



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V



CUERPO ACADÉMICO RECURSOS FITOGENÉTICOS
TROPICALES

Caracterización molecular y bioquímica de piñón comestible (*Jatropha curcas* L.) de seis regiones de Chiapas

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA
TROPICAL

Por
CONSUELO MARGARITA MOLINA NARCIA

Directora de tesis:
M.C. María de los Ángeles Rosales Esquinca

Villaflores, Chiapas a 7 de diciembre 2015.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V
DIRECCIÓN



VILLAFLORES, CHIAPAS
23 DE NOVIEMBRE DE 2015
OFICIO N° D/1298/2015

C. ING. CONSUELO MARGARITA MOLINA NARCIA
MAESTRANTE EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS, CAMPUS V
P R E S E N T E

En atención a que usted ha presentado los votos aprobatorios del Honorable Jurado, designado para su evaluación profesional de tesis titulada: "Caracterización molecular y bioquímica de piñón comestible (*Jatropha curcas* L.) de seis regiones de Chiapas", por este conducto le comunico que se le autoriza la impresión del documento, de acuerdo a los lineamientos vigentes de la Universidad.

Sin otro en particular, le envió un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR"

M.C. JAIME LLAVEN MARTÍNEZ
DIRECTOR.

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRONOMICAS



C.c.p. ARCHIVO.

JLLM/marh



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
CONSORCIO DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS



MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

Cuerpo Académico Recursos Fitogenéticos Tropicales

La presente tesis titulada **Caracterización molecular y bioquímica de piñón comestible (*Jatropha curcas* L.) de seis regiones de Chiapas**, forma parte del proyecto de: **Conservación y uso sustentable de *Jatropha*: colecta y resguardo de accesiones documentadas de *Jatropha* del estado de Chiapas** con clave de registro BEI-JAT-12-7 dirigido por Dr. Ricardo Quiroga-Madrigal y por el proyecto: **Caracterización molecular y bioquímica de accesiones de piñón comestible (*Jatropha curcas* L.)** financiado por el Consejo de Ciencia y Tecnología del estado de Chiapas dirigido por M.C. María de los Ángeles Rosales Esquinca, como parte del desarrollo de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: Investigación, desarrollo y transferencia de tecnología en recursos fitogenéticos tropicales del Cuerpo Académico Recursos Fitogenéticos Tropicales (CARFIT).



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V**



MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

Cuerpo Académico Recursos Fitogenéticos Tropicales

Esta tesis titulada “**Caracterización molecular y bioquímica de piñón comestible (*Jatropha curcas* L.) de seis regiones de Chiapas**”, fue realizada por la ing. **Consuelo Margarita Molina Narcia**, bajo la dirección y asesoría del Comité Tutorial indicado como requisito parcial para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL**.

**COMITÉ TUTORIAL
DIRECTORA**

M.C. MARÍA DE LOS ÁNGELES ROSALES ESQUINCA

CO-DIRECTORA

DRA. ROCÍO MEZA GORDILLO

ASESORES

DRA. PILAR PONCE DÍAZ

M.C. MARIANO SOLÍS LÓPEZ



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V**



MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

Cuerpo Académico Recursos Fitogenéticos Tropicales

Esta tesis titulada “**Caracterización molecular y bioquímica de piñón comestible (*Jatropha curcas* L.) de seis regiones de Chiapas**”, fue realizada por la ing. **Consuelo Margarita Molina Narcia**, ha sido aprobada por la Comisión Revisora indicada, como requisito para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL**.

COMISIÓN REVISORA

M.C. MARÍA DE LOS ÁNGELES ROSALES ESQUINCA

DRA. ROCÍO MEZA GORDILLO (ITTG)

DRA. PILAR PONCE DÍAZ

A DIOS

Gracias Dios mío por tu incomparable amor que hace en mi vida nunca rendirme y seguir luchando por el camino que has trazado para mi vida, llevándome a lograr mis sueños y enseñándome cada día que con paciencia, oración y amor nada es inalcanzable.

A MI FAMILIA

Gracias a Rigoberto, Danna y Miguel por siempre apoyarme y alentarme a seguir siempre mis sueños, han sido un gran motor para alcanzar un objetivo más en mi carrera "Los amo".

A MIS PADRES

Doy gracias a Dios por permitirme nacer de la unión de dos seres Daniel Gil y Margarita, tan maravillosos que me enseñaron todas las cualidades para nunca rendirme y lograr los sueños que siempre me propuse, ellos con amor, paciencia y disciplina supieron guiarme siempre.

A MIS HERMANOS

Eugenio, Eduardo y Daniel gracias por apoyarme siempre en todos mis triunfos y fracasos y siempre estar ahí cuando los necesito.

A LA M.C. MARÍA DE ÁNGELES

Gracias dra. Ángelita por ser siempre mi amiga, mi consejera, mi paño de lágrimas y además mi directora, gracias por enseñarme toda su experiencia y orientarme para que juntas lográramos esta tesis.

AL DR. RICARDO QUIROGA MADRIGAL

Gracias por esa confianza que deposito en mí y me hizo parte de este trabajo, con esto logro que yo continuara con mis sueños.

A LA DRA. ROCÍO MEZA GORDILLO Y M.C. CELINA LUJÁN

Gracias a las dos por creer en mí y enseñarme todo lo necesario para la realización de esta tesis, por perseverar conmigo para lograr un buen resultado, Dios las bendiga.

AL M.C. MARIANO SOLIS

Gracias por tu apoyo y confianza para compartir tus conocimientos y experiencia y así culminar con este trabajo.

AL ITTG, COCYTECH, SINAREFI, SAGARPA, SNICS, REDGENMEX

Gracias por la confianza y el apoyo que depositaron en mí para la realización de este trabajo.

AL Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general	2
1.2. Objetivos específicos.....	2
1.3. Hipótesis.....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Jatropha curcas</i> (L.).....	3
2.2 Descripción botánica	3
2.3 Composición química	4
2.4 Toxicidad	6
2.4.1 Ésteres de forbol.....	8
2.4.2 Curcinas.....	8
2.5 Determinación de toxicidad con marcadores moleculares.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Colecta de la semilla.....	11
3.2 Marcadores moleculares	15
3.2.1 Preparación del material biológico	15
3.2.2 Extracción del DNA genómico	15
3.2.3 Amplificación mediante marcador tipo SCAR	16
3.2.4 Electroforesis	17
3.3 Contenido de aceite.....	17
3.4 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	17
3.4.1 Preparación de la muestra	17
3.5 Cuantificación de ésteres de forbol.....	18
3.5.1 Curva de estandarización para ésteres de forbol.....	18
3.6 Determinación de curcinas	19
3.6.1 Extracción	19
3.6.2 Preparación de la suspensión de eritrocitos humanos tripsinizados.....	19
3.6.3 Ensayo de hemaglutinación	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1 Obtención del DNA genómico	20
4.2 Amplificación mediante PCR con marcador molecular tipo SCAR	21
4.3 Determinación de ésteres de forbol mediante HPLC.....	22
4.3.1 Curva de calibración	23
4.3.2 Contenido de ésteres de forbol en las accesiones.....	24
4.4 Determinación de lectinas	27

5. CONCLUSIONES	31
6. LITERATURA CITADA.....	32
APÉNDICE.....	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Metabolitos aislados de diferentes estructuras de <i>Jatropha curcas</i>	5
2	Datos de ubicación de los 58 sitios de colecta de accesiones de piñón (<i>Jatropha curcas</i> L.) del estado de Chiapas.....	11
3	Características del cebador SCAR.....	16
4	Composición de la mezcla de amplificación.....	16
5	Diluciones utilizadas para la realización de la curva de los ésteres de forbol.....	18
6	Concentración de ésteres de forbol para cada accesión estudiada.....	27
7	Hemaglutinación de las lectinas en las accesiones estudiadas....	28
8	Resultados de los datos obtenidos.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ubicación geográfica de los sitios de colecta de <i>Jatropha curcas</i> (L.) reportada como comestible por los pobladores en el Estado de Chiapas.....	14
2	Electroforegramas de DNA genómico de 58 accesiones de piñón. En A, se presentan las accesiones 1 a la 41, en B las accesiones 43 a la 77.....	20
3	Electroforegramas de la amplificación de DNA de piñón con los cebadores ISPJ1-F y ISPJI-R. En A, se presentan las accesiones de la 1 a 41, en B las accesiones 43 a 77.....	21
4	Cromatograma del 12-miristato 13-acetato 4-O- metil éter forbol 500 ppm utilizado como estándar.....	23
5	Curva de estandarización con el equivalente a ésteres de forbol 12-miristato 13-acetato 4-O-metil éter.....	24
6	Cromatogramas obtenidos según la concentración de ésteres de forbol, (A) muestra 13, (B) muestra 39, muestra 35 (C).....	25
7	Obtención de hemaglutinación de lectinas.....	28
8A	Cromatogramas obtenidos de las muestras 5 (A) y 6 (B).....	35
9A	Cromatogramas obtenidos de muestras 8(A) y 13(B).....	36
10A	Cromatogramas obtenido de muestras 15(A) y 17 (B).....	37
11A	Cromatogramas obtenido de muestras 19 (A) y 21(B).....	38
12A	Cromatogramas obtenidos de las muestras 22(A), 23(B) y 25(C).....	39
13A	Cromatogramas de muestras obtenidas 29(A), 35(B) y 39(C).....	40
14A	Cromatogramas de muestras obtenidas 43(A) y 46(B).....	41
15A	Cromatogramas de las accesiones 49(A), 55 (B) y 65 (C).....	42
16A	Cromatograma de la muestra obtenida 75(A).....	43

RESUMEN

Jatropha curcas (L.) es una planta nativa de América, principalmente de México y Centroamérica que pertenece a la familia de las Euphorbiaceae, las semillas tienen un alto contenido de aceite, lo cual ha permitido que esta especie se considere como cultivo potencial para la producción de biodiesel. Además se ha encontrado que tiene muchas ventajas nutrimentales por lo que es una planta muy cultivada en diversos países y ha sido objeto de muchos estudios para el aprovechamiento de su proteína y aceite, aunque se han encontrado semillas tóxicas tanto para el consumo animal como humano, que acumulan metabolitos secundarios como mecanismos de defensa como fitatos, lectinas, taninos, glucósidos cianogénicos, saponinas, inhibidores de tripsina, glucósidos de pirimidina, alcaloides y ésteres de forbol, a los que se les atribuyen principalmente su toxicidad. Sin embargo, en México se han encontrado plantas de *J. curcas* no tóxicas, y entre los estados en los que se encuentra esta variedad está Chiapas donde se realizó una colecta en seis regiones donde hay reporte de que esta especie es consumida por los pobladores.

En este trabajo, se determinó la toxicidad, el contenido de los ésteres de forbol, las lectinas y el contenido de aceite de semillas de 20 accesiones de *J. curcas*. Para la determinación de toxicidad se utilizó un marcador SCAR que tiene la característica de mostrar una banda asociada a la toxicidad de 543 pb, la cual se encontró en un 62% de las accesiones estudiadas. De las 58 accesiones colectadas, solamente tres presentaron una concentración de ésteres de forbol inferior a 0.11 mg g^{-1} que es el nivel máximo para considerarla no tóxica. En cuanto a las lectinas, se determinó su presencia por hemaglutinación, las cuales se observaron en un 45% de las accesiones estudiadas. El contenido de aceite se encontró dentro del rango establecido en la literatura (40-45%). Con los resultados encontrados en este estudio se muestra que no existe una certeza para determinar la toxicidad de *J. curcas* en la asociación entre los marcadores moleculares, la concentración de ésteres de forbol y la presencia de lectinas.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Jatropha* pertenece a la familia de las Euphorbiaceae, cuenta con más de 70 especies, que se destacan por su rápido crecimiento y fácil propagación. Las semillas tienen un alto contenido de aceite, lo cual ha permitido que esta especie se considere como cultivo potencial para la producción de biodiesel.

J. curcas es un arbusto o árbol pequeño originario de América pero ampliamente cultivado en países de Asia y África; es reconocida por ser un excelente cultivo debido a que se adapta fácil a zonas áridas, semiáridas y de alta pluviosidad; prospera en suelos de baja fertilidad, permite recuperar nutrientes, restaurar y rehabilitar suelos afectados por la erosión.

Esta planta ha demostrado tener muchas ventajas nutrimentales por lo que es cultivada en diversos países y ha sido objeto de numerosos estudios para el aprovechamiento de su proteína y aceite. En México su semilla es utilizada en la elaboración de platillos tradicionales en Puebla, Morelos, Hidalgo, Veracruz y Quintana Roo. Sin embargo, por ser una especie semidomesticada, las semillas ricas en suplementos energéticos, sintetizan y acumulan metabolitos secundarios como mecanismos de defensa como fitatos, lectinas, taninos, glucósidos cianogénicos, saponinas, inhibidores de tripsina, glucósidos de pirimidina, alcaloides y ésteres de forbol, entre otros.

Los ésteres de forbol son los metabolitos a los que se les atribuye la principal causa de toxicidad y con base en su concentración, las plantas de *J. curcas* son clasificadas como tóxicas o no. La cuantificación de los ésteres de forbol es un punto clave para el aprovechamiento de *Jatropha curcas* en la industria.

La dificultad de eliminar los ésteres de forbol y otros factores antinutricionales o disminuirlos hasta los niveles reportados como inocuos, puede obstaculizar el aprovechamiento de esta especie en la alimentación de humanos y animales, aún cuando presenta un alto contenido y calidad de proteína en sus semillas. Por ello, resulta necesaria la caracterización de diferentes accesiones de *J. curcas*, en las regiones donde se presentan genotipos que se utilizan en la preparación de diversos platillos. En Chiapas *J. curcas* se utiliza mayormente como cerco vivo y se tienen algunos reportes de su consumo en la alimentación humana, sin contar con datos precisos de la distribución y proporción de genotipos tóxicos respecto a los no tóxicos.

1.1. Objetivo general

Determinar el contenido de aceite y algunas características bioquímicas y moleculares asociadas a la toxicidad, en semillas de *Jatropha curcas* (L.) colectadas en seis regiones del estado de Chiapas.

1.2 Objetivos específicos

- a) Estimar mediante Espectrofotometría de Infrarrojo Cercano (NIR) el contenido de aceite en la semilla completa de *Jatropha curcas* (L.)
- b) Cuantificar por cromatografía de alta eficacia (HPLC) el contenido de ésteres de forbol en la semilla completa de *Jatropha curcas* (L.)
- c) Determinar mediante hemaglutinación la presencia de lectinas en semillas de *Jatropha curcas* (L.)
- d) Determinar la presencia de marcadores tipo SCAR asociados a toxicidad en DNA de hojas cotiledonares de *Jatropha curcas* (L.)

1.3 Hipótesis

- a) Las accesiones de piñón comestible no presentan la banda asociada a la toxicidad con el marcador molecular tipo SCAR, el contenido de ésteres de forbol es bajo y las lectinas están ausentes.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Jatropha curcas* (L.)

Ante el grave problema de la contaminación ambiental, la amenaza de que las reservas de combustibles fósiles se agotarán en un futuro y el incremento del precio internacional del petróleo crudo, muchos países han decidido impulsar el desarrollo y uso de energías alternativas, que ofrecen grandes ventajas sobre las fuentes energéticas actuales, ya sea por su efecto menos contaminante o fundamentalmente por tratarse de energías renovables.

Existen fuentes vegetales semidomesticadas con alto contenido de aceite, como es el caso de *Jatropha curcas* (L.) que no forma parte de los cultivos básicos pero que por sus ventajas agronómicas es interesante y puede dar un impulso a la agricultura en México (Martínez, 2007).

Este cultivo se ha vuelto una alternativa como fuente de producción de biodiesel por el alto contenido de aceite en sus semillas, además que posee un alto contenido de proteína y se pueden obtener una serie de subproductos que aumenten la cadena de producción (Makkar y Becker, 2009).

2.2 Descripción botánica

Jatropha curcas (L.) corresponde a las plantas dicotiledóneas, clase Magnoliopsida, lo que indica que es una especie muy evolucionada, desde el punto de vista filogenético dicha clase se subdivide en seis subclases. *J. curcas* pertenece a una de las 58 000 especies de la subclase Rosidadae (Donogue y Mathews, 1998).

El piñón tropical (*J. curcas*) también llamado tempate, piñón botija, piñón de leche, coquito, coquillo, cotoncito, piñoncillo, *ashté* o *axté*, *chuta* o *chote* (Gómez *et al.*, 2009), es una oleaginosa perenne, de crecimiento rápido, porte arbustivo de 2 a 3 m de alto, pero en condiciones especiales puede alcanzar hasta 8 m; el grosor del tronco es de 20 cm en la base, con brotación a corta altura de varios tallos, la corteza lisa en color blanco grisácea (Martínez *et al.*, 2006; Makkar *et al.*, 1998).

La planta tiene hojas verdes con una longitud y anchura de 6 a 15 cm. Las plantas de *J. curcas* muestran diferente estructuración que va desde una planta con tallo principal sin o con pocas ramas, a una planta que se ramifica desde la base. Las ramas de la planta de piñón contienen un líquido (látex) de color blanco, de textura pegajosa que deja manchas marrones, insolubles al agua. El sistema radical de las plantulas está muy bien desarrollado, con raíces creciendo tanto lateral como verticalmente en las capas más profundas del suelo (van der Putten *et al.*, 2010).

La especie es monoica ya que forma inflorescencias con flores masculinas y femeninas en la misma planta, aunque algunas plantas son polígamas, ya que presentan flores hermafroditas, y hay también, plantas sólo con flores femeninas, las cuales son pequeñas, con pétalos de 6 a 7 mm de largo, blanquecinos, verdoso-amarillos en el centro y pubescentes. La longitud del pecíolo varía entre 6 y 23 mm. En condiciones donde ocurre el crecimiento continuo, un desequilibrio del pistilo trae como consecuencia un número más alto de flores femeninas que presentan brácteas acuminadas y las masculinas presentan brácteas ovadas y pedicelos pubescentes.

Las flores se polinizan, de manera importante por abejas, por lo que las colmenas son necesarias en el cultivo (Eguiluz, 2010).

Los frutos crecen al final de las ramas en racimos de 5 a 20 unidades, producto de cada inflorescencia formada y flores fecundadas; tienen una forma semejante a un balón de fútbol americano y alrededor de 40 mm de largo, es una cápsula ovoide, verdosa-amarillenta y carnosa, pero café oscuro o negro y dehiscente cuando está seca. Para desarrollarse requiere 90 días desde la floración hasta que maduran las semillas. Cada fruta contiene, por lo general, tres semillas, aunque a veces se pueden encontrar hasta cuatro o cinco (van der Putten *et al.*, 2010).

Los frutos maduran en invierno cuando el arbusto tira las hojas, pudiendo producir varias cosechas durante el año si la humedad de la tierra es buena y las temperaturas son suficientemente altas (Eguiluz, 2010).

La semilla de piñón o *Jatrofa* tiene en promedio 18 mm de largo, 12 mm de ancho y 10 mm de espesor. Las dimensiones de las semillas varían en una misma planta, así también entre semillas de diferentes procedencias. Los rangos de peso de las semillas varían entre los 0.5 y 0.8 gramos cada una, con un promedio de 1,333 semillas por kg (van der Putten *et al.*, 2010).

Las semillas consisten en una cáscara dura o testa, que representa alrededor del 37% en peso del total y una almendra blanca y suave al interior que representa al 63% restante. Las semillas secas tienen un contenido de humedad de alrededor del 7% y contienen un rango de 32 a 40% de aceite, con un promedio de 34% (*op. cit.*). Su producción anual promedio es de 5 t ha⁻¹. La semilla es cosechada cuando la cápsula está madura y esta cambia del verde a amarillo, esto ocurre de dos a cuatro meses después de la polinización (Eguiluz, 2010).

La *J. curcas* es una planta de gran resistencia que puede adaptarse a diversas condiciones ecológicas. Su mecanismo de supervivencia le permite soportar períodos de estrés como frío, sequía severa y bajos niveles de nutrientes. La planta es capaz de recuperar los nutrientes de las hojas y guardarlos en el tallo y la raíz; cuando esto ocurre las hojas se vuelven amarillas y caen, el tallo permanece verde y fotosintéticamente activo. En este estado de latencia, la planta puede sobrevivir por períodos de más de un año sin lluvia (van der Putten *et al.*, 2010).

2.3 Composición química

Las plantas y en general los seres vivos, sintetizan diversos compuestos para su funcionamiento (metabolitos primarios) como los aminoácidos, carbohidratos, lípidos, glicéridos, ácidos nucleicos y compuestos que intervienen en sus interacciones ecológicas con el ambiente (metabolitos secundarios) como terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides. Estos metabolitos secundarios cumplen con funciones de defensa contra predadores y patógenos, como agentes alelopáticos que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas, para encantar a los polinizadores con sus bellos colores o atrayendo a los animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento y que contribuyen a la dispersión de las semillas. El conocimiento, estudio y utilidad de estos metabolitos ha propiciado el desarrollo de la fotoquímica a través de la incorporación de nuevas técnicas de extracción,

purificación e identificación de moléculas biológicamente activas, como materia prima para la fabricación de productos farmacéuticos, cosméticos, nutracéuticos y agropecuarios (Pabón y Hernández-Rodríguez, 2012).

J. curcas es un ejemplo de esta gran diversidad tal como se reporta en el gran número de estudios dirigidos a conocer la composición química en cada una de las partes de esta planta. Se han identificado flavonoides, diterpenos, esteroides, triterpenos, saponinas, cumarinas, desoxipreusomerinas, ácidos orgánicos, iridoides, saponinas y taninos (Gübitz *et al.*, 1999), así como también distintos componentes tóxicos (ésteres de forbol, curcinas, inhibidores de tripsina, lectinas y fitatos) (Gübitz *et al.*, 1999, van der Putten *et al.*, 2010). En el Cuadro 1 se muestran los compuestos aislados en cada una de las estructuras de la planta (Pabón y Hernández-Rodríguez, 2012).

Cuadro 1. Metabolitos aislados de diferentes estructuras de *Jatropha curcas*

Estructura	Compuestos
Hojas	Flavonoides: apigenina, vitexina, isovitexina Diterpenos: heudolotina Triterpenos cíclicos: estigmasterol, estigmaste-5-en-3 β , 7 β -diol, estigmaste-5-en-3 β , 7 α -diol, colest-5-en-3 β , 7 β -diol, colest-5-en-3 β , 7 α -diol, campesterol, β -sitosterol, β -D-glucósido del 7-ceto- β -sitosterol, α -amirina 1-triacontanol (alcohol ceroso), Dímero de un triterpeno alcohol y dos glicósidos flavonoides Aminas: mezcla de 5-hidroxipirrolidina-2-ona y pirimidina-2,4-diona
Tallos	Triterpenos: β -amirina, β -sitoesterol, taraxerol, epi-friedelinol, friedelina, jatrocuringina Cumarinas: éster metílico escopoletina Diterpenos: palmarumicina CP1, palmarumicina JC1, palmarumicina JC2
Parte aérea	Ácidos: <i>o</i> -cumárico, <i>p</i> -cumárico, <i>p</i> -metilbenzoico, <i>p</i> -hidroxibenzoico, protocatéquico, resorsílico Diterpenos: 15- <i>o</i> -acetil-15-epi-(4E)-jatrogrossidentadiona, isojatrogrossidentadiona 3- β -acetoxi-12-metoxi-13-metil-podocarpa-8,11,13-trieno-7-ona, 3 β ,12-hidroxi-13-metil-podocarpa-8,10,13-trieno
Raíces	Esteroides: β -sitosterol y su β -D-glucósido, daucosterol Triterpenos: taraxerol Cumarina: tomentina, marmesina, propazina, jatrofina, 5-hidroxi-6,7-dimetoxicumarina, 6-metoxi-7-hidroxycoumarina Diterpenos: curculatirano A y B, curcusona A-D, jatrolona Ay B, jatrolol, jatrolactama, caniojana Flavonoides: nobiletina
Látex	Péptidos: curcaciclina A y B Enzimas: curcaína Alcaloides: jatrofina, jatrolano
Semillas	Esteroides: β -sitosterol y su β -D-glucósido Diterpenos: factores C1- C6 (diésteres núcleo tiglano 12- deoxi-16-hidroxi-forbol) Azúcares: dulcitol y sacarosa Proteínas: esterasa JEA, JEB, lipasa JL, curcina, fitatos, saponinas e inhibidores de la tripsina

Además la semilla contiene minerales como fósforo, calcio, sodio, potasio y magnesio (Eguiluz, 2010).

Al ser considerada como una planta oleaginosa por su alto contenido de aceite en las semillas, se han empleado diferentes métodos para optimizar los procesos de extracción; Heng *et al.* (2009) encontraron que la extracción con hexano por el método de Soxhlet, un rendimiento de 49.21% y por el método de fluidos supercríticos de 43.51% (Heng *et al.*, 2009). Asimismo, las características fisicoquímicas de este aceite, lo hacen adecuado para la fabricación de biodiesel, barnices, betunes y jabones, entre otros productos. La composición mayoritaria de este aceite es de 64% de triacilgliceroles, 12% de compuestos hidrocarbonados y 9 % de ácidos grasos libres, entre los que se encuentran los ácidos oleico, linoleico, palmítico y esteárico. A pesar de que este aceite tiene una composición similar a la de muchos aceites comestibles, no se han comercializado por sus efectos tóxicos atribuidos a los ésteres de forbol presentes, no sólo en la semilla, sino que han sido encontrados en diferentes partes de la planta (Kumar y Sharma, 2008).

2.4 Toxicidad

Si bien es conocida la amplia utilización de las plantas en medicina tradicional, no todas son seguras por la toxicidad que algunas presentan. Se conoce que la toxicidad varía en relación con el tipo de principio activo y su concentración, el tipo de principio activo, el tiempo de uso y el lugar geográfico de donde se extraen las plantas. Igualmente, pueden causar diferentes riesgos que van desde enfermar, herir o dar muerte a los seres vivos. Teniendo en cuenta el amplio conocimiento que se ha generado a través de los usos etnobotánicos, es importante realizar estudios sistemáticos y controlados para conocer el grado de toxicidad y la influencia de esta en las aplicaciones farmacológicas en los seres vivos. Además, propiciar el aislamiento de principios activos tóxicos para patógenos e inocuos para el ambiente permitiría generar productos contra plagas y vectores de agentes patógenos que benefician la producción agrícola, la salud humana y veterinaria (Pabón y Hernández-Rodríguez, 2012).

El efecto tóxico del piñón ha sido reportado para la mayor parte de la planta, sin embargo, la semilla es la parte más estudiada, tanto por su importancia, como por los efectos que causa en los seres vivos, desde microorganismos hasta animales pluricelulares. Los constituyentes tóxicos de la semilla incluyen: taninos, saponinas, alcaloides, ésteres, toxoalbúminas y compuestos cianogénicos. En los frutos y semillas se han reportado propiedades contraceptivas (Yan *et al.*, 2010). La mayoría de los ensayos donde se ha evaluado el efecto tóxico de las semillas en animales han mostrado síntomas clínicos comunes como dolor abdominal, diarrea, hemorragia, pérdida de apetito, disnea, desequilibrio nervioso y ojos hundidos, adicionalmente, los hallazgos histopatológicos reportan inflamación gastrointestinal, necrosis del hígado, corazón y riñones. Los estudios de toxicidad han permitido identificar que las diferencias en el efecto tóxico radican en la dosis, en el modo de administración y el animal que se utilice en el ensayo biológico (Yan *et al.*, 2010). Estos parámetros se deben tener en cuenta porque proporcionan una aproximación sobre las condiciones de inocuidad de la sustancia a utilizar de manera segura.

Rakshit *et al.* (2008) encontraron que en ratas alimentadas con semillas desengrasadas de piñón la muerte ocurre al cabo de 6 a 8 días y si se alimentan con semillas asadas o cocidas se prolonga entre 14 y 16 días. Con relación a la dosis se ha reportado que cuando en las cabras se suministra por vía oral una concentración diaria de 1 g kg^{-1} de peso, la muerte ocurre entre los siete y 11 días después de la ingestión, si la dosis disminuye a 0.25 g kg^{-1} , se provoca la muerte entre 18 y 21 días después (Abdel *et al.*, 2003). El modo de administración también puede provocar diferencias en el efecto tóxico de la sustancia que se evalúa; en forma general, se observa que la administración oral ocasiona la muerte en la mayoría de los animales, mientras que si se utiliza como tópico se genera una alteración local que puede ir desde un eritema hasta una lesión necrótica (Yan *et al.*, 2010).

En los humanos, el consumo accidental de las semillas no comestibles puede causar náuseas, vómitos y diarrea (Makkar y Becker, 2009). En 1854, en Birmingham, Inglaterra, más de 30 niños se intoxicaron con semillas de *J. curcas*. Estos efectos tóxicos, atribuidos a la presencia de factores antinutricionales (saponinas, fitatos, inhibidores de tripsina, glucosinolatos, inhibidores de amilasa, glicósidos cianogénicos, curcinas, curcaina y los ésteres de forbol), han llevado a la búsqueda de antídotos como la utilización de *Bixa orellana* (achiote) y *Peltrophorum africanum* (flamboyán dorado) para contrarrestar las intoxicaciones en poblaciones de México y del sur de África (Martínez *et al.*, 2006).

Esto ha despertado el interés por conocer a qué factor antinutricional y tóxico se deben los mayores efectos adversos, por lo que se han desarrollado varias investigaciones con algunos de estos factores. La curcina presenta una toxicidad oral aguda y un efecto aglutinante de los eritrocitos; el efecto tóxico está asociado con su participación en la inhibición de la síntesis de proteínas *in vitro* (Gübitz *et al.*, 1999). Sin embargo, este compuesto se encuentra en muchos alimentos como granos y vegetales, por lo que su presencia en las semillas no es una barrera para el aprovechamiento de esta parte de la planta, siempre y cuando no se encuentre este compuesto en altas concentraciones (King *et al.*, 2009).

Para disminuir la toxicidad de esta planta se han realizado diversos métodos de desintoxicación, como tratamiento térmico, extracción con solventes, extracción con radiación ionizante, entre otros (King *et al.*, 2009). El tratamiento térmico no es considerado como un método eficaz para disminuir la concentración de factores antinutricionales, por lo que se ha optado por la combinación de temperatura con bases fuerte, obteniéndose así una disminución de 86% de este tipo de compuestos (Kumar y Sharma, 2008). Otro método evaluado es la extracción con etanol, obteniéndose buenos resultados para eliminar por completo los ésteres de forbol y lectinas, aunque estos procesos de desintoxicación sólo se han realizado a escala de laboratorio y no a gran escala debido al alto costo económico (Saetae y Worapot, 2011).

Una opción viable para la utilización de la semilla de esta planta, sin los efectos tóxicos producidos por los metabolitos, es el establecimiento de huertos con especies provenientes de México o América Central que no presentan este efecto tóxico. Por ejemplo las semillas procedentes de algunas regiones en México son empleadas para alimentar pollos y cerdos e incluso después de ser hervidas o asadas son utilizadas para preparar platillos tradicionales como pipián, tamales o después de

tostarlos en un comal lo consumen como si fuera cacahuete (Gübitz *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 2009).

De acuerdo con los resultados encontrados por diferentes autores, se considera a los ésteres de forbol, así como las curcinas (lectinas), los principales componentes tóxicos en la semilla de piñón no comestible (Devappa *et al.*, 2010).

2.4.1 Ésteres de forbol

Los ésteres de forbol son diterpenos que pueden causar la muerte y están presentes en variedades no comestibles pero ausentes o en poca concentración en las accesiones de semilla comestible ($\geq 0.11 \text{ mg g}^{-1}$) (Makkar *et al.*, 1998, Makkar y Becker, 2009).

Los ésteres de forbol son el componente más tóxico de *Jatropha* y se encuentran presentes en elevadas concentraciones en los núcleos de las semillas. Makkar *et al.* (1998) establecieron que el contenido de ésteres de forbol varía según la procedencia de la semilla; este compuesto se conserva aún después de realizar el prensado para la extracción de aceite, según su grado de desengrase (Gandini *et al.*, 2007).

Inducen a una notable diversidad de efectos biológicos a concentraciones excepcionalmente bajas. Son responsables de efectos irritantes de piel, purgante y promoción tumoral, ya que estimulan la proteína quinasa C (PKC) que participa en la señalización y la transducción en procesos de desarrollo de la mayoría de las células y los tejidos, produciendo una variedad de efectos biológicos en una amplia gama de organismos (Goel *et al.*, 2007).

Los diésteres de forbol son moléculas anfipáticas que presentan una toxicidad que es probable, se relacionen con el gran número de actividades que presentan (inflamatoria, molusquicida, entre otras). Estos compuestos además provocan hemorragia gastrointestinal y cambios microscópicos en riñones, pulmones, corazón, hígado y bazo (Rakshit *et al.*, 2011).

Experimentos realizados con peces, ratones, ratas, ovejas y cabras, para evaluar la toxicidad provocada por ésteres de forbol, han mostrado efectos como la disminución en el nivel de glucosa, aumento en la concentración de arginina, glutamato y oxalacetato, falta de apetito, disminución de la ingesta de agua, diarrea, deshidratación y otros efectos hemorrágicos en diferentes órganos (Adam y Magzoub, 1975).

2.4.2 Curcinas

Las curcinas son un tipo de lectinas, las cuales son proteínas termolábiles, por lo que su actividad puede disminuirse por tratamiento térmico (Aregheore *et al.*, 1998, Morales y Troncoso, 1996)). La curcina al ser una lectina produce hemaglutinación en eritrocitos y su presencia, aparentemente, es similar en *J. curcas* tóxica y no tóxica.

Las lectinas son un grupo de proteínas unidas a un azúcar, que se encuentran en muchos organismos y están involucradas en varios procesos biológicos (Elgavish y Shaanan, 1997). Cuando se consumen altos niveles, las lectinas amenazan el crecimiento y salud de animales. Estas glicoproteínas vegetales son capaces de aglutinar células por lo que se les conoce también con el nombre de fitohemaglutinas; tienen un efecto antinutricional por su acción directa sobre la mucosa intestinal induciendo la modificación de algunas enzimas y esto provoca una mala absorción de nutrientes, por lo que es importante determinar su presencia como indicativo de toxicidad (Peralta, s.a).

2.5 Determinación de toxicidad con marcadores moleculares

Los métodos convencionales han mostrado que las características morfológicas son útiles para establecer relaciones filogenéticas a nivel de género, pero son insuficientes para definir diversidad genética y relaciones entre accesiones de *J. curcas*, debido a la fuerte influencia del ambiente en rasgos como el peso de la semilla, la proteína de la semilla y contenido de aceite (Heller, 1991; Sakaguchi y Somabhi, 1987). Por ello, la evaluación de la variación genética es más factible a través del uso de marcadores moleculares neutros (Basha y Sujatha, 2007).

Convencionalmente, la identificación de marcadores ligados a rasgos útiles se ha basado en mapas de ligamiento completos y experimentos de hibridación. Sin embargo, métodos alternativos como la construcción de mapas parciales y combinación de pedigrí y de información de marcadores, son muy útiles para identificar asociaciones marcador/rasgo (Korzun, 2003).

Varios marcadores de DNA del tipo RAPD, ISSR y AFLP están siendo utilizados para estudiar el germoplasma de *J. curcas* en todo el mundo. Sin embargo, el método de uso más frecuente es el estudio del DNA polimórfico amplificado al azar, mediante marcadores RAPD. Una revisión exhaustiva de las publicaciones basadas en marcadores moleculares indica dos tipos de estudios: A) aquellos que desean explorar la utilidad de los marcadores para dilucidar las relaciones filogenéticas del género *Jatropha* y B) los que estudian la variabilidad en accesiones de *J. curcas* de diferentes orígenes, con el objetivo a largo plazo de mejoramiento de germoplasma asistida por marcadores (Medina-Ovando *et al.*, 2011).

Basha y Sujatha (2009) caracterizaron 34 accesiones de ocho especies de *Jatropha* de importancia agronómica mediante marcadores RAPD, ISSR y microsatélites y encontraron la existencia de una elevada variación genética interespecífica (98.5% de polimorfismo) en concordancia con la diferenciación morfológica mostrada por las especies en estudio.

Algunas investigaciones realizadas con accesiones de *J. curcas* procedentes de distintas regiones del mundo, han reportado un bajo coeficiente de diversidad genética intraespecífica e independientemente del número de accesiones usadas, la robustez de los cebadores y el número de marcadores, todas las accesiones de la India se agrupan.

Popluechai *et al.* (2009) analizaron con marcadores 38 accesiones de *J. curcas* procedentes de 13 países de Asia, África y América, presentando altos coeficientes

de similitud, por ejemplo, de 0.78 entre las accesiones de India, Nigeria y Tailandia. Basha *et al.* (2009) utilizaron marcadores RAPD-ISSR, utilizando 72 accesiones de 13 países y obtuvieron resultados de diversidad alrededor de 43% entre países de Asia y hasta 55% entre países de África, y un 70% de diversidad genética en accesiones mexicanas, lo que coloca a México como centro de origen de esta especie.

Basha y Sujatha (2007) compararon 42 accesiones de *J. curcas* procedentes de diferentes regiones de India con un genotipo mexicano no tóxico. Encontraron niveles bajos de polimorfismo molecular entre las accesiones hindúes (42.0% con 400 cebadores RAPD y 33.5% con 100 cebadores ISSR). El cebador para Región Amplificada Caracterizada por una Secuencia SCAR ISPJ1 amplificó un fragmento de 543 pares de bases en todas las accesiones de la India mientras que el cebador ISPJ2 detectó un fragmento de 1,096 pares de bases específico del genotipo mexicano; además este genotipo presentó 17 fragmentos RAPD y cuatro ISSR específicos.

En un estudio realizado por Sánchez-Gutiérrez *et al.* (2010) con cinco poblaciones chiapanecas de *J. curcas* mediante marcadores AFLP se obtuvieron tasas de polimorfismo que variaron entre 78.3% y 93.1%, mientras que el polimorfismo global fue de 84.9%, pudiéndose discriminar entre las poblaciones del Centro y del Socunusco. Estos resultados revelan la alta diversidad genética en las poblaciones estudiadas, mayor que la de poblaciones que crecen en otras partes del mundo, por lo que Chiapas puede considerarse un centro de origen y diversidad de esta especie. De aquí la necesidad de realizar estudios de caracterización de los genotipos presentes en Chiapas para su utilización en futuros programas de mejoramiento genético orientados ya sea a la industria energética o a la alimentación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Colecta de la semilla

En el año 2013 se realizó una colecta de frutos maduros de piñón en cercos vivos, patios y huertos; en forma paralela a la colecta se hicieron entrevistas con el fin de conocer desde el punto de vista de los pobladores, si el piñón era comestible o no. Los puntos de colecta fueron georeferenciadas con la ayuda de un GPS modelo GPSmaps60.

Se obtuvieron 90 accesiones de *Jatropha curcas* (L.) y de estas se hizo una selección de 58 accesiones, tomando en cuenta el reporte de los pobladores como accesiones comestibles (Cuadro 2). La colecta se realizó en seis regiones de Chiapas, que fueron: Valle Zoque, Metropolitana, Mezcalapa, de Los llanos, Frailesca y Región Maya (Figura 1).

Cuadro 2. Datos de ubicación de los 58 sitios de colecta de accesiones de piñón (*Jatropha curcas* L.) del estado de Chiapas

Número	Clave de accesión	Municipio	Coordenadas		Tipo de sitio de la colecta	Reporte de toxicidad*
			LN	LW		
1	JAT-ACAL-EJA1	Acala	16°30'30.9"	92°51'03.2"	Cerco vivo	Tóxica
3	JAT-CHIA-EIA1	Chiapa de Corzo	16°31'48.7"	92°59'43.8"	Cerco vivo	Tóxica
4	JAT-CHIA-RSD1	Chiapa de Corzo	16°36'00.2"	92°58'26.0"	Cerco vivo	Tóxica
5	JAT-CHIA-RSA1	Chiapa de Corzo	16°42'50.3"	93°01'55.9"	Huerto Comercial	No tóxica
6	JAT-CHIA-RSA2	Chiapa de Corzo	16°42'50.3"	93°01'55.9"	Huerto Comercial	No tóxica
8	JAT-CHCO-ELO1	Chicoasén	17°01'27.4"	93°07'26.6"	Cerco vivo de traspatio y huerto comercial	No tóxica
11	JAT-CHCO- ELP2B	Chicoasén	17°02'05.5"	93°07'00.3"	Huerto Comercial	Tóxica
13	JAT-CHCO-ELP4	Chicoasén	17°02'05.5"	93°07'00.3"	Traspatio	Tóxica
15	JAT-OSUM-TUN1	Osumacinta	16°54'44.1"	93°07'28.9"	Cerco vivo	Tóxica
16	JAT-COPA-BJU1	Copainalá	17°08'28.2"	93°15'01.4"	Cerco vivo	Tóxica
17	JAT-COPA-BJU2	Copainalá	17°08'28.2"	93°15'01.4"	Cerco vivo	No tóxica
18	JAT-COPA-BJU5	Copainalá	17°08'28.2"	93°15'01.4"	Traspatio	No tóxica
19	JAT-COPA-CJS1	Copainalá	17°05'32.6"	93°12'41.6"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
20	JAT-COPA-CJS2	Copainalá	17°05'32.6"	93°12'41.6"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica

21	JAT-COPA-CTB1	Copainalá	17°06'02.4"	93°14'55.6"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
22	JAT-COPA-CTB2	Copainalá	17°06'02.4"	93°14'55.6"	Traspatio	No tóxica
23	JAT-COPA-PAN1	Copainalá	17°05'26.8"	93°12'26.8"	Traspatio	Tóxica
25	JAT-COPA-RAI2	Copainalá	17°10'28.3"	93°15'06.4"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
28	JAT-COPA-RAI5	Copainalá	17°10'24.4"	93°15'03.7"	Cerco vivo	No tóxica
29	JAT-COPA-RAI6	Copainalá	17°10'24.7"	93°15'01.2"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
31	JAT-COPA-RCC1	Copainalá	17°00'39.9"	93°08'10.8"	Cerco vivo de traspatio	Tóxica
33	JAT-COPA-RDE1	Copainalá	17°06'02.6"	93°10'08.1"	Cerco vivo	Tóxica
34	JAT-COPA-RSA1	Copainalá	17°07'30.1"	93°15'48.5"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
35	JAT-COPA-RSA2	Copainalá	17°07'38.7"	93°15'56.0"	Traspatio	No tóxica
36	JAT-COPA-RTU3	Copainalá	17°08'02.2"	93°13'10.6"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
37	JAT-COPA-RTU8	Copainalá	17°08'02.2"	93°13'10.6"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
38	JAT-COPA-RSL2	Copainalá	17°07'47.8"	93°15'02.4"	Cerco vivo	No tóxica
39	JAT-EMZA-EVN1	Emiliano Zapata	16°33'30.3"	92°54'36.2"	Cerco vivo	No tóxica
40	JAT-EMZA-RLI1	Emiliano Zapata	16°33'30.3"	92°54'36.2"	Cerco vivo	Tóxica
41	JAT-FLEO-FLE1	Fco. León	17°17'10.6"	93°16'25.0"	Traspatio	Tóxica
43	JAT-FLEO-FLE4	Fco. León	17°17'10.6"	93°16'25.0"	Cerco vivo de traspatio	Tóxica
44	JAT-FLEO-RSD1	Fco. León	17°17'11.3"	93°16'26.3"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
45	JAT-FLEO-SAT1	Fco. León	17°17'09.4"	93°16'22.5"	Cerco vivo de traspatio	Tóxica
46	JAT-OCOZ-RSA1	Ocozocuautila	17°02'35.7"	93°28'54.2"	Traspatio	No tóxica
47	JAT-PALE-ELZ1	Palenque	17°34'56.6"	92°08'37.3"	Cerco vivo de traspatio	Tóxica
48	JAT-PALE-EPN1	Palenque	17°34'35.7"	92°09'49.8"	Cerco vivo de traspatio	Tóxica
49	JAT-PALE-EPN2A	Palenque	17°34'32.0"	92°09'42.7"	Cerco vivo de traspatio	Tóxica
50	JAT-PALE-EPN2B	Palenque	17°34'32.0"	92°09'42.7"	Cerco vivo de traspatio	Tóxica
51	JAT-PALE-MKJ3	Palenque	17°36'55.3"	92°06'10.0"	Traspatio	Tóxica
52	JAT-PALE-MKJ4	Palenque	17°36'54.7"	92°06'06.9"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
54	JAT-TECP-CFM2	Tecpatán	17°12'44.1"	93°23'16.1"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica

55	JAT-TECP-CFM3	Tecpatán	17°12'44.3"	93°23'16.1"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
56	JAT-TECP-CJG1	Tecpatán	17°08'04.3"	93°18'25.1"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
58	JAT-TECP-EPO2	Tecpatán	17°10'51.9"	93°23'31.8"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
59	JAT-TECP-GTI1	Tecpatán	17°07'37.7"	93°24'39.4"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
60	JAT-TECP-LSP1	Tecpatán	17°08'49.5"	93°22'07.0"	Traspatio	Tóxica
61	JAT-TECP-LSP2	Tecpatán	17°08'49.5"	93°22'07.0"	Traspatio	Tóxica
62	JAT-TECP-MEN1	Tecpatán	17°09'00.1"	93°19'27.4"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
63	JAT-TECP-MEN2	Tecpatán	17°09'00.1"	93°19'27.4"	Cerco vivo	No tóxica
64	JAT-TECP-RCV1	Tecpatán	17°08'36.1"	93°18'34.5"	Traspatio	Tóxica
65	JAT-TECP-RLH1	Tecpatán	17°07'28.0"	93°24'52.8"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
66	JAT-TECP-FPZ1	Tecpatán	17°09'07.1"	93°18'22.3"	Cerco vivo de traspatio	No tóxica
69	JAT-TUGZ-SEC2	Tuxtla Gutiérrez	16°47'20.9"	93°10'36.6"	Cerco vivo	Tóxica
72	JAT-VCOR-EJM3	Villacorzo	16°08'39.0"	93°17'53.2"	Cerco vivo	Tóxica
74	JAT-VFLO-CNE1	Villaflores	16°12'56.9"	93°17'07.9"	Cerco vivo	Tóxica
75	JAT-VFLO-FBE1	Villaflores	16°25'53.4"	93°11'42.5"	Cerco vivo	No tóxica
76	JAT-VFLO-FBE2	Villaflores	16°25'52.6"	93°11'44.9"	Cerco vivo	Tóxica
77	JAT-VFLO-GPV1	Villaflores	16°28'21.4"	93°06'56.3"	Traspatio	Tóxica

* De acuerdo con lo reportado en las entrevistas hechas a las personas donde se realizó el muestreo.

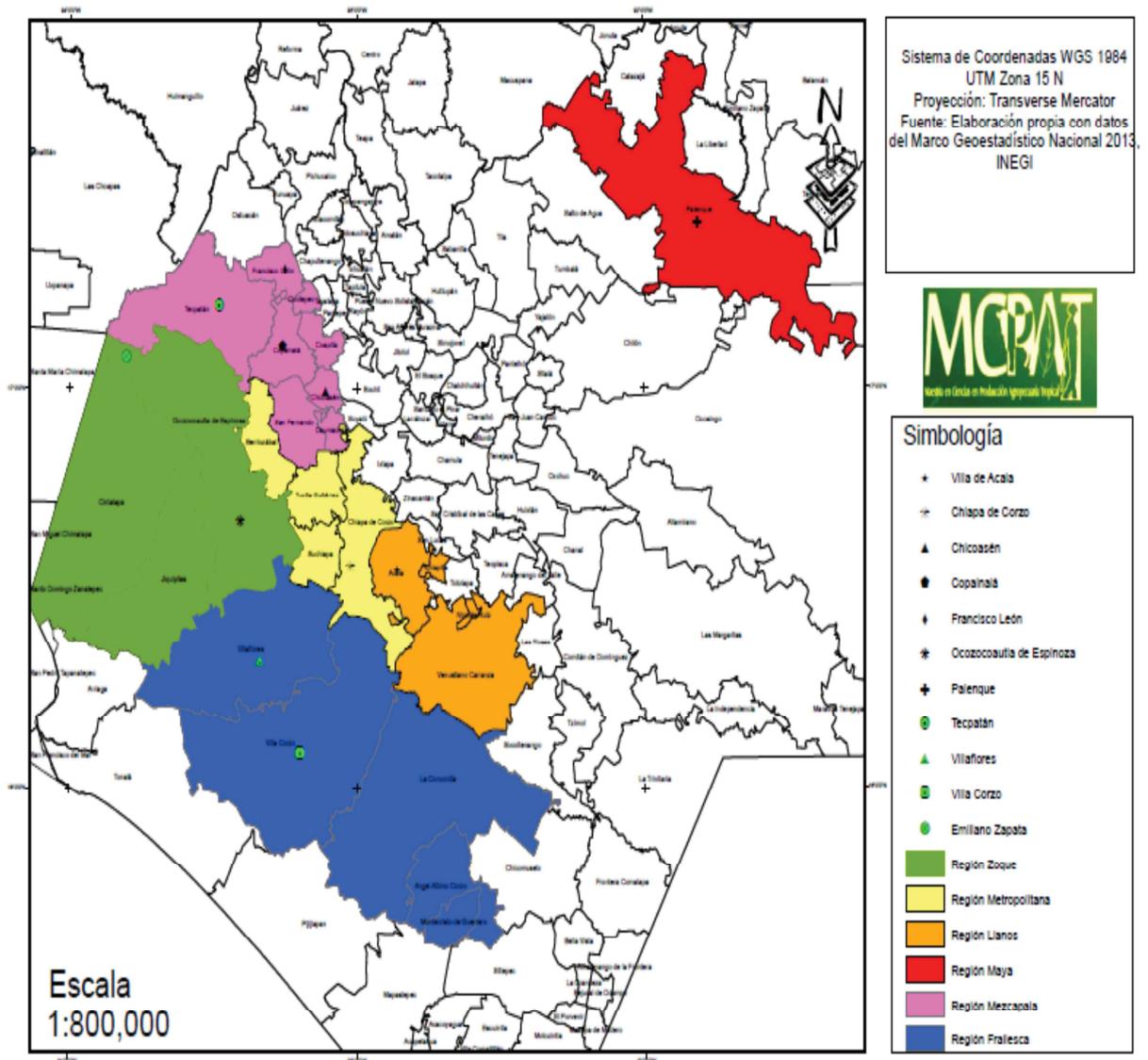


Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de colecta de *Jatropha curcas* (L.) reportada como comestible por los pobladores en el Estado de Chiapas.

3.2 Marcadores moleculares

3.2.1 Preparación del material biológico

Diez semillas de cada una de las 58 accesiones colectadas se sembraron en charolas germinadoras de plástico, con sustrato Cosmopeat®. Después de la siembra y una vez emergidas las plantas, se colectaron las hojas cotiledonales expandidas en su totalidad. En 10 accesiones la germinación fue imposible, aun cuando la testa se rompió, por lo que se utilizaron los embriones.

Las hojas cotiledonares, de las plántulas se limpiaron con etanol al 70%, se pesaron para obtener aproximadamente 80 mg de tejido y se congelaron en nitrógeno líquido antes de llevar a cabo la extracción del DNA.

En las accesiones cuya semilla no germinó, se seleccionaron 10 semillas que fueron quebradas cuidadosamente, a fin de evitar daño en la almendra, posteriormente se separaron los cotiledones para dejar expuesto el embrión que fue retirado con una pinza.

3.2.2 Extracción del DNA genómico

La extracción del DNA de las hojas cotiledonales y los embriones se realizó en el Laboratorio de Recursos Fitogenéticos Tropicales de la Facultad de Ciencias Agronómicas, con el método de Asemota (1995) con modificaciones. Se maceró el tejido con nitrógeno líquido en un mortero y se mezcló con 1 mL de solución de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 50 mM pH 8.0 y NaCl 1 M), posteriormente se adicionaron 15 µL de β-mercaptoetanol absoluto y 100 µL de SDS 10%, la mezcla se agitó vigorosamente y se incubó a 65°C durante 20 min. Después se agregaron 350 µL de acetato de potasio 5 M se mezcló por inversión suavemente y se incubó 10 min en hielo. Luego se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 20 min. Después se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf (1.5 mL de capacidad) estéril y se adicionaron 535 µL de isopropanol absoluto, incubando durante 20 min a -20°C. Se realizó un segundo ciclo de centrifugación a 12,000 rpm a 4°C durante 10 min para obtener la pastilla de DNA y decantar el sobrenadante. La pastilla se lavó dos veces con 500 µL de etanol frío al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, se resuspendió en 120 µL de TE (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0) y se incubó a 55°C por 10 min. Adicionalmente se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 10 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf estéril y se le agregaron 12 µL de acetato de sodio 3 M y 88 µL de isopropanol absoluto y se incubó a -20°C por 20 min. Se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm por 10 min a 4°C para obtener la pastilla y se lavó con 500 µL de etanol frío al 70%. En seguida se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Posteriormente, se resuspendió en 25 µL de TE-ARNasa (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0 y ARNasa 10 mg/mL) y se guardó a -20°C para su conservación.

El DNA genómico se analizó mediante electroforesis, en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X (Tris Base 1 M, EDTA 0.5 M y Ácido acético) y teñidos con el colorante GelRed 10,000X (cat. 41003 de BIOTIUM®) preparado a una concentración

1X. Los geles se incubaron durante 40 min, con agitaciones cada 10 min para permitir el contacto con el colorante. Posteriormente se fotodocumentó con un transiluminador tipo Gel Doc de BIO RAD®, para observar la calidad del DNA obtenido.

3.2.3 Amplificación mediante marcador tipo SCAR

Los marcadores moleculares de Región Amplificada Caracterizada por una Secuencia (SCAR), son una herramienta muy útil para la determinación de caracteres específicos de toxicidad en *Jatropha*.

Los cebadores ISPJ1F e ISPJ1R, presentan las características descritas en el cuadro 3; este cebador amplifica un fragmento de 543 pb que se asocia a la toxicidad en todas las poblaciones Hindúes y que está ausente en la accesión mexicana no tóxica.

Cuadro 3. Características del cebador SCAR

Cebador	Temperatura de Hibridación (°C)	Secuencia (5´-3´)
ISPJ1-F	56.0	GAGAGAGAGAGAGAGGTG
ISPJ1-R	56.0	GAGAGAGAGAGAGAAAACAAT

La amplificación, por PCR, del fragmento específico (543 pb), que se asocia a la toxicidad de *Jatropha curcas* (L.), se realizó a partir del DNA genómico extraído, como lo descrito en el apartado 3.2. La amplificación se realizó con una mezcla como se especifica en el cuadro 4, en tubos estériles con una capacidad de 200 µL, los cuales se colocaron en un termociclador Biorad® con el siguiente programa: un paso inicial de 4 min a 94°C, seguido de 35 ciclos consistentes, en 30 s a 94°C para la desnaturalización ; 15 s a 56°C para el acoplamiento, 1 min a 72°C para la elongación de la hebra, con una extensión final de 7 min a 72°C, y un paso adicional de 4°C para conservar frías las muestras.

Cuadro 4. Composición de la mezcla de amplificación.

Reactivo	Cantidad (µL)
DNA molde	1.0
Amortiguador NH ₄ 10X	2.5
MgCl ₂ 50 mM	1.5
dNTP's 1 mM	5.0
ISPJ-F 1µg/µL	0.4
ISPJ-R 1µg/µL	0.4
Biolasa DNA Pol. 5 U/µL	0.1
H ₂ O	14.5
Total	25.0

3.2.4 Electroforesis

Los productos resultantes de la amplificación fueron cargados en un gel de agarosa al 2% en amortiguador TAE 1X.

La separación se realizó en una cámara de electroforesis (OWL, modelo A2) a 100 V con duración de 2 h, fue teñido con el colorante GelRed 10,000X (cat. 41003 de BIOTIUM®) preparado a concentración 1X. El gel se incubó durante 40 min, con agitaciones cada 10 min para permitir el contacto con el colorante. Posteriormente, se fotodocumentó en el transiluminador tipo Gel Doc.

3.3 Contenido de aceite

La técnica utilizada es la empleada por Molina (2012) que consiste en lo siguiente:

- a) Se toman 10 semillas por accesión, para obtener una muestra de aproximadamente 8 g de pasta.
- b) Se procedió a quebrar la semilla para facilitar la molido y poder observar que se encuentran en buen estado, se transportaron en bolsas de papel estraza al laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Agronómicas.
- c) Las semillas fueron depositadas en un molino tipo Wiley, una vez molido, la pasta resultante se colocó en un recipiente de plástico de 10 oz con tapa a temperatura ambiente.

Posteriormente, cada una de las muestras obtenidas se depositaron en la celda de lectura del espectrofotómetro de Infrarrojo Cercano Spectra modelo 2400, serie No. 1349, la cual fue limpiada con algodón y alcohol antes y después de utilizarla para evitar contaminación entre muestras, se realizó la lectura de los espectros por triplicado para realizar un promedio y obtener el porcentaje de aceite de cada accesión.

3.4 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

3.4.1 Preparación de la muestra

Las muestras de semillas molidas y colocadas en recipientes transparentes de 10 Oz, fueron llevadas al laboratorio de analítica del Instituto Tecnológico Regional de Tuxtla Gutiérrez.

Se pesaron 2 g de muestra de cada accesión y se colocó en un tubo Falcon, agregaron 2 mL de diclorometano. Posteriormente se colocó en el vórtex por 2 min y se ultrasonizó por 10 min, este paso se repitió por 3 veces. La mezcla se centrifugó por 10 min a 4 000 g y el sobrenadante se decantó en un tubo limpio Falcon.

Las muestras fueron colocadas en la campana de extracción por tres días para que por evaporación del solvente, la muestra se concentrara.

Pasado los tres días las muestras se filtraron con la ayuda de un embudo Buchner y papel filtro para desechar residuos y se colocó en tubos Falcon limpios.

A cada tubo se le agregó 2 mL de THF (Tetrahidrofurano) y se colocó la muestra en jeringas de 5 mL para pasarlas por un portafiltro swinnex Millipore® con membrana de 0.2 µm.

Las muestras obtenidas se dejaron a temperatura ambiente para luego ser resuspendida en 1 mL de diclorometano.

3.5 Cuantificación de ésteres de forbol

La cuantificación de ésteres de forbol se realizó con un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) modelo Perkin 200, instalado en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. La metodología seguida fue la de Makkar *et al.* (1997) modificada; para la fase analítica se utilizó una columna de 15x46 mm. Los tres solventes utilizados fueron (A) 1.75 mL de ácido fosfórico 85% disuelto en 1 L de agua destilada, (B) Acetonitrilo y (C) Tetrahidrofurano. Los solventes fueron filtrados a través de una bomba de vacío con membranas Millipore® de 0.2 µm. El gradiente usado fue el siguiente: 60% A y 40% B por un minuto, disminuyendo 50% A e incrementando B al 50% por 10 min, seguido de 30 min disminuyendo A al 25% e incrementando B al 75%, 10 min incrementando B al 100% con un paso final de 10 min de tetrahidrofurano y 5 min de acetonitrilo para lavar la columna, para luego la columna quedar ajustada a las condiciones de inicio.

3.5.1 Curva de estandarización para ésteres de forbol

La curva de estandarización se realizó con 5 mg de 12-miristato 13-acetato 4-O-metil éter (Sigma®) disueltos en 10 mL de metanol para obtener una concentración madre de 500 ppm. Este compuesto es un equivalente de los ésteres de forbol, con señales que aparecen entre los 41 y 48 minutos que coinciden con las señales obtenidos en las accesiones estudiadas.

Cuadro 5. Diluciones utilizadas para la realización de la curva de los ésteres de forbol

Solución estándar (µL)	Volumen de metanol (µL)	Concentración (ppm)
100	900	50
200	800	100
600	400	300
1000	0	500

3.6 Determinación de curcinas

Esta determinación se realizó basándose en el método descrito por Gordon y Marquardt (1974), el cual consiste en tres partes, que se describen a continuación:

3.6.1 Extracción

0.5 g de la muestra, se mezclaron con 10 mL de NaCl a una concentración de 0.9% en tubos Falcon de 50 mL de capacidad, se homogeneizó usando un agitador vórtex durante 5 min (2 tiempos de 2.5 min); posteriormente los tubos se centrifugaron a 3500 g por 10 min, el sobrenadante de cada muestra fue colectado en tubos limpios y centrifugados una segunda vez a 4000 g por 10 min, para finalmente colocar cada muestra en tubos Falcon de 20 mL y almacenarlos a 4°C.

3.6.2 Preparación de la suspensión de eritrocitos humanos tripsinizados

Los eritrocitos fueron colectados de una suspensión de sangre humana por centrifugación a 1500 g durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron cuatro veces con solución salina (5 mL por cada mL de eritrocitos). Los eritrocitos se colocaron en regulador de fosfato (PBS) (2 mL de células en 47.5 mL de regulador) para obtener una suspensión con una absorbancia de 2, a 620 nm.

A esta suspensión se le adicionó 0.5 mL de solución de tripsina al 1% (10 mg de tripsina en 1 mL de regulador de fosfato) y se incubó a 37° C durante 90 min; los eritrocitos se lavaron 4 veces con PBS y al final se preparó una solución al 1% con los eritrocitos tripsinizados y el PBS.

3.6.3 Ensayo de hemaglutinación

Para el ensayo de hemaglutinación se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos, se preparó una dilución serial del extracto con PBS y se mezcló con 50 µL de una suspensión al 1% de los eritrocitos tripsinizados para obtener un volumen de 100 µL; las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 2 h. El patrón de sedimentación indica la aglutinación, un botón circular uniforme de eritrocitos humanos indica no hemaglutinación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención del DNA genómico

Se obtuvo DNA genómico de buena calidad, con concentración adecuada y alto peso molecular (por arriba de 10,000 pares de bases) de las 58 accesiones de piñón, mediante el método de Asemota (1995), tal como se observa en los electroforegramas presentados en la Figura 2. En los extremos del gel se observa el marcador (M) de peso molecular utilizado como referencia.

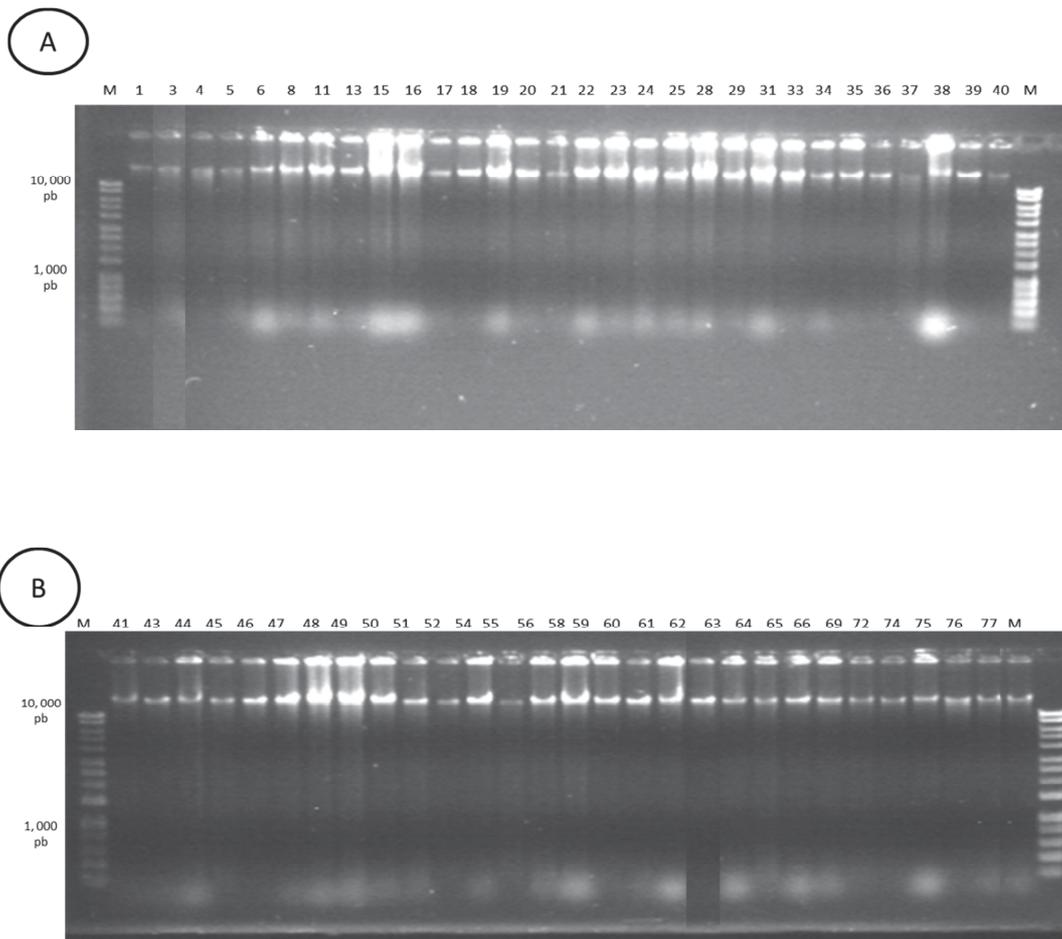


Figura 2. Electroforegramas de DNA genómico de 58 accesiones de piñón. En A, se presentan las accesiones 1 a la 41, en B las accesiones 43 a la 77, M= marcador de peso molecular HyperLadder™.

4.2 Amplificación mediante PCR con marcador molecular tipo SCAR

Al realizar la PCR se obtuvo el amplicón de 543 pb asociado a la toxicidad según lo reportado por Basha y Sujatha (2007). Los resultados electroforéticos obtenidos de las 58 accesiones se observan en la Figura 3.

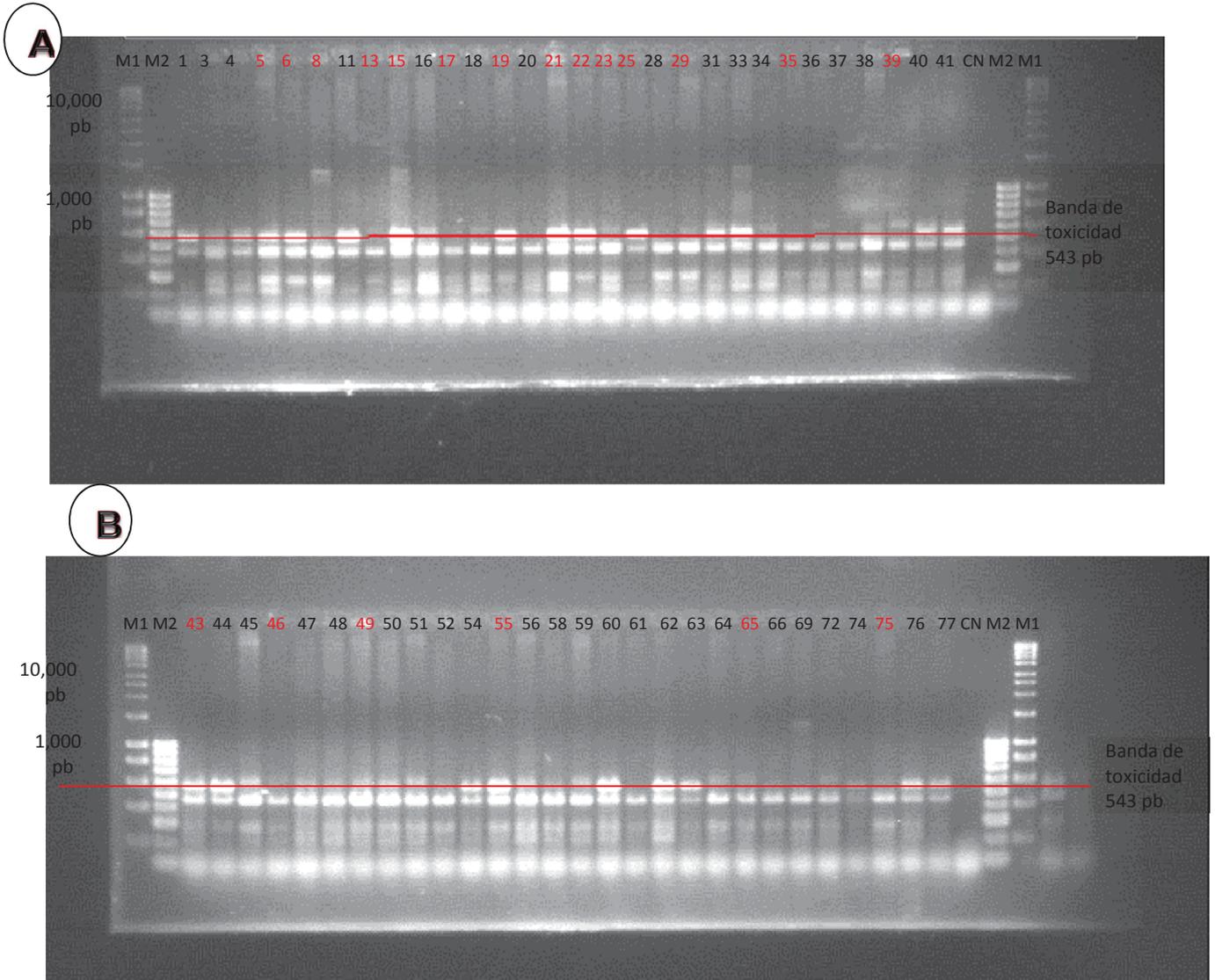


Figura 3. Electroforegramas de la amplificación de DNA de piñon con los cebadores ISPJ1-F y ISPJ1-R. En A, se presentan las accesiones de la 1 a 41, en B las accesiones 43 a 77, CN= control negativo, M1= marcador de peso molecular 1200-10,000 pb, M2= marcador de peso molecular HyperLadder™ IV 100-1000 pb.

De acuerdo con las entrevistas realizadas a los pobladores durante la colecta, se detectaron 20 accesiones que probablemente se pudieran considerar comestibles. Entre ellas se encuentran las accesiones 8, 17, 23, 29 y 35 reportadas por los pobladores como comestibles y que no mostraron la banda de 543 pb asociada a los genotipos hindúes tóxicas. Sin embargo, las accesiones 5, 6, 19, 21, 25, 43, 49 y 55 también fueron reportadas como comestibles y presentaron dicha banda en los electroforegramas (Cuadro 2).

Dentro de las muestras consideradas como tóxicas, las accesiones 13 y 46 no presentaron la banda asociada a los genotipos tóxicos de la India, y esto puede ser debido a que se asumieron que eran tóxicas porque fueron colectadas en cercos vivos y no hubo una persona que informara si era comestible, por lo cual la aseveración de que sean tóxicas verdaderamente es incierta. En cambio las accesiones 15, 22, 39, 65 y 75 que fueron reportadas como tóxicas, el resultado fue la presencia del amplicón de 543 pb.

Las muestras 5 y 6 son accesiones de un huerto comercial que se encuentra en el municipio de Chiapa de Corzo, provenientes de semillas traídas de Yauatepec, Morelos las cuales tienen la característica de ser no tóxicas; la accesión 5 es el huerto madre y la accesión 6 es F1 del huerto madre, y a pesar de haber sido estudiadas en varias ocasiones en este estudio mostraron la banda de 543 pb.

Con estos resultados contradictorios, se puede considerar que el cebador (ISPJ1) utilizado por Basha y Sujatha (2007) para determinar la diversidad genética de genotipos hindúes tóxicos y que resultó discriminativo para una accesión mexicana no tóxica, es insuficiente para identificar las accesiones tóxicas del piñón chiapaneco. Si se pretende asociar la presencia de uno o un grupo de marcadores moleculares a la toxicidad del piñón chiapaneco, es necesario ampliar los estudios y utilizar otros marcadores que pueden brindar con certeza esa relación con la toxicidad (Pamidimarri *et al.*, 2009; Tanya *et al.*, 2011; Mastan *et al.*, 2012; Sujatha *et al.*, 2013).

Sin embargo, es de hacer notar que la relación, en este caso de la toxicidad, también tendría que estar apoyada por un análisis químico de las sustancias consideradas tóxicas, que permita establecer una clara correlación entre la presencia del marcador molecular y el contenido de sustancias tóxicas, en particular aquí, de los ésteres de forbol, sustancias que determinan fuertemente el carácter tóxico de la semilla y la planta de piñón, tal como lo reportado por Makkar *et al.*, 1997.

4.3 Determinación de ésteres de forbol mediante HPLC

De las 58 accesiones colectadas de las seis regiones de Chiapas, se realizó una selección de 20 muestras marcadas en rojo en la figura 4 como posibles genotipos

de baja toxicidad. Esta selección se realizó usando como criterios la toxicidad reportada por los pobladores, la ubicación de la accesión, el uso que se le daba y los resultados obtenidos en el apartado anterior con el marcador tipo SCAR ISPJ1. Las accesiones seleccionadas fueron: 5, 6, 8, 13, 15, 17, 19, 21, 22, 23, 25, 29, 35, 39, 43, 46, 49, 55, 65, 75.

4.3.1 Curva de calibración

En el cromatograma que se obtuvo del estándar (figura 4), se observa un sola señal, lo que indica que el compuesto está puro. Su tiempo de retención fue de 44 min. Con este estándar se realizó la curva de calibración que se muestra en la Figura 5. Las lecturas de absorbancia son el valor medio de los obtenidos por tres repeticiones.

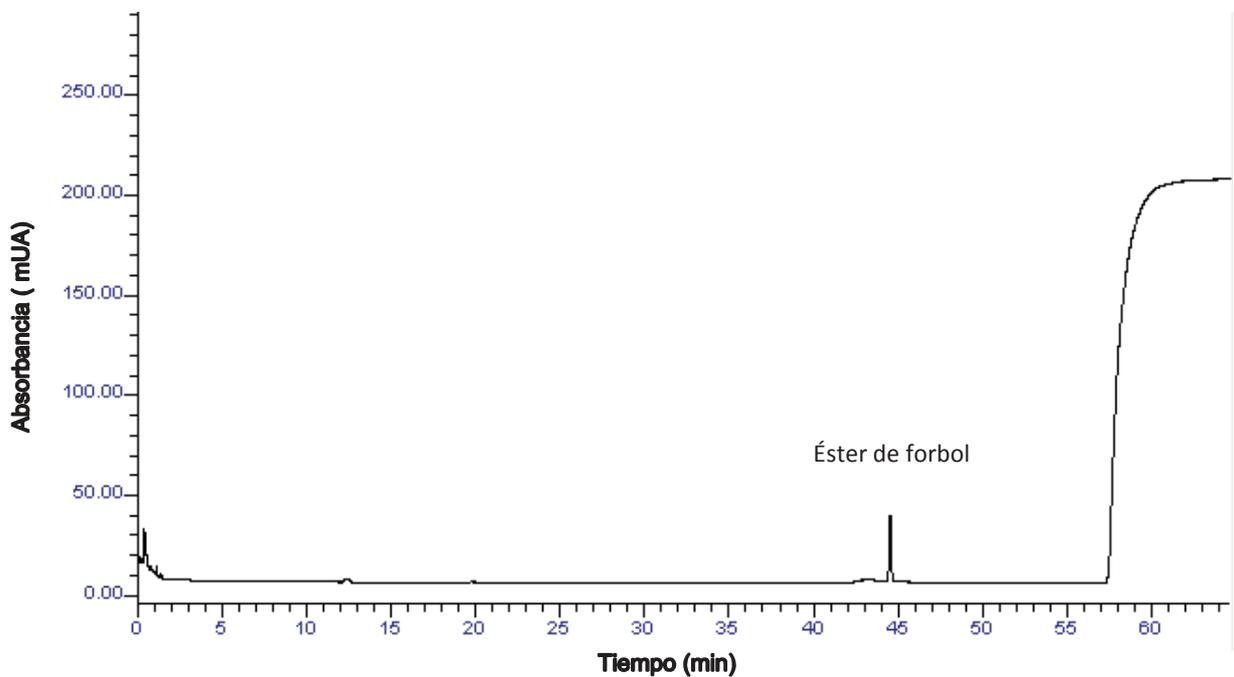


Figura 4. Cromatograma del 12-miristato 13-acetato 4-O- metil éter forbol 500 ppm utilizado como estándar.

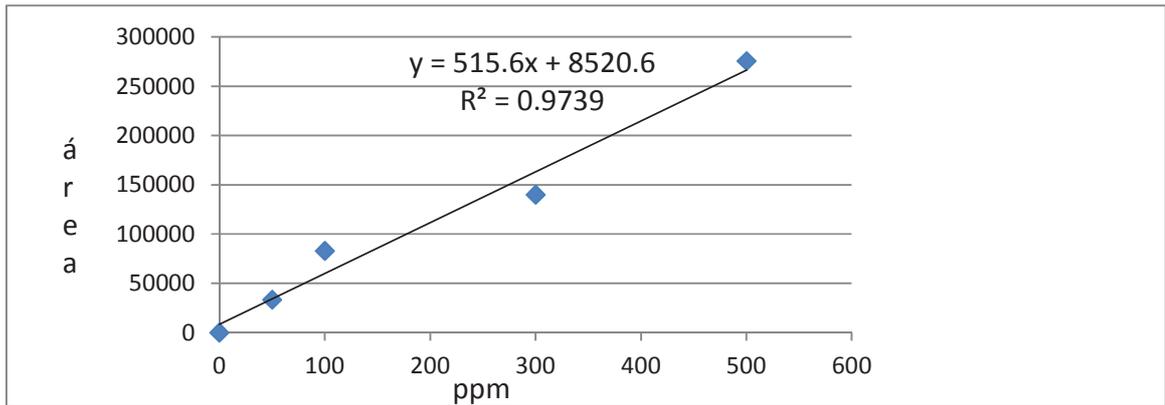


Figura 5. Curva de estandarización con el equivalente a ésteres de forbol 12-miristato 13-acetato 4-O-metil éter.

La curva de estandarización obtenida se considera muy buena pues la R^2 es alta, y se interpreta como que tiene un 97% de eficiencia, por lo que al extrapolar los resultados obtenidos de los ésteres de forbol de las accesiones se pudo obtener un resultado confiable.

4.3.2 Contenido de ésteres de forbol en las accesiones

En la Figura 6 se muestran los cromatogramas con los picos de absorbancia correspondientes a los de ésteres de forbol, donde se observa como las muestras con concentraciones altas (A) los picos llegan a tener una mayor absorbancia además que la definición de los cuatro picos se observan con mayor claridad, lo que no ocurre con las muestras que se obtuvieron con concentraciones más bajas (B) donde los picos corresponden a una menor absorbancia y con poca definición en cuanto a los picos, se obtuvo un tercer tipo de Cromatograma (C), donde la concentración de ésteres de forbol es tan baja, que resulta indetectable por lo que la absorbancia prácticamente es cero y en la gráfica se refleja como una meseta, justo en los tiempos de retención correspondientes a los ésteres de forbol, que resultan entre los 41 a 48 minutos. Los tres cromatogramas antes mostrados son representaciones de las tres diferentes concentraciones de ésteres de forbol encontradas en las muestras, los cromatogramas correspondientes a cada accesión en estudio se encuentran en el apéndice A.

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia reveló la presencia y separación de los ésteres de forbol en las accesiones de *Jatropha curcas* L. estudiadas. Las señales claramente diferenciadas en los cromatogramas obtenidos, corresponden a los cuatro ésteres de forbol encontrados por Makkar *et al.*, 1997.

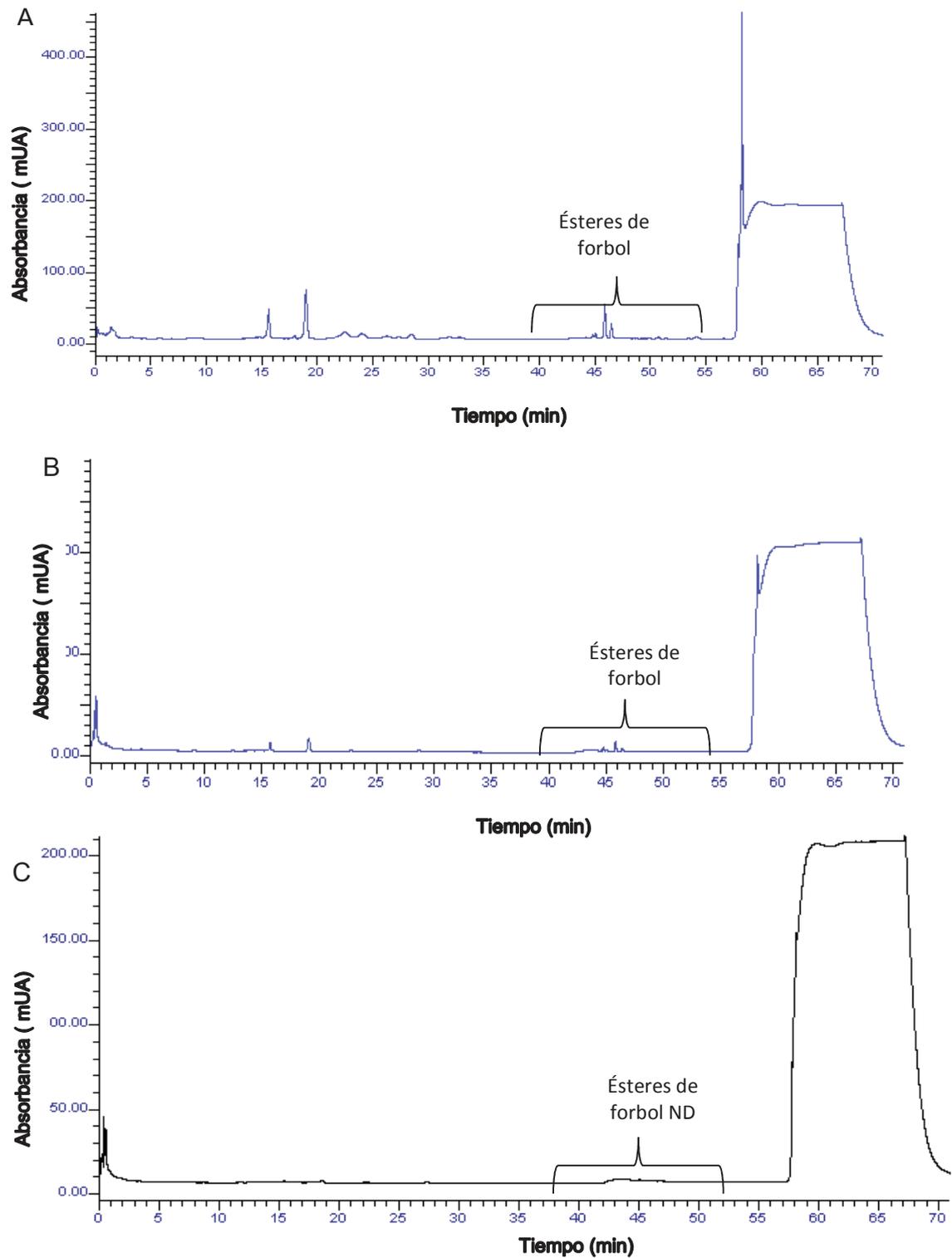


Figura 6. Cromatogramas obtenidos según la concentración de ésteres de forbol, (A) muestra 13, (B) muestra 39, muestra 35 (C).

En el cuadro 6 dentro de las 20 accesiones seleccionadas, para el ensayo de ésteres de forbol, 13 accesiones son reportadas como no tóxicas, de las cuales, la 25, 29 y 35, son accesiones con concentraciones de ésteres de forbol (EF) que van de 0.002 a 0.006 por debajo de $\geq 0.11 \text{ mg g}^{-1}$ indicado por Makkar *et al.*, 1997, en el cual establece que toda accesión por arriba o igual a este rango es tóxica.

Comparando estos resultados con los electroforegramas obtenidos se observa que la muestra 25 mostró presencia de banda de toxicidad lo cual no ocurrió con las accesiones 29 y 35 las cuales no presentaron la banda de toxicidad.

Existe una accesión (46) que es reportada como tóxica en la entrevista realizada, aunque en la obtención de la concentración de los EF este se encuentra por debajo de lo indicado para ser tóxica, el reporte obtenido de esta accesión no es del todo certera ya que no se encontró al dueño en el momento de la entrevista y se tomó como una accesión tóxica, aunque en el electroforegrama no se observa la banda asociada a la toxicidad.

Existen dos accesiones de particular interés, dado su origen (5 y 6) que fueron obtenidas del productor Félix Corzo, el cual tiene un huerto comercial establecido en Chiapa de Corzo, la accesión 5 procede de un huerto madre establecido con semillas traídas de Yautepec, Morelos, las cuales, son reportadas como no tóxicas según estudios realizados por Makkar *et al.* (1997); la accesión 6 es la F1 del huerto madre mencionada anteriormente. Martínez *et al.*, 2005 realizó estudios de la concentración de ésteres de forbol en semillas provenientes de Yautepec, Morelos obteniendo como resultados que los ésteres no fueron determinados, caso contrario con lo que sucedió en este estudio que estas accesiones provenientes de plantaciones de semillas de Yautepec sembradas en el estado de Chiapas las concentraciones obtenidas fueron bastantes altas comparadas con el parámetro establecido por Makkar *et al.* (1997), con lo cual se puede pensar que quizás las condiciones climáticas, el tipo de suelo, etc., a los que la planta se encuentra sometida pueda producir que ese alelo que se encuentra oculto como lo menciona Achten *et al.*, 2010 pueda expresarse y provocar que la concentración de ésteres de forbol sea mayor (ver cuadro 6).

La comparación del marcador ISPJ1 vs. los ésteres de forbol, se observa que de las 20 accesiones solamente tres de ellas coinciden con lo establecido en la hipótesis planteada en este estudio, aceptando que la ausencia de banda junto con la concentración de ésteres de forbol, la cual debe ser $\geq 0.11 \text{ mg g}^{-1}$, según Makkar *et al.* (1997) para que una accesión sea considerada como tóxica,

Existen 10 accesiones que indican la presencia de la banda asociada a la toxicidad y la concentración de ésteres de forbol alta, lo cual coincide con lo reportado en la literatura, que dice que la presencia alta de ésteres de forbol es un indicativo de que la semilla o la especie es tóxica y que la ingesta de más de tres semillas puede ocasionar la muerte, aunque según lo recabado en las entrevistas muchas de estas accesiones son consumidas por los pobladores ya sea para su consumo propio como para sus animales, como aves de patio, borregos o patos, y que a pesar de su concentración de ésteres de forbol alta no presentan una intoxicación.

Cuadro 6. Concentración de ésteres de forbol para cada accesión estudiada.

CLAVE DE LABORATORIO	CLAVE SINAREFI	CONCENTRACIÓN DE ÉSTERES DE FORBOL (mg g ⁻¹)
5	JAT-CHIA-RSA1	0.3538
6	JAT-CHIA-RSA2	0.36433
8	JAT-CHCO-ELO1	0.18687
13	JAT-CHCO-ELP4	0.6887
15	JAT-OSUM-TUN1	0.5309
17	JAT-COPA-CJS1	0.3011
19	JAT-COPA-CJS2	0.6274
21	JAT-COPA-CTB2	0.5102
22	JAT-COPA-PAN1	0.4588
23	JAT-COPA-RAI2	0.2983
25	JAT-COPA-RAI5	0.0061
29	JAT-COPA-RSA1	0.0031
35	JAT-COPA-RTU3	0.0020
39	JAT-EMZA-RLI1	0.6096
43	JAT-FLEO-RSD1	0.5920
46	JAT-PALE-EPN2A	0.0679
49	JAT-PALE-MKJ4	0.1675
55	JAT-TECP-MEN2	0.4769
65	JAT-TUGZ-SEC2	0.2854
75	JAT-VFLO-FBE2	0.3597

4.4 Determinación de lectinas

Las lectinas determinadas se realizaron con las mismas 20 muestras usadas para la determinación de ésteres de forbol, la actividad de la hemaglutinación se define como la cantidad mínima de muestra (mg mL⁻¹) que produce aglutinación, tanto la extracción como la preparación de la suspensión de eritrocitos (Figura 7).

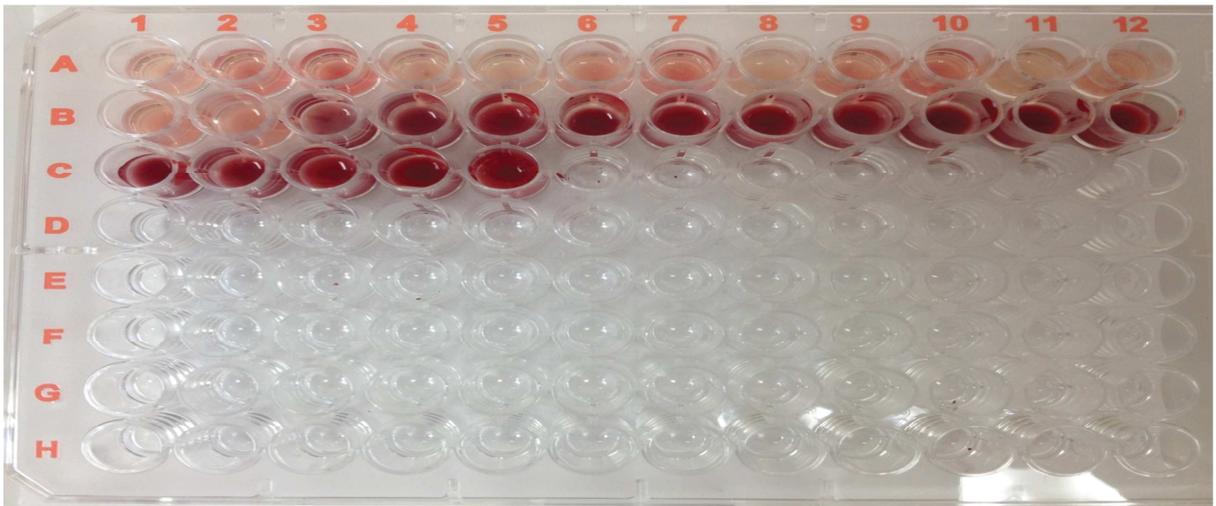


Figura 7. Obtención de hemaglutinación de lectinas

Cuadro 7. Hemaglutinación de las lectinas en las accesiones estudiadas

No de muestra	Dilución Extracción/ PBS μ l	Respuesta
5	50	Positivo
6	50	Negativo
8	50	Negativo
13	50	Negativo
15	50	Positivo
17	50	Negativo
19	50	Positivo
21	50	Negativo
22	50	Positivo
23	50	Positivo
25	50	Negativo
29	50	Positivo
35	50	Positivo
39	50	Negativo
43	50	Negativo
46	50	Positivo
49	50	Negativo
55	50	Negativo
65	50	Positivo
75	50	Negativo

De los valores obtenidos para la actividad de las lectinas, puede observarse en el Cuadro 7 que muestras reportadas como comestibles, por los pobladores, la concentración de ésteres de forbol fue baja y no presentaron banda 543 pb se obtuvo presencia de lectina.

Las muestras 29, 35 y 46 que son las muestras con concentraciones no determinadas para ésteres de forbol, ausencia de banda de toxicidad tuvieron presencia de lectinas, aunque la muestra 25 con presencia de banda de toxicidad, concentración no determinada de ésteres de forbol en el ensayo de hemaglutinación el resultado fue negativo, como se puede observar los resultados son dudosos lo que hace la necesidad de emplear otros métodos, para la cuantificación química de sustancias tóxicas.

Cuadro 8. Resultados de los datos obtenidos

ACCESIÓN	ENTREVISTA CONSUMO	BANDA 543 pb	NIVEL ESTER DE FORBOL	LECTINA
35	Si	Ausente	Bajo	Positivo
29	Si	Ausente	Bajo	Positivo
25	Si	Presente	Bajo	Negativo
46	No	Ausente	Bajo	Positivo
49	Si	Ausente	Bajo	Negativo
8	Si	Ausente	Alto	Negativo
65	No	Presente	Alto	Positivo
17	Si	Ausente	Alto	Negativo
23	Si	Ausente	Alto	Positivo
5	Si	Presente	Alto	Positivo
6	Si	Presente	Alto	Negativo
75	No	Presente	Alto	Negativo
22	No	Presente	Alto	Positivo
55	Si	Presente	Alto	Negativo
21	Si	Presente	Alto	Negativo
15	No	Presente	Alto	Positivo
43	Si	Presente	Alto	Negativo
39	No	Presente	Alto	Negativo
19	Si	Presente	Alto	Negativo
13	No	Ausente	Alto	Negativo

En el Cuadro 8 se observa que la hipótesis establecida en este trabajo no es aceptada porque en ningunas de las accesiones se obtuvo ausencia de la banda 543 pb, bajo contenido de ésteres de forbol y lectinas ausentes, con lo cual no podemos asociar que estos tres objetivos estudiados nos den certeza de la toxicidad de esta especie estudiada. En este estudio los ésteres de forbol son los que nos indican si esta especie es tóxica, aunque en accesiones que son consumidas por los pobladores y que se observa que tienen alto contenido de ésteres de forbol, se les

atribuye a la forma en la que las personas lo consumen en cual lleva un proceso térmico y los ésteres de forbol son fácilmente destruidos con una fuente de calor.

5. CONCLUSIONES

- La primera hipótesis establecida en este estudio es rechazada ya que no hay una certeza con el marcador tipo SCAR que se utilizó.
- De las accesiones reportadas como no tóxicas que se utilizaron para la realización de este estudio tres de ellas no presentaron la banda asociada a la toxicidad (543 pb) ni ésteres de forbol (EF), pero las accesiones restantes si presentaron concentraciones altas de EF, aunque los pobladores lo consumen esto puede ser debido a la forma de consumo.
- El cebador utilizado en este estudio no mostró con claridad que el amplicón de 543 pb se relaciona a la toxicidad.
- Es necesario realizar un estudio más exhaustivo utilizando otros marcadores moleculares que puedan ayudar a definir la relación del marcador con la toxicidad y específicamente para piñón chiapaneco ya que con mucha certeza se sabe de las accesiones no tóxicas.
- El contenido de aceite encontrado en las accesiones está dentro del rango entre 32-34%.

6. LITERATURA CITADA

- Abdel, W., T. Onsa, W. Alli, S. Badwi y S. Adam. 2003. Comparative toxicity of *Croton macrostachys*, *Jatropha curcas* and *Piper abyssinica* seeds in Nubian goats. *Small Ruminant Research*. 48(1):61-7.
- Achten, W., L. Nielsen, R. Aerts, A. Lengkeek, E. Kjaer, A. Trabucco, J. Hansen, W. Maes, L. Graudal, F. Akinnifesi y B. Muys. 2010. Towards domestication of *Jatropha curcas*. *Biofuels* 1(1), 91-107.
- Adam, S. E. y M. Magzoub. 1975. Toxicity of *Jatropha curcas* for goats. *Toxicology* 4:347-354.
- Asemota, H. N. 1995. A fast, simple and efficient miniscale method for the preparation of DNA from tissues of yam (*Dioscorea* sp.). *Plant. Mol. Biol. Rep.* 13: 214-218.
- Aregheore, E. M., H. P. S. Makkar y K. Becker. 1998. Assessment of lectin activity in a toxic and non-toxic variety of *Jatropha curcas* using latex agglutination and hemagglutination methods and inactivation of lectin by heat treatments. *J. Sci. Food Agri.* 77:349-352.
- Basha, S. y M. Sujatha. 2007. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica* 156 (3): 375-386.
- Basha, S., G. Francis, H. Makkar, K. Becker y M. Sujatha. 2009. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. *Plant Science* 176: 812-823.
- Devappa, R. K., H. P. S. Makkar y K. Becker. 2010. Biodegradation of *Jatropha curcas* phorbol esters in oil. *J. Sci. Food Agric.* 90: 2090-2097.
- Donogue, M. J. y S. Mathews. 1998. Duplicate genes and the root of angiosperms, with an example using phytochrome sequence. *Mol. Phyl. Evol.* 9(3):489-500.
- Eguiluz, P. T. 2010. *Jatropha curcas*. Ficha técnica. Genética forestal S. de R.L. de C.V. www.genforlandscaping.com.mx/blog/wp-content/uploads/2010/06/FICHA-TECNICA-JATROPHA-CURCAS.pdf. Consultado enero 2015.
- Elgavish, S. y B. Shaanan. 1997. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem. Sci.* 22:462-467.
- Gandini, T. L., I. G. Despal y Y. Permana. 2007. Nutritional Properties of Three Different Origins of Indonesian *Jatropha (Jatropha curcas)* Meal For Ruminant. *Journal of agriculture and rural development in the tropics and subtropics.* 90:94-101.
- Goel, G., H. P. Makkar, G. Francis y K. Becker. 2007. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *Int. J. Toxicol.* 26 (4), 279–288.
- Gómez P., A., A. I. Marín A., J. Campo G., J. H. Domínguez L., L. M. Cano A., L. M. Segura J., M. Cuéllar M., M. J. Fernández S., O. Sánchez S. y X. Lozoya. 2009. La XUTA se come. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. 71 p.

- Gordon, J. A., M. D. Marquardt. 1974. Factors affecting hemagglutination by concanavalin A and soybean agglutinin. *Biochim. Biophys. Acta.* 332:136-144.
- Gübitz, G., M. Mittelbach y M. Trabi. 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technol.* 67 (2-3):223-43.
- Heller, J. 1991. Investigation of the genetic potential and improvement of cultivation and propagation practices of physic nut (*Jatropha curcas* L.). Final Report Germany: German Agency for Technical Cooperation (GTZ).
- Heng, W., C. Hung, C. Ming, Y. Ho y D. Hsiang. 2009. Supercritical carbon dioxide extraction of triglycerides from *Jatropha curcas* L. sedes. *J. Supercritical Fluid.* 51 (2): 174-80.
- King, A., W. He, J. Cuevas, M. Freudenberge, D. Ramiamanana y I. Graham. 2009. Potencial of *Jatropha curcas* as a source or renewable oil and animal feed. *J. Experimental Botany* 60(10): 2897-905.
- Korzun, V. 2003. Molecular markers and their applications in cereal breeding. In: Proceedings of the Workshop Marker Assisted Selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding. Turin, Italy. University of Turin/FAO.
- Kumar, A. y S. Sharma. 2008. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Industrial Crops Products* 28(1):1-10.
- Loyola, V. V. 2011. Mejoramiento genético de *Jatropha curcas* mediante técnicas biotecnológicas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Conacyt
- Makkar H. P. S., K. Becker, F. Sporer y M. Wink. 1997. Studies on nutritive potencial and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3152-3157.
- Makkar H. P. S., K. Becker y B. Schmook. 1998. Edible provenances of *J. curcas* from Quintana Roo state of México and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. *Plant Food for Human Nutr.* 52: 31-36.
- Makkar, H. P. S. y K. Becker. 2009. *Jatropha curcas* an exciting crop for generation of biofuel and value-added products. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 11(8): 773-787.
- Makkar, H. P. S., P. Shdhuraju y K. Becker. 2007. *Plant Secondary Metabolites (Methods in Molecular Biology)*. Human Press, New York. Pp. 130
- Martínez, H. J. 2007. El piñón mexicano: Una alternativa bioenergética para México. *Revista Digital Universitaria.* Vol.8. 12:1067-6079.
- Martínez H. J., P. Siddhuraju, G. Francis, G. Dávila y K. Becker. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents and effects of different treatments on their levels in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *J. Agric. Food. Chem.* 96: 80-89.
- Morales, M. y A. Troncoso. 2006. Sustancias antinutritivas presentes en los alimentos. EN: *Toxicología alimentaria*. Buenos Aires-España, Díaz de santos, 191-209.
- Peralta F., M. E. L. s.a. Caracterización bioquímica de las proteínas de la semilla de *Jatropha curcas* (L.). Tesis de Maestría. CEPROBI-IPN. México. 82 p.

- Pabón, C. L. y P. Hernández-Rodríguez. 2012. Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales. *Revista cubana de plantas medicinales* 17 (2): 194-209.
- Popluechai, S., D. Breviario, S. Mulpuri, H. P. Makkar, M. R. Reddy, E. Palchetti, A. M. Gatehouse, J. Syers, A. O'Donnell y A. Kohli. 2009. Narrow genetic and apparent phenetic diversity in *Jatropha curcas*: initial success with generating low phorbol ester interspecific hybrids. *Nat. Precedings*: hdl:10101/npre.2009.2782.1
- Rakshit, K., J. Darukeshwara, K. Rathina, K. Narasimhamurthy, P. Saibaba y S. Bhagya. 2008. Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. *Food Chemical Toxicol.* 46(12): 3621-5.
- Rakshit, K., P. Harinder y B. Klaus. 2011. *Jatropha* diterpenes: a Review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88(3): 301-22.
- Saetae, D. y S. Worapot. 2011. Toxic compound, anti-nutritional factors and functional properties of protein isolated from detoxified *Jatropha curcas* seed cake. *Int. J. Mol. Sci.* 12(1): 66-77.
- Sakaguchi, S. y M. Somabhi. 1987. Exploitation of promising crops of Northeast Thailand. *Agricultural Development Research Center*. P.p 61.
- Sánchez-Gutiérrez, A., I. Ovando-Medina, L. Adriano-Anaya y M. Salvador-Figueroa. 2010. Diversidad Genética de poblaciones de *Jatropha curcas* L. del Estado de Chiapas, México. *Int. J. Mol. Sci.* 11.
- van der Putten, E., Y. J. Franken y J. de Jongh. 2010. General data in *Jatropha*. In: J. de Jongh (ed.). *The Jatropha Handbook From cultivation to application*. FACT Foundation. The Netherland. Pp.1-7.
- Yan, C., L. Rakshit, K. Devappa, J. Xin, J. Min y H. Makkar. 2010. Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. *Food Chemical Toxicol.* 48(2):620-5.

APÉNDICE

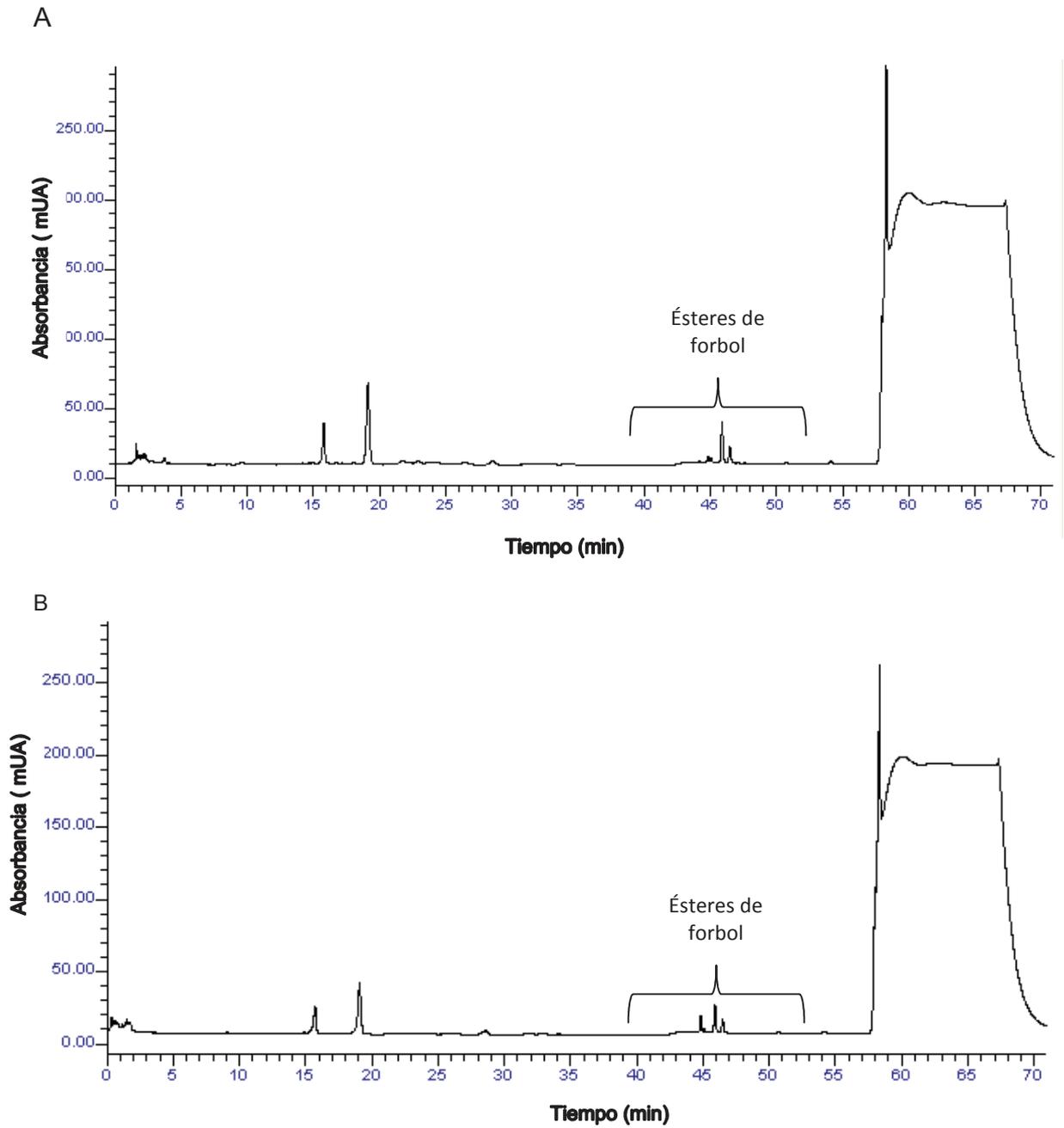


Figura 8A. Cromatogramas obtenidos de las muestras 5 (A) y 6 (B)

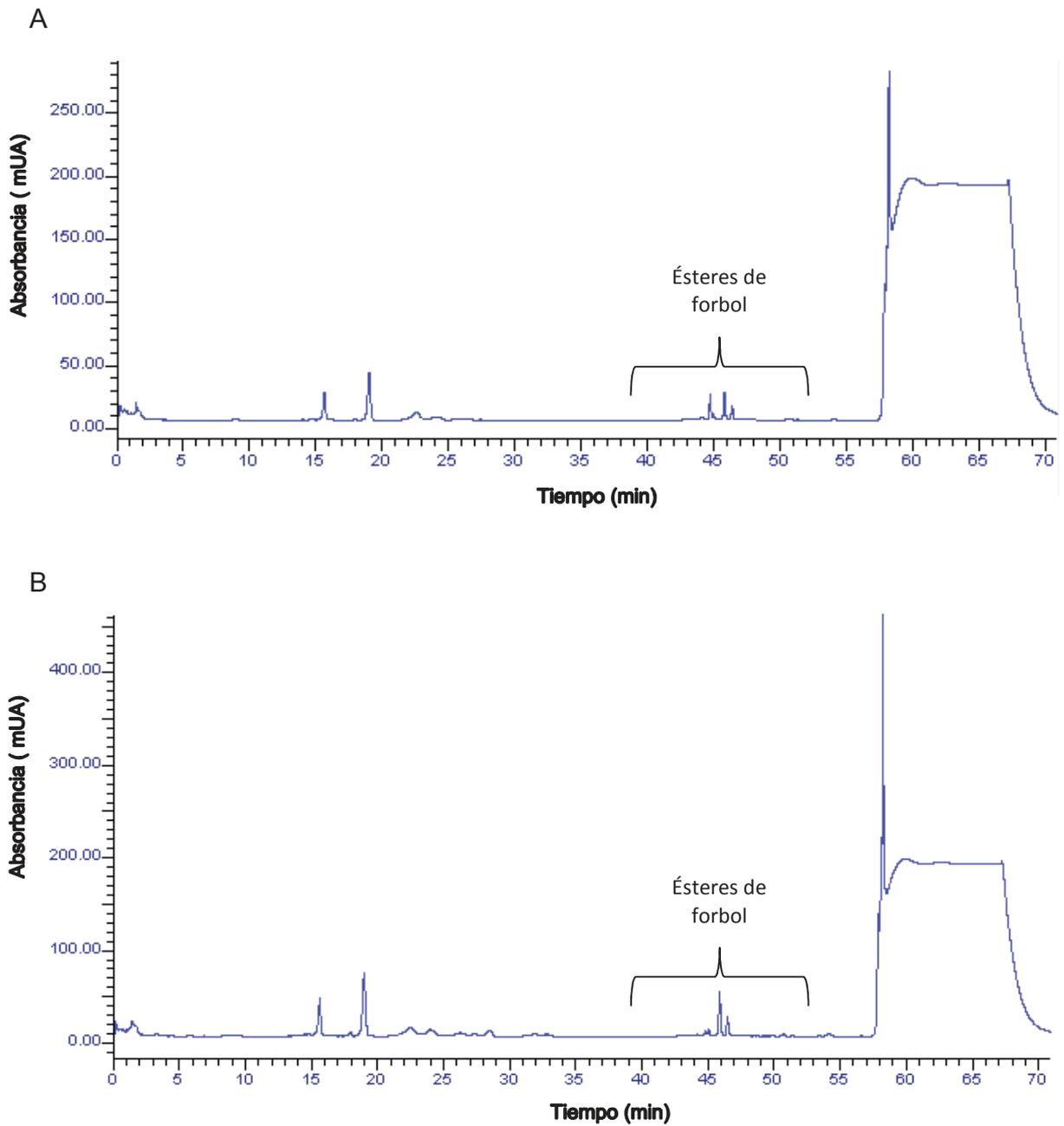


Figura 9A. Cromatogramas obtenidos de muestras 8(A) y 13(B)

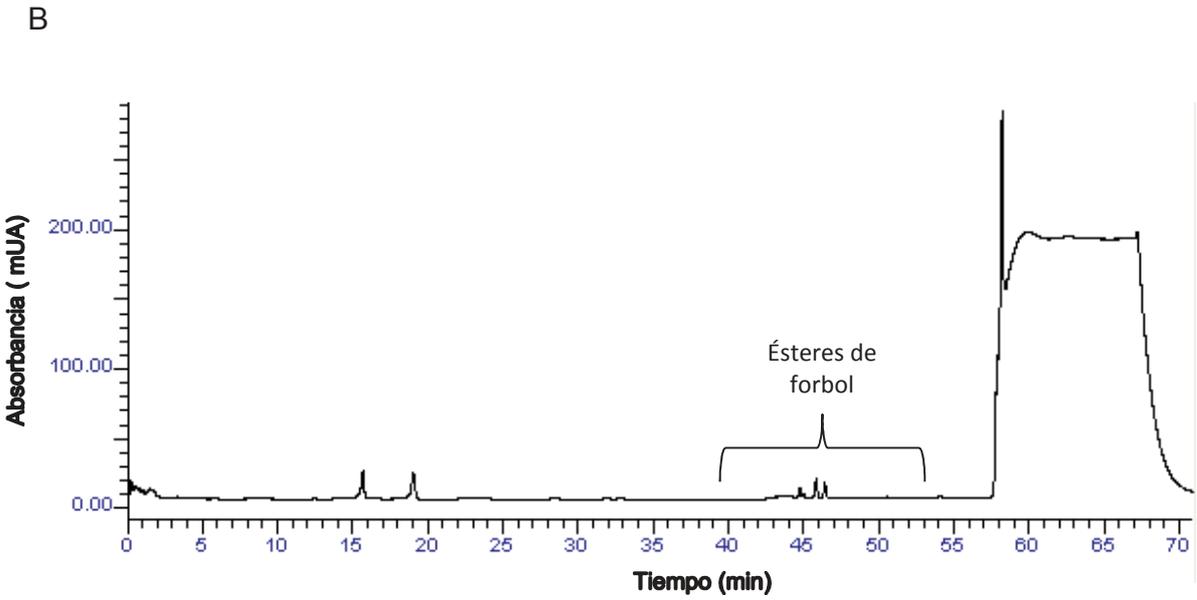
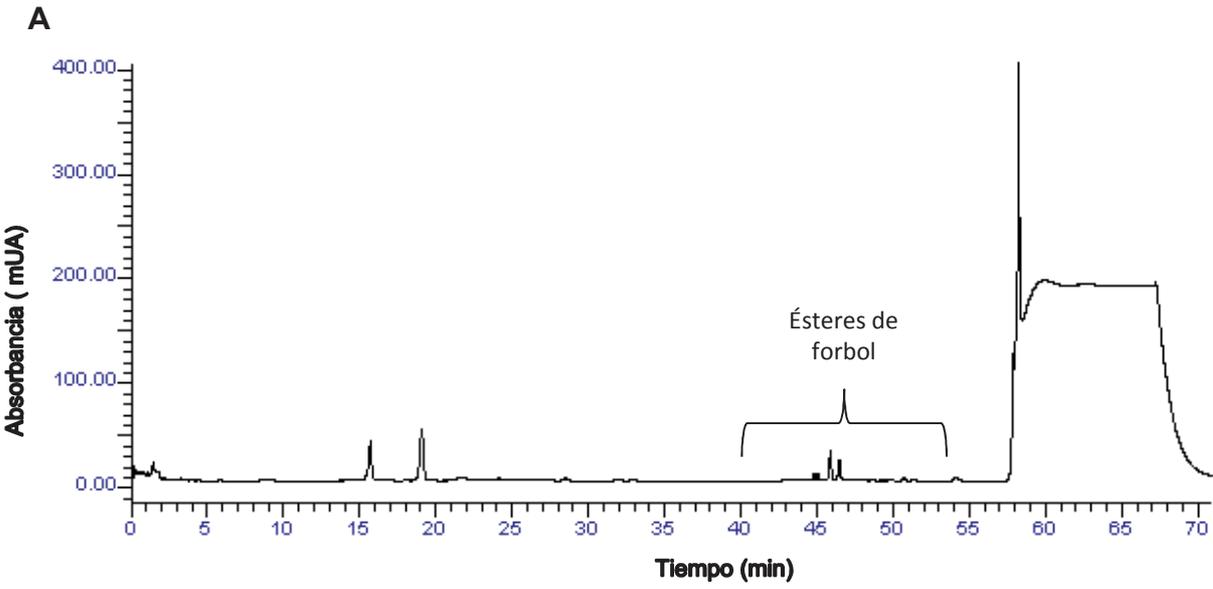


Figura 10A. Cromatogramas obtenido de muestras 15(A) y 17 (B)

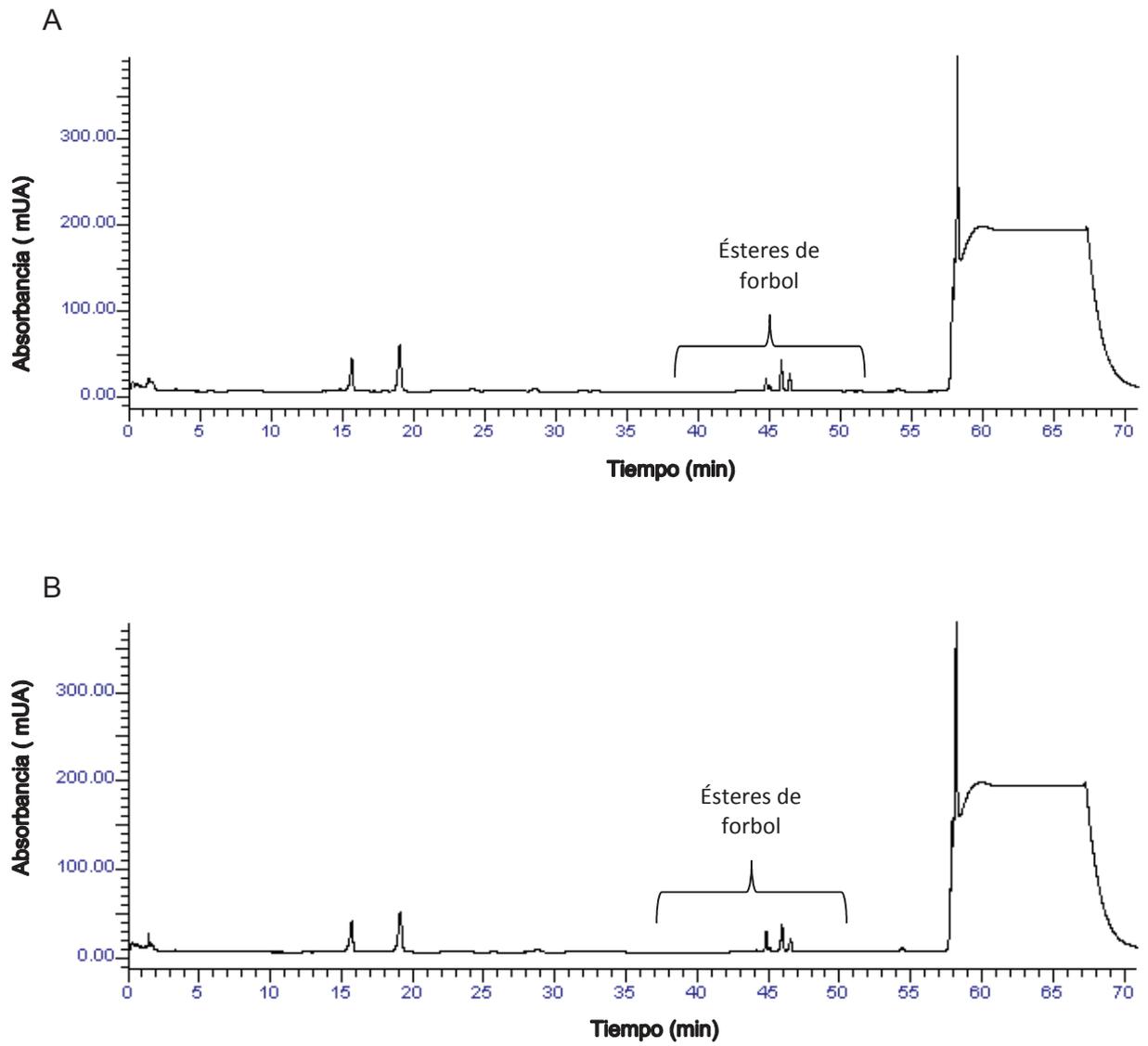


Figura 11A. Cromatogramas obtenido de muestras 19 (A) y 21(B)

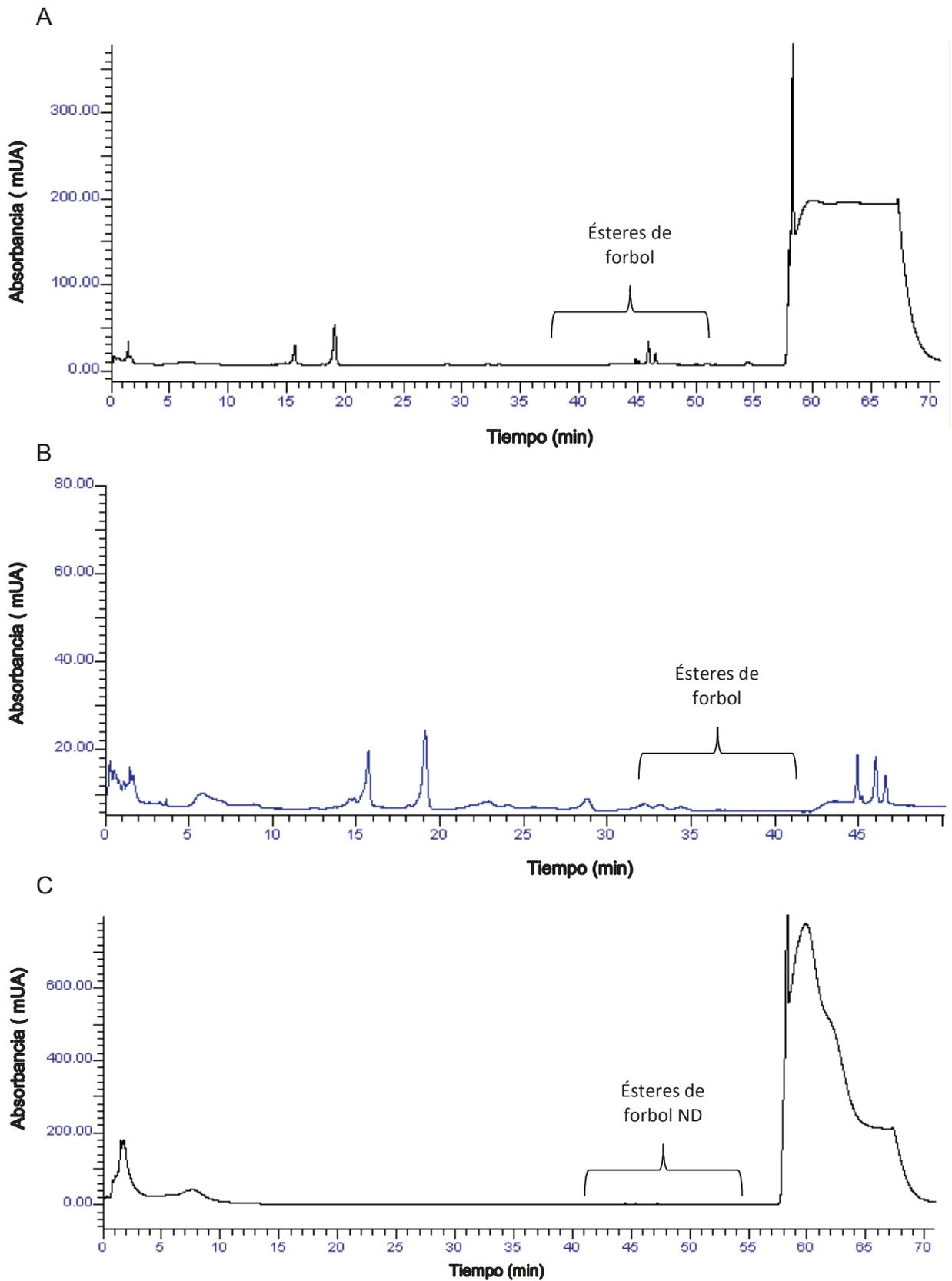


Figura 12A. Cromatogramas obtenidos de las muestras 22(A), 23(B) y 25(C)

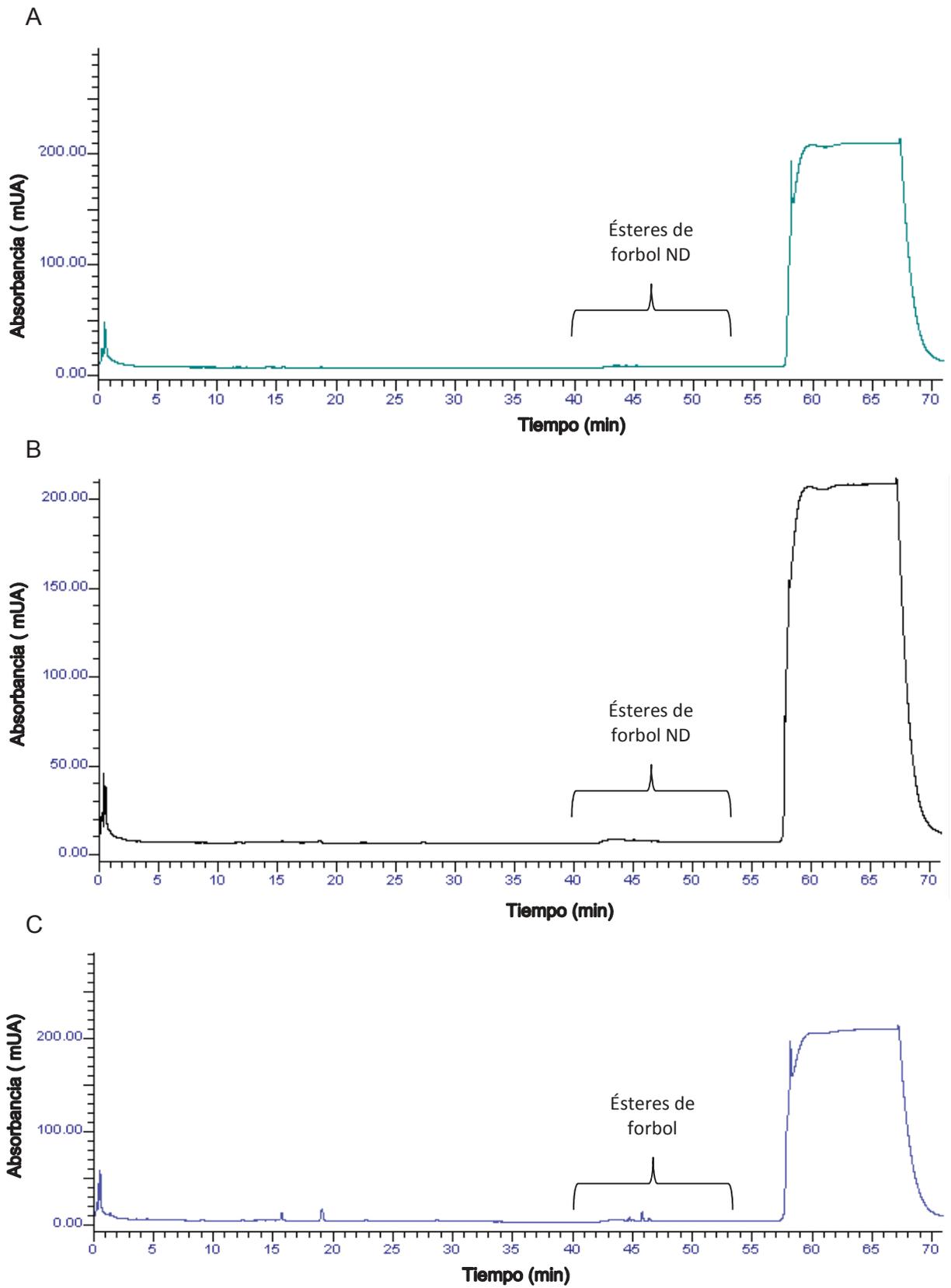


Figura 13A. Cromatogramas de muestras obtenidas 29(A), 35(B) y 39(C).

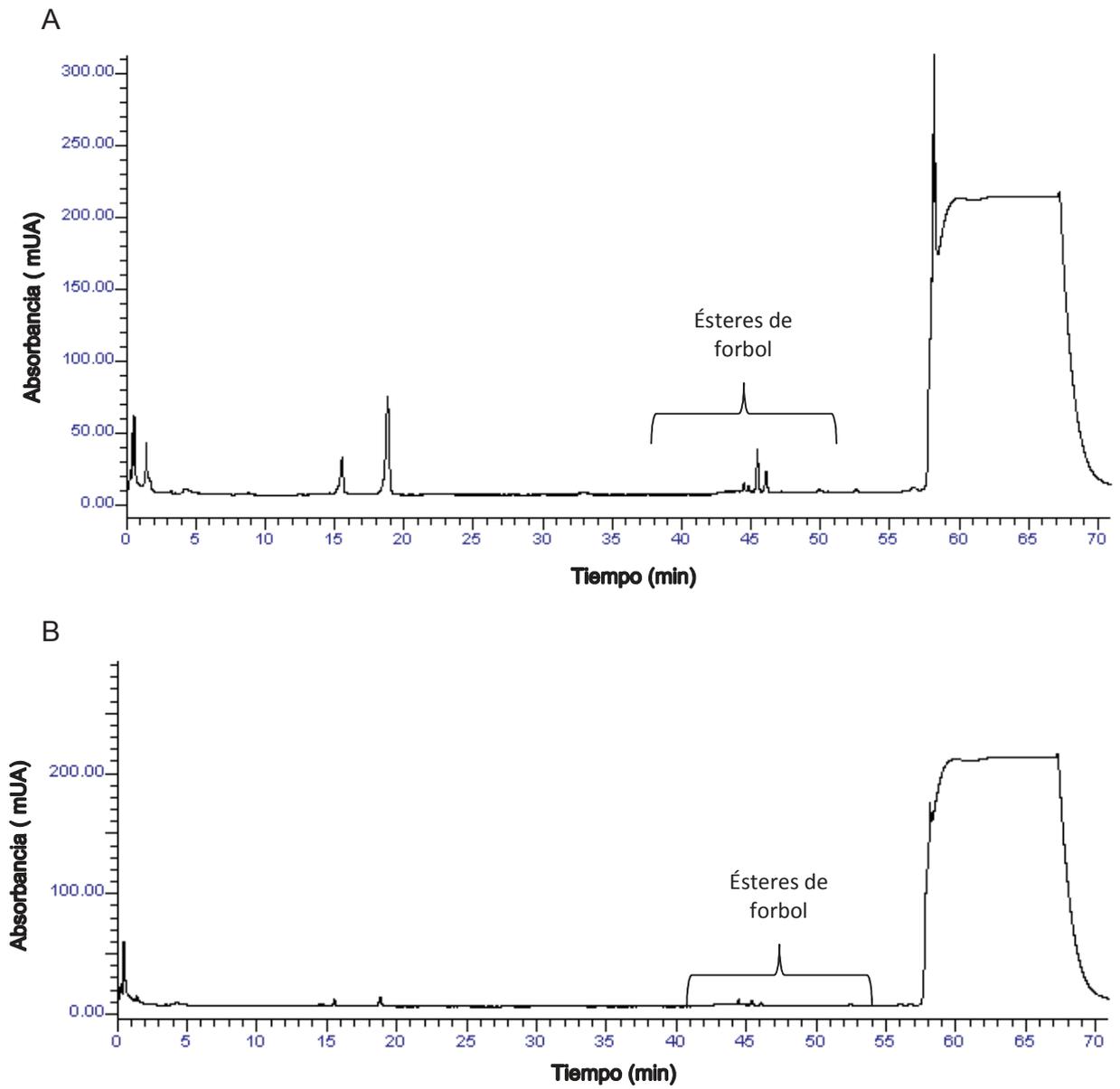


Figura 14A. Cromatogramas de muestras obtenidas 43(A) y 46(B)

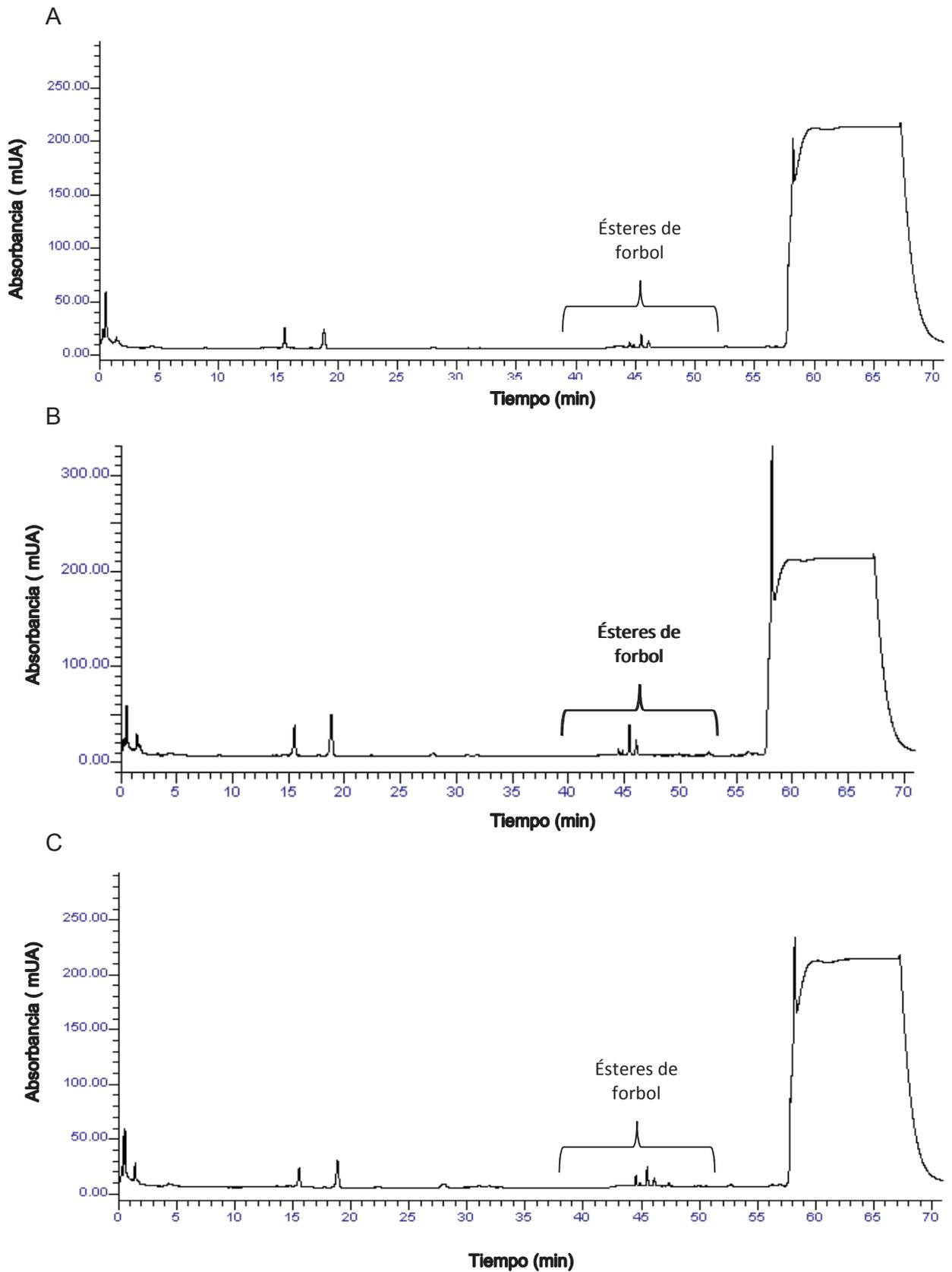


Figura 15A. Cromatogramas de las accesiones 49(A), 55 (B) y 65 (C)

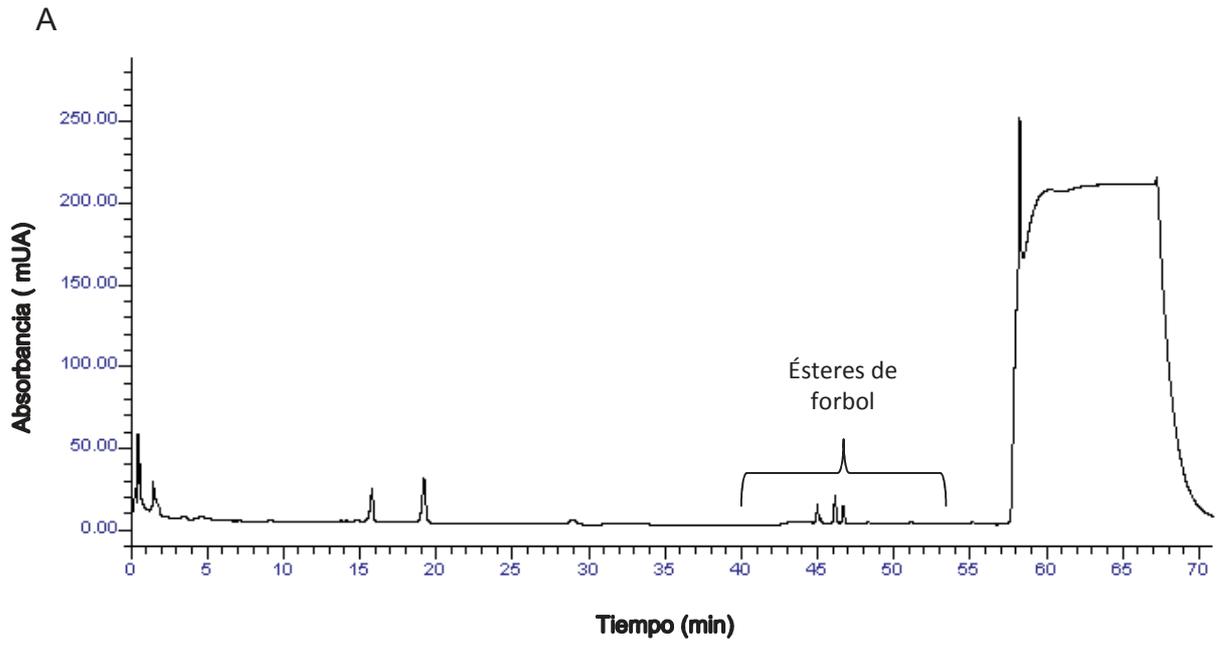


Figura 16A. Cromatograma de la muestra obtenida 75(A)