

# **DIVERSIDAD DE *Jatropha curcas* L.**

## **CONSERVACIÓN Y PROPAGACIÓN.**

### **DIVERSIDAD GENÉTICA**

El estudio de diversidad genética proporciona la base fundamental para la evaluación de recursos fitogenéticos, ya que su conservación e incremento es uno de los principios básicos de la gestión forestal sostenible. La alta variabilidad genética es responsable de los procesos de adaptación entre factores bióticos y abióticos extremos que a su vez aseguran la persistencia frente a los riesgos a los que están sometidas a las masas forestales. Esta diversidad ha permitido que los árboles se adapten a condiciones cambiantes y adversas durante miles de años y ha traído como resultado una variedad única e insustituible de recursos genéticos de los árboles. No obstante, la gran mayoría de la diversidad genética forestal permanece desconocida, especialmente en regiones tropicales (Alia R. y col., 2003).

Las estimaciones del número de especies arbóreas varían de 80, 000 a 100, 000; sin embargo, menos de 500 se han estudiado con algo profundidad en cuanto a su potencial presente y futuro. Incrementar el uso sostenible de la diversidad vegetal podría ser la clave para hacer frente a las dificultades de los recursos genéticos en la agricultura, (Diouf Jacques, FAO). Existen miles de variedades silvestres de cultivos que deben ser recolectadas, estudiadas y documentadas. La información genética que albergan determinadas especies es crucial para el desarrollo de nuevas variedades de crecimiento rápido, elevado rendimiento y resistentes al calor, la sequía, salinidad y las plagas y las enfermedades.

Existen diversos métodos de estudio, algunos ligados a caracteres relacionados con la adaptación o comportamiento en diferentes ambientes de los materiales ensayados (clones, progenies o procedencias). En general, esto obliga a ensayos experimentales comparativos en múltiples localidades, idealmente cubriendo la totalidad de la distribución natural de la especie. Estos ensayos de gran importancia en la genética forestal ocupan considerables extensiones de terreno y tienen un largo plazo de ejecución. Por otro lado los estudios utilizando marcadores moleculares analizan los aspectos de reproducción y su regeneración así como estimar parámetros genéticos en poblaciones de tratamientos silvícolas o aquellas que son objeto de conservación (Piñero y col, 2007). Los estudios sobre variación geográfica en especies forestales concentraron en caracteres de crecimiento como la altura o el volumen. En la actualidad con la incorporación de potentes marcadores moleculares se ha podido avanzar en el

conocimiento de la estructura geográfica de la diversidad y en los procesos de recolonización (Alia R. y col., 2003).

México es considerado un país megadiverso, tiene entre los nueve países con el mayor grado de diversidad cultural y goce con mayor grado de diversidad biológica (Moran, 1997). Es considerado como uno de los reservorios de diversidad vegetal más importantes del planeta, con 25.000 a 30.000 especies de plantas vasculares. Asimismo, es una de las áreas con mayor diversidad cultural del mundo con 58 grupos étnicos indígenas y cerca de 291 lenguas, y uno de los principales centros de domesticación de plantas. Las investigaciones etnobotánicas han documentado en México alrededor de 7.000 especies de plantas útiles, de las cuales alrededor de 200 especies nativas se encuentran en estado avanzado de domesticación, incluyendo algunas especies de plantas de importancia mundial tales como el maíz, frijoles, chiles, calabazas, cacao, algodón, agaves, amarantos, entre otras, así como numerosas especies de importancia nacional o regional (Casas y Parra, 2007).

Uno de ellos es *J. curcas*. El género *Jatropha* (*Euphorbiaceae*) especie que tienen importancia económica debido a su alto contenido de aceite. *Jatropha curcas* es una planta con aplicación potencial para la producción a escala industrial de biodiesel. Se considera que *J. curcas* es originaria de México y América central aunque crece en la mayoría de los países tropicales, su distribución geográfica es extensa y en forma silvestre o cultivada puede encontrarse en países como México, sureste de Asia, India, África y Latinoamérica. En México la especie se localiza principalmente en los estados de Guerrero, Hidalgo, Sonora, Sinaloa, Oaxaca, Quintana Roo, Yucatán, Chiapas, Tamaulipas, Puebla, Veracruz y Morelos, formando parte de la vegetación de dunas costeras y la selva baja caducifolia (Schmook y col., 1997). El fruto de *J. curcas* es una cápsula con tres semillas, de color blanco cubiertas con una testa oscura (Heller, 1996). Llegan a pesar 0.75 g y tienen un alto contenido de aceite y proteína, 58-60% y 27-32% respectivamente (Martínez-Ayala y col., 2002).

A *Jatropha curcas* se le han caracterizado ciertas proteínas las cuales se encuentran presentes en la harina desgrasada que se obtiene tras la extracción del aceite, esta harina tiene alto contenido proteico, en torno al 60% y podría ser aprovechada tras su extracción para alimentación animal y humana. Además, la calidad biológica de las proteínas de *J. curcas* es muy similar a la del frijol, la lenteja y superior a la del maíz (Castillo y col., 1991; Makkar y col., 1998). Sin embargo, la semilla contiene compuestos tóxicos denominados ésteres de forbol (Makkar y col., 1998) que han limitado su uso en alimentación. Los ésteres de forbol (12-desoxi-16-hidroxiforbol) pueden causar diversos trastornos como pérdida del equilibrio, midriasis y diarrea extrema. En este sentido, es destacable que solo

en México se ha descrito la existencia de variedades no tóxicas, sin esteres de forbol, en los estados de Veracruz, Morelos, Puebla y Quintana Roo, cuyos frutos, después de tostar, son usados para la preparación de platos tradicionales (Makkar y col., 1999, Martínez-Herrera y col., 2006).

El hecho de que *Jatropha curcas* se haya adaptado a una amplia gamma de condiciones edáficas y ecológicas sugiere que existe considerable variabilidad para ser explotable. Estudios realizados en diferentes accesiones de Asia y Africa han contribuido con la información fundamental para la reproducción y mejoramiento genético. Existen reportes que indican, que no hay diferencias morfológicas significativas entre las variedades tóxicas y no tóxicas, excepto por el contenido de esteres de forbol en las variedades tóxicas (Ghosh y col., 2007; Makkar y col., 1997) y también se han evaluado una variedad no tóxicas de México y 42 variedades tóxicas de India, usando marcadores RAPD y AFLP y no encontrando diferencias morfológicas significantes entre estas variedades. (Sudheer Pamidiamarri y col., 2008).

Debido al interés que se tiene sobre esta planta en el país, es necesario realizar análisis de variabilidad genética ya que no es una planta totalmente domesticada, carece de proceso agronómico, no existe material seleccionado y no hay conocimiento preciso sobre el potencial productivo ni de la fenología e incluso se desconoce el número de variedades. Con esto el análisis de variación a escala regional se relacionan con la caracterización de procedencias para su uso en repoblaciones. Los estudios realizados para su caracterización permitirán determinar sus niveles de diversidad y la posibilidad de diferenciarlas así como evaluar los riesgos asociados al movimiento de semillas entre zonas con características ecológicas distintas (Piñero y col. 2007).

## ETAPA 1

# ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Jatropha curcas* EN MÉXICO

El polimorfismo genético es una característica importante de las poblaciones naturales, proporciona bases necesarias para la adaptación en un medio variante y también para la evolución. Puede ser reducido en poblaciones que se reconstituyen después de haber sufrido una disminución fuerte de su abundancia o que se encuentran fragmentadas en subpoblaciones más o menos aisladas unas de otras (Dajoz y Leiva, 2003).

El avance de la biología molecular ha permitido detectar cambios en el genotipo mediante el diagnóstico del DNA. Los primeros marcadores moleculares desarrollados a finales de los 70 se basaron en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades y poblaciones de distinto origen geográfico. Pero esta técnica tenía una limitación muy importante, no es capaz de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, de un medio ambiente a otro, y de una época del año a otra. Los avances de la tecnología del DNA recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el DNA, consiguiendo estabilidad en la identificación de las especies y variedades (Claros, 2002).

Este tipo de marcadores moleculares han permitido conocer la estructura de las poblaciones en animales, plantas y microorganismos. Han sido útiles en estudios de taxonomía y permiten estudiar el origen de la evolución de las razas dentro de una población facilitando la identificación de genes de interés y la construcción de mapas genéticos (Michelmore y col., 1987). La similitud genética estimada por la huella genética, es una herramienta útil en la selección de genotipos y para proteger los derechos de propiedad del germoplasma liberado, así como para la producción y verificación de la pureza genética de la semilla.

En Brasil se realizan estudios genéticos de *Jatropha curcas*, obtuvieron el tamaño de su genoma (C= 416 Mb) lo que se determinó realizando un estudio de flujo citométrico, encontraron que es un genoma de tamaño pequeño similar al del arroz (Carvalho y col., 2008).

En India se llevó a cabo la secuenciación del genoma de *Jatropha curcas*, contiene 163, 856 bp con 110 genes distintos (Mehar y col., 2010).

Las técnicas moleculares constituyen herramientas adecuadas para determinar la variabilidad genética de la población de una especie determinada, son capaces de detectar las diferencias que existen entre individuos a nivel de ADN proporcionando el perfil genético preciso de cada organismo estudiado, similar a una huella dactilar. Estas técnicas ponen en evidencia mutaciones de ADN entre los distintos individuos por lo que se pretende determinar el nivel de polimorfismo, es decir, cuanto más similares genéticamente sean, compartirán mayor cantidad de fragmentos de ADN de igual tamaño y cuanto más polimórficas sean compartirán menor cantidad de fragmentos de ADN.

En las últimas dos décadas se han utilizado con éxito técnicas moleculares para el análisis del ADN con el objetivo de caracterizar y distinguir entre especies de plantas, animales y microorganismos, se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite sintetizar "in vitro" de manera exponencial fragmentos aleatorios de ADN a partir de un genoma que sirve como molde. Una de las técnicas más utilizadas en estudios para diferenciación de especies es RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) utiliza iniciadores con secuencias de bases arbitrarias para la amplificación, la probabilidad de que la amplificación ocurra es bastante alta, ya que los iniciadores son secuencias de 6-10 pb que hibridan con el ADN a bajas temperaturas (36°C) los polimorfismos detectados con RAPD se comportan como marcadores dominantes y se heredan en forma mendeliana, se pueden generar en cualquier especie vegetal, animal o microorganismos. Los productos amplificados se separan en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, en todos los geles se incluye un marcador de peso molecular de 1 Kb (Gigco BRL). Con base a la presencia o ausencia de bandas de ADN de un determinado peso molecular se conformará una matriz binaria donde el dígito "1" representa la presencia y el "0" representa la ausencia de esa banda en particular. El polimorfismo se cuantifica en porcentaje, que es la cantidad de alelos polimórficos entre la cantidad total de alelos amplificados por cien.

Las técnicas RAPD han sido muy utilizadas para determinar la huella genética de organismos (Moreno y col., 1998; Blair y col., 1999; Divaret y col., 1999; Gilbert y col., 1999; Hess y col., 2000; Basha and Sujatha, 2007; Shweta Gupta y col., 2008; Basha y col., 2009; Basha y Sujatha, 2009). Utilizando 42 accesiones de *J. curcas* de diferentes regiones de India y una no tóxica de México, se reportó 42% de polimorfismo con RAPD y 33.55% con ISSR, un modesto nivel de variabilidad genética de *J. curcas* en India (Basha y Sujatha, 2007). En estudio de variabilidad genética de accesiones de *Jatropha curcas* procedentes de India reportaron baja variabilidad usando las técnicas RAPD y AFLP (Sudheer

Pamidimarri y col., 2009) así mismo en China estudiaron la variabilidad genética de 37 accesiones de *Jatropha curcas* de Hainan China y 1 accesión de Indonesia usaron la técnica AFLP y encontraron un intervalo de similaridad de (0.866-0.977) entre las poblaciones indicando una baja variabilidad genética de *Jatropha curcas* en China (Jun-ling y col., 2010)

Shweta y Gupta (2008) obtuvieron 84% de polimorfismo por RAPD y 76.5% por ISSR, ambas técnicas fueron igualmente exitosas en el análisis de la diversidad genética de *J. curcas* en India. Senthil Kumar y colaboradores (2008) caracterizaron molecularmente 11 accesiones de un germoplasma de *J. curcas* de la India y reportaron 98.14% de polimorfismo con ISSR. Basha y Sujatha (2009) realizaron análisis genético de 6 especies de *Jatropha curcas* usando las técnicas RAPD e ISSR para la determinación de la diversidad genética, reportaron, 98.5% de polimorfismo con ambas técnicas siendo igualmente eficientes en la diferenciación de especies de *Jatropha curcas* en India. Posteriormente, se realizaron estudios de caracterización bioquímica y determinación de relaciones genéticas en un germoplasma de *Jatropha curcas* con accesiones de diferentes regiones del mundo y 28 accesiones de México. Mediante el uso de las técnicas RAPD e ISSR se observó una variabilidad genética baja para accesiones de las diferentes regiones de India y una alta diversidad entre los ecotipos Mexicanos, lo que indica claramente la necesidad de la explotación de germoplasma de *Jatropha curcas* de México (Basha y col., 2009).

En este trabajo se usaron las técnicas moleculares de DNA (RAPD) ambas se basan en la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los RAPD, consisten en la amplificación de fragmentos de ADN con un solo oligonucleótido y permite obtener millones de copias de un fragmento de ADN que sirve como molde gracias a la acción de la enzima Taq polimerasa ya que polimeriza nucleótidos de manera fiel y permite la formación de nuevas moléculas de ADN. Estas técnicas moleculares se han estado usando para la detección de polimorfismos entre organismos en base a la determinación de la huella genética (Martín y Sánchez-Yélamo, 2000; Blair y col., 1999; Moreno y col., 1998) y estudios de genética poblacional (Wolfe y col., 1998).

Es necesario conocer el contenido genético del germoplasma de *Jatropha curcas* que existe en México para poder ubicar las variantes alélicas que puedan ser útiles para su mejoramiento y conservación.

## **VARIABILIDAD GENÉTICA**

Históricamente los estudios de diversidad genética han estado relacionados con datos como la anatomía comparativa, morfología, embriología y fisiología. En la actualidad

existen colecciones de germoplasmas con genotipos de alto valor susceptibles de ser usados en los programas de mejoramiento genético y en muchas ocasiones se desconoce la variabilidad genética y la relación que existe entre materiales, lo que impide su utilización.

La variabilidad genética son polimorfismos que existen entre individuos a nivel de ADN que imprimen la capacidad para poder adaptarse a los cambios ambientales, cuanto más diferencias existan entre los individuos la población tendrá más oportunidad de sobrevivir, sin embargo en este estudio la variabilidad la usamos para ubicar las variantes alélicas que nos puedan servir como base para un futuro mejoramiento de la especie.

Los estudios de variación genética han constituido en los últimos años, una herramienta no sólo de interés académico, sino también de aplicación práctica sobre todo en la conservación de especies en extinción. El conocimiento sobre la variación de caracteres adaptativos, derivado del establecimiento de ensayos en cada zona, permiten establecer recomendaciones sobre las condiciones adaptativas a cada zona y la caracterización de especies y poblaciones mediante caracteres moleculares.

La variabilidad genética constituye un componente importante de la Biodiversidad y se debe tomar en cuenta para su mantenimiento y conservación (Moritz y Faith, 1998). Leding (1988) propone que, de ser posible, habría que conservar todos los genes, pues no es posible predecir qué es lo que será útil en el futuro. Erikson y col., (1993) consideraron que los objetivos de la conservación deben ir más allá de preservar todos los genes, los individuos, las poblaciones, las especies o los ecosistemas en sus sitios y tamaños actuales; el recurso es algo dinámico que responde a los cambios ambientales, y el objetivo debería ser preservar esa capacidad de adaptación ante futuras perturbaciones. El uso de datos moleculares son una aproximación adecuada para determinar los procesos que actúan o han actuado sobre una especie, ya que proporcionan información tanto sobre la distribución actual de la diversidad genética neutral (es decir no sujeta a fuerzas selectivas) y los procesos que actúan sobre ella como sobre la historia de la población, en particular sobre los patrones geográficos.

## **ANÁLISIS RAPD**

Los análisis por la técnica RAPD por sus siglas en inglés (*Random Amplified Polymorphic DNA*) DNA polimórfico amplificado al azar, es un análisis de polimorfismo basado en la amplificación de segmentos de DNA al azar utilizando iniciadores de secuencias arbitrarias que se unen a muchas regiones del genoma simultáneamente. Son rápidos, económicos y fáciles de realizar; han sido extensamente utilizados, es un sistema de

marcadores que utilizan oligonucleótidos cortos, de secuencias arbitrarias y de baja astringencia que permiten amplificar fragmentos directos de DNA mediante la técnica de PCR (Williams y col.,1990).

En teoría, los oligonucleótidos se unen a muchas regiones del genoma simultáneamente. Sin embargo, la amplificación solo ocurrirá en aquellas regiones en las que el extremo 3' del primer se une al DNA, y se enfrenta a su vez a otro oligonucleótido que no está alejado más de 3Kbp, por lo que los sitios de unión de los oligonucleótidos deben estar en repeticiones invertidas por lo que esta técnica amplifica diversas secuencias de DNA de tamaño variable.

Este tipo de técnicas moleculares han permitido conocer la estructura de las poblaciones en animales plantas y microorganismos, además permiten establecer el origen y la evolución de las razas dentro de una población facilitando la identificación de genes de interés y la estructura de mapas genéticos. (Michelmas, 1987).

La técnica RAPD es aplicable a cualquier especie, presentando altos porcentajes de polimorfismo. La desventaja que presentan es que no son fácilmente reproducibles entre laboratorios, es dominante y presenta solamente la mitad de la información genética como marcadores dominantes, o sea que no puede diferenciar entre heterocigotos y homocigotos, la reacción es muy sensible a las condiciones de amplificación y a la calidad y concentración del ADN, lo que puede influir en la reproducibilidad del método.

Los RAPD han sido utilizados para determinar la variación intra e interespecífica en híbridos somáticos de papa y huella genética (Demek y col.,1994; Gorg y col., 1983).

### ***COLECTA E IDENTIFICACIÓN DE LAS POBLACIONES DE *Jatropha curcas* L. EN LOS ESTADOS DE SINALOA, VERACRUZ, PUEBLA, MORELOS Y CHIAPAS.***

En el transcurso del proyecto, se realizaron colectas en los Estados de Puebla Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Sinaloa, San Luis Potosí, Morelos, Yucatán y Chiapas. Teniendo un total de 140 accesiones de las cuales, 43 accesiones pertenecen al Estado de Puebla, 13 al Estado de Veracruz, 5 al Estado de Oaxaca, 6 a Michoacán, 8 accesiones del Estado de Sinaloa, 1 a San Luis Potosí, 2 a Morelos al igual que Yucatán y 60 del Estado de Chiapas. Las accesiones colectadas a los Estados de Sinaloa son producto de plantaciones obtenidas de semillas originarias de la India (S1, S2, S3 y S4), y de semillas de Veracruz, Puebla y Morelos. En el mismo caso Yucatán, siendo accesiones originarias de Puebla y Filipinas sembradas en este Estado (Anexo 1).



Los frutos colectados se despulparon para obtener las semillas las cuales se dejaron secar y posteriormente se guardaron en bolsas de polietileno (Figura 1) En algunos casos se cuenta con información de la edad y nombre del propietario, uso tradicional dado según la región y en el transcurso de las colectas se identificaron algunas plagas y enfermedades. De las 140 accesiones se eligieron 32 para realizar un análisis de variabilidad genética, por lo que se tomaron diferentes accesiones de una misma localidad de un mismo Estado.



Figura 1.- Colecta en Sierra Nororiental de Puebla.

### ***Establecimiento de la técnica de extracción de ADN genómico para las hojas de las plantas de *Jatropha curcas* L.***

#### **Colecta de muestras**

De los frutos de árboles donadores de *Jatropha curcas* nativas de México. Se trabajó con diversas accesiones de *J. curcas* de los siguientes Estados: Sinaloa, Morelos, Michoacán, Veracruz, Chiapas, Yucatán, San Luís Potosí y Puebla (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Accesiones analizadas

N. P.	NO. DE MUESTRA	LOCALIDAD	ESTADO	COORDENADAS		
				ALTITUD	NORTE	OESTE
1	6	HUTZILAN	PUEBLA	913.2 m	19°59	97°42
2	16	HUTZILAN	PUEBLA	920.4 m	19°58	97°41
3	18	HUTZILAN	PUEBLA	881.0 m	19°58	97°41
4	19	HUITZILAN	PUEBLA	881.0 m	19°58	97°41
5	20	JALPAN	PUEBLA	586.9 m	20°26	97°51
6	21	JALPAN	PUEBLA	534.6 m	20°27	97°50
7	22	JALPAN	PUEBLA	534.6 m	20°27	97°50
8	42	PANTEPEC	PUEBLA	615.2 m	20°31	97°56
9	44	SUMIDERO	VERACRUZ	1,071 m	18°54'	97°01
10	45	SUMIDERO	VERACRUZ	1,077 m	18°59'	97°01
11	46	ALLENDE	VERACRUZ	200.0 m	18°25'	94°18'
12	47	ALLENDE	VERACRUZ	100.0 m	18°25'	94°18'
13	48	XOMAPA	VERACRUZ	1,100 m	19°47'	97°16'
14	49	CARRANZA	CHIAPAS	880.0 m	15°25'	92°33'
15	50	VILLAFLORES	CHIAPAS	570.0 m	16°17'	93°16'
16	51	TONALA	CHIAPAS	80.00 m	15°52'	93°28'
17	52	SILTEPEC	CHIAPAS	1620.0 m	15°34'	92°22'
18	53	LA CONCORDIA	CHIAPAS	580.0 m	16°13'	92°48'
19	54	FRONTERA COMALAPA	CHIAPAS	675.0 m	15°41'	92°07'
20	55	MAZATAN	CHIAPAS	25.00 m	74°24'	92°27'

### Extracción de DNA de plantas de *Jatropha curcas*

La extracción se realizó mediante el método Doyle y Doyle, (1990) con el que se pudo aislar ADN de *Jatropha curcas* con efectividad. Las semillas colectadas se germinaron para ocupar las hojas en la extracción de ADN, estas hojas se sometieron a maceración con Nitrógeno líquido para la conservación del material vegetal (Figura 2) se molieron 0.3 g de este tejido joven de hojas en 200 µl de buffer CTAB 4% (4% de CTAB, 20 mM EDTA, 1.4M de NaCl, 1 mM Tris-HCl pH 8.0 y 0.2% de mercaptoetanol). El CTAB se disuelve a 60°C y el mercaptoetanol se adicionó antes de realizar la extracción. Se agregaron 600 µl de buffer CTAB y se agitó e incubó a 60°C por 30 min. Posteriormente se agregaron 600 µl de cloroformo: alcohol- isoamílico (24:1v/v). Para la cuantificación del ADN se tomaron 4 µL

de ADN que se extrajo de la muestra, se agregaron 1,996  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril, se tomaron lecturas a dos longitudes de onda 260 y 280 nm .

Concentración de ADN en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  = (factor de dilución) (50) (lectura en 260 nm).

El sobrenadante se trató con RNasa a (100 g/ml), se incubará a 37°C por 30 min y se realizaron dos extracciones con cloroformo: alcohol- isoamílico (24:1v/v). El DNA precipitado con isopropanol se lavó dos veces con etanol al 70%, la pastilla de DNA se seco al aire y se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada estéril Milipore se almacenó a -20°C hasta su uso en el análisis de PCR. Se corroboró el efecto mediante el montaje de un gel de agarosa, corresponden al ADN ya purificado con un peso molecular de 23,130 BP



Figura 2.- Extracción de ADN de *Jatropha curcas*, por el método Doyle y Doyle.

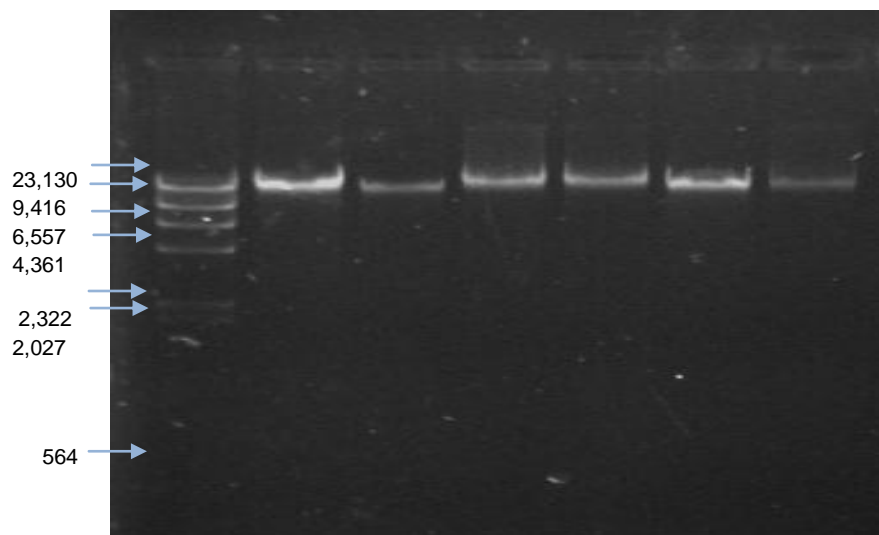


Figura 3. ADN purificado de *Jatropha curcas* L. M representa el marcador de pares de bases (PB)  $\lambda$  Hindi III Digest SIGMA

Después de haber cuantificado el ADN y de llevar a cabo los cálculos correspondientes para conocer su concentración, se realizó un análisis de RAPDs de diferentes muestras colectadas en diferentes Estados, para esto se ocupó el oligonucleótidos RAPD Analysis

***Obtención de los patrones de las poblaciones de *Jatropha curcas* de los estados de Sinaloa, Veracruz, Puebla, Morelos y Chiapas.***

**Análisis RAPD**

Para el análisis RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar), se utilizaron primer decámeros de secuencias arbitrarias (Operon Technologies Inc. Alameda, CA. USA) .La amplificación de DNA se lleva a cabo en un termociclador automático (Cycler-Biorad) por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción se lleva a cabo en un volumen de 25µl conteniendo una mezcla final de: 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1 Triton X-100, 0.2 mM de cada dNTP's, 3.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.4 M de primer, 50 ng de DNA y 1U Taq DNA polimerasa (Promega USA). Todos los componentes de la mezcla, con excepción de la Taq ADN polimerasa y el ADN molde se homogeneizan por agitación en vórtex por unos segundos. Durante la preparación de la mezcla de reacción, los tubos se deben mantener en hielo. Hecha la mezcla se homogeneiza por agitación leve.

La amplificación se realiza con las siguientes condiciones: En iniciación 94°C por 3 min en la primera etapa de desnaturalización (42 ciclos a 94°C por 3 s), alineación a 32°C por 1 min, extensión 72°C por 2.5 min y un ciclo final de extensión a 72°C por 4 min. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. La concentración de agarosa a utilizar fue al 2%, el gel se sumerge en la cámara de electroforesis y se cubre con un buffer de corrida (TAE 1x) hasta 0.5 cm por encima del gel, el bromuro de etidio se intercala en el ADN permitiendo su visualización mediante un transiluminador de luz UV, los resultados se registraron en un foto documentador de imágenes ( Geldoc, Biorad) y se analizaron las bandas amplificadas separadas por pesos moleculares.

Los patrones de RAPD obtenidos mediante los iniciador 1 presentan productos de amplificación así como la existencia de polimorfismos entre los individuos evaluados dentro de las poblaciones e intrapoblacionales; no obstante, esta variabilidad genética es relativamente baja según los resultados que arroja esta metodología. Por lo que se sugiere realizar otros tipos de ensayos que corroboren estos datos ya que esta metodología a pesar de contar con varias ventajas, se sabe que tiene baja selectividad y produce

resultados poco específicos y difíciles de reproducir lo que habría que probar con más iniciadores estas muestras.

Respecto a los resultados obtenidos la amplificación con el iniciador uno se observaron bandas las cuales, el peso molecular de las mismas fue de entre 1998 y 485pb (Figura 4 ).

En la figura 4. se distingue M como : El Marcador molecular de 100 pares de bases y los números: 6, 16, 18 y 19 como muestras procedentes de Huitzilán, Puebla; 20, 21 y 22 de Jalpan, Puebla; 42 de Pantepec, Puebla; 44 y 45 de Sumidero, Veracruz; 46 y 47 de Allende, Veracruz; 48 procedente de Xomapa, Veracruz; 49 de Carranza, Chiapas; 50 Villaflores, Chiapas; 51 de Tonalá, Chiapas; 52 Siltepec, Chiapas; 53 La Concordia, Chiapas; 54 Frontera Comalapa, Chiapas y 55 de Mazatán, Chiapas.

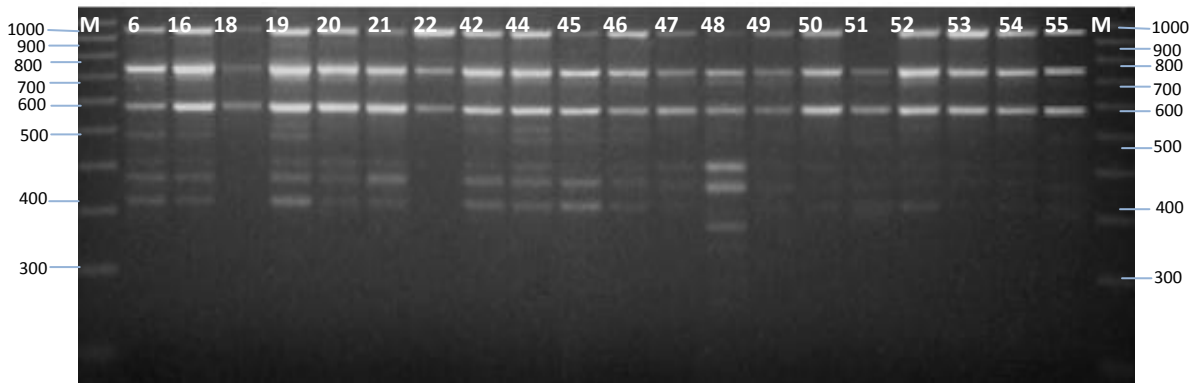


Figura 4.- Gel Figura 18. Perfiles de RAPD's iniciador uno (5'-d[GGTGCGGGAA]-3'):

Para determinar la relación existente entre la variabilidad genética de las poblaciones de *Jatropha curcas*, se utilizó el método promedio aritmético WARDs (Figura 5) En donde se indican las muestras número 6, 16, 18 y 19 procedentes de Huitzilán, Puebla; 20, 21 y 22 de Jalpan, Puebla; 42 de Pantepec, Puebla; 44 y 45 de Sumidero, Veracruz; 46 y 47 de Allende, Veracruz; 48 procedente de Xomapa, Veracruz; 49 de Carranza, Chiapas; 50 Villaflores, Chiapas; 51 de Tonalá, Chiapas; 52 Siltepec, Chiapas; 53 La Concordia, Chiapas; 54 Frontera Comalapa, Chiapas y 55 de Mazatán, Chiapas.

De acuerdo a los resultados observados en los dendogramas se puede inferir que las muestras amplificadas mediante el iniciador uno se agrupan de acuerdo a la región de donde fueron recolectadas las semillas (Figura 5).

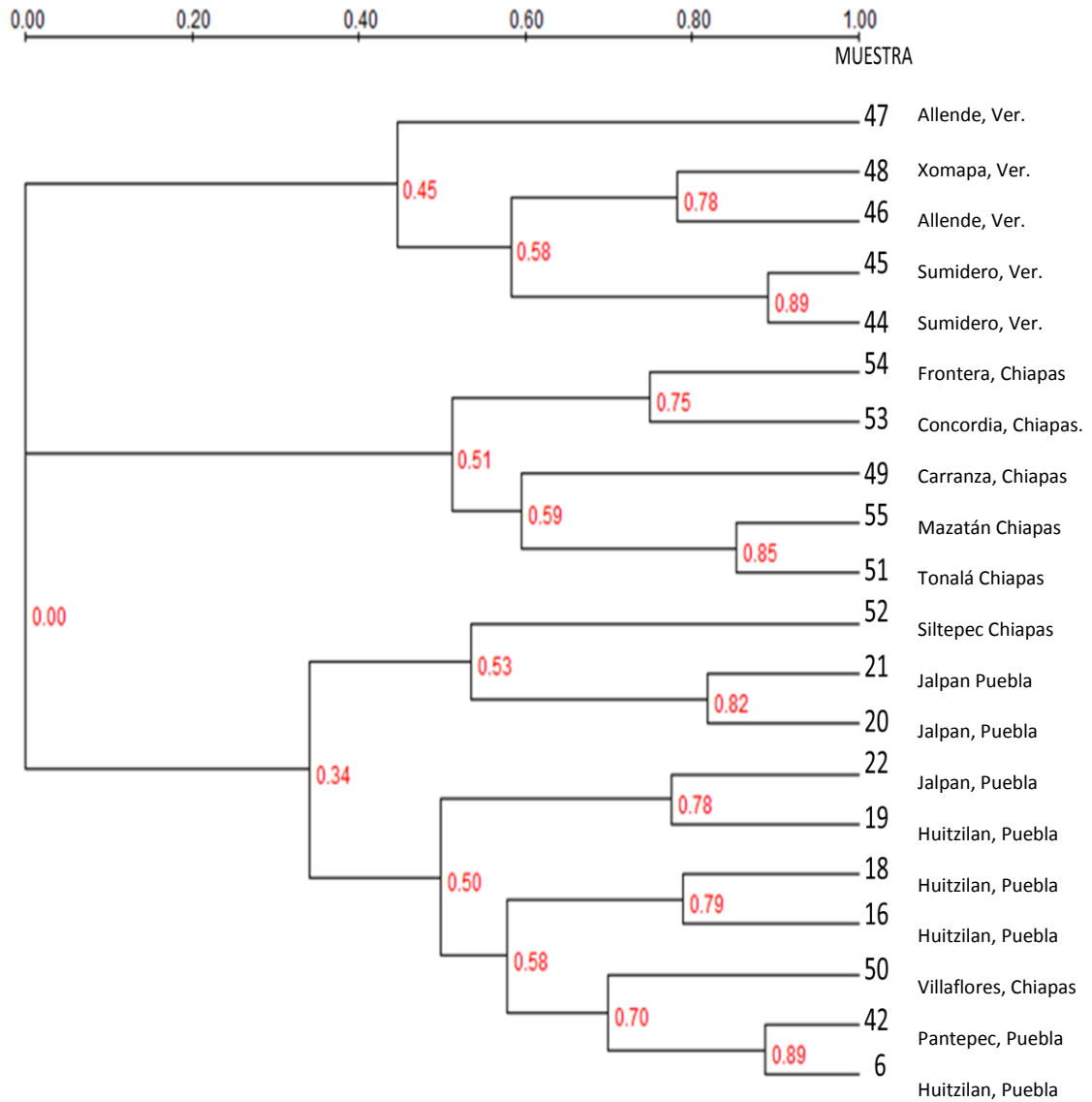


Figura 5.- Dendograma método Ward

En donde claramente se forman tres grupos los cuales corresponden a las muestras según el lugar de origen donde fueron tomadas quedando agrupadas como grupo I muestras procedentes del Estado de Veracruz, grupo II muestras procedentes del Estado de Chiapas y grupo III del Estado de Puebla. No obstante en el grupo III se observan agrupadas también muestras (51, 52) del Estado de Chiapas.

Al igual que las accesiones anteriores se analizaron 32 más para conocer la variabilidad genética que hay entre estas y se realizaron dendogramas por el método Wards.

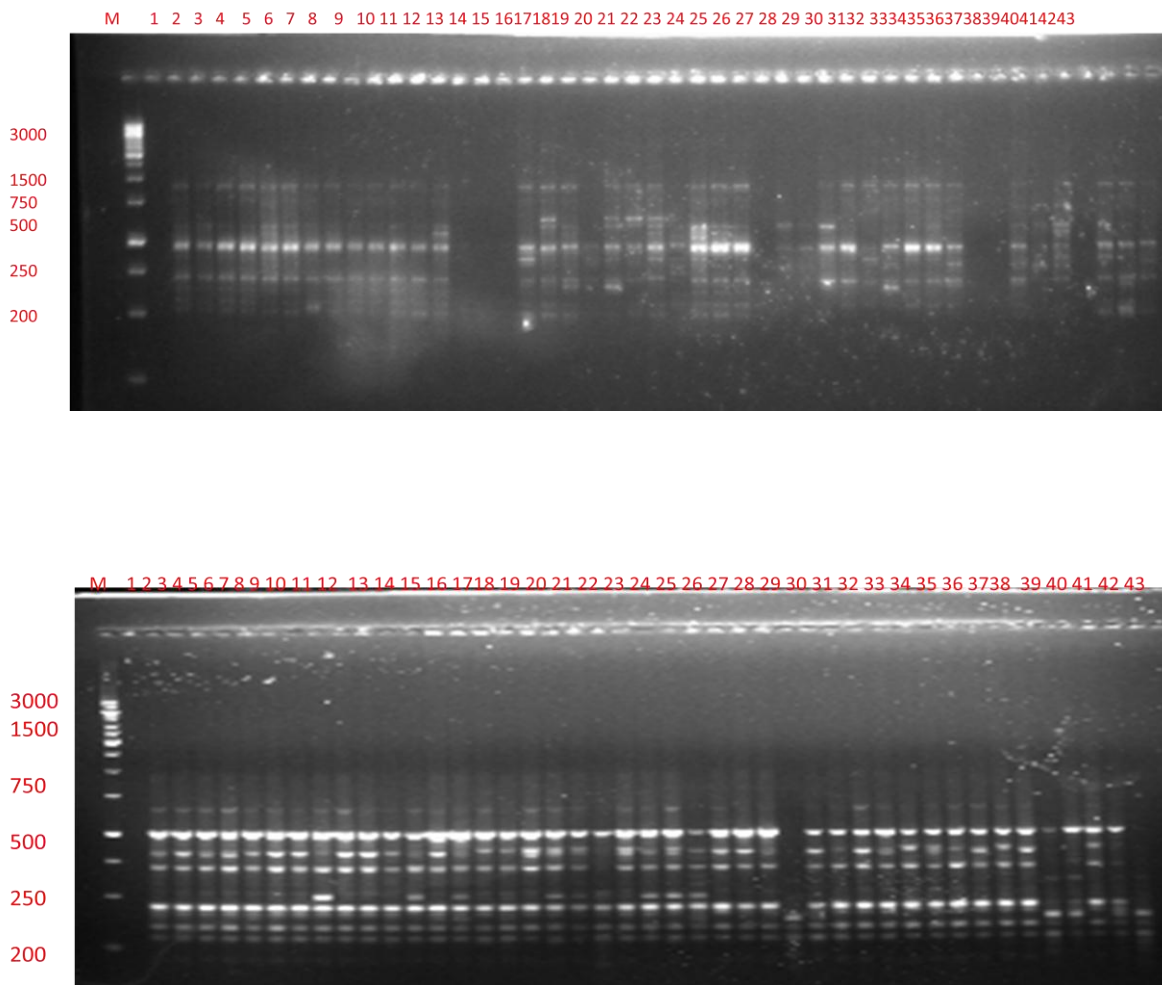


Figura 6.- Perfiles de RAPD con diferentes oligonucleótidos

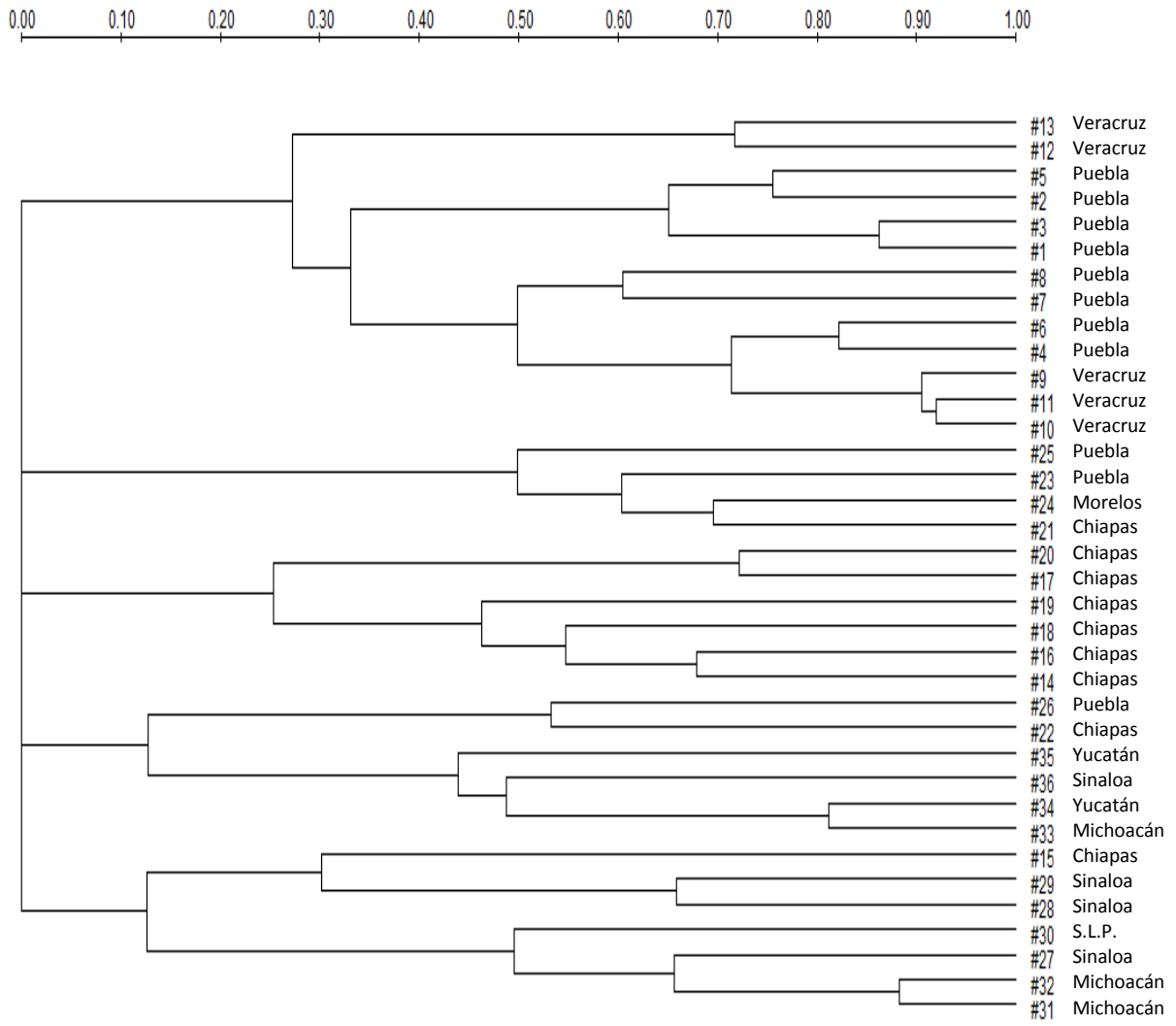


Figura 7 .- Dendograma primer 6



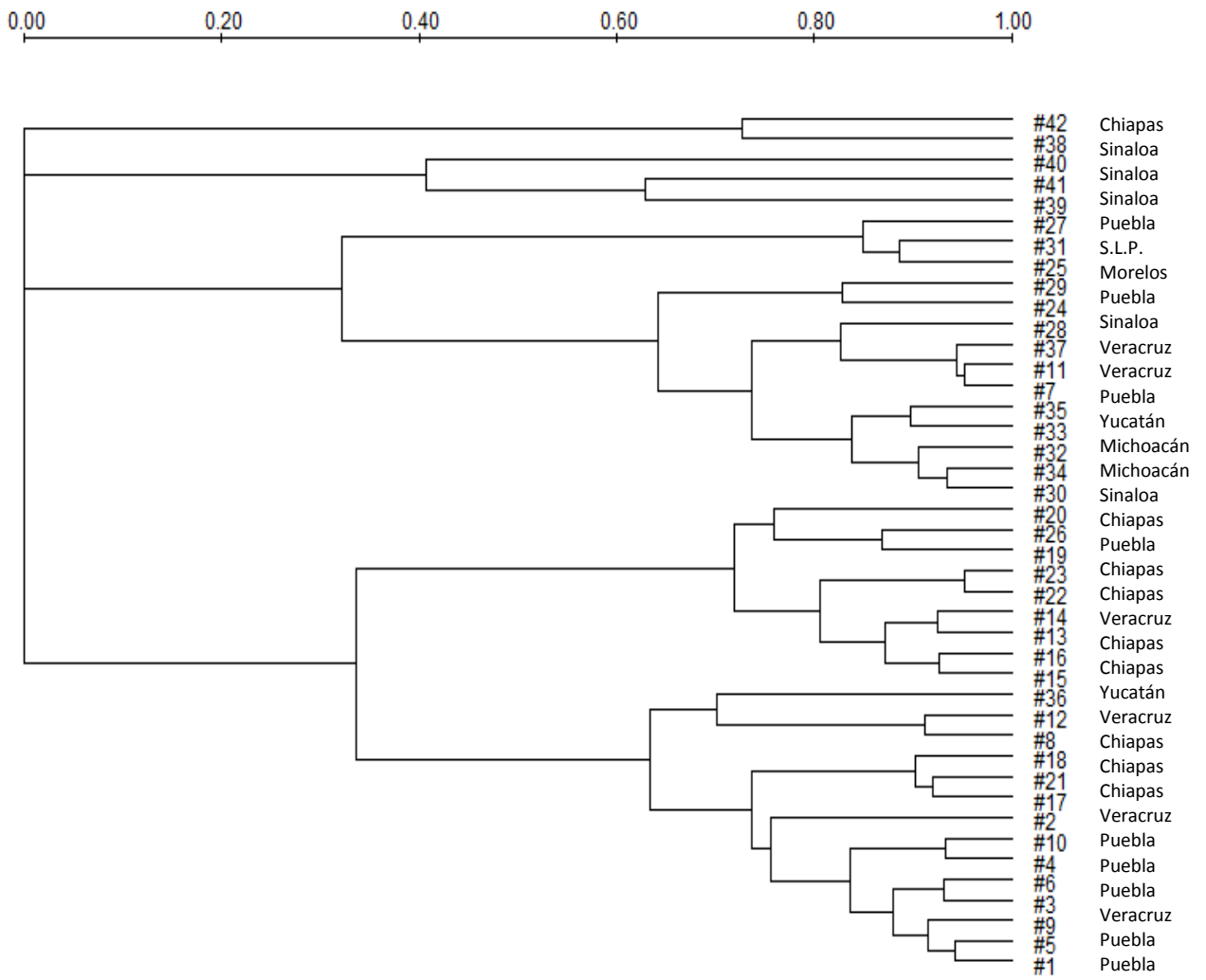


Figura 8.- Dendograma primer 5

**Análisis de la diversidad genética entre y dentro de poblaciones de *Jatropha curcas*, identificando los grupos de ligamiento y las distancias entre marcadores basados en los patrones.**

Los resultados obtenidos mediante RAPD's nos indican el bajo polimorfismo existente entre las muestras de diferentes Estados de México; no obstante, es necesario realizar otras metodologías con mayor reproducibilidad para corroborar esta premisa.

Con los resultados obtenidos mediante esta técnica se puede inferir que las muestras forman distancias génicas muy reducidas en *Jatropha curcas*, resultados semejantes se muestran en el análisis realizado por Basha y Sujatha, 2007 en donde existen pequeñas variaciones entre las muestras tomadas en diferentes regiones de la India; sin embargo, estas presentan amplia variabilidad con una muestra procedente de México reportada como no tóxica.

Esta baja variabilidad genética, quizás se deba a que los especímenes de donde se toman dichas muestras fueron cultivados de forma vegetativa (esquejes) ya que por lo regular los lugareños acostumbran a optar por dicha propagación debido al uso que le dan ya que para el crecimiento de la planta es más rápido en contraste con la semilla, lo que hace que disminuya la variabilidad entre estas.

Pudiendo decir, que si se realizan cultivos mediante propagación vegetativa, con fines comerciales se pone en riesgo al cultivo debido a la isogénia, por lo que al haber baja diversidad ciertos fenómenos como los cambios climáticos, la llegada de nuevos organismos patógenos o competidores así como los contaminantes son fenómenos que condenarían a las especies a la desaparición en ausencia de la diversidad genética, ya que esta es la responsable de el origen de las respuestas evolutivas y adaptativas de los seres vivos y es un seguro frente a las modificaciones del medio.

Se sabe que las muestras colectadas en el Estado de Chiapas son tóxicas por lo que probablemente se presente polimorfismo por los compuestos que poseen, ya que de acuerdo a la composición del suelo, clima, plagas y factores externos característicos de cada región influyen a que la planta sinteticen metabolitos secundarios en diferente concentración como defensa, tal como sucede con otras especies como *Thymus vulgaris* (tomillo) donde el polimorfismo que se ha registrado afecta la composición química en el contenido de terpenos producidos por la planta los cuales son seis quimiotipos. La distribución de dichos quimiotipos en esta especie se produce a distancias muy cortas dependiendo de la naturaleza del suelo y parece tener un valor adaptativo. Por lo que probablemente ocurra en *Jatropha curcas* al registrarse semilla tóxica y no tóxica en diferentes regiones del país.

## ETAPA 2

### SELECCIÓN DE GENOTIPOS SOBRESALIENTES Y DISEÑO DE ESTRATEGIAS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE BANCOS DE GERMOPLASMA

La planta del piñoncillo ha demostrado tener muchas ventajas nutrimentales (Makkar y col., 1998), por lo que en la actualidad es cultivada en diversos países y ha sido objeto de numerosos estudios para el aprovechamiento de su proteína y aceite.

Trabajos realizados por Makkar y col., (1997) con semillas tóxicas y no tóxicas, de diferentes partes del mundo reportan variaciones en los contenidos de proteína cruda (19-31%), lípidos (43-59%), fibra (3.5-6.1%) y cenizas (3.4-5%). En semillas de diferentes regiones de México estudiadas por Martínez-Herrera y col., (2006) se encontraron concentraciones de proteína cruda (31-34.5%), lípidos (55-58%), fibra (2.8-3.4%) y cenizas (3.8-5.1%). Los resultados provenientes de diversas investigaciones sugieren que las semillas de *Jatropha curcas* provenientes de plantas “no tóxicas” (no contienen ésteres de forbol o están en bajas concentraciones, <0.11 mg/g muestra) pueden ser una buena fuente de proteína disponible y lípidos para el ganado y peces y posiblemente para los humanos, ya que en Estados como Puebla, Hidalgo, Morelos y Quintana Roo son ingeridas (Makkar y col., 1998; Martínez-Herrera y col., 2006).

Las semillas de *J. curcas* contienen aminoácidos esenciales, sin embargo no todos cubren los requerimientos establecidos por la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), como es el caso de la lisina, triptófano, metionina y cisteína, que serían los aminoácidos limitantes (Cuadro 1). En investigaciones realizadas por Martínez-Herrera y col., 2006 en semillas provenientes de México, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos por Makkar y col., (1997) de aminoácidos esenciales (Cuadro2).

Cuadro 2 . Perfil de aminoácidos en semillas de *J. curcas* y los parámetros recomendados por la FAO/WHO.

Aminoácido	Makkar y col., 1997	Martínez-Herrera y col., 2006	Referencia FAO/WHO
Lisina	3.40	3.50	5.80
Leucina	7.5	5.90	6.8
Isoleucina	4.85	3.60	2.8
Metionina	1.76	1.50	2.50
Cisteína	1.58	1.80	2.50
Fenilalanina	4.89	3.90	6.30
Tirosina	3.78	2.60	6.30
Valina	5.30	4.20	3.50
Histidina	3.08	2.80	1.90
Triptófano	NR	NR	1.10
Serina	4.82	4.50	
Ácido glutámico	15.91	16.4	
Ácido aspártico	9.92	11.5	
Prolina	3.80	3.90	
Glicina	4.61	4.20	
Alanina	4.94	4.20	
Arginina	12.90	11.3	

NR: no reportado

En cuanto a la composición de ácidos grasos en el aceite de *Jatropha curcas*, los ácidos grasos más comunes encontrados en semillas provenientes de diferentes partes del mundo son el ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2). En semillas nativas de México se han reportado hasta 48.8% de ácido oleico y 44.4 % de ácido linoleico. Dependiendo del origen, el ácido oleico o linoleico puede ser el más abundante en algunas semillas, se considera que estas variaciones pueden deberse a las condiciones climáticas de cada región. También se ha encontrado en menor cantidad el ácido mirístico (14:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido linolénico (C18:3), ácido *cis*-11-eicosanoico (C20:1) y ácido *cis*-11-eicodienoico (C20:2). Otros estudios han registrado en algunas variedades de *J. curcas* y en pequeñas cantidades el ácido araquídico (C20:0), ácido araquidoleico (C20:1) y el ácido behénico (C22:0) (Adebowale y Adedire, 2006; Martínez-Herrera y col., 2006).

#### FACTORES NO NUTRITIVOS Y TÓXICOS

Las plantas producen metabolitos primarios como aminoácidos, clorofila, nucleótidos, carbohidratos simples y lípidos los cuales tienen efecto en el crecimiento y desarrollo de las mismas; sin embargo, también sintetizan y acumulan como respuesta al ataque de

plagas, metabolitos secundarios potentes de defensa química (Enneking y Wink, 2000; Wildman, 2001).

Estos se encuentran en muchos granos de leguminosas, oleaginosas y ciertos cereales; a estas sustancias se les conocen como sustancias bioactivas, las cuales no se consideran nutrientes, pero ejercen efectos metabólicos en humanos y animales. Muchas de estas sustancias bioactivas son consideradas factores no nutritivos, también llamados factores antinutricionales, tóxicos alimentarios, constituyentes tóxicos, antinutrientes, sustancias asociadas o fitoquímicos, entre estos metabolitos se puede mencionar a los fitatos, lectinas, taninos, glucósidos cianogénicos, saponinas, inhibidores de tripsina, glucósidos de pirimidina, alcaloides, isoflavonas, inhibidores de proteasa, inhibidores de amilasa y los ésteres de forbol, entre otros (Champ, 2002; Martínez-Herrera, 2006; Thompson, 2001).

Es común encontrarlos en alimentos como cacao, plátano, sorgo, té, nueces amargas y frijoles (Delgado, 1999). Algunos compuestos de defensa en las plantas pueden ser de toxicidad aguda tales como algunas lectinas y glucósidos cianogénicos; de sabor desagradable como las saponinas, taninos o alcaloides amargos. Respecto a los fitatos son no nutritivos y reducen el crecimiento y el bienestar del consumidor por la formación de complejos con minerales y proteínas. Los glucósidos cianogénicos, isoflavonas, alcaloides pueden provocar inhibición metabólica y los inhibidores de tripsina, lectinas u oligosacáridos causan problemas de digestión. Aun cuando muchas plantas son fuente importante de nutrimentos, el contenido de ácido fítico, taninos e inhibidores de tripsina afectan su eficiencia alimenticia y otros tóxicos naturales como ésteres de forbol y glucósidos cianogénicos, pueden tener efectos que van de una simple irritación dérmica hasta provocar la muerte (Iniestra-González y col, 2005). Las concentraciones de estas sustancias dependen de diferentes factores, tales como condiciones climatológicas, variedad, parte de la planta, época de recolección, entre otros (Gamboa, 1999).

El estudio de semillas de *Jatropha curcas* de diferentes países reporta la presencia de factores no nutritivos, como inhibidores de tripsina (18.4-27.5 mg de tripsina inhibida/g de muestra, mg/g IT), saponinas (1.8-3.4 g/100 g como diosgenina), lectinas (0.85-6.85 mg/ml, cantidad mínima de muestra la cual produce aglutinación), fitatos (6.2-10.1 g/100 g como ácido fítico) y tóxicos como son los ésteres de forbol 0.87-3.32 mg/g como equivalente a 13-acetato-12-miristato forbol (Makkar y col., 1997). En trabajos publicados por Aregheore y col., (2003) con semillas de *J. curcas* aplicados a dietas en ratas demostraron que éstas no fueron tolerantes a muestras que contenían EF a una concentración de 0.13 mg/g muestra; mientras que en investigaciones realizados por Martínez-Herrera y col., 2006, con tilapias (*Oreochromis niloticus*) no se observaron efectos adversos ni signos de intoxicación a niveles menores de EF de 0.02 mg/g de

muestra. Estudios recientes realizados en plantas provenientes de Coatzacoalcos, Veracruz reportaron el contenido de ésteres de forbol de 3.8 mg/g (como equivalente de equivalente a 13-acetato-12-miristato forbol), mientras que en muestras de Papantla, Veracruz, no se detectaron estos metabolitos, también se detectó la presencia de fitatos (6.04-12.0 g/100 g como ácido fítico), inhibidores de tripsina (0.57-34.3 mg de tripsina inhibida/g de muestra, mg/g IT), saponinas (1.07-3.0 g/100 g como diosgenina) y lectinas (0.75-23.2 mg/ml cantidad mínima de muestra la cual produce aglutinación) (Makkar y col., 1997; Martínez-Herrera col., 2006).

## **FITATOS**

Fitina, fitato o mio-inositol hexafosfato son sinónimos con que se le designa a un fosfato orgánico definido por la mayoría de los autores como la sal cálcico-magnésica de ácido fítico o ácido mio-inositol hexafosfórico (Febles, 1998).

Son compuestos no nutritivos que reducen el crecimiento y el bienestar del consumidor por la formación de complejos con compuestos nutricionales como es el caso de los minerales (Enneking y Wink, 2000). El consumo de alimentos ricos en fitatos ha sido relacionado con una reducción de la biodisponibilidad de proteínas y minerales, y en consecuencia influyen en el valor nutritivo de los alimentos. Los fitatos reducen la disponibilidad del hierro presente en muchas leguminosas produciendo cuadros de anemia ferropriva (Sotelo y col., 2002; Blatny y col., 1995). Otros metales como el cobre, zinc, magnesio y calcio pueden ser capturados por este compuesto impidiendo su absorción e incrementando la de otros metales tóxicos como el aluminio (Colomé y col., 1993). El ácido fítico también disminuye la digestibilidad proteica "*in vitro*" asociada con la formación de macro-complejos a través de la interacción con grupos cargados positivamente en las proteínas (Lajolo y Genovese, 2002). El ácido fítico (mio-inositol hexaquisfosfato, IP6) es abundante en semillas de cereales y leguminosas, contribuyendo cerca del 1-7% de su peso seco. Febles (1998), reporta que en semillas y cereales comestibles, el contenido de fitatos es de 1-2% y en algunos puede encontrarse hasta en concentraciones del 6%. Estudios en animales demuestran que el ácido fítico exhibe propiedades antineoplásicas en cáncer de mama, hígado, colon, próstata, sarcoma, leucemia y piel (Fox y Eberl, 2002).

A pesar de sus propiedades antinutricias, hay evidencia de que la presencia de fitatos en los alimentos aporta beneficios, como la prevención de cálculos renales, aparición de cardiopatías, diabetes y ciertos tipos de cáncer como el de colon y mama; de igual forma tienen efectos hipocolesterémicos (Champ, 2002; Graf y Eaton, 1990).

## LECTINAS

Las lectinas son un grupo de proteínas con actividad hemaglutinante, estudiadas por Stillmark en 1888, en extractos de semillas de castor (*Ricinus communis*) (Hernández y col., 1999). La aglutinación consiste en la agregación sistemática de células mediadas por macromoléculas específicas (anticuerpos o lectinas) que reconocen estructuras moleculares determinadas (antígenos) sobre la superficie celular. Cuando las células que se aglutinan son glóbulos rojos (eritrocitos) humanos, el fenómeno se denomina hemaglutinación (Rodríguez, 2004). El término “lectina” para denotar proteínas que selectivamente aglutinan las células sanguíneas de un grupo particular de sangre del grupo sanguíneo A, B, O (Patrick y Ngai, 2006). Damme y col., (1997) definieron a las lectinas como proteínas que se unen a carbohidratos que poseen al menos un dominio no catalítico, el cual se une reversiblemente a un mono u oligosacárido específico.

Las lectinas se encuentran en semillas y todo tipo de tejido vegetal, formando parte del sistema de defensa de la planta, se han encontrado lectinas en plantas pertenecientes a la familia de las Fabaceas (Legumbres), así como en *Canavalia ensiformis*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* y *Fitolaca ameicana* (Hernández y col., 1999; Kosenko, 2002; Rodríguez y col., 2004)). Se les considera como componente no nutritivo debido a que tienen un efecto negativo en el valor nutrimental de la dieta, pues pueden causar reducción en la digestión; algunas tienen efecto purgante y tóxico. Las lectinas han demostrado actividades biológicas entre las que se puede incluir la interacción con grupos sanguíneos, mitogénesis e inhibición de crecimiento micótico, entre otras (Celis, 1998). En la *Jatropha curcas* se ha detectado la presencia de una lectina conocida como curcina a la cual se le atribuye un efecto purgante cuyos síntomas son náusea, inflamación y vómitos; sin embargo, estudios realizados por Lin y col., (2003) reportan que la curcina tiene actividad anticancerígena y actúa directamente sobre las células cancerosas. Las lectinas de plantas no siempre son dañinas, como proteínas biológicamente activas pueden modificar y algunas veces mejorar la función del intestino y metabolismo y de esta forma tienen efecto benéfico en tratamientos contra la obesidad. Hoy en día son utilizadas en el área química como armas valiosas en la genética, biomedicina e inmunología. (Pusztai y col., 1998; Valadez-Vega, 2001; Hernández y col., 1999).

## GLUCÓSIDOS CIANOGENICOS

Los glucósidos cianogénicos son tóxicos naturales de amplia distribución en el reino vegetal. El ácido cianhídrico es un producto de hidrólisis de los glucósidos cianogénicos, el cual puede pasar a tiocianato por acción de las rodanasas (tiosulfato sulfotransferasa). El cianuro liberado es el responsable de la acción tóxica de estos metabolitos (Colomé y col.,

1993), considerándose el tiocianato formado como un producto de destoxificación, ya que su acción es 3200 veces menor que el cianuro.

Es difícil predecir la dimensión del envenenamiento debido a que la sensibilidad al HCN en los individuos es variable entre 1-30 mg/Kg de peso corporal. Colomé y col., (1993) reportan que el rango aceptable para seres humanos es de 210-310 mg/100g de muestra. La intoxicación por HCN se produce al bloquear el anión cianuro a la citocromo oxidasa produciendo la muerte por anorexia al impedir la respiración celular (Linder, 1990). En trabajos realizados a semillas de *J. curcas* de otras regiones de México y el mundo, no se detectaron dichos metabolitos (Makkar y col., 1997; Martínez-Herrera y col., 2006), sin embargo es importante la cuantificación, ya que la presencia de metabolitos secundarios, depende de las condiciones de estrés bajo climáticas, de suelo o estrés en las que se encuentre la planta.

## **TANINOS**

Los taninos son polifenoles que inhiben la absorción intestinal de los aminoácidos y se cree que reducen la actividad de enzimas proteolíticas (Colomé y col., 1993). Estos compuestos se encuentran con frecuencia en las plantas y constituyen el grupo más importante de los metabolitos secundarios involucrados en la defensa de la planta. Otros efectos antinutritivos se manifiestan por una mayor excreción de nitrógeno fecal lo que supone una disminución del valor biológico de las proteínas debido en gran parte a su interferencia en la utilización digestiva de las mismas (Gamboa, 1999). La actividad antinutricia también puede manifestarse por la capacidad que tienen de asociarse con iones di y trivalentes. Se ha demostrado que la ingestión disminuye la disponibilidad del hierro de los alimentos y aumenta la excreción de calcio (Delgado, 1999). El remojo y la cocción extraen una proporción importante de los mismos presentes en el grano.

Sin embargo, de acuerdo a la sensibilidad del individuo pueden presentarse efectos y atendiendo a los hábitos alimentarios puede incurrirse en malas prácticas alimentarias (Colomé y col., 1993). La cantidad considerada de estos factores permisibles para el cuerpo humano es hasta de un 5% ó 100 mg diarios (Velsid, 2006).

## **ÉSTERES DE FORBOL**

Algunas especies del género *Jatropha* como *J. curcas*, *J. multifida* y *J. macrorhiza* son citadas como causantes de intoxicaciones accidentales pues se les considera fuente de ciertas clases de diterpenos. Tal es el caso de los ésteres de forbol que tienen como estructura fundamental al tigliano, un diterpeno tetracíclico (Figura 9). Los ésteres de forbol (EF) son una clase de productos naturales ampliamente distribuidos en las familias Euphorbiaceae y Thymelaeaceae (Goel y col., 2007). Se han aislado alrededor de 60 ésteres



de forbol de 20 plantas diferentes pertenecientes a dichas familias, y por medio de técnicas de HPLC se ha demostrado la presencia de cuatro diferentes ésteres de forbol en la *J. curcas*, que debido a su alta inestabilidad, sólo se ha podido determinar la estructura de un diéster intramolecular, el 12-deoxi-16-hidroxiforbol, (Figura 9, 10) (Haas y col., 2002; Wink y col., 2000).

Además de las especies del género *Jatropha*, se han encontrado ésteres de forbol en otras plantas como *Sapium indicum*, *S. japonicum*, *Euphorbia frankiana*, *E. croculescence*, *E. ticulli*, *Croton spareiflorus*, *C. tigilium*, *C. ciliatuglandulifer*, *Excoecaria agallocha* y *Homalantus nutans* (Goel y col., 2007).

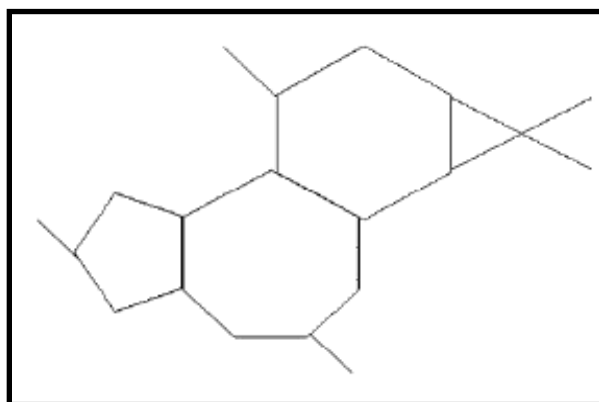


Figura 9. Tigliano: estructura base de los ésteres de forbol

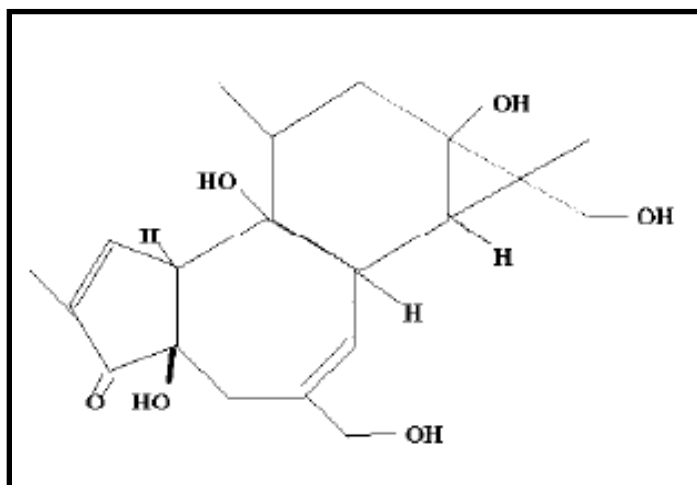


Figura 10. Éster de forbol 12-deoxi-16-hidroxiforbol.

Los ésteres de forbol son los metabolitos secundarios a los que se les atribuye la principal causa de envenenamiento y en base a su concentración las plantas de *J. curcas* son

clasificadas como potencialmente tóxicas o no tóxicas, La planta comienza a considerarse tóxica a partir de una concentración de EF > 0.11 mg/g como equivalente de 12-miristato-13-hidroxi-forbol (Makkar y col., 1998).

Los efectos causados por EF van de una leve intoxicación hasta la muerte. Los efectos biológicos atribuidos a estos metabolitos son la iniciación tumoral, proliferación celular, activación de plaquetas de la sangre, mitogénesis linfocítica, inflamación de la piel, producción de prostaglandina y estimulación de la granulación en neutrófilos (Haas y Mittelbach, 2000). Los síntomas humanos causados por intoxicación con ésteres de forbol incluyen quemaduras y dolor en boca y garganta, vómito, diarrea, delirio, contracción muscular, pérdida del equilibrio y midriasis (Makkar y col., 1997). Se han reportado efectos tóxicos en vertebrados e insectos y e intoxicaciones en humanos causadas por ingesta de semillas de *J. curcas* que contienen ésteres de forbol. En la india han sido registrados envenenamientos accidentales en niños, en dichos casos predominan efectos gastrointestinales (Kulkarni y col., 2005; Wink y col., 2000). En los Estados de Veracruz y Puebla, donde son consumidas las semillas, se tienen testimonios locales de intoxicaciones (Martínez-Herrera y col., 2006). Los EF tienen acción en la activación de la proteína C Kinasa (PKC). La PKC es una enzima que tiene un papel importante en mecanismos de acción de un gran número de neurotransmisores y hormonas cuyos efectos están mediados a través de la hidrólisis de polifosfoinosítidos. La interacción de los ésteres de forbol con la PKC afecta las actividades de varias enzimas, así como la biosíntesis de proteínas, ADN, poliaminas; el proceso de diferenciación celular y la expresión de genes (Goel y col., 2007; Wink y col., 2000).

Debido a su toxicidad los ésteres de forbol tienen actividad insecticida la cual ha sido registrada para *Manduca sexta*, *Helicoverpa armigera*, *Aphis gossypii*, *Pectinophora gossypiella*, *Empoasca biguttula*, *Callosobruchus chinensis*, *Sitophilus zeamays*, *Periplaneta americana*, *Blatella germanica*, *Oncopeltus fasciatus*, *Sesamia calamistis*, *Busseola fusca*, *Culex spp.*, *Plutella xylostella*, *Mycus persicae*, *Phaedon cochliariae* y *Tetranychus urticae* (Wink y col., 2000).

## **EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE SEMILLAS Y CARACTERÍSTICAS FÍSICAS POR PLANTA EN LAS DIFERENTES POBLACIONES ESTUDIADAS**

### **ANÁLISIS DE DIVERGENCIA EN CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS DE LAS SEMILLAS.**

#### **RECURSOS MATERIALES**

La determinación de humedad, proteína, glucósidos cianogénicos, taninos y ésteres de forbol por TLC, se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química de la UADY; la caracterización física, extracción y cuantificación del aceite, determinación de fitatos y lectinas se realizó en el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del IPN ubicado en Yautepec, Morelos. La cuantificación de ésteres de forbol por HPLC fue efectuada en el Centro de Investigación de Biotecnología Aplicada (CIBA) del IPN ubicado en Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala.

#### **MATERIAL BIOLÓGICO**

Semillas silvestres de *Jatropha curcas* fueron recolectadas de plantaciones silvestres. De cada región se tomaron frutos maduros de plantas de *J. curcas* en forma totalmente aleatoria, las semillas fueron retiradas del fruto, se secaron al Sol hasta que la testa negra que las cubre estuvo totalmente seca. Se descascararon, y se midieron las características físicas (longitud ancho y peso); y se cuantificó humedad, proteína, aceite extraído, así como factores tóxicos y no nutritivos (fitatos, lectinas, taninos ésteres de forbol).

#### **CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LAS SEMILLAS**

De cada muestra fueron tomadas semillas aleatoriamente para determinar el peso, grosor y longitud, registrándose el promedio total. Posteriormente fueron descascaradas y de igual forma se evaluó el promedio de peso, longitud y grosor del grano.

#### **OBTENCIÓN DE LA HARINA DE *JATROPHA CURCAS***

Las semillas de *J. curcas* se secaron a temperatura ambiente hasta que la testa negra que las cubre quedó totalmente seca para retirarla con ayuda de unas pinzas. Las semillas sin testa (grano) fueron pulverizadas con un mortero hasta la obtención de una pasta, que posteriormente fue desgrasada.

#### **EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ACEITE**

Para la extracción y cuantificación del aceite de *J. curcas* se realizó de acuerdo al Método de Soxhlet (Método 920.39, A.O.A.C., 2005). Se utilizó hexano como solvente y la

extracción fue continua durante 6 horas, posteriormente la muestra desgrasada se pulverizó nuevamente utilizando un mortero y se sometió de nuevo a extracción por dos horas. La muestra ya desgrasada se pasó por un molino Ciclotec y se tamizó en malla N° 80 con el fin de tener una harina más fina. Para la cuantificación del aceite se recuperó el solvente con la ayuda de un rotavapor Buchi R-205 al término de la extracción. El matraz receptor (a peso constante) que contenía el aceite extraído se secó durante 2 horas a 105°C. El contenido de aceite se determinó por diferencia de peso.

#### **DETERMINACIÓN DE HUMEDAD**

El contenido de humedad de las muestras fue determinado de acuerdo al método 925.09B de la A.O.A.C., 2005. Fueron puestos los crisoles a peso constante durante 4 horas a 105°C. Posteriormente se pesó por duplicado en los crisoles 1 g de muestra y se registraron los datos. Las muestras fueron secadas durante 4 horas a 105°C, se enfriaron a temperatura ambiente en un desecador y se pesaron nuevamente. La cantidad de agua se determinó por diferencia de peso.

#### **DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA**

Se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Kjeldahl, realizando el análisis con la ayuda de un Equipo Kjeldahl: Buchi Distillation Unit B-324, Buchi Digestión Unit K-424, (Método 954.01, A.O.A.C., 2005).

#### **DETERMINACIÓN DE FITATOS**

La cuantificación del contenido de fitatos en muestras de *J. curcas* se llevó a cabo mediante un método espectrofotométrico (Martínez-Herrera, 2006), con ciertas modificaciones. Se realizó una recta de estándares de fitatos a partir de una solución de 160 µg/ml de ácido fítico (Sigma P-8810), (Anexo A.1.). Para la extracción de fitatos se mezclaron 0.5 g de muestra desgrasada más 25 ml de HCl 0.5 N, se pusieron en agitación durante 1 h, centrifugando posteriormente a 10200 x g (12000 rpm) durante 15 min. Se separó el sobrenadante, filtró y centrifugó nuevamente. Se tomaron alícuotas correspondientes del extracto para proceder de igual forma que los estándares. Los estándares y las muestras fueron leídos a 500 nm, en un equipo Thermo Spectronic Genesys 10 UV.

#### **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LECTINAS**

Debido a que las lectinas son proteínas con actividad hemaglutinante, ésta fue determinada mediante el método de diluciones seriadas (Martínez-Ayala, 1989), con algunas modificaciones que se indican a continuación: para la extracción de lectinas se

pesó 1 g de harina desgrasada y fue puesto en agitación durante 5 h con 15 ml de búffer salino de fosfatos (PBS, pH 7.4) a 4 °C, se centrifugó a 1300 x g (4000 rpm) por 15 min al término de la agitación. En la preparación de eritrocitos se trabajó con sangre humana tipo O positivo, obtenida en bancos de sangre, la cual se mantuvo en una solución anticoagulante (5 ml de sangre en EDTA, 1 mg/ml). La sangre se centrifugó a 90 x g (1000 rpm) por 10 min en un equipo Microfugue 22R Centrifugue (Eppendorf) desechando el suero; los eritrocitos fueron suspendidos en PBS y se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones. Los lavados de eritrocitos con PBS se repitieron hasta que el sobrenadante quedó transparente, manteniendo el paquete de eritrocitos al 2% con PBS, el cual fue mantenido en frío. Al paquete de eritrocitos se le agregó tripsina de páncreas de porcino tipo IX-S (Sigma T-0303) en una concentración del 0.02%, incubándose a 37 °C por 40 min. Posteriormente, fue centrifugada la suspensión a 90 x g (1000 rpm) durante 10 minutos, agregando PBS para mantener la concentración de eritrocitos al 2%. La cuantificación de la actividad hemaglutinante se llevó a cabo por la técnica de diluciones seriadas del extracto de lectinas preparado previamente. En una microplaca para el ensayo de aglutinación fueron depositados 50 µl de PBS en cada micropozo. Para cada muestra en el micropozo correspondiente a la primera dilución se colocaron 50 µl del extracto de lectinas haciendo diluciones doblemente seriadas, posteriormente a las diluciones se agregó 50 µl de la solución de eritrocitos. El mismo procedimiento fue realizado con el paquete de eritrocitos tratados con tripsina; de esta forma se observó la actividad hemaglutinante de las lectinas en eritrocitos con y sin tripsina después de 4 horas. Para la cuantificación se necesitó de la determinación de proteína soluble por el método del ácido bicinconínico

## **DETERMINACIÓN DE TANINOS**

La determinación de taninos en las diferentes semillas se llevó a cabo por mediante el método ISO 9648:1988 en sorgo (1994). El principio del método se basa en la extracción de taninos con dimetilformamida. En la preparación de la muestra (harina de semillas de *J. curcas*), se removió cualquier materia extraña, se tamizó a través de una malla de 0.5 mm. El análisis fue realizado inmediatamente ya que en los productos triturados los taninos se oxidan rápidamente. Se pesó 1 g de la muestra en un tubo de centrifuga y se agregó 25 ml de solución de dimetilformamida al 75% v/v. Se tapó el tubo herméticamente y se mantuvo en agitación durante 1 h. Posteriormente, se centrifugó a 550 x g (2500 rpm) durante 15 min. Una vez centrifugada la muestra, se extrajo 1 ml del sobrenadante y se depositó en un tubo de ensayo (tubo A), se añadió 6 ml de agua destilada y 1 ml de solución amoniacal al 0.8% v/v (8 ml/L de amoniaco) y se agitó en un vortex. En un segundo tubo de ensayo (tubo B) se añadió 1 ml del sobrenadante, 5 ml de agua destilada y 1 ml de solución de citrato férrico (3.5 g/L citrato férrico), dicha solución

debió ser preparada 24 horas antes de ser utilizada y el contenido de hierro debió estar entre 17-20% (p/p); se mezcló. Posteriormente, se añadió 1 ml de la solución amoniacal 0.8% v/v y agitó en un vortex. Se transfirieron las soluciones a una celda de medición y se leyó en un equipo Termo espectral Genesys 10 UV a 525 nm después de 10 min. El resultado fue la diferencia entre las absorbancias. Para la preparación de los estándares de la recta de calibración (Anexo A.3.) se prepararon 6 matraces volumétricos de 25 ml cuyas concentraciones fueron de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mg/ml de ácido tánico (J.T. Baker). En tubos de ensayo previamente marcados se transfirió 1 ml de cada una de las soluciones anteriores y se añadieron 5 ml de agua destilada y 1 ml de la solución de citrato férrico se agitó por unos segundos con la ayuda de un vortex. Posteriormente se añadió a cada tubo 1 ml de la solución amoniacal al 0.8% v/v y se agitó nuevamente. Las soluciones anteriores se dejaron reposar por 10 min y se transfirieron a celdas de medición para leer las absorbancias en el espectrofotómetro a 525 nm. Como blanco se utilizó agua destilada.

### **DETERMINACIÓN DE GLUCÓSIDOS CIANOGENICOS**

El contenido de glucósidos cianogénicos en las semillas de *J. curcas* fue determinado mediante el método con yoduro –nitrato de plata (AOAC, 1990), con algunas modificaciones indicadas a continuación: se pesaron 10 g de harina de *J. curcas* y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 2 litros, se añadieron 200 ml de agua destilada y se mantuvo en agitación constante por 1 h. Posteriormente a la agitación, se añadieron 150 ml de agua y unas cuantas perlas de ebullición. Se colocó el matraz con la muestra al equipo de destilación por arrastre de vapor introduciendo el extremo de la salida del condensador en un matraz que contenga 30 ml de NaOH al 2.5% p/v, para neutralizar el ácido cianhídrico el cual es altamente tóxico. Se colectaron 150 ml del destilado, incluyendo los 30 ml del NaOH. El destilado obtenido se transfirió a un matraz aforado de 250 ml y se aforó con agua destilada. De esta solución se tomaron 100 ml y se vertió en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, por duplicado. A cada matraz se añadieron 8 ml de hidróxido de amonio 6 N, 2 ml de yoduro de potasio recientemente preparado; y 10 gotas de rodamina al 0.02%. Se titularon las muestras con una solución de nitrato de plata 0.02 N, hasta el vire a color salmón. Los resultados se expresaron como mg de ácido cianhídrico por 100 g de muestra.

### **DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTIFICACIÓN DE LOS ÉSTERES DE FORBOL**

La extracción y cuantificación de los ésteres de forbol se realizó mediante la metodología propuesta por Makkar y col., (1997), sometida a ciertas modificaciones, las cuales se indican a continuación. Para la extracción de EF, se pesaron en tubos Falcon de 50 ml, 2 g de harina y se añadieron 15 ml de metanol, la mezcla se pasó por un vortex durante 15 min y posteriormente fue centrifugada a 1700 x g (4500 rpm) por 10 min a 10°C en un

equipo Optima LE-80K ultracentrifuge BECKMAN COULTER, la operación anterior se repitió tres veces (45 ml de metanol). El sobrenadante fue colectado en un matraz y se concentró por evaporación con un rotavapor Buchi Rotavapor R-205 a 50°C, con bomba de alto vacío. La evaporación se detuvo en una etapa de pasta, no a sequedad completa, la cual se lavó con 6 ml de metanol y se llevó a sonicación durante 10 min, con la finalidad de lavar la pasta de las paredes del matraz. El extracto metanólico obtenido fue evaporado hasta aproximadamente 5 ml. Posteriormente se centrifugó el concentrado a 5700 x g (10,000 rpm) durante 15 min, pasando el sobrenadante a tubos Eppendorf y centrifugando a 10000 x g (11,000 rpm) por 15 min a 4°C. Los extractos fueron filtrados y depositados en viales de 2 ml y se conservaron a 4°C hasta su utilización.

Se utilizó un segundo método de extracción de EF bajo las mismas condiciones, con la diferencia que en vez pasar la mezcla muestra-metanol por el vortex durante 15 min, la mezcla se pasó por un sonicador durante 5 minutos (tres veces), con la finalidad de probar la eficiencia de la extracción por sonicación.

Para la separación de los componentes de los extractos metanólicos se empleó cromatografía en capa fina bajo elusión monodimensional, TLC, (Thin Layer Chromatography), aplicando alícuotas de 80 µl del extracto orgánico de cada una de las muestras en placas de sílica gel G 60 Merck de 10 x 10 cm. El eluyente utilizado fue metanol-cloroformo-ácido acético en relación 3:2:1 v/v/v. Las placas se revelaron con vapores de yodo. Se empleó como control positivo un extracto de semillas consideradas tóxicas procedentes de Coatzacoalcos, Veracruz. Se cuantificó el contenido de estos compuestos por HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución) utilizando como estándar 12,-miristato-13-hidroxiforbol (Sigma P-8139), el cual presenta un tiempo de retención de 33 a 34 minutos. Se utilizó un equipo Hewlett Packard 1100, bomba cuaternaria HPLC, y detector de arreglo de diodos (DAD) Hewlett Packard 1100, columna Agilent de fase reversa C18 (LiChrosphere 100 RP-18, endcapped 5 µm), columna analítica de 250 x 4 mm d.i. Las muestras fueron eluidas (20 µl) con un flujo de 1.3 ml/min utilizando como fase móvil de gradientes: (A) ácido o-fosfórico, H<sub>2</sub>O (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> - 0.175%) (B) Acetonitrilo (100%) y Tetrahidrofurano (THF) (100%) (Cuadro 3). Todos los solventes fueron filtrados con membranas de polietileno de poro 0.45 µm y 47 mm de diámetro, y desgasificados por sonicación.

Cuadro 3. Programación de los gradientes utilizados en la cuantificación de EF.

Tiempo (min)	%A	%B	%C	Flujo (ml/min)
0:00	40%	60%	0%	1.3
22:00	25%	75%	0%	1.3
30:00	25%	75%	0%	1.3
31:00	0%	100%	0%	1.3
37:00	0%	100%	0%	1.3
<b>Lavado de la columna y acondicionamiento a su estado inicial</b>				
47:00	0%	0%	100%	1.3
57:00	0%	0%	100%	1.3
67:00	40%	60%	0%	1.3

Los picos fueron integrados a 280 nm. Los resultados se expresaron como equivalentes a 12-miristato-13-hidroxi-forbol (sigma), los cuales aparecen entre 30 y 35 min.

### ***Análisis de características fisicoquímicas en semillas de *Jatropha curcas* L.*** ***Características físicas de las variedades estudiadas***

Las características físicas de las diferentes muestras estudiadas (Cuadro 4 ) son similares entre sí. Las semillas con testa midieron entre 18.0-18.8 mm de longitud, 8.17-8.75 mm de ancho y su peso entre 0.61-0.77 g. las características del grano fueron 14.2-15.2 mm de longitud, 6.93-7.5 mm de grosor y un peso de 0.45-0.6 g.

Cuadro 4.- Características físicas de las semillas de *Jatropha curcas*

Muestra	Semilla con testa			Grano			Testa	Grano
	Longitud (mm)	Grosor (mm)	Peso (g)	Longitud (mm)	Grosor (mm)	Peso (g)	%	%
M <sub>N</sub>	18.4±0.02	8.75±0.03	0.77±0.05	14.6±0.04	7.25±0.03	0.53±0.04	28.6	71.4
M <sub>T</sub>	18.0±0.05	8.58±0.02	0.73±0.11	14.7±0.03	7.28±0.02	0.56±0.05	27.5	72.5
P <sub>N</sub>	18.8±0.07	8.17±0.04	0.77±0.04	15.0±0.03	7.17±0.02	0.51±0.06	33.37	66.63
P <sub>T</sub>	18.2±0.03	8.30±0.04	0.75±0.03	14.9±0.02	7.20±0.02	0.47±0.02	33.99	66.01



<b>S1<sub>T</sub></b>	18.3±0.05	8.71±0.06	0.68±0.11	14.2±0.06	7.20±0.03	0.45±0.03	47.58	<b>52.42</b>
<b>S2<sub>T</sub></b>	18.2±0.03	8.63±0.03	0.71±0.05	15.0±0.00	7.50±0.00	0.49±0.02	48.19	<b>51.81</b>
<b>S3<sub>T</sub></b>	18.0±0.06	8.75±0.05	0.61±0.05	15.0±0.00	6.93±0.03	0.48±0.02	48.94	<b>51.06</b>
<b>S4<sub>T</sub></b>	<b>18.7±0.04</b>	<b>8.60±0.06</b>	<b>0.72±0.06</b>	<b>15.2±0.02</b>	<b>7.34±0.02</b>	<b>0.49±0.05</b>	<b>53.22</b>	<b>46.78</b>

M<sub>N</sub>= Morelos nativa, M<sub>T</sub>=Plantación Ceprobi, P<sub>N</sub>=Puebla nativa, P<sub>T</sub>=Plantación Huitzilán, S1<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S2<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S3<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S4<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa

Respecto a los análisis de factores antinutricios ó tóxicos, se analizaron semillas silvestres de *Jatropha curcas* fueron recolectadas de plantas nativas de la Sierra de Puebla (P<sub>N</sub>) y de Yautepec, Morelos (M<sub>N</sub>); así como semillas provenientes de Acatenco y Tenampa, Veracruz; Huitzilán, Puebla y la India las cuales fueron sembradas en plantaciones experimentales de CeProBi (M<sub>T</sub>), Huitzilán, Puebla (P<sub>T</sub>) y Sinaloa (S1<sub>T</sub>, S2<sub>T</sub>, S3<sub>T</sub>, S4<sub>T</sub>) respectivamente. De cada región se tomaron frutos correspondientes, las semillas fueron retiradas del fruto, se secaron a temperatura ambiente hasta que la testa negra que las cubre estuvo totalmente seca.

#### COMPOSICIÓN NUTRIMENTAL DE LAS SEMILLAS

La cantidad de humedad en las semillas fue de 4.10-5.01%, el contenido de proteína se registra en base seca para la harina de *J. curcas* no desgrasada reportando resultados de 24.1-31.78%, para la harina desgrasada el contenido de proteína es de 54.15-63.27%. En lo que refiere al contenido de aceite se observan porcentajes de rendimiento de aceite entre 47.82-54.89% (Cuadro 5).

Cuadro 5. Composición de la harina de *Jatropha curcas* provenientes de Morelos, Puebla y Sinaloa.

Muestra	Materia seca %	Humedad %	Proteína (B.S) %	Aceite %
<b>M<sub>N</sub></b>	95.19	4.81	31.34±0.08	<b>50.47</b>
<b>M<sub>T</sub></b>	94.99	5.01	31.78±0.00	<b>54.45</b>
<b>P<sub>N</sub></b>	95.17	4.83	27.68±0.25	<b>54.89</b>
<b>P<sub>T</sub></b>	95.12	4.88	27.85±0.14	<b>47.82</b>
<b>S1<sub>T</sub></b>	95.90	4.10	24.10±0.2	<b>56.79</b>
<b>S2<sub>T</sub></b>	95.17	4.83	28.45±0.25	<b>50.29</b>
<b>S3<sub>T</sub></b>	95.31	4.69	26.85±0.13	<b>50.42</b>
<b>S4<sub>T</sub></b>	<b>95.71</b>	<b>4.29</b>	<b>25.32±0.32</b>	<b>54.47</b>

M<sub>N</sub>= Morelos nativa, M<sub>T</sub>=Plantación Ceprobi, P<sub>N</sub>=Puebla nativa, P<sub>T</sub>=Plantación Huitzilán, S1<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S2<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S3<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S4<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa %= g/100 g; B.S.= % de proteína expresado en base seca.

Cuadro 6.- Características físicas de semillas *Jatropha curcas* de diferentes regiones

Muestra	Semilla con testa			Grano			Testa	Grano
	Longitud (mm)	Grosor (mm)	Peso (g)	Longitud (mm)	Grosor (mm)	Peso (g)	%	%
<b>M<sub>N</sub></b>	18.4±0.02	8.75±0.03	0.77±0.05	14.6±0.04	7.25±0.03	0.53±0.04	28.6	<b>71.4</b>
<b>M<sub>T</sub></b>	18.0±0.05	8.58±0.02	0.73±0.11	14.7±0.03	7.28±0.02	0.56±0.05	27.5	<b>72.5</b>
<b>P1<sub>N</sub></b>	18.8±0.07	8.17±0.04	0.77±0.04	15.0±0.03	7.17±0.02	0.51±0.06	33.37	<b>66.63</b>
<b>P2<sub>N</sub></b>	18.2±0.03	8.30±0.04	0.75±0.03	14.9±0.02	7.20±0.02	0.47±0.02	33.99	<b>66.01</b>
<b>S1<sub>T</sub></b>	18.3±0.05	8.71±0.06	0.68±0.11	14.2±0.06	7.20±0.03	0.45±0.03	47.58	<b>52.42</b>
<b>S2<sub>T</sub></b>	18.2±0.03	8.63±0.03	0.71±0.05	15.0±0.00	7.50±0.00	0.49±0.02	48.19	<b>51.81</b>
<b>S3<sub>T</sub></b>	18.0±0.06	8.75±0.05	0.61±0.05	15.0±0.00	6.93±0.03	0.48±0.02	48.94	<b>51.06</b>
<b>S4<sub>T</sub></b>	<b>18.7±0.04</b>	<b>8.60±0.06</b>	<b>0.72±0.06</b>	<b>15.2±0.02</b>	<b>7.34±0.02</b>	<b>0.49±0.05</b>	<b>53.22</b>	<b>46.78</b>

M<sub>N</sub>= Yautepec, Mor., silvestre, M<sub>T</sub>=Plantación Yautepec, Mor., P1<sub>N</sub>=Huitzilán, Pue., silvestre, P2<sub>N</sub>= Huitzilán, Pue., silvestre S1<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S2<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S3<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S4<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa

Las características de longitud (14.2 -15.2 mm), ancho (6.93-7.34 mm) y peso (0.45-0.56 g) entre las diferentes muestras y los resultados para las semillas con testa fueron similares (cuadro 7), sin embargo hubo diferencia estadísticamente significativa (P<0.05) entre las diferentes muestras.

La cantidad de humedad en las semillas, el contenido de proteína reportado en base seca para la harina de *J. curcas* no desgrasada y el contenido de aceite se muestran en el cuadro 2. Para la muestra desgrasada el contenido de proteína fue de 54.15-63.27%.

Cuadro 7. Porcentaje (%) de humedad, proteína y aceite de las muestras de *Jatropha curcas* provenientes de Morelos, Puebla y Sinaloa.

Muestra	Materia seca	Humedad	Proteína (B.S)	Aceite
<b>M<sub>N</sub></b>	95.19	4.81±0.00	31.34±0.08	<b>50.47±0.14</b>
<b>M<sub>T</sub></b>	94.99	5.01±0.01	31.78±0.00	<b>54.45±0.15</b>

<b>P1<sub>N</sub></b>	95.17	4.83±0.04	27.68±0.25	<b>54.89±0.30</b>
<b>P2<sub>N</sub></b>	95.12	4.88±0.03	27.85±0.14	<b>47.82±0.09</b>
<b>S1<sub>T</sub></b>	95.90	4.10±0.03	24.10±0.20	<b>56.79±0.00</b>
<b>S2<sub>T</sub></b>	95.17	4.83±0.07	28.45±0.25	<b>50.29±0.04</b>
<b>S3<sub>T</sub></b>	95.31	4.69±0.01	26.85±0.13	<b>50.42±0.05</b>
<b>S4<sub>T</sub></b>	<b>95.71</b>	<b>4.29±0.16</b>	<b>25.32±0.32</b>	<b>54.47±0.03</b>

M<sub>N</sub>= Yautepec, Mor., silvestre, M<sub>T</sub>=Plantación Yautepec, Mor., P1<sub>N</sub>=Huitzilán, Pue., silvestre, P2<sub>N</sub>=Huitzilán, Pue., silvestre S1<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S2<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S3<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S4<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa

La composición de proteína cruda en las diferentes muestras (Cuadro 7) fue de 24.1-31.78% (en base seca). Se reportó mayor contenido de proteína en las muestras M<sub>N</sub> (Yautepec, Mor., silvestre), M<sub>T</sub> (Plantación Yautepec, Mor.), con porcentajes de 31.34 y 31.78% respectivamente. Las muestras silvestres de Huitzilán, Puebla (P1<sub>N</sub>, P2<sub>N</sub>) tuvieron 27.68 y 27.85% de proteína respectivamente, presentando mayor porcentaje de proteína en comparación con semillas las muestras P1<sub>N</sub> y P2<sub>N</sub> tuvieron porcentajes similares de proteína cruda, a pesar de que la muestra P2<sub>N</sub> es proveniente de árboles de 15-20 años de edad, mientras que las P1<sub>N</sub> son de plantas más jóvenes. La composición de proteína de las muestras de la Plantación Sinaloa fue de 24.1-28.45%. En cuanto al contenido de aceite fue de 47.82-56.79%. La muestra P2<sub>N</sub> fue la que tuvo menos contenido de aceite, y es relevante tomar en cuenta que dicha plantación es de árboles de más edad de producción; en tanto que la S1<sub>T</sub> registró el mayor porcentaje de aceite. Tanto en la composición de proteína como de aceite hubo diferencia significativa (P< 0.5) entre las diferentes muestras. El contenido de humedad en las muestras fue mínimo (4.1-5.01%), característica que favorece el almacenamiento de la semilla. En las muestras de las plantaciones experimentales de Yautepec, Mor., (31.3-3.78%) se observó aumento en su contenido de proteína y disminución en el aceite, puesto que son originarias de Acatenco y Tenampa, Veracruz, estudios anteriores a plantas de esta región reportaron 27.6-28.91% de proteína cruda y 57.48-58.38% de aceite. Mientras que las muestras S1<sub>T</sub>, S2<sub>T</sub>, S3<sub>T</sub> y S4<sub>T</sub> (24.1-26.8), (Plantación Sinaloa) nativas de la India habían reportado 23.0-24.1% de proteína y 54.8-58.4% de aceite originalmente.

### ***Determinación del contenido de lectinas, fitatos, taninos y glucósidos cianogénicos y ésteres de forbol.***

El contenido de fitatos (8.4-10.24% como equivalente de ácido fítico), lectinas (2.45-6.45 mg/ml, cantidad mínima de muestra capaz de producir aglutinación), taninos (0.109-0.128 g/100g como equivalente de ácido tánico) y glucósidos cianogénicos (2.69-5.04mg/100 g) se ilustra en el cuadro 6. En el caso de los glucósidos cianogénicos y

lectinas no se detectaron en algunas muestras. A estas accesiones se les determinó compuestos antinutricios teniendo los siguientes resultados (Cuadro 8).

Cuadro 8 . Contenido de fitatos, lectinas, taninos y glucósidos cianogénicos

Muestra	Fitatos (%) <sup>a</sup>	Lectinas <sup>b</sup>	Taninos <sup>c</sup> (g/100g)	Glucósidos cianogénicos (mg/100g) <sup>d</sup>
<b>M<sub>N</sub></b>	8.48±0.09	2.87±0.00	0.126±0.00	<b>ND</b>
<b>M<sub>T</sub></b>	8.41±0.03	ND±0.00	0.126±0.00	<b>5.04±0.45</b>
<b>P1<sub>N</sub></b>	8.40±0.00	3.21±0.01	0.122±0.00	<b>2.69±0.00</b>
<b>P2<sub>N</sub></b>	8.58±0.04	4.34±0.00	0.109±0.00	<b>2.69±0.00</b>
<b>S1<sub>T</sub></b>	10.15±0.11	5.72±0.01	0.128±0.00	<b>ND</b>
<b>S2<sub>T</sub></b>	10.10±0.00	2.45±0.01	0.128±0.00	<b>ND</b>
<b>S3<sub>T</sub></b>	10.24±0.00	6.45±0.00	0.127±0.00	<b>ND</b>
<b>S4<sub>T</sub></b>	<b>9.11±0.00</b>	<b>6.44±0.00</b>	<b>0.127±0.00</b>	<b>ND</b>

M<sub>N</sub>= Yautepec, Mor., silvestre, M<sub>T</sub>=Plantación Yautepec, Mor., P1<sub>N</sub>=Huitzilán, Pue., silvestre, P2<sub>N</sub>=Huitzilán, Pue., silvestre S1<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S2<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S3<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S4<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa. (%)<sup>a</sup>, como equivalente de ácido fítico.<sup>b</sup>, cantidad mínima de muestra capaz de producir aglutinación (mg/ml).<sup>c</sup>, equivalente a ácido tánico.<sup>d</sup>, mg/100 g de muestra, equivalente a HCN

## FITATOS

Las muestras M<sub>N</sub>, M<sub>T</sub>, P1<sub>N</sub> y P2<sub>N</sub> tuvieron porcentajes de fitatos similares entre sí. Los niveles de fitatos entre las muestras S1<sub>T</sub>, S2<sub>T</sub>, y S3<sub>T</sub> también fueron cercanos entre sí, pero aumentaron en comparación con los datos reportados originalmente para semillas de la India (8.2-8.6%). La muestra S4<sub>T</sub> tuvo un menor porcentaje de fitatos en comparación con las muestras S1<sub>T</sub>, S2<sub>T</sub>, y S3<sub>T</sub>, nativas de la India y cultivadas en Sinaloa, (Cuadro 8). El análisis estadístico marca diferencia significativa (P<0.05) entre las muestras.

## LECTINAS

En la muestra S2<sub>T</sub> de la plantación Sinaloa tuvo un apreciable aumento en su actividad hemaglutinante (2.45 mg/ml) en comparación con las otras muestras de la misma plantación (S1<sub>T</sub>, S3<sub>T</sub>, S4<sub>T</sub>). Era de esperarse una baja actividad hemaglutinante en las muestras pues sólo se observó hemaglutinación en la primera de las diluciones seriadas, excepto en la muestra S2<sub>T</sub> en la que se observa hemaglutinación hasta la tercera dilución. Los resultados de hemaglutinación en las diluciones fueron los mismos para los eritrocitos tratados con tripsina, sin embargo se observó mejor formación del coagulo en eritrocitos

sin tripsina. El análisis estadístico indicó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) para la actividad hemaglutinante de lectinas en las diferentes muestras.

## TANINOS

La determinación de taninos dió como resultado 0.109-0.128% (como equivalente de ácido tánico). El contenido de estos metabolitos fue menor en la muestra P2<sub>N</sub>.

Los porcentajes de taninos encontrados fueron similares entre las muestras silvestres de Puebla y Morelos y las cultivadas en Sinaloa (que originalmente pertenecen a la India).

## GLUCÓSIDOS CIANOGENÍCOS.

Por otro lado, el contenido de glucósidos cianogénicos osciló de 2.69 a 5.04 mg/100 g de muestra (Cuadro 3 para las muestras P1<sub>N</sub>, P2<sub>N</sub> y M<sub>T</sub>, mientras que en las demás muestras no se detectó el contenido de estos tóxicos. Se encontró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en las muestras P1<sub>N</sub>, P2<sub>N</sub> y M<sub>T</sub> en las que se detectaron trazas glucósidos cianogénicos.

Cuadro 9. Contenido de ésteres de forbol en semillas de *Jatropha curcas*

Ésteres de forbol (mg/g) <sup>e</sup>					
Muestra	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Total
M <sub>N</sub>	0.003	0.007	0.007	0.001	<b>0.018±0.01</b>
M <sub>T</sub>	ND	ND	ND	ND	<b>ND</b>
P1 <sub>N</sub>	0.010	0.012	0.011	0.002	<b>0.035±0.01</b>
P2 <sub>N</sub>	0.003	0.005	0.006	0.004	<b>0.018±0.00</b>
S1 <sub>T</sub>	0.004	0.007	0.004	0.002	<b>0.017±0.01</b>
S2 <sub>T</sub>	0.006	0.008	0.006	0.001	<b>0.021±0.00</b>
S3 <sub>T</sub>	0.003	0.006	0.006	0.000	<b>0.015±0.00</b>
S4 <sub>T</sub>	<b>0.082</b>	<b>0.030</b>	<b>0.016</b>	<b>0.006</b>	<b>0.132±0.00</b>

M<sub>N</sub>= Yautepec, Mor., silvestre, M<sub>T</sub>=Plantación Yautepec, Mor., P1<sub>N</sub>=Huitzilan, Pue., silvestre, P2<sub>N</sub>=Huitzilan, Pue., silvestre S1<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S2<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S3<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa, S4<sub>T</sub>=Plantación Sinaloa.<sup>e</sup>, como equivalente de 12-miristato-13-hidroxiforbol. ND= no detectado

Se encontraron trazas de EF (0.015-0.035 mg/g) en las muestras M<sub>N</sub>, P1<sub>N</sub>, P2<sub>T</sub>, S1<sub>T</sub>, S2<sub>T</sub>, S3<sub>T</sub>, (cuadro 4) con tiempos de retención entre 33-34 minutos. Sin embargo en la muestra M<sub>T</sub> correspondiente a la Plantación Yautepec, Mor., no se detectó presencia de ésteres de forbol por HPLC. En tanto que en la muestra S4<sub>T</sub> el contenido de EF fue el más alto de 0.132 mg/g.

El contenido de ésteres de forbol para las muestras silvestres de Huitzilan, Puebla P1<sub>N</sub> y P2<sub>N</sub> fue de 0.035 y 0.18 mg/g respectivamente. Encontrándose menor concentración de EF

en las semillas de las plantas P2<sub>N</sub>, que pertenecen a plantaciones con más edad. Se observó un cambio significativo en las muestras cultivadas respecto al contenido de estos metabolitos, puesto que en las muestras provenientes de la Plantación Sinaloa (S1<sub>T</sub>, S2<sub>T</sub>, S3<sub>T</sub>, S4<sub>T</sub>) hubo una disminución de EF de 0.015-0.132 mg/g, ya que originalmente pertenecen a la India en donde se reportan como tóxicas con un contenido de 1.1-1.76 mg/g de EF como equivalente de 12-miristato-13-hidroxi-forbol. La muestra M<sub>T</sub> (Plantación Yautepec, Mor.) no reportó cambio alguno, pues estuvo libre de dichos tóxicos.

### ANÁLISIS DE VARIABILIDAD EN 32 ACCESIONES DE *Jatropha curcas* NATIVAS

Se evaluaron las características físicas de 32 accesiones de *Jatropha curcas* (Cuadro 10) obtenidas de diferentes Estados, se midió longitud, ancho, espesor, peso con testa, peso sin testa. Para conocer si existen diferencias en cuanto a su morfología. Se realizó un análisis de varianza simple y la comparación de medias de LSD, con el programa Statgraphics Centurion. En todos los casos se empleó un nivel de confianza del 95% (Figura 10).

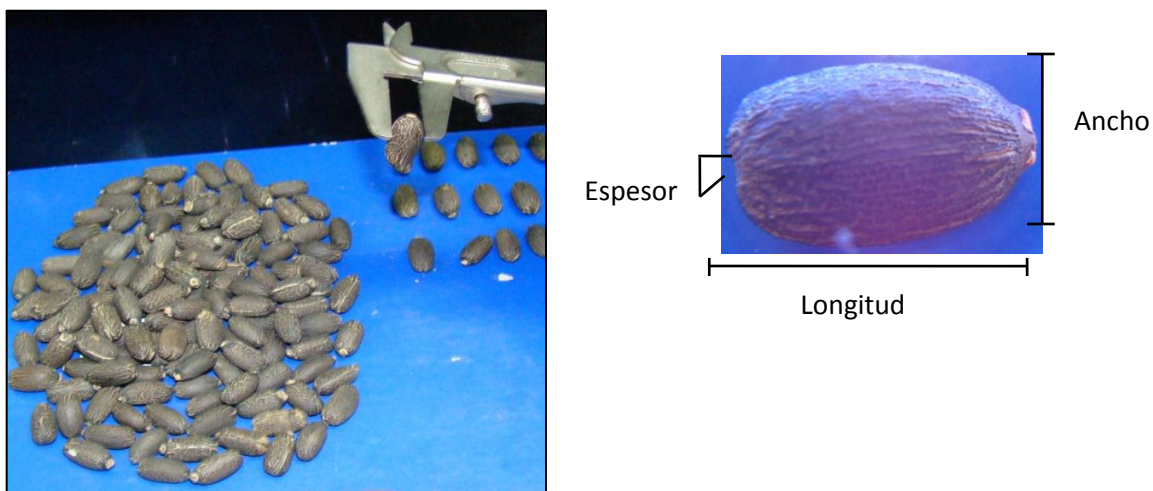


Figura 10.- Parámetros medidos a las semillas de *J. curcas*

Cuadro 10.- Características fisicoquímicas analizadas

Clave	Lugar	Longitud (cm)	Ancho (cm)	Espesor (cm)	Peso c/testa 100 semillas (g)	Peso s/testa 100 semillas (g)	Aceite %	Proteína %	Esteres mg/g
1	Huitzilán Puebla	1.84 <sup>a</sup>	0.968 <sup>a</sup>	0.878 <sup>a</sup>	69.1 <sup>b</sup>	46.2 <sup>b</sup>	55.2 <sup>ab</sup>	56.3 <sup>c</sup>	0.0457 <sup>a</sup>
2	Huitzilán Puebla	1.806 <sup>a</sup>	1.021 <sup>a</sup>	0.869 <sup>a</sup>	58.9 <sup>b</sup>	36.1 <sup>b</sup>	53.0 <sup>ab</sup>	48.2 <sup>c</sup>	0.009 <sup>a</sup>
3	Huitzilán Puebla	1.77 <sup>a</sup>	0.87 <sup>a</sup>	0.948 <sup>a</sup>	70.0 <sup>b</sup>	44.0 <sup>b</sup>	51.5 <sup>ab</sup>	15.7 <sup>c</sup>	NI
4	Huitzilán Puebla	1.45 <sup>a</sup>	1.0177 <sup>a</sup>	0.8842 <sup>a</sup>	77.0 <sup>b</sup>	50.8 <sup>b</sup>	54.4 <sup>ab</sup>	19.3 <sup>c</sup>	0.0244 <sup>a</sup>
5	Jalpan Puebla	2.015 <sup>a</sup>	1.0207 <sup>a</sup>	0.9126 <sup>a</sup>	78.9 <sup>b</sup>	46.0 <sup>b</sup>	52.1 <sup>ab</sup>	16.8 <sup>c</sup>	0.0556 <sup>a</sup>
6	Jalpan Puebla	2.03 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	0.85 <sup>a</sup>	83.0 <sup>b</sup>	51.0 <sup>b</sup>	51.7 <sup>ab</sup>	16.3 <sup>c</sup>	0.0031 <sup>a</sup>
7	Jalpan Puebla	1.871 <sup>a</sup>	1.028 <sup>a</sup>	0.869 <sup>a</sup>	69.8 <sup>b</sup>	44.8 <sup>b</sup>	52.8 <sup>ab</sup>	18.0 <sup>c</sup>	0.0297 <sup>a</sup>
8	Pantepec Puebla	1.976 <sup>a</sup>	1.128 <sup>a</sup>	0.928 <sup>a</sup>	87.4 <sup>b</sup>	57.1 <sup>b</sup>	44.0 <sup>ab</sup>	33.7 <sup>c</sup>	0.0277 <sup>a</sup>
9	Carrizal viejo Puebla	1.05 <sup>a</sup>	1.05 <sup>a</sup>	0.89 <sup>a</sup>	70.0 <sup>b</sup>	50.0 <sup>b</sup>	52.01 <sup>ab</sup>	36.80 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>
10	Sumidero Veracruz	1.7919 <sup>ab</sup>	0.9672 <sup>a</sup>	0.78 <sup>b</sup>	59.6 <sup>b</sup>	38.2 <sup>ab</sup>	42.8 <sup>ab</sup>	34.8 <sup>bc</sup>	0.0350 <sup>a</sup>
11	Sumidero Veracruz	1.982 <sup>ab</sup>	1.49 <sup>a</sup>	1.982 <sup>b</sup>	71.6 <sup>b</sup>	44.2 <sup>ab</sup>	50.65 <sup>ab</sup>	5.80 <sup>bc</sup>	0.0483 <sup>a</sup>
12	Sumidero, veracruz	1.794 <sup>ab</sup>	0.85 <sup>a</sup>	1.008 <sup>b</sup>	68.0 <sup>b</sup>	43.6 <sup>ab</sup>	60.54 <sup>ab</sup>	44.93 <sup>bc</sup>	0.0815 <sup>a</sup>
13	Xomapa Veracruz	1.729 <sup>ab</sup>	1.36 <sup>a</sup>	0.865 <sup>b</sup>	72.4 <sup>b</sup>	48.8 <sup>ab</sup>	52.53 <sup>ab</sup>	5.6 <sup>bc</sup>	NI
14	Enrique L. Veracruz	1.71 <sup>ab</sup>	1 <sup>a</sup>	0.67 <sup>b</sup>	67.0 <sup>b</sup>	37.0 <sup>ab</sup>	60.6 <sup>ab</sup>	18.5 <sup>bc</sup>	0 <sup>a</sup>
15	Carranza. Cacao I. Chiapas	1.724 <sup>b</sup>	0.99 <sup>a</sup>	0.825 <sup>a</sup>	68.4 <sup>b</sup>	43.2 <sup>b</sup>	55.87 <sup>b</sup>	27.03 <sup>c</sup>	0.03862 <sup>a</sup>
16	Villaflores Chiapas	1.793 <sup>b</sup>	1.15 <sup>a</sup>	0.886 <sup>a</sup>	88.8 <sup>b</sup>	52.8 <sup>b</sup>	53.93 <sup>b</sup>	2.70 <sup>c</sup>	0.0398 <sup>a</sup>
17	Tonalá Chiapas	1.866 <sup>b</sup>	0.90 <sup>a</sup>	1.059 <sup>a</sup>	68.4 <sup>b</sup>	41.6 <sup>b</sup>	62.46 <sup>b</sup>	24.90 <sup>c</sup>	0.0329 <sup>a</sup>
18	Siltepec Chiapas	1.74 <sup>b</sup>	1.01 <sup>a</sup>	1.117 <sup>a</sup>	77.7 <sup>b</sup>	50.7 <sup>b</sup>	54.34 <sup>b</sup>	44.35 <sup>c</sup>	0.0202 <sup>a</sup>
19	La Concordia Chiapas	1.617 <sup>b</sup>	1.33 <sup>a</sup>	0.88 <sup>a</sup>	65.0 <sup>b</sup>	44.9 <sup>b</sup>	52.39 <sup>b</sup>	28.70 <sup>c</sup>	0.0384 <sup>a</sup>
19	Frotera C. Col. El Anonal Chiapas	1.68 <sup>b</sup>	0.85 <sup>a</sup>	1.074 <sup>a</sup>	64.9 <sup>b</sup>	41.9 <sup>b</sup>	51.93 <sup>b</sup>	47.45 <sup>c</sup>	0.0314 <sup>a</sup>
20	Mazatán Chiapas	1.66 <sup>b</sup>	1.08 <sup>a</sup>	0.869 <sup>a</sup>	50.1 <sup>b</sup>	26.6 <sup>b</sup>	52.47 <sup>b</sup>	3.60 <sup>c</sup>	0.0356 <sup>a</sup>
21	Ej. Nueva libertad Chiapas	1.781 <sup>b</sup>	1.09	0.896 <sup>a</sup>	75.9 <sup>b</sup>	47.0 <sup>b</sup>	50.37 <sup>b</sup>	44.57 <sup>c</sup>	0.0310 <sup>a</sup>
22	Ej. Lib. Osumacinta Chiapas	1.854 <sup>b</sup>	0.88 <sup>a</sup>	0.952 <sup>a</sup>	66.0 <sup>b</sup>	45.1 <sup>b</sup>	59.42 <sup>b</sup>	8.4 <sup>c</sup>	0.0344 <sup>a</sup>
23	Ej. Suchiapa Chiapas	1.576 <sup>b</sup>	1.04 <sup>a</sup>	0.822 <sup>a</sup>	61.1 <sup>b</sup>	38.0 <sup>b</sup>	61.17 <sup>b</sup>		0.1024 <sup>a</sup>
27	Carretera México-Tuxpan Km 90	1.838 <sup>ab</sup>	1.01 <sup>a</sup>	0.8946 <sup>ab</sup>	73.2 <sup>ab</sup>	50.4 <sup>b</sup>	52.17 <sup>ab</sup>	47.17 <sup>abc</sup>	0.0578 <sup>a</sup>
28	Guasave-Veracruz	1.836 <sup>ab</sup>	1.04 <sup>a</sup>	0.85 <sup>a</sup>	65.1 <sup>a</sup>	42.9 <sup>a</sup>	47.87 <sup>a</sup>	22.59 <sup>c</sup>	0.0045 <sup>a</sup>
29	Guasave-Puebla	1.795 <sup>ab</sup>	1.00 <sup>a</sup>	0.834 <sup>a</sup>	67.2 <sup>a</sup>	44.0 <sup>a</sup>	42.0 <sup>a</sup>	21.25 <sup>c</sup>	0.0329 <sup>a</sup>
30	Guasave-Morelos	1.774 <sup>ab</sup>	0.95 <sup>a</sup>	0.775 <sup>a</sup>	55.0 <sup>a</sup>	34.3 <sup>a</sup>	53.63 <sup>a</sup>	20.5 <sup>c</sup>	0.0127 <sup>a</sup>
32	San Luis Potosí	1.817 <sup>ab</sup>	1.02 <sup>a</sup>	0.902 <sup>ab</sup>	74.5 <sup>ab</sup>	50.3 <sup>b</sup>	58.27 <sup>ab</sup>	18.20 <sup>ab</sup>	0.0231 <sup>a</sup>
33	Michoacán	1.814 <sup>ab</sup>	1.02 <sup>a</sup>	0.919 <sup>a</sup>	77.6 <sup>ab</sup>	49.3 <sup>ab</sup>	54.29 <sup>ab</sup>	2.5 <sup>a</sup>	0.0209 <sup>a</sup>
35	Los Charcos Apatzingan	1.807 <sup>ab</sup>	0.98 <sup>a</sup>	0.813 <sup>a</sup>	64.0 <sup>ab</sup>	42.0 <sup>ab</sup>	41.86 <sup>ab</sup>	22.68 <sup>a</sup>	0.0841 <sup>a</sup>
38	Villa unión, Fortín de las Flores Ver.	1.93 <sup>ab</sup>	0.98 <sup>a</sup>	0.845 <sup>b</sup>	74.3 <sup>b</sup>	49.0 <sup>ab</sup>	52.42 <sup>ab</sup>	14.15 <sup>bc</sup>	0.0437 <sup>a</sup>
39	India 1 Sinaloa /ver	1.836 <sup>ab</sup>	1.03 <sup>a</sup>	0.85 <sup>a</sup>	65.1 <sup>a</sup>	42.9 <sup>a</sup>	55.29 <sup>a</sup>	25.59 <sup>c</sup>	0.0187 <sup>a</sup>
40	India 2 Sinaloa/Pue	1.795 <sup>ab</sup>	1.00 <sup>a</sup>	0.834 <sup>a</sup>	67.2 <sup>a</sup>	44.0 <sup>a</sup>	48.94 <sup>a</sup>	25.75 <sup>c</sup>	0.0188 <sup>a</sup>
41	India 3 Sinaloa/Moe	1.774 <sup>ab</sup>	0.95 <sup>a</sup>	0.775 <sup>a</sup>	55.0 <sup>a</sup>	34.3 <sup>a</sup>	46.36 <sup>a</sup>	25 <sup>c</sup>	0.0144 <sup>a</sup>
42	India 4 Sinaloa	1.787 <sup>ab</sup>	1.03 <sup>a</sup>	0.775 <sup>a</sup>	57.0 <sup>a</sup>	30.0 <sup>a</sup>	54.52 <sup>a</sup>	34.28 <sup>c</sup>	0.129 <sup>a</sup>
	Chiapas Oscar	1.71 <sup>b</sup>	1.13 <sup>a</sup>	0.893 <sup>a</sup>	77.9 <sup>b</sup>	49.5 <sup>ab</sup>	50.87 <sup>b</sup>	33.87 <sup>c</sup>	0.0423 <sup>a</sup>

El análisis de varianza en las características de las semillas revela que existen diferencias significativas entre las accesiones en cuanto el parámetro longitud, ya que se observa la formación de grupos de acuerdo a su origen, la accesión que presenta máxima longitud es la 6 proveniente de Jalpan, Puebla y la mínima la 24 de Carrizal viejo Puebla. En el ancho de las semillas indica semejanza teniendo el valor máximo la accesión 10 proveniente de Sumidero, Veracruz y la mínima la accesión 11 proveniente de esta misma localidad. Existen diferencias significativas en el espesor entre las accesiones de Puebla y Veracruz; Chiapas- Veracruz. Sin embargo, en las poblaciones de Chiapas y Puebla no existe diferencias; el máximo espesor registrado corresponde a la accesión 10 de Sumidero, Veracruz y la mínima a Sinaloa 3.

En cuanto al peso con testa sólo las accesiones de cultivadas en Sinaloa son diferentes, las restantes no presentan diferencias siendo teniendo como máximo valor la accesión 15 de Villaflores Chiapas y el mínimo 20 de Mazatán, Chiapas. El análisis en el peso sin testa indica que existe diferencia entre las accesiones Puebla Veracruz y Puebla Sinaloa, sin embargo no es diferente en cuanto a las de Chiapas. Se presenta semejanzas entre las accesiones Veracruz y Chiapas y no hay diferencias entre Veracruz y Sinaloa, en este parámetro el máximo valor registrado corresponde a la accesión 8 de Pantepec, Puebla y la mínima a la 20 de Mazatán Chiapas.

### **ANÁLISIS DE DIVERGENCIA GENÉTICA EN CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE SEMILLAS**

El análisis cluster jerárquico es una herramienta exploratoria diseñada para revelar las agrupaciones naturales (o los conglomerados o clusters) dentro de un conjunto de datos que no sería de otra manera evidente. Es el más útil cuando se desea agrupar un número pequeño (menos que algunos cientos) de objetos. Los objetos en análisis cluster jerárquico pueden ser casos o variables, dependiendo de si desea clasificar casos o examinar relaciones entre las variables. En el caos del cluster no jerárquico, los datos se dividen en k particiones o grupos donde cada partición representa un cluster. Opuestamente a los métodos jerárquicos el número debe conocerse a priori.

Debido a las ventajas que presentan estos análisis multivariados se realizó además del análisis de varianza, análisis de características físicas con distancia Euclidiana mediante conglomerados jerárquicos realizando un dendograma con método Ward y análisis de medias por conglomerados no jerárquicos (K-means).

Las 31 accesiones se agruparon en tres poblaciones, teniendo diferente número de poblaciones cada uno, el máximo número de estas se encuentran en el cluster 3 con 14 accesiones y el número mínimo en el cluster 2 con 4 accesiones. Las medias más grandes



de longitud, peso con testa, peso sin testa, y esfericidad se ubican en el grupo 3, en este podemos encontrar accesiones originarias de diferentes Estados, como Puebla, Chiapas, Veracruz, San Luis Potosí (Cuadro 11).

Cuadro 11.- Composición de clusters jerárquicos y valores obtenidos por K-means no jerárquicos de las características físicas de semillas.

Cluster	Número de accesiones	Accesiones	Long	Anch	Espes	Peso c/testa 100 s	Peso s/testa 100 s	Esfericidad
I	13	1,6,9,13,15,17,18,21, 22,23, 25, 26, 30	1.79	1.09	0.89	66.68	43.27	1.07
II	4	2,19, 24, 27,	1.75	1.00	0.82	54.75	32.82	0.84
III	14	3,4,5,7,8,10,11,12,14, 16 , 20, 28,29,31	1.88	1.05	0.89	79.91	50.76	1.10

Respecto a la distancia Euclideana en el dendograma se muestra un súper cluster conformado por 17 accesiones, el cual a su vez forma 2 grupos los cuales están unidos a una distancia de 71.40, en el primer cluster (rojo) existen 13 accesiones originarias de Puebla, Chiapas, Veracruz y Sinaloa. El segundo cluster (verde) está conformado por 4 accesiones provenientes de Puebla, Sinaloa y Chiapas. El súper-cluster está unido a una distancia de 178.10 con otro grupo indicando con esto una alta disimilitud entre ellos en este cluster (azul) se encuentra 14 accesiones originarias también de Puebla, Veracruz, Michoacán y Chiapas (Figura 11).

Con estos resultados se deduce la existencia de variación morfológica entre y dentro de poblaciones de semillas de *Jatropha curcas* ya que existe una amplia disimilitud. Esta variación no está correlacionada con su origen geográfico ya que los grupos formados son de diferente origen.

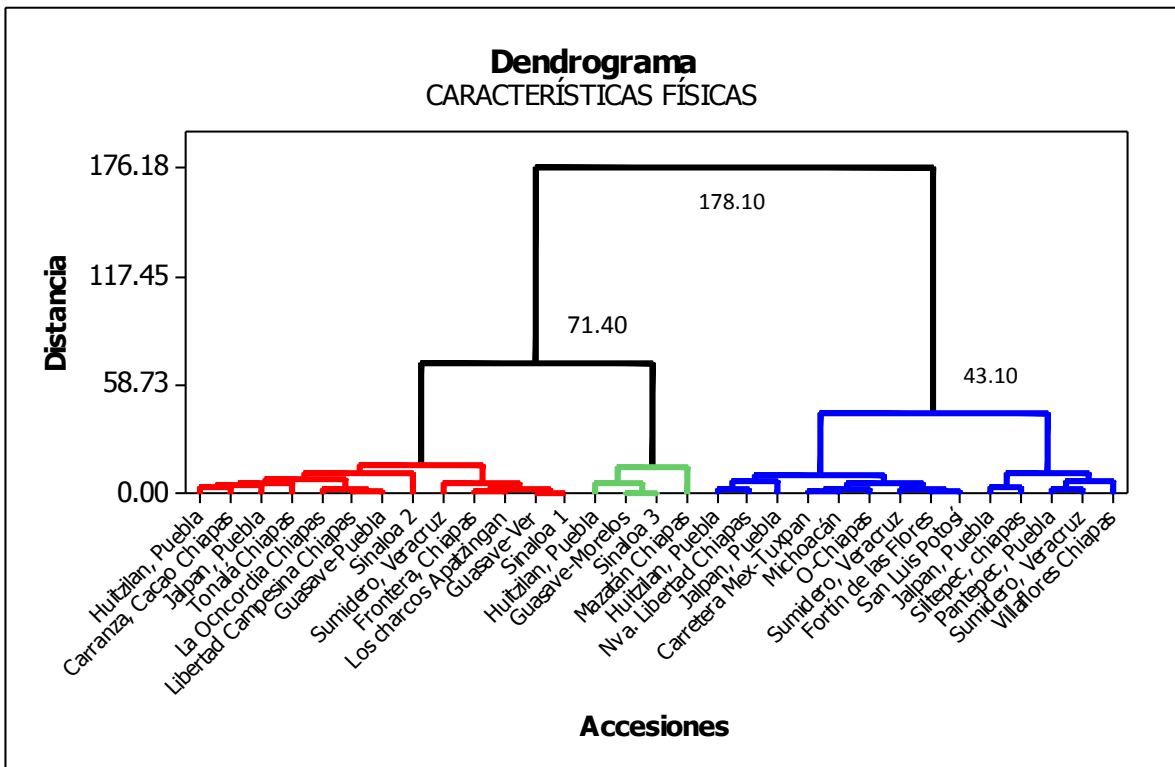


Figura 11 .- Dendrograma construido con el método Ward por análisis de clusters de distancias Euclidea por conglomerados no jerárquicos.

### DIVERGENCIA GENÉTICA EN CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE SEMILLAS.

Para conocer si existe similitud entre las accesiones de acuerdo a su composición química se realizó un análisis de divergencia genética mediante conglomerados jerárquicos realizando un dendrograma con distancias Euclidianas con método Ward y análisis de medias por conglomerados no jerárquicos (K-means).

El cluster 2 agrupó el máximo número de accesiones, 11 provenientes de Puebla, Chiapas, Veracruz, San Luis Potosí y Guasave-Morelos, estas accesiones son las del mayor contenido de aceite. Le siguió el cluster 1 con 9 accesiones provenientes de Puebla, Chiapas, Sinaloa, en este se agrupan accesiones con alto contenido de proteína. El cluster 3 está conformado por 5 accesiones de Veracruz, Chiapas y Michoacán las cuales tienen buen contenido de aceite y por último el cluster 4 conformado por 7 accesiones cuatro provenientes de Sinaloa, tres accesiones de Chiapas las cuales también tienen alto contenido de proteínas (Cuadro 12).

Cuadro 12.- Composición de clusters Euclidianos y valores de medias obtenidos por conglomerados no jerárquicos (K-means).

CLUSTER	NÚMERO DE ACCESIONES	ACCESIONES	CONT DE ACEITE	CONT. DE PROT.	CONT. E. FORBOL
I	9	1,2,7,9,13,17,25,28,32	51.55	30.50	0.0419
II	11	3,4,5,6,8,11,12,15,16,24,29	54.98	18.58	0.0355
III	5	10,14,19,21,30	54.15	4.60	0.0471
IV	7	18,20,22,23,26,27,31	47.05	23.17	0.0321

El dendograma obtenido mediante el método Ward forma 2 clusters unidos a una distancia de 113.28, el primer cluster está conformado por dos grupos que se unen a una distancia de 37.51 el primer cluster (rojo) está conformado por 9 accesiones donde aparecen dos accesiones de Huitzilán, el segundo grupo lo conforman 7 accesiones de Chiapas, Sinaloa y Michoacán. El segundo cluster también forma 2 subgrupos unidos a una distancia de 70.39, el grupo mayoritario está conformado por 11 accesiones (verde) provenientes en su mayoría a Puebla y Veracruz, el segundo cluster está formado por 5 accesiones originarias de Chiapas, Michoacán y Veracruz (Figura 12).

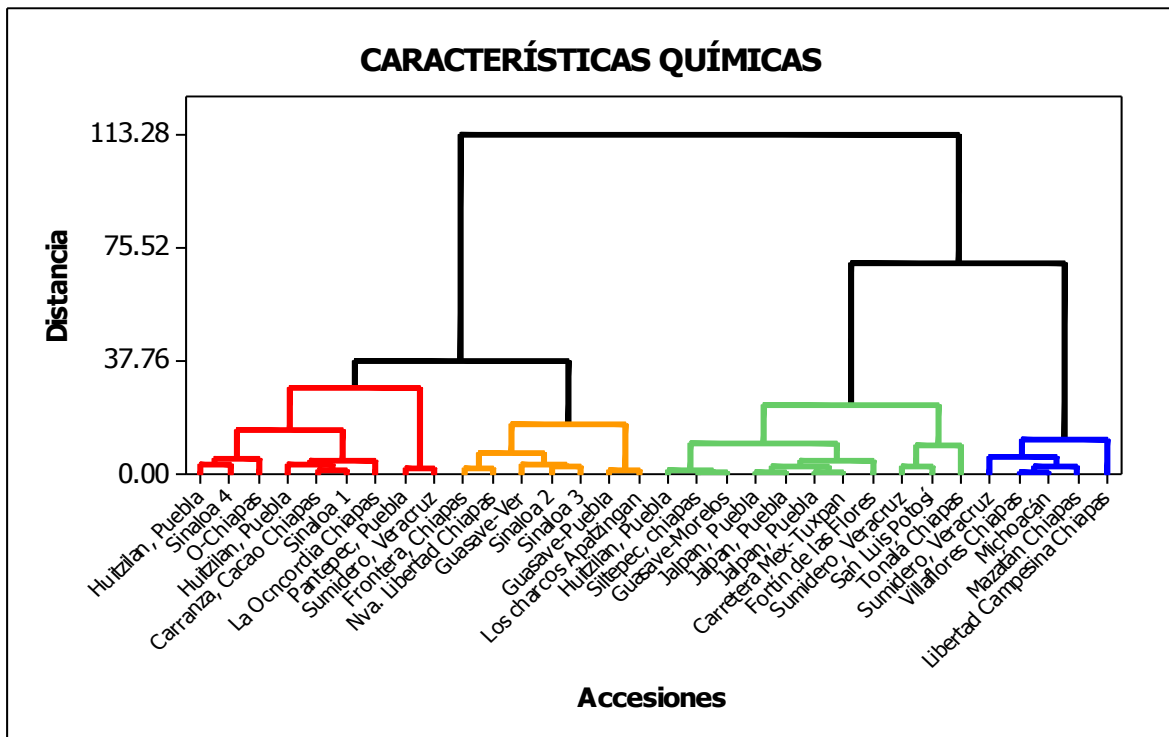


Figura 12.- Dendograma construido por método Ward del análisis de conglomerados Jerárquicos, distancia Euclideana.

Al igual que las características físicas existe variabilidad respecto al contenido de aceite y proteínas y no hay correlación entre el contenido de estos y su origen geográfico, ya que varía de acuerdo a las agrupaciones generadas mediante estos análisis.

El Análisis de componentes principales radica en demostrar como un gran número de variables puede ser reducido a un número menor. Según Júdez (citado por Benavides, 2004), éste análisis pretende facilitar la relación de las variables y la dispersión de las observaciones, detectando las variables responsables de esta variación. Los resultados de los componentes principales son interpretados tomando como base sus valores propios y vectores propios. Los valores propios y la variación total explicada de los CO, así como la proporción de la variación total. Se consideran como aceptables los valores que expliquen un 70% o más de la variación total.

El análisis de componentes principales indica que existen dos componentes mayor a 1, el primer componente tiene una varianza de 2.6704 y cuenta con un 44% del total de varianza correspondiente a longitud, el segundo con una varianza de 1.66 con un 72% de varianza total correspondiente a su ancho. Estos rangos muestran variación en cuanto a estos dos parámetros en las accesiones.

Cuadro 13.- Análisis de componentes principales

COMPONENTES PRINCIPALES	VALORES EIGEN	PROPORCIÓN DE VARIANZA TOTAL (%)	VARIANCA ACUMULATIVA (%)
1	2.67	0.445	0.445
2	1.66	0.278	0.723
3	0.908	0.151	0.874
4	0.436	0.073	0.947
5	0.314	0.052	0.999
6	0.0054	0.011	1.00

### CARACTERIZACIÓN DE SEMILLAS DE *Jatropha curcas* DE 18 LOCALIDADES DE MÉXICO

En otro trabajo se eligieron 18 regiones de diferentes Estados (Cuadro ); se colectaron semillas durante los meses de julio a noviembre de 2006. Los frutos se colocaron en bolsas de papel debidamente etiquetados; se llevaron al laboratorio, donde fueron extraídas las semillas, las cuales fueron secadas sol y almacenado en frascos de vidrio a temperatura ambiente hasta su análisis. La altitud de los lugares se registro por GPS III (Garmin, model GPS III Plus, Ronsey, UK). Las semillas sin testa con mayor peso fueron las colectadas en las localidades de Suchiapa, Chiapas y las de Tlapacoyan, Veracruz (0.83g) (Cuadro 14).

Cuadro 14. Características físicas de la semilla de *Jatropha curcas*, colectadas en diferentes localidades de México

Localidad	Altura nms*	Precipitación anual (mm)	Temperatura promedio(°C)	Tipo de clima
San José Acateno.	80	1400	24.0	A(w)
Tenampa	980	920	27.0	A(w1)
Coatzacoalcos	10	2500	25.6	Am
Tlapacoyan	430	1500	18.0	A(w)
Huitzilan	900	2021	18.0	Acf
Xochitlan	1040	1400	24.0	Acf
Comalcalco	40	2675	26.4	Am
Suchiapa	440	1186	24.4	A(w)
Chiapa de Corzo	450	990	26.0	A(w)
Villaflores	560	1209	24.3	A(w1)
Tlaxmalac	940	911	25.0	A(w)
Costa Chica	50	1200	25.0	A(w1)
Cuautla °	1300	856	22.6	Aw°
Tejaban	483	853	24.7	A(w)
Nuevo Urecho	483	853	24.7	A(w)
Tepalcatepec	402	621	24.8	A(w1)
Periban	1420	1366	28.2	A(w1)
Gabriel Zamora	474	853	26.0	A(w)

### COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición química de la semilla sin testa de las diversas localidades, presentó variación fue de 18 a 33 %; Huitzilan presentó el menor contenido de proteína cruda (18.6%) y de Villaflores el más alto (33.3%). El contenido de aceite fue de 46 a 64%; el menor porcentaje fue para Villaflores (45.9%) y el más alto para Huitzilan (64.5%). La ceniza y los contenidos en energía gruesa también variaron substancialmente (Cuadro 15).

Cuadro 15 .- Composición proximal de semillas de *Jatropha curcas* L.

Localidad	Materia seca	Proteína cruda	Aceite	ASH	Fibra	GROSS energía Mj/kg
San José Acateno.	95.7	27.6	58.3	5.0	5.1	29.9
Tenampa	94.7	28.9	57.4	3.8	3.8	29.4
Coatzacoalcos	95.3	31.9	52.6	4.5	3.8	29.2
Tlapacoyan	94.6	28.2	56.1	4.7	4.3	29.1

Huitzilán	96.0	18.8	64.5	5.8	5.3	31.6
Xochitlán	95.1	29.9	57.1	5.3	3.5	30.3
Comalcalco	95.3	24.6	56.3	5.1	4.2	29.2
Suchiapa	95.4	24.3	60.4	4.0	4.2	30.1
Chiapa de Corzo	95.9	26.4	55.3	4.3	4.8	29.1
Villaflores	94.0	33.3	45.9	4.	0 4.0	26.5
Tlaxmalac	95.6	23.2	57.7	5.4	4.1	30.2
Costa Chica	95.8	24.2	58.7	4.8	3.9	29.2
Cuautla	95.4	29.7	58.7	4.7	4.0	29.7
Tejaban	95.7	30.5	51.4	4.0	4.1	29.1
Nuevo Urecho	95.7	30.5	51.4	4.0	4.1	29.1
Tepalcatepec	96.4	29.2	51.3	4.3	4.2	29.2
Periban	95.6	30.5	48.9	3.8	3.9	27.4
Gabriel Zamora	95.8	24.3 9	51.1	3.7	3.9	29

## FACTORES TÓXICOS Y ANTINUTRICIONALES

La actividad del inhibidor de la tripsina se extendieron a partir del 30 a 35 mg/g, a ácido fítico a partir del 7.3 a 9.2%, al contenido de las saponinas a partir del 1.1 a 3.7% y a la actividad de lectina a partir de 1.56 a 12.5 mg/ml. La toxicidad del *J. curcas* se atribuye a la presencia de esteres del forbol (Makkar *et al.*, 1997). La concentración más alta de esteres del forbol la presentaron las muestras de Chiapa de Corzo (4.05 mg/g). Las muestras de Veracruz, Puebla y Morelos estuvieron libres de esteres del forbol. Estas semillas son consumidas por en alimentos tradicionales (Cuadro 16).

Cuadro 16.- Factores tóxicos y antinutricionales de semillas *Jatropha curcas* L.

Localidad	Tripsina	Ac. fítico	Saponinas	Lectina	Es for	consum
San José Acateno.	28.2 (0.76)	8.4 (0.26)	2.03 (0.12)	1.56	ND	Edible
Tenampa	35.5 (0.15)	7.5 (0.25)	2.50 (0.00)	12.5	ND	Edible
Coatzacoalcos	28.4 (1.06)	7.60 (0.06)	2.06 (0.02)	3.12	ND	Edible
Tlapacoyán	29.5 (0.58)	8.6 (0.36)	2.09 (0.23)	1.56	ND	Edible
Huitzilán	35.4 (0.6)	9.2 (0.31)	1.62(0.16)	1.56	ND	Edible
Xochitlán	28.5 (0.3)	7.8 (0.07)	1.10(0.05)	0.78	ND	Edible
Comalcalco	29.0 (0.76)	7.9 (0.10)	1.53 (0.25)	6.25	ND	Edible
Suchiapa	34.1 (1.5)	8.55 (0.26)	2.08 (0.05)	12.5	2.03	Non

					(0.16)	Edible
<b>Chiapa de Corzo</b>	28.3 (0.32)	7.3 (0.29)	1.96 (0.10)	3.12	4.05 (0.33)	Non Edible
<b>Villaflores</b>	23.4 (0.45)	7.7 (0.04)	3.71 (0.20)	12.5	0.60 (0.5)	Non Edible
<b>Tlaxmalac</b>	33.8 (0.76)	8.7 (0.16)	1.97 (0.02)	1.56	1.88 (0.26)	Non Edible
<b>Costa Chica</b>	32.5 (1.06)	8.2 (0.05)	2.68 (0.04)	12.5	ND	Edible
<b>Cuautla</b>	35.51 (0.15)	8.76 (80.39)	2.14 (0.03)	1.46	ND	Edible
<b>Tejaban</b>	27.4 (0.85)	8.4 (0.15)	2.41 (0.14)	0.78	ND	Edibl
<b>Nuevo Urecho</b>	26.1 (0.55)	7.9 (0.31)	2.36 (0.16)	3.12	ND	Edible
<b>Tepalcatepec</b>	28.8 (1.01)	7.9 (0.63)	1.62 (0.11)	6.25	ND	Edible
<b>Periban</b>	30.2 (0.96)	8.9 (0.07)	1.67 (0.08)	12.5	ND	Edible
<b>Gabriel Zamora</b>	30.0 (0.25)	8.0 (0.42)	2.21 (0.7)	3.12	ND	Edible

Los resultados fueron analizados mediante conglomerados jerárquicos de acuerdo a distancia euclidanea realizando un dendograma con método Ward (Figura). El dendograma muestra la formación de un súper-cluster en el que se agrupan la mayor parte de las accesiones provenientes de diferentes localidades, el cual está compuesto a su vez por dos cluster separados a una distancia de 32.75, de estos el cluster 2 es el que agrupa el mayor contenido de aceite, proteínas y el der meno contenido de ésteres de forbol en contraste con los demás grupos.

El pequeño cluster en donde sólo reúne las accesiones de Suchiapa y Villaflores las cuales agrupan el mayor porcentaje digestibilidad de proteína *In vitro*, ésteres de forbol, lectinas y saponinas (Cuadro 17).

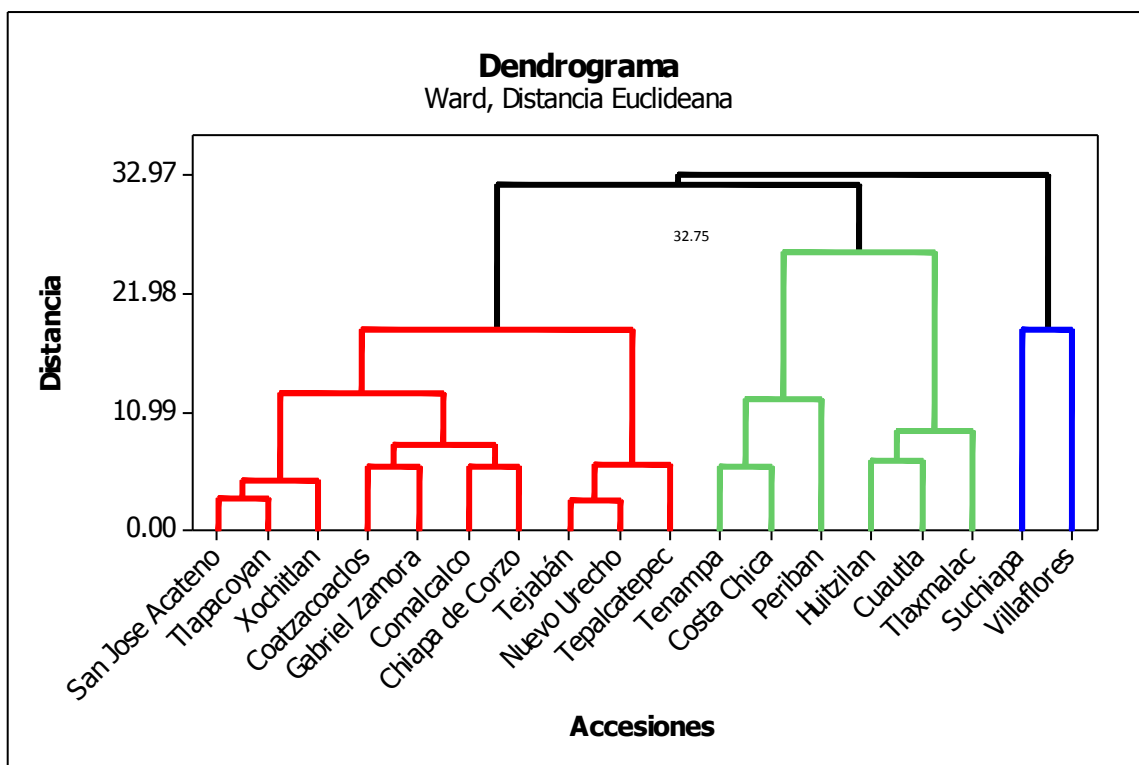


Figura 13 .- Composición química de semillas de *Jatropha curcas* L.

Cuadro 17 .- Composición química de semillas.

CLUSTER	NÚMERO DE ACCESIONES	PESO C/T	PESO S/T	ACEITE	PROTEÍNA %DIGES.	E. de forbol	Tripsina	Saponinas	Lectinas
I	10	66.80	33.20	54.09	76.82	0.405	28.42	1.93	2.96
II	6	64.50	35.50	57.65	78.60	0.313	33.81	2.09	7.01
III	2	74.05	25.95	53.15	73.55	1.315	28.75	2.89	12.50

Los resultados de estos tres proyectos indican que las semillas obtenidas de las comunidades de la Sierra Nor-oriental ( Huitzilan) poseen un contenido elevado de aceite y en algunas accesiones de proteínas, adicionalmente a su baja concentración de compuestos tóxicos ó antinutricios. Por lo que hacen una accesión recomendable para su uso en la extracción de aceite (Cuadro 17).



## Correlaciones

Carácter	Longitud	Ancho	Espesor	Ésteres de Forbol	Proteína	Aceite	Peso c/testa	Peso s/testa
Longitud		-0.028	-0.060	-0.079	-0.235	-0.015	0.610	0.540
Ancho				-0.129				
Espesor				-0.132				
Peso c/testa				-0.039				
Peso s/testa				-0.071				0.540
Contenido de aceite				0.147	-0.269			0.034
Contenido de proteína				-0.269				0.024
Contenido de ésteres de forbol								-0.071

## **ESTRATEGIAS PARA BANCOS DE GERMOPLASMA DE *Jatropha curcas* L.**

### **INTRODUCCIÓN**

La conservación de la biodiversidad es un tema que ha venido ganando relevancia de forma progresiva en nuestra sociedad. La conservación de la flora silvestre constituye una pieza clave. No sólo por la obligación ética de conservar este legado que nos ha dado la naturaleza para las generaciones venideras o el mero interés científico. La sociedad es cada vez más consciente de la importancia de la flora nativa como fuente de alimentos, aceites y lubricantes, gomas, resinas, ceras, colorantes, fibra, energía, sustancias aromáticas y principios medicinales, por su valor ornamental o por su valor ecológico (Prance, 1997).

A pesar del creciente interés suscitado por la diversidad de la flora silvestre, la actividad humana está ocasionando un progresivo deterioro de la misma. Según datos del World Conservation Monitoring Centre, el 12.5% del total aproximado de 250,000 especies vegetales conocidas en nuestro planeta se encuentra en peligro de extinción.

La percepción de la erosión genética como un problema a escala planetaria no tuvo lugar hasta bien entrado el siglo XIX. Las señales de alarma comenzaron a tomarse en serio a mediados de los años sesenta, al descubrirse que el alto ritmo de desplazamiento de

variedades primitivas cultivadas por la introducción de nuevos cultivares estaba llevando a un rápido estrechamiento de la base genética de las especies cultivadas (Maxted et al., 1997).

Actualmente, la conservación de recursos genéticos es aceptada de forma generalizada como una responsabilidad social, dentro del contexto mucho más amplio de conservación de la biodiversidad. En este escenario, a la pérdida de recursos genéticos ocurrida por la sustitución de variedades tradicionales por cultivares modernos, hay que añadir la ocasionada en especies vegetales nativos a consecuencia del deterioro de los ecosistemas naturales por la creciente actividad humana.

### **MODALIDADES DE CONSERVACIÓN**

La conservación de la biodiversidad puede, en teoría, aplicarse a tres niveles de organización: genética, organísmica y ecológica. Con los avances de la ingeniería genética en el aislamiento, secuenciación y transferencia de genes, se acerca el momento en el que se establezcan grandes bancos de genes para su conservación. Sin embargo, por el momento en la mayoría de los casos, los genes no se conservan individualmente, sino formando parte de organismos, poblaciones o ecosistemas. Al igual que los genes de un organismo se asocian entre ellos a través de múltiples interacciones, los individuos de una especie o de diferentes especies interactúan dentro de un ecosistema.

### **CONSERVACIÓN *in situ***

La conservación *in situ* de especies amenazadas implica una adecuada protección y gestión de sus ecosistemas. Existe un gran número de figuras de protección de espacios naturales en donde la actividad humana queda condicionada o restringida en mayor o menor medida. No obstante, frecuentemente la simple restricción de la actividad humana en el entorno no resulta suficiente para asegurar la supervivencia de las especies a conservar. La gestión activa de un ecosistema para conservar una determinada especie puede requerir medidas de intervención, como la preservación del medio físico en el que se desarrolla la especie amenazada, la potenciación de interacciones con otros organismos que lleven implícito un beneficio para la especie amenazada y el establecimiento de programas de reforzamiento de poblaciones existentes, reintroducción en localidades donde la población ya se haya extinguido o, incluso, la introducción de nuevas poblaciones (Falk, 1989). Para abordar de forma apropiada este tipo de acciones resulta necesario recabar previamente una gran cantidad de información sobre la especie a proteger y su ecosistema. Por ello, el proceso de conservación *in situ* se inicia con el estudio y seguimiento en el tiempo de las poblaciones, recabando datos demográficos, genéticos y autoecológicos (Gillman, 1997).

Para llevar a cabo la conservación de *Jatropha curcas* se establecieron plantaciones en la sierra Norte y Nororiental del Estado de Puebla y en el Estado de Veracruz.

En el mes de Julio de 2008 en el municipio de Xicotepec de Juárez perteneciente al estado de Puebla, La universidad Tecnológica de Xicotepec de Juárez facilito un terreno 2500 m<sup>2</sup> en el cual se sembraron 300 plantas de *J. curcas* propagadas a través de semilla y aclimatadas en invernadero durante cuatro meses. La plantación se mantuvo en condiciones de temporal y se realizaron labores de cultivo como cajeteo, fertilización y control de maleza manual (Figura 14 ).



Figura 14.- Plantación en Xicotepec de Juárez Puebla.

El muestreo para evaluar la viabilidad, sanidad y desarrollo de las plantas se realizo en noviembre de 2008, eligiendo al azar diez plantas de cuatro unidades de muestreo. Se evaluó el desarrollo de tomando en cuenta la altura, el grosor de tallo y el número de hojas.

Se cuantificaron 246 plantas viables lo que representa el 82% de la plantación inicial; se observaron en algunas plantas áfidos, araña roja y daño foliar aparentemente causado por hongos fitopatógenos; además se observó que el 57% de las plantas presentaban clorosis (Figura 15).



Figura 15 . Planta de con signos de clorosis.

La evaluación del desarrollo de la plantación muestra que la altura media de las plantas de *J. curcas* es de 10.8 cm., el grosor de tallo de 1.4 cm. y cada individuo posee una media de 2.4 hojas.

Cuadro 18 . Evaluación del desarrollo de la plantación de *J. curcas* en Xicotepec

Parámetro	Media	Desviación estándar
Altura (cm.)	10.8	4.6
Grosor de tallo (cm.)	1.4	0.33
Número de hojas	2.4	1.9

A los 12 meses de la siembra se volvió a evaluar la supervivencia y el desarrollo de las plantas, contabilizando 136 plantas vivas, el 20% de las 300 que inicialmente se sembraron sufrió pudrición de tallo; el 10% plagas y el 20% restante fueron dañadas accidentalmente debido al chapeo del terreno

Del mismo modo se realizó una plantación en el Municipio de Huitzilan intercalada con cafetos, se sembraron 700 plantas en ladera a una distancia de 3 x 3 m (Figura 16).





Figura 16.- Plantación en ladera Huitzilán de Serdán.

Las plantas sembradas se obtuvieron de semillas nativas, se evaluó su desarrollo a lo largo del proyecto. En este predio no se realizaron labores culturales durante un año para comprobar lo dicho en bibliografía de que estas plantas pueden crecer en suelos pobres, arenosos que no requieren demasiados cuidados como chapeo, fertilización, etc.

En Zoyotla pertenece al mismo municipio de Huitzilán de Serdán se estableció otra plantación en ladera rodeada de vegetación nativa, las plantas se obtuvieron de semillas de Huitzilán (Figura 17).



Figura 17 .- Plantación en Zoyotla, Huitzilán de Serdán.

### CONSERVACIÓN *ex situ*

Mientras está universalmente aceptado que el mecanismo más efectivo y eficiente para la conservación es la protección de los hábitats, también está reconocido que las técnicas de conservación *ex situ* constituyen componentes críticos en un programa de conservación global.

Los programas de conservación *ex situ* complementan la conservación *in situ* almacenando a largo plazo germoplasma representativo de las poblaciones, permitiendo un mejor conocimiento de las características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del material almacenado y proporcionando propágulos para su utilización en programas educativos, programas de mejora genética de especies cultivadas y en planes de reforzamiento, reintroducción o introducción.

Los métodos de conservación *ex situ* implican la recolección de muestras representativas de la variabilidad genética de una especie y su mantenimiento fuera de las condiciones naturales en las que la especie ha evolucionado. Las ventajas que proporcionan estos métodos son control directo del material, fácil accesibilidad y disponibilidad (Reid y Miller, 1989).

En el estado de Sinaloa se tiene una plantación con diferentes ecotipos, estos fueron sembrados en diferente orden para observar su comportamiento. Las plantas sembradas provenientes de Puebla son 360 , Morelos 360 y Veracruz con 150 plantas (Figura 18).

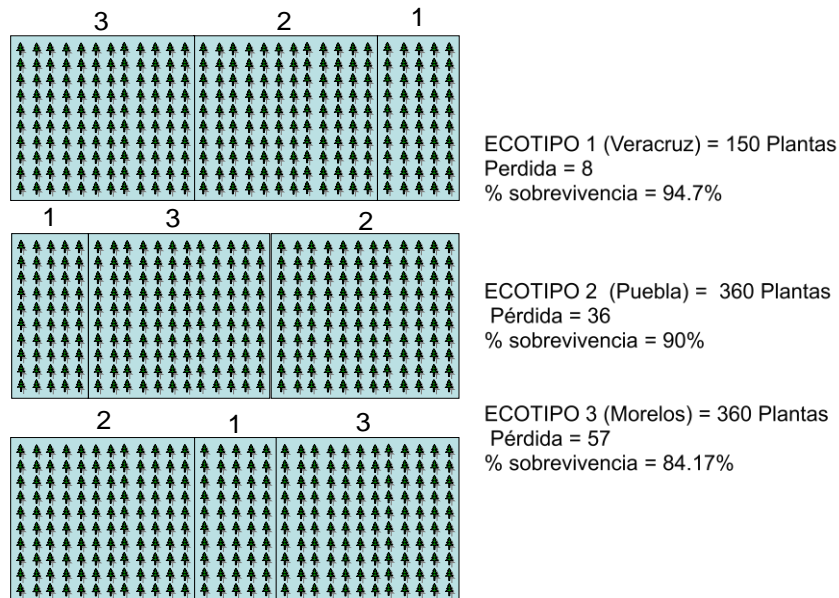




Figura 18.- Esquema de plantación de Sinaloa con diferentes ecotipos mexicanos.

Esta plantación cuenta con sistema de riego y se le realizaron cuidados como: chapeo, fertilización, control de plagas y enfermedades (Figura 19).



Figura 19.- Plantación de Sinaloa

En Mérida Yucatán se estableció una plantación obtenida de semillas de Huitzilán de Serdán Puebla rodeadas de vegetación nativa, sin embargo existen plantaciones de otras variedades cercas de esta (Figura 20).





Figura 20.- Plantación de Mérida, Yucatán.

En Yautepec Morelos también se cuenta con una plantación en la cual se encuentran sembradas diferentes accesiones originarias de diferentes Estados de México (Figura 21).



Figura 21.-Plantación de Yautepec Morelos



## ALMACENAMIENTO DE GERMOPLASMA

El almacenamiento de germoplasma de especies amenazadas tiene lugar en forma de colecciones de plantas y en los bancos de germoplasma.

### COLECCIONES DE PLANTAS

Las colecciones de plantas constituyen el método tradicional de conservación ex situ de recursos fitogenéticos. Bajo esta denominación se pueden considerar tanto los jardines botánicos como las colecciones de plantas en campo. No obstante, el almacenamiento de germoplasma de especies amenazadas en forma de colecciones de plantas tan sólo tiene lugar bajo el cuidado de los jardines botánicos.

#### COLECCIÓN DE PLANTAS EN YAUTEPEC, MORELOS.

En el Centro de Investigación CEPROBI se tiene establecida una colección de plantas de las cuales ya se han obtenido frutos (Figura 22) estos especímenes fueron extraídos de las siguientes localidades del país (Cuadro 19).

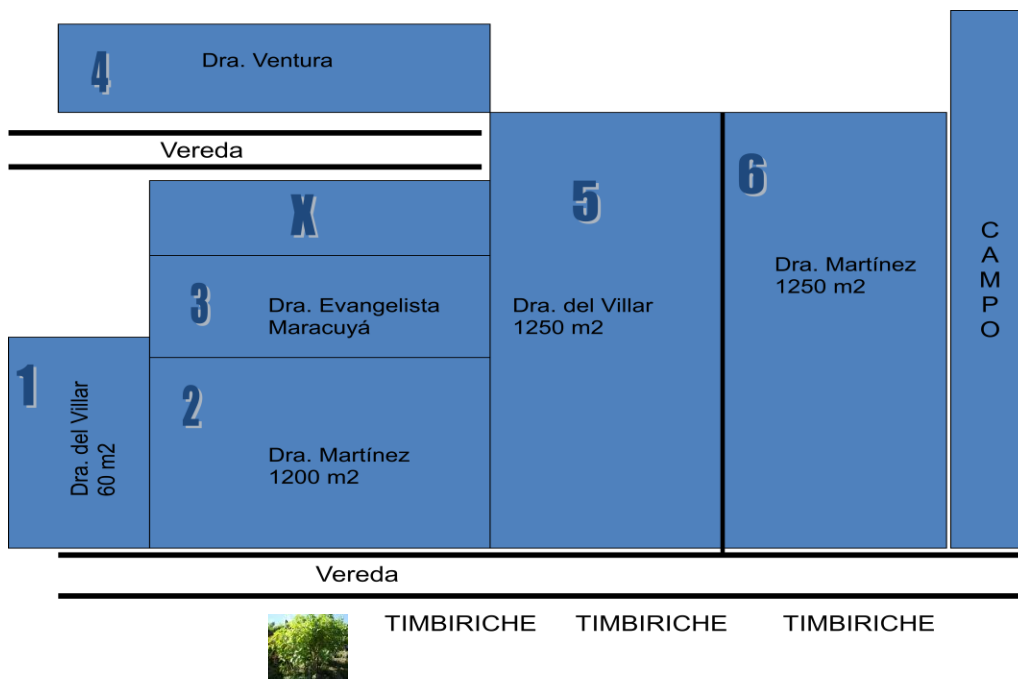


Figura 22.- Plano de predio sembrado en CEPROBI

Cuadro 19.-  
aclimatadas  
Morelos.

<b>ORIGEN</b>	<b>LOCALIDAD</b>
<b>Veracruz</b>	San Jose Acateno
	Tenampa
	Coatzacoaclos
	Tlapacoyan
<b>Puebla</b>	Huitzilan
	Xochitlan
<b>Tabasco</b>	Comalcalco
<b>Chiapas</b>	Suchiapa
	Chiapa de Corzo
	Villaflores
<b>Guerrero</b>	Tlaxmalac
	Costa Chica
<b>Morelos</b>	Cuatla
<b>Michoacán</b>	Tejabán
	Nuevo Urecho
	Tepalcatepec
	Periban
	Gabriel Zamora

Accesiones  
en Yautepec,

### **BANCOS DE GERMOPLASMA**

La conservación ex situ de germoplasma de especies raras y amenazadas está basada esencialmente en la utilización de los bancos de germoplasma. Los bancos de germoplasma son centros orientados al almacenamiento de propágulos de una parte representativa de la variabilidad genética correspondiente a una determinada especie. Dentro de esta categoría podemos distinguir los bancos de semillas, los bancos de cultivo in vitro, los bancos de polen y los bancos de genes o DNA.

### **BANCOS DE SEMILLAS**

El almacenamiento de semillas ha interesado a la humanidad desde el inicio de la Agricultura hace 10 000 años. Los antiguos agricultores almacenaban semillas para su utilización en la siembra del siguiente año o como reserva de alimento. Sin embargo, no es hasta mediados del presente siglo cuando se inicia de forma sistemática el almacenamiento de semillas con fines científicos o de conservación. El almacenamiento del material a conservar en forma de semillas constituye uno de los procedimientos de conservación ex situ más válidos y extendidos en la actualidad. Se ha podido comprobar que el almacenamiento de semillas a largo plazo constituye una operación relativamente simple y económica en términos de tecnología, infraestructuras, personal y gastos de mantenimiento (Maxted et al., 1997). De esta manera, resulta posible mantener un gran número de semillas de diferentes especies vegetales durante largos periodos de tiempo y con un mínimo riesgo de daños genéticos. Las semillas presentan una serie de características que hacen que su almacenamiento sea el método más eficaz y económico para la conservación ex situ de especies vegetales. Por un lado, las semillas son unidades adaptadas a la dispersión en el tiempo y por tanto, capaces en la mayoría de los casos de permanecer viables, de forma natural, durante largos periodos de tiempo (Chin, 1994). En segundo lugar el tamaño pequeño de las semillas, unido a la posibilidad de que cada una de ellas posea una constitución genética diferente, asegura la conservación de una gran diversidad genética en un espacio reducido (Iriondo y Pérez, 1999).

La conservación de semillas ofrece como mínimo un servicio de seguridad y apoyo a otras técnicas de conservación, mientras que, en el otro extremo, puede constituir la única opción disponible cuando los últimos ejemplares de una especie están a punto de desaparecer (Reid y Miller, 1989). Por ello, entre los métodos de conservación, los bancos de semillas son los más utilizados al ser simultáneamente prácticos y económicos.

En general, se utiliza el término “colección base” para las colecciones almacenadas a largo plazo, mientras que el término “colección activa” es aplicado a colecciones almacenadas a mediano plazo y se utiliza el término “colecciones de trabajo” para referirse a colecciones de mejoradores almacenadas con objetivos a corto plazo. Por motivos de seguridad, a menudo se guardan duplicados de las colecciones base en otros bancos de semillas.

Aunque el almacenamiento en bancos de germoplasma está universalmente aceptado como parte integral de los programas de conservación de plantas silvestres, las muestras de semillas de plantas silvestres almacenadas en bancos de germoplasma suponen menos del 2% del total de germoplasma almacenado, destinado esencialmente a plantas cultivadas (Astley, 1991).

## **SEMILLAS ORTODOXAS Y SEMILLAS RECALCITRANTES**

Las semillas se clasifican como ortodoxas o tolerantes a la desecación cuando son capaces de mantener viabilidad tras ser desecadas a menos de 5 – 10% de contenido de humedad. Por el contrario, las semillas recalcitrantes o sensibles a la desecación pierden viabilidad cuando se desecan por debajo de un límite crítico, habitualmente entre 12-30% de contenido en humedad (Chin y Roberts, 1980). Existe una tercera categoría en la que las semillas tienen características de almacenamiento intermedias entre las ortodoxas y las recalcitrantes. Las semillas intermedias pueden ser desecadas a contenidos de humedad similares a los de las semillas ortodoxas. Sin embargo, las semillas, una vez desecadas, se dañan al someterlas a bajas temperaturas y su viabilidad desciende rápidamente durante el almacenamiento (Ellis et al., 1990). Por ello la determinación del comportamiento de las semillas de una especie constituye un tema trascendental de cara a su conservación a largo plazo. Las semillas de especies con semillas ortodoxas pueden ser conservadas en bancos de semillas convencionales bajo condiciones de baja temperatura y humedad. Por el contrario, las especies con semillas intermedias o recalcitrantes no pueden mantenerse de esta manera (Marzalina y Krishnapillay, 1999).

Afortunadamente, la mayoría de las especies silvestres de las zonas templadas del planeta forman semillas ortodoxas. Las semillas recalcitrantes se encuentran en especies acuáticas, especies con semillas de gran tamaño, especies procedentes de zonas tropicales y algunas especies arbóreas de clima templado como *Quercus*, *Hacer* y *Aesculus* (Chin y Roberts, 1980).

### **PRINCIPIOS DE CONSERVACIÓN DE SEMILLAS**

El principio básico para la conservación de semillas es la limitación de los cambios químicos que son originados por el metabolismo o los procesos de envejecimiento. Se sabe desde hace tiempo que unas condiciones de baja temperatura y bajo contenido de humedad prolongan la longevidad de las semillas. De acuerdo a las reglas de Harrington (Justice y Bass, 1978), existe una relación exponencial entre la longevidad de las semillas, la temperatura y el contenido de humedad de almacenamiento, de manera que la longevidad de una semilla se duplica por cada reducción de 5 °C en la temperatura y por cada reducción de un 1% en el contenido de humedad. De acuerdo con este modelo, las semillas conservadas a muy bajas temperaturas y con muy bajos contenidos de humedad deberían mantenerse viables durante milenios. Sin embargo, Vertucci y Roos (1990) y Ellis et al. (1990) han mostrado que existen límites a los efectos beneficiosos de la desecación sobre la longevidad y que estos límites dependen de la composición química de la semilla. También se ha comprobado que, en contra de lo establecido por las reglas de Harrington, los efectos de la temperatura y el contenido de humedad no son independientes (Vertucci y Roos, 1993). De todas formas, el uso apropiado de estos dos factores proporciona una

vía aceptable para la conservación a largo plazo de muestras de semillas en bancos de germoplasma.

### **CONSERVACIÓN DE SEMILLAS ORTODOXAS EN BANCOS DE SEMILLAS CONVENCIONALES**

Los métodos para la manipulación de las semillas, el envasado, los ensayos de germinación y el envío de muestras de semillas han sido evaluados en profundidad y se encuentran estandarizados para el caso de especies cultivadas (Ellis et al., 1985, FAO e IPGRI, 1994) y, en principio, son igualmente aplicables a las especies silvestres.

Una vez que las semillas llegan al banco, éstas se desecan hasta un contenido de humedad de 3 – 7% (FAO e IPGI, 1994). A continuación se limpian, se cuentan y se ensaya su viabilidad antes de colocarlas en recipientes. Los recipientes utilizados para el almacenamiento suelen ser tarros de vidrio, tubos de ensayo, latas metálicas herméticas y bolsas de aluminio laminado (Chin, 1994, Iriondo y Pérez, 1999).

Los métodos de conservación convencionales normalmente incluyen el almacenamiento a temperaturas comprendidas entre 5°C y -20°C. En la conservación a largo plazo las semillas se almacenan normalmente a -18°C, mientras que en la conservación a medio plazo se utiliza una temperatura de 0 a 10°C (Ellis et al., 1985).

Independientemente de las condiciones de almacenamiento utilizadas, la viabilidad de las muestras debe ser controlada periódicamente. Si el porcentaje de germinación es inferior al 85% del valor inicial en muestras almacenadas en colecciones a largo plazo y al 65% del valor inicial en colecciones activas, se recomienda su regeneración ya sea mediante nuevas recolecciones o por multiplicación a partir de las semillas viables (FAO e IPGRI, 1994). La regeneración mediante recolección en muchos casos no es posible al haber desaparecido las poblaciones naturales y la multiplicación inevitablemente conlleva alteraciones en la composición genética de las muestras, originando, frecuentemente, una disminución de la variabilidad genética y, en cualquier caso, pérdida de genotipos. Por ello, resulta prioritario garantizar unas condiciones adecuadas de almacenamiento para retrasar en lo posible la regeneración.

Conviene hacer una distinción entre el diseño y los procedimientos utilizados en un banco de semillas de especies cultivadas y los llevados a cabo en un banco de semillas de especies silvestres. Los bancos de semillas de especies cultivadas manejan miles de accesiones de especies cuyas semillas son habitualmente de considerable tamaño. En consecuencia, estos bancos de semillas necesitan mucho más espacio y cierto número de facilidades adicionales para cumplir objetivos. Por el contrario, los bancos de semillas de especies silvestres normalmente poseen menos accesiones y las semillas almacenadas son más pequeñas.

## CONSERVACIÓN DE SEMILLAS RECALCITRANTES

Las semillas recalcitrantes tienen longevidades cortas que oscilan entre unas pocas semanas y varios meses (Chin y Roberts, 1980). Los tres factores que contribuyen a la corta longevidad de las semillas almacenadas son: sensibilidad a la desecación, daños por frío y problemas de contaminación microbiana y germinación durante el almacenamiento asociados a su alto contenido de humedad.

Para mantener la viabilidad, las semillas recalcitrantes se conservan a una temperatura tan baja como sea posible bajo condiciones que mantengan un contenido de humedad de las semillas ligeramente superior al límite crítico y aseguren un aporte de oxígeno para la respiración (Marzalina y Krisphnapillary, 1999). Dado que la longevidad de las semillas bajo estas condiciones es tan sólo del orden de semanas o meses, estas especies se conservan habitualmente en colecciones de campo.

En la actualidad se están desarrollando métodos para que los tejidos puedan ser expuestos a temperaturas inferiores a 0°C sin que se forme hielo letal. Estos métodos requieren optimizar el contenido de humedad de la semilla y enfriar los tejidos hasta una temperatura apropiada y a una velocidad adecuada de manera que tanto los daños por desecación como por congelación se eviten.

## COLECCIÓN DE SEMILLAS *Jatropha curcas* EN MÉXICO

En el transcurso del proyecto, se realizaron colectas en los Estados de Puebla, Veracruz, Oaxaca, Michoacán, Sinaloa, San Luis Potosí, Morelos, Yucatán y Chiapas. Teniendo un total de 140 accesiones de las cuales, 43 accesiones pertenecen al Estado de Puebla, 13 al Estado de Veracruz, 5 al Estado de Oaxaca, 6 a Michoacán, 8 accesiones del Estado de Sinaloa, 1 a San Luis Potosí, 2 a Morelos al igual que Yucatán y 60 del Estado de Chiapas. Las accesiones colectadas a los Estados de Sinaloa son producto de plantaciones obtenidas de semillas originarias de la India (S1, S2, S3 y S4), y de semillas de Veracruz, Puebla y Morelos. En el mismo caso Yucatán, siendo accesiones originarias de Puebla y Filipinas

en este  
(Figura



sembradas  
Estado  
23).

Figura 23-. Colección de semillas. Accesiones del Estado de Chiapas

### **VIABILIDAD Y CONTENIDO DE ACEITE EN SEMILLAS DE *Jatropha curcas* L.**

Uno de los riesgos al querer realizar una plantación es la utilización de semillas que en muchas ocasiones no son capaces de germinar, debido a que padecen dormancia o latencia. Esto depende de factores tanto externos, como internos debido a que las semillas comienzan a deteriorarse perdiendo su capacidad de germinar (viabilidad) y de dar lugar a plántulas sanas y vigorosas (vigor) todos estos factores se relacionan cercanamente con el manejo de la semilla como el almacenamiento de esta ya que de esto dependerá su aprovechamiento.

Si una semilla es viable y no presenta dormición, germinará cuando se la ponga en las condiciones adecuadas de humedad, luz y temperatura. Por ello se acepta que la capacidad germinativa de un lote de semillas es un reflejo directo de su viabilidad. La emergencia de la radícula es el criterio que se suele utilizar para determinar si una semilla ha germinado, expresándose los resultados obtenidos como porcentaje de semillas germinadas (porcentaje de viabilidad).

Debido a esto, para conocer el establecimiento de plantaciones se hizo necesario conocer la viabilidad y vigor de las semillas *Jatropha curcas*. Este ensayo se hizo con accesiones colectadas en un mismo sitio a partir de 2008 (Huitzilán, Puebla), para conocer el tiempo en que se pueden mantener almacenadas si su finalidad es la germinación, el almacenaje de estas fue en bolsas de polietileno, mantenidas a una temperatura oscilante de 10 hasta 25 °C.

A estas semillas se les realizó pruebas de viabilidad (tetrazolio) y vigor de semillas *Jatropha curcas* colectadas en los años 2008 (2 años de ser colectadas), 2009 (1 año de ser colectadas) y 2010 (4 meses de ser colectadas).

Logrando establecer el protocolo para la prueba de viabilidad. Se realizó pruebas con diferentes concentraciones al 0.1, 0.25 y 0.5% de Cloruro de Tetrazolio y varios tiempos de exposición de las semillas a diferentes temperaturas. La prueba de viabilidad demostró que la solución de tetrazolio al 0.1% durante 12 hrs a una temperatura de 34°C y haciendo un corte longitudinal fue suficiente para lograr tinción en las estructuras esenciales de la semillas.



Figura 24 .- Semillas teñidas con Tetrazolium. a) Semillas colectadas en el 2010; b) Semillas colectadas en el 2009; c) Semillas colectadas en el 2008

La prueba de tetrazolio se fundamenta a que debido a la hidratación de los diferentes tejidos del embrión ocurren diversas reacciones de óxido-reducción por la activación de rutas metabólicas reduciendo al tetrazolio debido a esto los tejidos del embrión cambiarán un color rojo intenso; indicando la existencia de actividad metabólica en los tejidos embrionarios y por consiguiente la viabilidad de las semillas.

En este ensayo las semillas de 2009 en su mayoría se tiñeron uniformemente de color rojo; las 2008 tuvieron una tinción menor a estas, tiñéndose parcialmente lo cual indicativo de áreas muertas en la semilla. Las semillas 2010 variaron ya que muchas de



ellas no tiñeron y las que sí, presentan coloración rosa tenue. Por lo que se infiere que fueron colectadas en estado inmaduro y aún no hay actividad enzimática en estas (Figura 24).

Si bien, la viabilidad es la capacidad de las semillas para germinar, el vigor se define como el conjunto de propiedades que determinan el nivel de actividad y capacidad de las semillas durante la germinación y posterior emergencia de las plántulas. Las semillas con buen comportamiento se consideran semillas de alto vigor.

Debido esto, además del ensayo de viabilidad, se realizó análisis de vigor a las semillas colectadas en estos años, evaluando las plantas generadas, longitud en determinado tiempo, presencia de deformaciones, etc. Por lo que se sometieron semillas al procedimiento de germinación, en donde se observó que el 40% de las semillas 2008 mostraban raíz primaria al igual que las 2009 en un 90%; en cuanto a las semillas con fecha de 2010 únicamente se obtuvo el 30% en estas fechas.

Los resultados indican que las semillas obtenidas en el 2009 almacenadas en presentan mayor viabilidad, esto se corrobora con la prueba de tetrazolio en donde se marca una coloración intensa y el porcentaje de germinación. Al igual que en el ensayo de vigor las plantas 2009 generaron plántulas normales y con tasas elevadas de crecimiento; en contraste con las plántulas obtenidas del 2008 y 2010. En el caso de las semillas 2008 se puede inferir que semillas almacenadas durante 2 años pueden tener un 50% de viabilidad y en las obtenidas en el 2010 se deduce que debido la inmadurez del embrión aún existen deficiencias en la actividad enzimáticas de las semillas.

De la misma forma se realizó análisis de viabilidad a semillas provenientes de frutos en distinta etapa de maduración (verdes, verde-amarillo, café y café oscuro) provenientes de un mismo árbol, con el objetivo de conocer en qué estado de madurez del fruto la semilla ya es capaz de germinar.

Los resultados obtenidos fueron una tinción en casi toda el área de las semillas obtenidas de frutos verde- amarillos, café y café obscuro. En el caso de las semillas extraídas de frutos verdes resultó una tinción atenuada apareciendo regiones blancas (Figura 25), por lo que se puede inferir que aún la semilla es inmadura ya que aún no existen reacciones enzimáticas en esta y no se llevo a cabo la reacción de óxido-reducción del Tetrazolio en estas zonas.

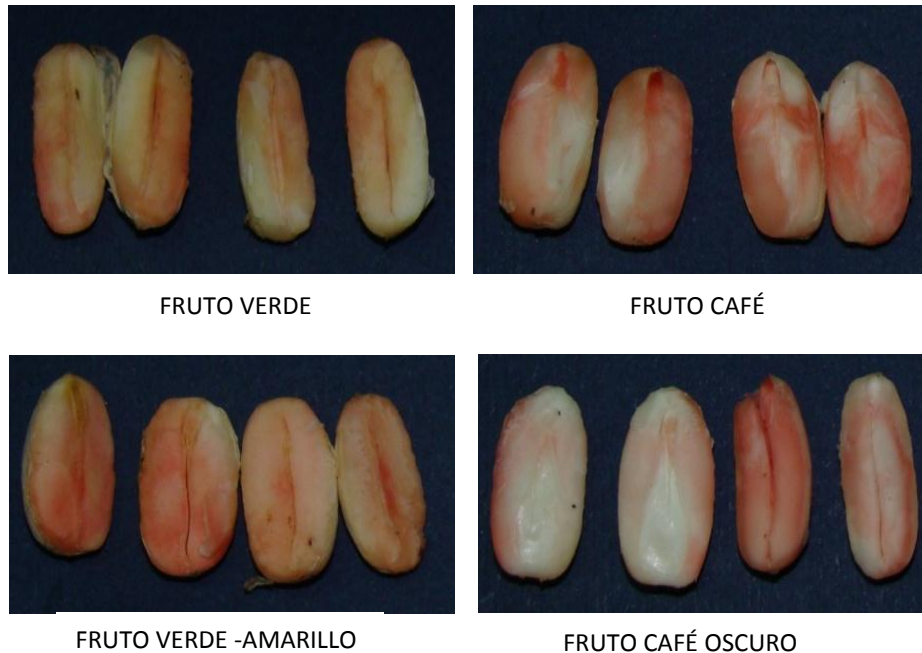


Figura 25. Corte longitudinal en semillas *Jatropha curcas* L. teñidas con tetrazolio, extraídas de frutos en diferentes estados de maduración.

### **CONTENIDO DE ACEITE EN SEMILLAS DE *Jatropha curcas* L. COLECTADAS EN DIFERENTES ESTADOS DE MADUREZ**

Es importante analizar el grado de madurez del fruto para ser colectado si este será usado para extracción de aceite, ya que se conoce que en la mayoría de las oleaginosas cuando existe un fruto maduro se encontrará el mayor contenido de aceite en la semilla. Debido a esto, se colectaron frutos en diferentes periodos de maduración provenientes de dos regiones diferentes, esto se realizó de acuerdo a la coloración de la pulpa del fruto por lo que se clasificó en verde-amarillo, amarillo, café, y café obscuro. El verde se descartó ya que se conoce que en ese momento la semilla cuenta con el mínimo contenido de aceite además que es difícil la extracción de las semillas debido a la dureza del fruto (Figura 26). Estas semillas fueron almacenadas en un breve periodo a una temperatura de 10-20°C mantenidas en bolsas de polietileno y se cuantificó el aceite de acuerdo al Método de Soxhlet (Método 920.39, A.O.A.C., 2005).

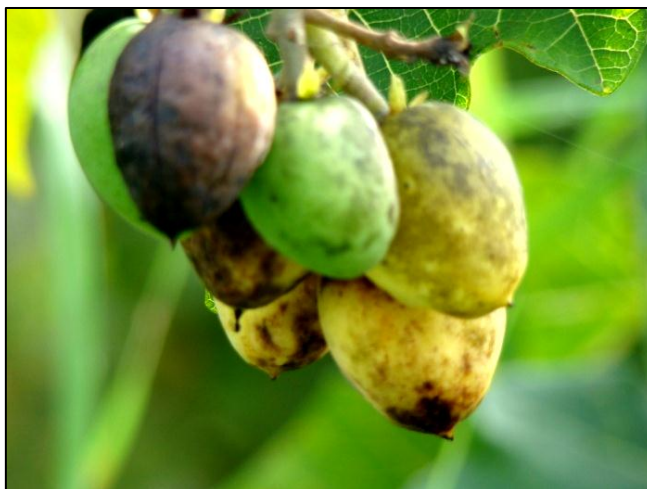


Figura 26. Frutos de *Jatropha curcas* en diferentes estados de maduración.

El contenido de aceite realizado a las semillas se realizó por triplicado y se evaluaron mediante un análisis de varianza simple, la comparación de medias de Tuckey, se realizó con el programa Minitab. En todos los casos se empleó un nivel de confianza del 95% (Cuadro 20).

Cuadro 20.- contenido de aceite de acuerdo a la madurez del fruto

Accesión	Lugar	% aceite
<b>PREDIO 1</b>		
<b>Predio 1</b>	semilla fruto café oscuro-patio	48.45 <sup>a</sup>
<b>1-2</b>	semilla fruto verde amarillo-patio	50.23 <sup>ab</sup>
<b>1-3</b>	semilla fruto amarillo-patio	58.43 <sup>b</sup>
<b>PREDIO 2</b>		
<b>Predio2</b>	semilla_ fruto amarillo oscuro	56.56 <sup>bc</sup>
<b>2-1</b>	semilla fruto amarillo	63.63 <sup>d</sup>
<b>2-2</b>	semilla_ fruto café oscuro	55.58 <sup>bc</sup>
<b>2-3</b>	semilla fruto café	52.93 <sup>abc</sup>
<b>2-4</b>	semilla fruto amarillo-verde	55.67 <sup>bc</sup>

El contenido de aceite de los frutos colectados en diferentes estados de madurez marca diferencias significativas en el contenido de aceite. Las semillas obtenidas de los frutos con color amarillo son los que marcan un mayor contenido de aceite respecto a los demás estados de madurez. Las semillas obtenidas de los frutos café oscuro, amarillo oscuro y verde amarillo presentan similitud entre sí.

#### **BANCOS DE CULTIVO *In vitro***

Si bien la conservación ex situ en bancos de semillas constituye la alternativa más utilizada, en ciertas especies surgen problemas de propagación o conservación que impiden o dificultan el uso de dicha solución. Este sería el caso de: a) especies con semillas recalcitrantes; b) especies que no producen semilla, con baja o nula fertilidad o con producción reducida de semillas o de polen; c) clones con elevado grado de heterocigosis que han sido seleccionados por sus características en una población natural y que deben ser mantenidos mediante propagación vegetativa. La conservación por semilla permite el almacenamiento de los genes del clon, pero puede resultar difícil recuperar la combinación heterocigótica para la que fueron seleccionados los clones; d) especies perennes con ciclos de vida muy largos que no producen semilla hasta cierta edad. Estas especies se suelen propagar vegetativamente para acortar la entrada en producción, aunque posean semillas viables y con capacidad de ser conservadas en un banco de germoplasma; e) especies con una población natural extremadamente reducida donde la mera recolección de semillas pueda afectar a la supervivencia de la población. En estos casos, las técnicas de almacenamiento o conservación in vitro constituyen una alternativa válida a la conservación de semillas de especies raras o amenazadas.

## **PROPAGACIÓN**

Un componente fundamental de la conservación ex situ de especies raras o amenazadas consiste en el desarrollo de métodos de propagación y cultivo que posibiliten la utilización del material almacenado en operaciones de conservación in situ como reforzamientos, reintroducciones o introducciones, en estudios científicos para un mejor conocimiento de la especie o en ámbitos de divulgación cultural y educativa como jardines botánicos.

### **PROPAGACIÓN POR SEMILLA**

Tanto en angiospermas como en gimnospermas el método más habitual de propagación es a partir de semillas. El período que comprende desde la germinación de la semilla hasta el establecimiento de las plántulas es el más vulnerable de todo el ciclo vital, ya que la semilla en germinación está expuesta a drásticas variaciones en contenido de humedad y temperatura y las plántulas son muy susceptibles a daños por plagas y enfermedades.

El período de germinación se caracteriza a través de dos parámetros: el porcentaje de semillas que germinan y la velocidad de germinación. Cuando estos parámetros se estudian bajo condiciones ambientales óptimas controladas resulta posible estimar la germinación intrínseca y el vigor de la muestra de semillas. Estos factores dependen esencialmente de la existencia de dormancia, la presencia de infecciones microbianas, el tamaño de la semilla, su edad y las condiciones de almacenamiento. Mientras en las semillas de plantas cultivadas la germinación de las semillas ha sido tan mejorada que no

se tiene casi en consideración, la baja germinación de una muestra de semillas de especies silvestres puede constituir una limitación para una propagación efectiva.

### **PROPAGACIÓN DE *Jatropha curcas* POR SEMILLA**

En el caso de *Jatropha curcas* para su propagación cuando se tienen semillas en buen estado, viables y libres de hongos su germinación es rápida ya que en 3 a 5 días se observa la germinación. El procedimiento es el siguiente: se dejan remojar semillas durante 24 horas en agua, transcurrido este tiempo se depositan sobre toallas de papel pre-humedecidas dentro de recipientes de plástico herméticos y se mantienen a una temperatura aproximada de 23-26 °C, se deben regar regularmente para mantenerlas húmedas. Con este método se puede observar la germinación y emergencias de semillas al cuarto día (Figura 27).



Figura 27- Geminación de semillas *Jatropha curcas*.

Al emerger las semillas se deben sembrar en bolsa con sustrato con un pH de 5.8 a poca profundidad con la radícula hacia abajo se recomienda realizar riegos de agua con raizal cada tercer día y mantenerlas 3 meses en el invernadero (Figura 28). Al cabo de 2 meses aproximadamente se puede realizar su trasplante al suelo.



Figura 28.-Propagación de planta por semilla en invernadero

### **PROPAGACIÓN VEGETATIVA**

Las técnicas de propagación vegetativa son muy importantes para la conservación de la integridad genética del material vegetal. Estas técnicas se han desarrollado a lo largo de varios siglos y la investigación en este campo es todavía muy activa.

Su utilización en el campo de especies vegetales amenazadas reside fundamentalmente en los jardines botánicos. No obstante, estas técnicas también pueden ser utilizadas de cara a la obtención de material vegetal para actuaciones de reforzamiento, introducción o reintroducción cuando la reproducción por vía sexual no resulta factible o eficaz. En estos casos se debe tener la precaución de mantener controlada la identidad genética del material propagado y tener en cuenta, no solo la producción de un determinado número de individuos, sino también la producción de un mínimo número de genotipos distintos.

### **PROPAGACIÓN VEGETATIVA DE *Jatropha curcas* L.**

Tradicionalmente los habitantes han realizado la propagación de *Jatropha curcas* mediante esquejes, por lo que se podría pensar que esta forma de propagación es fácil. Sin embargo, al replicar esta propagación de forma masiva, se han encontrado con algunas variables que menguan el porcentaje de sobrevivencia de la planta, estos factores son el tipo de explante, época de corte, contenido de azúcares, etc.

Para la obtención de estacas se debe tomar en cuenta el árbol madre de donde se generarán, este debe presentar características deseables como son: árbol sano, libre de plagas y enfermedades, que produzca semilla no tóxica y alta producción anual. Se



recomienda aprovechar el tiempo de poda para la generación en los meses de Febrero-Marzo.

De acuerdo a los resultados obtenidos se sabe que las estacas con mayor porcentaje de enraizamiento lo presentan las ramas secundarias con un contenido de azúcares totales de 14.4 g-100 ml de muestra (11.4 g-100 ml de glucosa) en la base de la estaca. Por lo que las estacas secundarias, son buen material para la propagación vegetativa de *J. curcas* (Figura 29).



Figura 29 .-Reproducción de plantas de piñoncillo por medio de esquejes en invernadero

### **MICROPROPAGACIÓN**

Cuando se trata de conservar la mayor diversidad genética posible de una población, las semillas constituyen normalmente el material de propagación preferido. Si la germinación de las semillas es baja cuando se utilizan métodos convencionales, las técnicas de cultivo *in vitro* pueden contribuir a mejorar los porcentajes de germinación. Además, cuando la disponibilidad de semillas es escasa, la situación común en muchas especies amenazadas, a la germinación *in vitro* le sucede una etapa de proliferación con objeto de producir un mayor número de plantas.

Los beneficios potenciales del uso de sistemas de cultivo *in vitro* pueden ser enormes, entre los que se encuentran: 1) las altas tasas de multiplicación que se consiguen, 2) la de ser un cultivo aséptico que puede mantenerse libre de hongos, bacterias, virus e insectos parásitos, 3) el espacio reducido que ocupan, 4) la economía frente a colecciones de campo y 5) las múltiples aplicaciones en programas de mejoramiento genético.

### **CULTIVO *In vitro* DE *Jatropha curcas* L.**

Para establecer la metodología de micropropagación de *Jatropha curcas* se probaron diversas metodologías para desinfección de explantes y semilla, sin embargo; no fueron efectivas, por lo que se usó semillas tratadas con  $\text{HgCl}_2$  0.1% para manejar embriones de *Jatropha curcas*, resultando en un 0% de contaminación y desarrollo completo de la planta.

De plántulas *In vitro* establecidas en medio MS, se evaluaron diversos explantes para la propagación directa, siendo el más efectivo las yemas apicales y tallo (Figura 30), se aplicó AIA (0.5 mg/mL) para inducir rizogénesis a los 83 días de edad. Para la inducción a callo los explantes se sembraron en: AIB (0, 0.1, 0.25 y 0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) combinado con BAP (0, 0.1, 0.25 y 0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), con lo que se obtuvo callos friables en el tratamiento AIB 0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + BAP 0.25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a los 21 días de incubación en el 100% de los explantes. La brotación se presentó en todos los tratamientos, obteniéndose plántulas completas y brotes múltiples, siendo el mejor AIB (0.1, 0.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  + BAP 0.25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Se evaluó la cinética de crecimiento celular del callo resultando un tiempo de duplicación celular de 6.64 días y una velocidad específica de crecimiento de 0.151  $\text{d}^{-1}$  (Figura 31).



Figura 30.- Yemas apicales obtenidas de plántula

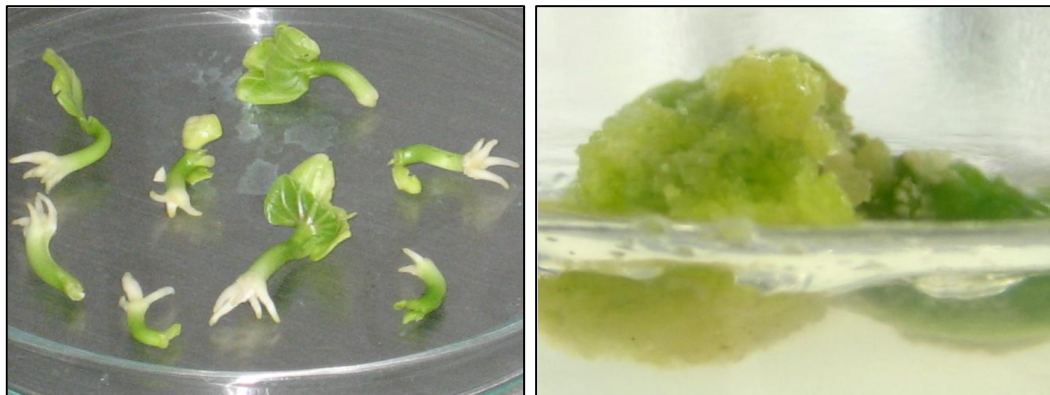


Figura 31.- Callos obtenidos a partir de embriones



## ETAPA 3

### VALIDACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE PROPAGACIÓN Y MANEJO DEL CULTIVO DE *Jatropha curcas*

#### PRODUCCION DE PLANTA

Tradicionalmente el piñoncillo se ha propagado mediante esquejes ya que para los agricultores representan un desarrollo rápido, característica que satisface sus necesidades del uso de esta planta como cerco limitante, en contraste con la propagación de las semillas, las cuales es un crecimiento relativamente lento. Sin embargo; ambos tipos de propagación presentan ventajas y desventajas.

En el caso de la propagación de esquejes (como todo tipo de propagación clonal), se orienta a la reproducción idéntica de las plantas con características deseables, además de que acorta ciclos reproductivos, no obstante, una limitante de esta propagación es la dispersión de enfermedades causadas principalmente por bacterias y virus. De tal manera que si se obtiene un esqueje (estaca, yema, etc.) éste también llevará consigo la enfermedad. Otra desventaja importante a considerar es que este tipo de reproducción no permite la recombinación genética lo que favorece la evolución y adaptación de las especies.

La propagación por semilla o reproducción sexual, presenta grandes ventajas a nivel poblacional, ya que con ella se incrementa la velocidad de adaptación o ajuste de las poblaciones a los cambios ambientales y se evita que las mutaciones desfavorables acumuladas en diversos tejidos de las plantas las cuales podrían pasar a la siguiente generación, contribuyendo con esto a la conservación de la diversidad biológica, de vital importancia para la sostenibilidad de la agricultura.

#### PROPAGACION POR ESQUEJE

La propagación vegetativa juega un papel importante en los programas de plantaciones extensivas, sin embargo, se requieren medios de propagación a gran escala de genotipos superiores, que permitan tener plantaciones con individuos de calidad uniforme; además el método de propagación por estaca es un medio eficiente en términos de rapidez, manejo y costo. No obstante, es necesario determinar la calidad de las estacas, en el que se incluye el estado fisiológico; por lo que en se planteo evaluar la capacidad de enraizamiento de estacas de acuerdo al contenido de azúcares y la posición en la planta. Se colectaron estacas de 50 cm de plantas madre de *J. curcas* no tóxica, estacas de ramas secundarias y terciarias, unas fueron llevadas al laboratorio para la determinación de azúcares y otras se indujeron a enraizamiento, en bolsa de polietileno negra de 8 L con

sustrato elaborado con turba, perlita y vermiculita. Las variables evaluadas fueron azúcares totales y porcentaje de enraizamiento; las estacas se cortadas en el mes de marzo, época en que la planta está defoliada; se valoraron 10 repeticiones por posición de estacas. Los resultados indicaron que las estacas con mayor porcentaje de enraizamiento lo presentaron las colectadas de ramas secundarias con un contenido de azúcares totales de 14.4 g·100 ml de muestra (11.4 g·100 ml de glucosa) en la base de la estaca. Por lo que se concluye que las estacas secundarias, son buen material para la propagación vegetativa de *J. curcas*.

En la obtención de estacas se debe tomar en cuenta el árbol madre de donde se generarán, este debe presentar características deseables como son: árbol sano, libre de plagas y enfermedades, que produzca semilla no tóxica y alta producción anual. Se recomienda aprovechar el tiempo de poda para la generación en los meses de Febrero-Marzo.

Los explantes que servirán como estacas deben realizarse con ramas secundarias de tono café-verdoso ya que son tejidos jóvenes que aún pueden regenerar brotes debido a los tejidos meristemáticos. Una vez obtenidos los esquejes se mantienen en agua con enraizador durante una semana, agitando la solución cada tercer día para provocar aireación, pasado este tiempo se siembran en bolsa negra de 30 cm con suelo enriquecido con el enraizador (raizal<sup>®</sup> 1.0 mg/L).

Dependiendo las condiciones ambientales, se recomienda realizar riegos con esta solución cada tercer día a punto de saturación sin exceso de la misma ya que se provocaría la muerte de este. En caso de climas secos si es necesario un riego frecuente debe intercalarse riegos de solución enraizadora y agua.

La propagación de *Jatropha curcas* mediante esquejes puede tener ciertas ventajas como es obtener una planta en corto tiempo y en algunos casos tener una producción inmediata. Sin embargo la raíz de esta será diferente a la raíz de la planta germinada ya que no será pivotante si no que tendrá raíces periféricas lo que hace que la planta sea más débil al encontrarse en situaciones de temporales, ya que la planta al carecer de la raíz que sirve como anclaje (pivotante) podría ser arrancada fácilmente (Figura 32).



Figura 32.-Esquejes y raíces de *Jatropha curcas*

### PROPAGACIÓN POR SEMILLA.

Se debe seleccionar semillas que se conozca tengan alto contenido de aceite, proteínas y no tóxicas ya que estas características son importantes para el manejo de subproductos las cuales añaden valor a la producción del cultivo de piñoncillo, ya que si se quiere propagar este tipo de semilla para la generación de biocombustible se puede aprovechar la pasta residual después de haber prensado las semillas; en contraste, con las tóxicas las cuales su uso se limita a ser fertilizante para suelo.

Para la propagación de la planta se dejan remojar semillas durante 24 horas en agua. Transcurrido este tiempo se depositaron sobre toallas de papel pre-humedecidas dentro de recipientes de plástico herméticos y se dejan a una temperatura aproximada de 23-26 °C, se deben regar para mantenerlas húmedas. Con este método se puede observar la germinación y emergencias de semillas al cuarto día ( Figura 33).



Figura 33. Germinación de semillas y plantas mantenidas en invernadero

En el caso de contar con semillero como los realizados para planta de café se debe humedecer el sustrato (1:1) suelo compost de café y sembrar las semillas casi en la superficie (no más de 1 cm de profundidad), se cubren con costales para protegerlas, se debe monitorear la humedad durante la germinación y emergencia de estas( Figura 34).



Figura 34.-Siembra de piñoncillo en semillero para café

En ocasiones aparecen semillas infectadas por hongos los cuales según reportes se han encontrado en la testa debido a su manejo durante la cosecha. Para evitar esta contaminación se recomienda el uso de antifúngicos como tiabendazol (Tecto™ 400) diluido en 1L de agua caliente (cerca a su punto de ebullición (70°C) esta solución sirve para medio Kg de semillas (Figura 35).



Figura 35. Semillas infectadas por hongos

El procedimiento se puede realizar con una botella de plástico en donde se colocan semillas agregándolas la solución antes mencionada . Se agitan durante 15 minutos, se les elimina el resto de la solución y se depositan sobre toallas de papel pre-humedecidas en un recipiente de plástico con tapa como cámara de incubación manteniéndolas a una temperatura de entre 24-27 °C hasta que se observe la germinación y emergencia de las semillas . (Figura 36).





Figura 36. Desinfectado de semilla de piñoncillo

Al emerger las semillas deben ser sembradas en bolsa negra con sustrato a poca profundidad con la radícula hacia abajo.

En el caso de los semilleros pueden permanecer hasta dos meses después que aparezca la hoja definitiva (Figura 37).



Figura 37. Semilla germinada, hojas cotiledonales y hoja definitiva

## PRODUCCIÓN DE PLANTAS OBTENIDAS POR SEMILLAS Y ESTACAS

Existen numerosos trabajos de investigación que reportan alta variabilidad en producción en cultivos comerciales, floración y fructificación, evaluados para diferentes especies de *Jatropha curcas* en el mundo (Banerji y col., 1985; Sujatha y col., 1996; Lakshminarana y Sujatha, 2001; Kaushik y col., 2007; Ginwal y col., 2004). En India se cultivó *Jatropha curcas* en 24 zonas climáticas diferentes, y se encontró una alta variabilidad entre los genotipos utilizados además de diferencias significativas en el contenido de aceite (18.90% - 99%), y el peso semilla (9.6 a 18%), así mismo se determinó que existe una correlación positiva entre la longitud, ancho y peso de semilla con el contenido de aceite de la semilla (Kaushik *et al.*, 2007).

Los resultados de investigaciones en India sobre biodiesel extraído de *Jatropha curcas* indican que éste cultivo puede ser una alternativa económica para las comunidades rurales (Radhakrishna Rao, 2004), por lo que India presentó un programa de cultivo masivo de *Jatropha curcas* en regiones semiáridas para el uso de biodiesel destinado al sector ferroviario (Gosh y col., 2007). En el sur de India en Andhra Pradesh, tienen programado plantar 200,000 hectáreas en suelos áridos de *Jatropha curcas*. Así mismo, otros países como China, cuentan actualmente con dos millones de hectáreas plantadas de *Jatropha curcas* (Jun-ling Shen y col., 2010).

La producción de *Jatropha curcas* no se puede extrapolar es variable e impredecible debido a que, de una región a otra, las condiciones climáticas y edafológicas influyen en la producción de semilla. Existen reportes de producción de cultivos comerciales de *J. curcas*, en diferentes países (Cuadro 21).

Cuadro 21. Producción de semilla (kg/Ha), edad y localización de *Jatropha curcas* L. de diferentes Países.

REFERENCIA	LUGAR	EDAD(AÑOS)	PRODUCCIÓN (KG/HA)
Bhag Mal (Pers. Com.)	India	3	1733
Foidl (Pers. Com.)	Nicaragua	–	5000
Henning (Pers. Com.)	Malí	–	2640
Isniiand Takeochi (1987)	Tailandia	–	2146
Larochas (1948)	Malí	–	8000
Matsuno y col.,(1985)	Paraguay	3	100
Matsunoy col.,(1985)	Paraguay	4	700
Matsuno y col .,(1985)	Paraguay	5	1000
Matsuno y col .,(1985)	Paraguay	6	2000

Matsuno y col.,(1985)	Paraguay	7	3000
Matsuno y col.,(1985)	Paraguay	8	4000
Matsuno y col.,(1985)	Paraguay	9	4000
Naigeon (1987)	Cabo Verde	–	1750
Silveira y col.,(1934)	Cabo Verde	–	200-800
Stienswat y col., (1986)	Tailandia	1	794

La producción de *Jatropha curcas* reportada por Matsuno y colaboradores en 1985 nos indica que fue aumentando con el tiempo y que se estabilizó hasta el octavo año con 4,000 ton/ha por año (Cuadro 20).

En Cuba se han sembrado 9 Ha de variedad Cabo Verde en la provincia de Gradma, se han adaptado muy bien a las condiciones edafoclimáticas imperantes en esta región y a suelos semiáridos y erosionados, abandonados por la agricultura cañera, en los que obtuvieron 75 Kg/Ha de aceite en el segundo año de cultivo ( Sotolongo y col., 2008).

Se estableció el cultivo de *Jatropha curcas* obtenidas desde semilla y estacas, en un marco real de 3 x 3 m en suelo arenoso, con fertilización de suelo y riego auxiliado. Este predio se ubica en Yautepec, Morelos a 18°49'42.97" N y 99°05'38.72" O y 1210 msnm. Con clima: semicálido, subhúmedo, temperatura promedio anual de 24.7 , máxima 42 y mínima 9.5 °C.

Se realizó el proceso de propagación por estacas como se indica la Figura 38. Para obtener plantas a partir de semillas (Figura 39) igual que para conocer el rendimiento entre estas dos formas de propagación. Las semillas se sembraron en el mes de Mayo y las estacas en el mes de Abril, se evaluó el inicio de floración, colecta de frutos, meses de la colecta y peso de esta.

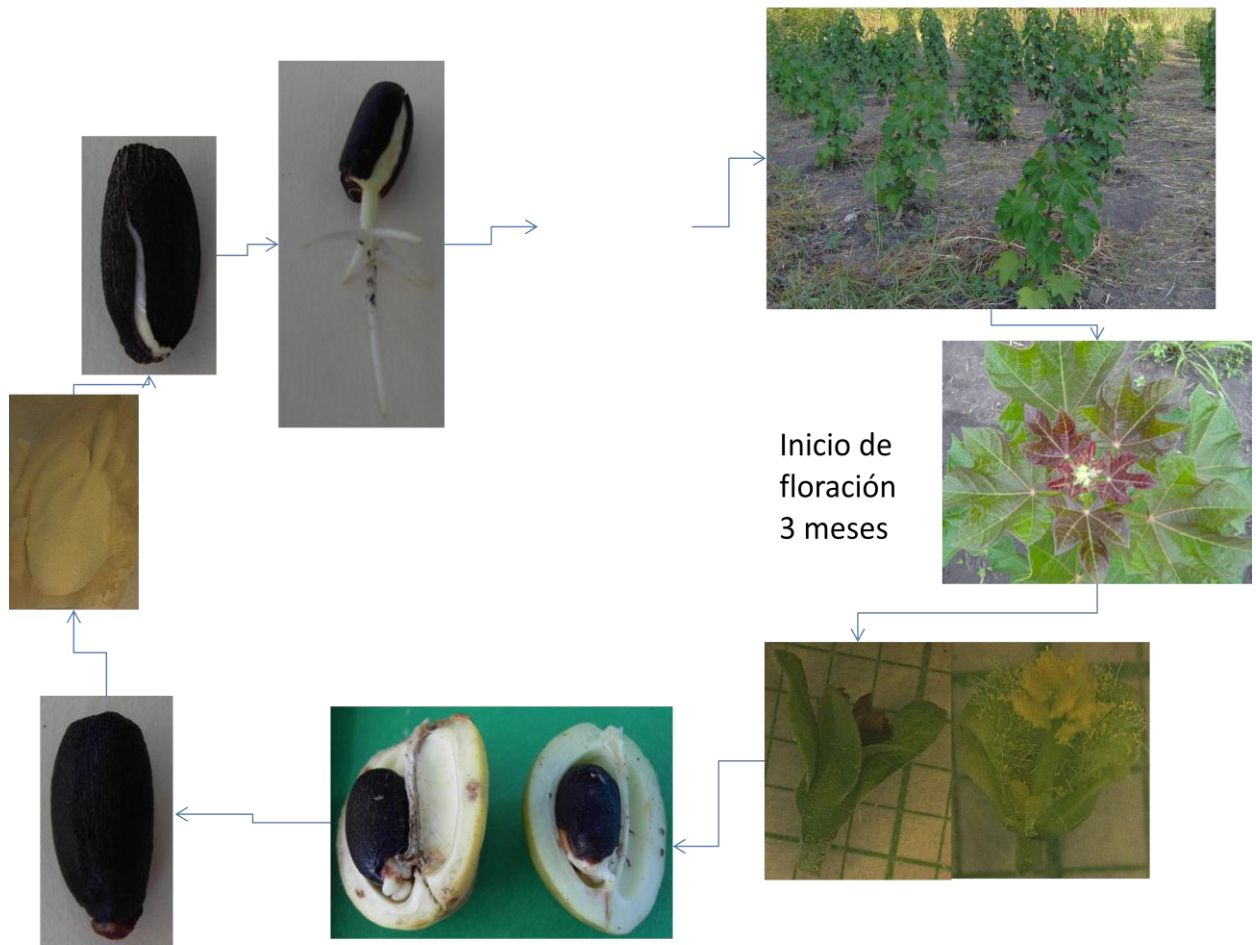


Figura 38.- Proceso de germinación para evaluar tiempo de floración en plantas obtenidas por semillas.



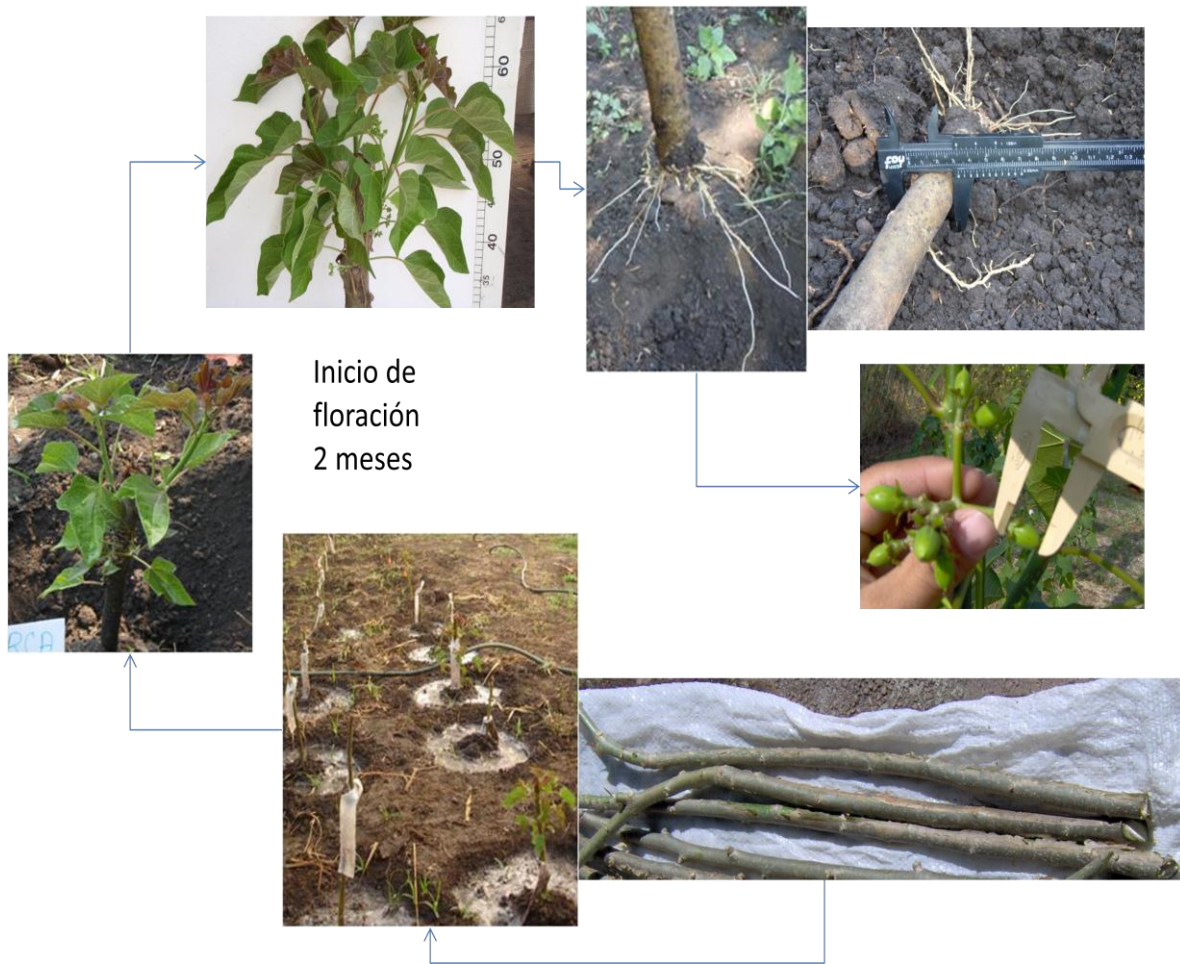


Figura 39.- Planta obtenida por estacas

De la plantación mantenida se observó floración a los 3 meses en el caso de estacas y en el de germinación por semilla en 2 meses, la cosecha para ambos fue en 2 meses después de la floración (Cuadro 22).

Cuadro 22.- Producción por semilla y estaca

	Semilla	Vegetativa
<i>Plantación</i>	<b>Mayo</b>	<b>Abril</b>
<i>Inicio de floración</i>	<b>3 meses</b>	<b>2 meses</b>
<i>Cosecha</i>	<b>2 meses</b>	<b>2 meses</b>

La producción en el primer año fue mayor en el caso de las estacas teniendo 754 g por planta contra 591 g por planta obtenida por semilla. En el segundo año la producción fue casi similar obteniendo 1350g de frutos por planta en contraste con la producción obtenida de las plantas clonadas la cual fue de 1329 g por planta. Al tercer año hubo un aumento anual fue incrementando en el transcurso de los 3 años (Figura 40).

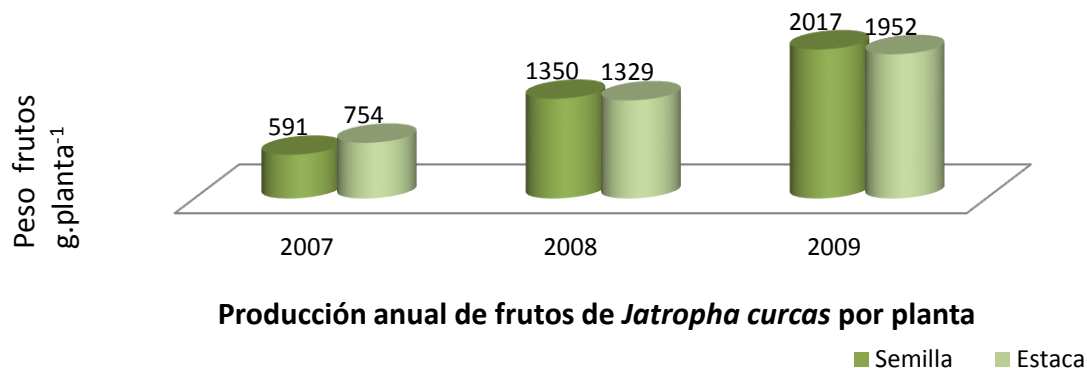


Figura 40.- Producción anual de frutos obtenidos por estaca y por planta germinada

Pudiendo concluir con este estudio que los meses de producción de *Jatropha curcas* es de Junio a Febrero, la diferencia en el inicio de cosecha, en plantas propagadas por semilla y por estaca es de un mes, siendo semejante al segundo y tercer año. El volumen de cosecha en el primer año es mayor en plantas provenientes de estacas siendo semejante el segundo y tercer año.

## TRANSPORTE DE PLANTA

Es necesario asegurar la integridad de la planta hasta el sitio donde se plantara debido a que de esto dependerá el éxito de la plantación, el tipo de embalaje podría causar daño fisiológicos y hasta la muerte de las plantas. Esto también dependerá de la distancia en donde se encuentre el lugar donde se pretende sembrar.

En el caso de *Jatropha curcas* se puede transportar en cajas o rejas evitando dañar el follaje. Se recomienda realizarlo cuando estén las temperaturas bajas del día (mañana, tarde). Ya que a temperaturas de 35-40 puede existir daño en el follaje (Figura 41).



Figura 41. Embalaje y transporte de planta mediante cajas.

También se pueden sacar del sustrato y acomodar las plantas con hidrogel en el caso que sea una trayectoria corta y una temperatura ambiental no mayor a 40°C.

### **HABILITACION DEL TERRENO.**

El objetivo de esta etapa es tener un terreno propicio para establecer un cultivo en donde las plantas puedan crecer y producir adecuadamente, además de facilitar las labores culturales en el terreno, factor importante a considerar debido a que de esto dependerá la inversión que se haga para el mantenimiento de la plantación y el éxito en el desarrollo de la planta y cosecha del fruto.

La preparación del terreno será de acuerdo a las características de su tipo de suelo, pendiente, y accesibilidad por lo que en ciertos casos la habilitación del terreno puede ser efectuada mediante maquinaria pero en otros debe habilitarse de forma manual. (Figura 42).

Para la instalación de la plantación se debe considerar la distancia de planta a planta, debido a las características de *Jatropha* se recomienda sembrar 3x3 m, por lo que para una hectárea sembrada en diseño de plantación *marco real* cabrían 1,111 plantas, al igual que en plantación por *tres bolillo* si el terreno está en pendiente, se recomienda realizar terrazas individuales para evitar que en época de lluvias el agua arrastre de suelo y escurrimientos.



Figura 42. Plantación en pendiente, plantas sembradas en terrazas individuales por tres bolillos.

### LABORES CULTURALES

Diversas fuentes indican que el piñoncillo no requiere de muchos cuidados para su desarrollo y mantenimiento; no obstante, si se realizan cultivos para explotación comercial; al igual que otros, requiere de un buen cuidado; uso de fertilizantes, chapeo y podas, para obtener una buena cosecha del fruto.

La siembra del piñoncillo debe ser antes de las lluvias para que estas favorezcan en el desarrollo de la planta, el suelo debe presentar humedad. Es importante considerar el deshierbe de maleza para facilitar la siembra de las plantas y no exista competencia con otras y para evitar plagas y enfermedades.

En caso de la fertilización se recomienda utilizar fertilizantes con NPK alrededor de la planta además de Boro y Calcio en foliar cuando se acerque la etapa del fruto y cosecha de este (Figura 44). El uso de biofertilizantes también ayuda al piñoncillo ya que se ha observado un mejor enraizamiento de las plantas cuando se inocula con bacterias fijadoras de nitrógeno.



## PODA

Figura 43. Fertilización de planta

Se aconseja realizar poda apical ya que terminando el invierno y antes de la época de lluvias, el piñoncillo requiere de dos tipos de poda: Poda apical y poda de formación (Figura 44).



La poda apical se debe realizar cuando la planta es joven ya que la planta crecerá con pocas ramas por lo que no habría mucho fruto en ellas, la poda se realiza con un corte de 45° en un nudo del tallo para provocar el crecimiento de yemas laterales, la inclinación del corte impedirá la entrada de algún patógeno ya que el látex escurrirá por la inclinación, sirviendo como protección.



Figura 44. Poda de piñoncillo, a) Poda apical, b) Respuesta de poda apical

## PODA DE FORMACIÓN

Esta se lleva a cabo para facilitar la cosecha del fruto y se hace en las ramas del árbol, se debe aprovechar para cortar las ramas que se encuentren dañadas o viejas (Figura 45).



Figura 45. Respuesta de poda apical y de rejuvenecimiento

## COLECTA

Durante los meses de Junio-Agosto (y en algunas regiones hasta el mes de septiembre) se puede colectar el fruto. La recomendación es que este tenga una coloración verde-amarillenta, los frutos del piñón no maduran al mismo tiempo por lo que se recomienda hacer de dos a tres cortes dependiendo de la maduración de las drupas (Figura 46).



a) Fruto verde



b) Fruto maduro

Figura 46. Grado de madurez de fruto de piñoncillo

## SECADO DE SEMILLA

Después de la cosecha es necesario el secado de la semilla, este secado puede hacerse al sol, manteniendo las semillas sobre un plástico, se deben remover durante el día para que exista uniformidad en estas. Esto se realiza para evitar la contaminación por hongos ya que de lo contrario se corre el riesgo de la proliferación de estos si las semillas se conservan húmedas.(Figura 48).



Figura 47. Secado al sol de semillas de piñoncillo

## REPORTE DE MUESTRAS DE SUELOS COLECTADAS DE LAS ZONAS DONDE SE ENCUENTRAN CULTIVOS DE *Jatropha curcas*.

Las malas prácticas en el manejo de los suelos agrícolas conducen a importantes problemas ambientales tales como la degradación de los suelos (incluye la erosión), la pérdida de la biodiversidad, contaminación de las aguas, y exceso de emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera. El manejo convencional de los suelos agrícolas lleva asociado una disminución de la calidad del suelo ya que merma su capacidad para realizar sus funciones de producción biológica, protección ambiental y sustento de la salud humana.

Por lo que es importante conocer el efecto que tiene el suelo con el cultivo, ya que en otras oleaginosas se ha observado la relación existente entre el contenido de aceite y proteínas de acuerdo a la fertilidad y riego donde se encuentra las plantaciones de estas.

Debido a esto se realizó muestreo de suelos en donde se ubican árboles *Jatropha curcas* para conocer el efecto que existe en el desarrollo de las plantas, el contenido de aceite y proteínas.

Estas muestras fueron colectadas en las zonas norte del Estado de Puebla y en la sierra de zongolica Veracruz donde se cuenta con cultivos de *Jatropha curcas*, debido a que estos



cultivos se instalaron en zonas muy accidentadas con pendientes muy prolongadas el suelo presenta características diferentes dentro de una misma parcela.

Las muestras colectadas se trajeron al laboratorio donde fueron analizadas y procesadas para las siguientes determinaciones pH, materia orgánica, Nitrógeno, fosforo y potasio.

### **MUESTREO DE SUELOS**

El suelo no es homogéneo y lo caracterizan diferentes tipos de variaciones. Las propiedades del suelo, incluyendo la fertilidad, varían de un lugar a otro, e inclusive a través de los diferentes horizontes de un mismo perfil. Dado que es impracticable muestrear el campo entero, debemos confiar en extraer submuestras para estimar el nivel de fertilidad de un lote. La intensidad del muestreo para una exactitud dada, dependerá de cuan variable sea la fertilidad del campo.

Para la zona norte del Estado de Puebla, las muestras colectadas son submuestras de predios con pendientes entre 40 y 60% esto dificulta la colecta de las muestras para hacer homogéneo el muestreo, por lo que se dividió la parcela en tres zonas conocidas como baja, media y alta se colectaron muestras de estas tres áreas y se hicieron submuestras para poder homogeneizarlas.

Para el caso de la sierra de Zongolica Veracruz, se tomaron muestras de áreas con pendientes menos prolongadas de entre 12 y 30 % se realizo un muestreo al en zic zac para homogenizarlos.

### **DETERMINACIÓN DE pH**

En general, el pH óptimo de los suelos agrícolas debe variar entre 6.5 y 7.0 para obtener los mejores rendimientos y la mayor productividad (Prasad and Power, 1997). El pH de un suelo ácido se puede mejorar gradualmente mediante el manejo apropiado y con aplicación de cal (Prasad and Power, 1997; Havlin *et al.*, 2005). El pH del suelo influye en la disponibilidad de los nutrimentos para las plantas, es decir, este factor puede ser la causa de que se presente deficiencia, toxicidad o que los elementos no se encuentren en niveles adecuados (Benton, 2003). Por otra parte, valores extremos del pH pueden afectar la estructura del suelo (Edward, 2000).

Se les determino el pH a las muestras colectadas colocando 10 gr de suelo y 20 ml de agua, se agitaron durante 10 min y se dejaron en reposo durante 30 min, procediendo a medir el pH. Los resultados se muestran en la tabla 1. Para la interpretación de los resultados nos basamos en la Norma Mexicana NOM-021-RECNAT-2000



Cuadro 23. Determinación de pH

<b>MUESTRA</b>	<b>pH</b>	<b>CLASIFICACION DE pH</b>
pulp.cafe huit	5.73	moderadamente acido
huit.comp	6.31	moderadamente acido
p.suegra composta	5.43	moderadamente acido
huit caf.peri 1	5.51	moderadamente acido
huit caf. peri 2	4.5	fuertemente acido
3 arena cañon j.c	4.73	fuertemente acido
cachito.huit j.c	4.35	fuertemente acido
2 ter. alt j.c	6.6	neutro
pres 1.j.c	6.35	moderadamente acido
zoyotla totutla	4.78	fuertemente ácido
nue.cul.hueytamalco	5.38	moderadamente ácido
pozo pretendiente	6.74	Neutro
par.proc.cafe seco	5.06	moderadamente ácido
(paraíso)	6.52	moderadamente ácido
par.patio tras	5.24	moderadamente ácido
(paraíso)	4.44	fuertemente acido
valentí 1 j .c		
valentín 2 comp		

De acuerdo con los valores de pH que se presentan en el cuadro encontramos desde los fuertemente ácidos hasta los moderadamente ácidos tanto en las muestras de Puebla como de Veracruz.

Se realizaron muestreos de material utilizado para el semillero (composta y mezcla de composta- suelo) hasta las muestras de campo, se observa que en promedio el pH va desde moderadamente acido a fuertemente acido, teniendo únicamente un suelo de Puebla cercano a la neutralidad y uno de la Sierra de Zongolica (Pozo preten) en estos sitios se encuentran cultivos de *Jatropha curcas*. Con edades entre dos y un año.

#### **DETERMINACION DE LA MATERIA ORGANICA Y NUTRIENTES ESENCIALES**

Las muestras de suelo se secaron al aire y se tamizaron con una malla de 0.5  $\mu\text{m}$ , las propiedades analizadas fueron: pH, materia orgánica con dicromato de potasio (Walkiey y

Black, en Jackson. 1979), nitrógeno, fosforo y potasio estos últimos con el uso de un kit (SOIL TEST HANDBOOK) HANNA INSTRUMENTS para determinación en campo.

Los resultados se presentan en la cuadro 23

Cuadro 23.- DETERMINACIÓN DE MATERIA ORGANICA

MUESTRA	% DE MATERIA ORGANICA	
PULP.CAFE HUIT	ND	ND
HUIT.COMP	5.2	BAJO
PAT SUE COMP	9.4	ALTO
HUIT CAF.PERI 1	4.1	BAJO
HUIT CAF. PERI 2	4.8	BAJO
2 TER. ALT J.C	4.8	BAJO
3 ARENA CAÑON J.C	8.3	MEDIO
CACH.HUIT J.C	3.7	MUY BAJO
ZOYOTLA TOTUTLA	2.8	MUY BAJO
NUE.CUL.HUEY J.C	3.3	MUY BAJO
PRES 1.J.C	3.6	MUY BAJO
POZO PRETEN J.C	4.1	BAJO
PAR.PROC.CAFE SECO	4.0	BAJO
PAR.PATIO TRAS	4.5	BAJO
VAL 1 J.C	3.9	MUY BAJO
VAL 2 COMP	3.2	MUY BAJO

Los datos presentados en la cuadro 23 muestran una deficiencia en el contenido de materia orgánica casi en todos los suelos estos van desde los muy bajos hasta los bajos, solo tenemos un suelo con un % de materia orgánica alto este se utilizó para la germinación directa en campo consistente de 1 a 1 pulpa de café degradada y suelo de jardín. Cabe mencionar que en este sustrato se desarrollaron perfectamente las semillas germinando en su totalidad presentando un desarrollo muy bueno y en poco tiempo, también tenemos ya en campo una muestra llamada 3 arena cañon J.C esta muestra presenta características de suelo Franco arenoso y se encuentra ubicada en la plantación experimental de Huitzilán de Serdán, ahí las plantas tienen un desarrollo muy bueno presentando características de grosor y altura diferentes al resto de la plantación.

Otros de los macronutrientes esenciales en los cultivos es el N, P y K los resultados de estos se encuentran en la cuadro 24.

Cuadro 24 .- Determinación de N, P y K

MUESTRA	N	P	K
<b>PULP.CAFE HUIT</b>	BAJO	ALTO	MEDIO
<b>HUIT.COMP</b>	MEDIO	ALTO	ALTO
<b>PAT SUE COMP</b>	ALTO	ALTO	ALTO
<b>HUIT CAF.PERI 1</b>	BAJO	ALTO	MEDIO
<b>HUIT CAF. PERI 2</b>	ALTO	ALTO	ALTO
<b>2 TER. ALT J.C</b>	BAJO	ALTO	MEDIO
<b>3 ARENA CAÑÓN J.C</b>	BAJO	MEDIO	MEDIO
<b>CACH.HUIT J.C</b>	BAJO	BAJO	MEDIO
<b>ZOYOTLA TOTUTLA</b>	BAJO	BAJO	ALTO
<b>NUE.CUL.HUEY J.C</b>	MEDIO	MEDIO	MEDIO
<b>PRES 1.J.C</b>	ALTO	ALTO	ALTO
<b>POZO PRETEN J.C</b>	BAJO	BAJO	ALTO
<b>PAR.PROC.CAFE SECO</b>	MEDIO	ALTO	ALTO
<b>PAR.PATIO TRAS</b>	BAJO	ALTO	MEDIO
<b>VAL 1 J.C</b>	BAJO	BAJO	ALTO
<b>VAL 2 COMP</b>	MEDIO	BAJO	ALTO

Aquí es importante correlacionar los datos obtenidos en la cuadro 23 con el 24 nuevamente la muestra que presenta un mayor contenido de materia orgánica aquí presenta niveles altos de NPK (patio sue comp); esto explica el por que del desarrollo de las semillas en este sitio, las muestras que presentan valores de N y P bajos son de suelos que tienen la característica de ser franco arcillosos, estas características dan propiedades de compactación en la estructura del suelo no permitiendo un buen desarrollo de la raíz y por lo tanto un deficiencia en el crecimiento de las plantas, Las zonas utilizadas en el cultivo de *Jatropha curcas*. Han sido suelos utilizados para el cultivo de café y de caña de azúcar, en los que no ha habido un programa adecuado de fertilización y un método adecuado de siembra ya que presentan pendientes muy prolongadas que dificultan el laboreo adecuado.

En las tablas siguientes se muestran los valores que se indican en la Norma oficial mexicana para los contenidos de NPK en los suelos agrícolas; esto nos da referencia de los valores cualitativos encontrados en las muestras procesadas.

Cuadro 25 .- Para nitrógeno

<b>CLASE</b>	<b>NITROGENO TOTAL %</b>
<b>MUY BAJO</b>	<0.05
<b>BAJO</b>	0.05-0.10
<b>MEDIO</b>	0.10-0.15
<b>ALTO</b>	0.15-0.25
<b>MUY ALTO</b>	>0.80

Cuadro 26 .- Para el caso de fósforo

<b>CLASE</b>	<b>CONTENIDO DE P (ppm)</b>
<b>HORIZONTE NATURAL</b>	MENOR QUE 250
<b>HORIZONTE ANTRÓPICO</b>	IGUAL O MAYOR QUE 250

Cuadro 27.- Para potasio Potasio

<b>CLASE</b>	<b>K</b>
<b>MUY BAJO</b>	<0.2
<b>BAJO</b>	0.2-0.3
<b>MEDIO</b>	0.3-0.6
<b>ALTO</b>	>0.6

Porque son indispensables los nutrientes en las plantas:

El nitrógeno es necesario para la descomposición de la materia orgánica por los microorganismos heterótrofos del suelo y si el material orgánico que se descompone tiene poco nitrógeno en relación al carbono presente (paja de trigo, tallos de cereales maduros), los microorganismos utilizan el amonio o nitratos presentes en el terreno. Este nitrógeno permite el rápido crecimiento de los microorganismos que proporcionan material con carbono al suelo.

El fósforo (P) juega un papel muy importante en la fisiología de las plantas es constituyente de muchos compuestos esenciales como ácidos nucleicos azúcares fosforados, núcleo - proteínas, enzimas, vitaminas y fosfolípidos. Una de las principales

funciones está relacionada con los procesos energéticos dentro de la planta (Calbaceta G. 1996).

En general los suelos del trópico presentan contenidos bajos de fósforo, esta situación se hace crítica especialmente en suelos tipo ultisoles y andisoles en donde se presentan mecanismos de fijación en el que intervienen por un lado elementos como el hierro y aluminio y por otro en los que se presentan altos contenidos de alofana (Bercht 1995, Vinasco 1997).

El potasio (K) es un elemento nutritivo esencial para todos los organismos vivos. Los vegetales necesitan cantidades elevadas de este nutriente siendo semejante su requerimiento al de nitrógeno. El K cumple un rol importante en la activación de un número de enzimas (conociéndose más de 60 activadas por este catión), que actúan en diversos procesos metabólicos tales como fotosíntesis, síntesis de proteínas y carbohidratos; también tiene incidencia en el balance de agua y en el crecimiento meristemático. Las plantas obtienen el K del suelo que proviene de la meteorización de los minerales, de los residuos orgánicos o el que proviene de los abonos y fertilizantes. Los procesos pedogenéticos actúan sobre los materiales presentes en el suelo y afectan en mayor o menor medida la disponibilidad del nutriente.

## SUELO ARCILLOSO

Como primer aspecto a subrayar, vale mencionar que este tipo de suelos presentan una textura fina, con un alto predominio de arcillas (45 % de arcillas, 30% de limo y 25% de arena).

Esta composición le permite una elevada retención de agua y nutrientes. No obstante posee una baja porosidad y por lo tanto, la consecuencia lógica es que son suelos que carecen de buenas posibilidades de aireación. Por este motivo se dice que son terrenos difíciles de trabajar ya que poseen una elevada viscosidad que ofrece una gran resistencia a la penetración de raíces.

Un aspecto peor aún que las dificultades de penetración de las raíces, es el hecho de que este tipo de suelo impide una correcta aireación de las mismas, y por tanto, tarde o temprano terminan pudriéndose.

## SUELO ARENOSO

Estos suelos presentan una textura gruesa, con predominio de arenas (75% arenas, 5% de arcillas y 20% de limo), lo cual les permite una gran aireación, y si bien absorben bien el agua, no tienen capacidad para retenerla, por tanto tampoco conservan los nutrientes, los cuales por lixiviación son arrastrados hacia el subsuelo.

## SUELO FRANCO

Son aquellos que tienen una textura media (45% de arena, 40% de limo y 15% de arcilla). Estos suelos presentan las mejores condiciones tanto físicas como químicas, siendo los más aptos para el cultivo.

También el color puede dar pautas sobre la composición mineralógica del suelo: en líneas generales, cuanto más oscura sea la tierra, mayor cantidad de materia orgánica y mayor fertilidad. En cambio, cuanto más claro, mayor presencia de gravas. Los rojos o castaño rojizos indican una alta proporción de óxidos de hierro, mientras que los amarillos indican una baja fertilidad (ya que son óxidos de hierro que han reaccionado con el agua y por lo tanto, son deficitarios en su drenaje). Los grisáceos pueden ser deficitarios en oxígeno o hierro, o bien poseer un exceso de sales alcalinas como el carbonato de calcio.

Con este análisis se puede concluir que además del ecotipo que se siembre dependerá mucho del tipo de suelo. Se sabe que *Jatropha curcas* es poco exigente en relación a este factor, por lo que se ha cultivado desde suelos arcillosos hasta arenosos, manteniéndose en diferentes tipos de climas. No obstante, para que exista un buen desarrollo y por consiguiente una buena cosecha es necesario contar con suelos fértiles con un pH cercano a la neutralidad ya que los pH ácidos hacen menos disponibles los nutrientes para las plantas.

En plantaciones mantenidas en suelo arcilloso debido a su baja porosidad, la compactación provoca dificultades de penetración de las raíces, impidiendo un buen desarrollo de estas y por consiguiente un crecimiento nulo en las plantas. En el caso de suelos arenosos se debe contar con suficiente agua debido a la infiltración de esta además de la fertilización para el crecimiento de la planta y la obtención del fruto (Figura 48).



Plantaciones en suelo arenoso (2 años de edad) plantación en suelo fértil (4 meses de edad).



Plantación en suelo fértil, sembrada directamente (edad 2 meses).  
Plantación en suelo arcilloso (Edad 1 año).

Figura 48.- Respuesta del piñoncillo sembrado en diferentes tipos de suelo.

## PLAGAS Y ENFERMEDADES EN *Jatropha curcas*

Generalmente las plantas de *Jatropha curcas* en estado silvestre no presentan plagas y enfermedades de consideración, sin embargo, cuando se cultivan en forma extensiva en monocultivo, pueden ser uno de los problemas más importantes en el cultivo (Kaushik and Kumar, 2008; Gour, 2006)

Dentro de las plagas más frecuentes que afectan a *J. curcas* se han encontrado el insecto *Podagrica sp* y al hongo *Cercospora sp.*, sin embargo existen reportes de plagas y enfermedades potenciales (Cuadro 28).

Cuadro 28. Plagas y enfermedades potenciales de *Jatropha curcas* L.

Nombre	Síntoma /Daño	Fuente
<i>Phytophthora spp.</i>	Pudrición de raíz	Heller, 1992
<i>Pythium spp.</i>	Pudrición de raíz	Heller, 1992
<i>Fusarium spp.</i>	Pudrición de raíz	Heller, 1992
<i>Helminthosporium tetramera</i>	Manchas en las hojas	Singh, 1983
<i>Pestalotiopsis paraguayensis</i>	Manchas en las hojas	Singh, 1983
<i>Pestalotiopsis versicolor</i>	Manchas en las hojas	Phillips, 1975
<i>Cercospora Jatropha curcas</i>	Manchas en las hojas	Kar & Das 1987
<i>Julus sp</i>	Pérdida de plántula	Heller, 1992
<i>Oedaleus senegalensis</i>	Hojas en plántula	Heller, 1992
<i>Lepidoptera larvae</i>	Galerías en hojas	Heller, 1992

En Nicaragua, las principales plagas que causan abortos de frutos y malformaciones en las semillas son: *Pachycoris Klugii Burmeister* (Heteroptera: *Scutelleridae*) y *Leptoglossus Zonatus* (Heteroptera: *Coreidae*). (Grimm y Somarriba, 1999), también se detectaron doce especies de insectos entre otras plagas como: El perforador de tallos *Lagocheirus undatus* (Voet) (Coleoptera: *Cerambycidae*), grillos, orugas e insectos benéficos polinizadores, predadores y parásitos.

En Cuba las principales enfermedades detectadas fueron: pudrición de la raíz, tallos y de la corona debido a un complejo de hongos llamada *Damping off*.



En Brasil, se detectaron: *Agaricinea bostrichus*, *Scutelcerideo (Coccídea)* y *Cochonillia* que ataca los tallos y las inflorescencias principalmente (Peioxo y col., 1973)

Otros factores que pueden afectar las plantaciones son los virus. El virus del mosaico de la *Jatropha* (JMV) fue reportado por primera vez en *Jatropha gossipiifolia* en Puerto Rico e identificado como *Begomovirus* (Brown y col., 1999), este virus fue transmitido por mosquita blanca (*Bemisia tabaci*).

Enfermedades causadas por virus en *Jatropha curcas* se han reportado recientemente en diferentes regiones de Karnataka India, presentando porcentajes de incidencia de 12%-46% (Palanivelu *et al.*, 2006). En época de lluvias detectaron incidencia del virus del mosaico de *Jatropha* (JMV) en varias regiones de Balrampur India, las plantas mostraron áreas cloróticas de forma irregular presentadas entre las venas secundarias de las hojas y enrollamiento de las mismas (Tewari *et al.*, 2007).

Orduño-Vega, (2009) encontró plantas positivas para *Begomovirus* en cultivos experimentales de *Jatropha curcas* en Sinaloa, obtuvo un fragmento de 750 pb

utilizando el juego de oligonucleótidos degenerados DGSAR/CP70BamH y PMOT/PCP resultados similares obtuvieron en India en el 2006 (Awatha Narayana y col., 2006) donde se detectó la presencia de *Begomovirus* en India.

## **METODOLOGIA**

### **DETECCIÓN DE PLAGAS Y ENFERMEDADES**

Para determinar la susceptibilidad a plagas y enfermedades del cultivo en Sinaloa, se evaluarán tres ecotipos no tóxicos de Veracruz, Puebla y Morelos en cuanto a su adaptabilidad a las condiciones agroecológicas de Sinaloa. Se realizará en un cultivo de 1 Ha, establecido en el CIIDIR Sinaloa en colaboración con CIBA Tlaxcala-IPN. La plantación de *J. curcas* no tóxica se establecieron en el mes de Febrero del 2008 en un campo experimental de CIIDIR Sinaloa, comprende material vegetal (a partir de semilla) originario de Veracruz, Puebla y Morelos establecido con un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones, con una densidad de siembra de 3.5 m X 3.5 m.

Para la detección de plagas se realizaron muestreos mensuales en la etapa vegetativa, floración, amarre de fruto y fructificación. Se utilizaron tres metodologías: Colecta manual, red entomológica y trampas amarillas adhesivas.

La colecta manual en tres secciones de la planta (superior, media e inferior) analizándose cinco plantas por cada tratamiento siguiendo la metodología de muestreo de cinco de oros, utilizada comúnmente por los agricultores, se tomaron cuatro plantas laterales y una central de cada tratamiento, la red entomológica se paso cien veces por cada tratamiento colectando los organismos en alcohol al 70% para su análisis en el laboratorio, se instalarán trampas amarillas adhesivas en cada uno de los tratamientos que serán reemplazadas cada mes.

Para la detección de patógenos se realizaron muestreos cada dos meses para detección de virus, hongos, bacterias, el muestreo se realizo en la etapa vegetativa y en la etapa de fructificación, además se realizaron recorridos en el cultivo para la detección de sintomatologías en el cultivo que indique la presencia de algún patógeno. El muestreo se realizo siguiendo la metodología de muestreo de cinco de oros, se tomaron hojas jóvenes o muestras de suelo siguiendo el método de muestreo de cinco plantas por cada tratamiento (cuatro laterales y una central).

## **DETECCIÓN DE GEMINIVIRUS EN MOSCA BLANCA Y EN PLANTAS DE *Jatropha curcas***

### **EXTRACCIÓN DE ADN DE MOSCA BLANCA**

Se utilizó el método de CTAB al 2% modificado. Se tomó un pool de 5 moscas blancas por muestra y fueron maceradas con un pistilo en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 200 µL de buffer CTAB al 2% (1.4M NaCl, 10 mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH=8.0, 0.2% βmercaptoetanol) precalentado a 60°C, luego se adicionó 200 µL del mismo buffer.

Posteriormente se incubó a 60°C por 15 min agitándose por inversión cada 5 min aproximadamente. Después de la incubación se agregó 400 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) se agitó por inversión varias veces, se centrifugó por 10 minutos a 13000 rev/min se recuperó el sobrenadante, se agregó 15 µL de la enzima RNAasa (10µg/µL) se incubó por 30 minutos a 37°C, posteriormente se agregó 400 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24.1), se agitó por inversión varias veces, se centrifugó a 13,000 rev/min por 10 min y se recuperó el sobrenadante.

El DNA que fue precipitado con 400 µL de isopropanol frío a -20°C al 100%, se centrifugó inmediatamente por 10 min a 13.000 rev/ min y se decantó, la pastilla se lavó con alcohol isopropílico al 100% se centrifugó por 5 min a 13,000 rev/min, finalmente se secó la pastilla y se resuspendió en 20 µL de agua destilada ultrapura estéril.. El DNA obtenido se almacenó a -20°C para su análisis en el laboratorio.

## **ELECTROFORESIS PARA LA VISUALIZACIÓN DEL DNA GENÓMICO**

Por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa, se verificó la calidad del DNA obtenido. Se utilizó un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1x con bromuro de etidio a una concentración de 10mg/  $\mu$ L.

Al gel se cargaron 2  $\mu$ L del DNA mezclado con 6  $\mu$ L de agua destilada estéril y 2  $\mu$ L de buffer de carga (colorante naranja G). Posteriormente se corrió en una

cámara de electroforesis con el buffer de corrida TAE 1X a 80 V por 25 -30 min. Finalmente se visualizó y documentó el gel en un sistema Gel Doc (Biorad, EUA serie 765/07029) y la imagen se manejó en el software Quantity –one (Biorad.EUA)

## **DETECCIÓN DE BEGOMOVIRUS POR PCR**

Para detectar a miembros del género Begomovirus se utilizó la técnica del PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) se utilizaron oligonucleótidos degenerados para amplificar Begomovirus por PCR simple y PCR anidado. Estos oligonucleótidos están diseñados en el componente A de los Begomovirus, sobre una región muy conservada pero que varía en tamaño dependiendo del Begomovirus en cuestión.

Así mismo pueden amplificar a los Begomovirus originarios de ambos hemisferios los cuáles se distinguen por el tamaño del fragmento amplificado. (Ascencio-Ibañez et al 1999) Han reportado que estos oligonucleótidos permiten diferenciar a los Begomovirus del nuevo mundo y del viejo mundo por el tamaño del fragmento amplificado.

Los Begomovirus del nuevo mundo amplifican un fragmento menor que los del viejo mundo.

Los Oligonucleótidos utilizados en el primer PCR simple son. Rep-DGRSAR

(GAGTCTAGATGCTGACCT CCTCTAGCWGATCTGCCGTC) y el CP70BamHI  
(CACGGATCCGATTGRACCT TACANGGNCCTTCACAACC)

Que amplifican un fragmento de 915 pb en Begomovirus del nuevo mundo y 1,100pb en Begomovirus del viejo mundo.

Para incrementar la sensibilidad en la detección y reducir la posibilidad de obtener falsos negativos, se realizó PCR anidado, el cual consiste en amplificar una región interna del fragmento amplificado en el primer PCR.

Para esto se utilizan los oligonucleótidos Mot y CP-Mot

Mot (GAGTCTAGAGGAT.....ANGTRAGGAAATARTTTGGC)

CP-Mot (CGCGAATTCGACT GGACCTTACATTGGNCCTCAC)

Los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente 650 pb en Begomovirus del nuevo mundo y 750 pb en Begomovirus del viejo mundo.

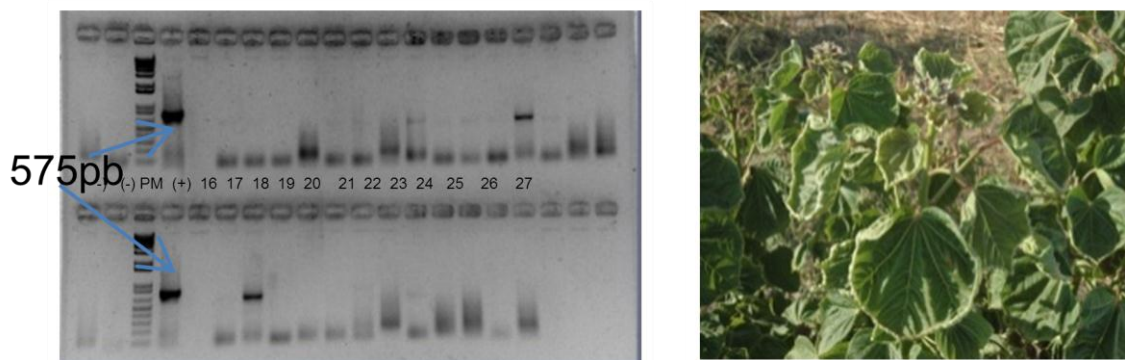


Figura 49. (a). Electroforesis del producto de amplificación de PCR que indica muestras positivas para begomovirus en *Jatropha curcas* (b). Sintomatología presente en el cultivo de *Jatropha curcas* que presentan enchinamiento en las hojas.

Otro estudio de plagas se realizó en el cultivo ubicado en Huitzilan de Serdán, Puebla durante el periodo de fructificación (Agosto-Septiembre 2010) el cual se encuentra en ladera y posee 800 m<sup>2</sup>. El cultivo está intercalado con plantas de café, en la parte inferior se localiza un arroyo, en la parte superior también se encuentra un cafetal, en las partes laterales sólo vegetación autóctona.



Figura 50.- Plantación de *Jatropha curcas* en Huitzilan, Puebla.

Se realizaron colectas de insectos de forma manual durante la época de fructificación en los insectos capturados fueron depositados en frascos de plástico con capacidad de 50 ml, agregándoles 25 ml de alcohol al 70%, estos frascos fueron etiquetados con datos como: lugar, fecha, hora inicial y final de la colecta, temperatura y humedad relativa. A partir de las muestras obtenidas se identificaron los insectos, benéficos y no benéficos.

Se utilizaron trampas amarillas de pegamento, empleando latas de 500 ml las cuales fueron colocadas alrededor del cultivo a una altura de medio metro; estas latas fueron forradas con el papel amarillo quedando el pegamento en la parte externa donde los insectos que fueron atraídos por el color se adherían y se dejaron en el campo tres días.



Figura 51. Trampas pegajosas en plantación, Huitzilán, Puebla.

Para reconocer la entomofauna asociada al cultivo de *Jatropha curcas* se separaron los insectos de acuerdo a características comunes, posteriormente fueron identificados empleando bibliografía especializada como Borrór, 1970; Coronado, 1976; Coronado 1986; Borrór, 1989, Davies, 1991; Knopf, 1992; Héller, 1992, Heller 1996; Domínguez, 1997; Domínguez, 1998.

Como resultado del estudio realizado llegamos a la conclusión que el orden y familia que mas predomina son los Hymenopteros y la familia Muscidae, ya que fue la población de la cual se logró capturar un total de 385 insectos en las trampas pegajosas (Cuadro 29).

Cuadro 29.- Insectos identificados en Huitzilán, Puebla

ORDEN	FAMILIA	No. INDIVIDUOS	EFECTO EN LA PLANTA
<b>Coleoptera</b>	Coccinellidae	77	Benéficos
	Bostrichidae	6	No benéficos
	Cucujidae	49	Benéficos
	Melyridae	5	Benéficos
	Anobiidae	1	No benéficos
	Nitidulidae	2	Benéficos
	<b>Díptera</b>	Scrophulariae	1
<b>Hymenoptera</b>	Trichogramma-	267	benéfico
	Muscidae	385	Benéfico
	Ropronildae	54	No benéfico
<b>Díptera</b>	Scrophulariae	385	Benéfico
	Ceratopogonidae	357	No benéfico
	Culicidae	57	No benéfico
<b>Lepidóptera</b>	Stenomidae	1	No benéfico
<b>Dermaptera</b>	Forticulidae	1	benéficos

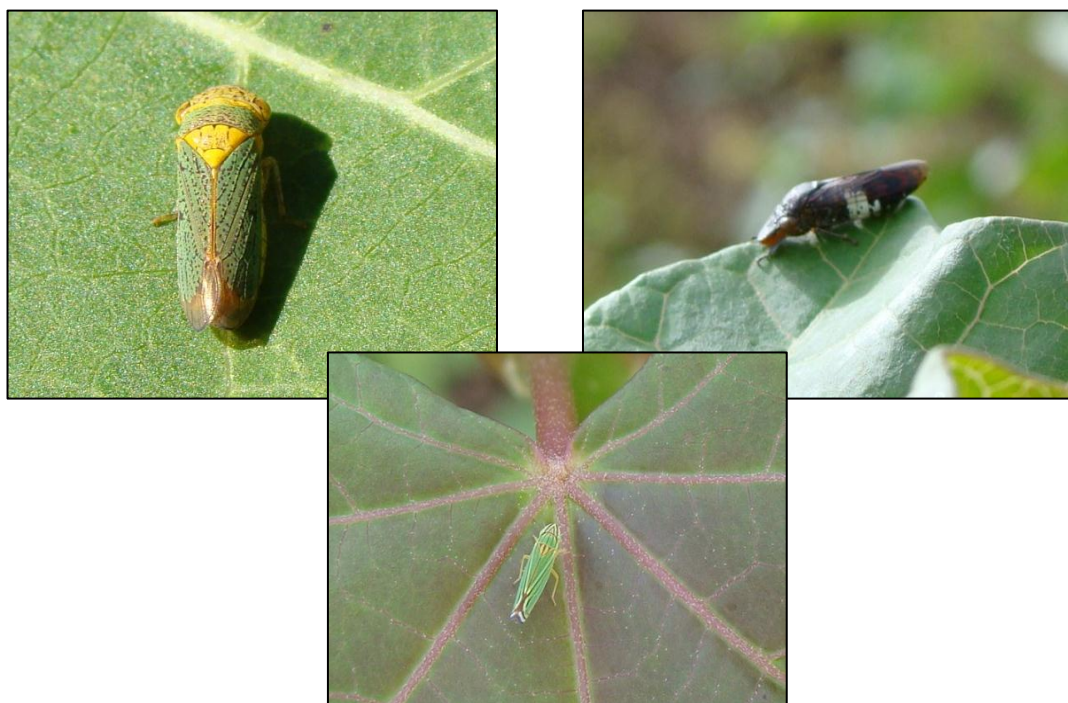


Es importante considerar el continuo monitoreo de las plantaciones para identificar si existe alguna enfermedad o plaga y así tomar medidas preventivas ó correctivas.

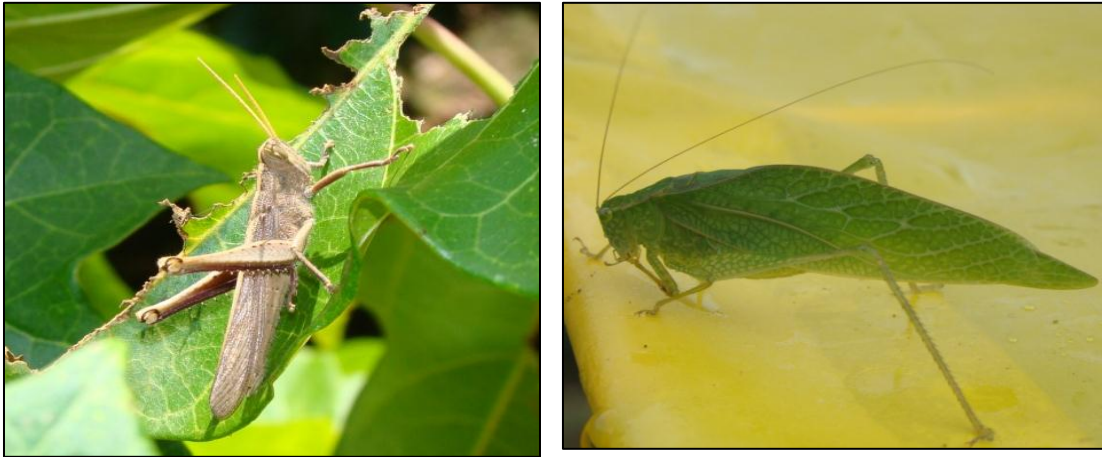
Los insectos no benéficos que se han identificado en cultivos del piñón varían de acuerdo al sitio donde se encuentre. A continuación se muestran en imágenes los insectos no benéficos encontrados en plantaciones (Figura 52).



A). *Pachycoris klugii* encontrados en plantaciones del Estado de Puebla, ocasionan daño en tallo y frutos.



B). Cicadélidos encontrados en Morelos y Yucatán, son vectores de enfermedades



C). Orthópteros encontrados en los Estados de Puebla, Morelos y Yucatán. Son insectos defoliadores.



D). *Leptoglossus* (chinche pata de hoja) impide el desarrollo del fruto ya que se alimentan de él, permitiendo a su vez la entrada de patógenos debido a las heridas.

Figura 52. Insectos no beneficios detectados en plantaciones de piñoncillo.

A).*Pachycoris klugii* B).Cicadélidos , C).Orthópteros, D).*Leptoglossus*.

Respecto a enfermedades, la planta puede verse afectada por diversos tipos de nematodos, cómo:

*Aphenculus* sp. Nematodo de la raíz; *Helicotylenchus* sp. Nematodo espirilado; *Tylenchus* sp., Nemaátodo cola de ratón, *Pratylenchus* sp. Nematodo lesionador( Figura 53) . Estos se



alimentan de la planta, provocando marchitez, lo que pudiera parecer sequía, falta de nutrientes, etc.



Figura 53.-*Jatropha curcas* afectada por nematodos.

El piñoncillo también puede verse afectado por hongos como *Fusarium culmorum* (podrición de tallo); *Colletotrichum gloesporioides*; *Alternaria sp.* y *Erisiphales sp* (oidio). Provocan podrición de tallo, raíz ( Figura18).



Figura 54. *Jatropha curcas* afectada por hongos. A) *Fusarium* B) *Erisiphe sp.*

En el caso de Sinaloa, para determinar plagas evaluó en un área experimental de 1 Ha de *Jatropha curcas* L. no tóxica, donde se encuentran tres ecotipos originarios de Veracruz, Puebla y Morelos. Se utilizó la metodología de muestreo de “cinco de oros”, se tomaron 5 muestras de cada tratamiento (4 laterales y una central). Actualmente el cultivo de *Jatropha curcas* cuenta con dos años ocho meses, se encuentra al inicio de la etapa de floración, se encuentra establecido en una hectárea experimental de CIIDIR Sinaloa en un

diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones y con una densidad de siembra 3.5X3.5.

De Agosto a Octubre del 2008 se realizaron muestreos cada mes de insectos plaga en el cultivo de *Jatropha curcas*. En Agosto los coleópteros presentaron mayor incidencia seguido por Piojo harinoso (*Planococcus sp.*). El tratamiento 2 del bloque I presentó mayor número y variedad de insectos, el número total de insectos fueron 36. En Septiembre, mosca blanca (*Bemisia tabaci*) presentó mayor incidencia en el cultivo y el tratamiento 3 del bloque III presentó mayor número y variedad de insectos y el número total de insectos colectados fueron 38. En Octubre, pulga saltona (*Epitrix sp.*) presentó mayor incidencia y el tratamiento 3 del bloque II presentó el mayor número y variedad de insectos, el número total de insectos colectados fueron 25 (Cuadro 30) y (Figura 55).

Cuadro 30 Principales insectos Plaga colectados en el cultivo de *Jatropha curcas* Agosto, Septiembre y Octubre 2008.

NOMBRE	ORDEN	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	Total
<b>Mosca blanca</b> ( <i>Bemisia tabaci</i> )	Hemíptera	4	7	5	16
<b>Piojo harinoso</b>	Homóptera	10	2		12
<b>Cigarrita</b>	Hemíptera	4			4
<b>Trips</b> ( <i>Frankliniella williamsi</i> )	Thysanoptera	1	1		2
<b>Pulga saltona</b>	Hemíptera		6	9	15
<b>Coleópteros</b>	Coleóptera	14	8	1	23
<b>Periquito</b>	Homóptera		2		2
<b>Acaro</b>	Acarina	*			*
<b>Psílido</b>	Homóptera	3			3
<b>Babosa</b>	Díptera		3	2	5
<b>Acalima</b>			3		3
<b>Chicharrita</b>	Homóptera			4	4
<b>Gusano peludo</b>	Lepidoptera			1	1
<b>Total</b>		35	33	22	90

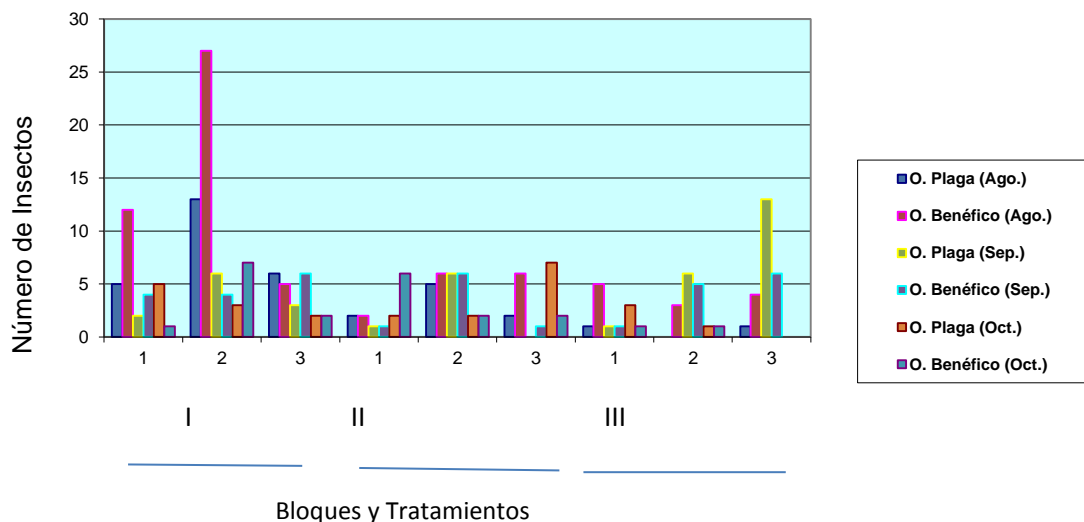


Figura 55.- Organismos colectados en plantación de Sinaloa

En la colecta de insectos benéficos en el mes de Agosto, Septiembre y Octubre del 2008, el grupo de insectos de Coccinélidos presentó la mayor cantidad seguido por araña depredadora, en el mes de Agosto se presentó el mayor número y diversidad de insectos benéficos.

Para la colecta y monitoreo de los insectos plaga se están utilizando red entomológica y las trampas amarillas adhesivas son colocadas a la altura de la planta.

Se realizó la segunda “poda” el día 3 de Junio 2010, después de haber sido podada en la etapa vegetativa, se reiniciaron los muestreos de insectos que visitan el cultivo de *Jatropha curcas*.

En la colecta de insectos en el mes de Junio, Julio y Agosto del 2010, la mayor cantidad de insectos detectados fueron mosca blanca (*Bemisia tabaci*), seguido por chicharrita (*Dalbulus elimatus*) y trips (*Trips spp.*), cabe señalar que las cantidades observadas de mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en los tres meses fueron indefinidas. En Junio chicharrita presento el mayor numero seguido por trips, se detectaron en el tratamiento uno Veracruz bloque II , seguido por tratamiento tres Morelos , bloque II.

En el mes de Julio chicharrita presento el mayor número seguido por trips, se detectaron en el tratamiento uno Veracruz bloque II , seguido por tratamiento uno Veracruz , bloque III.

En el mes de Agosto chicharrita presento el mayor número seguido por trips, se detectaron en el tratamiento uno Veracruz bloque III , seguido por tratamiento dos Puebla, bloque I. En el mes de Julio se presentaron la mayor cantidad y diversidad de insectos

#### Detección de patógenos

Para la detección de Patógenos, se está utilizando un área experimental de 1 Ha de *Jatropha curcas* L. no tóxica en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones, en la que se están evaluando los patógenos de tres ecotipos originarios de Veracruz, Puebla y Morelos.

Se detectaron plantas con enchinamiento en hojas en el mes de Agosto del 2008, por lo que se llevó a cabo el análisis de virus, se realizó la extracción de ADN por el método CTAB (Doyle y Doyle 1990) protocolo modificado. Para la reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos degenerados (DGSAR/CP70BamHI; PMOT/PCP). El ADN de la proteína del *geminivirus* es de 575 bp, se amplificó consistentemente a partir del ADN total extraído de muestras de *Jatropha curca*. Se obtuvo la presencia de *begomovirus* en el cultivo en el tratamiento dos correspondiente al ecotipo de Puebla en bloques I y III.

En Septiembre del 2010 se detectaron plantas que presentaban moteado clorótico y mosaico amarillo en hojas, se realizó análisis para la detección de *geminivirus* utilizando los oligonucleótidos degenerados (DGSAR/CP70BamHI; PMOT/PCP). Se encontraron cinco plantas positivas para *begomovirus* (Figura 6), nuevamente en el mes de Septiembre realizamos análisis similares y se detectaron 10 plantas positivas para *begomovirus*.

En el mes de Noviembre del 2010 se realizó muestreo de plantas que presentaban alguna sintomatología como: reducción en el tamaño de las hojas , achaparramiento o enanismo en las plantas, moteado clorótico, mosaico amarillo y engrosamiento de tallo, se colectaron organismos vectores de *Begomovirus* como es la Mosca Blanca, se recolectaron 40 organismos de mosca blanca y 125 muestras de tejido foliar de plantas en 1 ha de cultivo de *Jatropha curcas* , al realizar los análisis no se detectaron muestras positivas para *Begomovirus* ni en las muestras de los organismos de Mosca Blanca ni en plantas.

Se realizó un análisis del comportamiento del cultivo de *Jatropha curcas* en 2 años diez meses de edad y se detectaron plantas muertas y plantas marchitas así como plantas positivas para *Begomovirus* y virus TRSV y las clonas de Veracruz y Puebla presentan mayor resistencia a enfermedades y un mejor desarrollo y adaptabilidad al ecosistema.

## TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA

Se llevaron a cabo pláticas acerca del cultivo de *Jatropha curcas* a productores en el municipio de Tlaxco, Puebla.





Del mismo modo a productores del Estado de Veracruz en los municipios de Orizaba, Zongolica y Tezonapa a los que actualmente se les sigue asesorando.



En el Estado de Michoacán, en Morelia y Arteaga también se realizaron pláticas informando de las probables ventajas y desventajas que podrían existir con el cultivo de *Jatropha curcas* en esas localidades.



## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sobre Diversidad genética, mediante RAPD's indican que las accesiones de *Jatropha curcas* L. colectadas en los diferentes estados, tienen distancias génicas reducidas, agrupándose de acuerdo a su procedencia. Esta reducida variabilidad genética, quizás se deba a que los especímenes de donde se toman dichas muestras fueron cultivados de forma vegetativa (esquejes) ya que por lo regular los lugareños acostumbran a optar por dicha propagación debido al uso que le dan ya que para el crecimiento de la planta es más rápido en contraste con la semilla, lo que hace que disminuya la variabilidad entre estas.

La medición de las características fenotípicas de las accesiones *Jatropha curcas* marcan variabilidad genética entre las poblaciones estudiadas ya que se observa la formación de grupos de acuerdo a su origen, sin embargo, no existen diferencias significativas de manera intrapoblacional. De la misma forma el análisis químico de las accesiones presentan diferencias en cuanto el contenido de aceite, proteína así como de ésteres de forbol. Estas diferencias son intrapoblacionales e interpoblacionales.

Respecto al análisis de correlación existe relación de acuerdo al contenido de aceite y peso de semilla. Algunos autores indican que el nitrógeno no afecta el contenido de formación de aceite, sin embargo favorece el rendimiento de este por semilla y planta por lo que el análisis de correlación entre el contenido de aceite y proteína marca valor negativo.

Si bien el contenido porcentual de aceite se encuentra determinado en gran medida genéticamente, los efectos ambientales y las prácticas agronómicas producen variabilidad sobre el rendimiento.

Con estos resultados se puede decir que la variación genotípica en *Jatropha curcas* esta correlacionada a su origen geográfico y la variación fenotípica no marca relación debido probablemente a los factores ambientales que influyen en las características morfológicas de las semillas.

Las mejores accesiones en cuanto contenido de aceite y proteína son las provenientes de Huitzilán, Puebla, Nueva Libertad Chiapas y Sumidero Veracruz. Sin embargo, las accesiones de Chiapas son tóxicas.



En México existen las condiciones agroecológicas para el cultivo de *Jatropha curcas* L. De acuerdo a las experiencias en este trabajo se sabe que si bien *Jatropha curcas* soporta condiciones de estrés hídrico, diferentes climas y tipos de suelo, el desarrollo y productividad de la planta se verá afectado por estas condiciones, por lo que se tendrían diferentes tipos de respuestas. Sin embargo, si se realiza el cultivo de *Jatropha curcas* con la finalidad de tener una alta productividad de semilla para la obtención de aceite, debe tomarse en cuenta las características agroecológicas de las regiones donde se desee establecer el cultivo (suelo enriquecido, poda, fertilización, etc). La planta requiere labores culturales como cualquier otro monocultivo.

*Jatropha curcas* es una planta en proceso de domesticación ya que se observaron diferentes respuestas de acuerdo a las condiciones en donde se cultiva, por lo que se sugiere mejoramiento genético. En todas las regiones donde se cultive se debe asegurar variación genética.

*Jatropha curcas* es una alternativa para la obtención de biocombustibles y una oportunidad para los productores en México, sin embargo se deberá evaluar la rentabilidad y competitividad en cada región y planear su cultivo.

La producción de *Jatropha curcas* debe ser acorde con las características agroecológicas y sociales de las regiones donde se cultive. Esto implica la selección de germoplasma adecuado para cada región (mejoramiento genético).

En las plantaciones establecidas se identificaron diversas plagas y enfermedades que podrían afectar al cultivo de *Jatropha curcas*, sin embargo será necesario evaluar el riesgo que representan para los cultivos de importancia económica en cada región.

