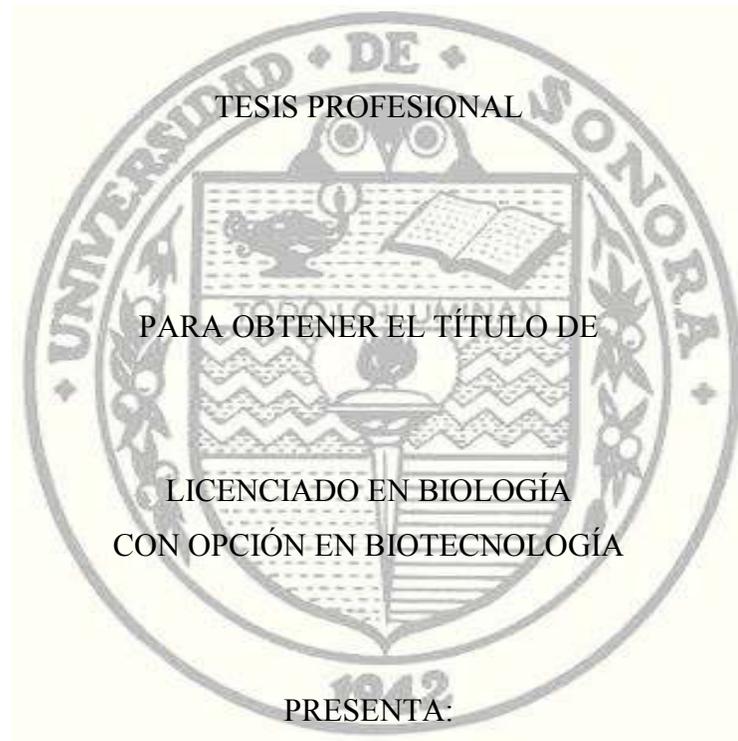


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS
GRASOS OLEICO Y LINOLEICO EN SEMILLAS DE *Jatropha cordata*



OMAR ALEJANDRO REYNA VALENZUELA

Hermosillo, Sonora

Agosto 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

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Omar Alejandro Reyna Valenzuela, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Licenciado en Biología con opción en Biotecnología.

Dr. Ángela Corina Hayano Kanashiro
Director de Tesis

Dr. Luis Ángel Medina Juárez
Sinodal Secretario

Dr. Alejandro Varela Romero
Sinodal

Dra. Nohemí Gámez Meza
Suplente

DEDICATORIA

A mis padres

Ustedes **hace años sembraron una semilla y ahora** obtienen su fruto.

AGRADECIMIENTOS

En el proceso de elaboración del proyecto de tesis, se encontraron involucradas un gran número de personas, todos colaborando de distintas formas, no obstante la ayuda recibida fue igualmente apreciada.

Este Proyecto fue Financiado por el Programa para el Mejoramiento del Profesorado (Promep) por Medio del Apoyo a la Incorporación de Nuevos Profesores 2014 con Número de Oficio DSA/103.5/14/7061.

A la Universidad de Sonora, que me dio la oportunidad de desarrollarme de manera profesional como lo fue de manera personal.

Al Departamento de Investigación Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), por haberme brindado sus herramientas esenciales para descubrir la Biología que tanto me apasiona y lo que por ahora será parte de mí, así como darme la oportunidad desarrollar investigación.

Agradezco enormemente a mi directora de tesis Dr. Ángela Corina Hayano Kanashiro, por depositar la confianza en mí de lograr este gran aprendizaje, por su paciencia, por sus comentarios, por sus valiosas enseñanzas, además de darme la oportunidad de trabajar hombro a hombro para sacar adelante la realización del presente trabajo, pero sobre todo por el apoyo que me otorgo del desarrollo del mismo. Muchas Gracias!

A los integrantes de mi comité de Tesis Dra. Nohemí Gámez Meza, Dr. Luis Ángel Medina Juárez y Dr. Alejandro Varela Romero, por la enorme ayuda en la redacción de tesis, consejos muy útiles tanto personal como profesional, por sus recomendaciones y guía a enriquecer este trabajo. Muchas Gracias!!

Quiero extender mi sincero agradecimiento a Pablo Lovio Fragoso, por tu amistad, apoyo, enseñanzas y sobre tu gran compañía en este periodo de trabajo, vivencias difíciles, estresantes y también confortables momentos dentro de este proceso.

A Claudia Molina, por tu tiempo prestado a ayudarme y enseñarme el funcionamiento de los equipos, así como los métodos para desarrollar los análisis de las muestras, pero sobre todo por tu cálida amistad y sinceridad.

Al laboratorio de Ecología molecular y los miembros que lo conforman, por sus comentarios y sugerencias para mantener la armonía.

A mis amigos que estuvieron en todo momento y para cualquier cosa, buenos y malos momentos, risas, depresiones, frustraciones y enojos, Paulina Ramírez y Uriel Campas por sus consejos y su entera amistad. Muchas Gracias

La realización de la tesis no hubiera sido posible sin el apoyo y cariño de Alejandra Ramírez, gracias por comprender y entender mi tiempo empeñado en este hermoso trabajo. Gracias por estar conmigo.

Finalmente quiero agradecer de corazón a las personas más importantes en mi vida, mi familia, a ellos debo todo lo que soy, la educación ética y personal que me han formado como persona de valores. A mis padres Leonardo Reyna San Martín y Francisca Valenzuela que día tras día están siempre a mi lado y me demuestran su cariño de distintas formas que le son posibles. A mi hermana Fátima Patricia Reyna Valenzuela que he sido y seré en ejemplo para ella, me da la fortaleza de seguir superándome un día a la vez.

CONTENIDO

ÍNDICE	Pág.
FORMATO DE APROBACIÓN	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
CONTENIDO	VII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
RESUMEN	XIV
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1. Género <i>Jatropha</i>	4
II.1.1 Características del Género <i>Jatropha</i>	4
II.1.2. Distribución del Género <i>Jatropha</i> en el Mundo	4
II.1.3 Distribución de las Especies de <i>Jatropha</i> en México	6
II.1.3.2 Distribución de las especies de <i>Jatropha</i> en regiones áridas de Sonora	7
II.1.3.3 Distribución geográfica de <i>Jatropha cordata</i> en Sonora	8
II.4 Condiciones Climáticas de Crecimiento de <i>Jatropha cordata</i>	8
II.5 Utilidad del género <i>Jatropha</i>	10
II.6 <i>Jatropha curcas</i> como modelo de investigación	10
II.7 <i>Jatropha cordata</i> como modelo de investigación en regiones áridas y semiáridas en el Estado de Sonora	12
II.7.1 Clasificación Taxonómica de <i>Jatropha cordata</i>	12
II.7.2 Descripción Botánica de <i>Jatropha cordata</i>	13
II.7.2.1. Árbol de <i>Jatropha cordata</i>	13
II.7.2.2 Usos prácticos del árbol de <i>Jatropha cordata</i>	15
II.7.2.3 Hojas, Flores y Fruto de <i>Jatropha cordata</i>	15

II.7.2.4 Semilla de <i>Jatropha cordata</i>	16
II.7.2.4.1 Propiedades físicas de la semilla de <i>Jatropha cordata</i>	17
II.7.2.4.2 Composición Química de la semilla de <i>Jatropha cordata</i>	17
II.8. Ácidos Grasos	18
II.8.1. Clasificación de los Ácidos Grasos	19
II.8.2. Nomenclatura de los Ácidos Grasos	20
II.8.3. Síntesis de Ácidos Grasos	20
II.8.4. Importancia de los ácidos grasos en la Industria	24
II.9. Biodiesel	25
II.9.1. Propiedades del biodiesel	27
II.10 Expresión de genes	28
II.11 Estudios Moleculares relacionados en la síntesis de Ácidos Grasos	29
II.11.1. Genes asociados a la Síntesis de Ácidos Grasos	32
II.11.1.1 Genes involucrados en la Síntesis de Ácido Linoleico	32
II.11.1.2. Genes involucrados en la Síntesis de Ácido Oleico	33
III. JUSTIFICACIÓN	36
IV. HIPÓTESIS	37
V. OBJETIVOS	38
V.1 Objetivos General	38
V.2 Objetivos Específicos	38
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	39
VI.1 Material Biológico	39
VI.2 Caracterización Física de la Semilla de <i>Jatropha cordata</i>	39
VI.3 Perfil de Ácidos Grasos	40
VI.3.1 Extracción de aceite y obtención de pasta residual	40
VI.3.2 Metilación de Ácidos Grasos	41
VI.3.3 Cromatografía de gases	41
VI.4 Molienda de la Semilla de <i>Jatropha cordata</i>	41
VI.5 Extracción de ARN Total	42
VI.5.1 Fase De Separación	42

VI.5.2 Precipitación De ARN Total	43
VI.5.3 Lavado De ARN Total	43
VI.5.4 Resuspensión De ARN Total	44
VI.6 Cuantificación de ARN Total	44
VI.7 Integridad de ARN total de <i>Jatropha cordata</i>	44
VI.8 Secuencias de genes relacionados a la síntesis de Ácidos Grasos usados en el presente estudio para <i>Jatropha cordata</i>	46
VI.9 RT-PCR Semi-Cuantitativo	47
VI.9.1. Síntesis De ADNc	48
VI.9.2. Reacción En Cadena de la Polimerasa (PCR)	50
VI.9.2.1 Preparación y Cuidados de las Perlas	50
VI.9.2.2 Preparación de los templados para PCR	51
VI.9.2.3 Determinación de los parámetros de ciclos y temperatura	51
VI.9.2.4 PCR Ready-To-Go beads	52
VI.10 Análisis de los productos de RT-PCR Semi-Cuantitativo	55
VI.10.1 Análisis de los productos de PCR en gel de agarosa 1%	55
VI.10.2 Análisis cuantitativo de expresión y obtención de imágenes de gel	57
VI.11 Análisis Estadístico	58
VII.RESULTADOS	59
VII.1.Recolección e Identificación de las Semillas de <i>Jatropha cordata</i>	59
VII.2 Caracterización física de las semillas de <i>Jatropha cordata</i>	60
VII.3 Determinación del Perfil de Ácidos grasos	60
VII.4 Obtención del ARN Total	63
VII.5 Cuantificación de ARN total	64
VII.6 Condiciones para el análisis de RT-PCR Semi-cuantitativo	64
VII.7 Expresión de los genes involucrados en la Síntesis de Ácido Grasos	66
VII.7.1.1 Genes involucrados en la Síntesis de Ácido Oleico	67
II.7.1.1 Análisis del gen <i>D9SD</i> se encuentra involucrado en la síntesis de Ácido Oleico	67
VII.7.1.2 Análisis del gen <i>KASII</i> relacionado en la elongasa del C16:0 a C18:	68

VII.7.1.3 <i>ACPI</i> actúa como un cofactor en síntesis de ácidos grasos	69
VII.7.2 Análisis de los genes involucrados en la Síntesis de Ácido Linoleico	72
VII.7.2.1 <i>FAD2-1</i> Y <i>FAD2-2</i> genes involucrados en la síntesis de Ácido Linoleico	72
VII.8 Análisis de correlación del perfil de ácidos grasos y expresión de genes en <i>Jatropha cordata</i> y <i>Jatropha curcas</i> .	75
VIII. DISCUSIÓN	77
IX. CONCLUSIONES	81
X. RECOMENDACIONES	82
XI. LITERATURA CITADA	83
XII. ANEXO	91

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Clasificación taxonómica de la planta <i>Jatropha cordata</i> .	13
Tabla 2	Nomenclatura de algunos ácidos grasos comunes	22
Tabla 3	Principales Países Productores de Biodiesel (Chávez <i>et al.</i> , 2010)	26
Tabla 4	Fórmula estructural para los ácidos grasos presentes en el biodiesel	28
Tabla 5	Secuencias de genes que codifican para la síntesis de ácidos grasos oleico y linoleico	47
Tabla 6	Reactivos y cantidades del Kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen)	48
Tabla 7	Reactivos y cantidades del Kit Ilustra Ready-To-Go RT-PCR Beads (G. E.)	49
Tabla 8	Componentes utilizados para la PCR con el Kit PCR Ready-To-Go Beads (G.E.)	52
Tabla 9	Determinación de los ciclos para cada gen en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).	53
Tabla 10	Determinación de condiciones de temperaturas para la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).	54
Tabla 11	Valores promedios del Perfil de Ácidos Grasos de aceite de semilla de <i>Jatropha cordata</i> y <i>Jatropha curcas</i> .	61
Tabla 12	Determinación de condiciones para la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).	66

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Distribución geográfica mundial del género <i>Jatropha</i> , ■ Puntos donde se ubica el género <i>Jatropha</i> en el mundo. Tomado de Discovery Life.	5
Figura 2	Distribución de <i>J. cordata</i> en Sonora. Tomada de Turner <i>et al.</i> , 2005.	9
Figura 3	Árbol de <i>Jatropha cordata</i> , en etapa seca y de floración, en el cerro de las Víboras, Hermosillo, Sonora.	14
Figura 4	Estructuras principales de <i>Jatropha cordata</i> . A) Hoja, B) Flores y C) Fruto de <i>Jatropha cordata</i> .	16
Figura 5	Semilla de <i>Jatropha cordata</i> A) Semilla completa, B) Cascara de la semilla C) Testa de la semilla	17
Figura 6	Estructura espacial de Ác. Linoleico	19
Figura 7	Esquema general de la síntesis metabólica de los ácidos grasos (Tomado de Ye <i>et al.</i> , 2003)	23
Figura 8	Ruta metabólica de ácidos grasos vegetal (participación de los genes <i>ACPI</i> , <i>KASII</i> y <i>D9SD</i> , <i>FAD2-1</i> y <i>FAD2-2</i>).	34
Figura 9	Gel de electroforesis de ARN total de las muestras en estudio. El ARN fue obtenido utilizando el método de TRIzol [®] Reagent (Invitrogen) y su integridad fue evaluada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% de ARN Total 1) <i>Jatropha curcas</i> . 2) <i>Jatropha cordata</i> .	63
Figura 10	Número de ciclos en la reacción de PCR. El gradiente se realizó para el gen de actina a 60.9°C. Carril 1: 25 ciclos, Carril 2: 27 ciclos, Carril 3: 29 ciclos, Carril 4: 31 ciclos Carril 5: 33 ciclos	65
Figura 11	Optimización de temperatura de alineamiento de la PCR realizado para el gen de actina. Carril 1: 60.2°C, Carril 2: 61.9°C, Carril 3: 64.4°C, Carril 4: 66.1°C Carril 5: 67.8°C	65
Figura 12	Producto del RT-PCR del gen <i>D9SD</i> . Los productos de PCR se presentan en Gel de agarosa al 1% teñido con Gel red (Biotium). Actina como gen control. Carril 1: Semilla de <i>J. curcas</i> . Carril 2: Semilla de <i>J. cordata</i> .	68

- Figura 13 Producto del RT-PCR del gen *KASII*. Los productos de PCR se presentan en 69
Gel de agarosa al 1% teñido con Gel red (Biotium) .Actina como gen control.
Carril 1: Semilla de *J. curcas*. Carril 2: Semilla de *J. cordata*.
- Figura 14 Producto del RT-PCR del gen *ACPI*. Los productos de PCR se presentan en 70
Gel de agarosa al 1% teñido con Gel red (Biotium) .Actina como gen control.
Carril 1: Semilla de *J. curcas*. Carril 2: Semilla de *J. cordata*.
- Figura 15 Análisis de expresión de los genes *D9SD*, *KASII* y *ACPI*. Comparación de los 71
niveles de expresión de los genes *D9SD*, *KASII* y *ACPI* y evaluados semi-
cuantitativamente por RT-PCR en relación al gen control actina, en semillas
de *J. cordata* y *J. curcas*. Los valores mostrados son el promedio de la
proporción de la señal específica del gen con la señal del gen de actina y la
Media \pm desviación estándar de tres réplicas.
- Figura 16 Producto del RT-PCR del gen *FAD2-1*. Los productos de PCR se presentan en 73
Gel de agarosa al 1% teñido con Gel red (Biotium) .Actina como gen control.
Carril 1: Semilla de *J. curcas*. Carril 2: Semilla de *J. cordata*.
- Figura 17 Producto del RT-PCR del gen *FAD2-2*. Los productos de PCR se presentan en 73
Gel de agarosa al 1% teñido con Gel red (Biotium) .Actina como gen control.
Carril 1: Semilla de *J. curcas*. Carril 2: Semilla de *J. cordata*.
- Figura 18 Comparación de expresión de los genes *FAD2-1* y *FAD2-2* involucrado en la 74
síntesis de Ác. Linoleico. Evaluación semi-cuantitativamente por RT-PCR, de
la cantidad de RNAm de los genes *FAD2-1* y *FAD2-2* en semillas de *J.*
cordata y *J. curcas*. Los valores mostrados son el promedio la proporción de
la señal específica del gen con la señal del gen de actina y la Media \pm
desviación estándar de tres determinaciones.

RESUMEN

El género *Jatropha* es perteneciente a la familia de las Euphorbiaceae, existen 185 especies distribuidas en el mundo, de las cuales 45 pertenecen a México. En el Noroeste del país se encuentra *Jatropha cordata*, una especie endémica del país que se encuentra adaptada a regiones áridas y semiáridas. Existen estudios en *Jatropha curcas* de genes relacionados con las rutas metabólicas de la síntesis de los ácidos oleico y linoleico. Sin embargo, la expresión del ARNm que codifica para las enzimas responsables de la síntesis de ácidos grasos presentes en la semilla de *J. cordata* no ha sido estudiada. Por lo tanto el objetivo del proyecto es determinar el perfil de ácidos grasos y analizar la expresión de los genes involucrados en la síntesis de ácido oleico y de ácido linoleico presente en las semillas de *Jatropha cordata*. Para lograr este objetivo se utilizó semillas en estado maduro del género *Jatropha*: *J. curcas* y *J. cordata*. Se realizó un perfil de ácidos grasos para ambas especies, encontrando los niveles más altos para los ácidos grasos oleico y linoleico. Se analizó la expresión del ARNm del gen *ACPI* que tiene una función como cofactor; de las desaturasas *D9SD*, *FAD2-1* y *FAD2-2*, y de la elongasa *KASII* mediante RT-PCR semi-cuantitativo. Se encontró una inducción mayor del gen *FAD2-1* en *J. cordata*. De la misma manera se observó que la expresión del gen *D9SD* tiene un efecto sobre el contenido del ácido oleico en la semilla. Los resultados de este trabajo permiten concluir que la expresión de los genes *ACPI* y *FAD2-1* en la síntesis de los ácidos oleico y linoleico, respectivamente, concuerdan con los contenidos de éstos ácidos grasos en la semilla de *J. cordata*.

I. INTRODUCCIÓN

México es considerado un país mega diverso, esto debido a su gran biodiversidad en todo el territorio. Es considerado uno de los 5 países con mayor riqueza biológica del planeta y aproximadamente el 50% de las especies mexicanas son exclusivas del país, teniendo un grado altísimo de endemismo (CONABIO, 2012). México es un país privilegiado, porque tiene recursos abundantes e inapreciables; debido a su gran variedad de climas y suelos es posible el crecimiento de tipos de flora muy diversos (Cruz et al., 2006).

El género *Jatropha* pertenece a la familia de las Euphorbiaceae. Estas especies se distribuyen principalmente en las regiones de África, Península Arábiga, India, Norte América y el Caribe (Peralta, 2010). Actualmente, se han descrito alrededor de 185 especies, de las cuales la mayoría de las especies son pertenecientes a regiones tropicales, subtropicales y semiáridas de América. En México, se encuentran 45 especies de *Jatropha* (Fresnedo y Orozco, 2012). Al noroeste del territorio nacional, se encuentran 4 especies de este género: *J. cordata*, *J. cinerea*, *J. cuneata*, *J. cardiophylla*, todas estas adaptadas a regiones de climas cálidos y secos, donde las precipitaciones pluviales oscilan entre los 500 mm (CONAGUA, 2015). Las especies localizadas al noroeste del país son arbustos, excepto *J. cordata*, que se considera un árbol importante para el matorral espinoso del desierto de Sonora (CONABIO, 2012). Su hábitat incluye el matorral espinoso, bosques tropicales caducifolios y algunos bosques de robles (Alday, 2011). La especie de *J. cordata* se suele encontrar asociada simpátricamente con otras especies a su alrededor de manera que forman colonias dispersas, comúnmente asociados a árboles y arbustos (Martin et al., 1998), y son característicos por ser árboles de crecimiento rápido así como que se encuentra de manera silvestre creciendo en laderas rocosas y suelos arenosos (Turner et al., 2005). La especie de *J. cordata* está bien adaptada a regiones áridas y semiáridas, utilizada para beneficio humano para la inflamación

de la encía (<http://132.248.9.34/hevila/ActamedicadeSonora/2011/vol12/no5/6.pdf>), además, suele ser utilizada por indígenas Yaquis y Mayos como artesanía (López, 2011).

La semilla de *J. cordata* contiene un alto contenido de aceite, el cual puede ser utilizado en la producción como biodiesel (Alday, 2011). En el mundo, el estudio de la planta de *Jatropha curcas* se ha desarrollado con un enfoque para la obtención de aceite (Makkar y Becker, 1997, Medina et al., 2014), y biocombustibles que sean propicios para mejorar el medio ambiente y sean una fuente baja de emisiones tóxicas (Alday, 2011). La industria petrolera ha sufrido una crisis por la insuficiente obtención del petróleo, el aumento de los costos y la indisponibilidad de los combustibles fósiles; siendo la contaminación atmosférica urbana una preocupación creciente (Montaño, 2010). Esta situación ha dado un gran impulso científico para desarrollar biocombustibles como el biodiesel (Montoya et al., 2006). Los biocombustibles se elaboran con materiales producidos por los seres vivos (Vivas, 2010); son alcoholes, éteres, ésteres y otros compuestos químicos generados a partir de los tejidos de plantas y animales, los residuos de la agricultura y de la actividad forestal y algunos desechos industriales, como por ejemplo los de la industria de la alimentación (Aquino et al, 2014). El biodiesel está compuesto por metilésteres de ácidos grasos de cadena larga, que se obtienen a partir de la reacción de transesterificación del metanol con aceites vegetales o grasas de origen animal (Vivas, 2010). Actualmente, la producción de materia prima que es destinada para el biodiesel son de cultivos tradicionales con fines alimentarios (Galaz et al., 2012), por lo tanto es necesario desarrollar cultivos oleaginosos alternativos con el fin de no destinar materia prima del mercado alimentario. En países de África, Oriente y Centroamérica se ha estudiado en particular el uso de plantas oleaginosas del género *Jatropha*, debido a que su aceite cumple con las exigencias necesarias y tiene como ventaja no ser utilizado de manera comestible (Falasca y Ulbercich, 2008). La composición del aceite de *Jatropha* muestra un contenido menor de ácidos grasos saturados (21,6%) y más ácidos grasos insaturados (78,4%) (Akbar, 2009). Según Akbar (2009), esta composición debe ser modificada para que sea una materia prima adecuada para la producción de biodiesel. Los aceites con más ácidos grasos saturados son deseables por la calidad de combustión/ignición del biodiesel, debido a que poseen un índice de cetano mayor y estabilidad oxidativa. A la especie *Jatropha curcas* se le ha dado

importancia por su producción alta de aceite usado como combustible alternativo al diésel, con contenido de ácidos grasos en la semilla del 30 al 45% que es igual o mayor que otras oleaginosas (Makkar y Becker, 1997). Aunque las vías metabólicas generales de síntesis de ácidos grasos en los tejidos de semillas de plantas son conocidas, estas resultan no ser claramente entendidas (Sinha et al., 2007). Sin embargo, es evidente a partir de varias líneas de estudio que a través de una vía predominante, el ácido oleico (C18:1), en la forma de oleoil-CoA (Coenzima A), se convierte en ácido linoleico (C18:2) por la enzima elongasa de ácidos grasos (AG). El flujo principal de elongación de carbonos en los ácidos grasos oleico y linoleico (C18:1 y C18:2) será sintetizado a partir del ácido graso palmítico (C16:0) debido a reacciones químicas y metabólicas, que están implicadas en la síntesis de ácidos grasos y las vías de desaturación (Sinha et al., 2007).

Investigaciones recientes con otras especies del mismo género como *J. cordata*, *J. cinerea* y *J. cardiophylla* (Hishida et al., 2013; Gámez et al., 2012), han demostrado un interés por el posible uso de sus semillas con el fin de producir aceite como una fuente comercial de biodiesel. Sin embargo, la utilización se ha restringido debido a la variabilidad del contenido de aceite en sus semillas y el bajo rendimiento económico de la plantación de *Jatropha* en la agricultura (Galaz, et al., 2012). La planta de interés que se propone en el presente estudio es *Jatropha cordata* (cuyo nombre común es torota o papelillo), que a diferencia de *J. curcas* (adaptada a regiones tropicales) se encuentra de manera silvestre adaptada a regiones de suelos áridos y semiáridos (CONABIO, 2000). Hasta el momento en avances en investigación para la especie de *J. cordata*, sólo se cuenta una caracterización química de la semilla (Gámez et al., 2012). En lo que a estudios moleculares concierne, actualmente no se ha reportado estudios de la expresión genética involucrada en la síntesis de ácidos grasos en la semilla de esta especie. Por tal razón, el objetivo del presente trabajo es generar información sobre esta especie de *Jatropha* a través del análisis de la expresión de los genes involucrados en la síntesis del ácido oleico (*D9SD*, *ACPI* y *KASI*) y genes involucrados en la síntesis del ácido linoleico (*FAD2-1*, *FAD2-2*) (Gu et al., 2012), así como también relacionarlos con el contenido de ácidos grasos presentes en la semilla de *Jatropha cordata*; lo que generará mayor conocimiento de esta especie y un panorama más amplio para su posible aprovechamiento.

II. ANTECEDENTES

II.1. Género *Jatropha*

II.1.1. Características del género *Jatropha*

Este género alberga árboles, arbustos o hierbas, generalmente monoicos, con los tallos a veces brotando de gruesas raíces, con indumentos de pelos simples y látex generalmente coloreado. Este género presenta hojas alternadas, pecioladas o sésiles, con el peciolo a veces glandular, enteras, dentadas, a menudo glandulares, con la nervadura palmeada o rara vez pinnada; con típulas presentes (Sanchez, 2010). Además, sus inflorescencias son bisexuales, en dicasios o en cimas, terminales o axilares, largamente pedunculadas, con brácteas enteras, a veces glandular-fimbriadas (López, 2011). Las flores masculinas son cortamente pediceladas, con el cáliz de 4-6 sépalos, regularmente connados en la base; poseen corola con 5 pétalos, libres o coherentes lateralmente, disco entero o segmentado en 5 glándulas libres, presenta también de 8-10 estambres, dispuestos de 1-2 verticilios, filamentos libres o connados parcialmente en una columna con anteras (González et al., 2012). Las flores femeninas son cortamente pediceladas, con sépalos y pétalos como en las flores masculinas; sin embargo, los sépalos presentan a veces foliáceos, disco anular, con 5 lóbulos o 5 glándulas libres, con estaminoidios a veces presentes. El ovario está compuesto de 1 a 5 lóculos (Sanchez, 2010).

La floración en *Jatropha* puede presentarse entre los 12 y 24 meses en condiciones muy favorables, pero normalmente es mayor. Los frutos presentan cápsula algo leñosa y dehiscente en 3 mericarpos bivalvos (Sanchez, 2010). La producción de semilla se estabiliza a partir del 4to y 5to año. El desarrollo del fruto toma alrededor de 90 días desde la floración

hasta la madurez de la semilla. Las semillas son de forma ovoide, carunculadas con endospermo carnosos (López, 2011).

II.1.2. Distribución del género *Jatropha* en el mundo

El género *Jatropha* pertenece a la familia de las Euphorbiaceae. Estas especies se distribuyen principalmente en las regiones de África, Península Arábiga, India, Norte América y el Caribe (Peralta, 2010). El género *Jatropha* está constituido aproximadamente por 180 especies, de las cuales generalmente son árboles y arbustos, aunque también se encuentran especies suculentas o hierbas (Sanchez, 2010); sólo seis especies fueron encontradas en África y Asia, sin embargo según el autor Hemming y Radcliffe (1987), señala la presencia de 26 especies de *Jatropha* en seis diferentes regiones localizadas al noreste del África tropical. Actualmente se reporta 186 especies registradas del género *Jatropha* alrededor del mundo (Fresnedo y Orozco, 2012).

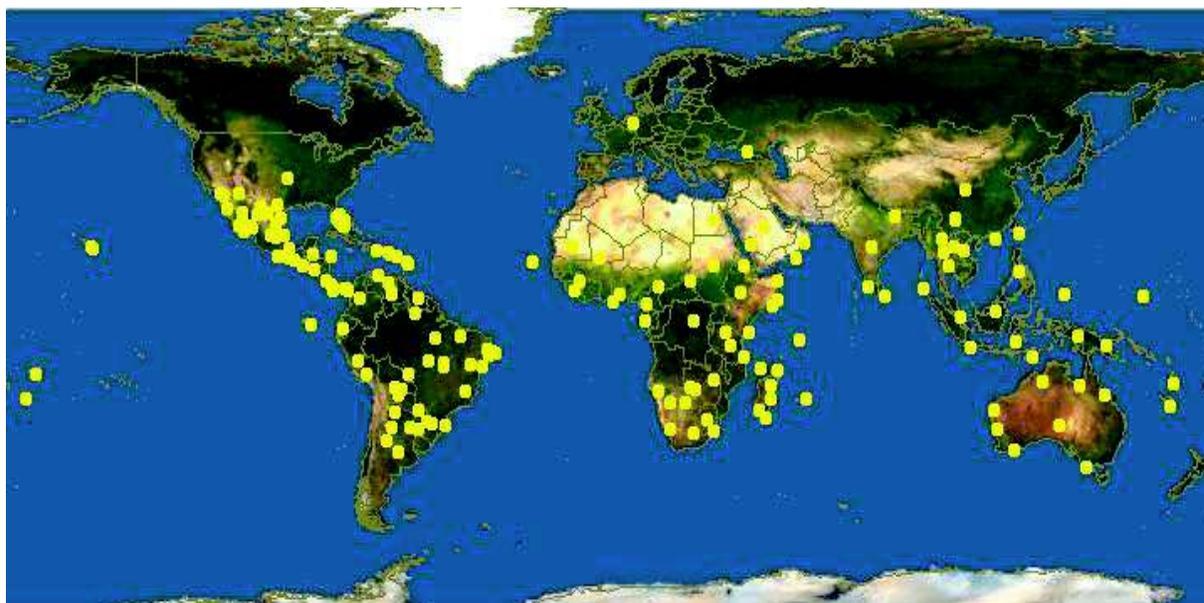


Figura 1. Distribución geográfica mundial del género *Jatropha*, los ■ puntos donde se ubica el género *Jatropha* en el mundo. Tomado de Discovery life.

De todas las especies del género *Jatropha*, la más estudiada a nivel mundial es *Jatropha curcas*. Esta especie es considerada como una prometedora fuente alternativa de biodiesel, dado que el aceite de este género es rico en el contenido de ácidos grasos insaturados en las semillas (Cruz et al., 2006) y además es una planta no útil para la alimentación o consumo humano, lo que la hace de mayor interés, ya que no se involucra en el sector comercial de consumo. En cuanto al uso de biodiesel, se ha considerado utilizar aceite de *Jatropha* y de palma ya que son materias primas que no compiten directamente con los alimentos y tienen altos rendimientos de aceite para elaborar biodiesel (Galeano et al., 2011).

Las semillas del género *Jatropha* son las principales fuentes de obtención de aceite y algunas de estas son tóxicas para consumo. Los aceites vegetales han sido utilizados para consumo humano en alimentación, sin embargo, también son la fuente principal y óptima para la producción de biodiesel. Sería un suceso alarmante si se utilizara la fuente de alimentación como un producto industrial (Costa, et. al., 2010).

II.1.3. Distribución del género *Jatropha* en México

Se cuenta con 826 especies de plantas en México, de las cuales 45 especies pertenecen al género *Jatropha* (CONABIO, 2012). De las 186 especies de *Jatropha* en el mundo, 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 y Orozco, 2012).

México es un país privilegiado, porque tiene recursos abundantes e inapreciables. Debido a su gran variedad de climas y suelos es posible el crecimiento de tipos de flora muy diversos (Cruz et al., 2006). Debido a su ubicación latitudinal, en la República Mexicana se sobreponen y entrelazan dos grandes regiones biogeográficas: la neártica y la neotropical. A ésta condición se suma una compleja historia geológica y una accidentada topografía

(CONABIO, 2000), lo que explica la enorme variedad de condiciones ambientales que hacen posible la excepcional riqueza biológica de México (CONABIO, 2012).

II.1.3.2. Distribución de las especies de *Jatropha* en regiones áridas de Sonora

En México se han registrado 46 especies del género *Jatropha* de las cuales dos de ellas son cultivadas, 45 especies son nativas y 38 son endémicas para el país. Los resultados de la distribución muestran que algunas especies de *Jatropha* se adaptan a diferentes condiciones climáticas, mayoritariamente se encuentran en trópicos y subtrópicos aunque también puede resistir a las bajas temperaturas en lugares secos donde hay escasez de agua, por lo tanto, están presentes en entornos tropicales, subtropicales, áridos y semiáridos. Especies como *J. cordata*, *J. cuneata*, *J. cardiophylla* y *J. cinerea* se distribuyen en zonas con condiciones ambientales bien definidas en regiones áridas y semiáridas (Fresnedo y Orozco, 2012).

La especie de interés en el presente estudio, *Jatropha cordata*, se encuentra distribuida a lo largo de las costas de Sonora a Oaxaca (Fresnedo y Orozco, 2012). *J. cordata* presenta una distribución principalmente en las regiones del norte de México, actualmente se encuentra disperso a través de las regiones áridas y semiáridas de México y con presencia también en los estados del sur de Estados Unidos (Arizona) (Felger et al., 2001). Debido a las características presentes de esta especie, es que puede ser contemplada en estos ambientes, ya que su crecimiento es en periodos cortos, muy resistente a la sequía y arbustos de hoja caducifolia. (Fresnedo y Orozco, 2012)

En función al interés de las especies que se encuentran en el estado de Sonora, las delimitaciones para *Jatropha cinerea*, se encuentra principalmente distribuida al norte de la región en la Península de Baja California y zonas de Sonora y Sinaloa, aunque se ha registrado en Oaxaca. *Jatropha cuneata* comparte área de distribución *J. cinerea*, pero está altamente representada hacia el sur de la Península de Baja California. *Jatropha cardiophylla* se delimita

por su presencia entre el norte de Sinaloa y Sonora. Sin embargo, la distribución de las especies, tales como *J. riojae* todavía no ha sido comprobada presencia en la entidad (Fresnedo y Orozco, 2012).

II.1.3.3. Distribución geográfica de *Jatropha cordata* en Sonora

A *J. cordata* se le encontrará en el desierto Sarcocaula por las costas de Sonora casi desde la desembocadura del Río Yaqui hasta donde desemboca el Río Magdalena, y en la península se extiende desde la isla Ángel de la Guarda, por un franja estrecha a lo largo de la costa hasta San José del Cabo (González et al., 2012). La especie de *J. cordata* se encuentra al sur del Estado de Sonora (Fig. 2), (Turner et al., 2005), hacia el norte a la región de Guaymas-San Carlos, y más al norte hacia Cucurpe y Río Bavispe en el centro-norte y el noreste de Sonora (Felger et al., 2001).

II.4. Condiciones Climáticas de Crecimiento de *J. cordata*

La especie *J. cordata* es considerada de importancia para esta región (López et al., 2011). Es un árbol de regiones áridas y semiáridas además de considerarse tener un crecimiento rápido, alrededor de 3 a 5 años, es tolerante a periodos de sequías y resistente a plagas que pudieran impedir su desarrollo (Sanchez et al., 2006).

El Desierto Sonorense se ha dividido en siete regiones correspondientes a sus características naturales desde tres puntos de vista geográfico, fisiográfico y florístico, también considerando el carácter y organización de las comunidades vegetales (González, 2012).

La lluvia es muy escasa e incierta y la precipitación no suele ser suficiente en estas zonas desérticas, pueden presentarse en verano o en invierno, aunque frecuentemente no cae durante varios años consecutivos; la temperatura en verano suele ser excesivas llegando a alcanzar los 50°C (CONAGUA, 2015).

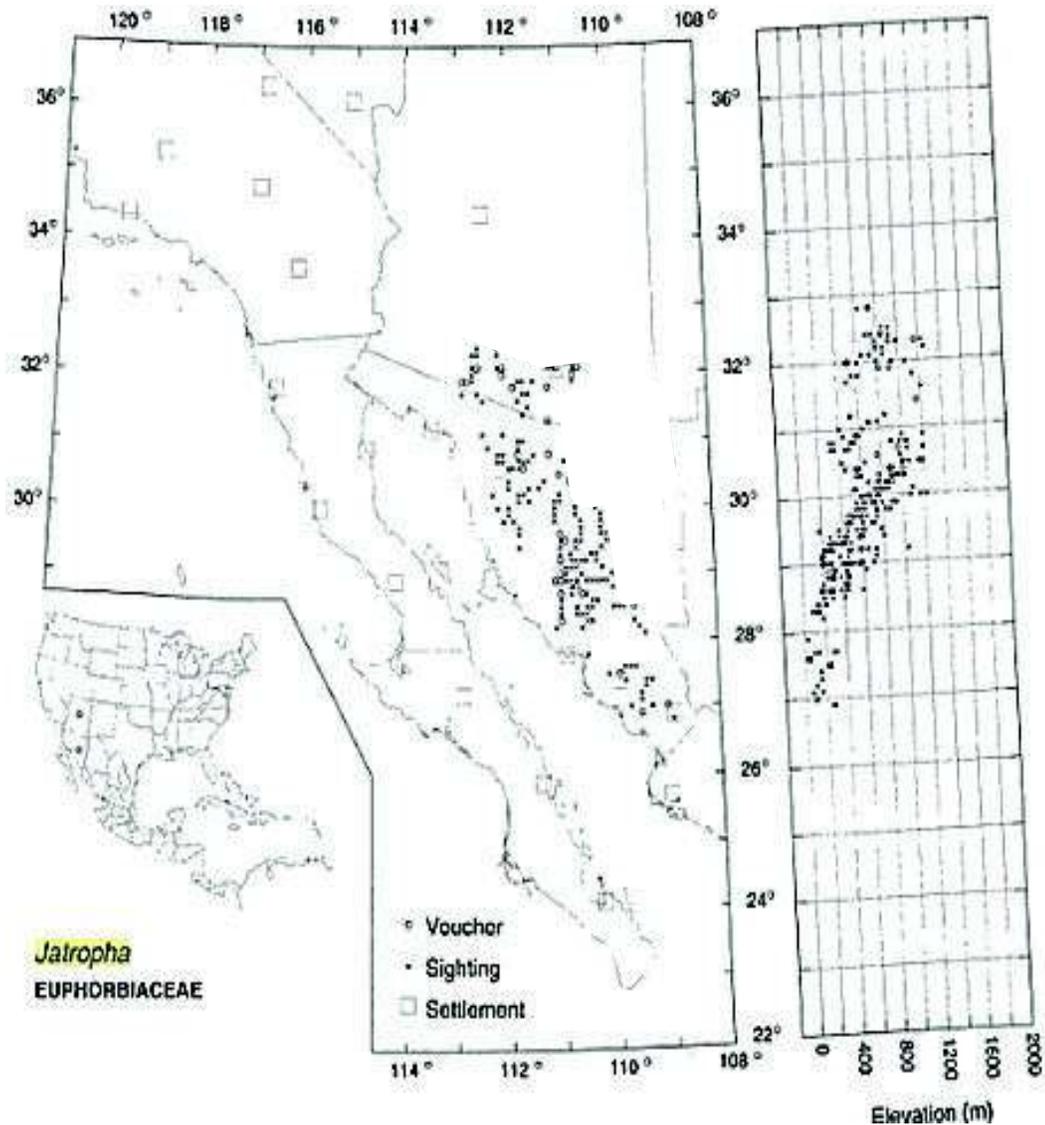


Figura 2. Distribución de *J. cordata* en Sonora. Tomada de Turner et al., 2005.

II.5. Utilidad del Género *Jatropha*

Los arbustos de este género son poco frecuentes en jardines, sin embargo suelen encontrarse de manera ornamental en las viviendas. También el aprovechamiento de estas plantas han sido mayormente utilizando las semillas de algunas especies; debido a su toxicidad, pueden ser utilizadas como purgativos enérgicos (Sanchez, 2010).

El género *Jatropha* tiene importancia económica, medicinal o como alimento para el ganado. Sin embargo algunas plantas son tóxicas y podrían causarle la muerte a un adulto. Las técnicas biotecnológicas pueden ser el factor clave que una todo el conocimiento para introducir las características deseables que son necesarias en el género *Jatropha*, en especial la especie *J. curcas* que ha llamado mucho la atención para desarrollar todo su potencial como fuente alternativa de biocombustibles natural renovable (Pabón y Hernández, 2012), sin embargo aunque es una especie que puede crecer en lugares arenosos y pedregosos secos, no es una especie que se desarrolle en condiciones de suelos áridos o semiáridos, debido al abastecimiento de agua a que estas regiones están expuestas (Cruz et al., 2006).

II.6. *Jatropha curcas* como Modelo de Investigación

Esta especie es originaria de América (Fresnedo y Orozco, 2012), se desarrolla naturalmente en regiones tropicales y subtropicales de altas pluviosidad, pero es cultivada en países de Asia y África, reconocida por ser un excelente cultivo debido a que incluso se ha adaptado a zonas semiáridas, además de tener pocas plagas y enfermedades. (Pabón y Hernández, 2012).

Como se mencionó anteriormente, esta especie es la más estudiada a nivel mundial y en México su rango de distribución es a lo largo de las costas del Pacífico y Golfo de México,

de Sinaloa a Chiapas y norte de Veracruz a la Península de Yucatán (Fresnedo y Orozco, 2012)

Las semillas de *J. curcas* tienen un contenido de ácidos grasos del 50%. Sus principales ácidos grasos son: ácido oleico (34.3-45.8%; 18:1), ácido linoleico (29.0-44.2%; 18:2), ácido palmítico (14.1-15.3%; 16:0) y ácido esteárico (3.7-9.8%; 18:0), debido a que se acumulan en niveles muy altos en el endospermo de las semillas de *Jatropha* (Costa et al, 2010). Sin embargo, el conocimiento de la taxonomía, distribución, y etnobotánica de las especies de este género está aún incompleta (Falasca y Ulbercich, 2008).

Asimismo, la especie *J. curcas* ha sido de importancia en la producción de fertilizantes y la medicina tradicional. El aumento de prevalencias de bacterias resistentes y cepas con reducida susceptibilidad a antibióticos han proporcionado la búsqueda de activos naturales, por lo cual, naturalmente *J. curcas* se ha implementado como medicina tradicional en el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas (Pabón y Hernández 2012). Además se han desarrollado aplicaciones biológicas para esta planta, específicamente para control biológico a partir del uso de principios activos obtenidos de diferentes partes de la planta que pueden controlar de manera eficiente hongos, parásitos y otros organismos (Pabón y Hernández, 2012)

Se ha sugerido que la especie *Jatropha curcas* pueda ser usada para estudios de biorremediación, puesto que, la planta ofrece una alternativa de recuperación del suelo rentable y viable con el medio ambiente. Para probar el impacto de *J. curcas* en fitorremediación de suelos se realizó un estudio en suelos contaminados con hidrocarburos, observándose una reducción de éstos entre 89 y 96% del contaminante (Pabón y Hernández, 2012). *J. curcas* es tolerante a la sequía, están bien adaptada a los suelos semiáridos de las zonas marginales y necesita sólo una lluvia moderada entre 300 y 1,000 mm por año (Gübitz et al, 1999), Por ejemplo, en estudios realizados en Egipto con la especie *J. curcas* se ha determinado que sólo necesita de 6 L de agua por semana durante su crecimiento y que la composición de los ácidos grasos no cambia con el régimen de riego (Galaz, 2012).

II.7. *Jatropha cordata* como Modelo de Investigación en Regiones Áridas y Semiáridas en el Estado de Sonora

Un elemento distintivo en la flora del Desierto Sonorense y los matorrales xerófilos circundantes lo constituyen las plantas anuales o efímeras del desierto (Oyama et al., 2006) que conforman un grupo diverso de herbáceas cuyo crecimiento responden únicamente a las lluvias de verano o de invierno (Peñalba et al., 2008).

Jatropha cordata pertenece a la familia de las Euphorbiaceae, es un importante componente en el matorral espinoso (Fresnedo y Orozco, 2012). Se le puede encontrar por encima de los 1000msnm sobre pendientes así como en planicies. Puede confundirse con Torote (*Brusera microphylla*) debido a que comparten morfología similar (López, et al., 2011). Además representa un tipo de árbol presente en el desierto de Sonora que ha desarrollado un interés significativo para la producción de biodiesel. Sin embargo, se conoce poco para hacerla una planta exitosa. (López et al., 2011).

II.7.1. Clasificación taxonómica de *Jatropha cordata*

Esta especie fue descrita por primera vez en 1999 con el nombre de *Jatropha cordata*, y es conocida comúnmente como Torota o papelillo.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la planta *Jatropha cordata*.

Reino:	Plantae
Phylum:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Euphorbiales
Familia:	Euphorbiaceae
Género:	<i>Jatropha</i>
Epíteto específico:	<i>cordata</i>
<u>Nombre Científico:</u>	<u><i>Jatropha cordata</i></u>

(Müll. Arg., 1999)

II.7.2 Descripción Botánica de *Jatropha cordata*

II.7.2.1. Árbol de *Jatropha cordata*

La torota o papelillo (nombre científico *Jatropha cordata*) pertenece a la familia Euphorbiaceae y es una planta leñosa que crece en regiones de zonas áridas y semiáridas, llega a medir entre 8-12 m de altura (López et al, 2011).

La especie de *Jatropha cordata* es un árbol (Fig. 3) que en algunos lugares llega a alcanzar hasta 10 m de altura; usualmente de aspecto más alto que ancho, de madera suave y

semi-suculenta y de ramas pequeñas flexibles. Posee un tronco bien desarrollado, la corteza desprende láminas delgadas como papel, estas láminas se aprecian mejor en las estaciones de invierno y primavera (López *et al.*, 2011). Presenta una superficie interior rojizo y el rojo-oro de la corteza recién expuestos los distingue de las especies del género *Bursera* (González *et al.*, 2012).



Figura 3. Árbol de *Jatropa cordata*, en etapa seca y de floración, en el cerro de las Víboras, Hermosillo, Sonora

II.7.2.2. Usos prácticos del árbol de *Jatropha cordata*

La corteza del árbol desprende pliego las cuales suele ser utilizada como un jabón que desprende aroma, además de ser atractivo para uso artesanal de algunas comunidades indígenas, suele ser utilizada por los indios Yaquis y Mayos para formar una famosa artesanía llamada “pascola”, también es usada por su madera blanda para hacer artesanía características en danzas ceremoniales (López et al., 2011).

II.7.2.3. Hojas, flores y fruto de *Jatropha cordata*

El árbol de *J. cordata* presenta hojas ovado-cordadas, crenadas, glabras, lustrosas de 1.5 a 4.5 cm de ancho y de 2.5 a 6 cm. de longitud (Fig. 4). El árbol tiene un follaje caducifolio; hojas simples alternadas, linear-lanceoladas u oblongas, de 5 a 18 cm de largo, asimétricas (López et al., 2011). El borde de la hoja tiene una pequeña vejiga muy característica que resalta de su borde aserrado (Sánchez, 2006).

Las flores presentan un color entre blanco a rosa (Fig. 4), urceolada de 4 mm de largo, en panículas; flores en racimos floridos de 3 a 10 cm, pedúnculos y pedicelos pequeños, sépalos frescos de 1.5 a 2.5mm; éstos últimos se encuentran unidos en la base. La corola es de 6 a 8 mm, con un tubo rosa o blanco; 8 estambre con glándulas basales tan largas como las anteras (Fig. 4). La floración se lleva a cabo en la etapa de verano (meses de Junio-Agosto) (López et al., 2011).

El fruto es alargado y pediculado de 7 a 18 mm que contiene una o hasta tres semillas en estado de maduración (Fig. 4); además la pulpa traslúcida contiene saponina (Alday, 2011).

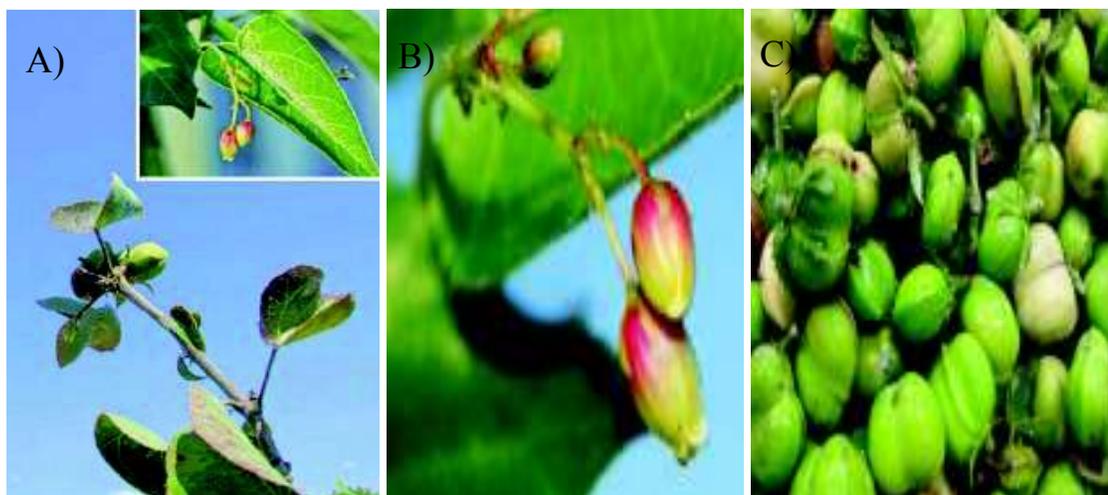


Figura 4. Estructuras principales de *Jatropha cordata*. A) Hoja, B) Flores y C) Fruto.

II.7.2.4. Semilla de *Jatropha cordata*

La semilla se forma a partir del rudimento seminal, localizado en el ovario de las flores, tras producirse la fecundación por los granos de polen (Molist et al., 2011). La semilla representa una cadena interminable que asegura la vida de su especie, así como proporcionan alimento a la humanidad, animales y otros seres vivos, además de ser materia prima para diversos productos empleados por el hombre (González et al., 2004).

El biólogo W. Heydecker dice: "la semilla es el principio y el fin, simboliza la multiplicación y la dispersión, la continuación y la innovación, la sobrevivencia, la renovación y el renacimiento". A la semilla de esta especie no se le atribuye un uso propio para el humano (Fig. 5A), aunque estas semillas no son tóxicas para consumo, no tienen ningún beneficio de alimentación ni uso medicinal (López et al., 2011).

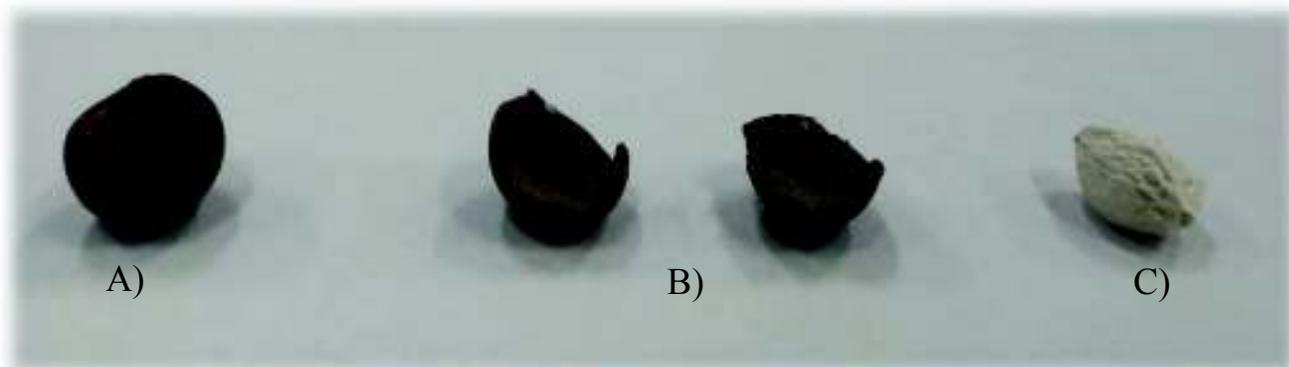


Figura 5. Semilla de *Jatropha cordata* A) Semilla completa, B) Cascara de la semilla C) Testa de la semilla.

II.7.2.4.1. Propiedades físicas de la semilla de *Jatropha cordata*

Generalmente se encuentran 2 semillas en cada fruto en estado de maduración, son de forma ovoide de 9 a 10mm, son ligeramente de coloración café oscuro. Según estudios la semilla tiende a tener un peso aproximado de 0.38g (Alday, 2011; López et al., 2011).

La relación almendra: cáscara es de 1:1.5, la almendra posee 46.6% del total de la semilla en comparación a la cascara que posee el 53.4% (Fig. 5B y 5C). La almendra o testa tiene una coloración blanca o color crema mientras que la cascara presenta una coloración café oscura (Alday, 2011)

II. 7.2.4.2. Composición química de la semilla de *Jatropha cordata*

La composición química de las semillas de *J. cordata* es variable. Se puede hablar por un lado de un conjunto de compuestos que está presente en todos los tejidos y por el otro de un

conjunto de compuestos de almacenamiento de reservas que está presente en las semillas en grandes cantidades (Alday, 2011)

De acuerdo a los reportes de Gámez (2012) acerca de la composición química de las semillas de *J. cordata*, los valores de acuerdo a sus componentes fueron los siguientes: humedad 4.91%, importante factor en lograr el éxito y proceso de germinación (Bewley y Black, 1982); grasa 34.76% al igual que la proteína 22.18%, dos componentes muy importantes en la semilla, ya que estos tienen la función de ser compuestos de reservas de nutrientes (Peralta, 2010). Se tiene registro de que en menor porcentaje la semilla está compuesta de cenizas con 5.04%, fibra con un 7.3%, y materia libre de N₂ con 25.81% este último indica que posee un buen porcentaje del principal nutriente para el crecimiento de las plantas (Gámez, 2011).

La composición química de las semillas está determinada genéticamente pero las cantidades relativas pueden variar en función de factores ambientales como la presencia de nutrientes minerales o el clima (Gallegos et al., 2011).

II.8. Los ácidos grasos

Los ácidos Grasos (AG) son ácidos monocarboxílicos alifáticos que pueden liberarse por hidrólisis de las grasas naturales (Fennema y Tannenbaum, 2000), se encuentran, raramente libres, y casi siempre esterificando al glicerol y eventualmente a otros alcoholes. Son generalmente de cadena lineal y tienen un número par de átomos de carbono. La conformación de un AG es por un grupo carboxilo en la parte terminal y un grupo metilo en el otro extremo (Guevara, 2011) como se puede apreciar en la figura 6. Son de importancia en los lípidos, ya que son los componentes principales de triglicéridos, diglicéridos monoglicéridos, esteres de esteroles y fosfolípidos (Fennema y Tannenbaum, 2000).

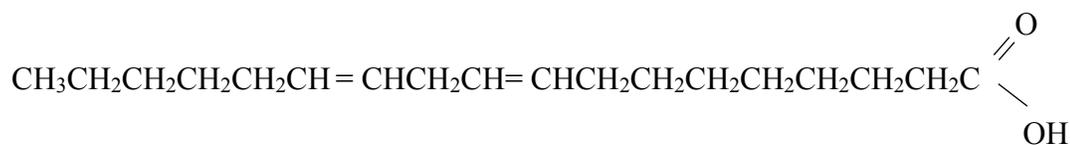


Figura 6 Estructura espacial de Ácido Linoleico

II.8.1 Clasificación de los ácidos grasos

En la naturaleza se pueden encontrar diversas formas de estructuras de los AG, por lo tanto se han clasificado por el número de carbonos e insaturación de tal manera que sea más perceptible. La longitud de la cadena va desde los cuatro carbonos del ácido butírico a los 35 del ácido ceroplástico. (Fennema y Tannenbaum, 2000). Teniéndose en cuenta el grado de insaturación que presentan los AG se clasifican de la siguiente manera:

- **Saturados:** Los enlaces de carbono se encuentran enlazados con átomos de hidrogeno y no presentan algún doble enlace en su estructura, son de ligadura simple entre C-C (Voet *et al.*, 2006). Estos AG se encuentran de 4 a 22 carbonos y los principales son: ácido butírico, ácido palmítico y ácido láurico (C12:0) entre otros. Los ácidos grasos saturados más comunes son los de 14, 16 y 18 átomos de carbono. Dada su estructura, los ácidos grasos saturados son sustancias extremadamente estables desde el punto de vista químico (Fennema y Tannenbaum, 2000).

- **Insaturados:** Se caracterizan por poseer dobles enlaces en su configuración molecular. Éstas son fácilmente identificables, ya que estos dobles enlaces hacen que su punto de fusión sea menor que en el resto de las grasas. Se presentan como líquidos y son lo que llamamos aceites. Estos ácidos grasos insaturados, se dividen a su vez en dos categorías: ácido graso monoinsaturado y ácido graso polinsaturado (Fennema y Tannenbaum, 2000).

- Monoinsaturados: Al igual que los ácidos grasos saturados, los AG insaturados pueden denominarse partiendo del nombre de hidrocarburos insaturados que posean (Fennema y Tannenbaum, 2011). Son cadenas de átomos de carbono que tiene un solo doble enlace. Estos AG tienen la presencia de 16 a 22 carbonos. Los AG monoinsaturados más comunes son: ácido palmitoleico (C16:1 n7), ácido oleico (C18:1 n9) y ácido erucico (C22:1 n9) (Voet *et al.*, 2006).

- Poliinsaturado: éstos están formados por 2 o más dobles enlaces en su estructura molecular (Voet *et al.*, 2006).

II.8.2. Nomenclatura de los ácidos grasos

Para facilitar la comprensión de la nomenclatura de los ácidos grasos, éstos utilizan el alfabeto griego para la identificación de la ubicación de los dobles enlaces. Comenzando la numeración con el grupo carboxilo, en letras arábicas, como el carbono número uno (C₁), el carbono alfa (α) es el carbono adyacente, de tal manera que, el último carbono correspondiente a la cadena es representado como carbono omega (Ω).

II.8.3. Síntesis de ácidos grasos

La célula necesita de elementos energéticos para llevar a cabo su óptimo funcionamiento y una vez que adquiere la concentración de sustratos oxidables elevada, éstos últimos son almacenados en forma de triacilglicéridos. Los triacilglicéridos son importantes en la célula y en general en los organismos como reserva energética (Vázquez, 2003).

La primera parte de este proceso, es la síntesis de ácidos grasos (AG) (Fig. 7), la cual se efectúa a partir de acetyl-CoA, ATP y el poder reductor del NADPH proveniente del ciclo de las pentosas fosfato y otros sistemas generadores (Voet et al.,2006). En presencia de exceso de glucosa el acetyl-CoA se deriva a la síntesis de AG, de manera que la carboxilación del Acetyl- CoA proporcione un precursor, Malonil-CoA, entonces se lleva a cabo reacciones químicas donde actuaran enzimas involucradas a la síntesis de AG y en posteriores ciclos van añadiéndose grupo de dos átomos de carbonos hasta llegar al palmitato, punto final de la síntesis. (Rodríguez, 2015) De este punto el palmitato o ácido palmítico se convierte en el precursor de otros ácidos grasos, mediante reacciones de elongación (Adición de dos átomos de carbono) que ocurren primeramente en el Retículo Endoplásmico (RE), donde las cadenas están unidas a CoA en vez de ACP, los sustratos son los ácidos grasos de 10 átomos de carbono y ácidos grasos insaturados y Elongación mitocondrial (Voet et al.,2006) y la desaturación de los ácidos grasos (proceso por el cual se adiciona un doble enlace en la cadena) se lleva a cabo en el RE liso y es regida por la enzima oxidasa que tiene funciones mixtas (Rodríguez, 2015).

Tabla 2. Nomenclatura de algunos ácidos grasos comunes.

N° de C	Nombre común: Ácido	Nombre Sistemático: Acido	Símbolo	Estructura
4:0	Butírico	Butanoico	B	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
6:0	Caproico	Hexanoico	H	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
8:0	Caprílico	Octanoico	Oc	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
10:0	Cáprico	Decanoico	D	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
12:0	Láurico	Dodecanoico	La	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
14:0	Mirístico	Tetradecanoico	M	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
16:0	Palmítico	Hexadecanoico	P	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
16:1	Palmitoleico	9-Hexadecanoico	Po	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:0	Esteárico	Octadecanoico	St	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
18:1	Oleico	9-Hexanoico	O	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:2	Linoleico	9,12-Octadecadienoico	L	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18:3	Linolénico	9,12,15-Octadecatrienoico	Ln	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
20:0	Eicosanoico	Araquídico	Ad	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
20:4	Araquidónico	5,8,11,14-Eicosatetraenoico	An	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
22:1	Erúxico	13-Docosenoico	E	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$

En la siguiente imagen (figura 7) se observa el proceso de la síntesis de ácidos grasos que ocurre a través de la condensación de unidades de dos carbonos (Vázquez, 2003).

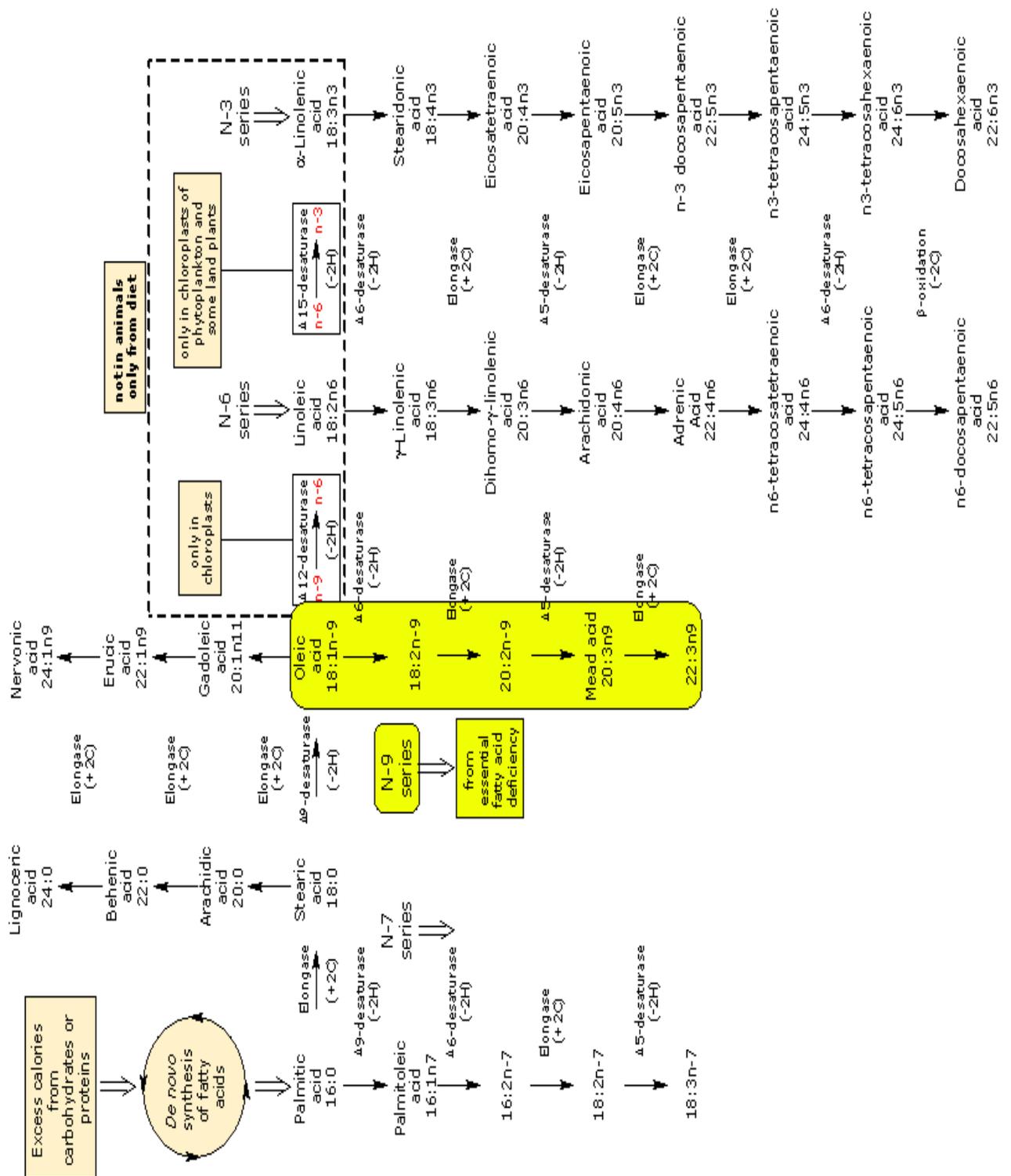


Figura 7. Esquema general de la síntesis metabólica de los ácidos grasos (Tomado de Ye et al., 2003).

II.8.4. Importancia de los Ácidos Grasos en la industria

Actualmente ha llamado mucha la atención los ácidos grasos n-6 y n-3, precursores del ácido linoleico (18:2 n-6) y el ácido alfa-Linolénico (18:3 n3). Dichos ácidos grasos sufren desaturaciones y elongaciones, produciendo diversos metabolitos de suma importancia en las funciones biológicas (Guevara, 2011).

Algunas plantas oleaginosas, que tienen como principal característica el acumular aceite como fuente de reserva en semillas y frutos, son requeridas para la elaboración de artículos así como de uso en la alimentación. Cada especie oleaginosa genera un tipo de aceite con distinta concentración y calidad de ácidos grasos. Los aceites de oleaginosas presentan un alto contenido de ácidos grasos mono y polinsaturados (Fennema, 2000). Los ácidos grasos como el oleico y linoleico que tienen presencia en el aceite son utilizados en la fabricación de distintos productos industriales como lubricantes, jabones, cosméticos, textiles, plásticos, adhesivos insecticidas, pinturas, tintes entre otros. Además el aceite es una alternativa potencial para la obtención de energía renovable de manera rentable, al obtenerse un alto rendimiento que varía entre 43 y 59 %, dependiendo de la variedad de las semillas que se utilice (Pabón y Hernández, 2012).

Según Kumar y Sharma (2008), el aceite proveniente de la semilla de *J. curcas*, que es característico por poseer alto contenido de ácidos grasos oleico y linoleico constituyendo del 72 al 80% el contenido total de ácidos grasos (Galaz, et al 2012), fue usado en motores en África en la Segunda Guerra Mundial, en Tailandia fue probado en motores con rendimientos satisfactorios y se utiliza en la iluminación de algunas calles cerca de Río de Janeiro (Kumar y Sharma, 2008).

II.9. Biodiesel

A pesar de que el petróleo se acumuló bajo la corteza terrestre por millones de años (Peñalba et al., 2008), la implementación del hombre en su consumo lo ha ido rezagando, de tal manera que en la actualidad este recurso sea escaso. Por lo tanto debido a que la humanidad ve que este recurso se está agotando, se han propuesto diversas fuentes de energía renovable (Chávez et al., 2010).

El biodiesel es un combustible alternativo para el diésel del petróleo, es producido principalmente por una reacción llamada transesterificación; llevada a cabo entre un aceite y un alcohol en presencia de un catalizador, para obtener los mono-alquil ésteres y glicerol, que luego se separan y se purifican (Uribe, 2010).

La transesterificación fue conocida a principios de 1846 cuando Rochieder describió la preparación de glicol por etanólisis de aceite de ricino (Meher et al., 2006).

A través de los años, la generación de una fuente renovable de combustible ha sido propuesta como un modelo de innovación. El biodiesel es 100% biodegradable, además se reduce la contaminación. Las emisiones netas de Dióxido de Carbono (CO₂) y de Dióxido Sulfuroso (SO₂) se reducen un 100%. La emisión de hollín se reduce un 40 - 60% y las de hidrocarburos (HC) un 10-50 % y la emisión de Monóxido de Carbono (CO) se reduce un 10-50% (Chávez et al., 2010).

Unidades de plantas de refinación de aceites comestibles han sido transformadas para la producción de biodiesel (Uribe, 2010). Sin embargo, los precios en los costos de producción continúan siendo muy elevados, debido a las dificultades por el suministro y un gran contenido de ácidos grasos libres (FFA por sus siglas en inglés Free Fatty Acids) (OCDE-FAO, 2013).

En el mundo la producción de biodiesel es destacado por instituciones como: BDP (Bioenergy Development Program of Canadá), PORIM (Palm Oil Research Institute of Malasia), Coperative Asperhofen - Austria y CENPES/DIPROD del Brasil; en investigación y ensayo son líderes las Universidades de Missouri, Iowa, Illinois e Idaho en los Estados Unidos, Saskatchewan en Canadá, Göttingen en Alemania y Graz en Austria, además de las instituciones: NBB (National Biodiesel Board), DOE (US Department of Energy), USB (United Soybean Board) y FPRF (Fats and Proteins Research Foundation) (Chávez et al., 2010).

De acuerdo a los comentarios anteriores se resaltan los principales productores de biodiesel del mundo en la Tabla 3:

Tabla 3. Principales Países Productores de Biodiesel (Chávez et al., 2010).

Países Productores de Biodiesel	Porcentaje
Alemania	63%
Francia	17%
Estados Unidos	10%
Italia	7%
Austria	3%

En base a los estudios de Chávez y colaboradores (2010), los litros de biodiesel obtenidos por hectáreas de cultivos de plantas oleaginosas, pertenecen a plantas de origen vegetal que son utilizados en el consumo alimenticio tales como coco y aguacate principalmente, sin embargo, especies de palma y *Jatropha* también se encuentran con alta producción de litros y éstas últimas no se le atribuyen un uso alimenticio (Chávez et al., 2010).

Algunas plantas usadas para la producción de biodiesel son:

- Soja (*Glicine max*): 420 litros
- Arroz (*Oriza sativa*): 770 litros
- Tung (*Aleurites fordii*): 880 litros
- Girasol (*Helianthus annuus*): 890 litros
- Cacahuete (*Arachis hipogaea*): 990 litros
- Colza (*Brassica napus*): 1 100 litros
- Ricino (*Ricinus communis*): 1 320 litros
- Piñon (*Jatropha curcas*): 1 590 litros
- Aguacate (*Persea americana*): 2 460 litros
- Coco (*Cocos nucifera*): 2 510 litros
- Cocotero (*Acrocomia aculeata*): 4 200 litros
- Palma africana (*Elaeis guineensis*): 5 550 litros

II.2.1. Propiedades del biodiesel

Las características del biodiesel son las siguientes:

- ✓ Combustible limpio.
- ✓ Es biodegradable.
- ✓ No tóxico.
- ✓ Alto índice de lubricidad.
- ✓ Libre de azufre y aromáticos.

El biodiesel es un combustible oxigenado (en la Tabla 4 se presenta la formación estructural de los ácidos grasos asociados al biodiesel) por eso tiene una combustión completa en comparación al diésel derivado del petróleo y produce menos gases contaminantes. Tiene un punto de inflamación relativamente alto (150 °C) que le hace menos volátil que el diésel del petróleo y es más seguro de transportar (Montaño, 2010).

Tabla 4. Fórmula estructural para los ácidos grasos presentes en el biodiesel.

Ácidos Grasos	Carbonos y dobles enlaces	Estructura química (= denota los dobles enlaces)
Caprílico	C8	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
Cáprico	C10	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
Láurico	C12	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
Mirístico	C14	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Palmítico	C16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Palmitoleico	C16:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Estearico	C18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Oleico	C18:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linoleico	C18:2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linolénico	C18:3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Araquídico	C20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
Eicosenoico	C20:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$
Beénico	C22:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
Eurírico	C22:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$

II.10. Expresión de Genes

La expresión génica es dinámica, y el mismo gen puede actuar de diferentes maneras en diferentes circunstancias. No todos los genes se expresan, sino que en cada tipo celular y en cada momento funcional hay un perfil de expresión génica que proporciona a cada célula su identidad y le permite adaptarse a las funciones que debe realizar (FIBAO, 2007). Los procesos de regulación de la transcripción dirigen esta expresión diferencial de genes en los distintos tipos celulares y en los distintos estados funcionales. Estos genes que muestran

diferencias en su expresión suelen estar implicados con mecanismos que alteren la funcionalidad correcta en la célula (Oliva y Vidal, 2006).

El análisis de expresión diferencial es uno de los análisis más utilizados para expresión génica, nos permite localizar genes que se expresan diferente entre los experimentos y ver en qué se diferencian entre sí las diversas muestras (Cañizares, 2010). En cambio los análisis de expresión temporal indican la tasa de expresión de los genes a una señal reguladora (Nicholson, 2008).

Los patrones de expresión espacio-temporales de transcritos han resultado muy útiles en la inferencia funcional de los genes que codifican para factores transcripcionales y estos pueden regirse por 3 tipos de respuesta (Pérez y Álvarez 2009), la primera se caracteriza por el aumento de la tasa de expresión génica que depende de la presencia continua de la señal inductora (factor de desarrollo), la segunda caracterizada por la elevada tasa de expresión génica que es temporal aun con la presencia continua de la señal reguladora (de sensibilidad-recuperación) y la tercera respuesta se observa en presencia de la señal reguladora como una tasa elevada de la expresión génica que persiste de manera indefinida aun después de la terminación de la señal (alteración irreversible) (Curtis et al., 2008).

II.11. Estudios Moleculares Relacionados en la Síntesis de Ácidos Grasos

En estudios previos con *Jatropha curcas L.*, se utilizaron semillas disecadas para recoger el endodermo, a estas semillas se les realizó un proceso de limpieza, remojo y también de germinación para obtener el nivel bioenergético del aceite de la semilla (Costa et. al., 2010). Para llevar a cabo se realizó el aislamiento de ARN a partir de los endospermos en desarrollo (JD) a los 19, 26, 33 y 40 días después de la polinización y de los endospermos de germinación (JG) a los 24, 36, 48 y 72 horas después de la inhibición en semillas de *J. curcas*, además cada marcador de secuencia expresada (EST por sus siglas en inglés *expressed*

sequence tag) fueron secuenciadas con el primer M13F con el fin de buscar secuencias putativas codificadoras. En el estudio se obtuvieron 20 genes más expresados en JD, de los cuales los más importantes son: 3 genes pertenecen a la globulina 11S (Contig153, Contig 81 y Contig 818) y 1 gen codifica para una aspartil proteasa (Contig254), que son conocidos por estar involucrados en el procesamiento de proteínas (Voigt, 1997). Tres genes que codifican para el inhibidor de la proteínasa de la cisteína (Contig1184, Contig515 y Contig1058) que se conocen estar involucrados en la movilización de las proteínas durante la germinación (Grudkowska y Zagdanska, 2004) y un gen más del inhibidor de la proteínasa de la cisteína (Contig724) involucrado en el control espacial y temporal de la movilización de la proteína de cisteína en el almacenamiento durante la germinación de la semilla (Moslov et al., 2005). El Contig1038 también mostrado como importante en relación a la ruptura de las reservas de aceite y de hidratos de carbonos, como acetil-CoA C-aciltransferasa. En el estudio se contribuyó con la anotación de secuencias de ESTs durante el desarrollo y germinación de la semilla de *J. curcas* (Costa et al., 2010).

También se ha llevado a cabo un estudio donde se analizaron los perfiles de expresión temporal de 21 genes que codifican a lípidos involucrados en 5 diferentes etapas de las vías que conducen a la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (TAG) dentro de semillas de *Jatropha curcas* en desarrollo. Ello, usando la tecnología de PCR tiempo real (Xu et al., 2011). El análisis se llevó a cabo también en las hojas y en las puntas de las raíces de *J. curcas*. En este estudio los 21 genes presentaron diversos patrones de expresión temporal durante el desarrollo de la semilla, 17 genes (cGPDH, DGAT1, heteroACC, HomoACC, KASI, KASII, KASIII, LPAT, Mitou3, Ole1, Ole2, PAP, PDAT, PDCE1a, PDCE1b, PDCE2 y pGPDH) fueron expresados en el desarrollo de la semilla, en particular los genes mayormente inducidos fueron Ole1 y Ole2. Solo 4 genes (Chlou3, Chlou6, DGAT2 y pGPAT) tenían menor inducción en el desarrollo de la semilla que en la hoja. Los 21 genes mostraron alta relación de expresión, lo que indica que presentan una fuerte diferenciación temporal durante del desarrollo de la semilla (Xu, et al., 2011).

Además también se ha utilizado a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* donde se han reconocido las funciones de las enzimas ACP, KASI, KASII, SAD, SADI, D9SD, en la producción del ácido oleico y FAD2-1, FAD2-2 y FAD6 en la producción de ácido linoleico, todas estas enzimas involucradas en la ruta metabólica de la síntesis de ácidos grasos (Ye et al., 2013).

También se ha llevado a cabo el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) una alternativa atractiva ya que permite la investigación de las funciones de genes sin la transformación de plantas (Ye et al. 2009). Aunque en *Jatropha* no se sabe que infecte el virus de cascabel del tabaco (TRV), los autores encontraron que este virus era capaz de infectar a *Jatropha*; en consecuencia, se utilizó el sistema de TRV para VIGS en *Jatropha*. Basado en el perfil de ácidos grasos y expresión génica de *Arabidopsis*, se propuso un modelo de trabajo con cinco genes funcionales importantes en la vía de la síntesis de ácidos grasos de las semillas de *J. curcas*. Se utilizaron algunos genes que codifican para ácidos grasos desaturasas que fueron utilizados para silenciar la expresión del gen que codifica para la enzima encargada de la síntesis del ácido linoleico, entre los cuales están *FAD2-2* y *FAD6*, sin embargo el gen *FAD2-1*, es el principal para el control del contenido de ácido oleico (Gu et al., 2012). Además los genes *ACP* (proteína transportadora de acilo) y *SADI* (estearoil- ACP desaturasa) son otros genes importantes en la regulación del contenido de ácidos grasos saturados también utilizados en este estudio. Con esta manipulación la concentración de ácidos grasos saturados aumentan en el aceite de la semilla de *J. curcas* (Ye, et al., 2013).

La semilla de la planta de *Jatropha curcas* contiene un 42 % de aceite el cual tiene propiedades fisicoquímicas semejantes a la de los aceites comestibles y no es tóxico, como otros aceites (Cruz et al., 2006). Se tiene en cuenta que el biodiesel con alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados, poseen las condiciones óptimas con respecto a la calidad de ignición, emisiones de óxidos de nitrógeno y estabilidad del combustible además de brindarle mayor estabilidad oxidativa al aceite (Chávez, et al., 2010). En *Jatropha curcas* el ácido graso con mayor abundancia es el ácido linoleico, el cual tiene dos dobles insaturaciones. Aunque se considera que el ácido oleico, con una doble insaturación, debe ser el ácido graso más

abundante de acuerdo a que las desaturaciones reducen la estabilidad del mismo y afecta el número de cetano (Ye et al., 2013).

II.11.1. Genes asociados a la síntesis de ácidos grasos

II.11.1.1. Genes involucrados en la síntesis de ácido linoleico

El gen *FAD2-1* (Fatty Acid Desaturase), está involucrado en la síntesis de ácido linoleico, se expresa sólo en la semilla en desarrollo en el género *Jatropha* y su nivel de expresión aumenta en gran medida cuando se induce la biosíntesis de aceite (Williams, 1997). Son enzimas desaturasas que regulan la insaturación de los ácidos grasos a través de la introducción de dobles enlaces entre los carbonos definidos de la cadena de acilo graso (Gu et al., 2012)

Un estudio reciente demostró que a menor regulación de *FAD2-1* en *Jatropha curcas* por la tecnología de ARN de interferencia causó un aumento dramático de ácido oleico (> 78%) y una reducción correspondiente en ácidos grasos poliinsaturados (<3%) en el aceite de las semillas (Gu et al., 2012).

El gen *FAD2-2* (Fatty Acid Desaturase) está asociado con la síntesis del ácido linoleico, el cual codifica para la enzima de la familia desaturasa, la más importante en la síntesis de ácidos grasos y especialmente en la semilla (Ye et al., 2013).

II.11.1.2. Genes involucrados en la síntesis de ácido oleico

El gen *D9SD* (*Delta 9 Estearoil-acilo Desaturasa*), involucrado en la producción de ácido oleico en la semilla. Este gen es codificador de la enzima Estearoil- ACP Desaturasa (*D9SD*), la cual convierte estearoil-ACP a oleoil-ACP en la ruta de síntesis de ácidos grasos (Habib *et al.*, 2000). Esta enzima se ha aislado y secuenciado en plantas productoras de aceite como la colza y cártamo (Habib *et al.*, 2000).

El gen *KASII* β -cetoacil ACP sintasa II, tiene la función de codificar para la enzima que actúa en la elongación de la cadena de carbono, esto se lleva a cabo en la elongación final de C16:0 (Ác. Palmítico) a C18:0 (Ác. Esteárico). Este gen codifica para la enzima β -cetoacil ACP sintasa II y se ha utilizado para mejorar la producción y la acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) principalmente en cultivos de oleaginosas. La enzima *KASII* participa en el ciclo de extensión de la cadena en el séptimo carbono durante el desarrollo de la semilla (Costa *et al.*, 2010).

El gen *ACPI* que codifica para la proteína portadora de acilo, se desarrolla actuando como una proteína ácida, siendo ésta el cofactor en la ruta metabólica de la biosíntesis de ácidos grasos vegetal (Branen *et al.*, 2001). La proteína portadora de acilo (ACP) es un cofactor importante para la biosíntesis de ácidos grasos en todos los organismos vivos (Ohlrogge, 1987). Es una pequeña proteína ácida de 9 kD con un residuo conservado que se conecta a través de un enlace fosfodiéster a un grupo prostético 4-phosphopantetheine. El grupo fosfopanteteína se une a ácidos grasos por medio de un enlace tioéster. De este modo, la ACP es capaz de transportar las cadenas de acilo a través de los ciclos de condensación, reducción y deshidratación, los cuales son los pasos en la biosíntesis de ácidos grasos (Branen, *et al.*, 2001).

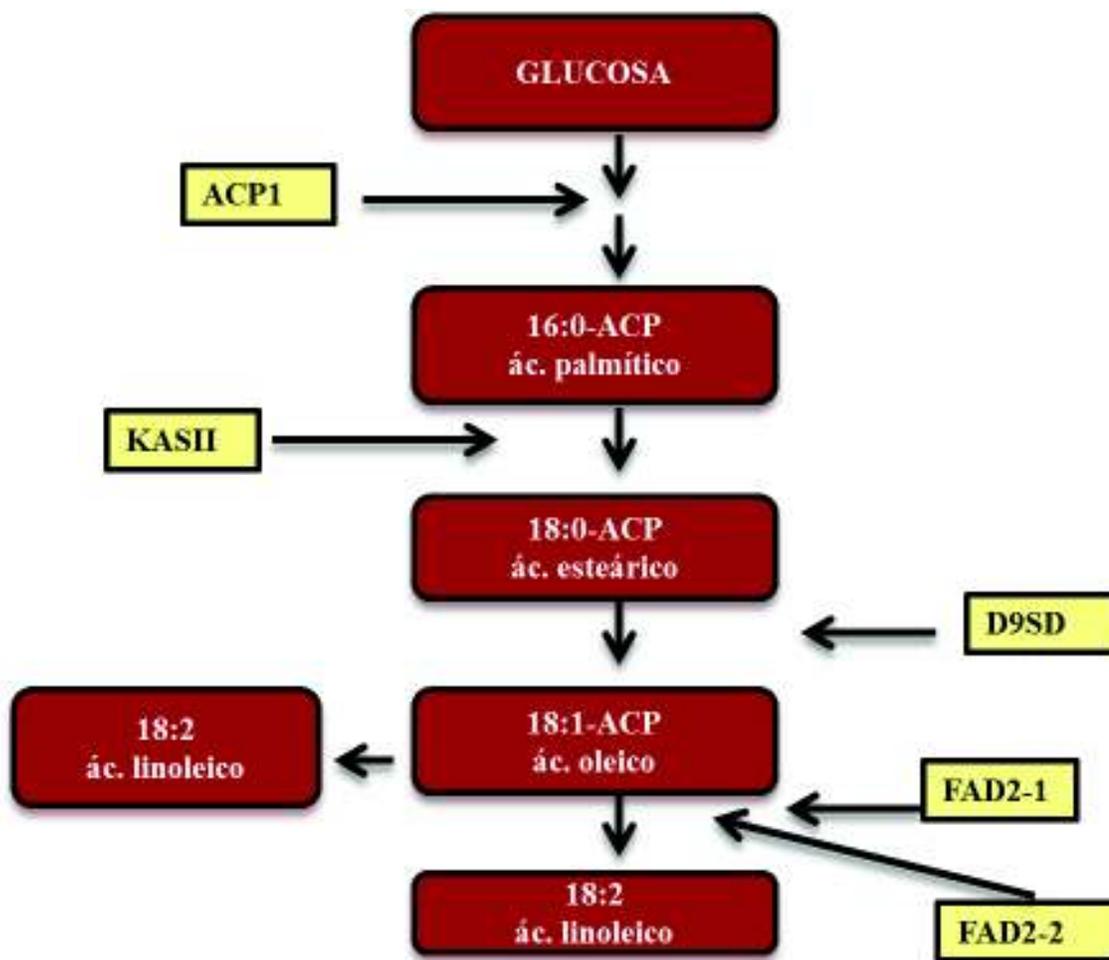


Figura 8. Ruta metabólica de ácidos grasos vegetales (participación de los genes *ACPI*, *KASII* y *D9SD*, *FAD2-1* y *FAD2-2*).

El perfil de expresión génica de una célula es una medida de la actividad de miles de genes simultáneamente, para crear una imagen global de la función celular (Rodríguez, et al., 2006)

Es importante llevar a cabo un análisis de expresión de genes involucrados en la ruta de síntesis de ácidos grasos de este cultivo de *Jatropha* para determinar el contenido de aceite, para conocer la composición de aceite, para eliminar los compuestos tóxicos, para demostrar si es posible aumentar la tolerancia a la sequía, etc. El contenido de aceite de semilla de *Brassica sp.* y *Arabidopsis thaliana* se ha incrementado por la sobreexpresión de diacilglicerol-acil-

transferasa, ácido lisofosfatídico aciltransferasa y glicerol-3-fosfato- aciltransferasa (Natarajan et al., 2010).

El silenciamiento de la esteroil-ACP desaturasa incrementa dramáticamente el contenido de ácido graso saturado (ácido esteárico) de 1,2% a 32% en *Brassica* (Knutzon et al., 1992). Por lo tanto, es posible que el aumento del contenido y la composición especializada de aceite de semilla pueda ser aplicado en especies del género *Jatropha* (Pabón y Hernández, 2012).

La ciencia ha proporcionado diversos avances tecnológicos que potencian al máximo los recursos naturales que se nos proveen, por este motivo se han realizado diversos estudios como silenciar el rol genético de algún gen en una semilla con el propósito de desarrollar o aumentar el proceso biológico de un ácido graso en particular (Gu et al., 2012). Este y otros estudios se han llevado a cabo en la especie de *Jatropha curcas*, sin embargo para otras especies del mismo género *Jatropha* se tiene escasa información y para las especies de *Jatropha* que se encuentran en la región de Sonora se encuentra nula información en bases moleculares y poca información en otros ámbitos.

En base a lo expuesto anteriormente, resulta de alto interés el generar información científica para *Jatropha cordata*, por tal razón, se consideró importante analizar el nivel de expresión de los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos oleico y linoleico y evaluar el contenido de ácidos grasos presentes en la semilla de *Jatropha cordata*. Además de tener en cuenta que esta especie se encuentra accesible en una región árida donde las condiciones para muchas plantas pueden ser hostiles.

III. JUSTIFICACIÓN

La gran biodiversidad de México, se debe a su ubicación latitudinal, por lo cual es considerado un país megadiverso (Sarukhán, 2009), el cual alberga del 10 a 12% de las especies del planeta (CONABIO, 2000), lo cual lo convierte en uno de los países con mayor diversidad biológica en el mundo. En el ámbito botánico, México cuenta con el 10% de las especies de plantas superiores del planeta, de las cuales más del 40% de ellas son de hábitats exclusivos del territorio nacional (Sarukhán, 2009), es decir endémicas para el país.

Se cuenta con 826 especies de plantas en México, de las cuales 45 especies pertenecen al género *Jatropha* (CONABIO, 2012), dentro de este género la especie *Jatropha curcas*, propia de regiones tropicales y subtropicales, es la más estudiada por ser una fuente alternativa de biodiesel debido a su alto contenido de aceite. Sin embargo, existen especies adaptadas a regiones áridas y semiáridas (Fresnedo y Orozco, 2012), que han sido poco estudiadas y entre las cuales se encuentra la especie de *Jatropha cordata*.

Por lo anterior en el presente trabajo se pretende analizar el nivel de expresión de los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos oleico y linoleico y evaluar el contenido de ácidos grasos presentes en la semilla de *Jatropha cordata*.

IV. HIPÓTESIS

La expresión de los genes *ACP1*, *KASII*, *D9SD*, *FAD2-1* y *FAD2-2* que están involucrados en la síntesis de los ácidos oleico y linoleico, está relacionada con el contenido de ácidos grasos presentes en la semilla de *Jatropha cordata*.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo General

Analizar la expresión de los genes involucrados en la síntesis de los ácidos grasos oleico y linoleico presentes en las semillas de *Jatropha cordata*.

V.2. Objetivos Específicos

1. Determinar el perfil de ácidos grasos presentes en la semilla de *Jatropha cordata*.
2. Evaluar la expresión de los genes *D9SD*, *ACP1* y *KASII* involucrados en la síntesis de ácido oleico en semillas de *J. cordata* por medio de RT-PCR semi-cuantitativo
3. Evaluar la expresión de los genes *FAD2-1* y *FAD2-1* involucrados en la síntesis de ácido linoleico en semillas de *J. cordata* por medio de RT-PCR semi-cuantitativo

VI. MATERIALES Y METODOS

VI.1. Material Biológico

Se realizaron revisiones del desarrollo de la semilla así como colectas de las mismas en un punto sur de la ciudad de Hermosillo-Sonora (México), en un lugar conocido como el Cerro de las Víboras (28°59'26.4"N 110°56'39.7"W) durante los meses de Agosto-October del 2013 para la obtención de semillas de *Jatropha cordata*. El material colectado fue limpiado, se quitó la cascara y posteriormente se almacenó a temperatura ambiente (25°C) y a -80°C hasta realizar los análisis correspondientes. Por otro lado se utilizó como referencia la semilla no toxica de *J. curcas*, proveniente del estado de Veracruz, la cual fue proporcionada por el Dr. Jorge Martínez Herrera.

VI.2. Caracterización Física de la Semilla de *Jatropha cordata*

Se registraron en promedio 95 semillas en estado maduro, de las cuales se determinó la forma que poseían y cantidad de semillas que tenía el fruto, así como también se estimó el peso, largo y ancho de cada una.

VI.3. Perfil de Ácidos Grasos

VI.3.1. Extracción de aceite y obtención de pasta residual

1. Primeramente se descarificó la cáscara de la semilla de *J. cordata*, de manera que se llegue a la parte final que es la testa de la semilla.*

* Proceso cuidadoso sin llegar a lastimar la capa externa de la testa. Se tomó peso y medida de la testa a moler.

2. La molienda consistió en triturar en una licuadora (Osterizer, Modelo 4122, México), lo más fino posible la semilla, y contener el polvo en un vial en refrigeración. Si el proceso es continuo no es necesario refrigerar.

3. Se utilizó una extracción en frío con hexano, como sustancia para extraer el aceite, de 15 g de semilla de *Jatropha cordata*, siguiendo el procedimiento sugerido por Yilmaz y Toledo (2004) con modificaciones, tales como la relación muestra-solvente de 1:6 g/mL.

4. Se mezcló la sustancia con el polvo de la semilla, en un agitador magnético por 2 horas, llevándose a cabo dos extracciones en el mismo lapso de tiempo. Se obtuvo el contenido que posteriormente se evaporó para obtener solo el aceite.

5. Posteriormente se realizó una filtración al vacío para separar los sólidos de la muestra y se almacenó en refrigeración.*

*La pasta residual se dejó descubierta para la eliminación de hexano y se almacenó para tratamientos posteriores.

6. La muestra fue tratada en rotavapor (Labconco, Modelo 78892-00) a 45°C para la eliminación de hexano de la muestra.

7. Finalmente, se reflujo con nitrógeno el aceite obtenido del paso anterior para eliminar el hexano remanente y poder continuar con el proceso de metilación de ácidos grasos.

VI.3.2. Metilación de ácidos grasos

Las muestras de aceite fueron saponificadas y metiladas en base al procedimiento de la AOCS (Ce 2-66), para la determinación del perfil de ácidos grasos.

VI.3.3. Cromatografía de gases

Una vez preparados los metil-ésteres de ácidos grasos provenientes de los aceites de *J. cordata* y *J. curcas*, se procedió a inyectar la muestra en el cromatógrafo de gases. Los metil-ésteres de ácidos grasos fueron analizados en el cromatógrafo de gases Agilent 7890A Series (Agilent Technologies), utilizando un detector de ionización de flama y equipado con una columna capilar SP-2560 (100m x 0.25 mm i.d., 25 mm; Supelco Bellefonte, PA, USA). El gas acarreador fue el nitrógeno. Se llevó a cabo un programa de temperatura de 180°C a 220°C y tanto la temperatura del inyector como la del detector fueron de 250°C. La cuantificación se realizó tomando a C17:0 como estándar interno.

VI.4. Molienda de la Semilla de *Jatropha cordata*

Para llevar a cabo la utilización del material biológico, se realizó un pool (agrupación de semillas) de todas las semillas colectadas en campo de diversos individuos de la especie *J.*

cordata. El objeto de realización de un pool es para implementar la agrupación de alelos únicos presentes en el material genético de la totalidad de los individuos existentes en dicha población. Además de que realizando un pool se amplía la diversidad genética que está asociada con grandes poblaciones de individuos (IPGRI, 2004).

En esta fase, la molienda se llevará a cabo en morteros, previamente desinfectados y horneados a 260°C. Después dejándolos en reposo, y posteriormente se llevarán a guardar a -80°C.

VI.5. Extracción de RNA total

Para la extracción de ARN total de las semillas de *J. cordata*, se empleó hielo seco en la base del mortero. Las semillas se encontraban previamente almacenadas a -80°C. Se trituraron las testas de la semilla de *Jatropha cordata* y el contenido se vertió dentro de un tubo eppendorf 1.5 con 1 mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen).

Se utilizó el reactivo TRIzol® Reagent (Invitrogen) que sirve para aislar el ARN total a partir de muestras de células y tejidos, en este caso fue a partir de semillas. Se siguieron las indicaciones del fabricante de la siguiente manera:

VI.5.1. Fase de separación

1. El proceso de separación de fases consistió en incubar la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa del complejo de nucleoproteína.

2. Se añadió 0,2 mL de cloroformo por 1 mL de reactivo TRIzol® utilizado para la homogeneización.

3. Después se llevó a cabo un agitado y se dejó incubando de 2-3 minutos a temperatura ambiente.

4. Se centrifugó la muestra a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante de la muestra.

5. Se colocó el sobrenadante a un tubo nuevo y se continuó con el procedimiento de aislamiento de ARN total.

VI.5.2. Precipitación de ARN total

1. De acuerdo al protocolo del reactivo TRIzol ® se añadió 0,5 mL de isopropanol al 100% de la fase acuosa, por 1 mL de reactivo TRIzol ® utilizado para la homogenización.

2. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La muestra entonces estuvo lista para centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

VI.5.3. Lavado de ARN total

1. Se eliminó el sobrenadante del tubo, dejando sólo el precipitado del pellet. Se lavó el sedimento, con 1 mL de etanol al 75 % por 1 mL de reactivo TRIzol ® utilizado en la homogenización inicial.

2. Luego se centrifugó el tubo a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C.

3. Se descartó el lavado. Se secó el precipitado de ARN durante 5-10 minutos a temperatura ambiente.

VI.5.4. Resuspensión de ARN total

1. Se resuspendió el pellet de ARN en agua libre de RNasas estéril (20-50 μ L).
2. Posteriormente, se procedió a guardar las muestras a -80°C para su futuro uso.

VI.6. Cuantificación de ARN total

Se llevó a cabo la cuantificación de las muestras de ARN total en el espectrofotómetro *Nano Drop 1000* (Thermo Scientific) que permite medir los ácidos nucleicos en absorbancia de 260 y 280nm, en este caso el ARN. Para la cuantificación del ARN total se tomó 2 μ L de cada muestra y se cuantificó en el espectrofotómetro. Se consideró que la relación de absorbancia 260/280 fuera entre el rango >1.8 a 2 aceptado como puro.

VI.7 Integridad del ARN total en gel de agarosa

Para observar la integridad del ARN total se analizó por medio de un gel de electroforesis, por lo cual se preparó un gel de agarosa al 1%.

1. Se pesó 0.5g de agarosa y se depositó en un Matraz Erlen-Meyer de 250mL.

2. Posteriormente se le añadió un volumen de 50mL de buffer TAE 1X estéril.

3. En el matraz Erlen-Meyer e calentó la mezcla de agarosa con TAE 1X, empleando un horno microondas (LG) por 1.50 minutos, con 3 agitaciones parciales de 30 segundos en cada periodo de tiempo.

4. Se enfrió la solución durante 5 minutos o hasta que la temperatura pueda ser soportable en la palma de la mano antes de añadir el colorante.

4. Se agregó la cantidad correspondiente de Gel Red (Biotium) (a razón de 3 μ l de Gel Red por cada 100 mL de la mezcla). Después se agito vigorosamente con la mano.

5. Luego se vació el contenido del matraz sobre la placa de electroforesis previamente preparada con los sellos acrílicos. Se colocaron los peines de separación correspondiente para cada placa. Se dejó solidificar durante 20 minutos.

6. Para preparar el buffer TAE 1X que se vaciará en el tanque de la cámara de electroforesis, se añadió 20 mL de TAE 50X y se aforó a 1L con agua.

7. Después del tiempo que se mantuvo solidificando la mezcla, se retiraron los sellos y se colocó la placa dentro del tanque de electroforesis. Se vertió la cantidad apropiada de buffer TAE1X estéril, cubriendo discretamente (no más de 1mm de altura) los pocillos del gel de agarosa.*

*La Cámara debe de estar en total asepsia. Para ello, se limpió la cámara con Benzal al 4%, tomando 20 mL de Benzal en 500 mL de agua estéril.

8. Se retiraron los peines del gel cuidadosamente de tal manera que no se dañen o rompan los pocillos.

9. Se cargaron 2 μ l de muestras de la extracción de ARN total utilizando 2 μ l Buffer de Carga 1X y se depositó aproximadamente 4 μ l en los pocillos correspondientes.

10. Se realizó la electroforesis conectando la cámara de electroforesis a una fuente de poder a 80 Volts por 35 min.

11. Una vez terminado el proceso, se visualizó el gel de electroforesis en el fotodocumentador Bio-Imaging System MiniBis pro (Bio America Inc) y se guardó la imagen en una unidad portable.

12. Se enjuagó con agua estéril todos los componentes de electroforesis al terminar la corrida. Esto debido a que pudieran haber quedado restos de sales que dañarían el equipo.

13. De manera opcional se puede reutilizar el buffer de electroforesis o se elimina depositándolo en un recipiente de Residuos.

VI.8. Secuencias de Genes Relacionados a la Síntesis de Ácidos Grasos Usados en el Presente Estudio para *Jatropha cordata*

En la Tabla 5 se muestran las secuencias de oligonucleótidos que fueron tomadas en base a la especie *Jatropha curcas*.

Tabla 5. Secuencias de genes que codifican para la síntesis de ácidos grasos oleico y linoleico.

Nombre	Abreviación	Inicial (Forward)/ Reverso (Reverse)
Ácido graso desaturasa 2-2	<i>FAD2-2</i>	FW:5'-GCAATCAAGCCTATATTGGGC RV:5'-CCAGAGAACTCCTCGGTTGG (Qu <i>et al.</i> , 2012)
Ácido graso desaturasa 2-1	<i>FAD2-1</i>	FW:5'-CCACCATTCACTTGGTCAG RV:5'-GGTTGAGGAAGGAGGTGGAAG (Qu <i>et al.</i> , 2012)
δ-9-esteroil-acilo desaturasa	<i>D9SD</i>	F:5'-CCACCATTCACTTGGTCAG R:5'-GGTTGAGGAAGGAGGTGGAAG (Qu <i>et al.</i> , 2012)
Cetoacil ACP sintasa II	<i>KASII</i>	F:5'-ACAGTCACCTTGTTTTTGTTC R:5'-ATGCTAATTACCTGATAAGG (Gu <i>et al.</i> , 2012)
Proteína transportadora de acilo 1	<i>ACPI</i>	F:5'-ACCGTTCAGGAAGCTGCTG R:5'-ACATAGTTCACAACAAGATTGC (Gu <i>et al.</i> , 2012)
Gen constitutivo Actina	Act	F:5'- TGGTTCCACTATGTTCCCTGGTA R:5'-CTTCATGCTGCTTGGAGCAA (Xu <i>et al.</i> , 2011)

VI.9. RT-PCR semi-cuantitativo

Esta técnica permite estudiar la expresión de genes. En primer lugar se extrae el ARN total de las células en estudio y se separa la fracción correspondiente al mensajero (ARNm). Tras purificar el ARN se transcribe a ADN mediante una transcriptasa reversa, por cada molécula de ARNm se sintetiza una molécula de ADNc monocatenaria que posteriormente se

ha de convertir en bicatenaria utilizando una ADN polimerasa (Hernández et al., 1994). De acuerdo con los protocolos sugeridos se realizó la siguiente metodología para obtención de los productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés).

VI.9.1. Síntesis de ADNc

Se utilizó la mezcla de dos Kits, uno es el Kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) y Kit Ilustra Ready-To-Go RT-PCR Beads (G. E.) para la síntesis del ADNc, los cuales se caracterizan por generar una gran cantidad de copias de ADNc. Una hebra de ARNm es copiado a ADN complementario (ADNc) mediante una enzima transcriptasa reversa usando un primer dT (Cortázar y Silva, 2004).

En base a las instrucciones del fabricante del Kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) se añadió los componentes siguientes:

1. La mezcla se añadió a un tubo libre de nucleasas las cantidades y reactivo de la Tabla 6.

Tabla 6. Reactivos y cantidades del Kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen)

Mezcla de reacción	Cantidad (μL)
10x Buffer	1
DNAsa	1
ARN total de <i>J. cordata</i>	Dependiendo del valor cuantificado

El volumen en “μL” de ARN total para *J. cordata*, se determinó de acuerdo al análisis de concentración de ARN total en la muestra. Se completó el volumen con agua, de tal manera que el volumen final de reacción sea de 10 μL.

2. Según las indicaciones del kit se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Luego se agregó 1 μL de Stop Solution.
4. Por último la mezcla se incubó por 10 minutos a una temperatura de 70°C.

En base a las instrucciones del fabricante del Kit Ilustra Ready-To-Go RT-PCR Beads (G. E.) se añadió los componentes siguientes:

1. Después de dar una breve centrifugación se añadió las cantidades y reactivo de la Tabla 7:

Tabla 7. Reactivos y cantidades del Kit Ilustra Ready-To-Go RT-PCR Beads (G. E.)

Mezcla de reacción	Cantidad (μL)
Mezcla del Kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen)	11
Oligo dT (pd(T₁₂₋₁₈)).	1
Agua estéril	38

Dejando así la reacción final con un volumen de 50 μL .

2. La reacción de síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando un Termociclador (NYXTechnik) con el programa RT_JAT_GE.
3. Para cada reacción se llevó a cabo una incubación a 42°C durante 30 min, después se procedió a aumentar la temperatura a 95°C por 5 min.
4. El ADNc ahora se puede utilizar como molde para la amplificación del PCR.

VI.9.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica en biología molecular que proviene de las siglas en inglés (polymerase chain reaction) y se basa en el mecanismo de la replicación *in vivo* del ADN: el ADN bicatenario se desenrolla y pasa a ADN monocatenario, se duplica y se vuelve a enrollar (Tamay et al., 2013). Esta técnica consiste en 3 ciclos repetitivos de desnaturalización (desnaturalizando el ADN por fusión elevada de temperatura con la finalidad de convertir el ADN bicatenario en ADN monocatenario), unión de oligonucleótidos (utilizando primers o cebadores) y extensión de la cadena de ADN (adición de nucleótidos a partir de primers utilizando ADN polimerasa como catalizador) (Somma et al., 2006). La implementación de la PCR se realiza en base al proceso de ADNc (Hernández et al., 1994).

La técnica de RT-PCR permite una detección de la expresión de ARNm mucho más sensible que con Northern blot o con hibridación *in situ*. Esta técnica *in vitro* permite amplificar una región determinada de ADN (Somma et al., 2006).

El uso del Kit PureTaq Ready-To-Go PCR beads para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite mediante las perlas realizar amplificaciones de la región de un gen determinado utilizando la enzima PureTaq ADN polimerasa que viene incluida en las perlas. Estas últimas contienen ~ 2.5 unidades de PureTaq ADN polimerasa, buffer, 10 mM Tris-HCl, (pH 9 a temperatura ambiente), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP

VI.9.2.1. Preparación y cuidados de las perlas de PCR

1. Se tomó un tubo del kit Pure Taq Redy-To-Go PCR beads.

2. Se examinó si la perla se encontraba en buenas condiciones, es decir, si se encuentra visible en el tubo o si la perla no presentaba alguna deformidad y se prosiguió con el protocolo según el manual del Kit.

3. El procedimiento anterior se realizó de la misma manera para todas las muestras.

VI.9.2.2. Preparación de los templados para PCR

El templado obtenido de la síntesis de ADNc se diluyó 1:7 en volumen de agua estéril de alta calidad y se adiciono 1 μL para realizar ampliificaciones en un volumen total de 24 μL de reacción.

VI.9.2.3. Determinación de los parámetros de ciclos y temperatura

La temperatura de alineamiento se calculó como se describe de la siguiente manera. El programa estándar está compuesto por un ciclo de pre-incubación de 5 minutos a 95°C, 60 segundo a 94°C, 30 segundos con variaciones de temperatura de 59.6-61.9°C para cada gen descrito (Tabla 10) y 40 segundos a 72°C para un número de ciclos determinados para cada gen (Tabla 9). Es sumamente importante establecer el número apropiado de ciclos, de tal forma que se ve reflejado en la amplificación de los productos visibles en el gel de agarosa. El número óptimo de ciclo tiene que estar en el mismo rango para el ARN específico de interés (*D9SD*, *ACPI*, *KASII*, *FAD2-1* y *FAD2-2*) y el control, que en este caso es la Actina. Las temperaturas de alineamiento de cada primer fueron probadas mediante un gradiente de temperatura, aceptando así la temperatura óptima para cada uno.

VI.9.2.4. PCR Ready-To-Go Beads

1. Para cada reacción se le añadió las especificaciones de la Tabla 8.

Tabla 8. Componentes utilizados para la PCR con el Kit PCR Ready-To-Go Beads (G.E.)

Mezcla de reacción	Cantidad (µL)
5 '(Forward) primer	1
3 '(Reverse) primer	1
Templado de ADNc	1
Agua estéril de alta calidad	21

2. Los tubos se taparon firmemente, de manera que quede bien cerrado. Se mezcló el tubo suavemente agitando el tubo con el dedo, en algunos casos se realizó una centrifugación corta, de tal manera que queden todos los componentes en la parte inferior del tubo.

3. Se colocó las mezclas de la reacción en hielo o en un bloque frío hasta que estén listos para ser introducidos al Termociclador.

4. Para cada reacción PCR fue activada por una pre-incubación a 95°C durante 5 min, (Figura 9), seguida por 30-35 ciclos que consta de 94°C por 1 min en el proceso de desnaturalización, en el proceso de alineamiento, la temperatura fue de 59.6-61.9°C (específica para cada gen) por 30 s y 72°C por 40s en la extensión.

5. El perfil de ciclos óptimo para un sistema de PCR dado, varió y debió ser determinado empíricamente para cada gen, por lo que se procedió a realizar un gradiente de ciclos y temperatura utilizando un Termociclador (NYXTechnik) con el programa JAT_GRAD. El número de ciclos puede variar de 20 a 40 dependiendo del rendimiento deseado del producto. Los resultados de ciclado térmico y el rendimiento del producto puede

variar según las condiciones de ciclo y termociclador utilizados. Para el análisis de PCR se utilizó un Termociclador (NYXTechnik) con el programa JATROPHA.

6 Se realizó un gradiente de ciclos (Tabla 9) en la alineación de los oligonucleotidos en la PCR en un Termociclador (NYXTechnik) para determinación de cada gen.

Tabla 9. Determinación de los ciclos para cada gen en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Gen (Nombre)	Abreviación	Ciclos determinados
Actina	<i>Act</i>	30
δ-9-esteroil-acilo desaturasa	<i>D9SD</i>	35
Proteina trasportadora de acilo 1	<i>ACPI</i>	30
Cetoacil ACP sintasa II	<i>KASII</i>	33
Ácido graso desaturasa 2-1	<i>FAD2-1</i>	30

7. Se procedió a utilizar el programa JATROPHA en el Termociclador como se muestra a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10. Determinación de condiciones de temperaturas para la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Temperaturas y Tiempo del ciclo de PCR				
Gen (Nombre)	Abreviación	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
Actina	<i>Act</i>	94°C (60s)	61.9°C (30s)	72°C (40s)
δ-9-esteroil-acilo desaturasa	<i>D9SD</i>	94°C (60s)	60.2°C (30s)	72°C (40s)
Proteína transportadora de acilo 1	<i>ACPI</i>	94°C (60s)	59.6°C (30s)	72°C (40s)
Cetoacil ACP sintasa II	<i>KASII</i>	94°C (60s)	60.2°C (30s)	72°C (40s)
Ácido graso desaturasa 2-1	<i>FAD2-1</i>	94°C (60s)	61.9°C (30s)	72°C (40s)

8. Una vez concluido el proceso de la PCR, se analizó la integridad de los productos en un gel de agarosa al 1% con Gel red, por lo cual se tomó 2 µL de cada muestra y se depositaron en los pocillos del gel.

VI.10. Análisis de los Productos de RT-PCR Semi-Cuantitativo

V.10.1. Análisis de los productos de PCR en gel de agarosa 1%

Se realizó un gel de electroforesis, el cual se caracteriza por tener corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa de agarosa. Para observar la integridad de los productos de PCR se realizó un gel de agarosa al 1%

1. Se calculó la concentración de agarosa requerida para la evaluación de la integridad del PCR. Se preparó un gel de agarosa al 1% con dimensiones aproximadas de 0.5 cm de grosor.

2. Se pesaron 0.75 g de agarosa de agarosa con un recipiente de plástico en una balanza analítica. Una vez obtenido los gramos se depositaron en un matraz Erlen-Meyer al cual posteriormente se le añadió 75 mL de buffer TAE 1X estéril.

3. En un Matraz Erlen-Meyer de 25 0mL se calentó la mezcla de agarosa con TAE 1X, empleando un horno microondas (LG) por 1.50 minutos, con 3 agitaciones parciales de 30 segundos en cada periodo de tiempo.*

3. Se enfrió el matraz con la mezcla durante 5 minutos o hasta que la temperatura pueda ser soportable en la palma de la mano antes de añadir el colorante.

4. Se agregó la cantidad correspondiente de Gel Red (Biotium) (a razón de 3 µl de Gel Red por cada 100 mL la mezcla). Después se agito vigorosamente con la mano.

5. Luego se vació el contenido del matraz sobre la placa de electroforesis previamente colocados los sellos acrílicos. Se colocaron los peines de separación correspondiente para cada placa. Se dejó solidificar durante 20 minutos.

6. Para preparar el buffer TAE 1X que se vaciará en el tanque de la cámara de electroforesis, se añadió 20 mL de TAE 50X y se aforó a 1 L con agua.

7. Después del tiempo que se mantuvo solidificando la mezcla, se retiraron los sellos y se colocó la placa dentro del tanque de electroforesis. Se vertió la cantidad apropiada de buffer TAE1X, cubriendo discretamente (no más de 1 mm de altura) los pocillos del gel de agarosa.*

*La Cámara debe de estar en total asepsia. Se limpió la cámara con Benzal diluyendo 20 mL de benzal en 500 mL.

8. Se retiraron los peines del gel cuidadosamente de tal manera que no se dañen o rompan los pocillos.

9. Se cargaron los productos de PCR con volumen de 2 μ l de muestra o 1 μ l en el caso de Marcador de Peso Molecular (MPM) y la utilización de 2 μ l Buffer de Carga 1X y se depositó aproximadamente 4 μ l en los pocillos correspondientes.

10. Se realizó la electroforesis conectando la cámara de electroforesis a una fuente de poder a 100 Volts por 40 min.

11. Una vez terminado el proceso, se visualizó el gel de electroforesis en el fotodocumentador Bio-Imaging System MiniBis pro (Bio America Inc).

12. Se enjuagó con agua estéril todos los componentes de electroforesis al terminar la corrida. Esto debido a que pudieran haber quedado restos de sales que dañarían el equipo.

13. De manera opcional se puede reutilizar el buffer de electroforesis o se elimina depositándolo en un recipiente de Residuos.

VI.10.2. Análisis cuantitativo de expresión y obtención de imágenes del gel

Las imágenes de la RT-PCR fueron teñidas con Gel red (Biotium) en gel de agarosa y fueron adquiridas mediante un fotodocumentador Bio-Imaging System MiniBis pro (Bio America Inc). La cuantificación de las bandas se realizó utilizando el software ImageJ (Java), el cual es un programa de procesamiento de imagen digital, este software es 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 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.

El procedimiento llevado a cabo para determinar las variaciones de las muestras, se realizó con el software de la siguiente manera en un ordenador (Toshiba):

1. Se abrió la imagen con software ImageJ, localizando la imagen deseada dentro de los archivos.

2. Una vez cargada la imagen, se seleccionó botón Analizar, seguido de Gel, después se seleccionó primera línea y luego se arrastró el recuadro a la primera banda, seleccionando toda su área.

3. Después realizó el mismo procedimiento del paso anterior, pero en este caso se seleccionó siguiente Línea.

4. Se seleccionó analizar, después se seleccionó Gel y luego Graficar líneas. De esta manera se obtuvo la intensidad de cada banda en un gráfico.

5. El análisis de intensidad de banda para cada gen fue normalizado con la abundancia de ARNm del gen constitutivo o gen control de actina.

VI.11. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos y gráficos se realizaron usando el programa Statgraphics Centurion XV. Las diferencias significativas entre las medias de los resultados fueron en base a la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Se realizaron comparaciones de medias de expresión de los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos. Los valores fueron expresados como las medias \pm de triplicado y la desviación estándar.

VII. RESULTADOS

En este trabajo se analizó la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos en semillas maduras de *J. cordata* como especie evaluada de estudio y *J. curcas* como especie de comparación, con el propósito de investigar cambios significativos en el contenido de ácidos grasos asociados a cambios en la expresión genética de los genes involucrados. Por lo que fue necesario realizar la caracterización física de las semillas de *Jatropha cordata*, la determinación del perfil de ácidos grasos en las semillas y la expresión genética de los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos.

VII.1. Recolección e Identificación de las Semillas de *Jatropha cordata*

Se recolectaron semillas de los diferentes individuos localizados en el área de muestreos (Cerro de las Víboras-Hermosillo, Sonora) de plantas de *Jatropha cordata*. Las plantas de *Jatropha cordata* mostraron una producción adecuada de fruto para realizar los estudios, debido a que las condiciones climáticas durante el año 2013 fueron favorables; según un reporte de la CONAGUA, se registró alrededor de 400 mm de precipitación pluvial en la estación de verano del 2013, que es en estos meses cuando se lleva a cabo la floración de *J. cordata*.

Esta planta tiende a crecer en zonas rocosas y más altas en el Cerro de las Víboras (Hermosillo-Sonora) sobre las laderas, sin embargo también se vió crecimiento en la planicie. Se encuentra asociada simpátricamente con plantas como Sangrengado (*Jatropha cardiophylla*), Toluache (*Datura inoxia* o *Datura meteloides*), Nopal (*Opuntia*), Bisnaga (*Echinocactus polycephalus*), Palo verde (*Parkinsonia microphylla*) y Uña de gato (*Mimosa*

laxiflora); por lo anterior se puede decir que no es una planta que compita por suelo o sea territorial.

VII.2. Caracterización física de las semillas de *J. cordata*

Las semillas que se obtuvieron de esta planta son de forma ovalada de 10.5 a 13.7 cm de largo y de 7 a 9 cm de ancho. En cada fruto se encontró de dos o a veces tres semillas en su estado maduro. Las semillas son de forma esférica y color negro y la almendra o testa es de color blanco o crema. Las semillas mostraron las siguientes características físicas: se registraron 95 semillas, de las cuales en promedio pesaron 0.32 g cada una. De acuerdo a las medidas, el porcentaje en peso total de la semilla equivale al 43% para la testa y 57% la cascara. No existen reportes hasta el momento de las características físicas de la semilla en *Jatropha cordata*.

VII.3. Determinación del Perfil de Ácidos Grasos

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (o Fatty Acid Methyl Ester (FAME) por sus siglas en inglés) se analizaron en un cromatógrafo (modelo Varían 3400), el cual cuenta con una detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar de sílica SP-2560 (100 m x 0.25 mm i.d. 25 µm de grosor de película, Supelco, Bellefonte, PA). La cuantificación de los picos de FAME se llevó a cabo por comparación con los tiempos de retención de sus respectivos estándares (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

En la Tabla 11, se muestra el perfil de ácidos grasos (AG) presentes en la semilla de *Jatropha cordata* y *Jatropha curcas*. El contenido de ácidos grasos total esta expresado en **g MEAG/ 100g MEAG**.

Tabla 11. Perfil de ácidos grasos de aceite de semilla de *Jatropha cordata* y *Jatropha curcas*.

Ácido Graso (g MEAG/ 100 g MEAG)		<i>Jatropha cordata</i>	<i>Jatropha curcas</i>
Ácido Mirístico	C14:0	0.35 ± 0.002	0.17 ± 0.005
Ácido Palmítico	C16:0	10.15 ± 0.030	12.23 ± 0.027
Ácido Palmitoleico	C16:1	0.68 ± 0.006	0.68 ± 0.004
Ácido Margárico	C17:0 (std)	11.40 ± 2.725	10.46 ± 1.132
Ácido Esteárico	C18:0	6.44 ± 0.028	5.99 ± 0.020
Ácido Oleico	C18:1	24.81 ± 0.123	37.47 ± 0.045
Ácido Linoleico	C18:2	56.62 ± 0.107	42.69 ± 0.067
Ácido Linolenico	C18:3	0.37 ± 0.003	0.28 ± 0.006
Ácido Araquídico	C20:0	0.17 ± 0.003	0.20 ± 0.003
Ácido Araquidónico	C20:4	0.03 ± 0.005	0.03 ± 0.002
Ácido Behenico	C22:0	0.02 ± 0.001	0.03 ± 0.002
Total de Ácidos Grasos Saturados		17.13	18.62
Total de Acidos Grasos		25.49	38.15
Monoinsaturados			
Total de Ácidos Grasos		57.02	43.0
Poliinsaturados			

MEAG: Metil Ésteres de Ácidos Grasos. Los valores son la media ± desviación estándar de triplicados. Se utilizó a el ácido margárico (C17:0) como estándar interno para identificación de los metil ésteres por comparación con los tiempos de retención.

Los AG más abundantes en la semilla de *J. cordata* y *J. curcas* fueron: ácido linoleico (C18:2), ácido oleico (C18:1), ácido margárico (C17:0) y ácido palmítico (C16:0). En *J. cordata* los AG insaturados, linoleico y oleico presentaron mayor abundancia: 56.62 y 24.81 g MEAG/ 100 g MEAG respectivamente y para el caso de *J. curcas* fue de 42.69 g MEAG/ 100 g MEAG para el ácido linoleico y 37.47 g MEAG/ 100 g MEAG para el ácido oleico. Los ácidos grasos araquídico (C20:0) y behénico (C22:0) se encontraron en concentraciones bajas en las semillas de *J. cordata* mientras que en *J. curcas* se encontraron los ácidos araquídico (C20:0) y mirístico (C14:0).

El presente estudio mostró que en las semillas de *J. cordata* el ácido graso linoleico presentó un contenido mayor estadísticamente significativo que *J. curcas*. (Tabla 11). En un estudio anterior, Gámez et al., (2012) encontraron un contenido de ácido graso linoleico de 49.88 g MEAG/ 100 g MEAG en *J. curcas*, valor similar encontrado en este estudio para la misma especie.

De tal forma, el contenido promedio entre los AG insaturados es superior en las muestras de la semilla de ambas especies que los contenidos de los AG saturados. De manera general el ácido graso linoleico (C18:2) es el constituyente más abundante en cuanto a contenido de AG se refiere para ambas especies (*J. cordata* y *J. curcas*). Sin embargo, *J. cordata* presenta un mayor contenido de ácido linoleico comparado con *J. curcas*. El ácido oleico (18:1) también se encuentra en el perfil de AG como uno de los más abundantes en las muestras de semillas de ambas especies de *Jatropha* evaluadas en ese estudio.

VII.4. Obtención del ARN Total

La extracción de ARN Total se llevó a cabo con el reactivo TRIzol[®] Reagent (Invitrogen), el cual permitió obtener un ARN viable, confiable y de buena calidad (Fig. 9). Además se pudo observar la integridad del mismo en un gel de agarosa al 1%, donde las muestras evaluadas mostraban una calidad buena. Se observó que las muestras de ARN total provenientes de las semillas de *J. cordata* y *J. curcas* no se encontraban degradadas.

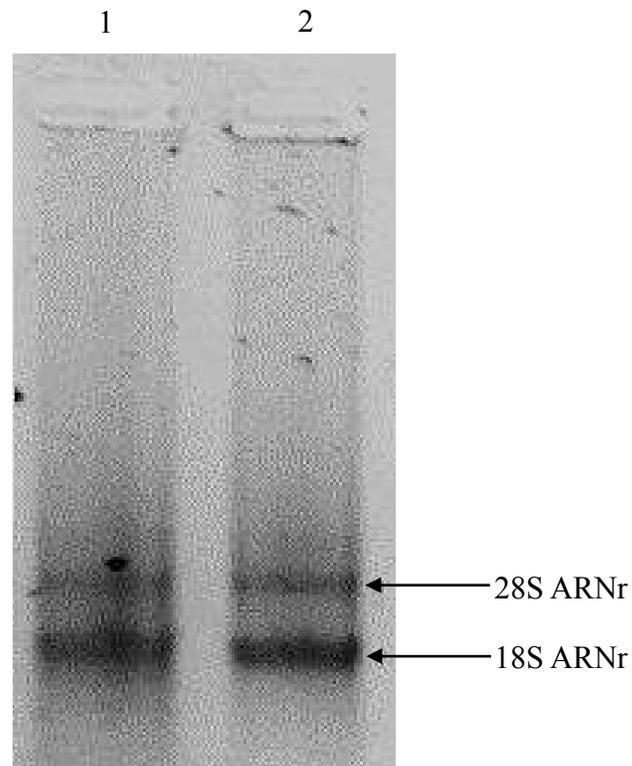


Figura 9. Gel de electroforesis de ARN total de las muestras en estudio. El ARN fue obtenido utilizando el método de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) y su integridad fue evaluada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% de ARN Total 1) *Jatropha curcas*. 2) *Jatropha cordata*.

VII.5. Cuantificación de ARN Total

Para la cuantificación del ARN total se utilizó un espectrofotómetro con absorbancia de 260 nm y 280 nm, *Nano Drop 1000* (Thermo Scientific) que permitió calcular con una precisión elevada las concentraciones de ARN a partir de cantidades pequeñas de muestra (2 μ l).

Las muestras obtenidas mostraron una relación de pureza y concentración adecuada, basados en una relación de pureza de 1.80 a 2.0 en el ARN total. Además en investigaciones previas consideran estas concentraciones como rango aceptable de pureza (Singh *et al.*, 2010). Las concentraciones de ng/ μ L de ARN Total que se obtuvieron variaron entre 443.2 a 2558.5 ng/ μ L en la semilla de *J. cordata* y para *J. curcas* se obtuvo de 429.2 a 832.4 ng/ μ L

VII.6. Condiciones para el Análisis de RT-PCR Semi-cuantitativo

Para realizar la expresión genética de los genes a estudiar, se tiene que considerar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés polymerase chain reaction). La determinación del producto de amplificación satisfactorio se da tanto por el número de ciclos y temperatura. Estos dos últimos factores son determinantes para la amplificación de cada gen y se obtiene realizando un gradiente de temperaturas y número de ciclos (Fig. 10). En la figura 11 se observa el gradiente de temperatura de alineamiento la cual fue determinada para cada uno de los genes en estudio. Las condiciones que se llevaron a cabo para la determinación metodológica de la PCR se muestran en la Tabla 12.

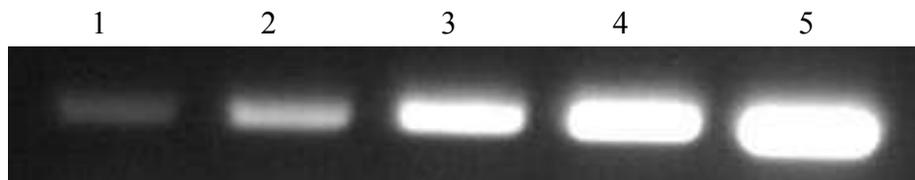


Figura 10. Número de ciclos en la reacción de PCR. El gradiente se realizó para el gen de actina a 61.9°C. Carril 1: 25 ciclos, Carril 2: 27 ciclos, Carril 3: 29 ciclos, Carril 4: 31 ciclos Carril 5: 33 ciclos

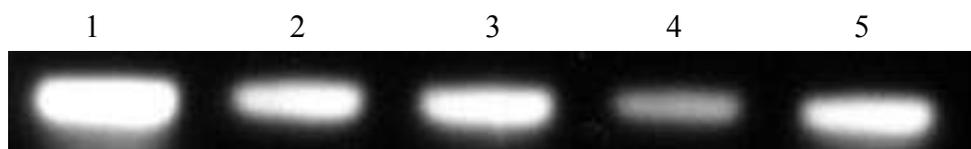


Figura 11. Optimización de temperatura de alineamiento de la PCR. La optimización de temperatura se realizó para el gen de actina. Carril 1: 60.2°C, Carril 2: 61.9°C, Carril 3: 64.4°C, Carril 4: 66.1°C Carril 5: 67.8°C

Tabla 12 Determinación de las condiciones para la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Gen (Nombre)	Abreviación	Ciclos determinados	Temperatura de alineamiento (°C)
Actina	<i>Act</i>	30	61.9
δ-9-esteroil- acilo desaturasa	<i>D9SD</i>	35	60.2
Proteína transportadora de acilo 1	<i>ACP1</i>	30	59.6
Cetoacil ACP sintasa II	<i>KASII</i>	33	60.2
Ácido graso desaturasa 2-1	<i>FAD2-1</i>	30	61.9
Ácido graso desaturasa 2-2	<i>FAD2-2</i>	30	61.9

VII.7. Expresión de los genes involucrados en la síntesis de ácido grasos

Mediante la técnica de RT-PCR, se evaluó semi-cuantitativamente la cantidad de ARNm de los genes *D9SD*, *KASII* y *ACP* involucrados en la síntesis de ácidos oleico y *FAD2-1* y *FAD2-2* involucrados en la síntesis de ácidos linoleico en muestras de semillas madura de *J. curcas* y *J. cordata*.

Los productos de RT-PCR, fueron determinados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con Gel Red. Los resultados de la cantidad de ARNm se obtuvieron

sometiendo los geles a densitometría mediante el software digital Image J (Java). Los valores de RT-PCR son presentados como la proporción de la señal específica del gen con la señal del gen de actina. La expresión del gen de actina sirvió como control interno.

VII.7.1. Genes involucrados en la síntesis de ácido oleico

El ácido oleico es un tipo de grasa monoinsaturada que, principalmente, está presente en algunos aceites vegetales. En el presente estudio los genes asociados a la síntesis de este ácido oleico son *D9SD*, *KASII* y *ACPI*.

El gen *D9SD* (*δ-9-Estearoil-Acilo Desaturasa*), interviene en la conversión del ácido esteárico (C18:0) en ácido oleico (C18:1), de tal manera que se adiciona una insaturación (doble enlace C=C) (Habib, 2000).

Existen otros dos genes participantes en la síntesis de ácidos grasos como lo son el gen *KASII* (*Cetoacil ACP sintasa II*) encargado de la elongación de la cadenas de carbonos y *ACPI* (*Acyl Carrier Protein I*) involucrado parcialmente con la síntesis del ácido oleico como cofactor de cadena de acilo (Gu et al., 2012).

VII.7.1.1. Análisis del gen *D9SD* involucrado en la síntesis de ácido oleico

El gen *D9SD* (*δ-9-estearoil-acilo desaturasa*), es un gen que está involucrado en la producción de ácido oleico y que codifica para la enzima δ -9-estearoil-acilo desaturasa (*D9SD*), con función similar en ácidos grasos y síntesis de lípidos (Habib et al., 2000).

El análisis de expresión en este gen fue determinado como de baja expresión, puesto que se requirió de 35 ciclos para la visualización del producto de PCR (Fig. 12). El tamaño de la banda fue de 200 pb aproximadamente. El análisis de expresión en la especie de interés *Jatropha cordata* mostró muy baja expresión (0.16 veces menos) mientras que para *J. curcas* 0.44 veces menos (Fig. 15) respecto al control interno de actina. El análisis demuestra como media a todas las réplicas biológicas estudiadas y han sido normalizadas con la expresión del gen de actina.

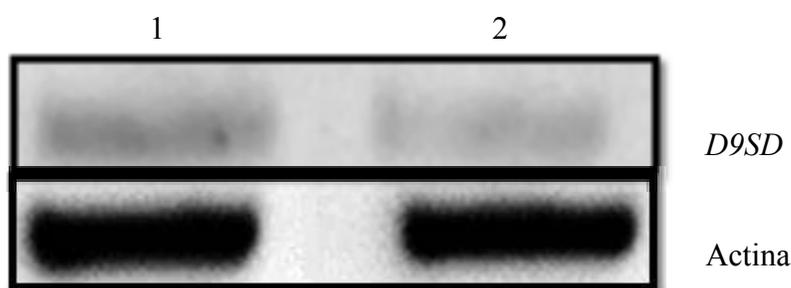


Figura 12 Producto del RT-PCR del gen *D9SD*. Los productos de PCR se presentan en Gel de agarosa al 1% teñido con Gel red (Biotium). Actina como gen control. Carril 1: Semilla de *J. curcas*. Carril 2: Semilla de *J. cordata*.

VII.7.1.2. Análisis del gen *KASII* relacionado en la elongasa del C16:0 a C18:0

KASI y *KASII* son genes que sintetizan a las enzimas codificantes para la elongación de la cadena de carbono de C4 a C18 (Wei *et al.*, 2012). Sin embargo, la elongación final en plástidos de 16:0-ACP a 18:0-ACP se lleva a cabo por la enzima Cetoacil ACP sintasa II (*KASII*). Los ácidos grasos C16 (Palmítico) y C18 (Esteárico), los principales compuestos de elongación, pueden ser desaturados tanto en la membrana del plástido y el retículo endoplásmico para producir ácidos grasos insaturados (Li *et al.*, 2007).

Los análisis de expresión del gen *KASII* (elongación en la cadena de carbono del ácido palmítico a esteárico) mostraron que *J. curcas* tiene un nivel de expresión mayor para este gen (1.04 veces). En el caso de *J. cordata* muestra baja expresión (0.36 veces menor comparado con el gen de actina) del gen en la semilla (Figura 13). La expresión del gen de actina sirvió como control de carga, así como para normalizar los valores obtenidos del gen *KASII*. El producto de PCR fue de aproximadamente 150 pb.

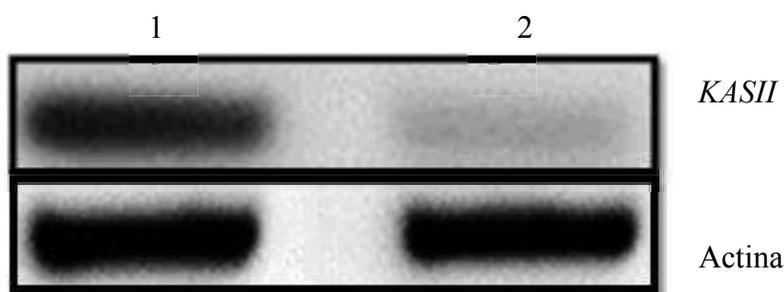


Figura 13 Producto del RT-PCR del gen *KASII*. Los productos de PCR se presentan en Gel de agarosa al 1% teñido con Gel red (Biotium). Actina como gen control. Carril 1: Semilla de *J. curcas*. Carril 2: Semilla de *J. cordata*.

VII.7.1.2. *ACPI* actúa como un cofactor en síntesis de ácidos grasos

La proteína portadora de acilo (ACP), es una proteína ácida que es un cofactor esencial en la síntesis de ácido graso vegetal (Branen et al., 2001). El gen del *ACPI* (*acyl carrier protein 1*) se ve involucrado en la elongación del ácido palmítico al ácido esteárico y presenta una afinidad con la enzima SAD (*stearoyl-ACP desaturase*) y está presente en la participación en la primera reacción de saturación en las cadenas de los carbonos C16 y C18.

En lo que corresponde al gen *ACPI* el análisis determinó que en *Jatropha cordata* hubo una inducción (0.47 veces mayor) ligeramente mayor en relación a lo mostrado en la especie *Jatropha curcas* (0.44 veces mayor) con respecto al gen de actina (Figs.14 y 15). La determinación de los productos de PCR se apreció aproximadamente 200 pb en el gel de agarosa.

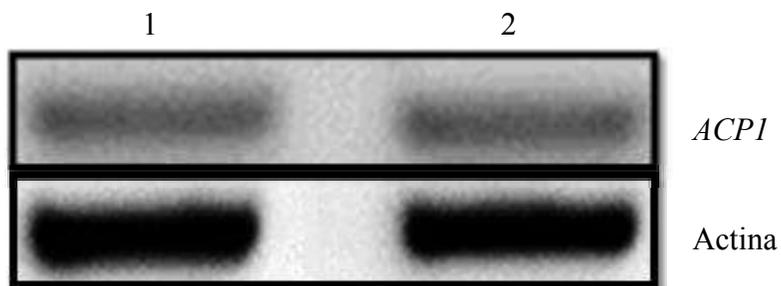


Figura 14 Producto del RT-PCR del gen *ACPI*. Los productos de PCR se presentan en Gel de agarosa al 1% teñido con Gel red (Biotium). Actina como gen control. Carril 1: Semilla de *J. curcas*. Carril 2: Semilla de *J. cordata*.

De los 3 genes involucrados en la síntesis de ácido oleico en *J. cordata*, analizados en el presente trabajo, el gen *ACPI* mostró un nivel de expresión mayor con respecto a los otros 2 genes *KASII* y *D9SD*. Para el caso de *J. curcas* el gen que mostró una mayor expresión fue *KASII*.

Genes asociados a la síntesis del Ácido Oleico

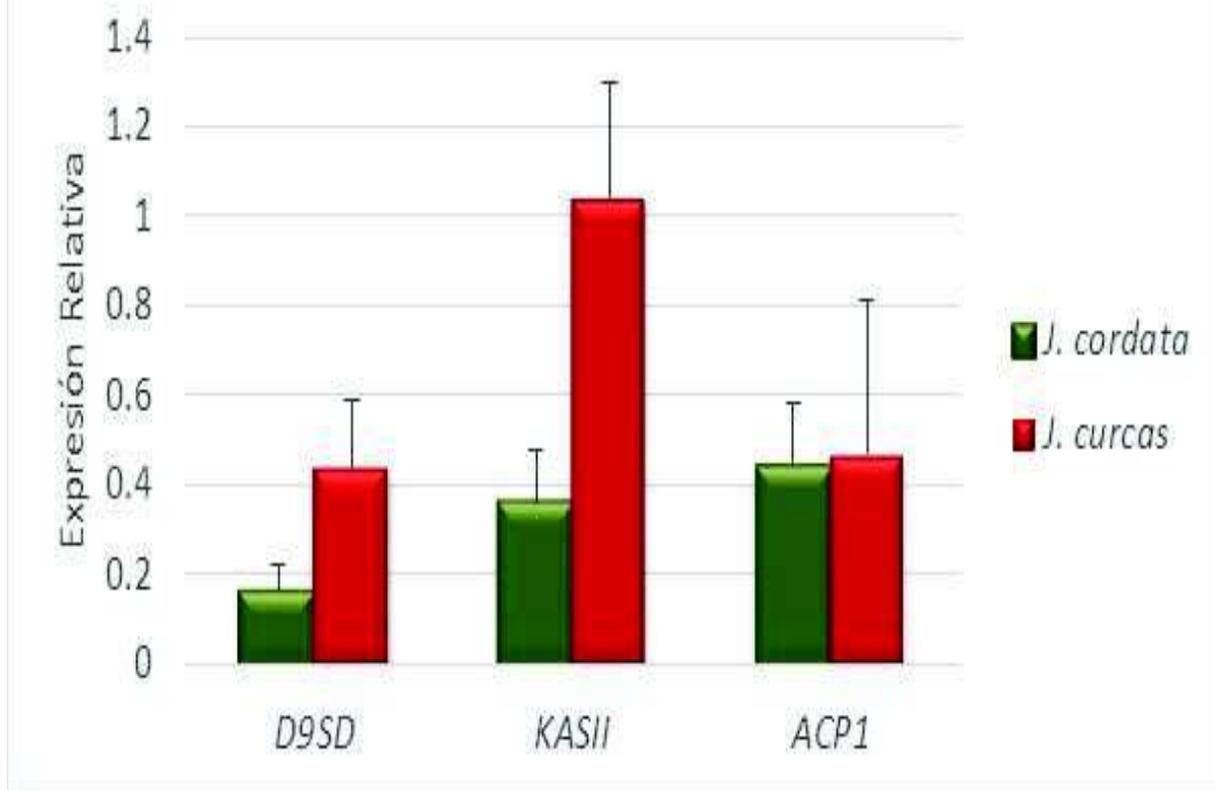


Figura 15. Análisis de expresión de los genes *D9SD*, *KASII* y *ACP1*. Comparación de los niveles de expresión de los genes *D9SD*, *KASII* y *ACP1* y evaluados semi-cuantitativamente por RT-PCR en relación al gen control actina, en semillas de *J. cordata* y *J. curcas*. Los valores mostrados son el promedio de la proporción de la señal específica del gen con la señal del gen de actina y la media \pm desviación estándar de tres réplicas.

VI.7.2. Análisis de los genes involucrados en la Síntesis de Ácido Linoleico

El ácido linoleico (C18:2), ácido graso esencial omega-6 se encuentra en mayor abundancia principalmente en el reino vegetal, aunque se presenta también en el reino animal (Sanhueza et al., 2002). De acuerdo a los autores Sánchez de Lorenzo (2010) y Vieitez (2012), la síntesis del ácido linoleico está intervenida por enzimas de la familia de las desaturasas, las cuales están asociadas con la introducción de una doble insaturación. En base a esta información se tomaron en cuenta dos genes: *FAD2-1* y *FAD2-2* que son considerados como genes importantes en la síntesis del ácido linoleico. En las Figuras 16 y 17 se puede observar los patrones de expresión de los genes *FAD2-1* y *FAD2-2*.

VI.7.2.1. *FAD2-1* y *FAD2-2* genes involucrados en la síntesis de Ácido Linoleico

Tanto *FAD2-1* y *FAD2-2* están presentes en la síntesis del ácido linoleico, se expresan mayormente en la semilla en desarrollo y su nivel de expresión aumenta en gran medida cuando se induce la síntesis de aceite (Williams, 1997). Estos intervienen como enzimas desaturasas que regulan las insaturación de los ácidos grasos a través de la introducción de dobles enlaces entre los carbonos definidos de la cadena de ácidos grasos (Heppard et al., 1996).

FAD2-1 es el principal gen en cuanto a la conversión del ácido oleico a linoleico, siendo su expresión alta en semilla y baja en otros tejidos de plantas oleaginosas (Ye *et al.*, 2013; Williams, 1997). El gen *FAD2-1* (*Fatty Acid Desaturase 2-1*) mostró una inducción mayor (0.86 veces) en *J. curcas* comparado con *J. cordata* (0.83 veces); aunque en ésta última su nivel de expresión fue alta (Fig. 16). Los análisis obtenidos de productos de la PCR son de 150 pb relativamente de acuerdo a la visualización en los geles de agarosa al 1%. (Fig. 16).

En el caso del gen *FAD2-2* (*Fatty Acid Desaturase 2-2*) en la semilla de *J. cordata* se observó baja expresión (0.23 veces) mientras que para la semilla de *J. curcas* se obtuvo un nivel de expresión mayor (0.95) (Figs. 17 y 18). La expresión de actina sirvió como control de carga, así como para normalizar los valores obtenidos de dos genes *FAD2*. Se observaron amplicones de 133 pb.

Debido a que el ácido oleico y linoleico son los principales constituyentes de aceite en *Jatropha*, estas enzimas son un objetivo potencial biotecnológico para la modulación en la composición de aceite de *Jatropha*.

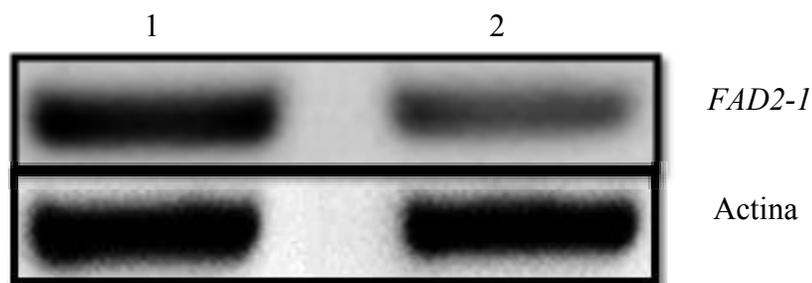


Figura 16. Producto del RT-PCR del gen *FAD2-1*. Los productos de PCR se presentan en Gel de agarosa al 1% teñido con Gel red (Biotium). Actina como gen control. Carril 1: Semilla de *J. curcas*. Carril 2: Semilla de *J. cordata*.

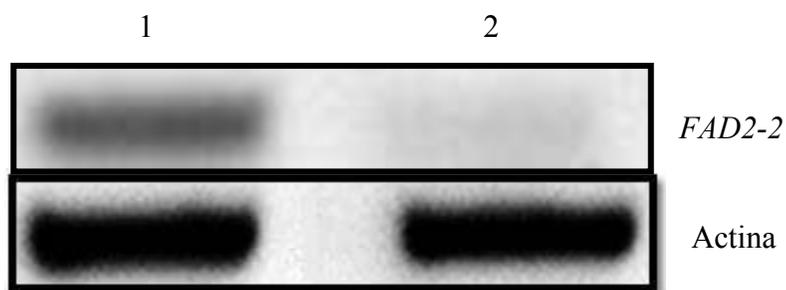


Figura 17. Producto del RT-PCR del gen *FAD2-2*. Los productos de PCR se presentan en Gel de agarosa al 1% teñido con Gel red (Biotium). Actina como gen control. Carril 1: Semilla de *J. curcas*. Carril 2: Semilla de *J. cordata*.

En lo que respecta al gen *FAD2-2* está relacionado a la producción de ácido linoleico, sin embargo, puede existir un factor de variación dado que los oligonucleótidos son en base a la especie *J. curcas*, además de que la cantidad de genes estudiados no brindan la certeza de su relación con el contenido total final de ácido linoleico en la semilla.

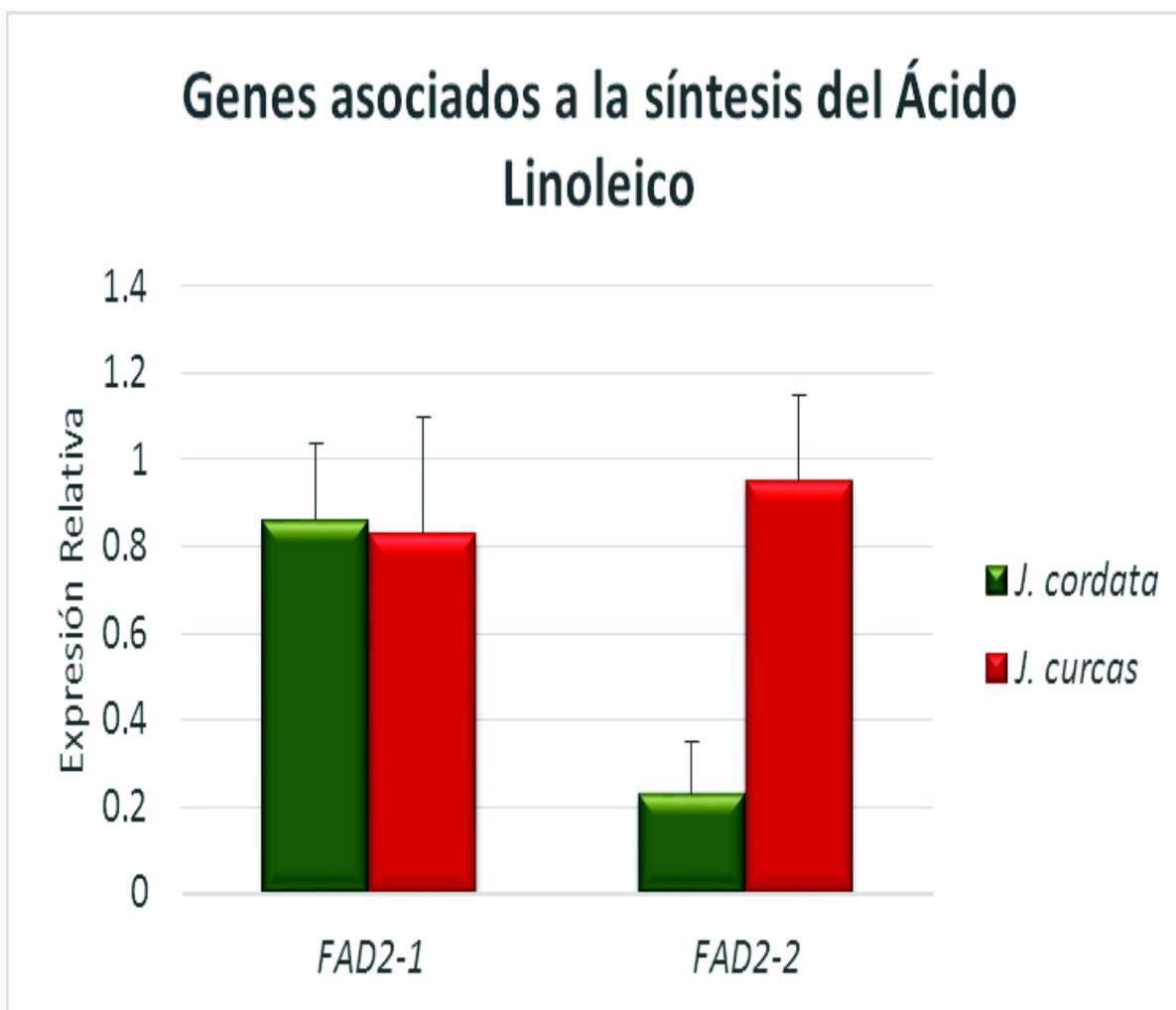


Figura 18 Comparación de expresión de los genes *FAD2-1* y *FAD2-2* involucrado en la síntesis de Ác. Linoleico. Evaluación semi-cuantitativamente por RT-PCR, de la cantidad de RNAm de los genes *FAD2-1* y *FAD2-2* en semillas de *J. cordata* y *J. curcas*. Los valores mostrados son el promedio la proporción de la señal específica del gen con la señal del gen de actina y la Media \pm desviación estándar de tres determinaciones.

De los 2 genes evaluados involucrados en la síntesis de ácido linoleico se observó que para *J. cordata*, el gen *FAD2-1* tuvo una mayor expresión comparado con el gen *FAD2-2* (de baja a nula expresión); al igual que para *J. curcas*, con la diferencia de que el gen, *FAD2-2* sí muestra una expresión moderada.

VII.8. Análisis de Correlación del Perfil de Ácidos Grasos y Expresión de Genes en *Jatropha cordata* y *Jatropha curcas*.

Se realizaron los análisis relacionados con la expresión de los genes involucrados en la síntesis de los ácidos grasos (AG) oleico y linoleico y el contenido de otros AG. En este estudio, los 5 genes relacionados con la síntesis de los ácidos grasos oleico y linoleico en las especies de *J. curcas* y *J. cordata* mostraron diferencias en su expresión en la semilla

El perfil de AG para *J. cordata* y *J. curcas* muestra que existe un contenido mayor total de ácidos grasos oleico y linoleico en la semilla. El ácido linoleico prevalece con un contenido mayor de MEAG (Metil Ésteres de Ácidos Grasos) para *J. cordata* con 56.62 g de MEAG/ 100 g MEAG en cambio en *J. curcas* fue de 49.88 g de MEAG/ 100 g MEAG. Se obtuvo una correlación con los análisis de expresión génica en el caso de *J. cordata* con ciertas variaciones en relación expresión-contenido de MEAG.

El otro ácido graso insaturado de mayor importancia en contenido es el ácido oleico. La cantidad de MEAG en la especie de *J. cordata* fue de 24.81g de MEAG/ 100 g MEAG y para *J. curcas* fue de 37.47g de MEAG/ 100g MEAG. Siendo su contenido el segundo más importante en la semilla de ambas especies. La relación de la expresión del gen *KASII* mostró estar vinculada con la inducción del gen respecto al contenido de ácido oleico.

El nivel de expresión del gen *D9SD* y *ACPI* y el contenido del ácido graso oleico (Tabla 11) no muestra correlación contundente para *J. cordata* y *J. curcas* (Fig. 12 y 14). El contenido de ácido linoleico en *J. cordata* fue el más abundante respecto a los demás ácidos

grasos, al igual que en *J. curcas*. En el análisis molecular el gen que codifica para la desaturasa *FAD2-1* asociado para la síntesis del ácido linoleico, es el que se expresa en mayor proporción en las semillas de *J. cordata*. Por lo que de acuerdo a los resultados obtenidos, el gen *FAD2-1* es el gen principal involucrado en el contenido de ácido linoleico. Para la especie de *J. curcas* el gen que mostró una expresión mayor relacionado a la síntesis de ácido linoleico es también *FAD2-1*, sin embargo, el gen *FAD2-2* mostró un nivel de expresión moderado. De acuerdo a los resultados obtenidos, los genes *FAD2-1* y *FAD2-2* están relacionados con el contenido de ácido linoleico en *J. curcas*.

En base a los resultados obtenidos se muestra que el gen *D9SD* es de baja expresión y no se puede realizar una correlación entre el contenido de ácido oleico y el nivel de expresión de este gen para *J. cordata* ni *J. curcas*.

Cabe mencionar que las secuencias de oligonucleótidos de los genes involucrados en la síntesis de AG utilizados en el presente estudio pertenecen a *J. curcas*. Por lo observado en el presente trabajo se pudo apreciar que sirvieron para realizar la expresión de genes con la especie *J. cordata*, aunque se tendrá que ser cauteloso en cuanto a los resultados ya que las diferencias de expresión pudiera deberse a esta situación.

Hay que resaltar que este es un estudio preliminar de los genes involucrados en la síntesis de AG en semillas de *J. cordata*. Se tendrá que realizar el análisis de expresión con un mayor número de genes y poder relacionarlos más directamente con el contenido de ácidos grasos presentes en la semilla de *J. cordata*.

VIII. DISCUSIÓN

Actualmente la demanda nacional e internacional por potenciar cultivos de oleaginosas que sean alternativas viables para la producción de biodiesel o combustibles renovables se ha incrementado gradualmente de acuerdo a estudios realizados con otras especies de *Jatropha* (Falasca y Ulbercich, 2008) y otros géneros distintos como *Brassica*, *Cynara*, *Camelina*, *Crambe* (Vivas, 2010) como vegetales alternativos. De estas alternativas existen escasos estudios referentes a la implementación como recurso de producción, por lo que es necesario realizar más trabajos en el ámbito sustentable como fuente renovable de combustible. El presente estudio propone a la planta *J. cordata*, como una alternativa renovable en sustitución del combustible fósil para regiones áridas de México. Sin embargo, los reportes para esta especie son escasos en relación a caracterización química y molecular de dicha planta y es necesario realizar investigaciones para conocer su biología y proponer acciones más concretas.

Dicho lo anterior en este trabajo se analizaron los niveles de expresión de los genes *D9SD*, *KASII* y *ACPI* que codifican para las enzimas que participan en la síntesis de ácido oleico (Habib *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2011). Existen reportes en la literatura sobre la expresión de *ACPI* y *KASII* (Gu *et al.*, 2012) en semillas de oleaginosas donde se ven involucrados como parte esencial en la síntesis de ácidos grasos, contribuyendo en la reacción de saturación en las cadenas de los carbonos (Fennema y Tannenbaum, 2000). A partir de los resultados obtenidos se identificó la expresión en las semillas de *J. cordata*, de los genes *FAD2-1* y *FAD2-2* involucrados en la síntesis de ácido linoleico, quedando así demostrado en este estudio como el primer estudio para esta especie. Reportes recientes indican que *D9SD* y *FAD2-1*, son los principales genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos y se han propuesto para realizar estudios de silenciamiento (Knutzon *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 2012) para potenciar el incremento de un ácido graso de interés.

Con respecto al gen *FAD2-1* éste se expresa más en semillas que en otros tejidos de la planta y de acuerdo a los resultados obtenidos se observó que se expresa en la semilla de *J. cordata*. Se sabe que *FAD2-1* y *FAD2-2* están vinculados en la síntesis de ácido linoleico y son genes que proporcionan información importante en la ruta metabólica. Para predecir el efecto potencial del ácido oleico, se realizó un estudio donde silencian el gen *FAD2-1* en *J. curcas*, incrementando 30% el ácido oleico como lo realizó Gu en su estudio (Gu et al., 2012). De la especie *J. cordata* se puede analizar la posible alteración del contenido de un ácido graso en particular (Tung et al., 2011) sin embargo, los reportes aún son escasos y es necesario la realización de trabajos más específicos. La evaluación de expresión de estos dos genes (*FAD2-1* y *FAD2-2*) codificadores de desaturasas en el presente estudio, concuerda con previas investigaciones (Liu et al., 2014; Tung et al., 2011) donde se les considera de importancia en las semillas de plantas oleaginosas. En un estudio realizado por Lee y colaboradores en *Vitis labrusca* L. mostraron la expresión de dos genes putativos de *FAD2*, ellos realizaron mediante un análisis de funcionalidad, que la expresión en diferentes tejidos indicó que *FAD2-1* es un gen constitutivo pero *FAD2-2* es un gen típico de semillas (Lee et al., 2012), a diferencia del estudio realizado en *J. cordata*, *FAD2-1* se muestra como un gen que se expresa en semilla, y aunque mostró variaciones tiende a seguir un mismo patrón de expresión en las réplicas del estudio. Sin embargo el gen *FAD2-2* tanto en el estudio de Lee y colaboradores (2012) como en el presente estudio también muestra baja expresión este gen en la semilla (Lee et al., 2012).

El gen *D9SD* codifica para la enzima δ -9-estearoil-acilo desaturasa que está involucrada en la síntesis del ácido oleico (Habib et al., 2000). Al parecer este gen está altamente conservado en plantas superiores. En el caso de *J. cordata* ha quedado demostrado que este gen se expresa en semilla y posiblemente interviniendo en la síntesis del ácido oleico como también lo presenta Habib (2000) en su trabajo acerca de la regulación temporal de dos ADNc que codifican la enzima δ -9-estearoil-acilo desaturasa en *Elaiis guineensis*. Por lo tanto se refleja que es una enzima crítica en la síntesis de ácidos grasos de las plantas oleaginosas.

Se tiene conocimiento de distintas variantes de ACP presentes en todos los tejidos de las plantas oleaginosas, aunque no en las mismas cantidades, encontrándose mayor presencia de *ACPI* en la semilla (Branen et al., 2001). *ACPI* es un cofactor cuya presencia es relevante para la síntesis de ácidos grasos en dichas plantas. Pues este gen *ACPI* es el encargado del transporte de cadenas acilo en la ruta metabólica de los 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. En estudios previos se ha determinado este gen en *Arabidopsis*, que participa como proteína precursora de cadenas de acilo en subunidades plastidiales de acetil-CoA Carboxilasas (Ruuska et al., 2002), también se llevó a cabo un estudio preliminar de genes en la especie *Brassica oleracea*, en la cual se encontró que *ACPI* posee 5 alelos co-dominantes en la semilla (Willis, 1977). De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio *ACPI* en *J. cordata* constituye como de importancia en la expresión del gen en la semilla y posiblemente involucrado en el contenido de ácido oleico y que según estudios, este gen aumenta progresivamente conforme se va desarrollando la semilla (Branen et al., 2001). Estos resultados se correlacionan con los resultados obtenidos en el presente estudio; ya que este gen también presenta una mayor expresión en *J. cordata* (Fig. 14) y coincide con la madurez de la semilla analizada en el presente estudio.

La expresión de genes varía en el desarrollo de la semilla. En el caso del gen *KASII* es un gen importante en la síntesis de ácido oleico. Los niveles de expresión alterados en *KASII* conducen a un cambio en el contenido de aceite y calidad, hecho que se vio representado en *Arabidopsis thaliana* (Abadi et al 2000; Dehesh et al 2001; Pidkowich et al 2007). En contraste con la síntesis de ácidos grasos estudiada en las semillas de *J. cordata* muestra que se encuentra en semilla y confirma su presencia en la ruta metabólica de esta especie. Según Meng y colaboradores (2009), encontraron cinco tipos de KAS en las semillas de maní (*Arachis hypogaea* L), distinguiéndose por la presencia de dos histidinas en *KASII*, los cuales mostraron que estos genes son codificadores para proteínas, aminoácidos y ácidos grasos. Sus resultados demostraron que la mayoría de los genes asociados en la síntesis de ácidos grasos tenían más de dos homólogos que se expresaban en el desarrollo de la semilla de maní (Meng

et al., 2009), de acuerdo al presente estudio uno de los genes homólogos presentado por los autores se encuentra en la semilla de *J. cordata*, dicho gen es *KASII* que se encontró en el presente estudio como de baja expresión.

En base a la literatura se tomaron a *ACPI*, *KASII*, *D9SD*, *FAD2-1* y *FAD2-2*, como algunos genes más representativos en el desarrollo de la semilla de plantas oleaginosas (Gu et al., 2012; Meng et al., 2009) y que están asociados en la síntesis de ácidos grasos oleico y linoleico (Habib et al., 2000). Las secuencias de nucleótidos de los genes del presente estudio se identificaron en *Jatropha curcas*, la investigación ha ganado gran interés en estos genes, dado que codifican para enzimas esenciales para la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (Tiwari et al., 2004; Habib et al., 2000).

Avances en la ciencia han proporcionado diversas formas de obtención de recursos tecnológicos que potencian al máximo los recursos naturales que se nos proveen, en este caso es la utilización de *J. cordata* como una alternativa para producción de biodiesel en zonas áridas de México. Se ha observado en el presente estudio que el contenido de los ácidos grasos oleico y linoleico, es similar en *J. cordata* y en *J. curcas*. Esta última especie es empleada en la producción de biodiesel a gran escala (Falasca y Ulbercich, 2008) en diferentes regiones alrededor del mundo y es el organismo modelo del género *Jatropha*.

VII. CONCLUSIONES

Las semillas de *Jatropha cordata* mostraron un contenido alto de ácidos grasos oleico y el linoleico. Siendo el ácido linoleico el ácido graso más abundante, seguido por el ácido oleico.

El gen *ACPI* mostró una expresión mayor en la semilla de *J. cordata*, mientras que para *J. curcas* fue el gen *KASII*.

El gen *FAD2-1* mostró una expresión mayor tanto en las semillas de *J. cordata* como en las semillas de *J. curcas* y un efecto sobre el contenido del ácido graso linoleico.

Los genes *ACPI* y *FAD2-1* han mostrado ser los más expresados en la síntesis de los ácidos grasos oleico y linoleico, respectivamente, en la semilla de *J. cordata*. Mientras que en *J. curcas* los genes mayormente expresados fueron *KASII* y *FAD2-1*.

Existe una relación moderada de la expresión de genes con el contenido de ácidos grasos, excepto con el gen *D9SD* el cual no muestra dicha correlación en las especies de *J. cordata* ni *J. curcas*.

IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda ampliar este estudio para todas las especies del género *Jatropha* que se encuentran en el Estado de Sonora y contribuir con estudios más completos para el género.

Es importante realizar un análisis transcriptómico de la semilla de *J. cordata* y analizar la expresión de genes que están involucrados en la síntesis de ácidos grasos.

Es recomendable realizar la secuenciación de los genes estudiados en el presente estudio para evaluar la complementariedad de bases de las secuencias de la misma especie.

Se sugiere realizar los análisis de expresión utilizando el método de PCR tiempo real, para obtener resultados más precisos y más sensibles.

XI. LITERATURA CITADA

- Akbar, E., Z. Yaakob, S. K. Kamarudin, M. Ismail y J. Salimon. 2009. Characteristic and Composition of *Jatropha Curcas* Oil Seed from Malaysia and its Potential as Biodiesel Feedstock. *European Journal of Scientific Research*. 2009:396-403
- 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 de Maestría. Universidad de Sonora. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Bewley, J. y Black, M. 1982. *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*. Springer Verlag, Nueva York, Estados Unidos de América.
- Branen, J., T. Chiou, y N. Engeseth. 2001. Overexpression of Acyl Carrier Protein-1 Alters Fatty Acid Composition of Leaf Tissue in Arabidopsis. *J Plant Physiol* 2001; 222-9.
- Cañizares, J., 2010. Análisis de expresión mediante microarrays. BioMur modulo3 v1.1.recuperado 05/03/15. http://personales.upv.es/jcanizar/modulo_3/lista.html.
- Chávez, G., R. Gallegos y M. Tapia. 2010. Proyecto de desarrollo de una refinería de biodiesel, por medio de la producción existente de palma africana, para comercialización en la ciudad de Quito. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Economía y Negocios. San Francisco de Quito. República de Ecuador.
- CONABIO. 2000. Estrategia nacional sobre biodiversidad de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- CONABIO. 2012. Biodiversidad Mexicana. Recuperado en febrero 2015, de Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad Sitio web: http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/plantas/magnoliayMarg/candelillas/candelillas.html
- CONAGUA (Comisión Nacional del Agua). 2015. Reporte de Lluvias Registradas. Recuperado 15/02/15. Servicio Meteorológico Nacional.

http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=70:informe-meteorologico-de-lluvias-1100&Itemid=49

- Cortázar, A. y E. Silva. 2004. Métodos Físico-Químicos en Biotecnología. PCR. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. Recuperado Noviembre 22/11/14. <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/pcr.pdf>
- Costa, G., K. Cardoso, L. Del Bem, A. Lima, A. Muciana, L. Campos R. Vicentini, F. Papes, R. Moreira, J. Yunes, F. Campos y M. Da Silva. 2010. Transcriptome analysis of the oil-rich seed of the bioenergy crop *Jatropha curcas* L. BMC Genomics. doi:10.1186/1471-2164-11-462
- Curtis, H., A. Schnek, G. Flores, N. Barnes. 2008. Curtis Biología. Buenos Aires: Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Falasca, S. y A. Ulbercich. 2008. Las especies del género *Jatropha* para producir biodiesel en Argentina. Revista Virtual REDESMA.
- OCDE/FAO. 2013. OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2013-2022. Texcoco, Estado de México. Universidad Autónoma Chapingo http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2013-es
- Felger, R. M., M. Johnson, M. Wilson. 2001. The Trees of Sonora. Oxford University Press, New York, Estados Unidos de América.
- Fennema, O. y S. Tannenbafum. 2000. Introducción a la química de los alimento. España: Acribia. Zaragoza, España.
- Fresnedo, R. y Orozco, R. 2012. Diversity and distribution of genus *Jatropha* in Mexico. Springer Science. doi:10.1007/s10722-012-9906-7
- FIBAO (Fundación para la Investigación Biosanitaria). 2007. Transcripción. Obtenido del portal Medicina molecular de FIBAO. Recuperado 11/03/15. <http://medmol.es/temas/66/>
- Galaz, A., R. Avilez, C. Ucan, J. Chan, V. Loyola. 2012. *Jatropha curcas* una Alternativa para la Obtención de Biodiésel sin afectar al Sector Alimentario. Centro de Investigación Científica de Yucatán. J. BioTecnología, 451: 880–883
- Galeano, L., A. Cristhian y M. Guapacha. 2011. Aprovechamiento y Caracterización de los Residuos Grasos del Pollo para la Producción de un Biocombustible (Biodiesel). Tesis de Ingeniería. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías. Pereira, Colombia.

- Gallegos, J., M. Vizcaya, E. Rodríguez y R. Domínguez. 2011. La semilla y su composición. Republica Boliviana de Venezuela. Universidad Nacional Experimental Politécnica de la Fuerza Armada Bolivariana.
- Gámez, N., P. Alday, H. Makkar, K. Becker, L. Medina. 2012. Chemical characterization of kernels, kernel meals and oils from *Jatropha cordata* and *Jatropha cardiophylla* seeds. *J Sci Food Agric.* 93(7): 1706-10.
- González, M., 2012. Las zonas áridas y semiáridas de México y su vegetación. Impreso en México. Publicación gubernamental nacional: Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). D.F., México.
- González, M., E. M. González, J. Tena, L. Ruacho, y L. López. 2012. Vegetación de la Sierra Madre Occidental, México: una síntesis. *J de SciELO.* ISSN 0187-7151.
- González, O. Silva, J. Espinosa, A. 2004. La semilla Artificial. Una Solución en la Biodiversidad Mundial. Universidad de Granma. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Recuperado 02/02/15. http://grua.ua.es/dspace/bitstream/10045/1115/1/cuadbiod15_3.pdf.
- Grudkowska, M. y B. Zagdanska. 2004. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochim Pol,* 51(3):609-624.
- Gu, K., C. Yi, D. Tian, S. Sangha, Y. Hong y Z. Yin. 2012. Expression of fatty acid and lipid biosynthetic genes in developing endosperm of *Jatropha curcas*. *J. of BioMed Biotechnology for Biofuels.* doi:10.1186/1754-6834-5-47
- Gübitz, G., M. Mittelbach y M. Trabi. 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Biores. Technol.* 67: 73-82.
- Guevara, P., 2011. Comparación del efecto de dos aceites empleados en dieta para gallinas contenido de lípidos y ácidos grasos del huevo durante el primer ciclo de postura. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. D.F., México.
- Habib, S., O. Rashid y C. Thye. 2000. Temporal regulation of two isoforms of cDNA clones encoding delta 9-stearoyl.ACP desaturase from oil palm (*Elaies guineensis*). *J. of Plant Science* 152 (27-33).

- Hemming, C. y A. Radcliffe. 1987. A revision of the Somali species of *Jatropha* (Euphorbiaceae). *Kew Bull* 42(1):103–122.
- Heppard, E., A. Kinney, K. Stecca, G. Miao. 1996. Developmental and Growth Temperature Regulation of Two Different Microsomal w-6 Desaturase Genes in Soybeans. *J. of Plant Physiol* 110: 311-319.
- Hernández, A., P. Vasallo, A. Torres, E. Salido. 1994. Análisis del RNA: Estudios de la expresión génica. *Nefrología* 14:145-62
- Knutzon, D., A. Gregory, S. Thompson, W. Radke, K. Johnson y J. Kridlt. 1992. Modification of Brassica seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc Natl Acad Sci.* 89:2624-2628.
- Kumar, A. y S. Sharma. 2008. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Industrial Crops Products.* 08; 28(1):1-10.
- Lee, K., S. Kim, Y. Go, S. Jung, K. Roh, J. Kim, M. Suh, S. Lee y H. Kim. 2012. Molecular cloning and functional analysis of two FAD2 genes from American grape (*Vitis labrusca* L.). *J. Elseiver; Gene* 509 189–194.
- Li, L., X. Wang, J. Gai y D. Yu. 2007. Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean. *J Plant Physiol.* 164:1516–26.
- López, R., M. Cházaro, R. González y H. Covarrubias. 2011. Árboles de la barranca de los ríos Santiago y Verde. Gobierno de Jalisco. Comisión Estatal del agua de Jalisco CEA Jalisco. ISBN 968-832-392-6
- Martin, P., D. Yerman, M. Fishbein, P. Jenkins, T. Van Deveder y R. Wilson. 1998. The tropical Dedicuos Forest and Environs of Nothwest Mexico. Gentry's Rios Mayo plants Tucson, Arizona: The University of Arizona. Recuperado 17/10/14. Disponible en <http://www.uapress.arizona.edu/Books/bid1204.htm>
- Makkar, H. y Becker, K. 1997. Potential of *J. curcas* seed meal as a protein Supplement to Livestock Feed, Constraints to its Utilization and Possible Strategy to Overcome Constraints. In G. M. Gubitz, M. Mittelbach and M. trabi Eds. *Biofuel and Industrial Products from Jatropha curcas*, Proceedings of the Symposium “*Jatropha 97*” held in Managua, Nicaragua, Feb 23- 27, 1997, pp 190 - 205.

- Medina, L., Alday, P., Gámez, N. 2014. Antioxidant capacity of methanolic extracts from *Jatropha cordata* and *Jatropha cardiophylla* seed cakes in soybean oil biodiesel. doi: 10.13140/2.1.2190.4641
- Molist, P., Pombal, M., Megías, M. 2011. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Universidad de Vigo. Depto. De Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Recuperado 22/01/15. Disponible en <http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html>.
- Nicholson, L., K. Gunisha, T. Singh, T. Osterwalder, W. Gregg, L. Ronald, K. Haig. 2008 Spatial and Temporal Control of Gene Expression in Drosophila Using the Inducible Gene Switch GAL4 System. I. Screen for Larval Nervous System Drivers. J Genetic Society of America. Doi 10.1534/genetics. 107.081968.
- Oliva, R. y Vidal, J. 2006. Genoma humano: nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento. Barcelona: publicaciones. Barcelona, España.
- Pabón, L. y P. Hernández. 2012. Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales. Revista Cubana de Plantas Medicinales 17(2): 194-209.
- Peñalba, M., C. Jacques, M. Valencia y H. Löser. 2008. Plantas y vegetación de la Sierra de Mazatán, Sonora. Nuestra Tierra, Número 10, 15 páginas.
- Peralta, M., 2010. Caracterización Bioquímica de las proteínas de la semilla de *Jatropha curcas* L. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro de desarrollo de productos bióticos. Ciudad de México, México.
- Pérez, R. y Álvarez, E. 2009. Patrones Espacio-Temporal de expresión de mRNA de cuatro genes de la familia MADS-BOX en *Arabidopsis thaliana*. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología-UNAM. Recuperado 03/03/15. Disponible en <http://www.smb.org.mx/smb-anterior/XXVICONGRESO/text/Carteles/Lunes/Lu013.pdf>
- PORIM, 1995. Carotene content: Methods of test for palm oil and palm oil products. In PORIM methods, Palm Oil Research Institute of Malaysia (pp. 43–44).
- Qu, J., H. Mao, W. Chen, S. Gao, Y. Bai, Y. Sun, Y. Geng y J. Ye. 2012. *Development of marker-free transgenic Jatropha plants with increased levels of seed oleic acid*. Biotechnology for Biofuels. doi:10.1186/1754-6834-5-10

- Rodríguez-Baena, D. S., 2006. Análisis de datos de Expresión Genética mediante técnicas de Biclustering. 1-94 p. Memoria del periodo de Investigación. Mayo de 2006. Sevilla, España.
- Rodríguez, J., 2015. Bioquímica Estructural y Metabólica. Universidad de Cantabria. Recuperado 03/03/15. Disponible en <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/bioquimica-estructural-y-metabolica/materiales-de-clase/Tema%2015.%20Biosintesis%20de%20acidos%20grasos.pdf>
- Ruuska, S., T. Girke, C. Bennung y J. Ohlrogge. 2002. Contrapuntal Networks of Gene Expression during Arabidopsis Seed Filling. J. of the Plant Cell American Society of Plant Biologists. doi:10.1105/tpc.000877.
- Sánchez J., 2006. Torota, papelío (*Jatropha cordata*), Universidad de Sonora. Herbario USON. Sitio Oficial de la Asociación para las Plantas Nativas de Sonora, A.C. Recuperado 10/10/14. Disponible en <http://www.apnsac.org/?p=27>
- Sanchez de Lorenzo, J. 2010. El género *Jatropha* L. (Euprobiaceae) en España. Recuperado 26/02/15. Disponible en <http://www.arbolesornamentales.es/Jatropha.pdf>
- Sanhueza, C., K. Nieto y B. Valenzuela. 2002. Ácido linoleico conjugado: un ácido graso con isomería trans potencialmente beneficioso. Revista Chilena Nutrición. doi.org/10.4067/S0717-75182002000200004
- Sarukhán, J., P. Koleff, J. Carabias, J. Soberón, R. Dirzo, J. Llorente, G. Halffter, R. González, I. March, A. Mohar, S. Anta y J. Maza. 2009. Capital natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. CONABIO. Estado de México, México.
- Singh, J., K. Gu, J. Kaur y Z. Yin. 2010. An improved method for RNA isolation and cDNA library construction from immature seed of *Jatropha curcas* L. J. of BMC Research Notes. doi:10.1186/1756-0500-3-126.
- Tamay, L., C. Ibarra y C. Velasquillo. 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.

- Tiwari, N. A. Sachdev, J. Kumar, K. Swathi, R. Johari. 2004. Developmental Expression of Microsomal Omega-6 Desaturase Gene (*fad2-1*) in Soybean Seeds. *J. Plant Biochemistry & Biotechnology*. 13, 107-111
- Tung, A., J. Dong, J. Grover y K. Bileyeu. 2011. A novel *FAD2-1* A allele in a soybean plant introduction offers an alternate means to produce soybean seed oil with 85% oleic acid content. *Theor Appl Genet*. doi 10.1007/s00122-011-1627-3.
- Turner, M., E. Bowers y L. Burgess. 2005. *Sonoran Desert plants*. University of Arizona Press. Tucson, Arizona, Estados Unidos
- Uribe, M., 2010. Simulación de una planta piloto para la producción de biodiesel en el laboratorio de operaciones unitarias de la esiqie. Tesis de Ingeniería. Instituto Politécnico Nacional. Departamento de ingeniería química petrolera. Ciudad de México, México.
- Vieitez, I., B. Irigaray, C. Pérez y M. Gromponen. 2011. Ácidos grasos trans de origen industrial: consumo y posibles sustitutos vs. Ácidos grasos trans “naturales”. Universidad de la Republica. Departamento de Ciencia y Tecnología de los alimentos. Montevideo, Uruguay.
- Vivas, A. M. 2010. Estudio y Obtención de Biodiesel a partir de Residuos Grasos de Origen Bovino. Tesis de Ingeniería. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Pereira, Columbia.
- Voigt, G., B. Biehl, H. Heinrichs y J. Voigt. 1997. Aspartic proteinase levels in seeds of different angiosperms. *J. of Phytochemistry*. 44(3):389-392.
- Wei, Q., J. Li, L. Zhang, P. Wu, Y. Chen, M. Li, H. Jiang, G. Wu. 2012. Cloning and characterization of a β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *Jatropha curcas*. 169:816-824.
- Willis, A., 1977. A preliminary gene list in *Brassica oleracea*. *Eucarpia Cruciferae News*: 22-24. Recuperado 03/03/15. Disponible en http://www.brassica.info/info/reference/GENELIST_Wills1977.pdf.
- Williams, J., 1997. *Physiology, biochemistry and molecular biology of plant lipids*. *J. of Plant Physiology*. Dordrecht: Kluwer Acad. P. 229. ISBN 978-90-481-4784-7
- Xu, R., W. Ruling y L. Aizhong. 2011. Expression profiles of genes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis in developing seeds of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.).

- Ye, J. Qu, J. Bui, H. T. Chua, N. H. 2009. Rapid analysis of *Jatropha curcas* gene functions by virus induced gene silencing. J. of Plant Biotechnol. doi:10.1016/j.biombioe.2011.01.001
- Yilmaz, R. y Toledo, T. 2004. Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid. J. Agric. Food Chem. doi: 10.1021/jf030117h

XII. ANEXO

Reactivos utilizados en los análisis químicos y moleculares

<u>Nombre</u>	<u>Marca</u>	<u>Reactivo usado</u>	<u>Función</u>
TRIzol Reagent	Life Technologies	-Tiocianato de guanidina -Fenol	Extracción de ARN Total
Kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Invitrogen	-Buffer 10X -Stop Solution -DNAsa	Síntesis de ADNc
illustra Ready-To-Go RT-PCR Beads	General Electric	-Perla hidrolizada* -Oligo dT(pd(T ₁₂₋₁₈))	Síntesis de ADNc
Illustra puReTaq Ready-To-Go PCR Beads	General Electric	-Perla hidrolizada** -Primer Forward 5' -Primer Reverse 3'	Multiplicación de copias de un fragmento de ADNc (PCR)
<i>n</i> -hexane, C ₆ H ₁₄	EMD	Hexano	Extracción de Aceite

*2.0 unidades de Taq ADN polimerasa, 10 mM Tris-HCl, (pH 9 a temperatura ambiente, 60 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, (M-MuLV) Transcriptasa Reversa (FPLC pure), RNAGuard Ribonucleasa y estabilizadores, Libre de ARNasa/ADNasa.

** ~2.5 unidades de PureTaq ADN polimerasa, buffer, 10 mM Tris-HCl, (pH 9 a temperatura ambiente), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP.