



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Caracterización bioquímica diferencial y análisis de
terpenoides en dos fases del desarrollo de embriones
somáticos de *Jatropha curcas L.*”**

TESIS

Que presenta

Anamarel Edzná Medina Hernández

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de la Tesis:

Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia

Ciudad de México

Septiembre, 2016

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia.

DEDICATORIA

A quienes me impulsan a cumplir mis sueños, pero en especial a mi mamá, a mi papá, a Martí y a Christian.

AGRADECIMIENTOS

Mis padres no sólo merecen la dedicatoria de este trabajo, sino que merecen mi más profundo agradecimiento por estar siempre a mi lado cuando los necesito, por escucharme, guiarme y alentarme en todos mis proyectos. Los quiero mucho.

A mi hermano Martí le agradezco esas pláticas que siempre me hacen regresar a la realidad. Por seguir creyendo en mí y en que puedo llegar muy lejos, por sus consejos y sobre todo por su cariño.

A Christian que no sólo alimenta mi alma, sino que me invita a seguir volando, y a quien debo agradecer por su apoyo para mantener vivos mis cultivos cuando estuve indispuesta para cuidarlos. Gracias.

A mi abuelita, a mis tías, tíos, primas y primos que siempre me apoyaron con sus consejos, sus pláticas, por estar siempre cuando los necesito y por cuidar a mis seres queridos cuando me encuentro ausente. A mis amigos de siempre y a los que conocí en la maestría, en especial a Azucena que compartió conmigo los malos, los buenos y los mejores momentos.

A Andrea porque en cada plática me incentiva a buscar más, porque me anima a no decaer y a buscar lo bueno de la vida. Y a mi tía Gloria porque siempre me brinda su tiempo y cariño cuando mi cuerpo se niega a seguir trabajando.

A mi comité tutorial por incentivar me a ser mejor. A mi tutora, la Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia, por todo su apoyo, porque siempre está dispuesta a dedicarme su tiempo, a escuchar mis propuestas y a compartir experiencias. Le agradezco su confianza, ser un modelo a seguir, y sobre todo por abrirme las puertas a nuevos horizontes, muchas gracias.

A mi asesora la Dra. María Teresa Ponce Noyola, por sus comentarios, por la confianza para acceder a su laboratorio, por hacerme parte de éste y en especial por compartir sus cualidades culinarias.

También agradezco a mi asesora, la Dra. Gabriela Trejo Tapia por su tiempo, por las molestias en venir desde lejos a presenciar mis tutoriales, por guiarme desde el primer momento y porque sus comentarios siempre me levantaban el ánimo.

Agradezco al M. en C. Emmanuel Ríos Castro de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica de LaNSE, CINVESTAV-IPN, por el análisis de las muestras mediante LC-MALDI-MS/MS, pero también por enseñarme a procesar muestras de proteínas, por dedicar su tiempo a escuchar mis dudas y sobre todo resolverlas.

Agradezco a la Dra. Ileana Vera Reyes por sus comentarios en la tesis, pero también porque no sólo me introdujo al mundo de la proteómica sino al mundo del CINVESTAV. Gracias lle por tu amistad, por compartir tus experiencias, e incluso tus antojos.

A la Dra. Gabriela Luna Palencia por apoyarme en el análisis de terpenoides, por ayudarme a conseguir que el material de proteómica llegara a buen recaudo, pero sobre todo por su amistad y por compartir conmigo sus gustos dulceros. A la Técnico Ma. Del Carmen Fontaine Sánchez por todo su apoyo técnico y por contagiarme de su alegría y su filosofía de la vida.

A los alumnos y al personal del laboratorio de la Dra. Tere Ponce, que me brindaron espacio y tiempo para concluir experimentos, pero sobre todo al M. en C. Javier Ríos que me brindó su apoyo y experiencia.

Al Dr. Fidel de la Cruz Hernández-Hernández del Departamento de Genética y Biología Molecular CINVESTAV- IPN Zacatenco por permitirme trabajar en su laboratorio, en especial a la Biól. Leticia Cortés Martínez por compartir su conocimiento y experiencia en proteómica, desde la forma de extracción, hasta la forma de obtener los geles en dos dimensiones. Muchas gracias.

Quiero agradecer al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) Zacatenco por el apoyo económico para asistir a congresos y al personal académico y administrativo del Departamento de Biotecnología.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por otorgarme la beca Nacional para Estudios de Posgrado con el número de becario 301021 para realizar la Maestría en Ciencias con Especialidad en Biotecnología en Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

Índice

Índice de tablas	I
Índice de figuras.....	I
Resumen.....	IV
Abstract	V
1. Introducción	1
2. Antecedentes.....	1
2.1. Familia Euphorbiaceae	1
2.1.1. <i>J. curcas</i>	2
2.1.1.1 Usos de <i>J. curcas</i>	3
2.2. Metabolitos de plantas	4
2.2.1. Terpenoides.....	4
2.2.1.1. Síntesis de los terpenoides.....	5
2.2.1.2. Terpenoides de <i>J. curcas</i>	7
2.3. Embriogénesis en plantas	8
2.3.1 Embriogénesis cigótica.....	8
2.3.2. Embriogénesis somática	9
2.3.2.1. Inducción y proliferación.....	10
2.3.2.2. Histodiferenciación	11
2.3.2.3. Maduración.....	11
2.3.2.5. Aplicaciones de los embriones somáticos	12
2.3.2.6. Embriones somáticos de <i>J. curcas</i>	13
2.4. Proteómica	13
2.4.1. Estudios proteómicos de embriones somáticos	14
3. Justificación	16
4. Hipótesis	17
5. Objetivos.....	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos específicos.....	18
6. Materiales y métodos.....	19
6.1. Material vegetal.....	19
6.1.1. Cultivo <i>in vitro</i> de plántulas de <i>J. curcas</i>	19
6.1.2. Cultivo <i>in vitro</i> de callo de <i>J. curcas</i>	19
6.1.3. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en suspensión.....	19
6.2. Tinción de embriones somáticos pre-globulares y globulares de <i>J. curcas</i>	20
6.2.1. Tinción diferencial con acetocarmín 2% y azul de Evans 0.5% (Gupta y Holmstrom, 2005).....	20
6.2.2. Tinción con diacetato de fluoresceína (FDA por sus siglas en inglés).....	21

6.2.3. Tinción con cloruro de tetrazolio 0.2% (TTC por sus siglas en inglés)	21
6.2.4. Tinción con lugol	21
6.3. Electroforesis en dos dimensiones	21
6.3.1. Extracción de proteína	21
6.3.2. Cuantificación de proteína	22
6.3.3. Isoelectroenfoque	23
6.3.4. SDS-PAGE	23
6.3.5. Visualización y análisis de geles 2-D	23
6.3.6. Selección de proteínas	24
6.4. Secuenciación de proteínas	24
6.4.1. Deshidratación de gel	24
6.4.2. Desnaturalización de la proteína	25
6.4.3. Rehidratación/ Deshidratación de gel	25
6.4.4. Digestión con tripsina	25
6.4.5. Extracción de proteína	25
6.4.6. Secuenciación de proteína	26
6.5. Análisis de secuencias	27
6.6. Extracción de terpenoides de embriones somáticos de <i>J. curcas</i>	28
6.7. Identificación de compuestos por cromatografía en placa fina (TLC)	28
7. Resultados y discusión	29
7.1. Establecimiento de cultivo <i>in vitro</i> de callo de <i>J. curcas</i> y caracterización morfológica	29
7.2. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en suspensión y caracterización morfológica	31
7.2.1. Inicio de cultivo de embriones somáticos	31
7.2.2. Subcultivo 1	32
7.2.3. Subcultivo 2	33
7.2.4. Subcultivo 3	34
7.3. Morfología interna de embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en estado globular	37
7.4. Caracterización morfológica de los embriones somáticos con protuberancias	38
7.5. Perfil proteómico de embriones somáticos pre-globulares y globulares	39
7.6. Identificación de proteínas de embriones somáticos en estado globular	43
7.7. Clasificación de proteínas identificadas en embriones somáticos en estado globular	52
7.7.1. Proteínas involucradas en el metabolismo	53
7.7.2. Proteínas asociadas con la producción de energía	54
7.7.3. Proteínas asociadas a almacenamiento y destino de proteínas	57
7.7.4. Proteínas asociadas a estructura celular	57
7.7.5. Proteínas asociadas a la transducción de señales	58
7.7.6. Proteínas asociadas al metabolismo secundario	59

7.8. Análisis de presencia de forboles en embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en estado globular.	60
7.9. Análisis comparativo de presencia de terpenoides en embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en estado pre-globular y globular.	61
7.9.1. Terpenoides detectados sólo en embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en estado pre-globular.	66
7.9.2. Terpenoides detectados sólo en embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en estado globular.	66
7.10. Relación de proteómica diferencial con metabolismo secundario de los embriones somáticos de <i>J. curcas</i>.	67
8. Conclusiones	69
9. Recomendaciones	70
10. Referencias	71
11. Anexos	79

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación botánica de <i>J. curcas</i>	2
Tabla 2. Comparación de número de proteínas únicas y con >1.5 veces de cambio entre embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en estado pre-globular y globular.....	41
Tabla 3. Proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF de embriones somáticos en estado globular de <i>J. curcas</i>	45
Tabla 4. Clasificación funcional de proteínas secuenciadas de embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en estado globular	52

Índice de figuras

Figura 1. Distribución mundial de <i>Jatropha curcas</i> . El centro de origen se muestra en círculo negro (Modificado de Discover Life).	3
Figura 2. Esquema representativo de la biosíntesis de terpenoides en plantas. Flechas discontinuas representan múltiples pasos. ABA ácido abscísico, BRs brasinoesteroides, CKs citoquininas, DMAPP dimetilalil difosfato, DXP desoxi-D-xilulosa 5-fosfato, FPP farnesil difosfato, GAs giberelinas, GGPP geranil geranil difosfato, GPP geranil difosfato, HMG- CoA hidroximetilglutaril Coenzima A, IPP isopentenil difosfato, MEP metileritritol 4-fosfato, MVA mevalonato, SLs estrigolactonas. Enzimas involucradas en la biosíntesis de terpenoides: DXR, DXP reductoisomerasa; DXS, DXP sintasa; FPS, FPP sintasa; GGPP, GGPP sintasa; GPS, GPP sintasa; HMGR, HMG-CoA reductasa. (Modificado de Rodríguez-Concepción, 2014).	6
Figura 3. Propuesta de biosíntesis de ácido betulínico, ácido ursólico y ácido oleanólico en <i>Catharantus roseus</i> . Enzimas: CrAS, <i>C. roseus</i> amirina sintasa; AtLUP1, <i>Arabidopsis thaliana</i> lupeol sintasa; CrAO, <i>C. roseus</i> amirina C-28 oxidasa (Modificado de Huang et al., 2012).	7
Figura 4. Comparación de embriogénesis cigótica y somática en angiospermas (Modificado de Smertenko y Bozhkov, 2014).	9
Figura 5. Cultivo <i>in vitro</i> de plántulas y callo de <i>J. curcas</i> . A) Frascos con algodón húmedo en donde se sembraron semillas de <i>J. curcas</i> . B) Plántula de <i>J. curcas</i> germinada <i>in vitro</i> . C) Callo de <i>J. curcas</i> obtenido después de un mes en medio MS adicionado con 1mg/L 2,4D. D) Callo de <i>J. curcas</i> obtenido después de un mes en medio 2S.	30
Figura 6. Fotografías de callo de un mes de edad de <i>J. curcas</i> en medio 2S observado a microscopio óptico. A) Células de callo sin tinción, 40x. B) Células de callo teñidas con FDA, 10x. C y D) Callo teñido con acetocarmín y azul de Evans, 10x.	31
Figura 7. Fotografías de inicio de cultivo de embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en suspensión, las células se observaron con microscopio óptico. A) Células sin tinción 10X, B-F) Células con tinción con FDA. B) Células en división y agregados celulares. C) Agregado celular, 10X. D) Agregado celular de mayor tamaño, 40x. E) Célula embriogénica, en donde el FDA se acumuló en el citoplasma, 40X. F) Célula no embriogénica, en donde el FDA se acumuló en cloroplastos, 40X.	32
Figura 8. Fotografías de subcultivo 1 de embriones somáticos de <i>J. curcas</i> a dos semanas de haberse iniciado. A) Agregados que pueden observarse a simple vista. B y C) Agregados observados a microscopio óptico con una tinción con FDA, 10X.	33
Figura 9. Fotografías de subcultivo 2 de embriones somáticos de <i>J. curcas</i> a dos semanas de haberse iniciado. A) Agregados que pueden observarse a simple vista. B) Embriones somáticos de <i>J. curcas</i> pre-globulares observados a microscopio	

óptico con una tinción con FDA, 10X. C) Embriones pre-globulares observados a microscopio óptico con una tinción diferencial con acetocarmín y azul de Evans, 10X.	33
Figura 10. Fotografías de embriones somáticos en estado pre-globular, globular y con protuberancias parecidas a raíz. A) Embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en estado pre-globular. B) Embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en estado globular. C) Embriones somáticos de <i>J. curcas</i> de primer subcultivo después de un mes, algunos con malformaciones. D) Embriones somáticos de <i>J. curcas</i> de tercer subcultivo en estado globular. E) Embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en estado globular de diferentes tamaños. F) Embriones somáticos <i>J. curcas</i> con protuberancia parecida a raíz.	36
Figura 11. Fotografías de embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en estado globular. A y B) Observados a microscopio óptico a 4X. A) Embrión globular teñido con FDA. B) Embrión globular teñido con acetocarmín y azul de Evans. C) Embriones globulares en solución de TTC observados a simple vista.	37
Figura 12. Fotografías de corte transversal de embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en estado globular. A y B) Observación a microscopio óptico a 4 x. A) Tinción con FDA. B) Tinción diferencial con acetocarmín y azul de Evans, la flecha indica las células que se tiñeron de azul y que forman el suspensor. C-F) Tinción con lugol. D) Células centrales del embrión, 40X, la flecha indica las células compactas que rodean el centro denso del embrión. E) Células de en medio con gránulos de almidón 40x. F) Células más distales al centro con división periclinal.	38
Figura 13. Fotografías de embriones con protuberancia parecida a raíz. A) Embrión con protuberancia parecida a raíz sin tinción observadas a microscopio estereoscópico. B) Embrión con protuberancia parecida a raíz teñida con TTC. C-E) Observación con microscopio estereoscópico de corte longitudinal del embrión con protuberancia parecida a raíz, 40 X. La flecha indica el procambium.	39
Figura 14. Comparación de perfil proteómico entre embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en estado pre-globular A) y globular B). Las imágenes muestran los geles en 2-D representativos de cada estado de desarrollo; para cada estado se hicieron tres réplicas biológicas. Las cruces rojas indican las manchas detectadas, en promedio se detectaron 654±41 manchas de proteína para el embrión en estado-pre globular y 552±30 para el estado globular. Los círculos azules representan las manchas que se seleccionaron para secuenciación, los números son los mismos con los que software ImageMaster™ 2D Platinum identificó cada mancha. Se usaron tiras de isoelectroenfoque de 11 cm con rango de pl 4-7. Los geles se tiñeron con SyproRuby.	42
Figura 15. Porcentaje de volumen de manchas de proteínas de embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en estado pre-globular y globular. Las primeras 8 manchas son únicas de los embriones somáticos globulares. En las 12 manchas restantes se hace la comparación entre el % de volumen entre los embriones somáticos en estado pre-globular y globular. El % volumen representa la media de tres réplicas independientes e indica en porcentaje relativo que ocupa la mancha con respecto al 100% que ocupa la suma del volumen de todas las manchas en el gel. El núm. mancha indica el número con que se identificó la mancha en el software Image MasterPlatinum.	43
Figura 16. Proporción funcional de proteínas identificadas de embriones somáticos de <i>J. curcas</i> en estado globular. La clasificación se hizo de acuerdo con Bevan y colaboradores (1998).	53

Figura 17. Fotografía de placa TLC RP-18 para identificación de forboles en embriones somáticos de *J. curcas* estado globular. 1) Semilla de variedad mexicana con forboles. 2) Estándar de forbol miristato (Rf= 0.81). 3) Extracción con diclorometano. A) Placa observada bajo luz UV a 254 nm, B) Placa observada bajo luz UV a 365 nm C) Placa observada a luz visible después de revelado con anisaldehído-ácido sulfúrico y calor. Los círculos verdes indican los forboles identificados en las muestras. Los círculos rojos indican las franjas de color que se observan a 365 nm. Los círculos negros indican las franjas de terpenoides que se observan a luz visible. Fase móvil= acetato de etilo: acetonitrilo (3:2) (Martelanc et al., 2009).61

Figura 18. Fotografía de placa TLC RP 18 para identificación de terpenoides en embriones somáticos de *J. curcas* estado globular a luz visible después del revelado con anisaldehído-ácido sulfúrico y calor. 1) Estándares de L= lupeol (Rf=0.48), Lact= lupeol acetato (Rf=0.54), AB= ácido betulínico (Rf=0.77); 2) S= β -sitosterol (Rf=0.32), ET= estigmasterol (Rf=0.35), α -a= α -amirina (Rf=0.40), β -a= β -amirina acetato (Rf=0.49), AO= ácido oleanólico (Rf=0.75); 3) Extracto con diclorometano de embriones somáticos *J. curcas*; 4) FNOL= friedelinol (Rf=0.4), Fn=friedenona (Rf=0.48), U= ácido ursólico (Rf=0.74); 5) ET, FL= friedelina (Rf=0.47), B= betulin (Rf=0.69). En círculo rojo están marcadas las franjas que a 365 nm se ven rojas. Las flechas indican la correspondencia de los terpenoides de los embriones somáticos y los estándares. Fase móvil acetato etilo: acetonitrilo (3:2) (Martelanc et al., 2009)...62

Figura 19. Extracciones con diclorometano de embriones somáticos de *J. curcas* en estado pre-globular (A, B y C) y globular (D, E y F).63

Figura 20. Identificación en placa TLC RP 18 de compuestos terpénicos en embriones somáticos de *J. curcas* en estado pre-globular y globular a luz visible después de revelado con anisaldehído-ácido sulfúrico y calor. 1) Embrión somático pre-globular C. 2) Embrión somático pre-globular B. 3) Embrión somático pre-globular A. 4) Embrión somático globular F. 5) Embrión somático globular E. 6) Embrión somático globular D. 7) Mezcla de estándares de terpenoides: S= β -sitosterol (0.22), E= estigmasterol (Rf=0.26), α -a= α -amirina (0.31), L= lupeol (Rf=0.37), B= betulin (Rf=0.58), AB= ácido betulínico (Rf=0.66). Las flechas rojas indican las franjas que se encuentran presentes en ambos estados de desarrollo. Las rectas rojas indican la ausencia de franjas. En círculo rojo están marcadas las franjas que a 365 nm se observan en color rojo o azul. En círculo verde se encuentra marcado la franja que sólo se vio a luz UV a 254 nm. El recuadro azul indica las franjas únicas de embriones pre-globulares. Fase móvil acetato etilo: acetonitrilo (3:2) (Martelanc et al., 2009).65

Resumen

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el perfil proteómico diferencial y de evaluar los cambios en la producción de terpenoides de embriones somáticos (ES) de *Jatropha curcas* de una variedad no tóxica mexicana en dos estados de desarrollo: pre-globular (ESPG) y globular (ESG). Los cultivos en suspensión de ES se obtuvieron en MS adicionado con 3% sacarosa, BAP (0.061 mg/L), NAA (0.05 mg/L) y ácido ascórbico (10 mg/L). La caracterización morfológica se realizó por medio de tinciones, en particular con acetocarmín y azul de Evans. Se hizo un análisis proteómico diferencial entre ESPG y ESG por medio de geles de electroforesis 2-D. Se analizaron 20 de 108 manchas de proteínas que se expresaban diferencialmente ($p < 0.02$) y se secuenciaron por MALDI TOF-TOF. El índice de abundancia de proteína modificado exponencialmente (emPAI) se utilizó en los casos en que se encontró más de una proteína por mancha. Se hizo un análisis comparativo de la producción de terpenoides mediante cromatografía en capa fina (TLC RP-18).

Se obtuvieron embriones somáticos de *J. curcas* en suspensión hasta un estado de histodiferenciación globular. Las tinciones permitieron identificar que las células de suspensor que rodean a los ESG no se degradan, lo que pudo evitar que el embrión se desarrollara a otros estados. Se obtuvo un perfil proteómico diferencial entre ESPG y ESG. La secuenciación de proteínas de los ESG permitió identificar proteínas relacionadas con la obtención de energía (68%), almacenamiento y destino de proteínas (9%), metabolismo secundario de fenoles (9%), transducción de señales (5%), estructura celular (5%) y metabolismo de aminoácidos (4%). En la categoría de proteínas relacionadas con la obtención de energía, las subcategorías más representativas fueron: proteínas involucradas con la fotosíntesis (40%), con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (20%), con la glucólisis (13%) y con la fermentación (13%). Cuando se analizó el perfil de la producción de terpenoides, en ambos tipos de embrión se identificaron esteroides y triterpenos de interés farmacológico (α -amirina y ácido betulínico), pero también se detectaron compuestos que eran únicos para cada estado de desarrollo. Los resultados de este trabajo generaron las bases para caracterizar a diferentes niveles el proceso de embriogénesis somática de *J. curcas*, de manera que este sistema se pueda utilizar eficientemente en procesos biotecnológicos.

Abstract

The aim of this study was to characterize the differential proteomic profile and evaluate the change on the terpenoid production in somatic embryos (SE) of *Jatropha curcas* from a non-toxic mexican variety at two different developmental stages: pre-globular (PGSE) and globular (GSE). The suspension cultures of SE were obtained on MS supplemented with 3% sucrose, BAP (0.061 mg/L), NAA (0.05 mg/L) and ascorbic acid (10 mg/L). The morphological characterization was carried out by staining with acetocarmine and Evans blue. The differential analysis in proteomics was made between PGSE and GSE by 2-D gel electrophoresis. Twenty spots were chosen from 108 spots differentially expressed ($p < 0.02$) and sequenced by MALDI TOF-TOF mass spectrometry. The exponentially modified protein abundance index (emPAI) approach was used where it was found more than one protein per spot. A comparative analysis of terpenoids production was made by TLC plates RP-18.

It was possible to obtain suspension cultures of *J. curcas* somatic embryos until globular histodifferentiation. Stains helped to identify suspensory cells that are surrounding GSE and do not degrade, which could have prevented the embryo to develop to other states. A differential proteomic profile between PGSE and GSE was obtained. Protein sequencing of GSE identified proteins related to energy production (68%), protein destination and storage (9%), secondary metabolism (9%), signal transduction (5%), cell structure (5%) and aminoacid metabolism (4%). In the category of proteins related to energy production, the most representative subcategories were: proteins involved in photosynthesis (40%), with the cycle of tricarboxylic acids (20%), with glycolysis (13%) and the fermentation (13%). When the production profile of terpenoids was analyzed, in both PGSE and GSE were identified sterols and triterpenes of pharmacological interest (α -amyrin and betulinic acid) however, it was also found compounds that were unique to each state. The results of this work generated the bases to characterize at different levels the process of somatic embryogenesis of *J. curcas*, so that this system can be used efficiently in biotechnological processes.

1. Introducción

Jatropha curcas L. es una especie de importancia económica, en especial por la producción de biodiesel derivado de los aceites de la semilla (Heller, 1996; Kumar y Sharma, 2008). En esta planta se ha podido obtener embriones somáticos, los cuales son estructuras bipolares capaces de formar una planta completa, sin embargo, no se han caracterizado, lo que ha reducido su aplicación biotecnológica. En este trabajo se establecieron las condiciones de cultivo para obtener embriones somáticos de *J. curcas* de una variedad no tóxica mexicana. Se caracterizaron dos estados de desarrollo (pre-globular y globular) a nivel morfológico por medio de tinciones y observaciones a microscopio óptico; proteómico por medio la obtención de perfiles proteómicos por medio electroforesis en dos dimensiones; y de producción de terpenoides por medio de perfiles en la producción de terpenoides por medio cromatografía en capa fina de fase reversa (TLC-RP por sus siglas en inglés).

2. Antecedentes

2.1. Familia Euphorbiaceae

Jatropha curcas pertenece a la familia Euphorbiaceae. Esta familia es cosmopolita, pero se ubica principalmente en regiones tropicales y subtropicales; comprende hierbas, arbustos y árboles monoicos y dioicos. La familia Euphorbiaceae se distingue por tener flores unisexuales con un ovario superior, usualmente tricarpelar, con un óvulo por carpelo, con placentación apical-axilar y por tener látex de varios colores, especialmente blanco (Simpson, 2010).

Dentro de esta familia se encuentran especies de importancia económica como *Hevea brasiliensis*, de la cual se obtiene el caucho; *Manihot esculenta*, también conocida como yuca que se utiliza para preparación de alimentos, así como para obtener tapioca; y *Ricinus communis*, como fuente de aceite de ricino; entre otros (Simpson, 2010).

La familia Euphorbiaceae presenta cinco subfamilias, y cerca de 8100 especies. La subfamilia Crotonoideae presenta 67 géneros, de los cuales los más diversos son *Croton* con 800 especies y *Jatropha* con 175. En México el género *Jatropha* está representado con 45 especies, de las cuales el 77 % son endémicas de selvas bajas

y matorrales xerófilos (Martínez et al., 2002). Dentro de las especies más conocidas del género *Jatropha* se encuentra *J. curcas* por la utilización de los aceites de sus semillas para la producción de biodiesel.

2.1.1. *J. curcas*

J. curcas (Tabla 1) es un arbusto de 3 a 5 metros de altura, con hojas lobuladas dispuestas alternativamente. Esta especie se cultiva en los trópicos y subtropicos (Fig. 1), crece en lugares con precipitación que puede variar de los 250 a 1200 mm por año, con temperaturas de 15°C a 40°C, en altitudes que llegan hasta los 500 msnm. Puede crecer en suelos secos con bajos contenidos de nutrientes (Heller, 1996; Kumar y Sharma, 2008).

Pecina-Quintero y colaboradores (2014) propusieron al estado de Chiapas en México como centro de origen de esta especie, y las áreas cercanas al Golfo de México - Veracruz, Puebla, Hidalgo y Yucatán- como sitios de domesticación (Pecina-Quintero et al., 2014). Se considera que la distribución de *J. curcas* a los países de África y Asia pudo haber ocurrido a mediados del S. XIX por la comercialización de los navegantes portugueses (Heller, 1996).

Tabla 1. Clasificación botánica de *J. curcas*

Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malpighiales
Familia	Euphorbiaceae
Subfamilia	Crotonoideae
Tribu	Jatropheae
Género	<i>Jatropha</i> L.
Especie	<i>Jatropha curcas</i> L.
Sinónimos	<i>Curcas curcas</i> (L.) Britton y Millsp.
Nombres comunes en México	piñón mexicano, piñón manso, piñoncillo

Existen variedades tóxicas y no tóxicas de *J. curcas*. Ambas contienen curcina, que es una proteína de las semillas que inhibe la síntesis de proteínas; pero la toxicidad la determina la presencia de ésteres de forbol que son una clase de compuestos diterpénicos que causan irritación en la piel y crecimiento de tumores. La intoxicación con estos compuestos produce síntomas como mareos, vómito, diarrea, y en algunos casos la muerte (Kumar y Sharma, 2008; Abdelgadir y Van Staden, 2013).

En México, la especie *J. curcas* tiene una gran diversidad genética, la cual se ve reflejada porque se han encontrado genotipos tóxicos y no tóxicos, así como por las variaciones en los contenidos de aceites (21 a 67%) y proteínas (23 a 59%) (Pecina-Quintero et al., 2014). Se ha reportado que las variedades mexicanas presentan contenidos de proteína y lípidos significativamente más altos que los encontrados en semillas provenientes de otros países (Martínez-Herrera et al., 2006).

El genoma de *J. curcas* fue secuenciado por Genomeweb (2010), y por Sato y colaboradores (2011), lo que ha permitido el análisis de esta planta a nivel genómico y proteómico.

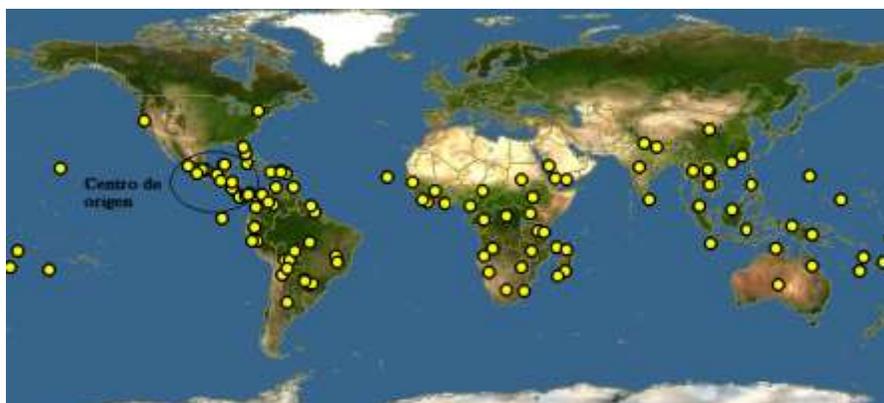


Figura 1. Distribución mundial de *Jatropha curcas*. El centro de origen se muestra en círculo negro (Modificado de Discover Life).

2.1.1.1 Usos de *J. curcas*

El principal uso de esta especie es para la producción de biodiesel a partir del aceite de sus semillas, ya que éstas contienen de un 55-58% de lípidos. Los ácidos grasos principales: ácido oléico (41.5–48.8%), linoléico (34.6–44.4%), palmítico (10.5–13%) y esteárico (2.3–2.8%) (Martínez-Herrera et al., 2006). El aceite de sus semillas

también se ha utilizado para la producción de velas, jabones y cosméticos (Abdelgadir y Van Staden, 2013).

En algunas partes de América, India y África, *J. curcas* es utilizada como cerca viva, como insecticida, algunas variedades para preparar alimentos, así como en la medicina tradicional (Heller, 1996; Kumar y Sharma, 2008, Abdelgadir y Van Staden, 2013).

El uso de *J. curcas* en la medicina tradicional ha llevado a diferentes investigadores a analizar el efecto farmacológico de diferentes partes de la planta preparados en varios tipos de extractos, así como a investigar los compuestos orgánicos involucrados en dichos efectos, por ejemplo, se encontró que los diterpenos producidos por esta planta son mayormente responsables de las actividades antimicrobiales y efectos analgésicos (revisado por Abdelgadir y Van Staden, 2013).

2.2. Metabolitos de plantas

En las plantas se pueden dividir en dos los compuestos orgánicos: los metabolitos primarios y secundarios. Los primarios tienen una función directa en el crecimiento y desarrollo de las plantas; los metabolitos secundarios por su parte son importantes para las respuestas ecológicas de reproducción, como lo es actuar como atrayentes para los polinizadores. Se conoce que los metabolitos secundarios funcionan para protección y defensa, además se distinguen de los primeros porque se encuentran distribuidos de manera diferente entre especies o entre familias de plantas (Taiz y Zeiger, 2010).

Dentro de los compuestos que producen las plantas, en este trabajo se hablará con más detalle de los terpenoides o isoprenoides, los cuales, al abarcar una gran variedad de compuestos diferentes por su estructura y función, pueden pertenecer al metabolismo primario o al secundario (Rodríguez-Concepción, 2014).

2.2.1. Terpenoides

Se conocen alrededor de 30, 000 tipos de terpenoides, todo ellos se derivan de dos precursores de cinco carbonos, el isopentenil difosfato y su isómero dimetilalil difosfato (IPP y DMAPP respectivamente por sus siglas en inglés). La función de los terpenoides en las plantas varía, los esteroides, por ejemplo, son metabolitos

primarios esenciales para la fluidez de la membrana celular; las hormonas, como las giberelinas, son necesarias para el crecimiento de la planta, no obstante, la mayoría de los terpenoides tienen su función a nivel ecológico: para atraer polinizadores y para la comunicación entre plantas, entre otras funciones (Boureau et al., 2013; Talapatra y Talapatra, 2015).

Los terpenoides tienen diversas aplicaciones para el humano, se han utilizado en la industria cosmética y alimenticia; además, se ha encontrado que estos compuestos tienen actividades biológicas y por lo tanto se han estudiado para el tratamiento de enfermedades. La artemisina, por ejemplo, se utiliza contra la malaria; y el taxol se utiliza para tratamientos contra el cáncer (Wang et al., 2005).

2.2.1.1. Síntesis de los terpenoides

Se conocen dos vías diferentes por las cuales se sintetizan los isómeros IPP y DMAPP (Fig. 2). La primera es a través de la ruta del mevalonato (MVA), en donde los isómeros se sintetizan en el citosol; en la segunda vía, el IPP y el DMAPP se sintetizan en el estroma de los cloroplastos a través de la ruta MEP, denominada así por el intermediario que se forma: metileritrol fosfato. Las unidades de IPP que se forman en ruta MVA son utilizadas para la producción de los triterpenos, incluyendo a los esteroides; así como en la mayoría de sesquiterpenos y poliisoprenoides. Los derivados de la ruta MEP por su parte sirven para la síntesis de hemiterpenos, monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos. Sin embargo, se ha encontrado que existe un cruce entre ambas vías, lo que no significa que una vía pueda compensar la pérdida de funcionamiento de la otra (Rodríguez-Concepción, 2014).

A partir de estos isómeros, las enzimas preniltransferasas sintetizan prenil difosfatos que sirven de precursores para la biosíntesis de terpenoides, así el IPP se adiciona repetidamente a DMAPP o a un prenil-difosfato en condensaciones catalizadas por las preniltransferasas. De esta manera el IPP y el DMAPP se condensan y forman el geranil difosfato (GPP), el cual es el precursor de los monoterpenoides (C₁₀); la condensación del GPP con otro IPP forma farnesil difosfato (FPP), que es el precursor de los sesquiterpenoides (C₁₅); la condensación de éste con otro IPP forma geranilgeranil difosfato (GGPP, C₂₀), precursor de los diterpenoides. Por su parte, la condensación de dos moléculas de FPP forma escualeno (C₃₀), el cual a través de la enzima escualeno epoxidasa se convierte en 2,3-oxidoescualeno,

precursor de los triterpenoides (Fig. 2). Una vez que se encuentran los precursores de los terpenoides, las terpeno-ciclasas son las responsables de proseguir con la síntesis (Boureau et al., 2013; Talapatra y Talapatra, 2015).

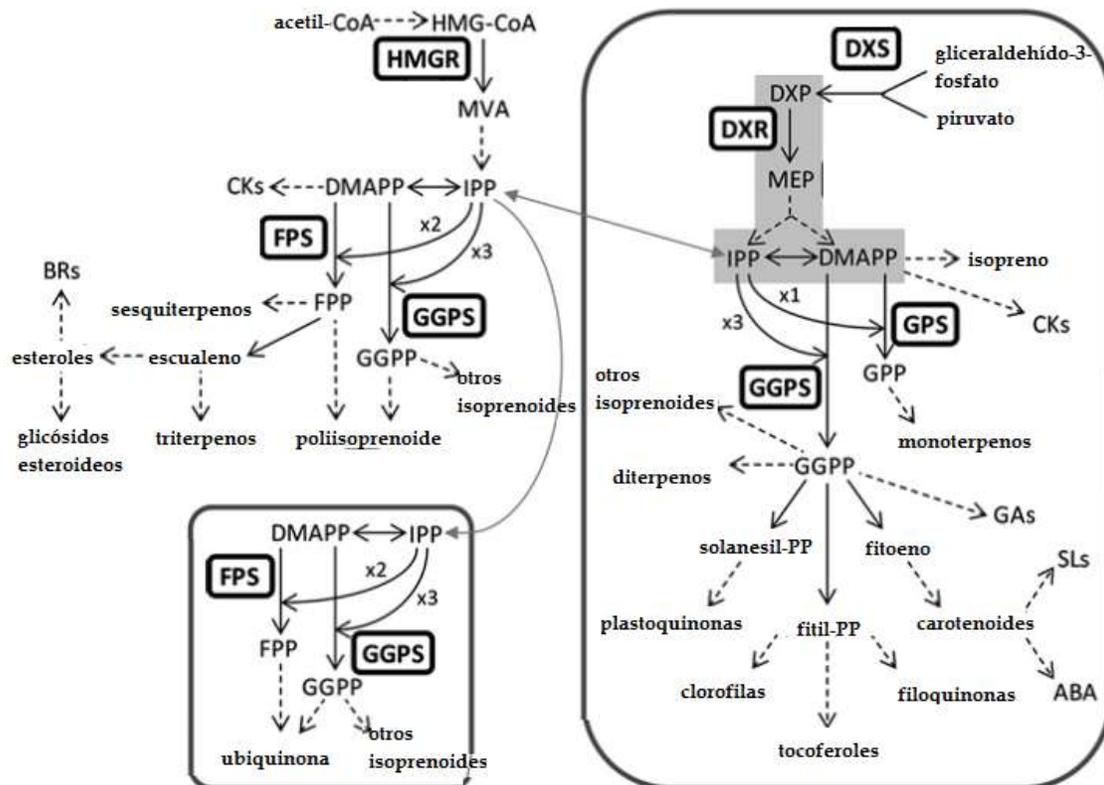


Figura 2. Esquema representativo de la biosíntesis de terpenoides en plantas. Flechas discontinuas representan múltiples pasos. ABA ácido abscísico, BRs brasinoesteroides, CKs citoquininas, DMAPP dimetilalil difosfato, DXP desoxi-D-xilulosa 5-fosfato, FPP farnesil difosfato, GAs giberelinas, GGPP geranil geranil difosfato, GPP geranil difosfato, HMG- CoA hidroximetilglutaril Coenzima A, IPP isopentenil difosfato, MEP metileritritol 4-fosfato, MVA mevalonato, SLs estrigolactonas. Enzimas involucradas en la biosíntesis de terpenoides: DXR, DXP reductoisomerasa; DXS, DXP sintasa; FPS, FPP sintasa; GGPS, GGPP sintasa; GPS, GPP sintasa; HMGR, HMG-CoA reductasa. (Modificado de Rodríguez-Concepción, 2014).

En plantas, la ciclación del 2,3-oxidoescualeno puede formar por un lado cicloartenol para la posterior síntesis de esteroides (β -sitoesterol, estigmasterol); y por otro lado producir más de 100 esqueletos de triterpenos entre los que destacan los esqueletos de olaneano (β - amirina, ácido oleanólico), ursano (α - amirina, ácido ursólico) y lupano (lupeol, betulin, ácido betulínico) (Fukushima et al., 2014, Thimmappa et al., 2014). Huang y colaboradores (2012) propusieron un esquema para la formación de

ácido betulínico, ursólico y oleanólico en *Catharantus roseus*, el cual puede observarse en la figura 3.

Los triterpenos son de especial interés por las propiedades biológicas que se han encontrado, como es que sean anticancerígenos, antivirales de la inmunodeficiencia humana (HIV), antiinflamatorios, antimicrobianos, hepatoprotectores, antioxidantes, entre otros (revisado por Kuo et al., 2009).

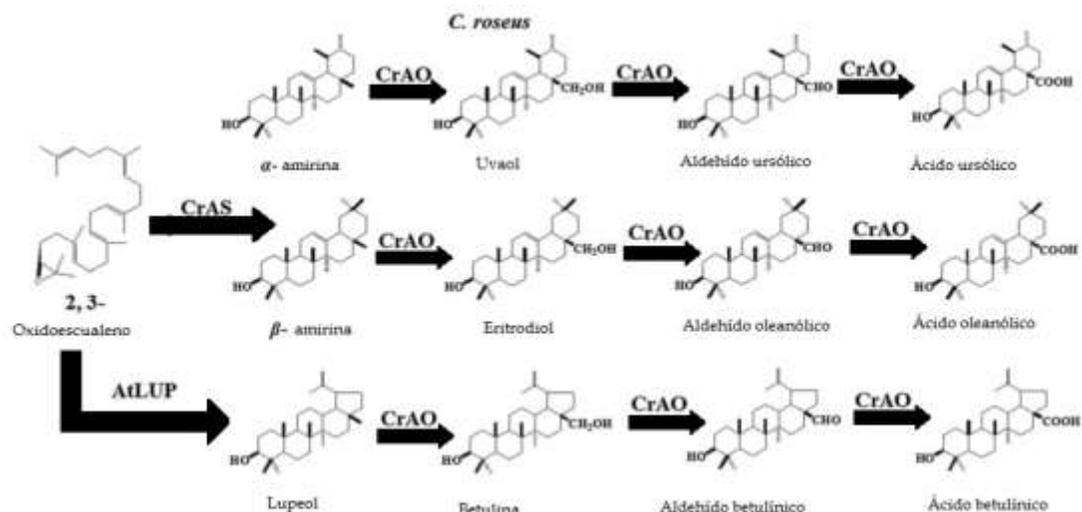


Figura 3. Propuesta de biosíntesis de ácido betulínico, ácido ursólico y ácido oleanólico en *Catharantus roseus*. Enzimas: CrAS, *C. roseus* amirina sintasa; AtLUP1, *Arabidopsis thaliana* lupeol sintasa; CrAO, *C. roseus* amirina C-28 oxidasa (Modificado de Huang et al., 2012).

2.2.1.2. Terpenoides de *J. curcas*

En diferentes partes de la planta de *J. curcas* se han aislado una diversidad de metabolitos secundarios; entre ellos fenoles, lignanos, flavonoides, alcaloides y terpenoides. Entre los compuestos terpénicos, los diterpenos encontrados en *J. curcas* pueden dividirse en seis grupos, de los cuales como se mencionó anteriormente, los ésteres de forbol son de los más relevantes, ya que su presencia en la semilla determina si es una variedad tóxica o no. Algunos ejemplos de estos compuestos son: jatrolfol, jatrolfolones A y B, factores C1-C6 *Jatropha* (Abdelgadir y Van Staden, 2013).

En los aceites de semilla de *J. curcas* se han reportado otros compuestos terpénicos como euphol, taraxerol, α- amirina, cicloartenol, lupeol, taraxasterol, que han sido

relacionados con la propiedad insecticida de la planta (Adebowale y Adedire 2006); algunos de ellos también se han reportado en hojas, tallos y raíces, además de la friedelina, β - amirina, β - sitoesterol, estigmasterol, entre otros (Pabón et al., 2012). Asimismo, se detectaron triterpenos como lupeol betulin y ácido betulínico en células en suspensión de *J. curcas* de una variedad mexicana después de la elicitación con ácido jasmónico (Zaragoza-Martínez et al., 2016).

2.3. Embriogénesis en plantas

En las plantas que producen semilla podemos encontrar diferentes tipos de embriogénesis. La embriogénesis puede definirse como el proceso por el cual una sola célula es transformada en un embrión, que establece el plan de desarrollo de la planta. La formación del embrión puede ser cigótica, somática, por microesporas, por células reproductivas femeninas y por células extra-embriónicas (Radoeva y Weijers, 2014).

Para los fines de este trabajo se describirá brevemente la embriogénesis cigótica para después ahondar sobre la embriogénesis somática.

2.3.1 Embriogénesis cigótica

Este tipo de embriogénesis se da a partir de la fusión de los gametos femeninos y masculinos. Después de la fertilización, el cigoto comienza una serie de divisiones que será distinta en gimnospermas y angiospermas; en estas últimas, la división es asimétrica, formando dos células diferentes, de las cuales la apical dará origen a la mayor parte del embrión, mientras que la basal formará el suspensor extraembrionario y la hipófisis (que se encuentra entre el suspensor y el embrión), y ambos formarán parte del meristemo de raíz (Radoeva y Weijers, 2014).

En plantas dicotiledóneas, se pueden observar diferentes estados de desarrollo del embrión: 1) estado globular, en el cual el embrión es esférico y unido al material materno por medio del suspensor; 2) estado corazón, en donde se observan los primordios de los cotiledones; 3) torpedo, el cual se forma una vez que los cotiledones se expanden, también se observa el hipocotilo y la raíz. Después continua una fase de deposición de sustancias de reserva (proteínas, lípidos y

carbohidratos), y una etapa de maduración en la cual se detiene la acumulación de sustancias de reserva y la semilla entra en estado inactivo.

2.3.2. Embriogénesis somática

En este tipo de embriogénesis, el embrión se forma a partir de la reprogramación de células somáticas hacia la vía embriogénica, sin pasar por la fusión de gametos. El desarrollo del embrión se asemeja al del embrión cigótico; tienen una estructura bipolar sin conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que pueden ser separados fácilmente de éste (Merkle et al., 1995). A pesar de que no forma suspensor sí forma una estructura parecida a esta, que se degenera durante el desarrollo (revisado por Fehér, 2014). La comparación de la embriogénesis cigótica y somática en angiospermas puede observarse en la figura 4.

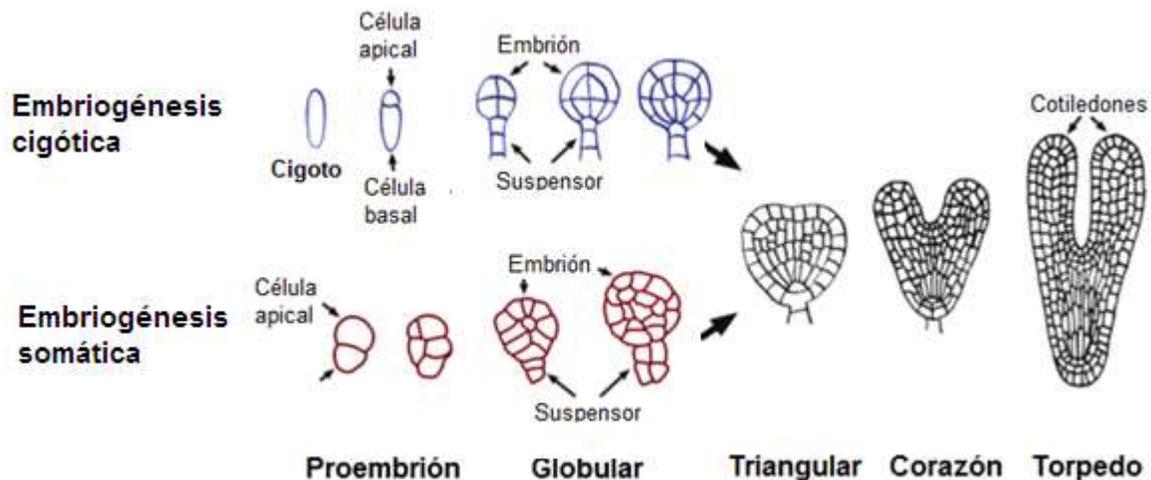


Figura 4. Comparación de embriogénesis cigótica y somática en angiospermas (Modificado de Smertenko y Bozhkov, 2014).

En cultivos *in vitro* para la formación de embriones somáticos, se distinguen los siguientes pasos: 1) iniciación de cultivo embriogénico, es decir, obtener células competentes que serán capaces de diferenciarse en embriones si reciben inductores de diferenciación; 2) proliferación de los cultivos embrionarios que puede ser en medio sólido o líquido; 3) pre-maduración que es en donde se estimula la formación de embriones; 4) maduración, en donde se permite la histodiferenciación de los embriones somáticos (Arnold et al., 2002). Sin embargo, por los cambios que surgen en el embrión, pueden dividirse en etapas como: inducción, proliferación, histodiferenciación, maduración y germinación (Merkle et al., 1995).

2.3.2.1. Inducción y proliferación

La inducción consiste en la terminación del patrón de expresión de genes que tiene el tejido de la planta para generar un estado de totipotencia, en el cual las células son competentes para recibir la señalización apropiada para proseguir con el programa de expresión de genes embriogénicos. Para este proceso, se ha observado que el estrés en cultivos *in vitro* puede inducir la formación de los embriones somáticos. Dentro de los inductores se encuentran los pertenecientes a los reguladores de crecimiento como las auxinas, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), aunque también se ha encontrado que la embriogénesis puede inducirse en ausencia de éstos; otros inductores son las altas concentraciones de sacarosa, el estrés osmótico, la radiación ultravioleta o tratamientos químicos (Fehér et al., 2014).

En el caso de los procesos involucrados en la formación de células pro-embriogénicas, en *Elaeis guineensis* Jacq., se realizó un estudio proteómico iniciándolo desde el explante; dentro de sus resultados encontraron que las proteínas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos y con el estrés eran más abundantes hacia el estado pro-embriogénico, que proteínas relacionadas con reserva (de Carvalho et al., 2014).

Para distinguir células embriogénicas de las no embriogénicas, en 1987, Gupta y Dupta desarrollaron una técnica de doble tinción con acetocarmín (utilizado para detectar glicoproteínas, cromatina y DNA); y azul de Evans (utilizado como técnica de exclusión para determinar viabilidad celular). De esta manera las células embriogénicas con un núcleo grande y con un denso citoplasma se tiñen de rojo con el acetocarmín; por el contrario, las células no embriogénicas con núcleo pequeño y vacuoladas se tiñen de azul por el azul de Evans; estas células no embriogénicas se encuentran asociadas a la formación de estructuras parecidas a suspensores derivadas de células embriogénicas (Gupta y Holmstrom, 2005).

En la proliferación, las células embriogénicas, tienen la posibilidad de desarrollarse en embriones somáticos o entrar a un nuevo ciclo de producción de estas células, siendo las auxinas un factor para la proliferación (Merkle et al., 1995).

2.3.2.2. Histodiferenciación

La histodiferenciación por su parte es el proceso por el cual la forma globular del embrión se desarrolla a la fase cotiledonar, pasando por corazón y torpedo (Merkle et al., 1995). En estudios al respecto sobre embriones somáticos, se ha observado que existen algunas similitudes en eventos bioquímicos con los embriones cigóticos, por ejemplo, se han encontrado que comparten reguladores clave para la embriogénesis, factores transcripcionales como WUSCHEL (WUS) que es un regulador del destino celular en el meristemo apical, AGAMOUS-LIKE 15 (AGL15) que se ha asociado al desarrollo y maduración de la semilla, BABY BOOM 1 (BBM1) asociado a la regulación del crecimiento de órganos primordios; así como SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE, que se ha asociado a la morfogénesis (Fehér, 2014).

En cuanto a la caracterización morfológica de los embriones somáticos, en *Cleome rosea*, que es una angiosperma dicotiledónea, se encontraron embriones globulares con presencia de protoderma formado de células en división con plano anticlinal, y debajo de éste se encontró meristemo con células vacuolizadas; hacia el centro células pequeñas con un denso citoplasma que forman el procambium. Los embriones en estado de maduración, por su parte, forman una estructura bipolar con la presencia de procambium que conectan los ápices de la raíz y los brotes (Simões, et al., 2010).

2.3.2.3. Maduración

En la maduración de embriones somáticos existen algunas similitudes en eventos bioquímicos con los embriones cigóticos, como lo es el proceso de expansión celular y la acumulación de sustancias de reserva, las cuales son utilizadas para la germinación del embrión. Dentro de estos compuestos se encuentran las proteínas de reserva; lípidos, como los triglicéridos que se acumulan en los cuerpos lipídicos en los embriones somáticos y carbohidratos como el almidón (Merkle et al., 1995).

En embriones somáticos, la expresión de proteínas de reserva es de 10% menos que los cigóticos, y también se ha observado que en embriones somáticos existe una mayor acumulación de almidón en comparación con los embriones cigóticos,

sugiriendo que los primeros no convierten eficientemente los carbohidratos en proteínas o lípidos de reserva (Merkle et al., 1995).

En cultivo *in vitro*, cuando los embriones se maduran a niveles altos de ácido abscísico (ABA por sus siglas en inglés), los embriones somáticos acumulan altos niveles de proteínas y lípidos relativos a los niveles de almidón (Revisado por Merkle, 1995).

2.3.2.4. Germinación y conversión

La germinación se refiere al desarrollo de la raíz y el brote, mientras que la conversión a la sobrevivencia y desarrollo de las plántulas en ambiente *ex vitro* (Merkle et al., 1995).

2.3.2.5. Aplicaciones de los embriones somáticos

Los embriones somáticos tienen diversas aplicaciones, dentro de las más importantes se encuentra su utilización como modelo para estudiar la embriogénesis y la totipotencialidad de las células de las plantas a nivel genético, molecular y fisiológico (Kurczynska et al., 2012).

Otro aspecto importante es para la propagación de plantas a través de éstos, ya que en diversas investigaciones se ha demostrado que las plantas de embriones somáticos crecen de manera similar a las plantas derivadas de semillas (Jiménez, 2001; Arnold et al., 2002), además de que permiten tener un mayor cultivo de unidades reproductivas, escalar el cultivo de producción, y por el hecho de que cada embrión deriva de una sola célula es factible obtener líneas celulares a través de éstos.

Con los embriones somáticos se pueden producir plantas con diferentes niveles de ploidía, semillas sintéticas, o pueden ser utilizados como herramientas para generar plantas transformadas, así como para producción *in vitro* de lípidos y proteínas (Jiménez, 2001). A pesar de las grandes posibilidades para su aplicación biotecnológica, su utilización se ha limitado por diversos factores, entre ellos la ineficiente conversión de embriones somáticos en plantas (Gomez-Garay et al., 2013).

2.3.2.6. Embriones somáticos de *J. curcas*

Existen varios reportes sobre la inducción de embriones somáticos en variedades no mexicanas de *J. curcas* en donde se han probado diversas condiciones de cultivo, incluyendo el medio basal y tipo y concentraciones de hormonas. En estos reportes, la mayor dificultad ha sido la baja eficiencia en la formación de plantas a partir de estos embriones (Jha et al., 2007; Saxena et al., 2011; Cai et al., 2011; Chong-Sang et al., 2012).

Para lograr implementar su potencial, los embriones somáticos deben ser estudiados a nivel genético, molecular, bioquímico, así como morfológico (Kurczynska, et al., 2012). Existen diversas técnicas para caracterizarlos como lo son las tinciones, los análisis genómicos, transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos.

2.4. Proteómica

La proteómica permite la investigación global de la estructura, función, abundancia, e interacción de las proteínas en un tiempo determinado; permite detectar regulaciones traduccionales y post-traduccionales. La proteómica diferencial es una herramienta poderosa para detectar cambios en la composición de proteínas en respuesta al desarrollo o estímulos ambientales (Wang et al., 2015).

En plantas, los estudios basados en proteómica son importantes para analizar los procesos de desarrollo, ya que permite la investigación global de la estructura, función, abundancia, así como las interacciones de las proteínas en un tiempo determinado. Dentro de los análisis proteómicos en plantas, el proceso de extracción es muy importante en especial por el bajo contenido de proteínas en células vegetales y una alta presencia de enzimas proteolíticas, así como metabolitos secundarios que interfieren con el análisis. La extracción de proteínas es seguida de la separación de éstas para lo cual existen una gran variedad de técnicas, sin embargo, una de las que más se utiliza es la de electroforesis en dos dimensiones (2-D) (Steen y Mann, 2004).

La electroforesis en 2-D consiste en una primera separación de proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico y después en una separación por su peso molecular; con esta técnica se obtienen mapas de geles con manchas de proteínas que después son

cortadas e identificadas por medio de espectrometría de masas (MS por sus siglas en ingles) y por herramientas bioinformáticas (Steen y Mann, 2004).

En los geles en 2-D es probable que en las manchas de proteínas que parezcan bien separadas se encuentre más de una proteína, lo que puede dificultar la interpretación de los resultados cuando se realizan experimentos de comparación, en donde se infiere que los cambios en el volumen de la mancha corresponden a los cambios en la abundancia de las proteínas. Aunque existen aproximaciones experimentales para resolver este problema como prefraccionar el proteoma, también existen aproximaciones teóricas como el índice de abundancia de proteína modificado exponencialmente (emPAI por sus siglas en ingles), desarrollado por Ishihama y colaboradores (2005), en el cual se puede determinar la cantidad relativa de cada proteína detectada, basándose en la cobertura de proteína de acuerdo a los resultados de la MS (Ishihama et al., 2005; Yan et al., 2007).

2.4.1. Estudios proteómicos de embriones somáticos

Existen algunos reportes sobre estudios basados en proteómica para el análisis de embriones somáticos; como el que se mencionó anteriormente el de *Elaeis guineensis* Jacq., al investigar las etapas primeras del desarrollo de embriones somáticos (de Carvalho et al., 2014). Otra especie estudiada es *Quercus suber*, en donde se analizaron los estados de histodiferenciación y posterior maduración; en los primeros estados se encontraron más proteínas relacionadas con la división celular que en los estados de maduración en donde se expresaron más proteínas involucradas en la expansión celular, y proteínas para la acumulación de compuestos de reserva (Gomez-Garay et al., 2013).

En especies más cercanas a *J. curcas*, como *Manihot esculenta*, se han realizado análisis proteómicos comparativos de embriones somáticos, plántulas, y raíces, en donde se encontraron 54 proteínas únicas de los embriones somáticos (Li et al., 2010). También en esta especie se han analizado los embriones somáticos secundarios, en donde se encontraron proteínas relacionadas con el metabolismo y energía en un 43%, pero también proteínas de almacenamiento (11.6%), proteínas involucradas con mecanismos de defensa (11.6%), síntesis de proteína y transcripción (7%), entre otras (Baba et al., 2008).

En *J. curcas* no se han realizado estudios en embriones somáticos, sin embargo, se ha realizado un análisis diferencial proteómico en varias fases de desarrollo de las semillas (Liu et al., 2013), en donde se encontró que proteínas relacionadas para la acumulación de lípidos se expresan en mayor abundancia hacia los estados finales de desarrollo de las semillas. En otros estudios se ha comparado el proteoma del endospermo y de los embriones en semillas, en uno se encontró que las proteínas del endospermo estaban relacionadas con enzimas de catabolismo, mientras que las del embrión con las de anabolismo (Liu et al., 2009); en otro artículo, el mismo autor reporta 66 proteínas diferentes entre ambos tejidos en donde las proteínas relacionadas con el metabolismo celular fueron las más abundantes (Liu et al., 2011).

3. Justificación

Los aspectos bioquímicos relacionados con la embriogénesis somática en *J. curcas* no se conocen, lo que ha limitado su aplicación en procesos biotecnológicos. Su caracterización en este aspecto es de gran interés para poder entender las limitantes que estuvieran relacionadas con la baja eficiencia en la formación de plantas a partir de los embriones somáticos, así como para estudios básicos relacionados con la embriogénesis en plantas, siendo la proteómica una herramienta para lograrlo.

Así mismo, el estudio de los cambios en la concentración de terpenos tales como diterpenos y triterpenos durante las fases embrionarias permitirá un acercamiento en la caracterización metabólica de los embriones.

De acuerdo a lo anterior en este trabajo se establecieron las condiciones para el desarrollo de embriones somáticos de una variedad mexicana de *J. curcas* proveniente de Veracruz. Se realizó la caracterización de dos fases de desarrollo de los embriones somáticos (pre-globular y globular) a nivel morfológico por medio de tinciones y observaciones a microscopio, bioquímico por medio de un análisis comparativo de los perfiles proteómicos y a nivel metabólico evaluando el perfil en la producción de terpenoides en las mismas fases.

4. Hipótesis

Durante el desarrollo de embriones somáticos de *Jatropha curcas* se presentará un perfil proteómico diferencial característico, además de cambios en el perfil de producción de terpenoides.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Caracterizar el perfil proteómico diferencial en dos fases de desarrollo de los embriones somáticos de *J. curcas* y evaluar los cambios en la producción de terpenoides.

5.2. Objetivos específicos

- Establecer las condiciones para un eficiente desarrollo de embriones somáticos de *J. curcas*
- Realizar un análisis morfológico de los embriones somáticos de *J. curcas*
- Analizar el perfil proteómico diferencial de los embriones somáticos de *J. curcas* en dos fases de desarrollo.
- Analizar el perfil en la producción de terpenoides de dos fases de desarrollo de embriones somáticos de *J. curcas*

6. Materiales y métodos

6.1. Material vegetal

6.1.1. Cultivo *in vitro* de plántulas de *J. curcas*

Las semillas de *J. curcas* de la variedad no tóxica fueron colectadas en 2014 por la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia en Tierra Blanca en Veracruz, México en las coordenadas latitud norte 18° 26' y longitud oeste 96° 20'.

La limpieza de las semillas se llevó a cabo de la siguiente manera: se lavaron con agua y jabón, posteriormente se sumergieron en agua destilada estéril por 20 minutos. En condiciones estériles se les quitó la testa y el tegumento, después se mantuvieron en diferentes soluciones de desinfección de acuerdo con la siguiente secuencia: 1) Etanol 70% 5 segundos, 2) Cloro 4% segundos 5 segundos, 3) Etanol 70% 1 minuto, 4) Cloro 30%, Tritón-X-100 0.01% por 1 minuto, 5) Cloro 4% por 1 minuto. Después las semillas se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril.

Las semillas se pusieron a germinar en algodón estéril en cajas Magenta (Sigma), se incubaron en una cámara Conviron CMP6010 a 30°C en fotoperiodo largo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

6.1.2. Cultivo *in vitro* de callo de *J. curcas*

Para obtener un cultivo *in vitro* de callo, se obtuvieron los hipocotilos a partir de plántulas de *J. curcas* de dos semanas de edad, se desinfectaron con el mismo método de limpieza de semillas y se sembraron en medio Murashige and Skoog (MS) adicionado con 2% de sacarosa, 1mg/L de ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2g/L de gelrite. Posteriormente, el callo obtenido se resembró en medio 2S: Medio basal MS adicionado con 3% sacarosa, 0.01 mg/L de bencilaminopurina (BAP), 1 mg/L de ácido α -naftalén acético (NAA), 10 mg/L de ácido ascórbico y 2 g/L de gelrite. Los cultivos de callo se mantuvieron en fotoperiodo largo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a 25°C. El pH de ambos medios se ajustó a 5.9 antes de esterilizarlos en autoclave.

6.1.3. Cultivo *in vitro* de embriones somáticos de *J. curcas* en suspensión

Para obtener el cultivo en suspensión se disgregó 2.5 g de callo obtenido en medio 2S en 50 mL de medio líquido 3S: MS adicionado con 3% sacarosa, 0.061 mg/L de

BAP, 0.05 mg/L de NAA y 10mg/ de ácido ascórbico. Los cultivos se mantuvieron en matraces de 250 mL y se mantuvieron en agitación constante a luz continua ($126.53 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$) a 25°C. El pH del medio se ajustó a 5.9 antes de esterilizarlo en autoclave. Una vez en suspensión se realizó una primera resiembra después de 8 días para eliminar el material vegetal de callo que no se disgregó. Posteriormente se hicieron otras dos siembras para obtener embriones somáticos de un sólo tamaño. Después de la tercera resiembra el medio se cambió por medio fresco cada semana. Los embriones somáticos pre-globulares se obtuvieron 5-7 días después de la tercera resiembra y los embriones en estado globular se colectaron 2 meses después de esta resiembra.

6.2. Tinción de embriones somáticos pre-globulares y globulares de *J. curcas*

Se realizaron observaciones con microscopio óptico y estereoscópico de cultivos de callo y de embriones somáticos pre- globulares y globulares, a éstos últimos se les realizaron cortes transversales. Para la visualización de estas muestras se utilizaron distintos tipos de tinciones:

6.2.1. Tinción diferencial con acetocarmín 2% y azul de Evans 0.5% (Gupta y Holmstrom, 2005).

Para los estados pre-globulares en medio de cultivo, se tomó 1 mL de muestra del medio de cultivo en tubos *Eppendorf* de 2 mL y se le agregó 1 mL de agua destilada estéril. La muestra se centrifugó a 5000 rpm por 3 minutos. Para la muestra de callo se tomaron 50 mg. Los embriones globulares se tomaron individualmente. Después se agregó acetocarmín al 2% y la muestra se pasó por la flama por diez segundos. Se realizó un lavado con agua destilada y la muestra se volvió a centrifugar a 5000 rpm por 3 minutos. El colorante se eliminó y como siguiente paso se adicionaron 20 μL de colorante azul de Evans al 0.5% por 30 segundos, posteriormente la muestra se lavó dos veces con agua destilada estéril centrifugando a 5000 rpm por 3 minutos. Las observaciones se realizaron en cajas de Petri desechables adicionando a la muestra 100 μL de glicerol al 50%.

6.2.2. Tinción con diacetato de fluoresceína (FDA por sus siglas en inglés).

El FDA es un indicador de la viabilidad celular, ya que emite fluorescencia verde cuando es hidrolizada por esterasas de las células vivas. Se preparó una solución stock de 0.5% en acetona. Se tomaron 100 μ L y se le agregó 900 μ L de acetona. Para las tinciones la solución se debe diluir, dos gotas en 3 mL de agua desionizada. Para las muestras de callo se utilizaron 50 mg, para los estados pre-globulares en medio de cultivo se se tomó una gota de muestra del medio de cultivo y se adicionó una gota de FDA. Las muestras se incubaron en oscuridad por 2 minutos a temperatura ambiente.

6.2.3. Tinción con cloruro de tetrazolio 0.2% (TTC por sus siglas en inglés).

Esta tinción sólo se utilizó para la observación de embriones en estado globular. El TTC al igual que el FDA es un indicador de viabilidad celular y actividad metabólica, en donde el TTC es reducido a trifenílformazan al actuar como aceptor de electrones en la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Los embriones individuales se colocaron en viales de centello de vidrio y se agregó la solución hasta cubrir los embriones. La muestra se dejó reposar por una noche en total oscuridad.

6.2.4. Tinción con lugol.

La tinción con lugol se realizó en embriones somáticos en estado globular divididos por un corte longitudinal. Este compuesto es un indicador de presencia de almidón, puesto que, al estar en contacto con éste, el lugol se introduce entre sus moléculas resultando un color azul-violeta. Para esta tinción, se dejó caer una gota de lugol en la muestra.

6.3. Electroforesis en dos dimensiones

6.3.1. Extracción de proteína

La extracción se llevó a cabo de acuerdo con Liu y colaboradores (2013) con algunas modificaciones. Para cada estado de desarrollo de los embriones somáticos (estado pre- globular y globular) se tomaron 2 g de muestra y se molieron con ayuda de nitrógeno líquido, mortero y pistilo. Por cada gramo se agregaron 1.5 mL de amortiguador de extracción, el cual estaba constituido por 50 mM/L Tris/HCl pH 8 adicionado con 250 mM/L de sacarosa, 10 mM de ácido tetraacético de etilenglicol

(EGTA), 1 mM de ditioneitol (DTT), 1% de Tritón-X-100 y una pastilla de Complete (Cocktail de inhibidores de proteasas) (Roche Life Science) por cada 10 mL de amortiguador de extracción. Las muestras se mezclaron con vórtex, después se sonicaron por 5 minutos, se dejaron reposar por 20 minutos en hielo y se volvieron a sonicar por 5 minutos. Posteriormente, para eliminar los restos celulares, se centrifugaron por 3000 g por 20 minutos a 4°C, en centrífuga Thermo Scientific modelo Survall St 16R. El sobrenadante se recuperó en tubos *Eppendorf* de 2 mL (900 µL por tubo) y se le añadió 1/8 parte de ácido tricloroacético (TCA) al 100% (112.5 µL por tubo). Las muestras se dejaron en reposo por 1 hora a -20°C. Una vez pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 10000 g por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.

La pastilla resultante se lavó dos veces con acetona fría adicionada con 20 mM de DTT y se centrifugó a 10 000 g por 5 minutos a 4°C. Se realizaron otros dos lavados sólo con acetona fría. A lo largo de estos pasos se juntaron las pastillas de cada muestra. Las muestras se secaron a temperatura ambiente por 30 minutos y posteriormente, las pastillas se hidrataron con 20 µL de agua desionizada estéril y 200 µL de DeStreak Rehydration Solution (Ge-Healthcare) adicionado con 0.5% de anfolitos pH 4-7.

Para disgregar la proteína se utilizaron pistilos, la muestra se sonicó por 5 minutos y después se congeló. Esto se repitió tres veces más con el objetivo de resuspender la mayor cantidad de proteína. Posteriormente se centrifugó a 14000 g por 5 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

6.3.2. Cuantificación de proteína

La cuantificación se realizó con 2-D Quant Kit (GE Healthcare) basado en el método de Smith y colaboradores (1985). Para la curva estándar se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) 2 mg/mL. El procedimiento 2D-Quant kit se basa en que las proteínas son precipitadas cuantitativamente (por la unión de iones de cobre a la proteína específica) dejando sustancias que interfieren en la solución. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en una solución que contiene cobre de tal manera que el cobre no unido se mide con un agente colorimétrico. La densidad de color es inversamente proporcional a la concentración de proteína.

6.3.3. Isoelectroenfoque

Se realizaron tres réplicas biológicas para cada estado de desarrollo, teniendo un total de 6 geles para el análisis. Se utilizaron tiras de poliacrilamida de 11cm con un gradiente de pH inmovilizado (IPG) de 4-7(Ge-Healthcare). Para la rehidratación se utilizaron 200 µg de proteína en 200 µL de DeStreak Rehydration Solution (Ge-Healthcare) a temperatura ambiente por 15 horas. Para separar las proteínas se utilizó el equipo Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing System (GE HEALTHCARE) con el siguiente protocolo: 200 volts (V) por 1 h, 500v por 1h, 1000v por 1h, 6000v por 2:30h y 6000 v por 5400v/h a 20°C con 50 µA por tira. Una vez terminado el isoelectroenfoque la tira se colocó en un sarcófago de rehidratación y se guardó a -80°C en ultracongelador Revco.

6.3.4. SDS-PAGE

Las tiras de isoelectroenfoque se limpiaron con agua desionizada estéril para eliminar exceso de aceite mineral y se equilibraron con amortiguadores de equilibrio marca Bio-Rad, el amortiguador I (urea 6 M, SDS 2%, amortiguador Tris/HCl 0.05M, pH 8.8, glicerol 20%, DTT 2%) se adicionó a la tira y se mantuvo en agitación por 20 minutos, posteriormente el amortiguador se decantó y se agregó el amortiguador II (urea 6M, SDS 2%, amortiguador Tris/HCl 0.05M, pH 8.8, glicerol 20%, iodoacetamida 2.5%), las tiras se mantuvieron en agitación durante 15 minutos para después eliminar el amortiguador por decantación. Por último, se limpiaron con amortiguador de corrida SDS-PAGE (25 mM Tris pH 8.8, glicina 192 mM, SDS 0.1%) antes de colocarlos en los geles de poliacrilamida para la segunda dimensión, con ayuda de la solución de agarosa OVERLAY AGAROSE (0.5% en 1X TGS w/BPB). Para la segunda dimensión se utilizaron geles prefabricados de poliacrilamida CRITERION 12.5% de 0.1 cm de grosor marca Bio-Rad.

La electroforesis se realizó en una cámara vertical CRITERION™Cell (Bio-Rad) a 160 V constante hasta que el marcador llegó al final del gel. Se utilizaron 15 µL de marcador KALEIDOSCOPE de Bio-Rad.

6.3.5. Visualización y análisis de geles 2-D

Los geles se tiñeron con Sypro Ruby (Bio-Rad). Primero las proteínas se fijaron colocando el gel en una solución de etanol 10% y ácido acético 7% por 30 minutos,

después el gel se sumergió en la solución de Sypro Ruby por 20 horas. Para desteñir los geles se volvieron a colocar en la solución fijadora por una hora.

Las imágenes de los geles se digitalizaron en Imaging System (170-8280) de BIORAD, y se procesaron en el software KODAK Molecular imaging versión 4.0. La detección de las manchas se realizó en el software ImageMaster™ 2D Platinum con los siguientes parámetros: smooth 6, saliency 350 y área mínima 100. La selección se revisó manualmente con ayuda de la herramienta 3D. Se eliminaron las manchas que no se encontraran al menos en dos geles por estado de desarrollo y se marcaron aquellas manchas que no se habían seleccionado.

6.3.6. Selección de proteínas

Se realizó la comparación de los geles de muestras de embriones pre-globulares y globulares con el promedio de la abundancia relativa de cada mancha. Para esto se tomó como parámetro el “% Vol” que calcula el software ImageMaster™ 2D Platinum, el cual indica el porcentaje de volumen que ocupa cada mancha tomando como 100% la suma de los volúmenes de todas las manchas detectadas. Con estos datos se hizo un análisis de varianza ANOVA y se seleccionaron 20 manchas (spots) de los geles de embriones en estado globular cuya significancia fuera <0.02 . Las manchas seleccionadas se cortaron del gel con ayuda de una navaja de bisturí hasta obtener piezas pequeñas de cada muestra. Estas piezas se colocaron en tubos *Eppendorf* de 1.5 mL.

6.4. Secuenciación de proteínas

Las muestras seleccionadas se procesaron de la siguiente manera para poder ser secuenciadas:

6.4.1. Deshidratación de gel.

Se añadieron 200 μ L de acetonitrilo (ACN) a cada muestra y se mantuvieron en agitación suave (7000 rpm) por 5 minutos con agitación ocasional con vórtex. Después se removió el ACN y se descartó la solución. Se repitió el paso anterior. A continuación, se secaron las piezas del gel en un concentrador de vacío Savant™ DNA SpeedVac™ Concentrator marca Thermo Scientific durante 10 minutos a 30°C.

6.4.2. Desnaturalización de la proteína.

Se añadió a cada muestra 50 μL de 10 mM de DTT disuelto en una solución de 100 mM de bicarbonato de amonio. Las muestras se incubaron a 56°C en agitación constante durante 30 minutos, después se descartó la solución. Para la alquilación de los puentes disulfuro de las proteínas se agregaron 50 μL de una solución de 100 mM de iodoacetamina disuelta en una solución 100 mM de bicarbonato de amonio. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos protegidas de la luz, posteriormente se removió la solución y se descartó.

6.4.3. Rehidratación/ Deshidratación de gel.

Las piezas de gel se rehidrataron con 100 μL de bicarbonato de amonio 100 mM incubándolas en agitación (8000rpm) por 10 minutos; posteriormente el bicarbonato de amonio fue eliminado. Las piezas del gel se deshidrataron con 200 μL de ACN dejándolo incubar en agitación por 5 minutos; la solución se removió y descartó. Las piezas volvieron a rehidratarse con 200 μL de bicarbonato de amonio 100mM y a deshidratarse con 200 μL de ACN, esto último se hizo una vez más. A continuación, se secaron las piezas del gel en un concentrador de vacío durante 10 minutos a 30°C.

6.4.4. Digestión con tripsina.

Se añadieron 50 μL de la solución de tripsina (20 ng/ μL) a cada muestra; las muestras se dejaron rehidratando por 40 minutos a 4°C. Después se removió la solución y se adicionó 50 μL de una solución de bicarbonato de amonio 50mM a las muestras y se mantuvo en baño maría a 37°C por 12 horas.

6.4.5. Extracción de proteína.

A cada muestra se le adicionó 40 μL de solución de ácido fórmico al 5% para relajar el gel y se incubaron las muestras por 10 minutos, agitando con vórtex ocasionalmente. Se recuperó el sobrenadante en un tubo *Eppendorf* de 0.6 mL. Después se añadieron 40 μL una solución con 5% ácido fórmico, 50% ACN y se incubaron las muestras por 10 minutos, agitando ocasionalmente. A continuación, se recuperó el sobrenadante y se repitió este paso. Las muestras se evaporaron hasta que quedaran aproximadamente 20 μL . Se mantuvieron a -20°C para su posterior secuenciación

6.4.6. Secuenciación de proteína.

La secuenciación de las proteínas fue realizada por el M. en C. Emmanuel Ríos Castro en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica, LaNSE, CINVESTAV-IPN del CINVESTAV, Zacatenco y se ejecutó de la siguiente manera:

De cada muestra se tomaron 9 μ L que fueron cargados en una precolumna ChromXP Trap Column C18-CL; 350 μ m X 0.5 mm, 120 Å tamaño de poro, 3 μ m tamaño de partícula (Eksigent, Redwood City CA); después cada muestra fue desalada con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en H_2O a un flujo de 5 μ L/min durante 10 min; posteriormente las muestras fueron cargadas y separadas en una columna Waters BEH130 C18; 100 μ m X 100 mm, 130 Å tamaño de poro, 1.7 μ m tamaño de partícula (Waters, Milford MA), mediante un HPLC Ekspert nanoLC 425 (Eksigent, Redwood City CA), utilizando como fase móvil A, 0.1% TFA en H_2O y como fase móvil B, 0.1% TFA en ACN, bajo el gradiente lineal: 0-3 min 10% B (90% A), 60 min 60% B (40% A), 61-64 min 90% B (10 % A), 65-90 min 10% B (90% A) con flujo durante toda la corrida de 250 nL/min. Las fracciones eluidas fueron automáticamente mezcladas con una solución de 2 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) en 0.1% de TFA y 50% ACN como matriz, "spoteadas" en una placa MALDI de acero inoxidable de 384 pozos utilizando un MALDI Ekspot (Eksigent, Redwood City CA) a una velocidad de 20s por spot con un flujo de matriz de 1.6 μ L/min. Los spots generados fueron analizados en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 plus (ABSciex, Framingham MA). Cada espectro de MS fue adquirido mediante un acumulado de 1000 disparos en un rango de masas de 850-4000 Da con una intensidad de laser de 4500. Se programó seleccionar los 100 precursores más intensos con una mínima relación señal-ruido (S/N) de 20. Los espectros de MS/MS de los precursores seleccionados fueron fragmentados activando la celda de colisión CID (Collision Induced Dissociation), y adquiridos mediante un acumulado de 3000 disparos con una intensidad de láser de 5000. Los espectros de MS/MS generados fueron comparados a través del software Protein Pilot v. 2.0.1 (ABSciex, Framingham MA) contra una base de datos de *Jatropha curcas* (Barbados nut) (descargada de Uniprot, 27,058 secuencias proteínicas) usando el algoritmo Paragon. Los parámetros de búsqueda fueron: Modificación en las cisteínas por Iodoacetamida (carbamidometilcisteína), enzima de corte tripsina y

todas las modificaciones biológicas establecidas por el algoritmo. El umbral de detección de la proteína (Unused Score) fue considerado en 2 para adquirir un 99% de confiabilidad; además, las proteínas identificadas cumplieron con un FDR local de 5% o menor. Las proteínas identificadas fueron agrupadas por el algoritmo ProGroup en el software para minimizar redundancia.

6.5. Análisis de secuencias

Debido a que la mayoría de proteínas identificadas se detectaron como no caracterizadas, se realizó una búsqueda no redundante para determinar la homología de la proteína; para ello se utilizó la herramienta BLAST en la página Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés). El análisis se hizo con secuencia obtenida de UniProt. Para determinar el peso molecular y el punto isoeléctrico teórico se utilizó la herramienta de Compute pI/Mw tool de ExPasy.

En la mayoría de los casos se encontró más de una proteína por mancha, por lo que para identificar cuál de esas proteínas era la responsable del cambio observado entre las dos muestras, se calculó por proteína el índice de abundancia de proteína modificado exponencialmente (emPAI) (Ishihama et al., 2005). La fórmula es:

$$\text{emPAI} = 10^{N_{\text{observados}}/N_{\text{observables}} - 1}$$

En donde el N observados es el número de péptidos observados experimentalmente y N observables es el número de péptidos teóricos esperados por una digestión *in silico*.

Para este trabajo, los N observados fueron todos aquellos péptidos que dieron un valor al unused score y que hubieran sido identificados por más de 95% de confianza, con modificaciones de carabamidometil y oxidación de las metioninas. Para los N observables, se realizó una digestión *in silico* por medio de la herramienta de PeptideMass de ExPASy, en donde se indicó que la digestión se hiciera con tripsina, así como que la masa fuera monoisotópica y que considerara que las cisteínas estuvieran tratadas con iodoacetamida, así como que las metioninas estuvieran oxidadas. Para el análisis no se permitieron cortes de la tripsina perdidos y el rango que se tomó tamaño fue de 850- 4000 Da. Una vez obtenido el emPAI, se procedió a calcular el porcentaje del contenido de proteína molar de acuerdo con:

$$\text{Contenido de proteína molar \%} = (\text{emPAI} / \sum(\text{emPAI})) \times 100$$

En donde $\sum(\text{emPAI})$ es la sumatoria de todos los valores de emPAI por todas las proteínas identificadas en cada mancha.

Una vez realizado este análisis se eligieron las proteínas que tuvieran más del 50% de contenido de proteína molar.

La clasificación de las proteínas se hizo en categorías funcionales y subcategorías de acuerdo en Bevan y colaboradores (1998).

6.6. Extracción de terpenoides de embriones somáticos de *J. curcas*

Se realizó de acuerdo con Khan y colaboradores (2012); los embriones somáticos pre-globulares y globulares se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron con mortero, después se liofilizaron. La extracción se realizó con 0.600 g y 0.300g de la muestra liofilizada con 10 mL de diclorometano, se mezclaron con vórtex, y después se sonicaron por 7 minutos, los pasos se repitieron. El extracto se filtró con papel filtro (marca Macherey-Nagel). El diclorometano se evaporó a baño María.

6.7. Identificación de compuestos por cromatografía en placa fina (TLC)

Las muestras se disolvieron en 1mL de metanol. Para la TLC se utilizaron placas TLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄s (Merck Millipore). La fase móvil utilizada fue: acetato etilo: acetonitrilo (3:2) (Martelanc et al., 2009). Se utilizaron los estándares β -sitosterol (S), estigmasterol (ET), ácido betulínico (AB), betulin (B), α -amirina (α -a), β -amirina acetato(β -a), lupeol (L) y ácido ursólico (U), ácido oleanólico (Ao), friedelina (FL), friedenona (FN), friedelinol (FNOL). Las muestras y los estándares se colocaron en las placas en forma horizontal en espacios de 0.7 mm. Las pruebas se realizaron en cubetas de vidrio de varios tamaños.

Una vez terminada la corrida, las placas se observaron con luz UV a dos longitudes de onda 254 nm y a 365 nm para detectar la presencia de forboles. La detección de los terpenos se realizó asperjando las placas con revelador anisaldehído-ácido sulfúrico y después calentándolas a 60° C (Wagner, 1984).

7. Resultados y discusión

7.1. Establecimiento de cultivo *in vitro* de callo de *J. curcas* y caracterización morfológica

El método utilizado para desinfectar las semillas permitió obtener plántulas de *J. curcas* de la variedad veracruzana *in vitro* (Fig.5 A y B). Las semillas germinaron en promedio a los tres días de siembra; los explantes de hipocotilos para la obtención de callo se obtuvieron de plántulas de dos semanas de edad. En un principio en este trabajo se comparó la inducción de callo a partir de cotiledones e hipocotilos, sin embargo, en los primeros no se logró la formación de callo a pesar de que, en otros reportes, sobre cultivos de embriones somáticos de *J. curcas*, el explante más utilizado es el de cotiledones (Saxena et al., 2011; Nindita et al., 2014).

Los hipocotilos utilizados como explantes en medio MS adicionado con 1mg/L de 2,4D formaron callo verde, aunque poco friable después de un mes (Fig.5C). Se ha reportado el uso de 2,4 D en diferentes concentraciones para la inducción de callo con diversos tipos de explantes de *J. curcas*, en donde la mejor concentración de este regulador de crecimiento para inducción de callo es de 0.5 mg/L (Soomro y Memon, 2007; Chong-Siang et al., 2012), incluso Soomro y Memon indican que, a esta concentración utilizando explantes de hipocotilo, los callos eran suaves y friables. Lo que podría explicar que en el presente trabajo la concentración de 1mg/L de 2,4 D provocó que el callo obtenido fuera duro. El 2,4 D se utiliza frecuentemente para iniciar cultivos de embriones somáticos, ya que permite que las células se vuelvan competentes para la formación de éstos (Jiménez y Thomas, 2005).

El callo obtenido en MS con 1mg/L de 2,4 D se subcultivó en medio 2S que contenía 3% de sacarosa, además de NAA 1mg/L, BAP 0.01 mg/L y ácido ascórbico 10mg/L. En este medio, el callo que se obtuvo fue más friable (Fig. 5 D). Se ha observado que la friabilidad de callo puede ser inducida por la composición de los reguladores de crecimiento del medio de cultivo (Bhojwani y Dantu, 2013), en este caso es probable que el balance de auxinas y citocininas mejorara la friabilidad del callo.

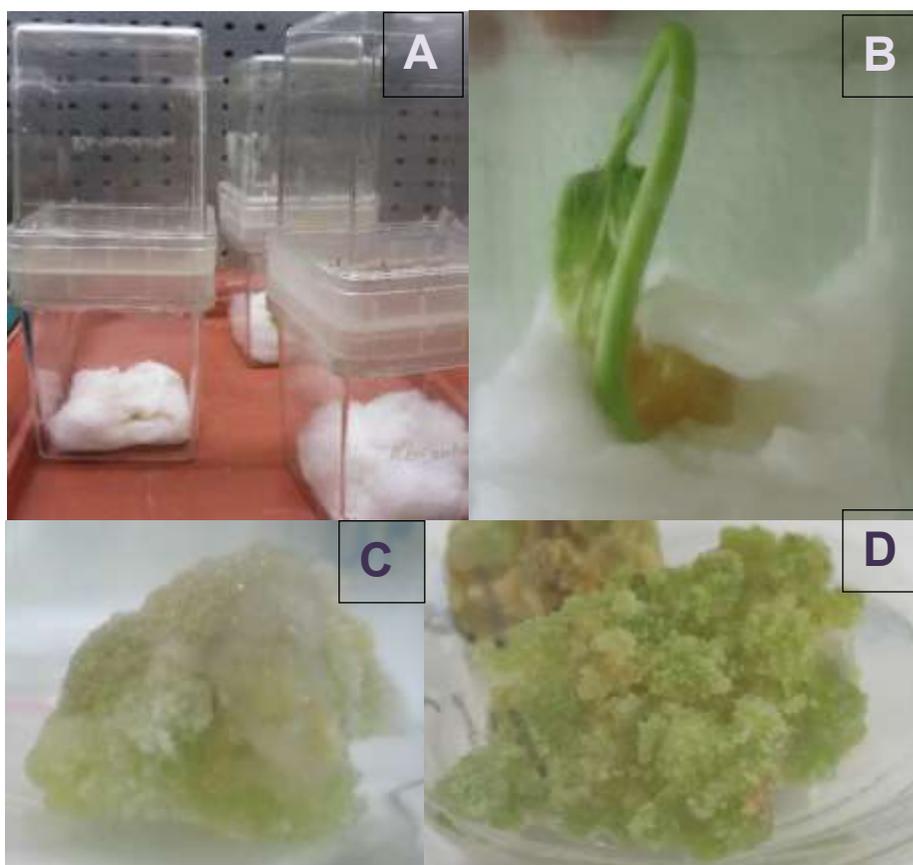


Figura 5. Cultivo *in vitro* de plántulas y callo de *J. curcas*. A) Frascos con algodón húmedo en donde se sembraron semillas de *J. curcas*. B) Plántula de *J. curcas* germinada *in vitro*. C) Callo de *J. curcas* obtenido después de un mes en medio MS adicionado con 1mg/L 2,4D. D) Callo de *J. curcas* obtenido después de un mes en medio 2S.

En las observaciones de callo en medio 2S a microscopio óptico, por medio de tinciones con FDA, se pudieron observar células de diferentes formas (redondas, alargadas) en diferentes fases de división (Fig. 6B). El FDA es un indicador de la viabilidad celular, ya que emite fluorescencia verde cuando es hidrolizada por esterasas de las células vivas, por lo que las células observadas tenían viabilidad celular.

Por medio de la tinción diferencial con acetocarmín y azul de Evans (Gupta y Durzan, 1987) se pudieron observar células de callo teñidas de rojo y azul (Fig. 6 C y D). La tinción diferencial permite diferenciar callo embriogénico del no- embriogénico; el callo no embriogénico se tiñe de azul debido a que en estas células los núcleos son pequeños y difíciles de localizar con el acetocarmín, el cual detecta glicoproteínas, cromatina y DNA (Gupta y Holmstrom, 2005). Debido a lo anterior es posible decir

que el callo del medio 2S tenían células con potencial embriogénico pero que no forman embriones en ese medio puesto que no se observaron estructuras con una organización celular definida.

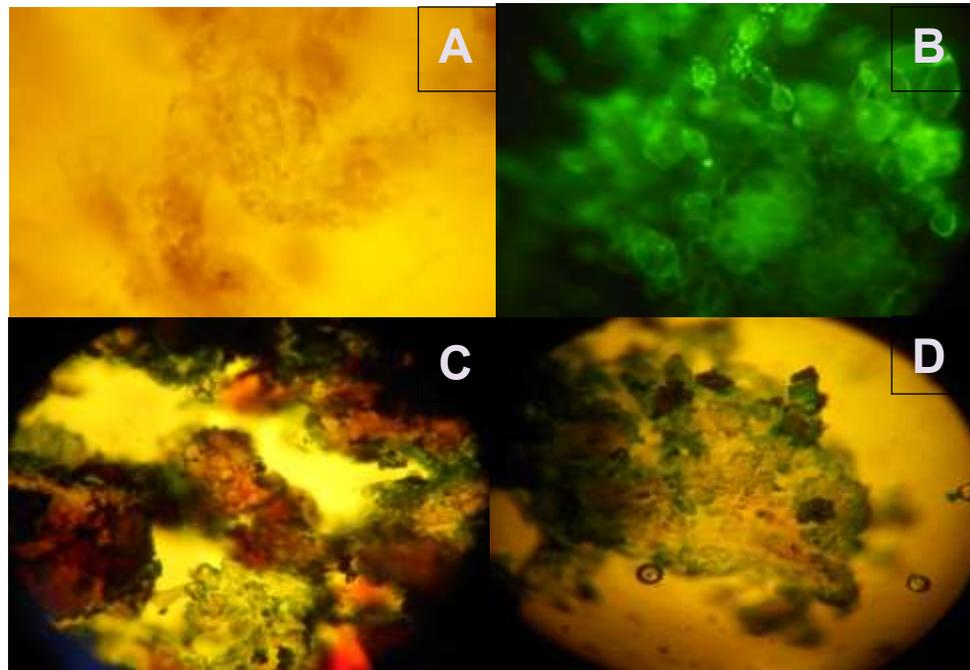


Figura 6. Fotografías de callo de un mes de edad de *J. curcas* en medio 2S observado a microscopio óptico. A) Células de callo sin tinción, 40x. B) Células de callo teñidas con FDA, 10x. C y D) Callo teñido con acetocarmín y azul de Evans, 10x.

7.2. Cultivo *in vitro* de embriones somáticos de *J. curcas* en suspensión y caracterización morfológica

7.2.1. Inicio de cultivo de embriones somáticos

Para inducir la formación de embriones en medio líquido, el callo obtenido de un mes de edad en medio 2S se disgregó en medio 3S: MS adicionado con 3% sacarosa, 0.061 mg/L de BAP, 0.05 mg/L de NAA, y 10mg/L de ácido ascórbico. Después de una semana de inicio del cultivo, se observaron agregados celulares a simple vista, los cuales al teñirse con FDA, sólo se tiñeron las células de la periferia (Fig. 7B), lo que podría deberse a que el agregado es muy grueso para que atravesase la luz del microscopio o que el propio colorante no incida. Con esta tinción también se observaron células libres, alargadas o en división celular (Fig. 7C-F). Algunas de ellas se identificaron como células embriogénicas y células no embriogénicas. En las

células embriogénicas la tinción con FDA se acumula en el citoplasma (Fig. 7E) y en las no embriogénicas en donde las células son más alargadas, la tinción se acumuló en cloroplastos (Fig. 7F). Lo mismo encontró Fehér y colaboradores (2003), en donde en protoplastos de alfalfa, el FDA sólo se detectó en cloroplastos de células alargadas y vacuoladas que no eran embriogénicas, probablemente porque las que sí son embriogénicas tienen una rápida desdiferenciación de cloroplastos que las hacen perder sus funciones fotosintéticas, además de que el citoplasma que se puede observar es más denso (Fehér et al., 2003).

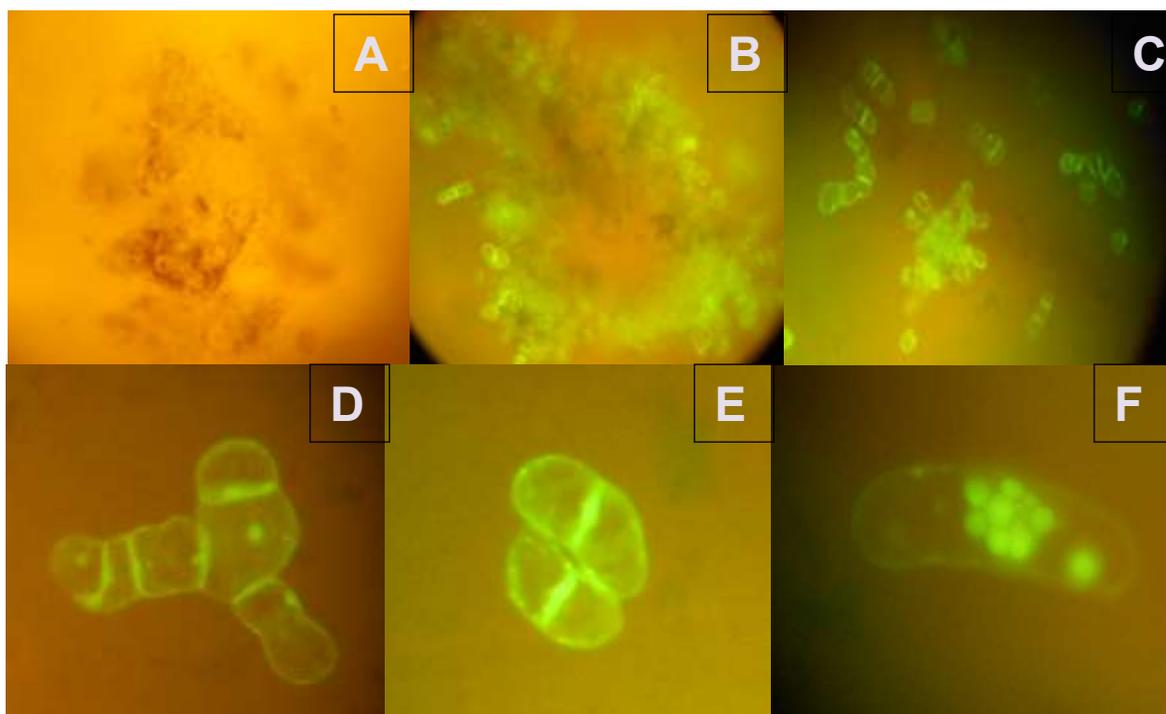


Figura 7. Fotografías de inicio de cultivo de embriones somáticos de *J. curcas* en suspensión, las células se observaron con microscopio óptico. A) Células sin tinción 10X, B-F) Células con tinción con FDA. B) Células en división y agregados celulares. C) Agregado celular, 10X. D) Agregado celular de mayor tamaño, 40x. E) Célula embriogénica, en donde el FDA se acumuló en el citoplasma, 40X. F) Célula no embriogénica, en donde el FDA se acumuló en cloroplastos, 40X.

7.2.2. Subcultivo 1

Para iniciar el primer subcultivo se eliminó el callo que no se disgregó en el medio 3S después de una semana de iniciarlo. En este subcultivo 1, después de dos semanas de haber sido iniciado fue posible observar agregados de gran tamaño a simple vista, los cuales no tenían una forma definida (Fig. 8 A). Los agregados al observarse al

microscopio óptico con tinción con FDA, sólo se tiñeron las células de la periferia (Fig. 8 B y C).

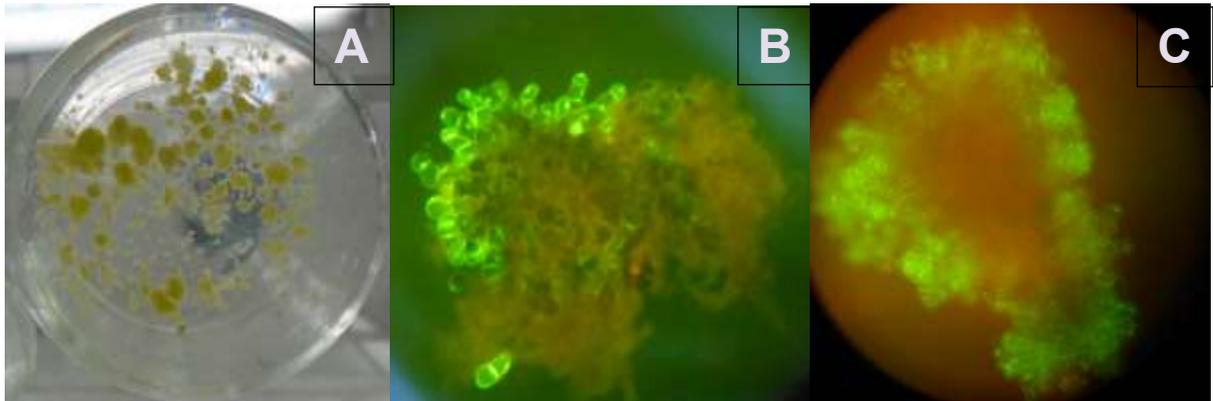


Figura 8. Fotografías de subcultivo 1 de embriones somáticos de *J. curcas* a dos semanas de haberse iniciado. A) Agregados que pueden observarse a simple vista. B y C) Agregados observados a microscopio óptico con una tinción con FDA, 10X.

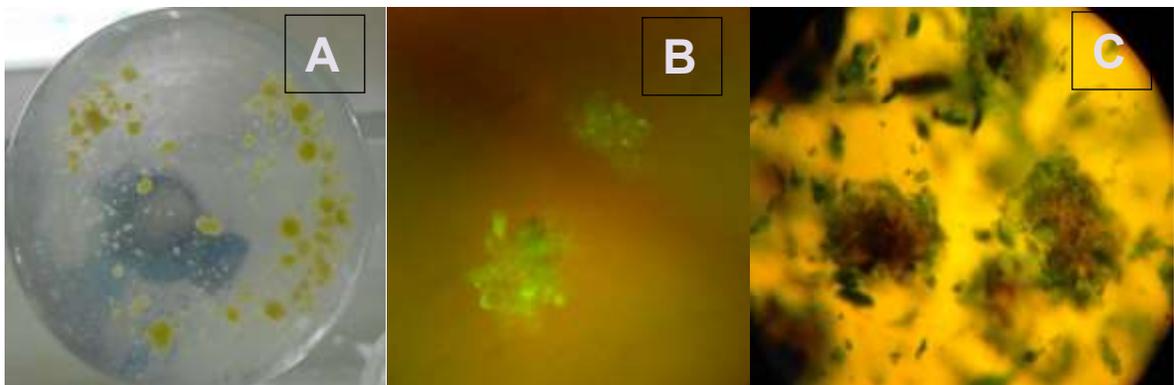


Figura 9. Fotografías de subcultivo 2 de embriones somáticos de *J. curcas* a dos semanas de haberse iniciado. A) Agregados que pueden observarse a simple vista. B) Embriones somáticos de *J. curcas* pre-globulares observados a microscopio óptico con una tinción con FDA, 10X. C) Embriones pre-globulares observados a microscopio óptico con una tinción diferencial con acetocarmín y azul de Evans, 10X.

7.2.3. Subcultivo 2

En el segundo subcultivo, después de dos semanas, los agregados empezaron a ser más regulares y pequeños y se podían observar a simple vista (Fig. 9 A), con la tinción con FDA se observó que eran viables (Fig. 9 B). Con la tinción diferencial, estos agregados se tiñeron de azul en las células externas y de rojo en las internas (Fig. 9 C). El acetocarmín tiñe DNA de células con núcleos grandes y con citoplasma denso, que se ha asociado a la tinción de tejidos embrionarios; el azul de Evans por su parte, tiñe las células vacuoladas con núcleos pequeños, que en el caso de

embriones somáticos ha sido relacionado con la tinción de suspensores (Gupta y Holmstrom, 2005). En este trabajo es probable que las células internas teñidas de rojo formen el embrión, mientras que las células que rodean a las primeras que se tiñeron de azul formen una cubierta parecida al suspensor, por lo que se denominaron embriones pre-globulares.

7.2.4. Subcultivo 3

En el tercer subcultivo, después de dos semanas se empezaron a observar los embriones somáticos en estado globular, los cuales tienen una superficie lisa, y son de color verde a simple vista (Fig. 10D y E). En este subcultivo se pudieron obtener en promedio 3000 embriones por matraz (Fig. 10B y D). La coloración verde de los embriones podría derivar de que los cultivos se mantuvieron a luz continua, en oposición a otros estudios en donde la formación de embriones somáticos se realiza en combinación de luz y oscuridad, por ejemplo, Jha y colaboradores (2007) mantuvieron sus cultivos de callos embriogénicos de *J. curcas* en 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y encontraron embriones globulares de color crema.

Fue necesario realizar al menos tres subcultivos para obtener embriones somáticos de tamaños similares, debido a que en el subcultivo 1, después de un mes, los agregados que se obtuvieron fueron de diferentes tamaños y con malformaciones (Fig. 10C). Se ha observado que, en medios en suspensión, las células individuales y en agregados se desarrollan en estructuras separadas, por lo que el subcultivo por medio de tamizaje o centrifugación permite que los cultivos puedan ser más sincronizados (Arnold et al., 2002).

La formación de embriones somáticos en estado pre-globular y globular en suspensión es de gran importancia por las posibilidades de escalamiento de cultivo. En varios reportes se ha propuesto que la formación de embriones somáticos se debe a que las células son cultivadas bajo condiciones de estrés, el cual puede ser generado al disminuir el suministro de nutrientes o de hormonas en el medio de cultivo (Fehér et al., 2014). En este trabajo el cambio en la concentración de NAA y BAP del medio 2S al medio 3S (De 1mg/L a 0.5 mg/L para NAA y 0.01 mg/L a 0.061 mg/L para BAP) pudo haber originado las condiciones de estrés. Sin embargo, otros

factores que pudieron originarlo son la luz constante y la agitación en que se mantuvieron los cultivos.

Los embriones en estado globular se tiñeron con FDA, en donde sólo se observaron de color verde las células externas (Fig. 11 A). La confirmación de los embriones globulares se obtuvo a través de la tinción diferencial con acetocarmín y azul de Evans. Como se observa en la figura 11 B, las células de alrededor se tiñeron de azul, mientras que en el centro se tiñeron de rojo (Fig. 11 B), lo que podría indicar que al igual que los embriones pre-globulares, las células centrales forman el embrión mientras que las de alrededor forman una cubierta parecida a suspensor.

Santacruz-Ruvalcaba y colaboradores (1998), en estudios de embriones somáticos con *Aztekium ritteri* en medios en suspensión, con la técnica de doble tinción con acetocarmín y azul de Evans encontraron células de suspensor teñidas de azul concentradas hacia un polo de las células embrionarias teñidas de rojo; las células del suspensor desaparecen hacia la fase globular, lo cual es diferente a lo obtenido en este trabajo, ya que como se mencionó, los embriones somáticos en estado globular se encuentran rodeados por completo de células teñidas con azul de Evans. El que las células del suspensor no se degraden hacia la formación del embrión en estado globular podría ser la causa de que los embriones no prosigan a las siguientes fases de la histodiferenciación.

Se conoce que, en el paso de embrión en estado globular a estado corazón, el crecimiento uniforme se detiene y la división celular incrementa hacia las partes que formaran los cotiledones. (Liu et al., 1993). Para que exista esta polaridad, se ha determinado que las auxinas juegan un papel muy importante. En zanahoria por ejemplo se ha observado que, si se mantienen los embriones somáticos en estado globular en un medio con 2,4 D, se inhibe la histodiferenciación o forma embriones con malformaciones. Los transportadores polares de auxina también son relevantes en este paso, puesto que se ha observado que en zanahoria la inhibición impide la transición de estado globular a corazón (Merkle et al., 1995). Es probable que en este trabajo las concentraciones remanentes de auxina en el medio de cultivo (0.05 mg/L de NAA) estén impidiendo que se forme esta polaridad y por lo tanto que las células del suspensor no se degraden hacia un polo del embrión, sino que se

mantengan rodeándolo. Sin embargo, no se puede descartar que existan moléculas que inhiban los transportadores polares de auxina, en estudios de embriones somáticos de *Brassica juncea* se ha observado que compuestos fenólicos como el ácido trans-cinámico inhiben estos transportadores resultando en embriones con fusión de cotiledones (Liu et al., 1993).



Figura 10. Fotografías de embriones somáticos en estado pre-globular, globular y con protuberancias parecidas a raíz. A) Embriones somáticos de *J. curcas* en estado pre-globular. B) Embriones somáticos de *J. curcas* en estado globular. C) Embriones somáticos de *J. curcas* de primer subcultivo después de un mes, algunos con malformaciones. D) Embriones somáticos de *J. curcas* de tercer subcultivo en estado globular. E) Embriones somáticos de *J. curcas* en estado globular de diferentes tamaños. F) Embriones somáticos *J. curcas* con protuberancia parecida a raíz.

A los embriones en estado globular, se les realizó la tinción con TTC, y se observó una coloración roja (Fig. 11C). El TTC es un indicador de la viabilidad que tiñe los tejidos de rojo cuando es reducido a trifenílformazan al actuar como aceptor de electrones en la cadena transportadora de electrones mitocondrial; por lo que, en este trabajo se puede decir que los embriones somáticos en estado globular son viables.

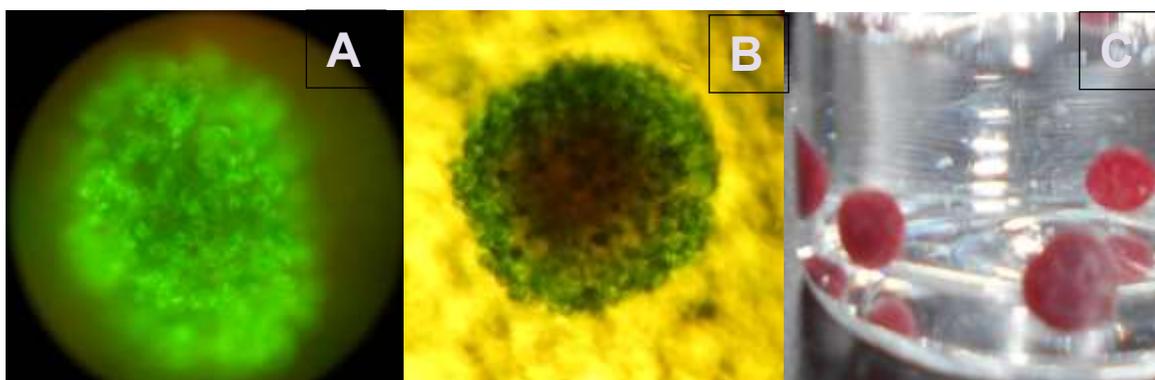


Figura 11. Fotografías de embriones somáticos de *J. curcas* en estado globular. A y B) Observados a microscopio óptico a 4X. A) Embrión globular teñido con FDA. B) Embrión globular teñido con acetocarmín y azul de Evans. C) Embriones globulares en solución de TTC observados a simple vista.

7.3. Morfología interna de embriones somáticos de *J. curcas* en estado globular.

Para determinar la morfología interna de los embriones en estado globular se realizó un corte transversal, en donde fue posible observar diferentes formas celulares dentro del embrión. Con la tinción con FDA se observó la viabilidad de las células (Fig. 12A). Con la tinción diferencial de acetocarmín y azul de Evans se observó una tinción azul de células de alrededor, y una tinción roja interna, indicando que células del suspensor se encuentran rodeando al embrión (Fig.12B).

Con la tinción con lugol se pudieron distinguir tres partes del embrión: una forma más densa en el centro en donde no se pudieron distinguir bien las células, y con células más compactas que rodean el centro (Fig. 12D), una parte del centro con acumulación de almidón (tinción con lugol) (Fig.12E), y más hacia el exterior se encontraron células en división periclinal (Fig. 12F).

Esta formación de embriones en estado globular no se parece a las encontradas por Freire (2009) para la misma especie. En otras especies, el embrión globular presenta

protoderma con división de plano anticlinal (Simões et al., 2010), lo que tampoco ocurre en los embriones de este trabajo. Como se mencionó, las capas de células que se forman alrededor del embrión y que forman el suspensor podrían estar impidiendo que el embrión prosiga las siguientes fases de histodiferenciación.

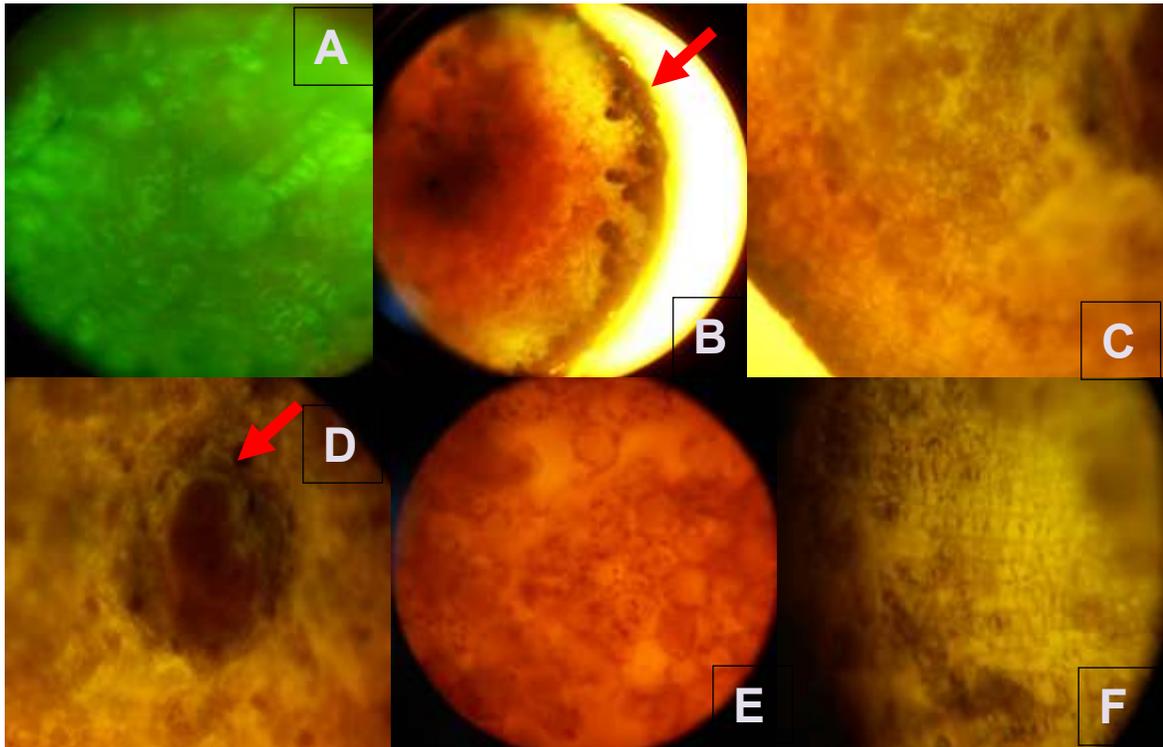


Figura 12. Fotografías de corte transversal de embriones somáticos de *J. curcas* en estado globular. A y B) Observación a microscopio óptico a 4 x. A) Tinción con FDA. B) Tinción diferencial con acetocarmín y azul de Evans, la flecha indica las células que se tiñeron de azul y que forman el suspensor. C-F) Tinción con lugol. D) Células centrales del embrión, 40X, la flecha indica las células compactas que rodean el centro denso del embrión. E) Células de en medio con gránulos de almidón 40x. F) Células más distales al centro con división periclinal.

7.4. Caracterización morfológica de los embriones somáticos con protuberancias

En el subcultivo 3 se encontraron de 3-6 embriones con una protuberancia parecida a una raíz por matraz (Fig. 10F). Estos embriones se colocaron en medio sólido Freire (2009) (MS1/2 + BAP 0.8 mg/L + ácido indol acético (IAA) 0.1 mg/L + adenina 2.5 mg/L + glutamina 250 mg/L + giberelina (GA) 3mg/L + 4% sacarosa) para observar si podría existir un cambio en su desarrollo, no obstante, después de un mes sólo se obtuvo callo (No se muestran resultados). Estos embriones se tiñeron

con TTC, las partes apicales se tiñeron de rojo por lo que sólo en esos lugares existe actividad metabólica (Fig. 13A).

Simões y colaboradores (2010) reportaron en *Cleome rosea* Vahl embriones somáticos en estado de maduración parecidos a los embriones con protuberancia encontrados en este trabajo, en donde observaron el procambium; al realizar un corte longitudinal a los embriones también pudo observarse esta estructura (Fig. 13 C-E). El que se presentaran este tipo de embriones pudiera estar relacionado con el agotamiento de los componentes del medio de cultivo debido a la gran cantidad de embriones por matraz, en particular las hormonas, las cuales pudieron haberse agotado antes del cambio de medio por medio nuevo. Se ha observado que, en otros cultivos de embriones somáticos, la ausencia de hormonas, en especial las auxinas, permite la histodiferenciación (Zimmerman, 1993; Jafari et al., 2015).

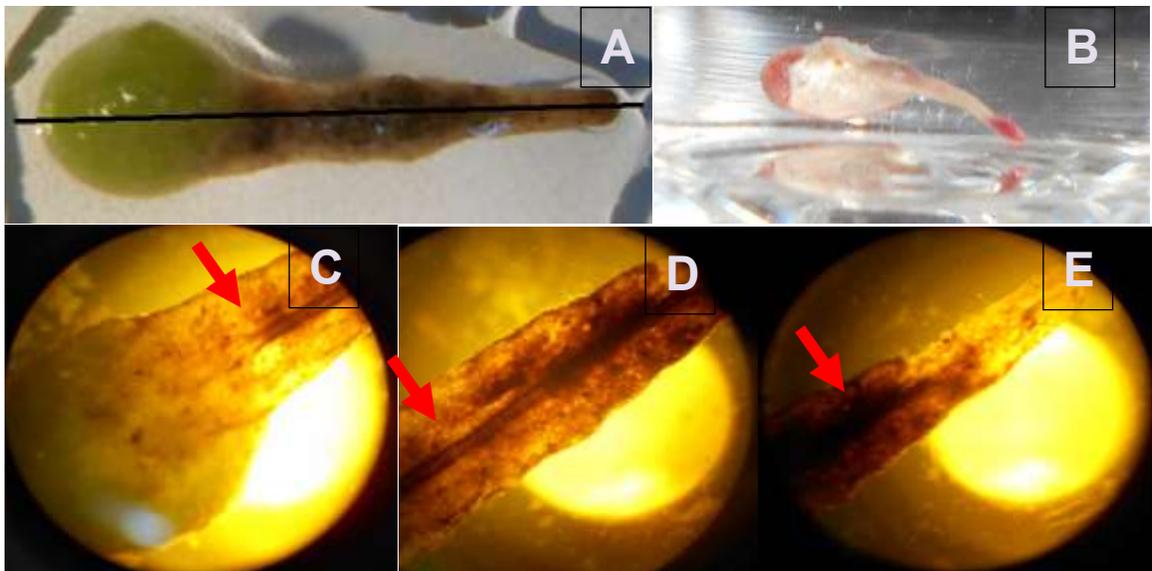


Figura 13. Fotografías de embriones con protuberancia parecida a raíz. A) Embrión con protuberancia parecida a raíz sin tinción observadas a microscopio estereoscópico. B) Embrión con protuberancia parecida a raíz teñida con TTC. C-E) Observación con microscopio estereoscópico de corte longitudinal del embrión con protuberancia parecida a raíz, 40 X. La flecha indica el procambium.

7.5. Perfil proteómico de embriones somáticos pre-globulares y globulares

La colecta de embriones somáticos para estos experimentos se realizó en el subcultivo 3; para los embriones somáticos pre-globulares la colecta se hizo a los cinco días de inicio del subcultivo; para los de estado globular fue dos meses

después. La extracción de proteínas se llevó a cabo de acuerdo al protocolo utilizado por Liu y colaboradores (2013), quienes realizaron un análisis proteómico sobre el desarrollo de semillas de *J. curcas*. En este trabajo se cambiaron algunos parámetros, como el amortiguador de extracción, ya que se aumentó la molaridad y el pH, además se cambió el uso de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF por sus siglas en inglés) por un cocktail de inhibidores de proteasas. Al final de los experimentos se pudieron obtener manchas de proteínas reproducibles en las dos fases del desarrollo de embriones somáticos de *J. curcas* (estado pre-globular y globular), en un rango de pH de 4-7, de una masa de 10 a 100 kDa. Las manchas detectadas pueden observarse en las imágenes de los geles en la figura 14.

Al analizar los geles por Image MasterPlatinum se localizaron (654±41) manchas de proteínas para el embrión en estado-pre globular y (552±30) manchas de proteínas para el embrión en fase globular (Fig. 14). Para el análisis estadístico de ANOVA se utilizó el porcentaje de volumen de cada mancha, el cual indica el volumen relativo del total del volumen que ocupan todas las manchas en el gel. Se detectaron 108 manchas con cambios significativos ($p < 0.02$). Cincuenta y seis manchas fueron únicas para uno u otro estado de desarrollo, 52 se compartieron, pero 50 cambiaron entre un estado y otro en más de 1.5 veces; y en 2 manchas, el cambio fue menor de 1.5 veces (Tabla 2). Por comodidad, el número de la mancha indica el número asignado por el software ImageMaster™ 2D Platinum.

De las manchas únicas, los embriones somáticos pre-globulares presentaron una mayor diversidad de manchas (66%) en comparación a los globulares (34%), lo que podría indicar que los embriones somáticos en estado pre-globular necesitan una mayor síntesis de proteínas para la transición hacia el estado globular. En otros estudios se ha observado que en procesos de reprogramación celular de tejido somático a tejido embriogénico se sintetizan más proteínas (de Carvalho et al., 2014).

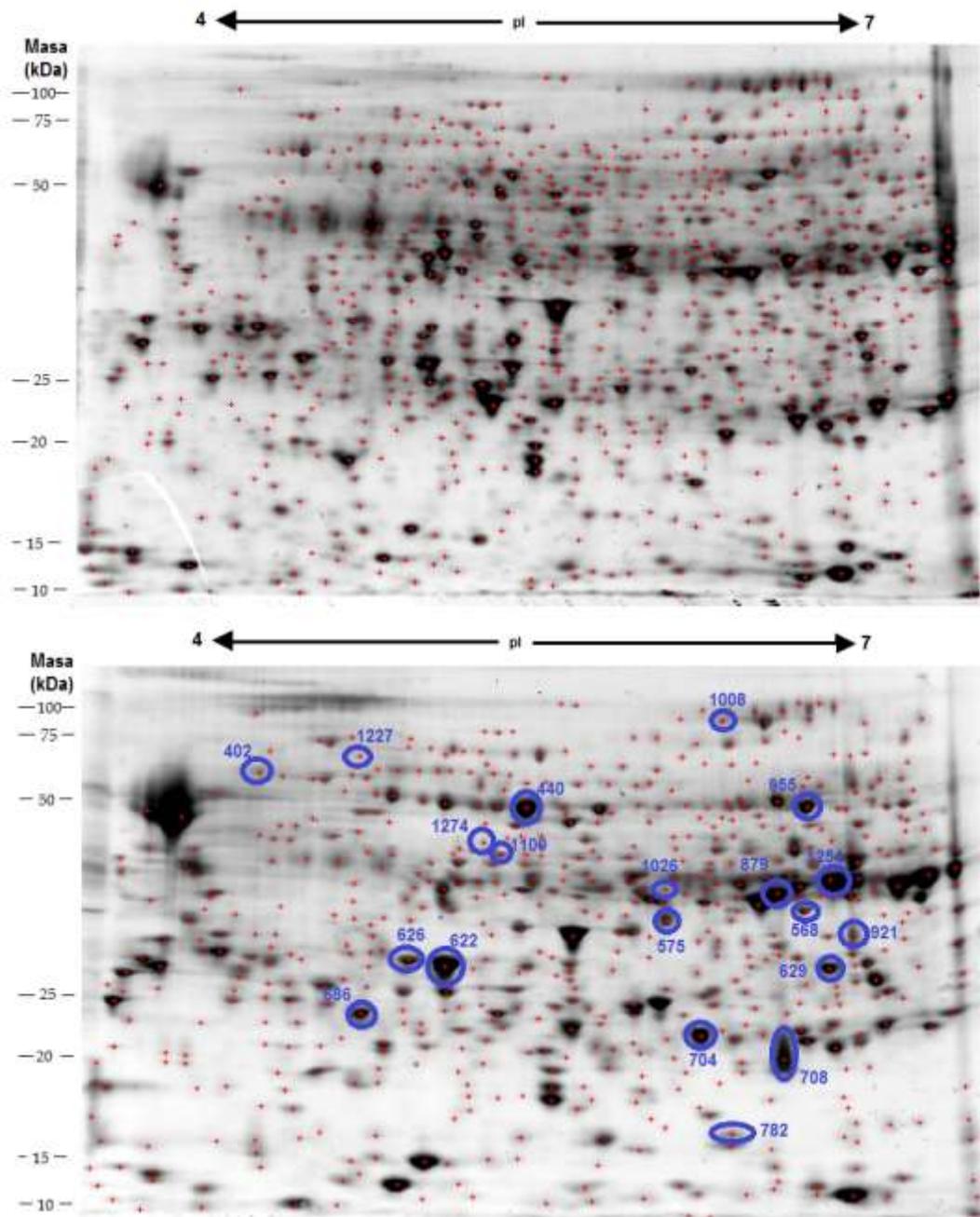
Por otro lado, los embriones en estado globular tuvieron más proteínas que se sobreexpresaron (68%) en comparación con los pre-globulares (32%), lo que podría indicar que una vez diferenciado el embrión necesita menos proteínas nuevas pero una mayor acumulación de las que tenía.

Tabla 2. Comparación de número de proteínas únicas y con >1.5 veces de cambio entre embriones somáticos de *J. curcas* en estado pre-globular y globular

Estado desarrollo	Núm. de proteínas únicas	Núm. de proteínas con >1.5 veces de cambio
Embriones somáticos estado pre-globular	37	16
Embriones somáticos estado globular	19	34
Total	56	50

En esta tabla se muestra una comparación entre los estados de desarrollo y el número de proteínas únicas que se detectaron, así como el número de proteínas que se sobreexpresaron en más de 1.5 veces en un estado de desarrollo con respecto al otro. El análisis comparativo es resultado de las 108 manchas que se expresaron diferencialmente con $p < 0.2$ de acuerdo con el análisis de ANOVA que se realizó en el software ImageMasterTM 2D Platinum. En la tabla no se muestra el registro de dos manchas debido a que el número de veces de cambio fue menor de 1.5 veces.

De las manchas diferentes significativamente, se eligieron 20 para su secuenciación, 8 de las cuales se encontraban sólo en embriones somáticos en estado globular (las imágenes de las manchas pueden observarse en el Anexo B), y 12 se encontraban sobreexpresadas > 1.5 veces en estos embriones con respecto a los pre-globulares (las imágenes de las manchas pueden observarse en el Anexo A). El porcentaje promedio del volumen por mancha puede observarse en la figura 15, en donde en el caso de las manchas sobreexpresadas se hace la comparación entre los estados pre-globulares y globulares.



A

B

Figura 14. Comparación de perfil proteómico entre embriones somáticos de *J. curcas* en estado pre-globular A) y globular B). Las imágenes muestran los geles en 2-D representativos de cada estado de desarrollo; para cada estado se hicieron tres réplicas biológicas. Las cruces rojas indican las manchas detectadas, en promedio se detectaron 654 ± 41 manchas de proteína para el embrión en estado-pre globular y 552 ± 30 para el estado globular. Los círculos azules representan las manchas que se seleccionaron para secuenciación, los números son los mismos con los que software ImageMaster™ 2D Platinum identificó cada mancha. Se usaron tiras de isoelectroenfoco de 11 cm con rango de pI 4-7. Los geles se tiñeron con SyproRuby.

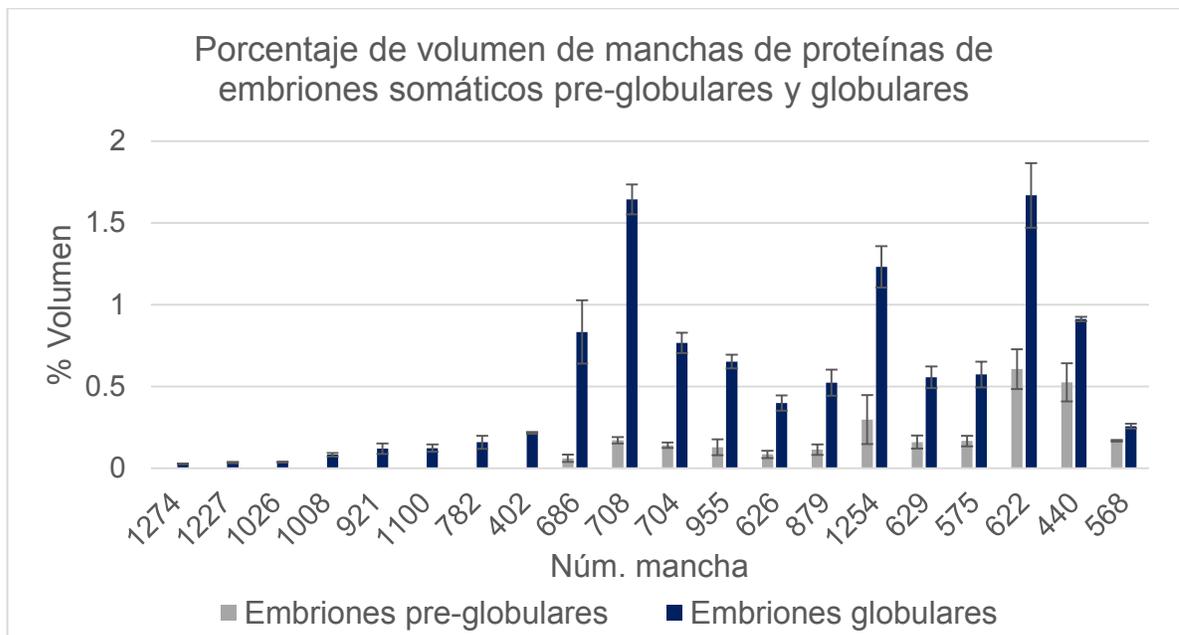


Figura 15. Porcentaje de volumen de manchas de proteínas de embriones somáticos de *J. curcas* en estado pre-globular y globular. Las primeras 8 manchas son únicas de los embriones somáticos globulares. En las 12 manchas restantes se hace la comparación entre el % de volumen entre los embriones somáticos en estado pre-globular y globular. El % volumen representa la media de tres réplicas independientes e indica en porcentaje relativo que ocupa la mancha con respecto al 100% que ocupa la suma del volumen de todas las manchas en el gel. El núm. mancha indica el número con que se identificó la mancha en el software Image MasterPlatinum.

7.6. Identificación de proteínas de embriones somáticos en estado globular

Las 20 manchas elegidas se secuenciaron por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. En el 85% de las manchas se detectaron más de una secuencia de proteína por mancha, por lo que al final se obtuvieron 68 secuencias.

Se realizó un BLAST de todas las secuencias de proteínas a través de la página de NCBI. Sesenta y un proteínas fueron Predichas para *J. curcas*, las otras proteínas se identificaron por homología con especies de *Theobroma cacao* (3 proteínas), *Ziziphus jujuba* (2 proteínas) y *Ricinus communis* (1 proteína). Sólo una proteína no pudo ser identificada, la cual correspondió con la mancha 402 proteína 6 (ver columna “organismo” de la Tabla 3). El que la mayoría de las proteínas fueran Predichas para *J. curcas* está ligado a que el genoma de esta especie ha sido secuenciado (Genomeweb,2010; Sato et al., 2011).

En especies con genomas que contienen 10^4 a 10^5 genes es posible que produzcan de 10^5 a 10^6 proteínas distintas debido a modificaciones que sufren las proteínas, por lo que es común que en análisis proteómicos en dos dimensiones se encuentren más de una proteína por mancha (Yang et al., 2013). Por ejemplo, Noah y colaboradores (2013) al comparar los perfiles proteómicos de embriones somáticos y cigóticos de *Theobroma cacao L.*, encontraron que en 19 de 32 proteínas secuenciadas se encontraban más de una proteína por mancha (Noah et al., 2013). Esta condición hace difícil determinar qué proteína es la que está contribuyendo al cambio de porcentaje de volumen que se observa, lo que a su vez no permite identificar la actividad biológica característica de los sistemas a comparar, en este caso los dos estados de desarrollo de los embriones somáticos de *J. curcas*.

Yang y colaboradores (2006) desarrollaron una guía para realizar análisis de proteínas en geles de dos dimensiones utilizando el enfoque emPAI, lo que les permitió determinar qué proteína era la que estaba determinando el cambio cuando se encontraba más de una por mancha. El enfoque había sido desarrollado por Ishihama y colaboradores (2005) para determinar la abundancia de cada proteína encontrada en un lisado celular.

Por lo anterior, en este trabajo se utilizó el enfoque emPAI, lo que permitió definir las proteínas que determinaban el porcentaje de volumen por mancha. De manera que al final del análisis se contemplaron 22 proteínas para la discusión. Esto debido a que en 18 manchas se encontró que sólo una proteína tenía el % molar mayor de 50 %. En las manchas 402 y 1254 como no existía una proteína que tuviera altos índices de % molar, se decidió tomar como válidas las dos proteínas con los valores más elevados (ver columna % molar de Tabla 3).

En la mancha 575 las dos secuencias de proteína se identificaron como cisteína sintasa, y en enfoque emPAI permitió distinguir entre la isoforma más utilizada por el embrión somático en estado globular (Tabla 3).

Tabla 3. Proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF de embriones somáticos en estado globular de *J. curcas*

Núm. de mancha	Núm. de proteína	Núm. de acceso ^a	Nombre de proteína ^b	Ubicación celular ^c	Organismo	Unused score	% Cobertura ≥ 95%	Núm. de amino-ácidos	Masa (kDa)/ pI experimental	Masa (kDa)/ pI teórico ^e	Núm. Veces de cambio ^f	emPAI	%molar
402	1	NP_001295629.1	Proteína disulfuro isomerasa	--	<i>Jatropha curcas</i>	26.7	34.33	504	62.5/4.5	56.625/4.85	---	0.951	41.83
	2	XP_002521706.1	Predicha: Proteína tipo DSK2a con dominio de unión a ubiquitina	--	<i>Jatropha curcas</i>	10.07	17.32	560		58.928/4.76		0.931	40.92
	3	XP_012082810.1	Predicha: Probable pectinaesterasa/ Inhibidor 7 pectinasterasa	--	<i>Jatropha curcas</i>	4.44	7.37	556		60.988/8.98		0.292	12.82
	4	XP_007019162.1	Proteína tipo dominio N-terminal dipeptidil peptidasa (DPP6)	--	<i>Theobroma cacao</i>	3.79	2.00	699		77.187/6.15		0.101	4.43
	5	XP_007028830.1	Superfamilia de proteínas con motivo dedo de zinc RING/FYVE/PHD, isoforma 2	--	<i>Theobroma cacao</i>	3.21	1.40	931		104.862/5.19		0.000	0.00
	6	KDP44313.1	Proteína hipotética	--	<i>Jatropha curcas</i>	3.19	7.84	204		23.561/5.23		0.000	0.00
	7	XP_012072418.1	Predicha: Proteína dominio-indeterminado 5	C	<i>Jatropha curcas</i>	3.11	1.72	582		63.417/9.14		0.000	0.00
	8	XP_007014010.1	Superfamilia de proteínas hidrolasas nucleosido trifosfato lazo-P con motivo Clp-N doble	--	<i>Theobroma cacao</i>	2.86	1.24	1052		115.219/8.32		0.000	0.00
440	1	XP_012075690.1	Predicha: Subunidad beta de la ATP sintasa	M	<i>Jatropha curcas</i>	79.92	80.75	561	48-50/5.4	60.153/6.13	1.73	3.417	62.25

	2	XP_01 209039 7.1	Predicha: Enolasa	--	<i>Jatropha curcas</i>	20.48	40.67	445		47.979/ 5.59		1.404	25.58
	3	XP_01 206879 5.1	Predicha: Alanina aminotransferasa tipo 2	--	<i>Jatropha curcas</i>	18.46	21.34	539		59.252/ 6.12		0.668	12.17
	4	XP_01 209039 3.1	Predicha: Tipo enolasa	--	<i>Jatropha curcas</i>	2	31.69	445		48.135/ 6.17		0.000	0.00
568	1	XP_01 208027 6.1	Predicha: Malato deshidrogenasa	C	<i>Jatropha curcas</i>	17.72	23.79	412	36/6.4	43.252 82/8.61	1.53	0.778	100.00
575	1	XP_01 208920 8.1	Predicha: Cisteína sintasa	--	<i>Jatropha curcas</i>	37.2	56.00	325	34.9/5. 9	34.252/ 5.83	2.47	2.652	65.91
	2	XP_01 206963 1.1	Predicha: Cisteína sintasa	--	<i>Jatropha curcas</i>	10.95	40.00	325		34.327/ 5.82		1.371	34.09
622	1	XP_01 207912 3.1	Predicha: Proteína 1 potenciadora productora de oxígeno	C	<i>Jatropha curcas</i>	48	62.05	332	28.4- 32.66/5 .2	35.108/ 5.87	2.75	3.870	71.41
	2	XP_01 207454 7.1	Predicha: Pirofosfatasa inorganica soluble 6	C	<i>Jatropha curcas</i>	16	33.22	304		33.875/ 6.26		0.848	15.65
	3	XP_01 207925 5.1	Predicha: Cafeoil- CoA O- metiltransferasa tipo 1		<i>Jatropha curcas</i>	6.08	12.81	281		31.692/ 5.21		0.701	12.94
626	1	XP_01 207912 3.1	Predicha: Proteína 1 potenciadora productora de oxígeno	C	<i>Jatropha curcas</i>	40.02	62.05	332	32/5	35.108/ 5.87	4.71	2.875	92.13
	2	XP_01 207454 7.1	Predicha: Pirofosfatasa inorganica soluble 6	C	<i>Jatropha curcas</i>	6.03	13.16	304	32/5	33.875/ 6.26		0.166	5.32
	3	XP_01 206603	Predicha: ATP sintasa subunidad	M	<i>Jatropha curcas</i>	2	2.34	555	32/5	59.666/ 6.06		0.080	2.56

		8.1	beta tipo mitocondrial										
629	1	XP_01 206683 8.1	Predicha: Proteína tipo secoisolariciresinol deshidrogenasa	--	<i>Jatropha curcas</i>	25.7	58.52	270	31.12/6 .5	28.182/ 6.31	3.47	2.162	75.05
	2	XP_01 208622 0.1	Predicha: S- formilglutación hidrolasa	--	<i>Jatropha curcas</i>	6	13.73	284		31.780/ 6.25		0.540	18.74
	3	XP_01 207436 9.1	Predicha: Proteína tipo secoisolariciresinol deshidrogenasa	--	<i>Jatropha curcas</i>	2	6.07	280		29.457/ 5.48		0.179	6.21
686	1	XP_01 208405 0.1	Predicha: Proteína 8 unida a clorofila a-b	C	<i>Jatropha curcas</i>	13.63	27.31	271	24/4.8	29.307 03/8.58	13.68	0.874	67.19
	2	NP_00 129562 4.1	Superóxido dismutasa (Mn)	M	<i>Jatropha curcas</i>	2.05	6.70	239		26.356 66/6.71		0.000	0.00
	3	NP_00 129567 8.1	Glutación S- transferasa tipo DHAR2	--	<i>Jatropha curcas</i>	2.04	4.72	212		23.507 30/5.91		0.194	14.90
	4	XP_01 209113 3.1	Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa [NAD(+)] 2, isoforma 2	C	<i>Jatropha curcas</i>	2	7.28	426		45.824 87/9.29		0.000	0.00
	5	XP_01 208271 6.1	Glutación S- transferasa tipo PARB	--	<i>Jatropha curcas</i>	2	5.61	214		24.012 63/6.24		0.233	17.91
704	1	XP_01 207208 0.1	Predicha: Proteína tipo 1 del complejo captador de luz unida a clorofila a-b	--	<i>Jatropha curcas</i>	5.78	17.36	265	22.4/6	28.107 07/5.29	5.43	0.259	100.00
708	1	XP_01 207418 5.1	Predicha: Proteína 2 potenciadora productora de oxígeno	C	<i>Jatropha curcas</i>	43.32	57.20	264	20- 22/6.34	28.513/ 8.62	9.59	0.931	66.65
	2	NP_00	Superóxido	M	<i>Jatropha</i>	4.14	12.55	239		26.363/		0.233	16.67

		129562 4.1	dismutasa (Mn)		<i>curcas</i>					6.71			
	3	XP_01 208271 6.1	Glutación S- transferasa tipo PARB	--	<i>Jatropha curcas</i>	2.22	5.61	214		24.028/ 6.24		0.233	16.67
782	1	XP_01 207141 1.1	Predicha: Subunidad de hierro-azufre del complejo citocromo b6-f	C	<i>Jatropha curcas</i>	13.72	37.44	227	16/6.1	24.277 12/8.22	----	0.585	77.90
	2	XP_01 206940 2.1	Predicha: proteína de división de plastos tipo PDV2	--	<i>Jatropha curcas</i>	2	5.02	239		26.817 03/9.24		0.166	22.10
	3	XP_01 209276 1.1	Predicha GTPasa ERA	M	<i>Jatropha curcas</i>	2	1.64	428		48.767 42/6.41		0.000	0.00
879	1	XP_01 206995 1.1	Predicha: Lactato deshidrogenasa B	--	<i>Jatropha curcas</i>	20	31.14	350	36.5- 37.7/6. 3	37.767/ 6.40	4.57	0.585	59.27
	2	XP_01 206644 1.1	Predicha:Isoenzima citoplásmica fructosa bifosfato aldolasa	Cit	<i>Jatropha curcas</i>	10.56	22.35	358		38.531/ 6.92		0.292	29.55
	3	NP_00 129295 2.1	Catalasa isoenzima 2	--	<i>Jatropha curcas</i>	2.07	2.24	492		57.304/ 6.68		0.110	11.18
921	1	XP_01 207429 2.1	Predicha: Proteína tipo secoisolariciresinol deshidrogenasa	--	<i>Jatropha curcas</i>	30.01	68.36	275	35/6.6	28.882/ 6.32	----	5.105	100.00
	2	XP_01 207442 1.1	Predicha: Proteína inactivadora de ribosoma tipo cucurmosina	--	<i>Jatropha curcas</i>	5.63	12.17	304		34.374/ 4.87		0.000	0.00
	3	XP_01 207436 8.1	Predicha: Proteína inactivadora de ribosoma tipo cucurmosina	--	<i>Jatropha curcas</i>	2.57	13.55	251		28.17/ 8.60		0.000	0.00

	4	XP_01 209276 1.1	Predicha: GTPasa ERA	M	<i>Jatropha curcas</i>	2	1.64	428		48.798/ 6.41		0.000	0.00
955	1	XP_01 209039 3.1	Predicha: Tipo enolasa	--	<i>Jatropha curcas</i>	42.64	53.48	445	48- 50/6.4	48.135/ 6.17	5.06	1.683	65.32
	2	XP_01 207116 6.1	Predicha: Glutación reductasa	Cit	<i>Jatropha curcas</i>	8	10.87	497		53.411/ 6.08		0.369	14.32
	3	XP_01 207666 5.1	Predicha: Familia 2 aldehído deshidrogenasa miembro C4	--	<i>Jatropha curcas</i>	7.4	10.32	504		54.731/ 5.92		0.269	10.44
	4	XP_01 208035 5.1	Predicha: UDP- glucosa 6 deshidrogenasa tipo 1	--	<i>Jatropha curcas</i>	2.85	2.08	480		52.913/ 6.23		0.110	4.28
	5	XP_01 206747 4.1	Predicha: Shikimato O-hidroxicinamoil- transferasa	--	<i>Jatropha curcas</i>	2.06	3.94	431		47.828/ 6.27		0.145	5.63
1008	1	XP_01 208644 0.1	Predicha: Proteína 1 hierro-azufre de la NADH deshidrogenasa (ubiquinona)	M	<i>Jatropha curcas</i>	4.49	3.37	742	83/6.1	80.708/ 6.56	---	0.155	100
1026	1	XP_01 206995 1.1	Predicha: L- Lactato deshidrogenasa B	--	<i>Jatropha curcas</i>	8	19.14	350	37/5.9	37.767/ 6.40	----	0.585	54.12
	2	XP_01 207855 3.1	Predicha: Malato deshidrogenasa	M	<i>Jatropha curcas</i>	7.15	10.72	345		36.179/ 8.52		0.359	33.25
	3	XP_01 206644 1.1	Predicha: Isoenzi- ma citoplásmica fructosa bifosfato aldolasa	Cit	<i>Jatropha curcas</i>	6.04	12.85	348		38.531/ 6.92		0.136	12.63
1100	1	XP_01 209052 8.1	Predicha: Malato deshidrogenasa (NADP)	C	<i>Jatropha curcas</i>	18.23	22.43	437	45/5.3	47.939/ 5.99	----	0.585	57.16

	2	NP_001310807.1	Actina-7	--	<i>Ziziphus jujuba</i>	6.21	11.94	377		41.696/5.31		0.438	42.84
1227	1	XP_012088048.1	Predicha: Receptor tipo quinasa FERONIA	--	<i>Jatropha curcas</i>	6	7.54	464	68.7/4.87	51.49335/5.29	----	0.540	75.17
	2	XP_012072267.1	Predicha: Fosfoglucomutasa	Cit	<i>Jatropha curcas</i>	2	2.92	582		63.20319/6.06		0.086	11.93
	3	XP_012082057.1	Predicha: isoforma beta subunidad A reguladora de 65kDa de la proteína serina/treonina fosfatasa 2ª	--	<i>Jatropha curcas</i>	2	1.87	587		65.52414/4.93		0.093	12.89
	4	XP_002517076.1	Predicha: Proteína de unión VAN3	--	<i>Ricinus communis</i>	2	2.36	466		49.71239/9.24		0.000	0.00
1254	1	XP_012066441.1	Predicha:Isoenzima citoplásmica fructosa bifosfato aldolasa	Cit	<i>Jatropha curcas</i>	47.24	56.70	358	37-42.13/6.5	38.531/6.92	4.13	1.448	31.32
	2	XP_012069835.1	Predicha: Malato deshidrogenasa	--	<i>Jatropha curcas</i>	18.02	34.04	332		35.731/6.40		2.162	46.76
	3	XP_012071894.1	Predicha: Ornitina carbamoiltransferasa	C	<i>Jatropha curcas</i>	4	9.60	375		40.815/6.89		0.359	7.77
	4	XP_012067954.1	Proteína 1 tipo GEM	--	<i>Jatropha curcas</i>	3.52	7.86	280		30.66/6.18		0.389	8.42
	5	XP_012089251.1	Predicha: Probable aldocetoreductasa 1	--	<i>Jatropha curcas</i>	3.15	4.03	347		38.720/6.23		0.155	3.35
	6	NP_001292952.1	Catalasa isoenzima 2	--	<i>Jatropha curcas</i>	2.68	2.24	492		57.26715/6.68		0.110	2.39

1274	1	NP_001310807.1	Actina-7	--	<i>Ziziphus jujuba</i>	14.61	23.87	377	45.78/5.3	41.696/5.31	----	0.624	52.41
	2	XP_012074529.1	Predicha: LL-diaminopimelato transferasa	C	<i>Jatropha curcas</i>	4	5.00	460		50.496/6.19		0.233	19.56
	3	XP_012091162.1	Predicha: Alfa-galactosidasa 3	--	<i>Jatropha curcas</i>	3.47	6.21	435		48.172/5.66		0.212	17.77
	4	XP_012064715.1	Predicha: S-adenosilmetionina sintasa 1	--	<i>Jatropha curcas</i>	2.44	3.84	391		42.838/6.02		0.122	10.25

^a núm. de acceso de acuerdo con la identificación en la base de datos de NCBI.

^b Nombre de la proteína de acuerdo con la base de datos de NCBI después de un análisis de BLAST.

^c Ubicación de proteína en las células: c=cloroplasto, Cit= citoplasma, M= mitocondria.

^d La masa molecular (KDa) y punto isoeléctrico (pI) teóricos se obtuvieron a través de la aplicación de compute pI/Mw de Swiss Prot.

^e El número de veces de cambio se calculó con los porcentajes promedios de volumen y se expresa como el radio entre % volumen de embriones somáticos globulares/ % volumen de embriones somáticos pre-globulares. El % volumen representa la media de tres réplicas independientes. En los casos en que las manchas sólo se encontraron en embriones somáticos en estado globular, las casillas se llenaron con guiones.

El sombreado de los renglones se utilizó para separar los datos entre una mancha de proteína y otra.

7.7. Clasificación de proteínas identificadas en embriones somáticos en estado globular

Las 22 proteínas se clasificaron de acuerdo a su función en 6 categorías y 12 subcategorías (Bevan et al.,1998) (Tabla 4). En los embriones en estado globular, la mayor abundancia de proteínas estuvo relacionada con la producción de energía (68%) y dentro de éstas, el 40% de las proteínas estaban involucradas con la fotosíntesis (Fig.16). Por ejemplo, la proteína 686.1, que es la proteína 8 unida a clorofila a-b, tuvo un cambio de más de 13 veces en porcentaje de volumen en el embrión somático en estado globular con respecto al estado pre-globular.

Tabla 4. Clasificación funcional de proteínas secuenciadas de embriones somáticos de *J. curcas* en estado globular

Categoría	Subcategoría	Proteínas
Metabolismo	Metabolismo de aminoácidos	575.1
Energía	Fotosíntesis	622.1, 636.1, 686.1, 704.1, 708.1, 782.1
	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos	568.1, 1100.1, 1254.2
	Glicólisis/ Gluconeogénesis	955.1, 1254.1
	Respiración celular	440.1
	Fermentación	879.1, 1026.1
	Transporte de electrones	1008.1
Almacenamiento y destino de proteínas	Plegamiento y estabilidad	402.1
	Proteólisis	402.2
Estructura celular	Citoesqueleto	1274.1
Transducción de señales	Receptor	1227.1
Metabolismo secundario	Fenilpropanoides/ fenoles	629.1, 921.1

La clasificación se hizo de acuerdo con Bevan y colaboradores (1998).

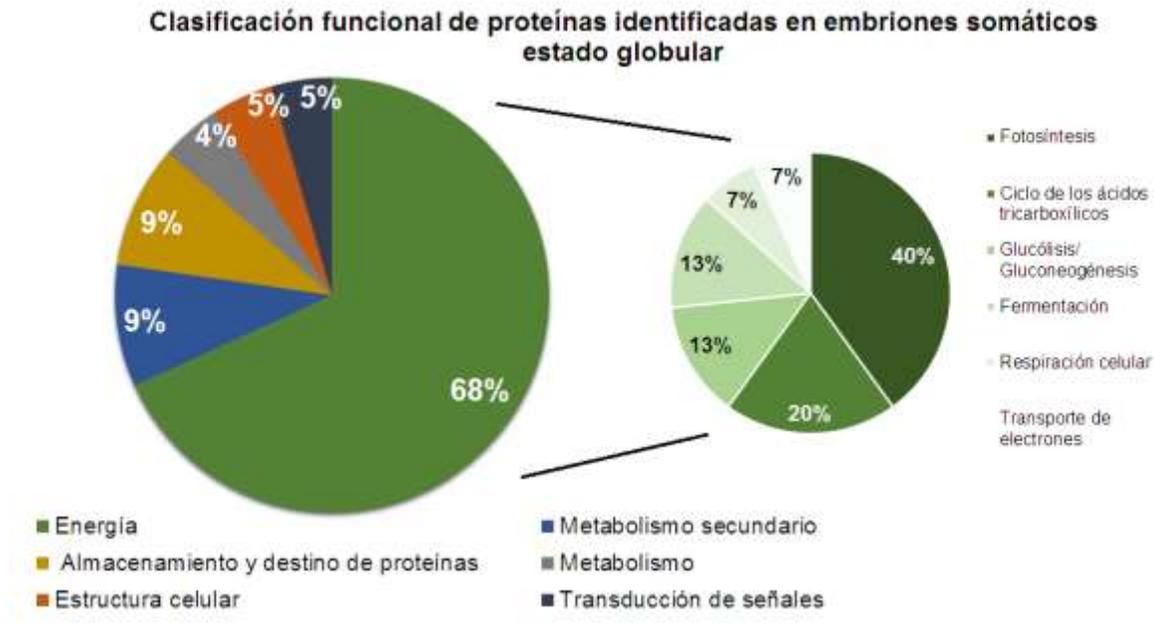


Figura 16. Proporción funcional de proteínas identificadas de embriones somáticos de *J. curcas* en estado globular. La clasificación se hizo de acuerdo con Bevan y colaboradores (1998).

7.7.1. Proteínas involucradas en el metabolismo

En este estudio se encontró sobreexpresada la mancha 575 en más de dos veces en embriones somáticos globulares con respecto a los pre-globulares. Esta mancha correspondió a dos isoformas de la cisteína sintasa, la cual se encuentra involucrada en la síntesis de cisteína a partir de serina. En embriones somáticos en estado de desarrollo cotiledorario de *Quercus suber*, esta proteína se ha encontrado sobreexpresada (Gomez-Garay, 2013). La alta síntesis de cisteína podría deberse a que este aminoácido sirve como precursor para la síntesis de varios metabolitos que contienen azufre como el glutatión (GSH). El GSH se encuentra involucrado como parte del sistema de desintoxicación por especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (Liang et al., 2007), lo que podría indicar las condiciones de estrés en las que se encuentran los cultivos de embriones somáticos de *J. curcas*.

7.7.2. Proteínas asociadas con la producción de energía

Aunque se indicó que la mayoría de las proteínas que pertenecen a esta categoría están implicadas con la fotosíntesis, también se encontraron proteínas involucradas en funciones de glicólisis, gluconeogénesis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos y respiración celular.

En la fotosíntesis, en las reacciones dependientes de la luz, la célula utiliza complejos de proteínas unidos a pigmentos denominados fotosistemas que se encuentran en los tilacoides de los cloroplastos, en donde el flujo de electrones pasa del agua al fotosistema II (FSII), de éste al fotosistema I (FSI) y de este último al NADP⁺. En este trabajo se encontraron proteínas de los dos fotosistemas, así como de complejos proteicos acoplados a éstos.

La proteína tipo 1 del complejo captador de luz unida a clorofila a-b (704.1), sobre-expresada en embriones somáticos globulares, se encuentra en el complejo II para recolección de luz (LHCII por sus siglas en inglés), el cual contiene pigmentos que reúnen luz para activar el fotosistema II al transferir la energía de excitación que captan estos pigmentos a las moléculas de clorofila situadas en el interior del FSII.

El complejo productor de oxígeno (OEC por sus siglas en inglés) retira electrones de moléculas de H₂O en el fotosistema II. En este trabajo se encontraron sobre-expresadas dos proteínas del OEC: la proteína 1 potenciadora productora de oxígeno 1 en dos isoformas (622.1 y 626.1); y proteína 2 potenciadora productora de oxígeno 2 (708.1). Las proteínas del OEC se reportaron en el perfil de embriones somáticos secundarios de *Manihot esculenta* después de 16 días de inducción en donde los embriones se encontraban en diferentes fases de desarrollo (Baba et al., 2008).

EL plastoquinol formado en el FSII por la reducción de la plastoquinona, porta electrones hacia el citocromo b6-f, el cual a su vez pasa los electrones a otro portador de electrones hacia el FSI. En este trabajo se encontró la subunidad de

hierro-azufre del complejo citocromo b6-f (782.1), la cual sólo se encontró en los embriones somáticos en estado globular.

En el FSI también hay complejo para recolección de luz (LHCI), la proteína 8 unida a clorofila a-b (686.1) es parte de este complejo y en este trabajo esta proteína se sobre-expresó en los embriones somáticos en estado globular. La absorción de luz en el FSI conduce a la formación de P700+ y Ao- que al final de las reacciones permitirán la formación de NADPH a partir de NADP+

Las proteínas involucradas en la fotosíntesis se acumulan durante el desarrollo de las semillas en diferentes aspectos dependiendo del tipo de semilla. Para las semillas de plantas como *Ricinus communis L.*, estas proteínas se acumulan en alta abundancia como parte de la histodiferenciación y cuando se inicia el estado de desarrollo de almacenamiento de reservas. Sin embargo, en otras semillas como de soya se ha observado que la acumulación de proteínas involucradas en la fotosíntesis coincide con la acumulación de aceites en las semillas (Wang et al., 2015).

Por otra parte, en este trabajo se encontraron proteínas involucradas en la glucólisis, la cual conlleva una serie de reacciones que derivan en la formación de piruvato y es parte esencial del metabolismo de los carbohidratos. La proteína fructosa difosfato aldolasa (mancha 1254), realiza la conversión reversible de fructosa 1,6 difosfato en gliceraldehído 3-fosfato + dihidroxiacetona fosfato.

La enzima enolasa por su parte (955.1), se encontró sobre-expresada en más de 5 veces en los embriones somáticos globulares que en los pre-globulares. Realiza la conversión reversible de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. Esta enzima podría estar involucrada en los embriones somáticos en la acumulación de almidón, ya que se ha observado que es importante para este proceso en semillas, así mismo se ha encontrado abundantemente en embriones somáticos en estado de torpedo de *Coffea arabica*, y se ha propuesto como marcador molecular del estado torpedo de la embriogénesis en plantas (Tonietto et al., 2012).

El piruvato obtenido en la glucólisis puede dirigirse a reacciones de fermentación o hacia la mitocondria para oxidarse a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En este trabajo se encontraron enzimas de las dos vías. La enzima L-lactato deshidrogenasa tipo b se encontró en dos isoformas, la correspondiente a la mancha 879 se sobre-expresó y la correspondiente a la mancha 1026 sólo se encontró en los embriones somáticos en estado globular. Esta enzima realiza la conversión reversible de piruvato a lactato como parte de reacciones de fermentación. La enzima malato deshidrogenasa por su parte se encontró en tres isoformas: una dependiente de NADP (1100.1) que sólo se encontró en los embriones somáticos globulares, y otras que son dependientes de NAD (mancha 568.1 y 1254.1) que se sobre-expresaron en estos embriones. La malato deshidrogenasa realiza la conversión de malato a oxaloacetato. Durante el desarrollo de semillas de *J. curcas* se ha observado que el ciclo de los ácidos tricarboxílicos es más activo en estados de desarrollo temprano de semilla (Liu et al., 2013). La glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos también proveen intermediarios para la biosíntesis de sustancias de reserva, metabolitos secundarios y nucleótidos (Wang et al., 2015).

Los NADH obtenidos en la glucólisis y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos transfieren sus electrones a portadores de electrones que constituyen la cadena transportadora de electrones; dentro de estos transportadores se encuentra la NADH deshidrogenasa. En este estudio se identificó la proteína 1 hierro-azufre de la NADH deshidrogenasa (ubiquinona) (1008.1). Este complejo también se ha visto abundantemente expresado en embriones somáticos de *Theobroma cacao* en comparación a los embriones cigóticos (Noah et al., 2013).

La energía que pasa a través de la cadena de transportadores de electrones al final permite la formación de ATP a través de la ATP sintasa, la cual convierte ADP en ATP. En este trabajo se identificó sobre-expresada la subunidad beta de la ATP sintasa mitocondrial (mancha 440) en embriones somáticos globulares.

La ATP sintasa se ha observado que se expresa abundantemente en embriones somáticos (*Manihot esculenta*, *Theobroma cacao*) pero también en el desarrollo de

semillas de *J. curcas*. Esto podría indicar que, en embriones, el proceso de fosforilación oxidativa está muy activo. Se ha propuesto que debido los altos niveles de los ácidos tricarbónicos y de oxidación fosforilativa, y por lo tanto de respiración aeróbica, los embriones somáticos no tengan la fase de dormancia (Noah et al., 2013).

7.7.3. Proteínas asociadas a almacenamiento y destino de proteínas

En este trabajo se identificó una proteína involucrada en el plegamiento de proteínas, la proteína disulfuro isomerasa (402.1), la cual modifica los puentes disulfuro de las proteínas. Estas enzimas se pueden dividir de acuerdo al lugar en donde se localicen en las células, lo cual a su vez implica que se encuentren asociadas a diferentes procesos biológicos, por ejemplo, PDIL1 que se ubica en cloroplastos de las plantas y está involucrada en la síntesis de almidón, por su parte PD12 puede interactuar con factores de transcripción en el núcleo (Cho et al., 2011).

Otra proteína encontrada en la categoría de proteínas asociadas a almacenamiento y destino de proteínas es la proteína tipo DSK2a con dominio de unión a ubiquitina (402. 2) que se encuentra involucrada en la vía de proteólisis. Esta proteína actúa como receptor de conjugados de ubiquitina y se asocia a subunidades del sistema proteosoma 26S. El sistema de proteosoma-ubiquitina controla diversos aspectos de desarrollo de la planta como la embriogénesis. Enzimas involucradas en el proteosoma 26S son importantes para el paso de callo a embriones somáticos en estado globular, así como para pasar de estado globular a estado torpedo en *Cyclamen* (Rode et al., 2012). En semillas, la acumulación de proteasas durante el desarrollo se ha asociado a la liberación de aminoácidos desde el endospermo hacia el embrión para la síntesis de proteínas de reserva (Revisado por Wang et al., 2015).

7.7.4. Proteínas asociadas a estructura celular

Los microfilamentos de actina (1274.1) forman parte del citoesqueleto, y tiene una gran variedad de funciones, desde elongación celular, desarrollo de pared celular,

así como en procesos de muerte celular programada entre otros (revisado por Tchorbadjieva, 2016). En estudios proteómicos de embriones somáticos secundarios de *Manihot esculenta* se encontraron isoformas de esta proteína (Baba et al., 2008). En particular, la isoforma actina-7 encontrada en este estudio, se ha visto involucrada en la regulación de proliferación celular inducida por hormonas, así como en la formación de callo. Además, en un estudio proteómico diferencial de embrión y endospermo de semillas de *J. curcas*, se observó que esta isoforma se encuentra en mayor abundancia en el endospermo (Liu et al., 2011). El que se hubiera encontrado esta isoforma en los embriones en estado globular y no en el pre-globular es probablemente debido a que en estos embriones se encuentran en constante crecimiento y por lo tanto una mayor proliferación celular.

7.7.5. Proteínas asociadas a la transducción de señales

En esta categoría se encontró la proteína receptora tipo quinasa FERONIA (1227.1). Esta proteína se ha observado que está involucrada en una gran variedad de procesos en plantas como en el control de desarrollo de raíces adventicias mediado por ROS. Además, parece regular la señalización entre brasinoesteroides y etileno en la elongación del hipocotilo. Así mismo actuaría como regulador positivo del crecimiento promovido por auxinas y estaría inhibiendo la señalización de ABA. También ha sido reportado como un receptor de RALF-1, que está involucrado en la vía de señalización que previene la expansión celular (Yu et al., 2012; Li et al., 2016).

En este trabajo el receptor podría estar asociado en el crecimiento celular ya que inhibe ABA que a su vez inhibe este crecimiento. Esto puede observarse en los embriones somáticos globulares en donde el crecimiento celular del suspensor prosigue envolviendo al embrión y no dejando que pase a otros estados de desarrollo (Fig.12F).

7.7.6. Proteínas asociadas al metabolismo secundario

Las tres proteínas que se encontraron de esta categoría participan en la biosíntesis de fenilpropanoides. La proteína tipo secoisolariciresinol deshidrogenasa (629.1 y 921.1) se encuentra involucrada en la biosíntesis de lignanos, cataliza la conversión de secoisolariciresinol a matairesinol. El matairesinol es un precursor en plantas de la biosíntesis de diferentes lignanos. En estudios farmacológicos con *J. curcas*, se ha encontrado que los lignanos son los responsables de los efectos citotóxicos que presentan extractos para el tratamiento de cáncer (Abdelgadir y Van Staden, 2013).

En estudios proteómicos sobre el desarrollo de las semillas de *J. curcas*, las proteínas que se expresan diferencialmente corresponden en su mayoría a proteínas involucradas a la obtención de energía (26.24%) y al metabolismo (25.23%) (Liu et al., 2013). En el presente trabajo las proteínas relacionadas con la obtención de energía fueron las más abundantes (68%) lo que podría explicarse porque las condiciones *in vitro* provocan estrés en los cultivos, lo que induce una demanda de altos niveles de energía (de Carvalho et al., 2014). Sin embargo, en comparación con la categoría sobre metabolismo, en este trabajo sólo representó el 4% de las proteínas obtenidas. En este trabajo se analizaron 20 de 108 proteínas expresadas diferencialmente entre los embriones somáticos de *J. curcas*, por lo que cuando se identifiquen por secuenciación, es probable que este porcentaje aumente.

Otro aspecto relevante es el receptor FERONIA encontrado en los embriones somáticos globulares, el cual al estar inhibiendo la señalización de ABA podría estar manteniendo el crecimiento celular, lo cual impide el paso de estado globular a corazón debido a que en esta fase el crecimiento uniforme debe detenerse para polarizarse (Liu et al., 1993).

7.8. Análisis de presencia de forboles en embriones somáticos de *J. curcas* en estado globular.

Para realizar esta parte, los embriones somáticos fueron molidos y liofilizados. El promedio de peso seco para los embriones en estado pre-globular fue de 0.150 g a partir de 4 g de peso fresco; para los embriones somáticos en estado globular fue de 0.600 g de peso seco a partir de 18 g de peso fresco.

Para determinar si los embriones somáticos en estado globular tenían forboles se realizó una placa de TLC-RP 18, en donde se comparó la extracción con diclorometano, obtenida de 600 mg de embriones somáticos, con un estándar de forbol miristato, y un extracto de semilla tóxica de *J. curcas* originaria de Chiapas, que contenía ésteres de forbol propios de las semillas y diferentes al estándar. Se realizaron registros de la placa a luz UV a 254 y a 365 nm antes de revelar la placa con anisaldehído-ácido sulfúrico y calor.

En las muestras de los embriones somáticos en estado globular no se encontraron forboles. La correspondencia de la muestra de éstos en las placas TLC RP-18 que se observó a luz visible después del revelado con el estándar de forbol miristato ($R_f = 0.81$) (Fig. 17 C) se descartó como forbol debido a que a luz UV de 254 nm esta franja no se encontraba (Fig.17 A). También se observó una correspondencia con un éster de forbol de la semilla tóxica (Fig. 17 C), sin embargo, a luz UV de 365 nm, la franja en cuestión se observó azul (Fig. 17B), lo que indica que en lugar de forboles son fenoles.

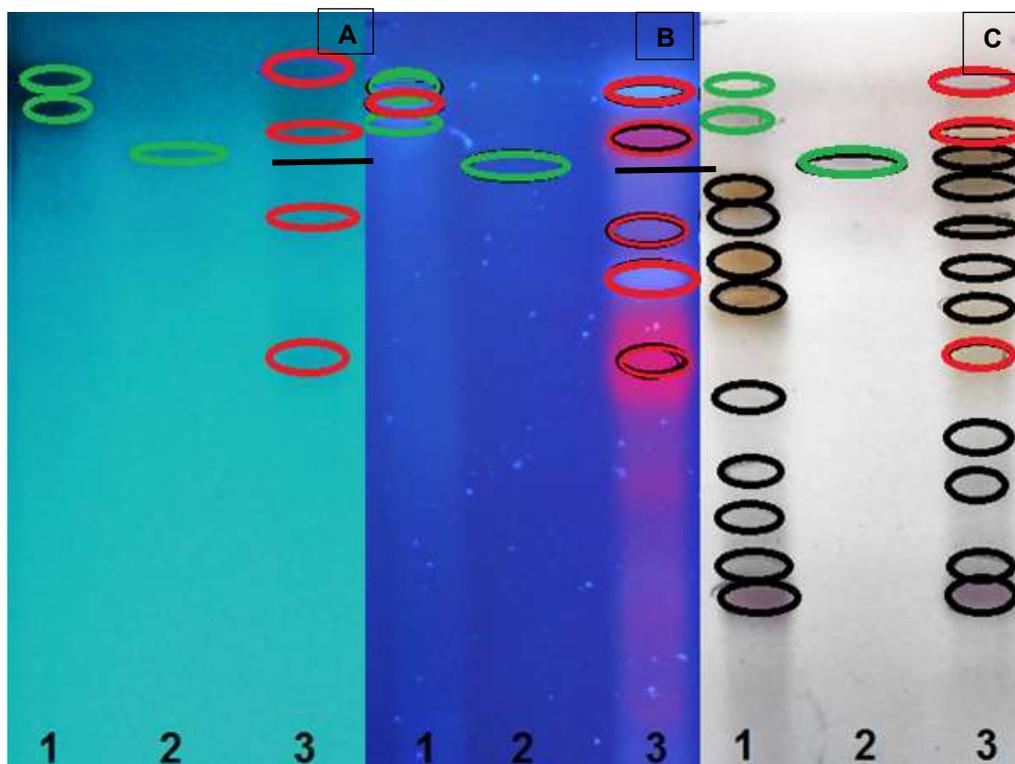


Figura 17. Fotografía de placa TLC RP-18 para identificación de forboles en embriones somáticos de *J. curcas* estado globular. 1) Semilla de variedad mexicana con forboles. 2) Estándar de forbol miristato ($R_f = 0.81$). 3) Extracción con diclorometano. A) Placa observada bajo luz UV a 254 nm, B) Placa observada bajo luz UV a 365 nm C) Placa observada a luz visible después de revelado con anisaldehído-ácido sulfúrico y calor. Los círculos verdes indican los forboles identificados en las muestras. Los círculos rojos indican las franjas de color que se observan a 365 nm. Los círculos negros indican las franjas de terpenoides que se observan a luz visible. Fase móvil= acetato de etilo: acetonitrilo (3:2) (Martelanc et al., 2009).

7.9. Análisis comparativo de presencia de terpenoides en embriones somáticos de *J. curcas* en estado pre-globular y globular.

Para determinar qué tipos de triterpenos podrían estar en los embriones somáticos en estado globular, se realizó una placa de TLC-RP 18, en donde se comparó la extracción con diclorometano de los embriones somáticos con estándares de triterpenos. Se detectó estigmasterol, β -sitosterol, ácido betulínico y β -amirina acetato en base al R_f de los estándares y las franjas de las muestras observadas

a luz visible después del revelado de las muestras. En la figura 18 las flechas rojas indican estas correspondencias.

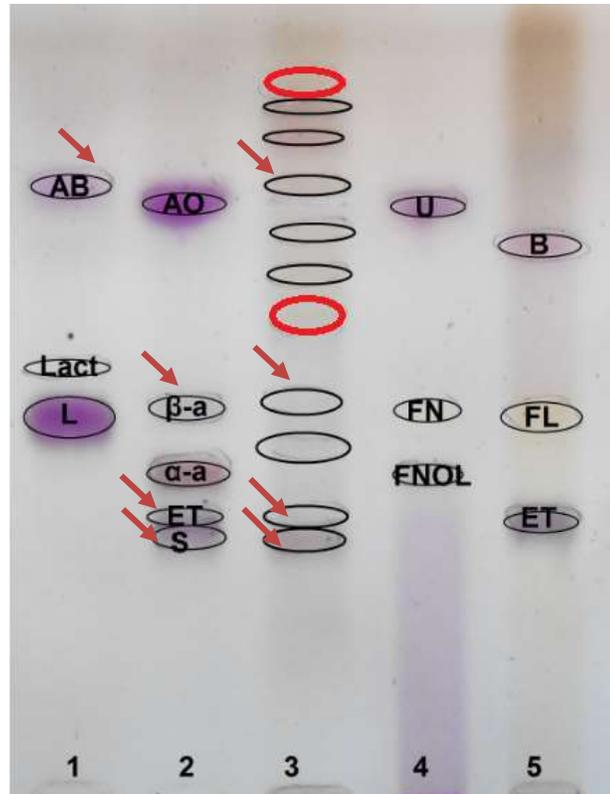


Figura 18. Fotografía de placa TLC RP 18 para identificación de terpenoides en embriones somáticos de *J. curcas* estado globular a luz visible después del revelado con anisaldehído-ácido sulfúrico y calor. 1) Estándares de L= lupeol (Rf=0.48), Lact= lupeol acetato (Rf=0.54), AB= ácido betulínico (Rf=0.77); 2) S= β -sitosterol (Rf=0.32), ET= estigmasterol (Rf=0.35), α -a= α -amirina (Rf=0.40), β -a= β -amirina acetato (Rf=0.49), AO= ácido oleanólico (Rf=0.75); 3) Extracto con diclorometano de embriones somáticos *J. curcas*; 4) FNOL= friedelinol (Rf=0.4), Fn=friedenona (Rf=0.48), U= ácido ursólico (Rf=0.74); 5) ET, FL= friedelina (Rf=0.47), B= betulin (Rf=0.69). En círculo rojo están marcadas las franjas que a 365 nm se ven rojas. Las flechas indican la correspondencia de los terpenoides de los embriones somáticos y los estándares. Fase móvil acetato etilo: acetonitrilo (3:2) (Martelanc et al., 2009).

Para comparar el perfil terpénico entre los estados de desarrollo pre-globular y globular de los embriones somáticos de *J. curcas*, se hicieron tres extracciones con diclorometano por cada estado de desarrollo. Cada extracción se hizo con 300 mg de embriones somáticos liofilizados. Los extractos de embriones globulares

fueron más verdes que los pre-globulares (Fig. 19). Se realizó una placa de TLC-RP 18 comparando estas extracciones de los embriones y los estándares de triterpenos.

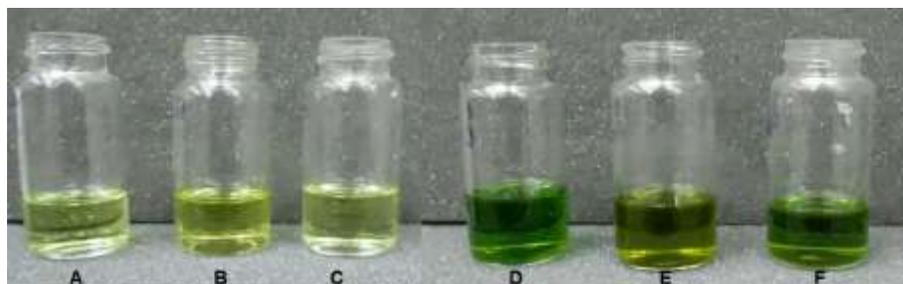


Figura 19. Extracciones con diclorometano de embriones somáticos de *J. curcas* en estado pre-globular (A, B y C) y globular (D, E y F).

En ambos estados de desarrollo de los embriones somáticos de *J. curcas* se detectaron 6 franjas de terpenoides (indicadas con flechas rojas en la figura 20). Cuatro de ellas se identificaron por medio de los Rf de los estándares, como estigmasterol, β -sitosterol, α -amirina y ácido betulínico. En los embriones globulares la detección cualitativa fue mayor de los compuestos mencionados. En las plantas de *J. curcas* se habían reportado esteroides en hojas, tallos, raíces y semillas, y amirinas sólo se habían detectado en hojas y en tallos (Pabón et al., 2012). El ácido betulínico, por su parte, sólo se había identificado en cultivos en suspensión de *J. curcas* después de elicitación con ácido jasmónico (Zaragoza-Martínez et al., 2016).

En la placa de la figura 20 se puede distinguir cualitativamente que, en los embriones en estado pre-globular, el estigmasterol se encuentra más concentrado que el β -sitosterol (carril 1 y 3), sin embargo, debe comprobarse mediante la cuantificación de los compuestos obtenidos, en algunos reportes se ha realizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) (Martelanc et al., 2009) o por cromatografía de gases (GC) (Hernández-Vázquez et al., 2012). En estudios sobre las diferencias en los contenidos de esteroides en plantas de lino (*Linum usitatissimum*) se ha observado que pueden existir cambios en la concentración de esteroides dependiendo de la diferenciación del tejido, en

ese caso el aumento de estigmasterol con respecto al β -sitosterol ocurría en tejidos diferenciados como embriones somáticos, en comparación con tejidos no diferenciados como callo (Cunha y Ferreira, 1997).

La importancia de que se puedan obtener esteroides en los embriones somáticos radica en que, en humanos, estos compuestos han sido propuestos como preventivos contra cáncer, en particular en cáncer de mama (Woyengo et al., 2009; Vundru et al., 2013).

Por otra parte, la síntesis de ácido betulínico en los embriones somáticos puede ser en respuesta al estrés del cultivo en suspensión. En humanos, el ácido betulínico ha sido investigado para el tratamiento contra el cáncer, y se ha encontrado que sus propiedades citotóxicas son selectivas hacia las células tumorales induciendo apoptosis a través de la vía mitocondrial (Kuo et al., 2009).

El α -amirina no se había detectado antes en los extractos con diclorometano de embriones somáticos que se hicieron para este trabajo, en donde sólo se había detectado la presencia de β -amirina acetato (Fig.18). Huang y colaboradores (2012) propusieron la ruta de biosíntesis de triterpenos de *Catharantus roseus*, identificando la enzima CrAS como aquella que forman en conjunto la α y β -amirina, aunque no en la misma proporción. En este trabajo, es probable que se tengan los dos tipos de amirinas, pero que la proporción varíe dependiendo del estado metabólico de las muestras de embriones somáticos de *J. curcas*. Las amirinas han sido identificadas como compuestos antiinflamatorios, y antimicrobianos (Hernández-Vázquez et al., 2012).

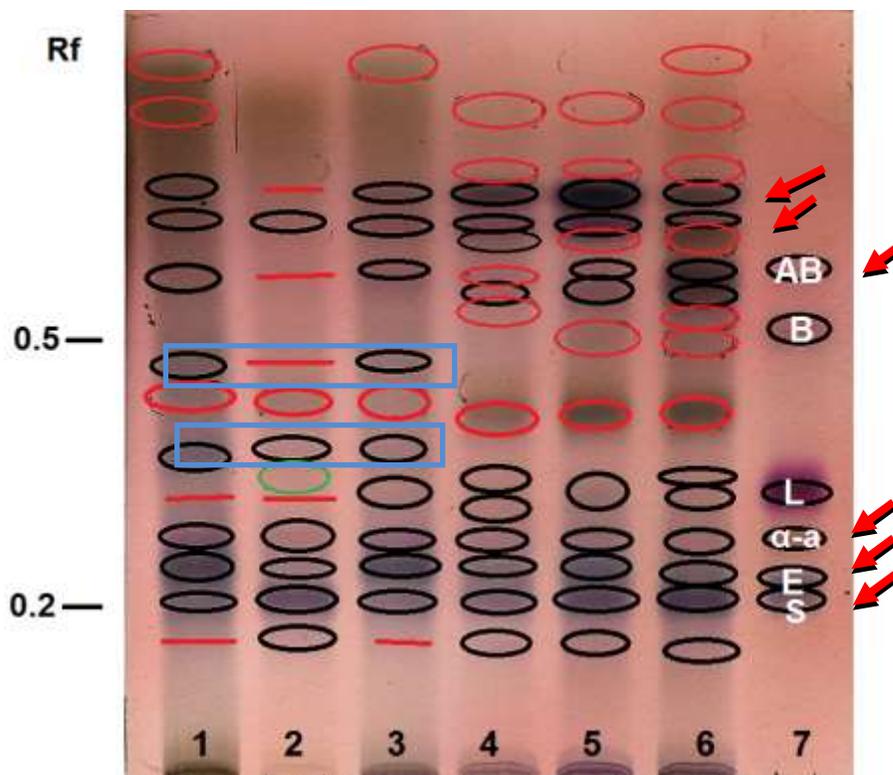


Figura 20. Identificación en placa TLC RP 18 de compuestos terpénicos en embriones somáticos de *J. curcas* en estado pre-globular y globular a luz visible después de revelado con anisaldehído-ácido sulfúrico y calor. 1) Embrión somático pre-globular C. 2) Embrión somático pre-globular B. 3) Embrión somático pre-globular A. 4) Embrión somático globular F. 5) Embrión somático globular E. 6) Embrión somático globular D. 7) Mezcla de estándares de terpenoides: S= β -sitosterol (0.22), E= estigmasterol (Rf=0.26), α -a= α -amirina (0.31), L= lupeol (Rf=0.37), B= betulin (Rf=0.58), AB= ácido betulínico (Rf=0.66). Las flechas rojas indican las franjas que se encuentran presentes en ambos estados de desarrollo. Las rectas rojas indican la ausencia de franjas. En círculo rojo están marcadas las franjas que a luz UV a 365 nm se observan en color rojo o azul. En círculo verde se encuentra marcado la franja que sólo se vio a luz UV a 254 nm. El recuadro azul indica las franjas únicas de embriones pre-globulares. Fase móvil acetato etilo: acetonitrilo (3:2) (Martelanc et al., 2009).

Otros compuestos que se compartieron fueron clorofilas y fenoles, que se detectaron a UV a 365 nm, los cuales están señalados en la figura 20 con círculos rojos.

7.9.1. Terpenoides detectados sólo en embriones somáticos de *J. curcas* en estado pre-globular.

En placas de TLC-RP 18 se encontraron franjas únicas para las muestras de embriones somáticos en estado pre-globular que ninguna muestra de embrión somático globular compartió hacia el Rf 0.4, las cuales pueden verse en la figura 20 en el recuadro azul. Otra franja que compartieron dos muestras fue debajo del Rf 0.5. Ninguna de ellas pudo identificarse, sin embargo, es probable que sean terpenoides porque se detectan a luz visible después de revelado con anisaldehído-ácido sulfúrico y calor y no en antes del revelado a luz UV a 254nm y 365 nm.

La muestra B de los embriones somáticos pre-globulares, difirió en las otras dos por la menor cantidad de franjas detectadas, pero también por una franja que sólo se pudo observar a luz UV a 254 nm, la cual está identificada con el color verde en el carril 2 en la figura 20.

7.9.2. Terpenoides detectados sólo en embriones somáticos de *J. curcas* en estado globular.

En las placas de TLC RP-18, en los carriles de las muestras de embriones en estado globular, se detectaron dos franjas hacia el Rf 0.37. En éstas no fue fácil determinar si el compuesto era lupeol, β -amirina acetato, o si se encontraban ambos. También se encontró una franja debajo del Rf 0.2 que no se pudo identificar (Fig. 20). En *Catharantus roseus*, la formación de lupeol se realiza a través de la enzima AtLUP1, y las amirinas son sintetizadas por la enzima CrAS (Huang et al., 2012). Por lo que en este trabajo la predilección por la formación de uno u otro compuesto dependerá del estado metabólico de las muestras.

El que no se detecte lupeol en los embriones somáticos pre-globulares puede deberse a que las condiciones de cultivo favorezcan la oxidación de lupeol para la formación de ácido betulínico. En *Catharantus roseus* la oxidación del lupeol ocurre por medio de la enzima CrAO (Huang et al., 2012).

El lupeol es un compuesto que ha sido asociado a diferentes actividades farmacológicas, para tratamiento contra cáncer, y antiinflamatorio (Saleem, 2009). En cuanto a la β -amirina se ha sugerido que tiene propiedades citotóxicas (Hernández-Vázquez et al., 2012).

La variedad de compuestos terpénicos de valor farmacológico hace que los embriones somáticos de *J. curcas* sean candidatos para la obtención de estos compuestos. Sin embargo, son necesarios otro tipo de experimentos para aislar e identificar los terpenoides de las franjas encontradas en las placas de TLC RP-18 que no correspondieron con los estándares o cuya detección no fue clara como en el caso del β - amirina y lupeol.

7.10. Relación de proteómica diferencial con metabolismo secundario de los embriones somáticos de *J. curcas*

En la secuenciación de proteínas que se expresaban diferencialmente en los embriones somáticos de *J. curcas*, no se identificaron proteínas cuya expresión pudiera estar involucrada en la producción de terpenoides, pero sí de lignanos (proteína secoisolariciresinol deshidrogenasa) (Tabla 3). Es probable que la síntesis de estos compuestos sea necesaria para el mantenimiento *in vitro* de los embriones somáticos de *J. curcas*.

Los resultados de este trabajo son un acercamiento para la caracterización de la embriogénesis somática de *J. curcas* a nivel morfológico, bioquímico y metabolómico, y pueden ser utilizados como base para proseguir con experimentos que permitan revelar procesos sobre la embriogénesis de plantas y plantear el uso eficiente de los embriones somáticos de *J. curcas* en procesos biotecnológicos.

8. Conclusiones

Fue posible obtener embriones somáticos de *J. curcas* en suspensión hasta un estado de histodiferenciación globular.

Las tinciones con acetocarmín y azul de Evans permitieron identificar que el suspensor no se degrada en los embriones somáticos en estado globular de *J. curcas*, sino que sigue en crecimiento envolviendo al embrión evitando de esta manera que se desarrolle.

Los embriones somáticos de *J. curcas* en estado pre-globular y globular tuvieron un perfil proteómico característico. En los embriones globulares se detectó un mayor número de proteínas (34) que se sobreexpresaron en más de 1.5 veces en comparación de los embriones somáticos en estado pre-globular (16 proteínas). Sin embargo, en los embriones somáticos en estado pre-globular se detectó un mayor número de proteínas únicas (37) en comparación con el otro estado de desarrollo (19 proteínas).

Se secuenciaron 20 manchas de proteínas, de las cuales el 68% se categorizó en proteínas involucradas en la producción de energía como aquellas involucradas en la fotosíntesis, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, glucólisis y fermentación. El 32 % restante corresponde a proteínas involucradas en el almacenamiento y destino de proteínas, metabolismo secundario de fenoles, transducción de señales, estructura celular y metabolismo de aminoácidos.

Se determinó el perfil de terpenoides característico de los embriones somáticos de *J. curcas*, en donde se identificaron compuestos como el estigmasterol, β -sitoesterol, α -amirina y ácido betulínico en ambos estados de desarrollo. También se detectaron compuestos característicos de cada estado que no se identificaron.

9. Recomendaciones

Es necesario determinar las condiciones para llevar a cabo el desarrollo completo de los embriones somáticos *in vitro*, de su germinación y conversión a plantas de *J. curcas*.

Se deben secuenciar manchas únicas de los embriones somáticos en estado pre-globular y globular, así como proteínas que se sobreexpresan en alguno de los estados de desarrollo.

Son necesarios otro tipo de experimentos para aislar e identificar los compuestos de las franjas encontradas en las placas de TLC RP-18 que no correspondieron con los estándares o cuya detección no fue clara como en el caso del β - amirina y lupeol.

10. Referencias

Abdelgadir, H. A., y Van Staden, J. (2013). Ethnobotany, ethnopharmacology and toxicity of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae): A review. *South African Journal of Botany*, 88, 204-218.

Adebowale, K. O., y Adedire, C. O. (2006). Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. *African Journal of Biotechnology*, 5, 901-906.

Arnold, S. Von, Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., y Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 69, 233-249.

Baba, A. I., Nogueira, F. C. S., Pinheiro, C. B., Brasil, J. N., Soares, A. A., Santos, M. F., Campos, F. A. P. (2008). Proteome analysis of secondary somatic embryogenesis in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Science*, 175, 717-723.

Bevan, M., Bancroft, I., Bent, E., Love, K., Goodman, H., Dean, C., et al. (1998). Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 391, 485-488.

Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). Tissue and cell culture. En *Plant tissue culture: an introductory text* (pp. 39-50). India: Springer India.

Boureau, L., Pribat, A., Mortain-bertrand, A., Bert, L. S., Rolin, D., y Teyssier, E. (2013). Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis. En K. G. Ramawat y J.-M. Mérillon (Eds.), *Natural Products* (pp. 2813-2851). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Cai, L., Fu, L., y Ji, L. (2011). Regeneration of *Jatropha curcas* through efficient somatic embryogenesis and suspension culture. *GM crops*, 2, 110-117.

Cho, E. J., Yuen, C. Y. L., Kang, B. H., Ondzighi, C. A., Staehelin, L. A., y Christopher, D. A. (2011). Protein disulfide isomerase-2 of arabidopsis mediates protein folding and localizes to both the secretory pathway and nucleus, where it interacts with maternal effect embryo arrest factor. *Molecules and Cells*, 32, 459-475.

Chong-Siang, T., Then-Soong, S., y Su-Yien, A. T. (2012). Plant regeneration studies of *Jatropha curcas* using induced embryogenic callus from cotyledon explants. *African Journal of Biotechnology*, 11, 8022-8031.

Cunha, A., y Fernandes-Ferreira, M. (1997). Differences in free sterols content and composition associated with somatic embryogenesis, shoot organogenesis and calli growth of flax. *Plant Science*, 124, 97-10.

De Carvalho Silva, R., Carmo, L. S. T., Luis, Z. G., Silva, L. P., Scherwinski-Pereira, J. E., y Mehta, A. (2014). Proteomic identification of differentially expressed proteins during the acquisition of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal of Proteomics*, 104, 112-27.

DiscoveryLife. (2014). *Jatropha curcas* L. Recuperado 19 de abril de 2014, a partir de <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Jatropha+curcas>

Fehér, A. (2014). Somatic embryogenesis - Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1849, 385-402.

Fehér, A., Pasternak, T., y Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 74, 201-228.

Freire, D. A. (2009). *Establecimiento de embriogénesis somática y caracterización histológica embrionaria de piñon (Jatropha curcas) a partir de peciolo*. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Biotecnología. Escuela politécnica del ejército. Sangolquí, Ecuador.

Fukushima, E., Seki, H., y Muranaka, T. (2014). Heterologous expression of triterpene biosynthetic genes in yeast and subsequeute metabolite identification throught GC-MS. En M. Rodríguez-Concepción (Ed.), *Plant Isoprenoids* (pp. 235-244). New York: Humana Press.

Genomeweb (2010). Life Technologies and SG Biofuels Sequence Jatropha Genome on SOLiD 4, a partir de: <https://www.genomeweb.com/sequencing/life-technologies-and-sg-biofuels-sequence-jatropha-genome-solid-4>

Gomez-Garay, A., Lopez, J. A., Camafeita, E., Bueno, M. A., y Pintos, B. (2013). Proteomic perspective of *Quercus suber* somatic embryogenesis. *Journal of Proteomics*, 93, 314-25.

Gupta, P. K., y Durzan, D. J. (1987). Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in Loblolly pine. *Bio/Technology*, 5, 147-151.

Gupta, P. K., y Holmstrom, D. (2005). Double Staining Technology for Distinguishing Embryogenic Cultures. En S. Jain y P. K. Gupta (Eds.), *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants* (pp. 573-575). Netherlands: Springer.

Heller, J. (1996). *Physic nut. Jatropha curcas L. Promoting the conservation and the use of underutilized and neglected crops. 1*. Roma: International Plant Genetic Resources Institute.

Hernández-Vázquez, L., Palazon, J., y Navarro-Ocaña, A. (2012). The pentacyclic triterpenes α , β -amyrins: A review of sources and biological activities. En V. Rao (Ed.), *Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health* (pp. 487-502). InTech.

Huang, L., Li, J., Ye, H., Li, C., Wang, H., Liu, B., y Zhang, Y. (2012). Molecular characterization of the pentacyclic triterpenoid biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus*. *Planta*, 236, 1571-1581.

Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., y Mann, M. (2005). Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Molecular y Cellular Proteomics*, 4, 1265-1272.

Jafari, N., Othman, R. Y., Tan, B. C., y Khalid, N. (2015). Morphohistological and molecular profiles during the developmental stages of somatic embryogenesis of *Musa acuminata* cv. "Berangan" (AAA). *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 37-45.

Jha, T. B., Mukherjee, P., y Datta, M. M. (2007). Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 1, 135-140.

Jiménez, V. (2001). Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13, 196-223.

Jiménez, V. M., y Thomas, C. (2005). Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. En A. Mujib y J. Samaj (Eds.), *Somatic embryogenesis* (pp. 103-118). Berlin: Springer- Verlag.

Khan, I., Sangwan, P. L., Dhar, J. K., y Koul, S. (2012). Simultaneous quantification of five marker compounds of *Betula utilis* stem bark using a validated high-performance thin-layer chromatography method. *Journal of Separation Science*, 35, 392-9.

Kumar, A., y Sharma, S. (2008). An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Industrial Crops and Products*, 28, 1-10.

Kuo, R.-Y., Qian, K., Morris-Natschke, S. L., y Lee, K.-H. (2009). Plant-derived triterpenoids and analogues as antitumor and anti- HIV agents. *Natural Product Reports*, 26, 1321-1344.

Kurczynska, E. U., Potocka, I., y Dobrowolska, I. (2012). Cellular Markers for Somatic Embryogenesis. En K.-I. Sato (Ed.), *Embryogenesis* (pp. 307-332). Intech.

Li, C., Wu, H., y Cheung, A. Y. (2016). FERONIA and her pals: functions and mechanisms. *Plant Physiology*, 171, 2379-2392.

Li, K., Zhu, W., Zeng, K., Zhang, Z., Ye, J., Ou, W., Rehman, S., Heuer, B., y Chen, S. (2010). Proteome characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) somatic embryos, plantlets and tuberous roots. *Proteome Science*, 8, 1-12.

Liang, Y., Chen, H., Tang, M.-J., Yang, P.-F., y Shen, S.-H. (2007). Responses of *Jatropha curcas* seedlings to cold stress: photosynthesis-related proteins and chlorophyll fluorescence characteristics. *Physiologia Plantarum*, 131, 508–5.

Liu, H., Wang, C., Komatsu, S., He, M., Liu, G., y Shen, S. (2013). Proteomic analysis of the seed development in *Jatropha curcas*: from carbon flux to the lipid accumulation. *Journal of Proteomics*, 91, 23-40.

Liu, C., Xu, Z., & CHua, N.-H. (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell*, 5, 621-630.

Liu, H., Yang, Z., Yang, M., y Shen, S. (2011). The differential proteome of endosperm and embryo from mature seed of *Jatropha curcas*. *Plant Science*, 181, 660-666.

Martelanc, M., Vovk, I., y Simonovska, B. (2009). Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216, 6662-6670.

Martínez, M., Jiménez, J., Cruz, R., Juárez, E., García, R., Cervantes, A., y Mejía, R. (2002). Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Anales del Instituto de Biología, UNAM*, 73, 155-281.

Martínez-Herrera, J., Martínez-Ayala, A. L., y Dávila-Ortíz, G. (2006). El piñón mexicano (*Jatropha curcas* L.) fuente de energía renovable. En *V Congreso internacional y XI Congreso nacional de ciencias ambientales* (pp. 2-5). Mazatlán, Sinaloa: Academia Nacional de Ciencias Ambientales A. C. (ANCA).

Merkle SA, Parrott WA, Flinn (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe TA (Ed.), *In vitro Embryogenesis in Plants* (pp. 155–203). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers

Nindita, A., Purwoko, B. S., Efendi, D., y Dewi, I. S. (2014). Somatic embryogenesis media optimization study of physic nut (*Jatropha curcas*) as biodiesel feedstock. *Energy Procedia*, 47, 21-28.

Noah, A. M., Niemenak, N., Sunderhaus, S., Haase, C., Omokolo, D. N., Winkelmann, T., y Braun, H. P. (2013). Comparative proteomic analysis of early somatic and zygotic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Journal of Proteomics*, 78, 123–133.

Pabón, L. C., y Hernández-Rodríguez, P. (2012). Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17, 194-209.

Pecina-Quintero, V., Anaya-López, J. L., Zamarripa-Colmenero, A., Núñez-Colín, C. A., Montes-García, N., Solís-Bonilla, J. L., y Jiménez-Becerril, M. F. (2014). Genetic structure of *Jatropha curcas* L. in México and probable centre of origin. *Biomass and Bioenergy*, 60, 147-155.

Radoeva, T., y Weijers, D. (2014). A roadmap to embryo identity in plants. *Trends in Plant Science*, 30, 1-8.

Rode, C., Lindhorst, K., Braun, H.-P., y Winkelmann, T. (2012). From callus to embryo: a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum*. *Planta*, 235, 995-1011.

Rodríguez-Concepción, M. (2014). Plant isoprenoids: A general overview. En M. Rodríguez-Concepción (Ed.), *Plant Isoprenoids* (pp. 1-5). New York: Humana Press.

Saleem, M. (2009). Lupeol, a novel anti-inflammatory and anticancer dietary triterpene. *Cancer Letters*, 28, 109-115.

Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutierrez-Mora, A., y Rodriguez-Garay, B. (1998). Somatic embryogenesis in some cactus and agave species. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 3, 15–26.

Sato, S., Hirakawa, H., Isobe, S., Fukai, E., Watanabe, A., Kato, M., et al. (2011). Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree, *Jatropha curcas* L. *DNA research*, 18, 65–76.

Saxena, S., Sharma, A., y Sardana, J. (2012). Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* L. using cotyledonary leaves, *Indian Journal of Biotechnology*, 11, 348-351.

Simões, C., Albarello, N., Henriques, C., Carvalho, T., y Mansur, E. (2010). Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Cleome rosea* Vahl. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 679-686.

Simpson, M. G. (2010). *Plant systematics* (2.^a ed.). San Diego, Estados Unidos de América: Elsevier Science Publishing Co Inc.

Smith, P., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., y Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.

Soomro, R., y Memon, R. A. (2007). Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. *Pakistan Journal of Botany*, 39, 2431-2441.

Steen, H., y Mann, M. (2004). The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 5, 699-711.

Taiz, L., y Zeiger, E. (Eds.). (2010). *Plant Physiology* (5.^a ed.). USA: Sinauer Associates.

Talapatra, S. K., y Talapatra, B. (2015). *Chemistry of Plant Natural Products*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Tchorbadjieva, M. I. (2016). Advances in proteomics of somatic embryogenesis. En A. Mujib (Ed.), *Somatic embryogenesis in ornamentals and its applications* (pp. 67-90). New Delhi: Springer India.

Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O'Maille, P., y Osbourn, A. (2014). Triterpene biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 225-57.

Tonietto, Â., Sato, J. H., Teixeira, J. B., de Souza, E. M., Pedrosa, F. O., Franco, O. L., y Mehta, A. (2012). Proteomic analysis of developing somatic embryos of *Coffea arabica*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30, 1393–1399.

Vundru, S. S., Kale, R. K., y Singh, R. P. (2013). β -Sitosterol induces G1 arrest and causes depolarization of mitochondrial membrane potential in breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 13, 280.

Wagner, H., Blatt, S., y Zgainski, E. M. (1984). *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas*. Berlin: Springer-Verlag.

Wang, G., Tang, W., y Bidigare, R. R. (2005). Terpenoids as therapeutic drugs and pharmaceutical agents. En L. Zhang y A. L. Demain (Eds.), *Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine* (pp. 197-227). Humana Press Inc.

Wang, W.-Q., Liu, S.-J., Song, S.-Q., y Møller, I. M. (2015). Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. *Plant Physiology and Biochemistry*, 86, 1-15.

Woyengo, T. a, Ramprasath, V. R., y Jones, P. J. H. (2009). Anticancer effects of phytosterols. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, 813-820.

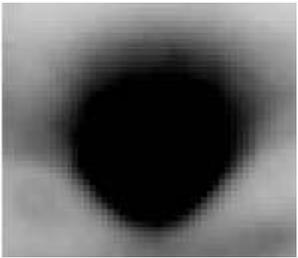
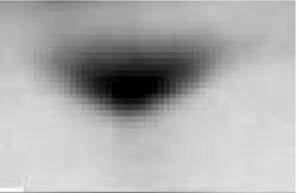
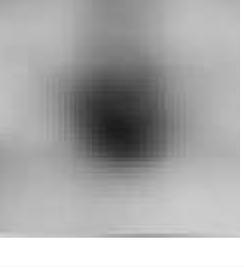
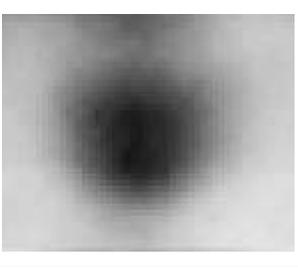
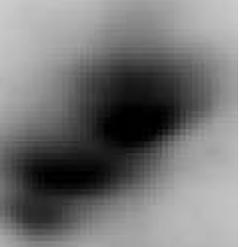
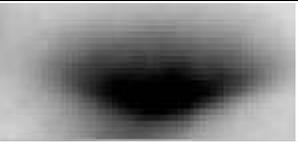
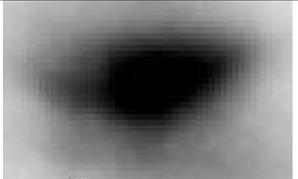
Yang, Y., Thannhauser, T. W., Li, L., y Zhang, S. (2007). Development of an integrated approach for evaluation of 2-D gel image analysis: Impact of multiple proteins in single spots on comparative proteomics in conventional 2-D gel/MALDI workflow. *Electrophoresis*, 28, 2080–2084.

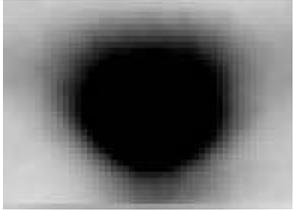
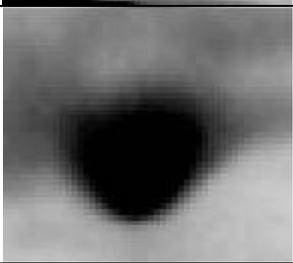
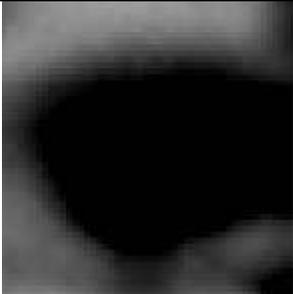
Yu, F., Qian, L., Nibau, C., Duan, Q., Kita, D., Levasseur, K., et al. (2012). FERONIA receptor kinase pathway suppresses abscisic acid signaling in *Arabidopsis* by activating ABI2 phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 14693-14698.

Zaragoza-Martínez, F., Lucho-Constantino, G., Ponce-Noyola, T., Esparza-García, F., Poggi-Varaldo, H., Cerda-García-Rojas, C., Trejo-Tapia, G., y Ramos-Valdivia, A. C. (2016). Jasmonic acid stimulates the oxidative responses and triterpene production in *Jatropha curcas* cell suspension cultures through mevalonate as biosynthetic precursor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127, 47–56.

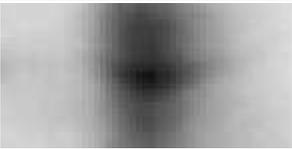
Zimmerman, J. L. (1993). Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell*, 5, 1411–1423.

11. Anexos

Número de mancha	Embrión somático pre-globular	Embrión somático globular
440		
568		
575		
622		
626		
629		
686		

704						
708						
879						
955						
1254						

Anexo A. Imágenes ampliadas de las manchas secuenciadas que se sobreexpresaron en embriones somáticos en estado globular de *J. curcas* en comparación a los embriones somáticos en estado pre-globular

Número de spot	Embrión somático pre-globular	Embrión somático globular	Número de spot	Embrión somático pre-globular	Embrión somático globular
402	ND		1026	ND	
782	ND		1100	ND	
921	ND		1227	ND	
1008	ND		1274	ND	

Anexo B. Imágenes ampliadas de las manchas secuenciadas que se sólo se detectaron en embriones somáticos en estado globular de *J. curcas* en comparación a los embriones somáticos en estado pre-globular. ND significa que no se detectaron las manchas en los embriones somáticos pre-globulares.

EL JURADO DESIGNADO POR EL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, APRUEBA LA TESIS QUE PRESENTA PARA SU EXAMEN FINAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA, LA C. ANAMAREL EDZNÁ MEDINA HERNÁNDEZ, EL DÍA TREINTA DE SEPTIEMBRE DEL AÑO DOS MIL DIECISEIS.

Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia

Dra. María Teresa Ponce Noyola

Dra. Gabriela Trejo Tapia