



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS VERACRUZ

POSTGRADO EN AGROECOSISTEMAS TROPICALES

**CARACTERIZACIÓN MORFOGENÉTICA DE ACCESIONES DE *Jatropha curcas* L.,
RECOLECTADAS EN EL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO**

IVAN ZAVALA DEL ANGEL

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTOR EN CIENCIAS


TEPETATES, MANLIO FABIO ALTAMIRANO, VERACRUZ, MÉXICO.

2016

La presente tesis titulada: **Caracterización morfogénica de accesiones de *Jatropha curcas* L., recolectadas en el estado de Veracruz, México** realizada por el alumno: **Iván Zavala del Ángel**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:


DOCTOR EN CIENCIAS
EN AGROECOSISTEMAS TROPICALES


CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DR. ELISEO GARCÍA PÉREZ

ASESOR: 
DR. ARTURO PÉREZ VAZQUEZ

ASESOR: 
DRA. DOLORES GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

ASESOR: 
DR. CATARINO ÁVILA RESENDIZ

ASESOR: 
DR. ARMANDO GUERRERO PEÑA

TEPETATES, MANLIO FABIO ALTAMIRANO, VERACRUZ.

MAYO 2016

CARACTERIZACIÓN MORFOGENÉTICA DE ACCESIONES DE *Jatropha curcas* L.
RECOLECTADAS EN EL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO

Ivan Zavala del Angel, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2016

Jatropha curcas es una planta oleaginosa nativa de México y Centroamérica. El cultivo de esta planta se reconoce como una opción viable de materia prima en la producción de biodiesel, en función del alto contenido de aceite en la semilla ($\approx 40\%$). Sin embargo, poco se ha avanzado en identificar y seleccionar materiales que muestren características promisorias en cuanto a la producción y calidad de aceite. El objetivo de este trabajo fue caracterizar morfogénicamente accesiones de *J. curcas* recolectadas en diferentes condiciones edafoclimáticas del estado de Veracruz. Se realizó una búsqueda de accesiones de *J. curcas* en el estado determinando su localización y distribución geográfica, la diversidad genética existente mediante el uso de marcadores moleculares, características morfológicas de semilla y algunas propiedades químicas del aceite. La planta está ampliamente distribuida en todo el estado, principalmente en altitudes menores de 500 m. El análisis de diversidad genética, mostró que las accesiones recolectadas en la parte norte del estado tendieron a agruparse y aunque hubo variaciones en el tamaño de las semillas no se correlacionó genéticamente. De acuerdo con los análisis de contenido de ésteres de forbol, se encontraron materiales tóxicos y no tóxicos. Las plantas tóxicas (0.12 a 0.66 mg/g de forbol) se localizaron en el centro y sur del estado, mientras que las no tóxicas en las regiones Huasteca alta, Huasteca baja, Totonaca y Nautla. Se concluye que, en el estado de Veracruz es posible encontrar germoplasma de *J. curcas* que puede ser utilizado para mejoramiento genético en la obtención de variedades no tóxicas lo que potencializa el uso multipropósito de la planta.

Palabras clave: Diversidad genética, ésteres de forbol, *Jatropha curcas*, Veracruz

MORPHOLOGICAL AND GENETICAL CHARACTERIZATION OF *Jatropha curcas* L.
ACCESSIONS RE COLLECTED FROM VERACRUZ STATE, MEXICO

Ivan Zavala del Angel, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2016

Jatropha curcas is a native oleaginous plant from Mexico and Central America. The cultivation of this plant is recognized as a viable option of feedstock, for biofuel production fort its high oil content in the seeds ($\approx 40\%$). However, little progress has been made in identifying and selecting materials that show promising characteristics in terms of production and quality of oil. The aim of this study was to characterize morpho and genetically *J. curcas* accessions collected from different soil and climatic conditions in the state of Veracruz. A search for accessions of *J. curcas* in the state was conducted and its location and geographical distribution, genetic diversity with molecular markers and morphological characteristics of seeds and chemical of oil. It was found that the plant is distributed throughout the whole state, mainly at altitudes less than 500 m. Genetic analysis showed that the accessions collected in the northern part of the state tended to cluster and although there were variations in the size of the seeds they were not genetically correlated. According to the phorbol analysis, toxic and non-toxic accessions were found. Toxic plants (0.12 to 0.66 mg / g phorbol esters) were located at the center and south of the Veracruz, while non-toxic at regions: Huasteca Alta, Huasteca Baja, Totonaca and Nautla. According to the data obtained germplasm of *J. curcas* can be found in Veracruz, that can be used for breeding in obtaining non-toxic varieties, which potentiates the multipurpose use of the plant.

Key words: *J. curcas* L., biofuels, diversity, morphological traits

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a mis Padres, como un tributo a su esfuerzo, amor, visión y sacrificio para sacar adelante a mis hermanos y a mí.

A Estela, mi amada compañera para toda la vida, cómplice de todas mis aventuras.

A mis hijos, Vivi e Ivan, a quienes amo con todo mi ser y son el motor de mi vida.

A mis hermanos: Flor, Rogelio, Lety, Tita, Abel, Armando a quienes admiro y quiero y en agradecimiento por todo el apoyo que me han dado desde que nací.

A mis sobrinos, Abelito, Fany, Abel, Angel, Lalo, Tere, Iván, Mauri, Karla, Armandito y Andrés, a quienes quiero como a mis hijos

A Barto, Lito y doña Isabel quienes siempre han estado al pendiente de mí

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi profundo agradecimiento al Colegio de Postgraduados por la oportunidad que se me brindó para realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca que me fue otorgada para realizar los estudios de doctorado.

Al Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión del COLPOS 2009 y 2010, por el financiamiento otorgado a mi proyecto de investigación de tesis.

A los proyectos FOMIX 127702 y 095753 por los recursos proporcionados para la realización del proyecto de investigación de tesis y estancias académicas nacionales y en el extranjero.

A la Línea Prioritaria 3, Energía Alterna y Biomateriales del Colegio de Postgraduados, por los recursos otorgados para el desarrollo de la parte experimental y para la presentación de los resultados en diferentes foros nacionales e internacionales.

Al INECOL y a la Universidad de Leiden, por las facilidades otorgadas para la realización de los diferentes experimentos que se contemplaron en la tesis.

A mi consejero, Dr. Eliseo, por toda la confianza y apoyo incondicional, aún en las situaciones más críticas. Agradezco su trato siempre amable y cálido, lo cual hizo posible una estancia muy agradable durante el desarrollo de la tesis y demás proyectos planteados paralelamente.

Al Dr. Arturo mi más enorme agradecimiento, por siempre estar al pendiente de mi en lo personal y profesional. También por valorar mis capacidades y enseñarme a sacar el mayor provecho de ellas.

A la Dra. Dolores agradezco todas sus enseñanzas, paciencia, confianza y consejos. Gracias por hacerme sentir en el INECOL como una extensión de mi casa, el COLPOS.

Al Dr. Catarino agradezco infinitamente su asesoría en las etapas tempranas del proyecto de tesis, sus comentarios y observaciones tuvieron mucha trascendencia en lo que sería el trabajo final.

Al Dr. Armando agradezco sus observaciones en la etapa de revisión de la tesis, así como también su interés por dejarme bien cimentados los conocimientos y fundamentos de las técnicas analíticas utilizadas.

Sin ser parte del consejo particular también quiero agradecer al Dr. Rob Verpoorte, por abrirme las puertas de la Universidad de Leiden y permitirme realizar una fructífera y gratificante estancia en Holanda. Asimismo, al Dr. Ramón Marcos Soto Hernández por ser el puente para hacer esto posible.

A la Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia, quien apareció en mi vida de manera fortuita, agradezco sus enseñanzas, apoyo y sobre todo, su amistad.

Mi reconocimiento y agradecimiento sincero a todos los profesores del COLPOS, de quienes aprendí muchas cosas tanto en el aula como fuera de ella. Hago mención especial a la Dra. Carmen y Dr. Asiain, quienes me motivaron y tuvieron una influencia determinante para que pudiera concretar este proyecto.

Agradezco la amistad y las buenas charlas con mis compañeros de generación y demás estudiantes con los que conviví durante mi larga estancia en el COLPOS, es difícil mencionar sus nombres por el temor de omitir a alguien, pero todos fueron valiosos sin duda. A Pablo Guntin y Wil, agradezco su apoyo para la ardua tarea de la recolecta de materiales en todo el estado.

Al personal administrativo y de campo, mi profundo reconocimiento a su labor.

CONTENIDO

| | Páginas |
|--|---------|
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| 1. Planteamiento del problema | 3 |
| 2. Objetivos | 6 |
| 2.1 General | 6 |
| 2.2 Específicos | 6 |
| 3. Hipótesis | 7 |
| 3.1 General | 7 |
| 3.2 Específicas | 7 |
| 4. Marco teórico | 8 |
| 5. Marco de referencia..... | 14 |
| 5.1 Biocombustibles | 14 |
| 5.1.1 Situación mundial de la producción y uso de los biocombustibles | 14 |
| 5.1.2 Situación del uso de los biocombustibles en México | 16 |
| 5.2. Fuentes agrícolas de biodiesel..... | 16 |
| 5.2.1 <i>Jatropha curcas</i> L..... | 17 |
| 5.2.1.1 Descripción botánica..... | 17 |
| 5.2.1.2 Requerimientos y manejo del cultivo | 18 |
| 5.2.1.3 Principales Usos..... | 19 |
| 5.2.1.4 Diversidad genética | 20 |
| 6. Literatura citada | 22 |
| | |
| CAPITULO I. AISLAMIENTO DE ADN Y RFLP's EN ACCESIONES DE <i>Jatropha curcas</i> L. RECOLECTADAS EN LA REGIÓN DEL SOTAVENTO EN VERACRUZ | 30 |
| 1.1 Introducción | 32 |
| 1.2 Materiales y métodos..... | 32 |
| 1.3 Resultados y discusión | 33 |
| 1.4 Conclusiones | 35 |
| 1.5 Literatura citada..... | 35 |
| | |
| CAPITULO II. ASPECTOS ETNOBOTÁNICOS DEL PIÑÓN (<i>Jatropha curcas</i> L.): CONTENIDO DE ÉSTERES DE FORBOL Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA EN VERACRUZ, MÉXICO | 37 |
| 2.1 Introducción | 39 |
| 2.2 Materiales y métodos | 40 |
| 2.3 Resultados | 41 |
| 2.4 Discusión | 49 |
| 2.5 Conclusiones | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 2.6 Literatura citada | 53 |
| CAPITULO III. DIVERSIDAD GENÉTICA DE <i>Jatropha curcas</i> L. EN EL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO USANDO MARCADORES DE MICROSATÉLITES Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE ESTERES DE FORBOL | 56 |
| 3.1 Introducción | 58 |
| 3.2 Materiales y métodos | 60 |
| 3.3 Resultados | 65 |
| 3.4 Discusión | 68 |
| 3.5 Conclusiones | 71 |
| 3.6 Literatura citada | 72 |
| CAPITULO IV. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE SEMILLAS, CONTENIDO DE ACEITE Y TOXICIDAD EN ACCESIONES DE <i>Jatropha curcas</i> L. RECOLECTADAS EN VERACRUZ, MÉXICO..... | 76 |
| 4.1 Introducción | 78 |
| 4.2 Materiales y métodos | 79 |
| 4.3 Resultados y discusión..... | 81 |
| 4.4 Conclusiones..... | 91 |
| 4.5 Literatura citada | 91 |
| CONTRASTACIÓN DE HIPOTESIS, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES | 95 |
| Conclusiones generales | 96 |
| Recomendaciones generales..... | 96 |
| Anexos | 98 |

LISTA DE CUADROS

| | Páginas |
|--|----------------|
| Cuadro 1. Descripción taxonómica de <i>Jatropha curcas</i> | 17 |
| Cuadro 2. Clave, localidad, región de colecta, georreferenciación y altitud de las accesiones recolectadas en el estado de Veracruz | 42 |
| Cuadro 3. Ubicación del árbol en el sitio de recolecta, forma de propagación y toxicidad de la semilla de acuerdo con el propietario | 44 |
| Cuadro 4. Valor medio, mínimo y máximo de las variables diámetro del tallo, altura de planta, y edad del árbol y altitud de las plantas registradas | 44 |
| Cuadro 5. Percepción de los entrevistados sobre la toxicidad de <i>J. curcas</i> y contenido de ésteres de forbol..... | 48 |
| Cuadro 6. Clave, municipio, región, coordenadas geográficas y altitud de los sitios donde se recolectaron las accesiones de <i>J. curcas</i> en el estado de Veracruz, México..... | 62 |
| Cuadro 7. Características de los seis microsátélites utilizados | 64 |
| Cuadro 8. Polimorfismo obtenido con seis loci de microsateles en 64 accesiones de <i>J. curcas</i> | 66 |
| Cuadro 9. Contenido de ésteres de forbol en accesiones de <i>J. curcas</i> recolectadas en diferentes regiones del estado de Veracruz | 68 |
| Cuadro 10. Medidas de largo, ancho, grosor, peso y esfericidad de semillas de 40 accesiones de <i>J. curcas</i> | 83 |
| Cuadro 11. Información geográfica, contenido de aceite y ésteres de forbol de 40 accesiones de <i>J. curcas</i> recolectadas en Veracruz, México | 85 |
| Cuadro 12. Perfil de ácidos grasos de 40 accesiones de <i>J. curcas</i> recolectadas en Veracruz, México | 87 |
| Cuadro 13. Análisis de correlación de las variables de ubicación de las plantas, morfología de semilla, contenido de aceite, semillas por fruto y de perfil de ácidos grasos de las accesiones de <i>J. curcas</i> | 90 |

LISTA DE FIGURAS

| | Páginas |
|---|----------------|
| Figura 1. Representación esquemática del problema de investigación basado en el enfoque de sistemas | 10 |
| Figura 2. Esquema de un agroecosistema de <i>J. curcas</i> como bioenergético..... | 11 |
| Figura 3. Geles de electroforesis con ADN extraído por el método CETAB sin purificación y por el kit comercial Dneasy..... | 33 |
| Figura 4. Fotografía del gel de electroforesis que muestra los patrones de bandeo del espaciador intergénico <i>trnLUAA-trnFGAA</i> de las cuatro accesiones con las enzimas de restricción <i>Hha</i> I, <i>Taq</i> I y <i>Hpa</i> II..... | 34 |
| Figura 5. Distribución de las recolectas de <i>J. curcas</i> en las diferentes regiones del estado de Veracruz, México | 41 |
| Figura. 6. Distribución de los diferentes usos de <i>J. curcas</i> en las diferentes regiones del estado de Veracruz, México | 45 |
| Figura 7. Usos medicinales de <i>J. curcas</i> mencionados por los entrevistados | 46 |
| Figura 8. Ubicación de los sitios de recolecta de accesiones de <i>J. curcas</i> en el estado de Veracruz, México..... | 61 |
| Figura 9. Fenograma de 64 accesiones de <i>J. curcas</i> agrupadas de acuerdo con el Coeficiente de Similaridad de Jaccard | 67 |
| Figura 10. Distribución de accesiones tóxicas y no tóxicas de acuerdo con el sitio de recolecta en el estado de Veracruz..... | 69 |
| Figura 11. Media y moda de número de semillas por fruto de accesiones de <i>J. curcas</i> recolectadas en Veracruz, México | 81 |

INTRODUCCIÓN GENERAL

J. curcas es un arbusto perene, caducifolio, de tallo suculento perteneciente a la familia Euphorbiaceae (Maes *et al.*, 2009). Crece en variadas condiciones climáticas, aunque se desarrolla mejor en los trópicos, donde las temperaturas medias están entre los 20 °C y 28 °C y se alcanzan precipitaciones anuales superiores a los 600 mm (Trabucco *et al.*, 2010). México forma parte del centro de origen (Ovando-Medina *et al.*, 2011a), debido a que de 186 especies de *Jatropha* conocidas en el mundo, 48 (26 %) están presentes en el país, de las cuales 39 son endémicas (Steinmann, 2002).

En México *J. curcas* se distribuye ampliamente en regiones tropicales y subtropicales de los estados de Yucatán, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Puebla, Morelos, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Sinaloa y Veracruz (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2009).

Alrededor del mundo, se han descrito una gran diversidad de usos para las diferentes partes de la planta. Sin embargo, recientemente ha cobrado importancia debido a que el aceite, extraído de sus semillas, tiene grandes posibilidades de ser utilizado como materia prima para la fabricación de biodiesel (Abdulla *et al.*, 2011; Luijten y Kerkhof, 2011).

La transformación del aceite de *J. curcas* en biodiesel, puede lograrse mediante una reacción de transesterificación con metanol en presencia de un catalizador básico, obteniéndose además del biodiesel, glicerina como subproducto (Achten *et al.*, 2008).

Desafortunadamente el establecimiento de plantaciones comerciales de *J. curcas* en México y en otros países, se ha visto limitado por problemas como: 1) alta variabilidad de rendimiento entre plantas 2) asincronía en la maduración del fruto, 3) presencia de compuestos tóxicos en el aceite y subproductos, y 4) ataque de plagas y enfermedades. Lo que refleja el poco conocimiento que se tiene sobre la planta y que aún se encuentra en un proceso de domesticación, y por tanto se requiere seleccionar individuos con características sobresalientes para integrarlas en programas de mejoramiento genético.

Para su incorporación a un sistema productivo comercial, es deseable contar con materiales genéticos que puedan tener altos rendimientos de fruto, semillas y aceite, para abastecer la demanda agroindustrial para la producción de biodiesel.

En la producción del biodiesel, tiene importancia la cantidad de aceite que pueda extraerse de la semilla y la calidad del mismo. Mayores rendimientos pueden esperarse cuando el aceite

utilizado contiene altas concentraciones de ácidos grasos monoinsaturados como el ácido palmitoleico y oleico (Berchmans y Hirata, 2008).

En Veracruz, existe conocimiento empírico sobre la planta en las personas que la poseen y que la han cultivado por años para usos tradicionales diversos. En la medicina, las semillas y el aceite se han utilizado como antihelmíntico y agente purgante (Kumar y Sharma, 2008); el látex como cicatrizante de heridas y control del herpes; de las hojas se han aislado sustancias con propiedades antiinflamatorias (Gübitz *et al.*, 1999).

No obstante que en semillas de *J. curcas* se han encontrado sustancias altamente tóxicas, como los ésteres de forbol y otros compuestos antinutricionales (saponinas, fitatos, inhibidores de tripsina y lectinas) se ha documentado que en las regiones del Totonacapan y Maya en los estados de Veracruz y Quintana Roo en México, se da el uso alimenticio empleando las semillas (Makkar y Becker, 1997; Makkar *et al.*, 1998b; Valdes-Rodriguez *et al.*, 2013).

La presencia de materiales tóxicos y no tóxicos en Veracruz (Herrera *et al.*, 2010), obliga a la realización de estudios encaminados a medir la diversidad genética de estos materiales. Si bien la caracterización morfológica es una herramienta útil para seleccionar características promisorias, el empleo de marcadores moleculares como los microsatélites ofrecen ventajas adicionales, como por ejemplo no ser afectados por el ambiente.

En este sentido, el objetivo de esta investigación fue caracterizar morfológica y genéticamente accesiones recolectadas en el estado de Veracruz, a fin de identificar materiales promisorios, que en un futuro puedan ser utilizados en la generación de variedades comerciales.

1. Planteamiento del problema

Ante el escenario evidente del agotamiento de reservas petroleras en el mundo, aunado a la necesidad de dar protección del ambiente, el tema de las energías renovables ha cobrado interés como una prioridad en las agendas de muchos países, particularmente en países desarrollados.

La primera gran crisis del petróleo ocurrida en 1973 provocó un encarecimiento notable de ésta fuente de energía, por lo que surgió la preocupación sobre el suministro y precio futuro del petróleo. Los países consumidores dependientes de éste combustible fósil, tuvieron que modificar sus políticas energéticas y buscar opciones para reducir su dependencia a fuentes no renovables (Pousa *et al.*, 2007).

Según la AIE (Agencia Internacional de Energía), la demanda mundial de petróleo llegará a 116 millones de barriles diarios (mbd) en 2030 (de un valor de 84 mbd en 2005), lo que equivale a un incremento de 38% en ese periodo. Es por ello urgente la utilización racional de la energía convencional y la sustitución de los combustibles fósiles por otros tipos de energía. Esto requiere de una política energética que permita disminuir la actual dependencia del petróleo e impulsar la transición hacia las energías alternas y renovables (Solomon *et al.*, 2015).

Hoy en día muchas de las tecnologías de aprovechamiento de energías renovables han madurado y evolucionado, aumentando su confiabilidad y mejorando su rentabilidad para muchas aplicaciones. Sin embargo, aún no han logrado alcanzar la preponderancia esperada (Al-Amir y Abu-Hijleh, 2013).

Dentro de las energías alternas, las fuentes renovables ocupan particular atención. Estas son aquellas que por su capacidad de regeneración natural y cantidad en relación a los consumos que los seres humanos pueden hacer de ellas, son inagotables y su explotación con responsabilidad poco afectan al ambiente (Estrada y Islas, 2010).

La bioenergía o agroenergía es la energía que se obtiene de materiales orgánicos de origen biológico y ha sido utilizada como combustible a lo largo de toda la historia de la humanidad.

Los materiales orgánicos de origen biológico proporcionan según su origen y procesamiento, energía técnicamente útil y factible de aprovechar desde el punto de vista económico en las tres formas físicas, sólido (Contreras-Hinojosa *et al.*, 2003), líquidos (Bhuiya *et al.*, 2014) y gas (Luijten y Kerkhof, 2011).

El uso de la bioenergía tiene importantes ventajas, que la hacen sumamente atractiva para ser usada como energético. Puede reducir las emisiones que contribuyen al cambio climático, es la

única fuente de energía que puede sustituir a los combustibles líquidos y se puede almacenar fácilmente como el petróleo y el gas (Navarro-Pineda *et al.*, 2016).

Es de esperarse que en países ubicados en las franjas tropicales y subtropicales, sean los principales proveedores de materias primas para la industria de la bioenergía. Sin embargo, en países como México, no existe aún un marco normativo suficiente para la producción, comercialización y utilización de biocombustibles líquidos. Otras problemáticas involucradas son: la falta de una política energética integral que contemple a la bioenergía, mantenimiento de subsidios a los combustibles fósiles que limitan el margen de acción de los biocombustibles y así como la falta de una visión integral que incluya a todos los actores involucrados en el tema como cadena de valor (Estrada y Islas, 2010).

Para la producción de bioetanol y biodiesel, dos de los principales biocombustibles líquidos, se han utilizado diversas materias primas. Para el caso del bioetanol, destaca el uso de la caña de azúcar y el maíz. Mientras que para el biodiesel, se emplean los aceites procedentes de oleaginosas como colza, soya y palma aceitera (Abdulla *et al.*, 2011). Sin embargo, la demanda creciente de estos productos en la producción de biocombustibles afecta su precio en el mercado, ya que también son utilizados en la alimentación humana y/o animal. Esto ha ocasionado la búsqueda de especies de bajo o nulo valor alimenticio que puedan ser utilizadas como materia prima en la producción de biocombustibles. En lo que respecta a la producción de biodiesel, el uso del aceite de *J. curcas*, puede tener un gran potencial.

Para Achten *et al.* (2008), *J. curcas* es una planta que de acuerdo con las propiedades del cultivo y su aceite, potencialmente puede ser un sustituto de los combustibles fósiles y ayudar a reducir la emisión de gases de efecto invernadero. Si bien México es considerado el centro de origen de *J. curcas*, poco se ha trabajado en identificar y seleccionar materiales que muestren características promisorias en cuanto a producción y calidad de aceite. Numerosos proyectos de producción de biodiesel a partir de plantaciones de *J. curcas* han fracasado, las causas de esta situación han involucrado factores económicos, políticos, legales y técnicos. Pero el más decisivo ha sido el desconocimiento que se tiene sobre la planta, muestra de ello es la carencia de variedades comerciales.

Las plantaciones comerciales de *J. curcas* establecidas en el país han evidenciado serios problemas de adaptación, presencia de plagas y rendimientos variables en producción y contenido de aceite, lo cual se debe en gran medida a que la planta no está totalmente

domesticada (Divakara *et al.*, 2010). Es decir, hace falta conocer la diversidad genética, seleccionar materiales sobresalientes, iniciar programas de mejoramiento genético, para después evaluar el manejo agronómico de esta especie y así lograr su aprovechamiento de manera más eficiente y redituable.

El desarrollo de variedades es un proceso necesario para el aprovechamiento de un recurso genético; implica procesos de identificación y selección de materiales con características sobresalientes las cuales posteriormente deberán someterse a procesos de mejoramiento genético (Kumar *et al.*, 2015).

La existencia de variedades de *J. curcas* está en discusión. Para Ovando *et al.* (2011a), las variedades que frecuentemente han sido mencionadas por algunos investigadores, han sido clasificadas de manera arbitraria y su diferenciación se ha basado en el tamaño de sus fruto (variedad Nicaragua), dispersión en el mundo (Cabo verde) y por el contenido de moléculas tóxicas (*Jatropha mexicana* no tóxica).

El empleo de marcadores moleculares ha proveído de poderosas herramientas para la detección de diferencias genéticas entre los individuos (Cruzan, 1998). Se detectan a través de una serie de métodos o técnicas que exploran la variación de los organismos, a nivel de las proteínas o ADN y al nivel de un locus o varios loci en particular. Tienen la ventaja de que no son afectados por el ambiente como los marcadores morfológicos. No obstante, los estudios en *J. curcas* llevados con marcadores moleculares han mostrado una baja variación genética (Basha y Sujatha, 2007; Shen *et al.*, 2010). De acuerdo con Ovando *et al.* (2011b), esto puede deberse a que no se han incluido materiales procedentes del centro de origen.

De acuerdo con lo anterior, el presente trabajo planteó la siguiente pregunta de investigación ¿Cuáles son las características morfológicas, diversidad genética y aceite de accesiones de *J. curcas* recolectadas en diferentes regiones del estado de Veracruz?.

2. Objetivos

2.1 General

Analizar la morfología, diversidad genética y el contenido y composición de aceite, en accesos de *J. curcas*, recolectados en diferentes condiciones edafoclimáticas del estado de Veracruz .

2.2 Específicos

Recolectar, georeferenciar y conocer la morfología de *J. curcas* en las diferentes condiciones agroclimáticas del estado de Veracruz.

Analizar la diversidad genética de accesiones de *J. curcas* recolectadas en el estado de Veracruz, México mediante microsatélites.

Caracterizar el contenido de aceite, ésteres de forbol y ácidos grasos en accesiones de *J. curcas* recolectadas en diferentes regiones del estado de Veracruz.

3. Hipótesis

3.1 General

Los accesos de *J. curcas* presentan diferencias morfológicas, genéticas y químicas, en función de las condiciones edafoclimáticas contrastantes en el estado de Veracruz.

3.2 Específicas

Existen diferencias morfológicas en *J. curcas* de acuerdo con la distribución de la planta en las diferentes regiones del estado de Veracruz .

Las diferentes condiciones edafoclimáticas presentes en el estado de Veracruz contribuyen a incrementar la diversidad genética de *J. curcas*.

La composición y cantidad del aceite de *J. curcas*, varía en relación a las diferentes condiciones edafoclimáticas en las que la planta crece en el estado de Veracruz

4. Marco Teórico

La demanda de cultivos de segunda generación para la producción de bioenergéticos ha provocado que se inicien numerosas investigaciones en varias especies vegetales, como piñón, higuera, sorgo y pastos (Bhuiya *et al.*, 2016). Esto con la finalidad de generar información que permita llenar el vacío de conocimiento que existe y con ello determinar su factibilidad de aprovechamiento en la creciente industria de los biocombustibles.

Para el estudio de *J. curcas*, difícilmente podrá centrarse la investigación únicamente en un enfoque reduccionista positivista, ya que al ser una planta que hasta hace poco había pasado desapercibida, el mayor conocimiento sobre ella está en manos de sus propietarios rurales.

La Teoría General de Sistemas es un marco teórico unificador tanto para las ciencias naturales y sociales (Álvarez, 2003). En un sentido amplio, se presenta como una forma sistemática y científica de aproximación y representación de la realidad y, al mismo tiempo, como una orientación hacia una práctica estimulante para formas de trabajo transdisciplinarias (Arnold, 1998).

La aplicación del pensamiento positivista por sí solo, presenta grandes deficiencias irreconciliables con las necesidades de conocimiento actual. En sus inicios, el positivismo se caracterizaba por la selección arbitraria de la experiencia o la negación sistemática de ciertos aspectos de la experiencia, que no se basaran en el método científico. Para Augusto Comte, uno de los principales exponentes de esta corriente, el interés dominador del conocimiento positivista era el control y el dominio de la naturaleza, por lo que se debía poner énfasis en la predicción de los fenómenos (Rodríguez, 2011).

La explicación científica queda supeditada a la explicación causal, donde la causa es suficiente para explicar un efecto, teniendo como verdadero y pleno de sentido a todo aquello que fuera capaz de ser sometido a observación directa y a la comprobación mediante experimentos. Esta manera de asumir la ciencia condujo a segmentar la realidad, lo que generó una amplia gama de problemas que aún persisten (Morin y Vallejo-Gómez, 2001). Otra limitante muy cuestionable del positivismo, es la pretensión de utilizar el método de las ciencias naturales para explicar la sociedad y sus problemas (García, 2000). En contraposición al enfoque positivista, el enfoque sistémico no es reduccionista, sino que considera que todo fenómeno es parte de un fenómeno mayor, con el cual se establecen relaciones (expansionismo), la explicación del fenómeno se hará

definiendo el papel o rol que pueda jugar en ese sistema mayor donde la relación causa-efecto no sea determinista o mecanicista sino más bien probabilística.

El campo de la Teoría de Sistemas es casi universal, porque toda realidad conocida, desde el átomo hasta la galaxia, pasando por la molécula, la célula, el organismo y la sociedad, puede ser concebida como sistema, es decir, como asociación combinatoria de elementos diferentes (Alfonso, 2008).

El enfoque sistémico ha ido asumiendo múltiples adaptaciones por su continuo proceso de evolución teórica. Lo sistémico comenzó como una teoría con Bertalanffy en la década de 1940, pero ha evolucionado hasta nuestros días en ser un enfoque, una visión o una manera de pensar (García, 2007). Además, los sistemas biológicos, ecológicos y sociales, son sistemas complejos, que poseen una doble característica: 1) están integrados por elementos heterogéneos en permanente interacción y 2) son abiertos, es decir, están sometidos a interacciones con el medio circundante, los cuales pueden consistir en intercambios de materia y energía, en flujos de recursos de información o en la acción de ciertas políticas. Por tal motivo, cada vez se recurre más a este enfoque, ya que según Morin y Vallejo-Gómez (2001), los desarrollos propios a nuestra era planetaria, nos enfrentan cada vez más y de manera más ineluctable a los desafíos de la complejidad.

Si bien en el agroecosistema ocurren dinámicas que competen, tanto a la faceta de las ciencias naturales como las sociales, es de esperarse que el diseño de la investigación contemple ambos paradigmas. Sin embargo, en estos estudios de caracterización de especies a diversos niveles, la investigación supone la búsqueda de datos (análisis descriptivo) que permitan integrar a un cultivo como *J. curcas*, ubicada originalmente en diferentes agroecosistemas, a un nuevo agroecosistema (cultivos agroenergéticos), el paradigma dominante resulta ser el cuantitativo, sin excluir el cualitativo.

La investigación cuantitativa por definición es un proceso hipotético deductivo, objetivo, de tipo experimental, secuencial y probatorio con diseño estadístico. Se basa en criterios de validez externa, el cual está dado por los datos fiables, duros y repetibles. De esta manera, el conocimiento generado es de carácter generalizable y conduce a predicciones, explicaciones y entendimiento del fenómeno estudiado (Creswell, 2013).

Sin embargo, siguiendo el enfoque sistémico, cuya unidad de estudio es el agroecosistema, no puede dejarse de lado las interrelaciones de los diferentes componentes involucrados.

En la Figura 1 quedan plasmadas las interacciones y componentes del modelo de agroecosistema planteado, para resolver la pregunta de investigación.

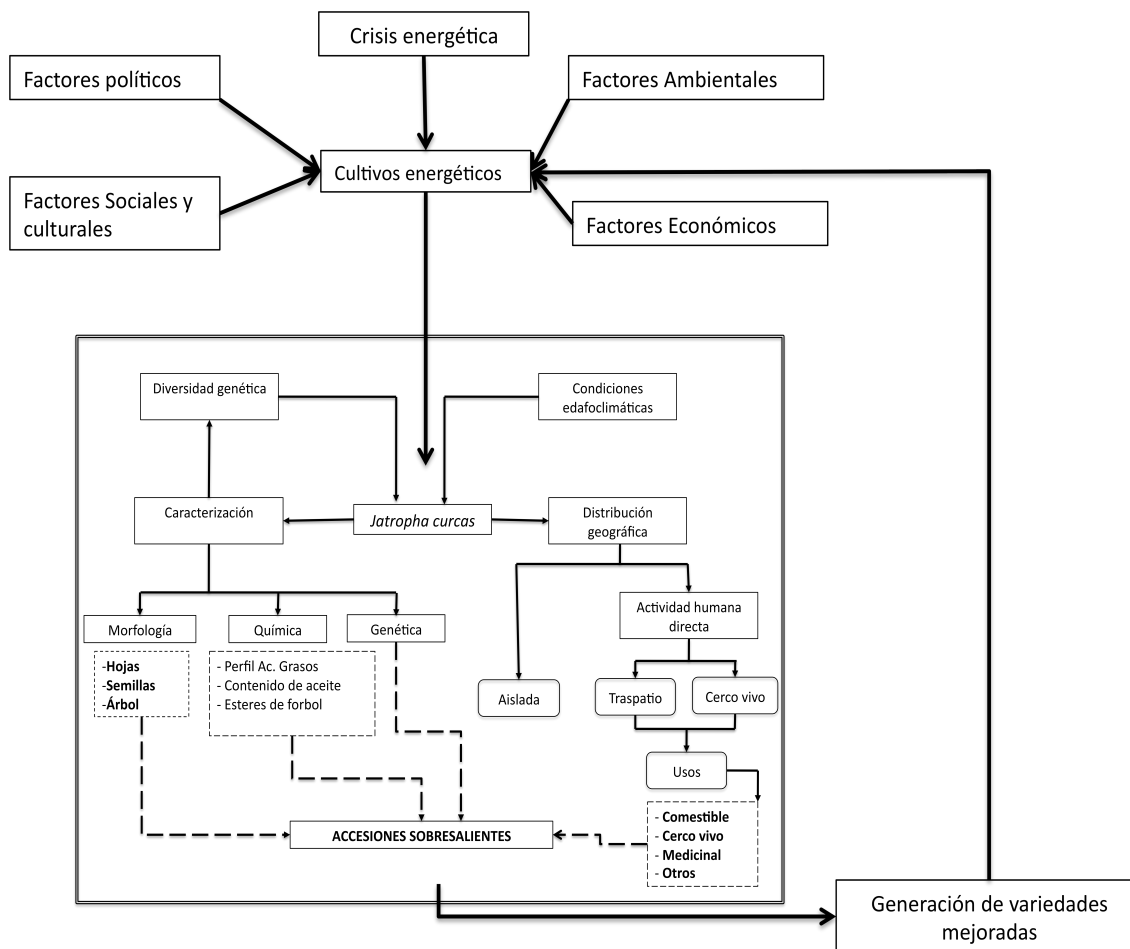


Figura 1. Representación esquemática del problema de investigación basado en el enfoque de sistemas

La producción de biocombustibles como una solución alternativa a la crisis energética debe de ser vista como un problema complejo, donde es necesario identificar y analizar las interrelaciones entre los componentes tecnológicos, económicos, ambientales sociales y políticos involucrados.

El caso particular de *J. curcas* no es la excepción, la integración de esta especie a un sistema productivo de materia prima, para su transformación a biodiesel, debe acompañarse con un diagnóstico multidimensional, para asegurar su viabilidad técnica, económica, energética y sobre todo sustentable.

La Figura 2 muestra un diagrama conceptual de lo que sería el cultivo de *J. curcas* como un bioenergético. La parte social estaría integrada por productores en lo individual o integrados en organizaciones.

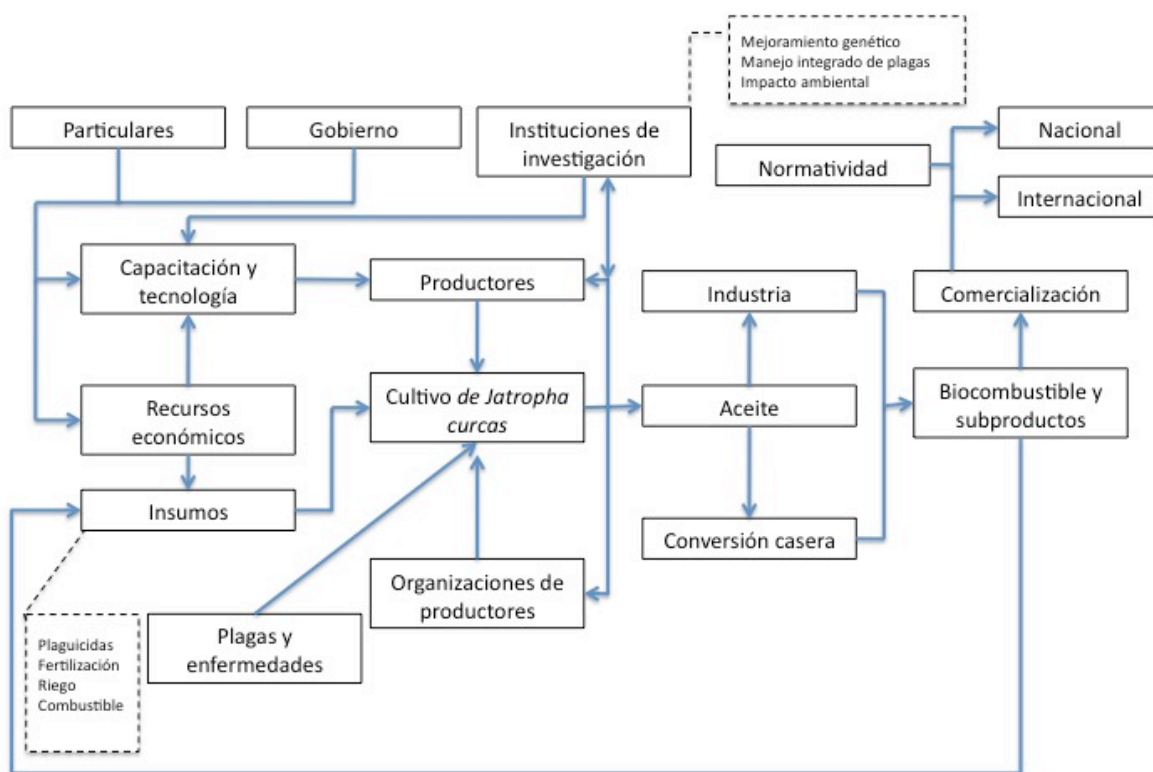


Figura 2. Esquema de un agroecosistema de *J. curcas* como bioenergético

J. curcas puede ubicarse como monocultivo o bien en asociación con otros cultivos, lo que estará determinado indudablemente por las capacidades económicas del productor y el propósito de la producción. Las características de las plantaciones en monocultivo estarán definidas por extensiones grandes de terreno y con un alto grado de tecnología y uso de insumos. Por otra parte, los cultivos asociados con *J. curcas* o en sistema agroforestal como cerco vivo, frutales,

leguminosas, gramíneas y pastos en plantaciones pequeñas donde el productor puede recibir recursos de otras actividades diferentes al cultivo energético.

La dimensión económica incide en los diferentes componentes del agroecosistema. Por una parte, todos los recursos para capitalizar al productor, cuyo origen pueden ser créditos otorgados por instituciones privadas, o bien, apoyos económicos derivados de programas gubernamentales o recursos propios del productor. La recuperación de capital estará determinada por la comercialización de algunos de los siguientes productos:

- Semilla. Para ajustar el valor de la semilla tendrían que considerarse diferentes parámetros: características morfológicas y de calidad intrínseca (tamaño, peso, relación cáscara/endospermo, contenido de aceite, toxicidad y calidad genética).
- Aceite. Supone un precio mayor al de la semilla, ya que involucra un proceso de extracción mecánico mediante prensas o con solventes (Willems *et al.*, 2008). Las características a considerar son: toxicidad, pureza y propiedades fisicoquímicas como: densidad, viscosidad, índice de yodo, estabilidad y calidad. De acuerdo con las características del aceite este puede ser comercializado a diferentes industrias: cosmética para la fabricación de jabones, farmacéutica debido a que compuestos como los ésteres de forbol tienen aplicación antiviral y antifúngica o bien, biocombustibles (biodiesel o turbosina).
- Abonos orgánicos. El cultivo de *J. curcas* hasta la producción de aceite, genera una gran cantidad de biomasa que fácilmente puede ser convertida en biofertilizantes, particularmente si su toxicidad es baja o nula (Sharma y Pandey, 2009).
- Biodiesel de fabricación casera. El proceso de la transesterificación del aceite a biodiesel es fácilmente adaptable a pequeña escala, el cual puede orientarse hacia el autoconsumo o bien ser vendido en mercados locales.
- Biodiesel grado industrial. Para poder cumplir normativas de carácter nacional e internacional, es necesario producir el biocombustible en instalaciones especiales, donde se pueda asegurar la homogeneidad y calidad del producto final (Lim y Lee, 2013).
- Torta residual. La torta residual que queda después de la extracción del aceite, tiene un alto valor proteínico, por lo que puede ser utilizada para la alimentación animal si su toxicidad es baja o nula. La utilización de germoplasma no tóxico, ahorra el proceso de destoxificación (Shukla *et al.*, 2015).

El papel de las instituciones de investigación es crucial para el sistema, ya que tienen la función de generar conocimientos y tecnología que permita su aprovechamiento sustentable, además de intervenir en la transferencia de tecnología, a través de capacitación técnica a los productores, en un proceso de retroalimentación continua en temas como mejoramiento genético, manejo integrado de plagas, impacto ambiental, cumplimiento de políticas ambientales, comercialización, y buenas prácticas de producción.

Finalmente, el agroecosistema deberá estar integrado por un componente ambiental. Este componente sería la planta y su relación con otros organismos presentes (cultivos asociados, otras plantas de *J. curcas*, plagas, etc.) entendiendo sus interacciones bióticas para reducir efectos negativos.

5. Marco de referencia

5.1 Biocombustibles

Las fuentes fósiles de energía a nivel nacional son limitadas, lo que significa que en el futuro tendrán que ser sustituidas por fuentes renovables de energía. Ante este panorama, habrá cada vez una dependencia menor de combustibles fósiles y un mayor empleo de energía solar, eólica y geotérmica como fuentes de energía (Aman *et al.*, 2015).

Los biocombustibles se presentan a menudo como una alternativa a la solución de problemas relacionados con una alta dependencia a los combustibles fósiles y al impacto ambiental de éstos en términos de la emisión de gases de efecto invernadero (GEI), contaminación urbana, lluvia ácida, entre otros (Winayanuwattikun *et al.*, 2008; Farinelli *et al.*, 2009). Esto debido a que el uso de biocombustibles puede reducir en alto porcentaje las emisiones de GEI (Vasudevan y Briggs, 2008).

Los biocombustibles tienen su principal aplicación en el sector del transporte, en forma de biocombustibles líquidos o gaseosos, siendo el bioetanol y el biodiesel los más usados (Achten *et al.*, 2008). Actualmente, los biocombustibles líquidos participan con el 2.5 % en este sector (Savaliya *et al.*, 2015). Su uso en ciudades con altos niveles de contaminación como la ciudad de México, podrían ser una alternativa.

5.1.1. Situación mundial de la producción y uso de los biocombustibles

La producción mundial de bioetanol para el año 2012 se estimó en 83.1 billones de litros, cayendo el 1.3 % con respecto al 2011. En Estados Unidos, la producción registró una caída del 4 % pero se mantuvo como principal productor con 50.4 billones de litros (61 %). Para el mismo año, la producción en Brasil se incrementó un 3 % alcanzando la cifra de 21.6 billones de litros (26 %). Actualmente la producción alcanza los 94 billones de litros (Sawin *et al.*, 2014).

En lo que respecta a la producción mundial de biodiesel, esta se ha mantenido creciendo pero a una tasa mucho más lenta a la observada hace algunos años, alcanzando una producción de 22.5 billones de litros para el 2012. Los Estados Unidos sobresalieron como el principal productor seguido por Argentina, Alemania, Brasil y Francia (Solomon *et al.*, 2015). Europa tiene el 41 % de la producción de biodiesel, liderado por Alemania con un estimado de 2.7 billones de litros.

Para el 2012, las energías renovables juntas proveyeron alrededor del 19 % de la energía mundial. De ellas, la mayor parte estuvo representada por la biomasa tradicional (principalmente leña) y sólo el 0.8% de la energía total fue abastecida por los biocombustibles (Sawin *et al.*, 2014). Lo que indica que el uso de biocombustibles es aún marginal y que aprovechar su potencial solo se logrará a través de la selección de materiales con potencial genético, innovación y mejores prácticas de producción.

El panorama global de los biocombustibles para los próximos años dependerá de varios factores interrelacionados, como el precio futuro del petróleo, la disponibilidad y precio de las materias primas, la continuidad de políticas públicas que alienten el sector, los cambios tecnológicos que podrían reducir el costo de biocombustibles de segunda generación, la competencia de los combustibles fósiles no convencionales (carbón, gas y esquistos bituminosos) y la necesidad de reducir las emisiones de GEI (Savaliya *et al.*, 2015). Por el lado de la demanda, en varios países existe un importante y progresivo impulso derivado de regulaciones cuya vigencia arrancó desde el año 2007.

La producción y uso de los biocombustibles es un tema de gran importancia en muchos países, por lo que se han diseñado políticas energéticas encaminadas por una parte a promover prácticas comerciales y su uso. Muestra de ello es que durante el periodo 2012 al 2013, 49 países realizaron reglamentaciones de alcance nacional. Las principales políticas promovidas incluyeron: subsidios a la producción de biocombustibles, obligatoriedad en el uso de mezclas con biocombustibles e incentivos en impuestos un aspecto no considerado en la ley de producción de biocombustibles en México (Urías *et al.*, 2014).

Para el año 2012, Sudáfrica se agregó a los países que utilizan mezclas de biocombustibles en combustibles convencionales, introduciendo la mezcla E10 (adición de un 10 % de bioetanol). En 2013, los gobiernos de Turquía y Zimbawe aprobaron la utilización de mezclas E2 y E5, respectivamente. Adicionalmente, en una provincia canadiense, se incluyó la mezcla B2 (adición de un 2 % de biodiesel), complementando la ya existente mezcla E8.5 (Sawin *et al.*, 2014).

En lo que respecta a Estados Unidos y Europa, se han mantenido sin cambios la adición de mezclas de biocombustibles. Las mezclas de biocombustibles existentes en los Estados Unidos varían de acuerdo con los estados, siendo para bioetanol de E2 hasta E10 y para biodiesel de B2 hasta B20 (McPhail y Babcock, 2012).

Por su parte Brasil, un país pionero en el uso de biocombustibles a nivel internacional, mantiene mezclas de bioetanol E18 hasta E25 y B5 para biodiesel. El uso de mezclas se remonta a los años 30's, aunque no fue hasta el año de 1975 cuando se creó el Programa Brasileño de Alcohol (PROALCOOL), que la gasolina empezó a ser remplazada en una escala significativa en todos los vehículos de pasajeros (Walter *et al.*, 2008).

5.1.2. Situación del uso de los biocombustibles en México

En México, el 88.5 % de la energía utilizada proviene del petróleo y el gas natural, mientras que el 6.9 % de las energías renovables. A su vez, las energías renovables se componen del 1.7 % donde se engloban la geotérmica, solar y eólica; 1.3 % de la hidrotérmica y un 3.9 % derivada de la biomasa (Montero *et al.*, 2015).

Desde el año 2012 se está llevando a cabo un plan piloto para adicionar un 6 % de bioetanol a las gasolinas en las tres zonas metropolitanas principales del país (D. F., Monterrey y Guadalajara), lo que resultará en una demanda de 986 millones de litros. Se tiene pensado que este programa se extienda hasta abarcar a toda la gasolina producida en México.

Adicionalmente, la incorporación de bioetanol producido en México a las gasolinas permitirá disminuir las importaciones del oxigenante Metil Terbutil Éter (MTBE). Donde, si todas las gasolinas producidas en México emplearan un 10% de bioetanol, se podría tener un ahorro de 2 mil millones de dólares al año en importaciones de MTBE (Rendon-Sagardi *et al.*, 2014).

En cuanto al biodiesel, PEMEX ha determinado adicionar el 0.35% de biodiesel a su producción de diésel UBA (Ultra Bajo Azufre), sólo en la medida en la que el combustible de origen renovable esté disponible. Según estimaciones de la Secretaría de Energía, la cantidad de biodiesel que PEMEX podría emplear en un año sería de hasta 8.7 millones de litros (Montero *et al.*, 2015).

5.2. Fuentes agrícolas de biodiesel

Se han identificado más de 350 especies oleaginosas factibles de ser utilizadas para la producción de biodiesel (Demirbas, 2007). Sin embargo, la utilización de especies comestibles como la soya (*Glicine max*), canola (*Brassica napus*), girasol (*Helianthus annus*), cártamo (*Carthamus tintorius*), jojoba (*Simmondsia chinensis*) y coco (*Cocos nucifera*), es poco factible. Esto debido a los impactos potenciales que el cultivo de energéticos pudiera tener sobre la

seguridad alimentaria, provocando un incremento en los precios de los alimentos y eventualmente hambrunas en países en desarrollo (Bhuiya *et al.*, 2016).

En este sentido, se ha intensificado la búsqueda de especies productoras de aceite no comestibles (segunda generación), que sirvan de materia prima para la producción de biodiesel.

5.2.1. *Jatropha curcas* L.

5.2.1.1. Descripción botánica

J. curcas también conocida en México como “piñón”, piñoncillo o pistache mexicano, puede ser considerado, comúnmente como un árbol pequeño o un arbusto, pertenece a la familia Euphorbiaceae (Cuadro 1) y se ha visto que llega a alcanzar entre cinco y siete metros de altura, presenta una madera suave y una expectativa de vida de alrededor de 50 años (Achten *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Descripción taxonómica de *Jatropha curcas*

| Clasificación | Descripción |
|---------------|-----------------|
| Reino: | Plantae |
| Subreino: | Tracheobionta |
| División: | Magnoliophyta |
| Clase: | Magnoliopsida |
| Subclase: | Rosidae |
| Orden: | Euphorbiales |
| Familia: | Euphorbiaceae |
| Subfamilia | Crotonoidae |
| Género | <i>Jatropha</i> |
| Especie | <i>curcas</i> |

Fuente Divakara *et al.* (2010)

Las hojas de las planta son suaves, con presencia de cuatro a seis lóbulos, pecíolos largos y se colocan de forma alterna a subalterno opuesto con una filotaxia espiral. Se caen durante el otoño-invierno.

Normalmente la floración ocurre en el periodo de lluvias, aunque en regiones con humedad durante todo el año o con riego, puede ocurrir en varias ocasiones. Las inflorescencias se forman en el axial de las hojas de las ramas. Cada inflorescencia puede producir de una a 20 flores

femeninas y de 20 a 220 flores masculinas. Ambas abren por la mañana de forma sincronizada (Bressan *et al.*, 2013).

Después de la polinización, las inflorescencias forman un ramillete conteniendo 10 frutos o más. Los frutos son cápsulas drupáceas, ovoides, de color verde que cambian a un café oscuro, pasando por una coloración amarilla en la maduración. Cada fruto puede contener de una a cuatro semillas que tienen una coloración negra en la madurez (Makkar *et al.*, 1998a).

J. curcas presenta una raíz pivotante, lo que le confiere un buen asidero al suelo, así como también la capacidad de soportar periodos de sequía prolongados.

5.2.1.2 Requerimientos y manejo del cultivo

J. curcas crece en diferentes condiciones climáticas, aunque se desarrolla mejor en los trópicos, donde las temperaturas medias están entre los 20 °C y 28 °C y una precipitación anual superior a los 600 mm (Trabuco *et al.*, 2010). Se ha descrito a *J. curcas* como una planta tolerante a la sequía (Abou Kheira y Atta, 2009; Everson *et al.*, 2013). Sin embargo, para asegurar la producción de semilla estos autores señalan, que los requerimientos de agua para el cultivo deben de estar entre los 600 y los 1500 mm de lluvia, con necesidad de riegos de auxilio en la temporada seca.

Los rendimientos en la producción de semilla varían en un amplio rango (0.5 a 12 t año⁻¹ ha⁻¹), lo cual puede deberse a la falta de información sobre las prácticas culturales como podas, riego, fertilización, densidades de plantación y control de plagas, lo cual depende del tipo de suelo, fertilización y condiciones de riego. El arbusto tiene un periodo productivo de más de 40 años. Además, que desde el primer año (9-10 meses) tiene semillas. Un promedio anual de producción de semilla alrededor de 5 ton ha⁻¹ puede esperarse en excelentes tierras y precipitaciones de 900-1200 mm (Achten *et al.*, 2008).

J. curcas se propaga por semilla o de forma vegetativa por estaca, aunque en esta última de cultivo no desarrolla la raíz pivotante. Es recomendable que la propagación por semilla se realice al principio de la temporada de las lluvias, para obtener un desarrollo adecuado de la raíz. El mejor rendimiento de semillas se obtiene cosechando los frutos en el estado maduro (color amarillo oscuro). La madurez se alcanza 90 días después de la floración, pero esta tiene la característica de ser muy heterogénea.

5.1.2.3 Principales Usos

El nombre del género *Jatropha* deriva de la palabra griega *jatrós* (doctor) y *trophé* (alimento) que implica un uso medicinal. Alrededor del mundo se han descrito una diversidad de usos, para las diferentes partes de la planta.

Por la facilidad de propagación vegetativa de la planta y la no preferencia de consumo por el ganado, es muy común su empleo como cerco vivo (Reyes y Rosado, 2000).

En la medicina, las semillas y el aceite se han utilizado como antihelmíntico y agente purgante (Kumar y Sharma, 2008); el látex como cicatrizante de heridas y herpes; de las hojas se han aislado sustancias con propiedades antiinflamatorias (Gübitz *et al.*, 1999).

No obstante que en semillas de *J. curcas* se han encontrado sustancias altamente tóxicas, como los ésteres de forbol, en las regiones del Totonacapan y Maya en los estados de Veracruz y Quintana Roo en México, se ha documentado el uso alimenticio de las semillas (Makkar *et al.*, 1998b).

La presencia de compuestos tóxicos en las semillas resta valor al aceite, ya que compuestos como los ésteres de forbol tienen una elevada toxicidad, por su carácter de promotor de tumores, lo cual, por un lado pone en riesgo al personal que pudiera intervenir en el procesamiento y transformación de la materia prima (frutos, semillas, aceite y subproductos), así como también involucra un proceso de destoxificación con implicaciones económicas (Shukla *et al.*, 2015).

Otros compuestos que se han encontrado y que presentan un carácter tóxico o antimetabolito son los inhibidores de la tripsina, fitatos y saponinas (Martínez-Herrera *et al.*, 2006).

Las semillas de *J. curcas* contienen una gran cantidad de aceite (≈ 40 %), por lo que su cultivo resulta interesante, dado el potencial que tiene para servir en muchas aplicaciones industriales.

La primera aplicación comercial de *J. curcas* fue reportada en Lisboa, donde el aceite importado de Cabo Verde era usado para la producción de jabón y como combustible para lámparas (Gübitz *et al.*, 1999). Sin embargo, actualmente la transesterificación del aceite para la producción de biodiesel esta ganando más importancia (Abdulla *et al.*, 2011).

El aceite de *J. curcas* esta compuesto por un 24.6 % de proteína cruda, 47.25 % de grasas y un contenido de humedad del 5.54 % (Akintayo, 2004). Los principales ácidos grasos saturados encontrados son el ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0) e insaturados se tienen al oleico (18:1) y linoleico (18:2). La relación entre el ácido oleico y linoleico confieren al aceite excelentes propiedades para su conversión a biodiesel.

El aceite tiene otras propiedades de gran valor como, baja acidez, una mejor estabilidad para la oxidación en comparación con el aceite de soya, menor viscosidad que el aceite de ricino, mejor comportamiento en frío comparado con el aceite de palma y menos costos de producción comparado con el etanol de maíz (Abdulla *et al.*, 2011).

El biodiesel es una mezcla de metil o etil ésteres de ácidos grasos, derivados de la transesterificación de triacilgliceroles presentes en los aceites vegetales. La conversión del aceite de *J. curcas* en biodiesel puede realizarse principalmente de forma química (Achten *et al.*, 2008) o por catálisis enzimática (Winayanuwattikun *et al.*, 2008).

La reacción química para formar el biodiesel requiere de una mol de triglicérido y tres moles de alcohol (metano) para formar tres moles de ésteres metílicos y una molécula de glicerol, utilizando catalizadores ácidos o básicos (Boonmee *et al.*, 2010).

5.2.1.4 Diversidad genética

El conocimiento del grado de diversidad genética de *J. curcas* en poblaciones nativas es importante para desarrollar programas de mejoramiento genético. En la actualidad, aún no se cuenta con variedades que tengan características deseables y que puedan desarrollarse en condiciones de cultivo específicas (Kumar *et al.*, 2015).

Los objetivos para un mejoramiento genético del cultivo incluyen: incrementos en el número de flores femeninas, alto rendimiento de semilla con alto rendimiento de aceite, maduración temprana, resistencia a plagas y enfermedades, resistencia a la sequía, reducción en el tamaño de la planta, y una mayor ramificación de las ramas (Divakara *et al.*, 2010). El estudio de la diversidad genética puede realizarse usando marcadores morfológicos o moleculares.

a) Caracterización morfológica

En la búsqueda de diversidad mediante descriptores morfológicos se distinguen normalmente dos aspectos: la caracterización y la evaluación. Cuando se habla de caracterizar, generalmente se hace referencia a la caracterización primaria de los materiales y por tanto, se enfatiza en la descripción morfológica de características cualitativas que pueden considerarse invariables o no afectados por el ambiente como el color de la flor y la forma de la semilla (Tripathi *et al.*, 2013). La evaluación, que es un tipo de caracterización secundaria, persigue fundamentalmente determinar caracteres de tipo cuantitativo y de interés agronómico que normalmente se ven

influenciados por las condiciones ambientales como la precocidad, el contenido en proteína y la resistencia a plagas y enfermedades.

En el caso particular de *J. curcas*, se han utilizado descriptores cualitativos como el color de las hojas, la pigmentación del peciolo y el inicio de la floración, entre otros. Sin embargo, sobresalen por su número e importancia práctica los de origen cuantitativo, tales como: días a la emergencia, altura de la planta, número de ramas, número de frutos por planta, número de racimos por rama, número de frutos por racimo y por árbol, el tamaño de las semillas y su porcentaje de aceite, rendimiento de semilla por planta y por unidad de área, y la incidencia de plagas y de enfermedades (Machado y Brunet, 2014).

Una de las grandes debilidades de esta técnica, es que las características de mayor valor para la utilización de *J. curcas* como un agroenergético, como peso de la semilla, contenido de proteína y contenido de aceite están fuertemente influenciadas por el ambiente (Ovando *et al.*, 2011a).

b) Marcadores moleculares

El empleo de marcadores moleculares ha proveído de poderosas herramientas para la detección de diferencias genéticas entre los individuos. Se detectan a través de una serie de métodos o técnicas que exploran la variación de los organismos al nivel de las proteínas o del ADN a nivel de un locus o varios loci en particular.

La técnica de PCR, o reacción en cadena de la polimerasa es la tecnología más utilizada. Se basa en la amplificación de fragmentos de ADN a partir de secuencias de nucleótidos denominadas “cebador” (primer), que son capaces de reconocer una secuencia blanco para la cual es complementaria. Dentro de esta metodología se encuentran los marcadores llamados RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) y DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) entre otros (González, 1998).

El uso de marcadores moleculares de ADN, es una herramienta que ha sido exitosamente utilizada en muchas especies de plantas de importancia comercial en la búsqueda de diversidad genética (Varshney *et al.*, 2005).

La mayoría de los estudios realizados en *J. curcas* mediante marcadores moleculares, han buscado estudiar su variabilidad con miras a seleccionar materiales candidatos a mejoramiento genético. En estudios de diversidad genética con accesiones colectadas en diferentes partes del mundo incluidas accesiones de México, la variabilidad detectada se ha atribuido a la presencia de

las accesiones mexicanas, las cuales generalmente han sido no tóxicas (Na-ek *et al.*, 2011; Trebbi *et al.*, 2015). La planta posiblemente fue dispersada por comerciantes Portugueses a Tailandia y otros países asiáticos, hace más de dos siglos (Sun *et al.*, 2008; Tatikonda *et al.*, 2009; Sirithunya y Ukoskit, 2010).

La obtención de nuevas secuencias de microsatélites para *J. curcas* (Pamidimarri *et al.*, 2009), así como la utilización de microsatélites de especies relacionadas, como *Manihot esculena* (Wen *et al.*, 2010), ha hecho posible revelar la diversidad genética entre accesiones recolectadas en diferentes sitios geográficos y dilucidar relaciones filogenéticas entre algunas especies del género *Jatropha* (Sudheer Pamidimarri *et al.*, 2009) y además, han resultado útiles para diferenciar entre accesiones tóxicas y no tóxicas.

Sin embargo, en la mayoría de los estudios realizados con microsatélites, al igual que con el empleo de otros marcadores moleculares de ADN, se ha reportado una baja diversidad genética en accesiones de *J. curcas* provenientes de un mismo país y sólo se ha detectado cierta variabilidad genética cuando se han incluido accesiones procedentes de otros países (Ovando et al, 2011b)

Respecto a México, la información disponible sobre la diversidad genética de *J. curcas* es limitada. En un estudio realizado con 88 accesiones de *J. curcas* recolectadas en Chiapas, mediante marcadores AFLP, se reportaron niveles altos de polimorfismo (90%) y el análisis de las relaciones genéticas AMOVA y el índice de diversidad (DI=60%) indicaron la existencia de una amplia base genética en el germoplasma analizado (Pecina-Quintero *et al.*, 2011).

6. Literatura citada

- Abdulla, R., E. S. Chan y P. Ravindra. 2011. Biodiesel production from *Jatropha curcas*: A critical review. *Critical Reviews in Biotechnology* 31: 53-64.
- Abou Kheira, A. A. y N. M. M. Atta. 2009. Response of *Jatropha curcas* L. to water deficits: Yield, water use efficiency and oilseed characteristics. *Biomass and Bioenergy* 33: 1343-1350.
- Achten, W. M. J., L. Verchot, Y. J. Franken, E. Mathijs, V. P. Singh, R. Aerts y B. Muys. 2008. *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass and Bioenergy* 32: 1063-1084.
- Akintayo, E. 2004. Characteristics and composition of *Parkia biglobbosa* and *Jatropha curcas* oils and cakes. *Bioresource Technology* 92: 307-310.

- Al-Amir, J. y B. Abu-Hijleh. 2013. Strategies and policies from promoting the use of renewable energy resource in the UAE. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 26: 660-667.
- Alfonso, P. B. 2008. Fundamentos teóricos del pensamiento complejo de Edgar Morin. *Revista Electrónica Educare* 12: 95-113.
- Álvarez, E. G. A. 2003. La teoría de Niklas Luhmann. *Convergencia Revista de Ciencias Sociales*.
- Aman, M., K. Solangi, M. Hossain, A. Badarudin, G. Jasmon, H. Mokhlis, A. Bakar y S. Kazi. 2015. A review of safety, health and environmental (SHE) issues of solar energy system. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 41: 1190-1204.
- Arnold, M. 1998. Introducción a los conceptos básicos de la Teoría General de Sistemas. Cinta de Moebio. *Revista de Epistemología de Ciencias Sociales*.
- Basha, S. D. y M. Sujatha. 2007. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by rapd and issr markers and development of population-specific scar markers. *Euphytica* 156: 375-386.
- Berchmans, H. J. y S. Hirata. 2008. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. *Bioresource Technology* 99: 1716-1721.
- Bhuiya, M., M. Rasul, M. Khan, N. Ashwath y A. Azad. 2016. Prospects of 2nd generation biodiesel as a sustainable fuel—part: 1 selection of feedstocks, oil extraction techniques and conversion technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 55: 1109-1128.
- Bhuiya, M., M. Rasul, M. M. K. Khan, N. Ashwath, A. K. Azad y M. Hazrat. 2014. Second generation biodiesel: Potential alternative to-edible oil-derived biodiesel. *Energy Procedia* 61: 1969-1972.
- Boonmee, K., S. Chuntranuluck, V. Punsuvon y P. Silayoi. 2010. Optimization of biodiesel production from *Jatropha* oil (*Jatropha curcas* L.) using response surface methodology. *Kasetsart Journal* 44: 290-299.
- Bressan, E. A., A. M. Sebbenn, R. R. Ferreira, T. S. G. Lee y A. Figueira. 2013. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) exhibits a mixed mating system, high correlated mating and apomixis. *Tree Genetics & Genomes* 9: 1089-1097.

- Contreras-Hinojosa, J., V. Volke-Haller, J. Oropeza-Mota, C. Rodríguez-Franco y A. Martínez-Garza. 2003. Disponibilidad y uso de la leña en el municipio de Yanhuitlan, Oaxaca. *Terra Latinoamericana* 21: 437-445.
- Creswell, J. W. 2013. *Research design: Qualitative, quantitative, and mixed methods approaches*. Sage publications.
- Cruzan, M. B. 1998. Genetic markers in plant evolutionary ecology. *Ecology* 79: 400-412.
- Demirbas, A. 2007. Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy* 35: 4661-4670.
- Divakara, B., H. Upadhyaya, S. Wani y C. L. Gowda. 2010. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. *Applied Energy* 87: 732-742.
- Estrada, C. y J. Islas. 2010. *Energías alternas: Propuesta de investigación y desarrollo tecnológico para México*. Academia Mexicana de Ciencias, primera edición, México.
- Everson, C., M. Mengistu y M. Gush. 2013. A field assessment of the agronomic performance and water use of *Jatropha curcas* in South Africa. *Biomass and Bioenergy* 59: 59-69.
- Farinelli, B., C. A. Carter, C.-Y. C. Lin y D. A. Sumner. 2009. Import demand for brazilian ethanol: A cross-country analysis. *Journal of Cleaner Production* 17: S9-S17.
- García, R. 2000. *El conocimiento en construcción: De las formulaciones de Jean Piaget a la Teoría de Sistemas Complejos*. Gedisa.
- García, R. 2007. *Sistemas complejos, conceptos, método y fundamentación epistemológica de la investigación interdisciplinaria*.
- González, D. 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Revista Mexicana de Micología* 14: 1-21.
- Gübitz, G. M., M. Mittelbach y M. Trabi. 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technology* 67: 73-82.
- Herrera, J. M., A. L. M. Ayala, H. Makkar, G. Francis y K. Becker. 2010. Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. From Mexico. *European Journal of Scientific Research* 39: 396-407.

- Kumar, A. y S. Sharma. 2008. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Industrial Crops and Products* 28: 1-10.
- Kumar, N., A. S. Singh, S. Kumari y M. Reddy. 2015. Biotechnological approaches for the genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A biodiesel plant. *Industrial Crops and Products* 76: 817-828.
- Lim, S. y K.-T. Lee. 2013. Influences of different co-solvents in simultaneous supercritical extraction and transesterification of *Jatropha curcas* L. seeds for the production of biodiesel. *Chemical Engineering Journal* 221: 436-445.
- Luijten, C. C. M. y E. Kerkhof. 2011. *Jatropha* oil and biogas in a dual fuel CI engine for rural electrification. *Energy Conversion and Management* 52: 1426-1438.
- Machado, R. y J. Brunet. 2014. Colecta y caracterización de procedencias de *Jatropha curcas* L. *Pastos y Forrajes* 37: 145-150.
- Maes, W. H., A. Trabucco, W. M. J. Achten y B. Muys. 2009. Climatic growing conditions of *Jatropha curcas* L. *Biomass and Bioenergy* 33: 1481-1485.
- Makkar, H. y K. Becker. 1997. Potential of *J. Curcas* seed meal as a protein supplement to livestock feed; constraints to its utilization and possible strategies to overcome constraints. *DBV Graz*: 190 - 205.
- Makkar, H. P. S., A. O. Aderibigbe y K. Becker. 1998a. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. *Food Chemistry* 62: 207-215.
- Makkar, H. P. S., K. Becker y B. Schmook. 1998b. Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. *Plant Foods for Human Nutrition* 52: 31-36.
- Martínez-Herrera, J., P. Siddhuraju, G. Francis, G. Dávila-Ortíz y K. Becker. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. From Mexico. *Food Chemistry* 96: 80-89.
- McPhail, L. L. y B. A. Babcock. 2012. Impact of US biofuel policy on US corn and gasoline price variability. *Energy* 37: 505-513.

- Montero, G., M. Stoytcheva, M. Coronado, C. García, J. Cerezo, L. Toscano, A. M. Vázquez y J. A. León. 2015. An overview of biodiesel production in Mexico. Tomado de: <http://www.intechopen.com/books/biofuels-status-and-perspective/an-overview-of-biodiesel-production-in-mexico>. Fecha de consulta: 16 de febrero de 2016
- Morin, E. y M. Vallejo-Gómez. 2001. Los siete saberes necesarios para la educación del futuro. Paidós Barcelona.
- Na-ek, Y., A. Wongkaew, T. Phumichai, N. Kongsiri, R. Kaveeta, T. reewongchai y C. Phumichai. 2011. Genetic diversity of physic nut (*Jatropha curcas* L.) revealed by SSR markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 14: 105-110.
- Navarro-Pineda, F. S., S. A. Baz-Rodríguez, R. Handler y J. C. Sacramento-Rivero. 2016. Advances on the processing of *Jatropha curcas* towards a whole-crop biorefinery. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 54: 247-269.
- Ovando-Medina, I., F. Espinosa-García, J. Núñez-Farfán y M. Salvador-Figueroa. 2011a. State of the art of genetic diversity research in *Jatropha curcas*. *Sci Res Essays* 6: 1709-1719.
- Ovando-Medina, I., A. Sánchez-Gutiérrez, L. Adriano-Anaya, F. Espinosa-García, J. Núñez-Farfán y M. Salvador-Figueroa. 2011b. Genetic diversity in *Jatropha curcas* populations in the state of Chiapas, Mexico. *Diversity* 3: 641-659.
- Pamidimarri, D. V. N. S., R. Sinha, P. Kothari y M. P. Reddy. 2009. Isolation of novel microsatellites from *Jatropha curcas* L. and their cross-species amplification. *Molecular Ecology Resources* 9: 431-433.
- Pecina-Quintero, V., J. L. Anaya-López, A. Z. Colmenero, N. M. García, C. A. Núñez Colín, J. L. Solís Bonilla, M. R. Aguilar-Rangel, H. R. Gill Langarica y D. J. Méjia Bustamante. 2011. Molecular characterisation of *Jatropha curcas* L. Genetic resources from Chiapas, México through AFLP markers. *Biomass and Bioenergy* 35: 1897-1905.
- Pousa, G. P., A. L. Santos y P. A. Suarez. 2007. History and policy of biodiesel in Brazil. *Energy Policy* 35: 5393-5398.
- Rendon-Sagardi, M. A., C. Sanchez-Ramirez, G. Cortes-Robles, G. Alor-Hernandez y M. G. Cedillo-Campos. 2014. Dynamic analysis of feasibility in ethanol supply chain for biofuel production in Mexico. *Applied Energy* 123: 358-367.
- Reyes, S. A. y I. A. Rosado. 2000. Plantas utilizadas como cercas vivas en el estado de Veracruz. *Madera y Bosques* 6: 55-71.

- Rodríguez-Acosta, M., K. Vega-Flores, V. H. De Gante-Cabrera y J. Jiménez-Ramírez. 2009. Distribución del genero *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) en el estado de Puebla, México. *Polibotánica*: 37-48.
- Rodríguez, J. M. 2011. Métodos de investigación cualitativa. *Revista de Investigación Silogismo* 1:1-43.
- Savaliya, M. L., B. D. Dhorajiya y B. Z. Dholakiya. 2015. Recent advancement in production of liquid biofuels from renewable resources: A review. *Research on Chemical Intermediates* 41: 475-509.
- Sawin, J. L., F. Sverrisson, K. Chawla, C. Lins, R. Adib, M. Hullin, S. Leitner, S. Mazzaccaro, H. Murdock y L. E. Williamson. 2014. *Renewables 2014. Global status report 2014*.
- Sharma, D. y A. Pandey. 2009. Use of *Jatropha curcas* hull biomass for bioactive compost production. *Biomass and Bioenergy* 33: 159-162.
- Shen, J.-l., X.-n. Jia, H.-q. Ni, P.-g. Sun, S.-h. Niu y X.-y. Chen. 2010. AFLP analysis of genetic diversity of *Jatropha curcas* grown in Hainan, China. *Trees* 24: 455-462.
- Shukla, A., S. P. Singh y S. Tiwari. 2015. Transformation of toxic potential of *Jatropha curcas* (ratanjyot) into protein source: A mini-review. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 2: 89-94.
- Sirithunya, P. y K. Ukoskit. 2010. Population genetic structure and genetic diversity of *Jatropha curcas* germplasm as investigated by 5'-anchored simple sequence repeat primers. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 13: 147-153.
- Solomon, B. D., A. Banerjee, A. Acevedo, K. E. Halvorsen y A. Eastmond. 2015. Policies for the sustainable development of biofuels in the pan american region: A review and synthesis of five countries. *Environmental management* 56: 1276-1294.
- Steinmann, V. W. 2002. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*: 61-93.
- Sudheer Pamidimarri, D. V. N., B. Chattopadhyay y M. Reddy. 2009. Genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* based on nuclear ribosomal DNA its sequence. *Molecular Biology Reports* 36: 1929-1935.

- Sun, Q.-B., L.-F. Li, Y. Li, G.-J. Wu y X.-J. Ge. 2008. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. *Crop Science* 48: 1865-1871.
- Tatikonda, L., S. Wani y S. Kannan. 2009. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L. A biofuel plant. *Plant Science* 176: 505 - 513.
- Trabucco, A., W. M. J. Achten, C. Bowe, R. A. F. Aerts, J. V. Orshoven, L. Norgrove y B. Muys. 2010. Global mapping of *Jatropha curcas* yield based on response of fitness to present and future climate. *GCB Bioenergy* 2: 139-151.
- Trebbi, D., E. G. Papazoglou, E. Saadaoui, M. Vischi, M. Baldini, P. Stevanato, E. Cettul, A. P. Sanzone, L. Gualdi y A. Fabbri. 2015. Assessment of genetic diversity in different accessions of *Jatropha curcas*. *Industrial Crops and Products* 75: 35-39.
- Tripathi, A., D. K. Mishra y J. K. Shukla. 2013. Genetic variability, heritability and genetic advance of growth and yield components of *Jatropha* (*Jatropha curcas* Linn.) genotypes. *Trees* 27: 1049-1060.
- Urias, R. E. U., E. M. Ramos y J. M. M. Guerrero. 2014. Los biocombustibles en América Latina. Actualidad y debates según las experiencias en Brasil, Argentina y México. Observatorio de la Economía Latinoamericana.
- Valdes-Rodriguez, O. A., O. Sanchez-Sanchez, A. Perez-Vazquez y J. Caplan. 2013. The mexican non-toxic *Jatropha curcas* L., food resource or biofuel? *Ethnobotany Research and Applications* 11: 001-007.
- Varshney, R. K., A. Graner y M. E. Sorrells. 2005. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends in biotechnology* 23: 48-55.
- Vasudevan, P. T. y M. Briggs. 2008. Biodiesel production—current state of the art and challenges. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35: 421-430.
- Walter, A., F. Rosillo-Calle, P. Dolzan, E. Piacente y K. Borges da Cunha. 2008. Perspectives on fuel ethanol consumption and trade. *Biomass and Bioenergy* 32: 730-748.
- Wen, M., H. Wang, Z. Xia, M. Zou, C. Lu y W. Wang. 2010. Development of EST-SSR and genomic-ssr markers to assess genetic diversity in *Jatropha curcas* L. *BMC Research Notes* 3: 42.

Willems, P., N. Kuipers y A. De Haan. 2008. Hydraulic pressing of oilseeds: Experimental determination and modeling of yield and pressing rates. *Journal of Food Engineering* 89: 8-16.

Winayanuwattikun, P., C. Kaewpiboon, K. Piriyananon, S. Tantong, W. Thakernkarnkit, W. Chulalaksananukul y T. Yongvanich. 2008. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. *Biomass and Bioenergy* 32: 1279-1286.

CAPITULO I. AISLAMIENTO DE ADN Y RFLP's EN ACCESIONES DE *Jatropha curcas* L. RECOLECTADAS EN LA REGIÓN DEL SOTAVENTO EN VERACRUZ

Resumen

El conocimiento de la diversidad genética de *Jatropha curcas* L. en el estado de Veracruz es muy importante, dada la relevancia que está teniendo esta planta como fuente de materia prima para biocombustibles. En este trabajo se evaluó la diversidad genética por medio de marcadores RFLP's a cuatro accesiones de piñón colectadas en diferentes sitios geográficos del centro del estado, se probaron cuatro enzimas de restricción y dos métodos de extracción de ADN. El método más eficiente para la extracción de ADN resultó ser el kit comercial DNeasy. De las cuatro muestras analizadas por RFLP's ninguna mostró variabilidad genética, ya que ninguna de las enzimas encontró sitio de corte en el gen amplificado. Se requiere realizar estudios de este tipo con nuevos marcadores y que incluyan a un mayor número de accesiones que se encuentren geográficamente más distantes.

Palabras Clave: Diversidad genética, DNeasy, *Jatropha curcas*, RFLP's

DNA ISOLATION AND RFLP 's, OF *Jatropha curcas* L. ACCESSIONS RE COLLECTED FROM SOTAVENTO REGION, VERACRUZ

Abstract

To gain knowledge of the genetic diversity of *Jatropha curcas* L. available in the state of Veracruz is important given the significance that this plant has as a source of feedstock for biofuels. This study assessed the genetic diversity by RFLP's markers on four piñon accessions collected in different geographical locations in central Veracruz, four restriction enzymes and two methods of DNA extraction were tested. The most efficient method of DNA extraction was proved for the commercial kit DNeasy. None of the four samples analyzed by RFLP's showed genetic variability, as no enzyme cleavage site found in the gene amplified. Therefore, it is required, to perform these studies with different markers and to include a larger number of accessions geographically more distant.

Key words: Genetical Diversity, DNeasy, *Jatropha curcas*, RFLP's

1.1 Introducción

El interés creciente por *Jatropha curcas* L. a nivel mundial, radica en que el aceite que contiene la semilla de esta planta, puede ser utilizado como materia prima para la producción de biodiesel (Achten *et al.*, 2008). aunque *J. curcas* L. es nativa de México (Steinman, 2002), poco se ha trabajado en identificar y seleccionar ecotipos que muestren características promisorias en cuanto a producción y calidad de aceite. La mayoría de los cultivos de piñón que se han establecido en el país han mostrado serios problemas de adaptación, presencia de plagas y rendimientos variables en producción y contenido de aceite, lo que indica que no se ha hecho un trabajo de selección consistente. Por lo que hace falta conocer la diversidad genética, seleccionar materiales sobresalientes e iniciar programas de mejoramiento genético, para después evaluar el manejo agronómico de esta especie, que permita lograr su aprovechamiento de manera más eficiente y redituable. Son relativamente pocos los estudios reportados a nivel mundial acerca de la variabilidad genética de *J. curcas* Sukarin *et al.* (1987), en Thailandia, encontraron poca variabilidad en el rendimiento de semillas, morfología y desarrollo de la planta en 42 diferentes materiales colectados. La India es quizás el país que más trabajos ha reportado en lo referente al uso de marcadores moleculares como AFLP's (Tatikonda *et al.*, 2009) y RAPD's (Ranade, *et al.*, 2008; Subramanyam *et al.*, 2009). Ginwal *et al.* (2004) también reportaron poca variabilidad genética en materiales de *J. curcas* colectados en plantaciones localizados en los estados de Madhya, Pradesh y Haryana. Sin embargo, la poca variación que encontraron se debió a que en la evaluación no se incluyó colectas de materiales silvestres, ya que en el 2008, Ranade *et al.*, en colectas provenientes tanto de *J. curcas* silvestres como cultivadas, encontraron que eran los materiales silvestres los que contribuían con la mayor diversidad genética. La presente investigación tuvo como objetivo probar diferentes protocolos de extracción y purificación de ADN a partir de tejido foliar de accesiones de *Jatropha curcas* L. y realizar un análisis de la diversidad genética a partir de marcadores moleculares tipo RFLP's (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

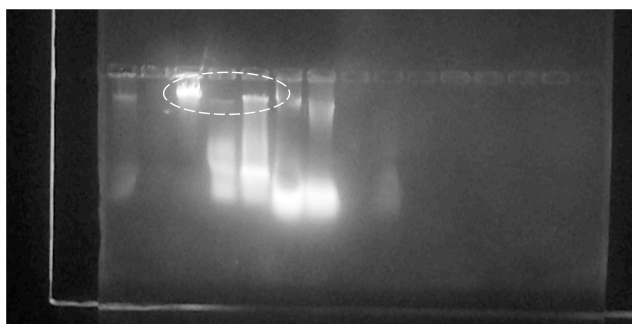
1.2 Materiales y Métodos

Se utilizaron cuatro plantas de piñón colectadas en las localidades de La Antigua (AN), Vargas (Vr), Rancho Paraíso (RP) y Curva del Coyote (CC) pertenecientes a la zona centro del estado de Veracruz. Para la extracción y purificación de ADN se probaron dos metodologías, la primera

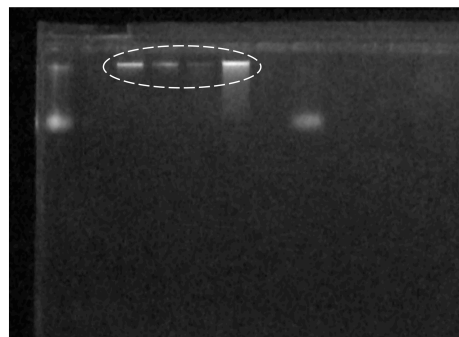
descrita por González y Vovidez en 2002 y la segunda mediante el kit comercial DNeasy (Quiagen). Para el análisis de la diversidad genética mediante RFLP's se amplificó una sección del espaciador intergénico de dos ARN de transferencia *trnLUAA-trnFGAA* con los "primers" E y F mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de: 94 °C /1 min; 59 °C/1 min; 72 °C/2 min. Se terminó con una extensión final a 72 °C por 7 min, partiendo de ADN previamente aislado y purificado. La digestión de los productos de PCR se realizó mediante las endonucleasas *HhaI*, *TaqI* y *HpaII* y posteriormente se realizó una electroforesis utilizando un gel de agarosa a una concentración de 0.8% teñido con bromuro de etidio. La visualización del gel y fotografiado del mismo se realizó bajo luz UV. Las variables consideradas en el presente trabajo fueron, para el caso de los métodos de extracción/purificación de ADN, la obtención de ADN de calidad y cantidad; mientras que para el análisis de RFLP's, la presencia o ausencia de bandas en el gel de electroforesis, indicativo de polimorfismo.

1.3 Resultados y discusión

Con los dos métodos de extracción probados se logró extraer ADN en cantidad y calidad necesaria para los análisis moleculares, siendo esto revelado por medio de electroforesis. El gel de electroforesis del ADN extraído mediante CETAB, mostró la migración de muchos subproductos que fueron eliminados posteriormente mediante purificación. Las bandas de ADN extraído mediante el DNeasy resultaron más claras y consistentes (Figura 3).



Método CETAB



Kit DNeasy

Figura 3. Geles de electroforesis con ADN extraído por el método CETAB sin purificación y por el kit comercial DNeasy

Con el kit comercial se redujo sustancialmente el tiempo de extracción y purificación del ADN. El análisis genético con los marcadores RFLP's, no reveló variación genética alguna entre los materiales evaluados, dado que con las enzimas de restricción no se encontraron sitios de corte diferencial entre las muestras como se observa en la Figura 4, lo que hubiera sido indicativo que la secuencia del gen aislado tiene variación en la secuencia de nucleótidos como producto de una mutación en las plantas evaluadas.

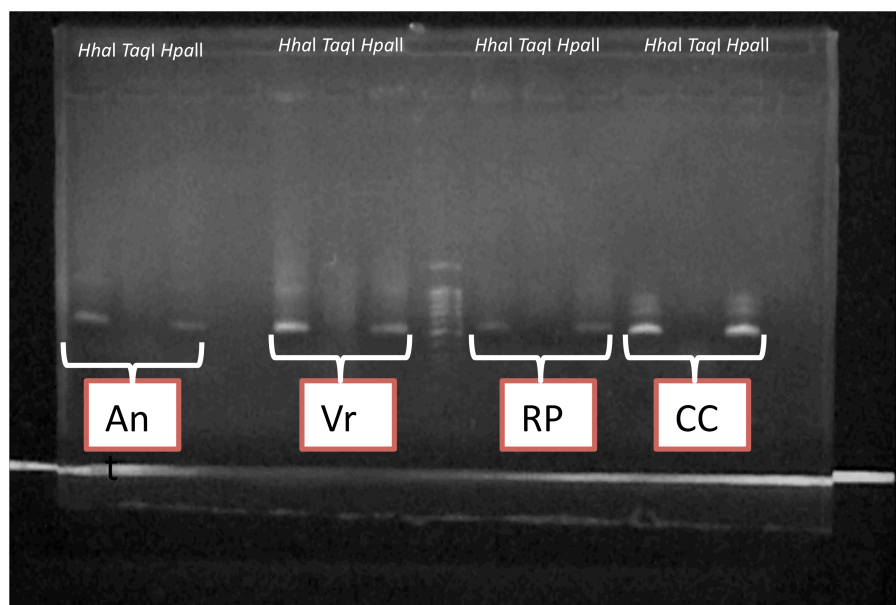


Figura 4. Fotografía del gel de electroforesis que muestra los patrones de bandeo del espaciador intergénico *trnLUAA-trnFGAA* de las cuatro accesiones con las enzimas de restricción *HhaI*, *TaqI* y *HpaII*.

En estudios previos realizados principalmente en la India, se han reportado resultados similares con marcadores moleculares AFLP's (Tatikonda *et al.*, 2009; Sudheer *et al.*, 2008) y RAPD's (Ranade, *et al.*, 2008; Subramanyam *et al.*, 2009) obteniendo bajos niveles de variación genética en las poblaciones estudiadas. Es importante destacar que en estos estudios se han evaluado individuos que han sido introducidos, a diferencia de México, que figura como centro de origen de *J. curcas* y en particular el estado de Veracruz, donde la distribución de esta especie es abundante, por lo que puede esperarse una mayor variación genética (Martínez *et al.*, 2006). De tal forma que, la baja variabilidad obtenida pudo deberse a que las muestras fueron colectadas en

un espacio geográfico muy reducido, y dado que el piñón se propaga mediante estacas, es muy probable que se hayan evaluado clones.

1.4 Conclusiones

Del presente estudio puede concluirse que tanto el protocolo de extracción de ADN descrito por González y Vovides (2002), como el kit comercial DNeasy, permiten obtener ADN en cantidad y calidad requerida para estudios moleculares en *Jatropha curcas*. Mediante RFLP's, en las plantas de *Jatropha curcas* evaluadas, no se encontró variación genética. Para incrementar la probabilidad de detectar diversidad genética en esta planta mediante el empleo de marcadores moleculares, es necesario realizar colectas en sitios geográficamente distantes y con diferentes condiciones edafoclimáticas.

1.5 Literatura citada

- Achten W. J. M., L. Verchot, Y. Franken J., E. Mathijs, V. Singh P., R. Aerts, B. Muys. 2008. *Jatropha* Bio-diesel Production and Use. *Biomass and Bioenergy* 32: 1063-1084.
- Ginwal, H., P. Rawat, and R. Srivastava. 2004. Seed source variation in growth performance and oil yield of *Jatropha curcas* L. in central India. *Silvae Genetica* 53:186-192
- González, D. and A. Vovides P. 2002. Low intralineaage divergence in *Ceratozamia* (Zamiaceae) detected with nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA trnL-F non-coding region. *Systematic Botany* 27: 654-661.
- Martínez J., P. Siddhuraju, G. Francis, G. Dávila, and K. Becker. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food chemistry* 96: 80-89.
- Ranade S., A. Srivastava, T. Rana, J. Srivastava and R. Tuli. 2008. Easy assessment of Diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. *Biomass and Bioenergy* 32:533-540.
- Subramanyam, K., D. Muralidhararao and N. Devanna. 2009. Genetic diversity assessment of wild and cultivated varieties of *Jatropha curcas* L. in India by RAPD análisis. *African Journal of Biotechnology* 8(9): 1900-1910.
- Steinman, V.W. 2002. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana* 61:61-93.

- Sudheer, P., S. Singt, S. Mastan, J. Patel and M. Reddy. 2008. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. *Molecular Biology Report*. 11: 274-280.
- Sukarin, W., Y. Yamada, S. Sakaguchi. 1987. Characterization of physic nut, *Jatropha curcas* L. as a new biomass crop in the tropics. *Japan agricultural Research Quartely* 20:302-303.
- Tatikonda, L., S. Wani, S. Kannan, N. Beerelli, T. Sreedevi K., D. Hoisington, D. Prathibha and R. Varshney. 2009. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. *Plant Science* 176 (4): 505-513.

CAPITULO II. ASPECTOS ETNOBOTÁNICOS DEL PIÑÓN (*Jatropha curcas* L.): CONTENIDO DE ÉSTERES DE FORBOL Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA EN VERACRUZ, MÉXICO (◆)

Resumen

Existe gran variedad de usos descritos para *Jatropha curcas*, pero su uso como alimento sólo ha sido descrito en México. El consumo de semillas es posible por la existencia de germoplasma no tóxico con bajo o nulo contenido de ésteres de forbol. Se realizó una búsqueda e identificación de arbustos, se registraron datos pasaporte, altura y diámetro del tronco. Se realizó una entrevista para registrar usos de *J. curcas*. Se tomó una muestra de semillas y se analizó la concentración de ésteres de forbol por HPLC. Se colectaron 80 accesiones en las 10 regiones del estado de Veracruz, en altitudes desde el nivel del mar hasta los 1,054 m. Los principales usos fueron: comestible (46 %), cerco vivos (41 %) y medicinal (10 %). La predominancia de su uso varió de acuerdo con las regiones del estado y al contenido o ausencia de ésteres de forbol. El uso alimenticio se registró principalmente en regiones al norte del estado, donde no se detectaron ésteres de forbol. Mientras que en las regiones del centro y sur, donde la concentración de ésteres varió entre 0.12 y 0.66 mg/g, el uso predominante fue como cerco vivo. Existe amplia distribución de *J. curcas*, con diversidad de usos, de estos el uso alimenticio se asocia con el bajo contenido de ésteres de forbol, los materiales no tóxicos se concentran en las regiones de la zona norte del estado de Veracruz.

Palabras clave: *Jatropha curcas*, etnobotánica, ésteres de forbol, Veracruz

(◆) Manuscrito enviado a la revista *Botanical Science* en espera de arbitraje

ETHNOBOTANICAL ASPECTS OF PIÑON (*Jatropha curcas* L.): PHORBOL ESTERS CONTENT AND GEOGRAFICAL DISTRIBUTION IN VERACRUZ, MEXICO

Abstract

A variety of uses of *Jatropha curcas* has been described, but its use as food has only been documented in Mexico. Seed consumption is possible due the existence of non-toxic germplasm with low or no content of phorbol esters. A search and identification of shrubs was carried out, passport data, height and trunk diameter were recorded. Besides, an interview was conducted to record uses of *Jatropha*. A seed sample was taken and the concentration of phorbol esters was analyzed by HPLC. 80 accessions were collected in the 10 regions of Veracruz state, at altitudes from sea level up to 1,054 m. Main uses were: edible (46%), living fence (41%) and medicinal (10%). The predominance of use varied according to regions and the content or absence of phorbol esters. Food use was mainly in north regions of the state, where no phorbol esters were detected. While in the central and southern regions, where the phorbol ester concentration varied between 0.12 and 0.66 mg/g, the predominant use was as a living fence. It is concluded that the use of *J. curcas* is based on their level of toxicity and partly determined by the region of Veracruz state.

Key Words: *Jatropha curcas*, ethnobotanical, phorbol esters, Veracruz

2.1 Introducción

Jatropha curcas es un arbusto perenne, caducifolio, de tallo succulento perteneciente a la familia *Euphorbiaceae* (Maes *et al.*, 2009). El nombre del género *Jatropha* deriva de la palabra griega *jatrós* (doctor) y *trophé* (alimento) que implica un uso medicinal. Alrededor del mundo se ha descrito una diversidad de usos para las diferentes partes de la planta. En la medicina, las semillas y el aceite se han utilizado como antihelmíntico y agente purgante (Kumar y Sharma, 2008); el látex como cicatrizante de heridas y herpes; de las hojas se han aislado sustancias con propiedades antiinflamatorias (Gübitz *et al.*, 1999). Así como existen semillas de *J. curcas* altamente tóxicas, por su contenido de ésteres de forbol, en las regiones del Totonacapan y Maya en los estados de Veracruz y Quintana Roo en México, se han encontrado plantas cuya semillas presentan nulos o bajos contenidos de ésteres de forbol y por tanto tiene uso alimenticio (Makkar y Becker, 1997; Makkar *et al.*, 1998b). Es una planta de fácil propagación vegetativa que no es consumida por el ganado, por ello su empleo como cerco vivo (Reyes y Rosado, 2000). El alto contenido de aceite de sus semillas, ha despertado gran interés como materia prima para la fabricación de biodiesel mediante un proceso de transesterificación (Abdulla *et al.*, 2011; Luijten y Kerkhof, 2011) y la glicerina remanente para la elaboración de jabones (Kumar y Sharma, 2008).

J. curcas crece en diferentes condiciones agroclimáticas, aunque se desarrolla mejor en los trópicos, donde las temperaturas medias fluctúan entre los 20 °C y 28 °C y una precipitación anual superior a los 600 mm (Trabucco *et al.*, 2010). México forma parte del centro de origen de esta planta (Ovando-Medina *et al.*, 2011a), debido a que de 186 especies de *Jatropha* identificadas en el mundo, 48 están presentes en el país, de las cuales 39 (21 %) son endémicas (Steinmann, 2002).

J. curcas se distribuye ampliamente en regiones tropicales y subtropicales de México, particularmente en los estados de Yucatán, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Puebla, Morelos, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Sinaloa y Veracruz (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2009). El germoplasma de *J. curcas* presente en el estado de Veracruz, destaca por la presencia de materiales tóxicos y no tóxicos (Herrera *et al.*, 2010). Si bien, se ha descrito la presencia de estos materiales, es necesario establecer con mayor detalle la distribución y el uso que tiene, acorde a su toxicidad. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue documentar los diferentes usos de *J. curcas*

de acuerdo con la distribución geográfica de plantas tóxicas y no tóxicas en el estado de Veracruz.

2.2. Materiales y métodos

Área de estudio

Durante los meses de agosto a octubre del año 2011 se realizó una búsqueda y localización de plantas de *J. curcas* en el estado de Veracruz, México. Este comprende una franja de 709 km de largo, con una superficie de 72,410 km², y que se divide en 10 regiones de acuerdo con las condiciones ecogeográficas y a la presencia y/o predominio de algún grupo étnico (INAFED, 2015).

Los sitios de búsqueda se definieron de acuerdo con la información reportada en herbarios nacionales. Una vez localizada la planta, se tomaron datos pasaporte incluyendo las coordenadas y altitud utilizando un GPS (Garmin® GPSMAP 76CSx). Se midió el diámetro del tallo a 50 cm de altura y la altura de la copa de la planta.

Cuando fue posible, se entrevistó al propietario de las plantas, registrando su nombre, edad y sexo. Además, se solicitó información sobre la edad de la planta, forma de siembra y una explicación detallada de todos los usos que le dan y si consideraba que la planta o alguna parte de ésta es tóxica para los humanos.

Toma de muestra y análisis

De las plantas localizadas y en estado de fructificación, se tomó una muestra de semillas para la determinación del contenido de ésteres de forbol.

Los ésteres de forbol se determinaron de acuerdo con el procedimiento descrito por (Makkar y Becker, 1997) con modificaciones menores. Las semillas se molieron en un mortero con nitrógeno líquido, posteriormente se tomó un gramo de endospermo de semilla de *J. curcas* y se sonicó (Sonicador Branson 5510) por tres minutos con 10 mL de metanol absoluto y centrifugado a 3,000 rpm por 8 min. Se colectó el sobrenadante y se repitió la operación de extracción dos veces más. El sobrenadante recuperado, se secó con un rotavapor (Buchi R210) a 40 °C y posteriormente, los extractos secos se disolvieron en 1 mL de metanol y se transfirieron a un vial de HPLC para su análisis. La cuantificación de ésteres de forbol se realizó en un HPLC (Agilent 1200), utilizando una columna RP18 (Phenomenex) de 150 x 4.6 mm y 5 m. Como fase

móvil se emplearon gradientes de agua y acetonitrilo. Los picos resultantes se integraron y los resultados se expresaron como equivalentes al 12-miristato-13-acetatoforbol. El análisis estadístico descriptivo y categórico de los datos se hizo con el software Statistica, versión 7.1.

2.3 Resultados

Se colectaron y georeferenciaron un total de 80 accesiones de *J. curcas* distribuidas en las diferentes regiones del estado de Veracruz (Figura 5). De estas, 41 plantas se encontraban en etapa de fructificación. La presencia de la planta se confirmó en todas las regiones del estado. La mayor distribución y presencia de plantas se registró en las regiones de la Huasteca alta (12.5 %), Totonaca (18.7 %), Nautla (12.5 %), Papaloapan (13.7 %) y Tuxtlas (13.7 %), mientras que en las regiones Capital (2.5 %) y Montañas (2.5 %) fueron menores. De las 80 accesos recolectados, el 55% se encontró en etapa de fructificación al momento de la recolecta.

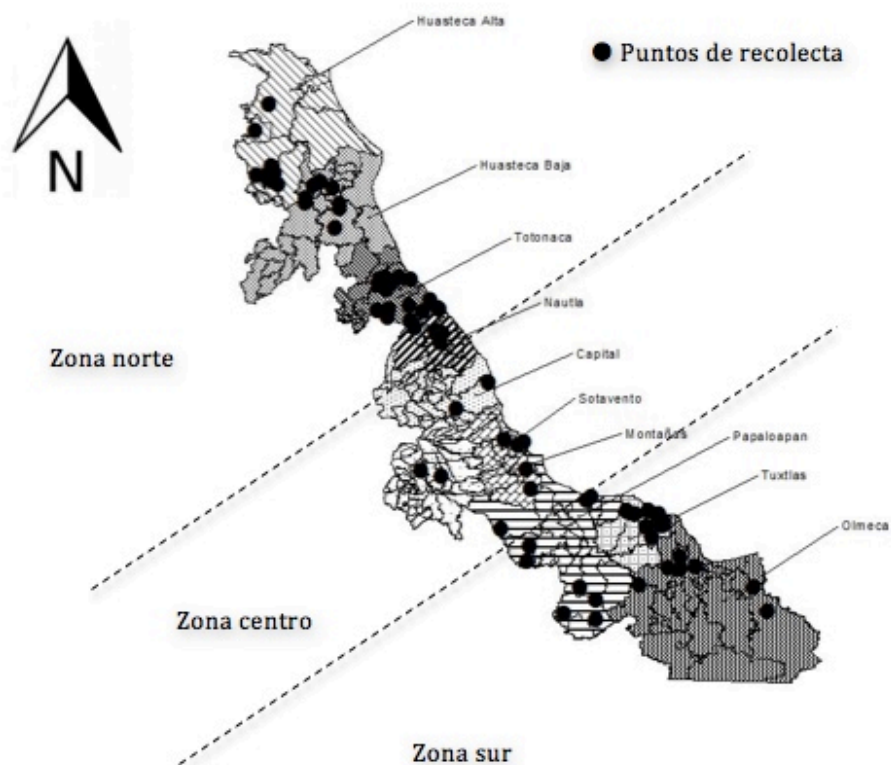


Figura 5. Distribución de las recolectas de *J. curcas* en las diferentes regiones del estado de Veracruz, México

Se registraron árboles a nivel del mar (I-01 y I-05) y a más de 1, 000 m (I-31 y I-62). El 91.25 % de los accesos se encontró en altitudes menores de 500 m. La altitud media fue de 158.2 m (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clave, localidad, región de colecta, georreferenciación y altitud de las accesiones recolectadas en el estado de Veracruz

| Clave accesión | Localidad | Región | Lat N | Lat O | Altitud (m snm) |
|-------------------|-------------------------|---------------|--------|--------|--------------------|
| I-02 | El molino | Huasteca Alta | 21°54' | 98°17' | 30 |
| I-03 | Las puentes | Huasteca Alta | 21°45' | 98°25' | 20 |
| I-04 | Santa Mónica | Huasteca Alta | 21°18' | 98°20' | 130 |
| I-05 | Tepatlan grande | Huasteca Alta | 21°18' | 98°16' | 94 |
| I-06 | Buenavista Santa Clara | Huasteca Alta | 21°15' | 98°10' | 113 |
| I-68 | Monte Grande Laja 1 | Huasteca Alta | 21°27' | 98°18' | 93 |
| I-69 | El palmar San Gabriel | Huasteca Alta | 21°20' | 98°21' | 105 |
| I-70 | Tanzaquil Xilusochitl | Huasteca Alta | 21°19' | 98°14' | 115 |
| I-71 | Terrero Temetate | Huasteca Alta | 21°19' | 98°14' | 130 |
| I-76 | Tepatlan Grande | Huasteca Alta | 21°18' | 98°16' | 94 |
| I-07 | Piedras clavadas | Huasteca Baja | 21°10' | 98°00' | 258 |
| I-08 | Tzicuatitla | Huasteca Baja | 21°11' | 97°59' | 228 |
| I-09 | Chontla | Huasteca Baja | 21°17' | 97°55' | 281 |
| I-10 | Tantima | Huasteca Baja | 21°20' | 97°50' | 184 |
| I-11 | Zacamixtle | Huasteca Baja | 21°14' | 97°43' | 136 |
| I-12 | Chapopote | Huasteca Baja | 20°55' | 97°40' | 31 |
| I-67 | Soyotitla | Huasteca Baja | 21°04' | 97°39' | 91 |
| I-13 | Papantla | Totonaca | 20°27' | 97°19' | 173 |
| I-14 | Papantla | Totonaca | 20°27' | 97°19' | 170 |
| I-15 | El chote | Totonaca | 20°24' | 97°19' | 98 |
| I-16 | Paso del correo | Totonaca | 20°19' | 97°16' | 31 |
| I-17 | Pueblillo | Totonaca | 20°15' | 97°15' | 77 |
| I-18 | Insurgentes socialistas | Totonaca | 20°11' | 97°15' | 119 |
| I-19 | El remolino | Totonaca | 20°23' | 97°12' | 64 |
| I-22 | Totomoxtle | Totonaca | 20°28' | 97°15' | 43 |
| I-23 | Anclón arenal | Totonaca | 20°26' | 97°06' | 10 |
| I-24 | La Victoria | Totonaca | 20°24' | 96°59' | 5 |
| I-25 | Costa esmeralda | Totonaca | 20°15' | 96°48' | 5 |
| I-72 | Espinal | Totonaca | 20°14' | 97°23' | 55 |
| I-77 | Pueblillo | Totonaca | 20°15' | 97°15' | 78 |
| I-78 | Paso del correo | Totonaca | 20°21' | 97°14' | 39 |
| I-79 | El remolino | Totonaca | 20°23' | 97°12' | 114 |
| I-20 | Sanjas | Nautla | 20°13' | 97°01' | 35 |
| I-21 | Manuel Ávila Camacho | Nautla | 20°12' | 97°00' | 96 |

| | | | | | |
|------|----------------------|------------|--------|--------|------|
| I-26 | Cementerios | Nautla | 20°10' | 96°53' | 9 |
| I-27 | Progreso | Nautla | 20°06' | 96°00' | 70 |
| I-28 | Libertad | Nautla | 20°03' | 96°58' | 54 |
| I-29 | Buenos Aires | Nautla | 19°55' | 96°46' | 366 |
| I-30 | Reforma Km 9 | Nautla | 19°53' | 96°48' | 631 |
| I-31 | Yecuatla | Nautla | 19°50' | 96°48' | 1054 |
| I-66 | Barra de palmas | Nautla | 20°09' | 96°43' | 0 |
| I-80 | Buenos Aires | Nautla | 19°56' | 96°50' | 321 |
| I-01 | La mancha | Capital | 19°35' | 96°23' | 4 |
| I-32 | Tuzamapan | Capital | 19°24' | 96°52' | 892 |
| I-52 | Veracruz | Sotavento | 19°10' | 96°8' | 10 |
| I-53 | Col. Ejidal | Sotavento | 18°55' | 96°12' | 12 |
| I-63 | Las bajadas | Sotavento | 19°8' | 96°10' | 15 |
| I-64 | Tepetates | Sotavento | 19°11' | 96°20' | 16 |
| I-65 | Tepetates | Sotavento | 18°11' | 96°20' | 16 |
| I-61 | San José del Corral | Montañas | 18°49' | 96°49' | 523 |
| I-62 | Cuatlapan | Montañas | 18°53' | 97°01' | 1006 |
| I-33 | Alvarado | Papaloapan | 18°47' | 95°47' | 21 |
| I-34 | Alvarado | Papaloapan | 18°47' | 95°45' | 22 |
| I-35 | Lerdo de Tejada | Papaloapan | 18°38' | 95°31' | 5 |
| I-36 | Tecolapan | Papaloapan | 18°34' | 95°20' | 160 |
| I-54 | Tierra Blanca | Papaloapan | 18°26' | 96°20' | 55 |
| I-55 | Loma de San Pedro | Papaloapan | 18°08' | 96°08' | 43 |
| I-56 | Tierra Nueva | Papaloapan | 17°54' | 95°39' | 69 |
| I-57 | Dos Zapotes | Papaloapan | 17°44' | 95°48' | 77 |
| I-58 | Coahuila Nuevo | Papaloapan | 17°55' | 95°12' | 135 |
| I-59 | Progreso | Papaloapan | 17°39' | 95°33' | 117 |
| I-60 | Abasolo del Valle | Papaloapan | 17°47' | 95°34' | 157 |
| I-37 | La Perla San Martín | Tuxtlas | 18°32' | 95°07' | 783 |
| I-38 | Díaz Ordaz | Tuxtlas | 18°31' | 95°05' | 520 |
| I-39 | Sotecomapan | Tuxtlas | 18°29' | 95°02' | 67 |
| I-40 | La palma | Tuxtlas | 18°33' | 95°03' | 24 |
| I-41 | Revolución de abajo | Tuxtlas | 18°38' | 95°06' | 8 |
| I-42 | - | Tuxtlas | 18°40' | 96°09' | 30 |
| I-43 | Salina Roca Quebrada | Tuxtlas | 18°41' | 95°14' | 16 |
| I-44 | Sihuapan | Tuxtlas | 18°26' | 95°10' | 258 |
| I-45 | Santa Rosa Sintepec | Tuxtlas | 18°18' | 96°06' | 490 |
| I-81 | Sontecomapan | Tuxtlas | 18°31' | 95°03' | 68 |
| I-82 | Santa Rosa Sintepec | Tuxtlas | 18°18' | 95°06' | 493 |
| I-46 | San Miguel | Olmecca | 18°04' | 94°57' | 143 |
| I-47 | El chichón | Olmecca | 17°45' | 94°06' | 50 |
| I-48 | Acalapa II | Olmecca | 17°57' | 94°13' | 42 |
| I-49 | Chacalapan | Olmecca | 18°05' | 94°42' | 17 |
| I-50 | Mirador Saltillo | Olmecca | 18°09' | 94°51' | 186 |
| I-51 | Mirador Saltillo | Olmecca | 18°09' | 94°51' | 186 |
| I-83 | Monte grande | Olmecca | 18°04' | 94°53' | 75 |

En las regiones del norte del estado (Huasteca alta, Huasteca baja, Totonaca y Nautla) *J. curcas* se encontró principalmente en los solares o huertos familiares, registrándose no más de tres árboles en los sitios de recolecta. Fue constante observar que los domicilios de las personas que tenían plantas, se ubicaban en las zonas periurbanas de las localidades y eran de bajos recursos. Mientras que en la zona sur (regiones Papaloapan y Tuxtlas) la planta se ubicó como parte de cercos vivos con numerosos arbustos en la zona rural. El 5 % de los arbustos se encontró aislado en potreros o tierras de cultivo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Ubicación del árbol en el sitio de recolecta, forma de propagación y toxicidad de la semilla de acuerdo con el propietario.

| Variable | Categoría | Frecuencia y porcentaje (%) |
|-------------------------|------------|-----------------------------|
| Ubicación del árbol | Cerco vivo | 21 (26) |
| | Solar | 55 (69) |
| | Aislado | 4 (5) |
| Forma de propagación | Estaca | 17 (36) |
| | Semilla | 30 (64) |
| Toxicidad de la semilla | No | 36 (58) |
| | No sabe | 21 (37) |
| | Si | 3 (5) |

Se encontraron plantas con un diámetro de tronco de hasta 103 cm y una altura de 8 m, aunque el promedio estuvo en 35.91 cm y 3.74 m, respectivamente. El 50 % de las accesiones tuvieron una altura de 3.5 m o menos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Valor medio, mínimo y máximo de las variables diámetro del tallo, altura de planta, y edad del árbol y altitud de las plantas registradas

| Variable | Media | Valor Mínimo | Valor Máximo |
|------------------------|-------|--------------|--------------|
| Diámetro de Tallo (cm) | 36 | 8.5 | 113.0 |
| Altura Planta (m) | 3.7 | 1.0 | 8.0 |
| Edad Árbol (años) | 10.7 | 1.0 | 50.0 |
| Altitud (m snm) | 158.2 | 0.0 | 1054.0 |

Las personas entrevistadas o propietarios de los arbustos de *J. curcas*, en su mayoría fueron del sexo masculino y de edad promedio de 51 años. A partir de la entrevista, se documentaron seis

usos para *J. curcas*, los cuales se muestran en la Figura 6, destacando como usos principales: el comestible (46 %) y cerco vivo (41 %). En todas las regiones del estado hubo al menos una mención de uso como alimento. Mientras que en la zona sur del estado (Papaloapan, Tuxtlas y Olmeca), el uso de la planta fue como cerco vivo.

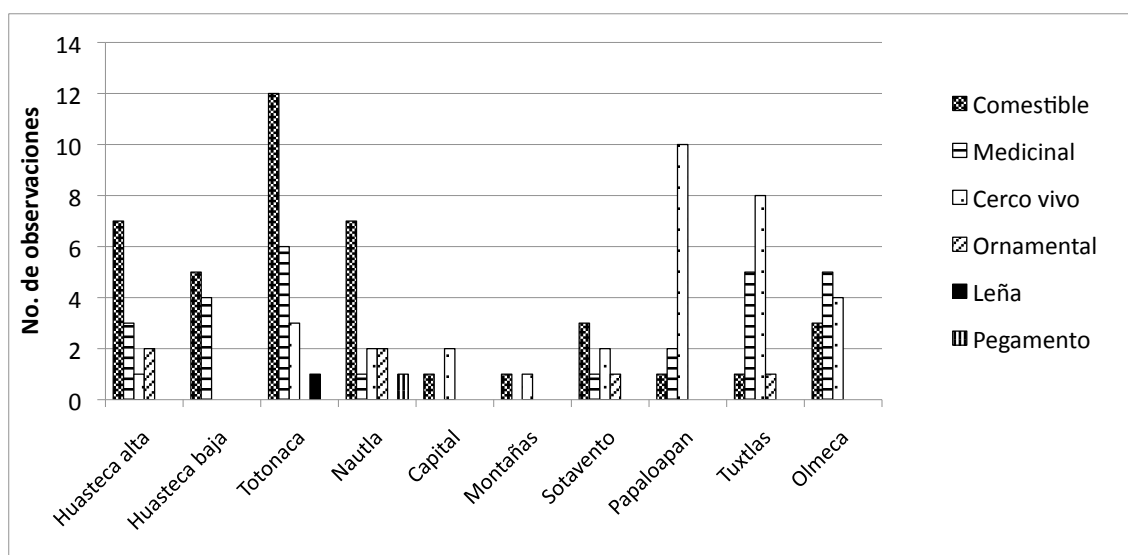


Figura. 6. Distribución de los diferentes usos de *J. curcas* en las diferentes regiones del estado de Veracruz, México

Se encontró que existen diferencias en cuanto a la posesión y utilización de *J. curcas*. En las regiones de la Huasteca alta, Huasteca baja, Totonaca y Nautla, el uso que las personas le dan está orientado principalmente a fines alimenticios. La semilla previamente tostada, de acuerdo con las menciones de los propietarios, se usa principalmente para preparar: salsas (42 %), botana (29 %), tamales (27 %) y dulces (2 %).

Para la elaboración de las salsas, las semillas tostadas se muelen y se combinan con diferentes tipos de chiles para elaborar platillos como: enchiladas y guisos con carne de cerdo o pollo (región Totonaca) o bien mariscos en las zonas de costa (región Nautla).

El consumo de las semillas tostadas como botana, fue reportado por al menos uno de los entrevistados en ocho regiones, por lo que fue el uso alimenticio más conocido en el estado, con excepción de las regiones Nautla y Sotavento donde no se mencionó.

La utilización de semilla de *J. curcas* para la elaboración de tamales fue mencionada frecuentemente y de forma exclusiva en las regiones Totonaca y Nautla. La preparación de los

tamales era muy similar entre las localidades de ambas regiones, consistiendo en una mezcla de masa de maíz, frijol, manteca, y variaciones en cuanto a incluir ejotes, chayote o calabacitas, todo cocido al vapor y envuelto en hoja de plátano. Sin embargo, cambió la forma de nombrar a los tamales entre una y otra región, siendo “pulacles” en la región Totonaca y “chilahuates” en la de Nautla.

La elaboración de dulces a partir de la semilla solo tuvo una mención en la localidad de Misantla, perteneciente a la región de Nautla. El entrevistado mencionó que era originario del estado de Puebla y que de la localidad donde él provenía se tenía la costumbre de realizar dulces con estas semillas.

Los usos medicinales de la planta fueron mencionados en la mayoría de las regiones, con excepción de las regiones de Montañas y Capital. El látex de la planta se utiliza primordialmente contra fuegos labiales (herpes), aftas y como cicatrizante y antiséptico de heridas (27 %) (Figura 7).

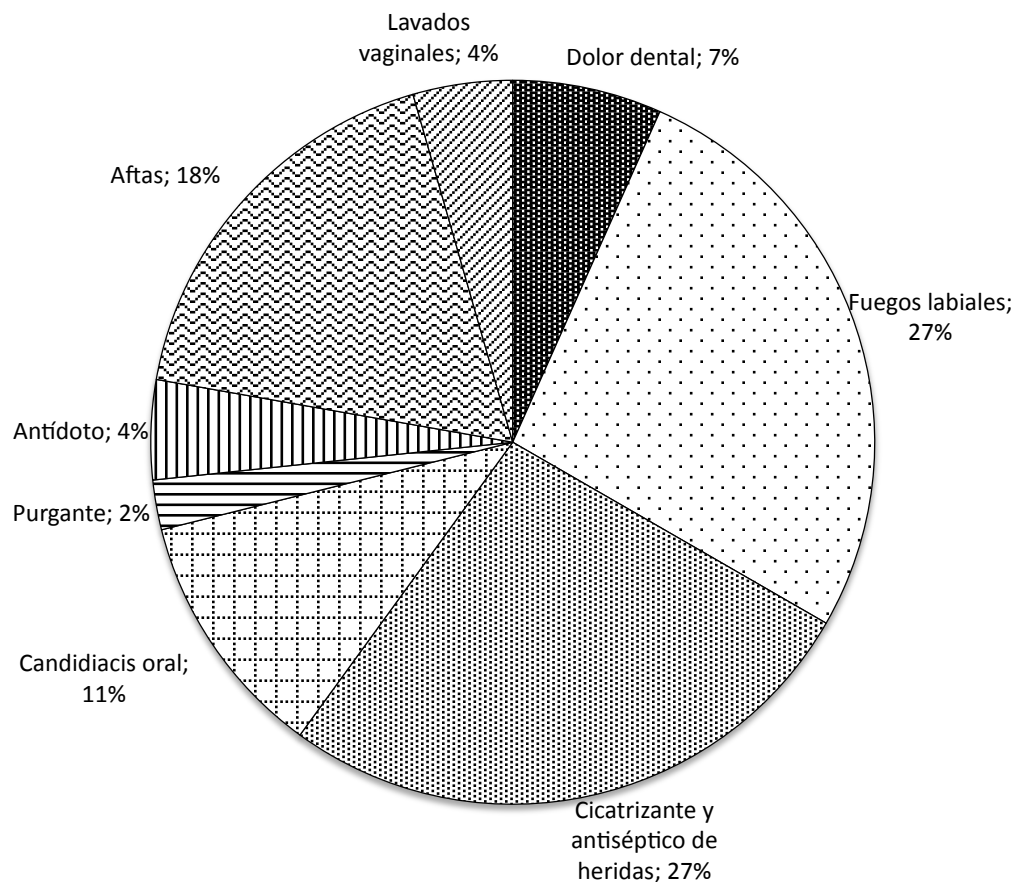


Figura 7. Usos medicinales de *J. curcas* mencionados por los entrevistados

Tanto para los fuegos labiales como para las heridas, el látex se aplica directamente sin diluciones. Los entrevistados refirieron que el fuego labial desaparece a los tres días de iniciado el tratamiento.

En las regiones Totonaca, Tuxtlas y Olmeca, coincidió el uso del látex para combatir el “algodoncillo” o candidiasis bucal en bebés recién nacidos. El procedimiento descrito por los entrevistados de las diferentes regiones fue muy similar, consistiendo en humedecer un paño de tela en el látex emanado de hojas recién cortadas, para después aplicarlo en la cavidad bucal de los bebés. Los entrevistados manifestaron que estos procedimientos naturistas se han venido perdiendo debido a la utilización cada vez más frecuente de productos alopáticos.

En la región Totonaca, se mencionó la utilización de una infusión elaborada a partir de corteza de *J. curcas*, frijol, tabaco y ajo, como un antídoto contra el veneno de serpientes y escorpiones. En las regiones de los Tuxtlas y Olmeca se utiliza para controlar infecciones vaginales con lavados. Como purgante solo se mencionó en la localidad de Revolución de Abajo en la región de los Tuxtlas.

El uso del látex para tratar dolores dentales fue registrado en la localidad de Tantoyuca, perteneciente a la región de la Huasteca Alta, así como en la localidad de Cotaxtla en la región de Sotavento. El procedimiento descrito consistía en aplicar el látex recién emanado de una hoja cortada y aplicarlo en la pieza dental afectada, el procedimiento se repite a lo largo del día hasta que el dolor disminuye. Adicionalmente en la localidad de Chontla en la Huasteca Baja, se hizo mención del uso del látex de *J. curcas* para curar la presencia de cataratas en gallinas.

En el Cuadro 5 se muestra lo reportado por los entrevistados sobre la toxicidad de las plantas y el producto del análisis de contenido de ésteres de forbol. De las personas que respondieron afirmativamente sobre la toxicidad de sus plantas, refirieron que el consumo de las semillas ocasionaba dolores estomacales, vómito y diarrea. En las muestras recolectadas en las regiones Huasteca alta, Huasteca baja, Totonaca y Nautla, no se detectaron ésteres de forbol, coincidiendo con la respuesta de los entrevistados que sus plantas no son tóxicas. Sin embargo, en la accesión I-01 de la región Capital y las I-44 y I-45 de la región Tuxtlas, se detectaron ésteres de forbol, aún cuando los entrevistados las consideraron no tóxicas.

Cuadro 5. Percepción de los entrevistados sobre la toxicidad de *J. curcas* y contenido de ésteres de forbol.

| Zona del Estado | Clave accesoión | Región | Percepción de Toxicidad de la Planta | Contenido de ésteres de forbol (mg/g) |
|-----------------|-----------------|---------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| NORTE | I-02 | Huasteca alta | - | ND |
| | I-04 | Huasteca alta | No | ND |
| | I-05 | Huasteca alta | No | ND |
| | I-08 | Huasteca baja | No | ND |
| | I-11 | Huasteca baja | - | ND |
| | I-13 | Totonaca | No | ND |
| | I-14 | Totonaca | No | ND |
| | I-16 | Totonaca | - | ND |
| | I-18 | Totonaca | No | ND |
| | I-22 | Totonaca | No | ND |
| | I-25 | Totonaca | No | ND |
| | I-77 | Totonaca | No | ND |
| | I-78 | Totonaca | - | ND |
| | I-79 | Totonaca | - | ND |
| CENTRO | I-26 | Nautla | No | ND |
| | I-27 | Nautla | - | ND |
| | I-29 | Nautla | No | ND |
| | I-30 | Nautla | No | ND |
| | I-31 | Nautla | - | ND |
| | I-80 | Nautla | No | ND |
| | I-01 | Capital | No | 0.43 |
| | I-32 | Capital | - | ND |
| | I-52 | Sotavento | No | 0.23 |
| | I-53 | Sotavento | - | 0.16 |
| | I-64 | Sotavento | No | ND |
| | I-65 | Sotavento | - | ND |
| | I-61 | Montañas | - | 0.65 |
| | I-62 | Montañas | No | ND |
| SUR | I-33 | Papaloapan | Sí | 0.42 |
| | I-34 | Papaloapan | - | ND |
| | I-35 | Papaloapan | - | 0.45 |
| | I-36 | Papaloapan | - | 0.66 |
| | I-57 | Papaloapan | Sí | 0.23 |
| | I-59 | Papaloapan | - | 0.38 |
| | I-38 | Tuxtlas | Sí | 0.12 |
| | I-41 | Tuxtlas | - | ND |
| | I-42 | Tuxtlas | - | 0.28 |
| | I-43 | Tuxtlas | - | 0.44 |
| | I-44 | Tuxtlas | No | 0.43 |
| | I-45 | Tuxtlas | No | 0.48 |
| | I-81 | Tuxtlas | - | 0.33 |
| | I-82 | Tuxtlas | - | 0.59 |
| | I-47 | Olmecca | - | ND |
| | I-48 | Olmecca | - | ND |
| | I-83 | Olmecca | - | 0.28 |

ND: No detectado; - : No entrevistado

Las plantas con ésteres de forbol, se ubicaron exclusivamente en las zonas centro y sur del estado. De acuerdo con información proporcionada por los entrevistados, el origen de los accesos I-47, I-64 y I-65 eran de la región Totonaca y posteriormente fueron llevados a las regiones Olmeca y Sotavento.

2.4 Discusión

Se encontró la presencia de *J. curcas* en todas las regiones del estado de Veracruz. Sin embargo, la mayor distribución se tuvo en las regiones de clima tropical con temperaturas medias anuales entre los 20 y 26 °C y precipitaciones pluviales anuales superiores a los 1,160 mm. La menor distribución se tuvo en las regiones con clima templado (Capital y Montañas) debido a una baja tolerancia al frío (Achten *et al.*, 2008). De acuerdo con Núñez-Colín y Goytia-Jiménez (2009), en México, *J. curcas* puede distribuirse ampliamente en todas las regiones tropicales y subtropicales, mientras que es poco común encontrarla en regiones templadas, áridas o semiáridas o con precipitaciones inferiores a los 944 mm año⁻¹ (Maes *et al.*, 2009).

No fue posible encontrar poblaciones silvestres de *J. curcas*, no obstante se han descrito poblaciones en estas condiciones en la parte sur de México, específicamente en selvas baja caducifolia y mediana subcaducifolia y formando parte de vegetación secundaria (Ovando-Medina *et al.*, 2011b). La mayoría de las plantas ubicadas (95 %) fueron establecidas intencionalmente por el hombre, en los traspacios de las casas o bien como cerco vivo. Las que fueron encontradas aisladas de toda actividad humana, probablemente fueron dispersadas por animales, como ardillas y loros.

J. curcas es una planta considerada multipropósito, dada la variedad de usos descritos (Openshaw, 2000; Kumar y Sharma, 2008; Ye *et al.*, 2009). La encuesta reportó varios usos para la planta, aunque dependiendo de la región del estado, algunos de ellos fueron predominantes.

El uso comestible de *J. curcas* sólo se ha documentado en México, en los estados de Veracruz (Martínez-Herrera *et al.*, 2006) y Quintana Roo (Makkar *et al.*, 1998b). En Veracruz, el consumo *J. curcas* se ha circunscrito a la región Totonaca (Makkar *et al.*, 1998a). De acuerdo a resultados previos *J. curcas* no tóxica se distribuye en una área más amplia, abarcando las regiones Huasteca Alta, Huasteca Baja, Nautla y Sotavento, donde su principal uso es comestible (Valdes-Rodríguez *et al.*, 2013).

En la región Totonaca y Nautla el consumo de semillas tostadas (botana) o como ingrediente en diferentes guisos es una práctica muy aceptada. El sabor de las semillas tostadas es comparado al del cacahuete, además de que presentan un alto contenido nutricional, como lo ha revelado el análisis proximal del endospermo. Se reporta que el endospermo de la semilla presenta un contenido de proteína cruda de entre 27 y 30 %, y de lípidos entre 55 y 62 % en base a materia seca (Makkar *et al.*, 1998a).

La utilización de la planta como alimento en las regiones del sur de estado es muy limitado, debido a que la mayoría de las plantas son tóxicas. Los entrevistados mencionaron en forma recurrente que el consumo de las semillas crudas causaba vómitos, náuseas y fuertes diarreas. Estos síntomas se pueden asociar a que las semillas de *J. curcas* contienen compuestos antinutricionales, como fitatos, lectinas, saponinas, inhibidores de tripsina y un grupo de compuestos denominados ésteres de forbol, los cuales causan diversos efectos a la salud (Rakshit *et al.*, 2008).

El carácter tóxico más grave es ocasionado por la presencia de los ésteres de forbol, cuyos efectos biológicos incluyen formación de tumores, proliferación celular, activación de plaquetas, inflamación y producción de prostaglandinas entre otros (Haas y Mittelbach, 2000; Goel *et al.*, 2007). La presencia de ésteres de forbol, se detectó en muestras provenientes de las zonas centro y sur del estado, coincidiendo con las regiones donde el consumo de semillas es prácticamente nulo y la planta se utiliza preferentemente como cerco vivo.

El tostado de las semillas de *J. curcas* inactiva completamente a compuestos tóxicos presentes como el inhibidor de la tripsina y reduce la actividad de la lectinas. Sin embargo, se ha visto que las saponinas, los fitatos y los ésteres de forbol no se ven afectados a las temperaturas generalmente utilizadas para su tostado y consumo posterior (Makkar *et al.*, 1998b). Para la degradación completa de compuestos como los ésteres de forbol, se necesita aplicar una temperatura de 230 °C a una presión de 3 milibares (Haas y Mittelbach, 2000).

El uso comestible de las accesiones I-47, I-64 y I-65 documentado en el centro y sur del estado (regiones Sotavento y Olmecca), correspondió a personas migrantes originarias del norte del estado. Fue notable observar que la ubicación de los arbustos para estos casos, fue similar al encontrado en las regiones de la zona norte, es decir en los traspatios y no como cerco vivo como fue constante observarlos en la zona sur.

La presencia de ésteres de forbol en accesiones del centro y sur del estado, y la ausencia en la zona norte, puede ser producto de un proceso de selección y domesticación de la especie por los grupos indígenas que han habitado estas áreas (Totonacos y Huastecos), y su distribución geográfica tiene relación con acciones antrópicas por la cultura de su consumo. En este sentido, se requieren estudios más profundos para rastrear el origen genético de la expresión de la característica no tóxica y su distribución.

Recientemente, se ha promovido el establecimiento de plantaciones en diferentes estados de México, incluyendo a Chiapas, Morelos, Michoacán y Veracruz, debido al gran interés que ha generado la utilización del aceite de *J. curcas* como materia prima para la producción de biodiesel (Abdulla *et al.*, 2011). Por tanto, resulta particularmente importante tomar previsiones sobre la utilización de materiales tóxicos en regiones donde predominan plantas no tóxicas (sin ésteres de forbol), ya que existe el riesgo de contaminación genética de los materiales nativos y se puede afectar con ello la salud de las personas consumidoras y eventualmente la degeneración de este recurso genético.

En la zona sur del estado de Veracruz, la utilización del *J. curcas* como cerco vivo fue alta. Este uso de la planta es una práctica ampliamente difundida alrededor del mundo, por su fácil propagación por estacas y para la protección de los campos de cultivo dada su baja palatabilidad para el ganado bovino (Kumar y Sharma, 2008). No existen datos sobre el inicio del uso de los cercos vivos en México, se ha planteado que su empleo se extendió con la introducción de la ganadería extensiva durante la época de la colonia (Challenger y Elizondo, 1998).

De acuerdo con los datos recabados, la comercialización de las semillas tostadas de *J. curcas* destinadas al consumo humano como botana, ha tendido a desaparecer en los mercados locales de algunas localidades de la región Totonaca, donde hasta hace unos años era posible adquirirla. La almendra se utiliza como sustituto de la semilla de calabaza pipían (*Cucurbita mixta*) en la elaboración de salsas para acompañar una gran diversidad de guisos. Además, su uso como cerco vivo de igual manera a disminuido al ser desplazado por árboles de la especie *Bursera simaruba* (palo mulato), el cual a diferencia de *J. curcas* tiene la ventaja de que requiere de menos podas, resiste mejor las grapas y tiene un mayor aprovechamiento maderable. De acuerdo con Reyes y Rosado (2000), en la elección de una especie como cerco vivo, el propietario del terreno considera no solo las características que deben reunir las plantas en congruencia con los

requerimientos de cercado, sino también el periodo de crecimiento, las labores de mantenimiento y los productos útiles adicionales que pueden obtenerse.

Todas las partes de la planta se han utilizado en la medicina humana tradicional y en veterinaria. En Veracruz, la aplicación tópica del látex exudado de hojas recién cortadas, es la forma más común de tratar padecimientos como los fuegos labiales y como coadyuvante en la cicatrización de heridas. La acción antiviral del látex ha sido reportada (Tewari y Shukla, 1982), al igual que la capacidad de cicatrización, que puede estar relacionada con la actividad de una enzima proteolítica (Villegas *et al.*, 1997). Los tiempos de coagulación pueden disminuirse o aumentarse según la concentración del látex que se aplique (Kumar y Sharma, 2008). El látex también contiene compuestos que pueden ocasionar efectos negativos en la salud humana, como la curcaciolina que afecta el sistema del complemento y la proliferación de células T y se encuentran implicadas en la defensa del organismo contra infecciones y células tumorales (van den Berg *et al.*, 1995).

En Veracruz, la presencia de ésteres de forbol en las plantas de *J. curcas* no ha sido limitante para ser usada con propósitos medicinales. Los ésteres de forbol se concentran principalmente en el endospermo de la semilla y en menor grado en el látex de las hojas (Devappa *et al.*, 2011), que son las principales partes de la planta utilizadas con fines medicinales.

2.5 Conclusiones

J. curcas tiene una amplia distribución en el estado de Veracruz pudiendo encontrarla en muy variadas condiciones edafoclimáticas, lo que demuestra su capacidad de adaptación.

En Veracruz al igual que en otras partes de México y el mundo, a *J. curcas* es utilizada con diferentes propósitos. La utilización de la planta con fines alimenticios, estuvo en función de la presencia o ausencia de ésteres de forbol en las semillas. Situación que se presentó de manera constante en las regiones localizadas al norte del estado.

El origen de esta característica en las plantas no está del todo claro, pero la presencia de este germoplasma posibilita su utilización en un sin número de aplicaciones industriales y alimentarias. Identificar características sobresalientes en materiales no tóxicos, es importante para integrarlos a un programa de mejoramiento genético de la especie.

2.6 Literatura citada

- Abdulla, R., E. S. Chan y P. Ravindra. 2011. Biodiesel production from *Jatropha curcas*: A critical review. *Critical Reviews in Biotechnology* 31: 53-64.
- Achten, W. M. J., L. Verchot, Y. J. Franken, E. Mathijs, V. P. Singh, R. Aerts y B. Muys. 2008. *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass and Bioenergy* 32: 1063-1084.
- Challenger, A. Z. y S. Elizondo. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro.
- Devappa, R., H. S. Makkar y K. Becker. 2011. *Jatropha* diterpenes: A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 88: 301-322.
- Goel, G., H. P. S. Makkar, G. Francis y K. Becker. 2007. Phorbol esters: Structure, biological activity, and toxicity in animals. *International Journal of Toxicology* 26: 279-288.
- Gübitz, G. M., M. Mittelbach y M. Trabi. 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technology* 67: 73-82.
- Haas, W. y M. Mittelbach. 2000. Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L. *Industrial Crops and Products* 12: 111-118.
- Herrera, J. M., A. L. M. Ayala, H. Makkar, G. Francis y K. Becker. 2010. Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *European Journal of Scientific Research* 39: 396-407.
- INAFED, 2015. Instituto nacional para el federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED). Tomado de http://www.e-local.gob.mx/wb/ELOCAL/EMM_veracruz. Fecha de consulta: 15 de octubre de 2015.
- Kumar, A. y S. Sharma. 2008. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Industrial Crops and Products* 28: 1-10.
- Luijten, C. C. M. y E. Kerkhof. 2011. *Jatropha* oil and biogas in a dual fuel CI engine for rural electrification. *Energy Conversion and Management* 52: 1426-1438.
- Maes, W. H., A. Trabucco, W. M. J. Achten y B. Muys. 2009. Climatic growing conditions of *Jatropha curcas* L. *Biomass and Bioenergy* 33: 1481-1485.

- Makkar, H. y K. Becker. 1997. Potential of *Jatropha curcas* seed meal as a protein supplement to livestock feed; constraints to its utilization and possible strategies to overcome constraints. DBV Graz: 190 - 205.
- Makkar, H. P. S., A. O. Aderibigbe y K. Becker. 1998a. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. Food Chemistry 62: 207-215.
- Makkar, H. P. S., K. Becker y B. Schmook. 1998b. Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. Plant Foods for Human Nutrition 52: 31-36.
- Martínez-Herrera, J., P. Siddhuraju, G. Francis, G. Dávila-Ortíz y K. Becker. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. Food Chemistry 96: 80-89.
- Núñez-Colín, C. A. y M. A. Goytia-Jiménez. 2009. Distribution and agroclimatic characterization of potential cultivation regions of physic nut in Mexico. Pesquisa Agropecuária Brasileira 44: 1078-1085.
- Openshaw, K. 2000. A review of *Jatropha curcas* L: An oil plant of unfulfilled promise. Biomass Bioenergy 19: 1 - 15.
- Ovando-Medina, I., F. Espinosa-García, J. Núñez-Farfán y M. Salvador-Figueroa. 2011a. State of the art of genetic diversity research in *Jatropha curcas*. Sci Res Essays 6: 1709-1719.
- Ovando-Medina, I., A. Sánchez-Gutiérrez, L. Adriano-Anaya, F. Espinosa-García, J. Núñez-Farfán y M. Salvador-Figueroa. 2011b. Genetic diversity in *Jatropha curcas* populations in the state of Chiapas, Mexico. Diversity 3: 641-659.
- Rakshit, K. D., J. Darukeshwara, K. Rathina Raj, K. Narasimhamurthy, P. Saibaba y S. Bhagya. 2008. Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. Food and Chemical Toxicology 46: 3621-3625.
- Reyes, S. A. y I. A. Rosado. 2000. Plantas utilizadas como cercas vivas en el estado de Veracruz. Madera y Bosques 6: 55-71.
- Rodríguez-Acosta, M., K. Vega-Flores, V. H. De Gante-Cabrera y J. Jiménez-Ramírez. 2009. Distribución del genero *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) en el estado de Puebla, México. Polibotánica: 37-48.

- Steinmann, V. W. 2002. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*: 61-93.
- Tewari, J. y I. Shukla. 1982. Inhibition of infectivity of two strains of watermelon mosaic virus by latex of some angiosperms. *Geobios* 9: 124-126.
- Trabucco, A., W. M. J. Achten, C. Bowe, R. A. F. Aerts, J. V. Orshoven, L. Norgrove y B. Muys. 2010. Global mapping of *Jatropha curcas* yield based on response of fitness to present and future climate. *GCB Bioenergy* 2: 139-151.
- Valdes-Rodriguez, O. A., O. Sanchez-Sanchez, A. Perez-Vazquez y J. Caplan. 2013. The mexican non-toxic *Jatropha curcas* L., food resource or biofuel? *Ethnobotany Research and Applications* 11: 001-007.
- van den Berg, A. J. J., S. F. A. J. Horsten, J. J. Kettenes-van den Bosch, B. H. Kroes, C. J. Beukelman, B. R. Leeftang y R. P. Labadie. 1995. Curcacycline a — a novel cyclic octapeptide isolated from the latex of *Jatropha curcas* L. *FEBS Letters* 358: 215-218.
- Villegas, L. F., I. D. Fernández, H. Maldonado, R. Torres, A. Zavaleta, A. J. Vaisberg y G. B. Hammond. 1997. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Perú. *Journal of Ethnopharmacology* 55: 193-200.
- Ye, M., C. Li, G. Francis y H. S. Makkar. 2009. Current situation and prospects of *Jatropha curcas* as a multipurpose tree in China. *Agroforestry Systems* 76: 487-497.

CAPITULO III. DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Jatropha curcas* L. EN EL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO USANDO MARCADORES DE MICROSATÉLITES Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE ÉSTERES DE FORBOL (◆)

Resumen

El interés creciente a nivel mundial por *Jatropha curcas* radica en el alto contenido de aceite en sus semillas el cuál puede ser utilizado como materia prima para la producción de biodiesel. Esta planta es nativa de México (Mesoamérica) y se pueden encontrar plantas tóxicas y no tóxicas. Sin embargo, existe poca claridad sobre la diversidad genética de *J. curcas*. El propósito de este trabajo fue analizar la diversidad genética de 64 accesiones de *J. curcas* del estado de Veracruz, México mediante microsatélites y su relación con la presencia de ésteres de forbol. Se utilizaron 12 microsatélites diseñados previamente para esta especie. Los loci se amplificaron por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los alelos fueron separados en geles de poliacrilamida y visualizados mediante tinción con plata. En 38 accesiones (59%) se determinó la presencia de ésteres de forbol por HPLC. Todos los loci amplificaron, seleccionando a seis de acuerdo con la claridad de los alelos y al polimorfismo generado. Sólo en dos de los seis loci utilizados se detectaron ejemplares heterocigotos. Las accesiones recolectadas en la parte norte del estado de Veracruz tendieron a agruparse. De acuerdo con el análisis de forbol, se confirmó la presencia de materiales tóxicos y no tóxicos de *J. curcas* en Veracruz, México. A nivel genético, ninguno de los microsatélites empleados lograron discriminar entre muestras tóxicas y no tóxicas. Las plantas tóxicas se localizaron en el centro y sur del estado con contenidos de ésteres de forbol de 0.12 a 0.66 mg/g, mientras que las plantas no tóxicas se distribuyeron en todo el estado. Dada la gran importancia de *J. curcas* como biocombustible, la utilización de técnicas moleculares son de gran ayuda para ubicar y seleccionar individuos sobresalientes para programas de mejoramiento genético, donde el estado de Veracruz podría ser un nicho de biodiversidad de esta planta.

Palabras clave. Diversidad genética, ésteres de forbol, *Jatropha curcas*, microsatélites, Veracruz (◆) Manuscrito enviado a la revista *Global Advance Research Journal of Agricultural Science* (GARJAS), aceptado para publicación

GENETIC DIVERSITY OF *Jatropha curcas* L. IN VERACRUZ STATE, MEXICO, AND ITS RELATIONSHIPS WITH THE CONTENT OF PHORBOL ESTERS

Abstract

There is growing interest worldwide for *Jatropha curcas* because of the high oil content in the seeds, which can be used as base material for biodiesel production. This plant is native to Mexico (Mesoamerica) and can be found as toxic and non-toxic. However, there is little information on the genetic diversity of *J. curcas*. The purpose of this study was to analyze the genetic diversity of 64 accessions of *J. curcas* in the state of Veracruz, Mexico, and its relationship with the contents of phorbol esters. We used 12 microsatellites designed previously for this species. Loci were amplified using the polymerase chain reaction and alleles were separated on polyacrylamide gels. From all loci amplified, six were selected according to the clarity of the alleles and the polymorphisms generated. Heterozygous individuals were detected in only two of the six loci used. The accessions collected from northern Veracruz state were clustered together. Phorbol ester analysis confirmed the presence of toxic and non-toxic *J. curcas*. At the genetic level, none of the microsatellites employed were able to distinguish between toxic and non-toxic samples. Toxic plants were found in the central and southern parts of the state with phorbol ester contents ranging from 0.12 to 0.66 mg g⁻¹, while non-toxic plants were distributed throughout the state. Given the importance of *J. curcas* as a biofuel, and the diversity of this plant species in the state of Veracruz, molecular techniques are helpful in locating and selecting individuals for breeding programs.

Keywords: Genetic diversity, Phorbol esters, *Jatropha curcas*, Microsatellites, Veracruz

3.1 Introducción

En muchos países alrededor del mundo, el interés por estudiar a *Jatropha curcas* se ha incrementado, debido al alto potencial que tiene el aceite de sus semillas como materia prima para la producción de biodiesel. *Jatropha curcas* pertenece a la familia Euphorbiaceae, en México se le conoce como “piñón” o piñoncillo (Rodríguez-Acosta *et al.*, 2009). Esta planta puede llegar a alcanzar hasta 7 m de altura y tiene una longevidad de alrededor de 50 años (Achten *et al.*, 2008). *J. curcas* crece en diversas condiciones de suelo y clima (Herrera *et al.*, 2010), aunque preferentemente se le encuentra en zonas de clima tropical y subtropical (Pecina-Quintero *et al.*, 2011). La planta es utilizada generalmente como cerco vivo (Reyes y Rosado, 2000) y en algunas comunidades rurales de los estados de Veracruz y Puebla, las semillas se utilizan en la preparación de platillos locales (Makkar *et al.*, 1998; Martínez-Herrera *et al.*, 2006).

La amplia distribución de *J. curcas* en México, y la presencia de 46 especies del género (Steinmann, 2002), ubican a este país como centro de origen; de donde fue dispersada por comerciantes Portugueses a Tailandia y otros países asiáticos, hace más de dos siglos (Sun *et al.*, 2008; Senthil Kumar *et al.*, 2009; Tatikonda *et al.*, 2009; Sirithunya y Ukoskit, 2010; Ovando-Medina *et al.*, 2011a). Adicionalmente en el municipio de Papantla, Veracruz, se ha documentado la presencia de accesiones no tóxicas las cuales contienen poco o nulo contenido de ésteres de forbol (Makkar *et al.*, 1998).

El establecimiento de plantaciones comerciales de *J. curcas* en México y en otros países, se ha visto limitado por problemas como: 1) alta variabilidad en rendimiento por planta 2) asincronía en la maduración del fruto, 3) presencia de compuestos tóxicos en el aceite y subproductos, y 4) ataque de plagas y enfermedades. Lo cual puede explicarse dado que la planta aún se encuentra en un proceso de domesticación, y por tanto se requiere seleccionar individuos con características sobresalientes en un programa de mejoramiento genético (Grativol *et al.*, 2011).

El uso de marcadores moleculares de ADN, es una herramienta utilizada con éxito en muchas especies de plantas de importancia comercial en la búsqueda de diversidad genética (Botta *et al.*, 1995; Varshney *et al.*, 2005). Existen varios estudios sobre la diversidad genética de *J. curcas* con el uso de diferentes marcadores moleculares. Basha y Sujatha (2007), reportaron niveles bajos de diversidad genética al analizar 42 accesiones de *J. curcas* procedentes de diferentes regiones de la India, utilizaron 400 primers RAPD y 100 ISSR, encontrando un polimorfismo del

42% y 33.5% para cada tipo de primer usado respectivamente. En un estudio posterior, Ranade *et al.* (Ranade *et al.*, 2008), con siete primers RAPD's y cuatro DAMD, encontraron niveles altos de variación genética en 12 accesiones de *J. curcas* recolectados en India, atribuido al incremento de la variabilidad genética a la inclusión de materiales silvestres.

La obtención de nuevas secuencias de microsatélites para *J. curcas* (Pamidimarri *et al.*, 2009), así como la utilización de microsatélites de especies relacionadas, como *Manihot esculena* (Wen *et al.*, 2010), ha hecho posible revelar la diversidad genética entre accesiones recolectadas en diferentes sitios geográficos y dilucidar relaciones filogenéticas entre algunas especies del género *Jatropha* (Sudheer *et al.*, 2011). Además, han resultado útiles para diferenciar entre accesiones tóxicas y no tóxicas.

Sin embargo, en la mayoría de los estudios con microsatélites, u otros marcadores moleculares de ADN, se ha reportado una baja diversidad genética en accesiones de *J. curcas* provenientes de un mismo país y sólo se ha encontrado alguna variabilidad genética cuando se han incluido accesiones procedentes de diferentes países. En China (Sun *et al.*, 2008), se analizaron 58 accesiones de *J. curcas* con marcadores microsatélites y AFLP's, se encontró que de 77 loci de microsatélites probados, solo uno resultó polimórfico con dos alelos, mientras que de siete AFLP's, el 14.3% mostraron ser polimórficos. No obstante, sólo con los microsatélites pudo encontrarse variabilidad genética entre accesiones de China y Malasia.

En estudios donde se han incluido accesiones Mexicanas, la variabilidad detectada se atribuye a la presencia de accesiones mexicanas, generalmente no tóxicas (Na-ek *et al.*, 2011). En el análisis de accesiones tóxicas y no tóxicas mediante microsatélites, se ha puesto especial atención en identificar marcadores de microsatélites que ayuden a diferenciarlas. Basha *et al.* (2009), probaron 17 microsatélites en 72 accesiones provenientes de 13 países. Con el microsatélite jcSSR26, obtuvieron 4 alelos de los cuales uno resultó específico para las accesiones no tóxicas. Por otra parte, Sudheer *et al.* (Sudheer Pamidimarri *et al.*, 2009) encontraron un alelo homocigoto en accesiones tóxicas con el microsatélite jcms21 en seis accesiones divergentes, donde se incluyó una accesión no tóxica procedente de México. Tanya *et al.* (2011) reportaron que cinco microsatélites (MPN006, MPN007, MPN008, MPN016, MPN046) de 49 diseñados por ellos, mostraron claramente distintos patrones de bandeo entre 26 accesiones mexicanas no tóxicas y 10 accesiones asiáticas tóxicas. Sin embargo, si bien los autores indicaron la utilidad de estos nuevos microsatélites para diferenciar entre accesiones

tóxicas y no tóxicas, queda poco claro si la variabilidad genética encontrada pudo estar relacionada a la procedencia de las accesiones más que a su toxicidad.

En México, la información disponible sobre la diversidad genética de *J. curcas* es limitada. Sin embargo, se han reportado estudios en materiales procedentes del estado de Chiapas, al sureste de México, los cuales han sugerido la existencia de una alta diversidad genética. Pecina *et al.* (2011), utilizando seis marcadores AFLP en 88 accesiones de *J. curcas*, reportaron niveles altos de polimorfismo (90 %) y de diversidad genética (60 %). Resultados similares fueron obtenidos por Ovando *et al.* (2011b), quienes también con marcadores AFLP analizaron cinco poblaciones de *J. curcas* colectadas en cercos vivos, el polimorfismo obtenido por ellos fue de 81.18 % y de acuerdo con la AMOVA, la mayor variación se encontró dentro de la población (87.8 %) que entre las poblaciones (7.88%).

Con base en estos antecedentes, los objetivos de este estudio fueron conocer la diversidad genética disponible en el germoplasma de *J. curcas* del estado de Veracruz, México con el uso de marcadores microsatélites y buscar su relación con el contenido de ésteres de forbol; además identificar individuos de elevada diversidad genética y baja toxicidad, con potencial para integrarse en programas de mejoramiento genético.

3.2 Materiales y métodos

Material vegetal

En los meses de septiembre y octubre, se realizó una búsqueda y localización de plantas de *J. curcas* en diferentes localidades del estado de Veracruz (Figura 8).

La recolecta de accesiones se realizó, en los distintos tipos de vegetación, clima y altitud, para obtener materiales silvestres o cultivados presentes en el estado. Se recolectaron un total de 64 accesiones (Cuadro 6), de éstos se tomó una muestra de hojas jóvenes para la extracción de ADN. Las hojas se desinfectaron con una solución de cloro al 5% y se conservaron en bolsas plásticas con sílica hasta su procesamiento en el laboratorio. Durante la recolecta, 38 plantas se encontraban en etapa de fructificación por lo que se tomó una muestra de 500 g de semilla para determinar el contenido de ésteres de forbol y determinar su toxicidad.

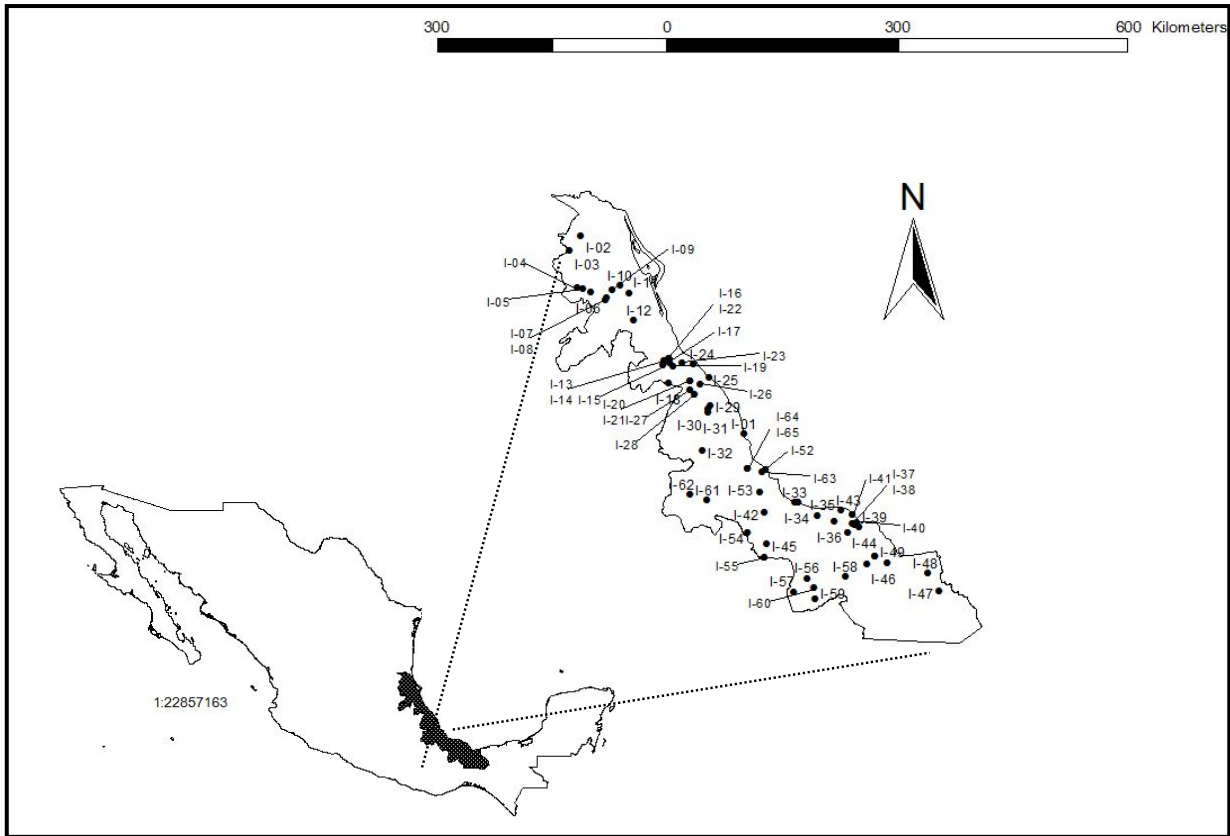


Figura 8. Ubicación de los sitios de recolecta de accesiones de *J. curcas* en el estado de Veracruz, México

Extracción de ADN, amplificación y análisis de microsatélites

La extracción de ADN se realizó a partir de 200 mg de tejido foliar seco, con el kit comercial *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Alemania) siguiendo las especificaciones del proveedor. La concentración y calidad del ADN se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. La concentración de ADN se estandarizó para todas las accesiones antes de realizar las amplificaciones.

Cuadro 6. Clave, municipio, región, coordenadas geográficas y altitud de los sitios donde se recolectaron las accesiones de *J. curcas* en el estado de Veracruz, México

| Clave | Municipio | Región | Latitud (N) | Latitud (O) | Altitud (m snm) |
|-------|----------------------|---------------|-------------|-------------|-----------------|
| I-01 | Actopan | Capital | 19°35' | 96°23' | 4 |
| I-02 | Panuco | Huasteca Alta | 21°54' | 98°17' | 30 |
| I-03 | El Higo | Huasteca Alta | 21°45' | 98°25' | 20 |
| I-04 | Tantoyuca | Huasteca Alta | 21°18' | 98°20' | 130 |
| I-05 | Tantoyuca | Huasteca Alta | 21°18' | 98°16' | 94 |
| I-06 | Tantoyuca | Huasteca Alta | 21°15' | 98°10' | 113 |
| I-07 | Ixcatepec | Huasteca Baja | 21°10' | 98°00' | 258 |
| I-08 | Ixcatepex | Huasteca Baja | 21°11' | 97°59' | 228 |
| I-09 | Chontla | Huasteca Baja | 21°17' | 97°55' | 281 |
| I-10 | Tantima | Huasteca Baja | 21°20' | 97°50' | 184 |
| I-11 | Tancoco | Huasteca Baja | 21°14' | 97°43' | 136 |
| I-12 | Temapache | Huasteca Baja | 20°55' | 97°40' | 31 |
| I-13 | Papantla | Totonaca | 20°27' | 97°19' | 173 |
| I-14 | Papantla | Totonaca | 20°27' | 97°19' | 170 |
| I-15 | Papantla | Totonaca | 20°24' | 97°19' | 98 |
| I-16 | Papantla | Totonaca | 20°19' | 97°16' | 31 |
| I-17 | Papantla | Totonaca | 20°15' | 97°15' | 77 |
| I-18 | Papantla | Totonaca | 20°11' | 97°15' | 119 |
| I-19 | Papantla | Totonaca | 20°23' | 97°12' | 64 |
| I-20 | San Rafael | Nautla | 20°13' | 97°01' | 35 |
| I-21 | San Rafael | Nautla | 20°12' | 97°00' | 96 |
| I-22 | Papantla | Totonaca | 20°28' | 97°15' | 43 |
| I-23 | Gutiérrez Zamora | Totonaca | 20°26' | 97°06' | 10 |
| I-24 | Tecolutla | Totonaca | 20°24' | 96°59' | 5 |
| I-25 | Tecolutla | Totonaca | 20°15' | 96°48' | 5 |
| I-26 | San Rafael | Nautla | 20°10' | 96°53' | 9 |
| I-27 | Martínez de la Torre | Nautla | 20°06' | 96°00' | 70 |
| I-28 | Misantla | Nautla | 20°03' | 96°58' | 54 |
| I-29 | Misantla | Nautla | 19°55' | 96°46' | 366 |
| I-30 | Misantla | Nautla | 19°53' | 96°48' | 631 |
| I-31 | Yecuatla | Nautla | 19°50' | 96°48' | 1054 |
| I-32 | Coatepec | Capital | 19°24' | 96°52' | 892 |
| I-33 | Alvarado | Papaloapan | 18°47' | 95°47' | 21 |
| I-34 | Alvarado | Papaloapan | 18°47' | 95°45' | 22 |
| I-35 | Lerdo de Tejada | Papaloapan | 18°38' | 95°31' | 5 |
| I-36 | Ángel R. Cabada | Papaloapan | 18°34' | 95°20' | 160 |
| I-37 | Catemaco | Tuxtlas | 18°32' | 95°07' | 783 |
| I-38 | Catemaco | Tuxtlas | 18°31' | 95°05' | 520 |
| I-39 | Catemaco | Tuxtlas | 18°29' | 95°02' | 67 |
| I-40 | Catemaco | Tuxtlas | 18°33' | 95°03' | 24 |
| I-41 | San Andrés Tuxtla | Tuxtlas | 18°38' | 95°06' | 8 |
| I-42 | San Andrés Tuxtla | Tuxtlas | 18°40' | 96°09' | 30 |

| | | | | | |
|------|--------------------|------------|--------|--------|------|
| I-43 | San Andrés Tuxtla | Tuxtlas | 18°41' | 95°14' | 16 |
| I-44 | San Andrés Tuxtla | Tuxtlas | 18°26' | 95°10' | 258 |
| | Hueyapan de | Tuxtlas | | | |
| I-45 | Ocampo | | 18°18' | 96°06' | 490 |
| I-46 | Acayucan | Olmeca | 18°04' | 94°57' | 143 |
| I-47 | Las Choapas | Olmeca | 17°45' | 94°06' | 50 |
| I-48 | Moloacán | Olmeca | 17°57' | 94°13' | 42 |
| I-49 | Chinameca | Olmeca | 18°05' | 94°42' | 17 |
| I-51 | San Pedro Soteapan | Olmeca | 18°09' | 94°51' | 186 |
| I-52 | Veracruz | Sotavento | 19°10' | 96°8' | 10 |
| I-53 | Cotaxtla | Sotavento | 18°55' | 96°12' | 12 |
| I-54 | Tierra Blanca | Papaloapan | 18°26' | 96°20' | 55 |
| I-55 | Cosamaloapan | Papaloapan | 18°08' | 96°08' | 43 |
| I-56 | Playa Vicente | Papaloapan | 17°54' | 95°39' | 69 |
| I-57 | Playa Vicente | Papaloapan | 17°44' | 95°48' | 77 |
| I-58 | Playa Vicente | Papaloapan | 17°55' | 95°12' | 135 |
| I-59 | Xochiapa | Papaloapan | 17°39' | 95°33' | 117 |
| I-60 | Playa Vicente | Papaloapan | 17°47' | 95°34' | 157 |
| I-61 | Yanga | Montañas | 18°49' | 96°49' | 523 |
| I-62 | Ixtaczoquitlan | Montañas | 18°53' | 97°01' | 1006 |
| I-63 | Veracruz | Sotavento | 19°8' | 96°10' | 12 |
| | Manlio Fabio | Sotavento | | | |
| I-64 | Altamirano | | 19°11' | 96°20' | 16 |
| | Manlio Fabio | Sotavento | | | |
| I-65 | Altamirano | | 19°11' | 96°20' | 15 |

Se probaron 12 loci de microsatélites caracterizados previamente para *J. curcas* (Pamidimarri *et al.*, 2009). De éstos se seleccionaron seis que resultaron polimórficos: jcds10, jcds41, jcps6, jcps9, jcps21 y jcms30 (Cuadro 7). Con excepción del locus jcds41, las temperaturas de hibridación reportadas para el resto de los loci se modificaron como sigue: 59 °C para jcds10, 57 °C para jcds41 y jcps6, 65 °C para jcps9 y jcps21, y 55 °C para jcms30. El cambio de las temperaturas de hibridación se debió a que en las pruebas preliminares con las temperaturas recomendadas se observaron subproductos de la reacción de amplificación en los geles de acrilamida, por lo que se calcularon nuevas temperaturas para inhibir la aparición de éstos y obtener geles con bandas definidas y claras.

Cuadro 7. Características de los seis microsatélites utilizados

| Marcador No. GenBank | Secuencia del primer (5'-3') | T _a | A | Secuencia repetida | Tamaño del alelo (pb) |
|-------------------------|--|----------------|---|---|--------------------------|
| Jc10 (EU586340) | F: CATCAAATGCTAATGAAAGTACA R: CACACCTAGCAAACACTTTGCA | 46.5 | 4 | (TG)6CACGCA(TG)4 | 108-122 |
| Jc14 (EU586341) | F: AACACACCATGGGCCACAGGT R: TGCATGTGTGCGGGTTTGATTAC | 56.5 | 5 | (CA)6(TA)2 | 102-114 |
| Jc16 (EU586346) | F: CCAGAAGTAGAATTATAAATTTAAA R: AGCGGCTCTGACATTATGTAC | 44.0 | 4 | (AT)3G(TA)3 ... (CT)3 ...(GT)5CT(GT)3 | 288-305 |
| Jc19 (EU586347) | F: GTAAGTAGATCTCTTGTAACTAACAG R: TATCTCTTGTTCAGAAATGGAT | 48.0 | 4 | (GT)3GC(TG)2A (GT)3 | 140-165 |
| Jc21 (EU586349) | F: CCTGCTGACAGGCCATGATT R: TTTCAGTGCAGAGGTAGCTTGTATA | 54.8 | 3 | (CA)2 ... (CA)4 | 189-200 |
| Jc23 (EU586351) | F: GGGAAAGAGGCTCTTTGC R: ATGAGTTCACATAAAATCATGCA | 48.5 | 2 | (GT)5T(TG)2 | 135-144 |

T_a (°C) = temperatura de hibridación; A = Alelos

Tomado de Pamidimarri *et al.* (2009)

La amplificación de los microsatélites se realizó en un volumen de 25 µL, conteniendo: buffer TBE 1X (10 mM Trizma, 8.9 mM ácido bórico y 2 mM Na₂ EDTA), 1.5 mM de cloruro de magnesio, dNTPs a una concentración de 2 mM cada uno, 10 µM de loci de microsatélite, 25 ng de templado de ADN y 1.5 unidades de enzima Taq polimerasa (Invitrogen, California, Estados Unidos). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (*Labnet Multigene II*) con las mismas condiciones de reacción propuestas por Pamidimarri *et al.* (2009).

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis vertical (*Thermo Scientific Owl P10DS Dual Gel System*), en geles de poliacrilamida al 6% y buffer TBE 1X, siguiendo el procedimiento descrito por Benbouza *et al.* (2006). Previo a la electroforesis, el ADN se desnaturalizó 2 minutos a 92 °C. Se utilizaron dos marcadores de tamaño, uno se colocó en la primer fila del gel y consistió en 11 fragmentos desde 100 a 1100 pares de bases (pb) en incremento de 100 pb (Promega, California, Estados Unidos) y otro más se colocó en la parte media, consistente de 12 fragmentos de 500 a 12000 pb (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos). Los geles se tiñeron con nitrato de plata hasta el revelado de las bandas. Posteriormente se capturó la imagen con una cámara *Kodak Digital Science*®. Para determinar el tamaño de los alelos (pb) se utilizó el software *1D Image Analysis* (versión 3.0) tomando como referencia los dos marcadores.

Obtención y análisis de ésteres de forbol

Los ésteres de forbol se obtuvieron de acuerdo con el procedimiento descrito por Makkar y Becker (1997) con modificaciones menores. Un gramo de endospermo de semilla de *J. curcas* fue sonificado por tres minutos con 10 mL de metanol absoluto y centrifugado a 3,000 g por 8 min. Se colectó el sobrenadante y se repitió la operación de extracción dos veces más. El sobrenadante recuperado, se secó con un rotavapor a 40° C. Posteriormente, los extractos secos se re-disolvieron en 1 mL de metanol y se transfirieron a un vial de HPLC para su análisis. La cuantificación de ésteres de forbol se realizó en un HPLC Agilent 1200, utilizando una columna RP18 (Phenomenex) de 150 x 4.6 mm y 5 m. Como fase móvil se emplearon gradientes de agua y acetonitrilo. Los picos resultantes se integraron y los resultados se expresaron como equivalentes al 12-miristato-13-acetatoforbol.

Análisis de la diversidad genética

La diversidad genética se caracterizó en términos del número de alelos (N_a), niveles observados y esperados de homocigocidad (H_0) y heterocigocidad (H_E) e índice de diversidad de Nei (h) utilizando el programa Popgene (Yeh *et al.*, 2000), asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg. La información del contenido de polimorfismo (PIC) para cada locus se calculó con el complemento para Excel MICROSAT v. 2007, siguiendo la fórmula $PIC = 1 - \sum P_i$, donde P_i es la frecuencia de alelos i , en los genotipos examinados (Weir y Cockerham, 1984). La presencia de alelos nulos se calculó con la estimación de máxima verosimilitud (ML) del algoritmo EM (*Expectation-Maximization*) de Dempster *et al.* (1977) en el programa GenePop 4.0 (Rousset, 2008). El índice de fijación (F) se calculó como una medida de exceso o deficiencia de heterocigocidad dentro de la especie con el programa FSTAT versión 2.9.3.2 (Goudet, 2001). Se construyó una matriz binaria de presencia (1) o ausencia (0) de alelos y se calculó el coeficiente de similitud de Jaccard. La similitud entre las accesiones se agrupó con el método *Unweighted Pair Group Method with Averages* (UPGMA).

3.3 Resultados

Se usaron seis loci de microsatélite para caracterizar la diversidad genética de *J. curcas* en el estado de Veracruz, México. El tamaño de los alelos varió de 124 pb para jcms30 a 806 pb para

jcps6. En total se registraron 18 alelos con una media de tres alelos por locus. jc41 fue el locus que presentó mayor número de alelos, con cinco (Cuadro 8).

La heterocigocidad observada (H_O) fue entre 0 y 0.2500, mientras que la heterocigocidad esperada (H_E) estuvo entre 0.6667 y 0.8929 para los loci jc10 y jc41. La media de H_O y H_E fue de 0.125 y 0.764, respectivamente. Los valores de PIC variaron entre 0.375 y 0.746 con una media de 0.522. De acuerdo con el índice de fijación (F), se encontró un exceso de individuos homocigotos en los loci jc10, jcps6, jcps9 y jcps21.

La frecuencia de alelos nulos varió de 0.3333 para el locus jc30 a 0.7071 para los loci jc10, jcps9 y jcps21.

Cuadro 8. Polimorfismo obtenido con seis loci de microsatélites en 64 accesiones de *J. curcas*

| Locus | N | Na | H_O | H_E | h | PIC | F | Frecuencia alelos nulos |
|-----------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|-------------------------|
| jc10 | 4 | 2 | 0.000 | 0.6667 | 0.500 | 0.375 | 1.000 | 0.7071 |
| jc41 | 8 | 5 | 0.250 | 0.8929 | 0.7812 | 0.746 | 0.680 | 0.4286 |
| jcps6 | 8 | 4 | 0.000 | 0.8571 | 0.7500 | 0.703 | 1.000 | 0.5854 |
| jcps9 | 4 | 2 | 0.000 | 0.6667 | 0.5000 | 0.375 | 1.000 | 0.7071 |
| jcps21 | 4 | 2 | 0.000 | 0.6667 | 0.5000 | 0.375 | 1.000 | 0.7071 |
| jc30 | 4 | 3 | 0.500 | 0.8333 | 0.6250 | 0.555 | 0.200 | 0.3333 |
| Media | 5.333 | 3 | 0.1250 | 0.7639 | 0.6094 | 0.522 | 0.8133 | |
| Desv. Est | 1.886 | 1.155 | 0.2092 | 0.1082 | 0.1307 | | | |

N: Tamaño de muestra; Na: número de alelos; H_O : heterocigocidad observada; H_E : heterocigocidad esperada; h: índice de diversidad de Nei; PIC: Información del contenido polimórfico; F: índice de fijación

El fenograma obtenido con los valores de similitud separa las accesiones en ocho grupos (Figura 9). En el Grupo I se encuentran accesiones recolectadas en las zonas norte y centro del estado, se incluyen las recolectadas en las regiones de la Huasteca baja (6), Totonaca (11), Capital (1) y de las Montañas (2). El Grupo II se conformó por las accesiones I-03, I-26, I-44 e I-53, que corresponden a las regiones Huasteca alta, Nautla, Tuxtlas y Sotavento respectivamente. Tanto el Grupo III, como los restantes Grupos estuvieron formados por las accesiones recolectadas en las zonas centro y sur del estado, pertenecientes a las regiones Sotavento, Papaloapan, Tuxtlas y

Olmeca. Las accesiones I-40, I-63, I-60 e I-42 presentaron la mayor disimilitud y se separaron en forma individual del resto.

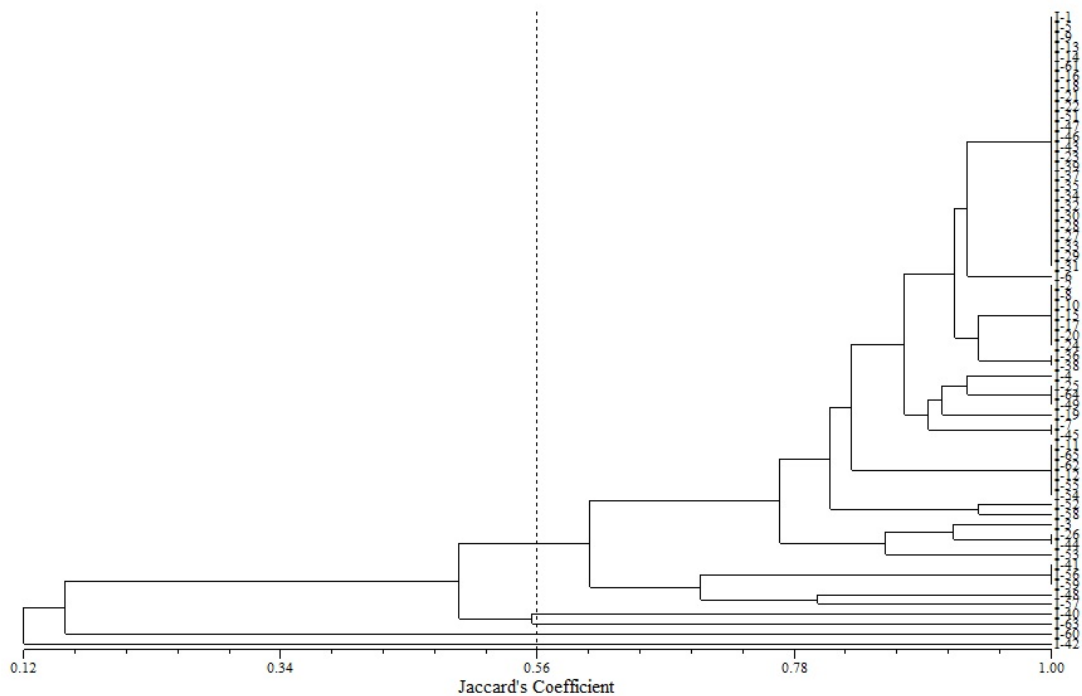


Figura 9. Fenograma de 64 accesiones de *J. curcas* agrupadas de acuerdo con el Coeficiente de Similitud de Jaccard

El análisis de ésteres de forbol, mostró que en el 63 % de las accesiones analizadas no se detectaron estos compuestos. Las accesiones restantes, se consideraron tóxicas o de baja toxicidad, con contenido de ésteres de forbol en un intervalo de 0.12 a 0.66 mg/g (Cuadro 9). Fue relevante encontrar que en las accesiones recolectadas en la región norte del estado, no se detectó la presencia de ésteres de forbol. Sin embargo, fue evidente la presencia de estos compuestos en las recolectadas en el centro y principalmente sur del estado (Figura 10).

Cuadro 9. Contenido de ésteres de forbol en accesiones de *J. curcas* recolectadas en diferentes regiones del estado de Veracruz

| Clave | Región | Esteres de forbol (mg/g) |
|-------|---------------|--------------------------|
| I-01 | Capital | 0.43 |
| I-02 | Huasteca alta | ND |
| I-04 | Huasteca alta | ND |
| I-05 | Huasteca alta | ND |
| I-08 | Huasteca baja | ND |
| I-11 | Huasteca baja | ND |
| I-13 | Totonaca | ND |
| I-14 | Totonaca | ND |
| I-16 | Totonaca | ND |
| I-18 | Totonaca | ND |
| I-22 | Totonaca | ND |
| I-25 | Totonaca | ND |
| I-26 | Nautla | ND |
| I-27 | Nautla | ND |
| I-29 | Nautla | ND |
| I-30 | Nautla | ND |
| I-31 | Nautla | ND |
| I-32 | Capital | ND |
| I-33 | Papaloapan | 0.42 |
| I-34 | Papaloapan | ND |
| I-35 | Papaloapan | 0.45 |
| I-36 | Papaloapan | 0.66 |
| I-38 | Tuxtlas | 0.12 |
| I-41 | Tuxtlas | ND |
| I-42 | Tuxtlas | 0.28 |
| I-43 | Tuxtlas | 0.44 |
| I-44 | Tuxtlas | 0.43 |
| I-45 | Tuxtlas | 0.48 |
| I-47 | Olmeca | ND |
| I-48 | Olmeca | ND |
| I-52 | Sotavento | 0.23 |
| I-53 | Sotavento | 0.16 |
| I-57 | Papaloapan | 0.23 |
| I-59 | Papaloapan | 0.38 |
| I-61 | Montañas | 0.65 |
| I-62 | Montañas | ND |
| I-64 | Sotavento | ND |
| I-65 | Sotavento | ND |

ND: No detectado

3.4 Discusión.

Los estudios de diversidad genética en germoplasma de *J. curcas* en países como India (Gupta *et al.*, 2008; Tatikonda *et al.*, 2009; Pamidimarri *et al.*, 2010), China (Sun *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2010) y Brasil (Grativol *et al.*, 2011), reportan baja variabilidad genética independientemente del marcador molecular utilizado. Sin embargo, en estudios donde se ha buscado conocer la variabilidad genética de *J. curcas* procedentes de diferentes países y se ha incluido accesiones de México, se observa una clara separación de las accesiones mexicanas (Basha y Sujatha, 2007; Basha *et al.*, 2009; Na-ek *et al.*, 2011; Tanya *et al.*, 2011). Por lo anterior, resulta de interés

particular conocer la diversidad genética de *J. curcas* en México. Aunque nuestro estudio sólo consideró el análisis genético de accesiones recolectadas en el estado de Veracruz sin considerar a otras accesiones del país, también se observó baja variabilidad genética.

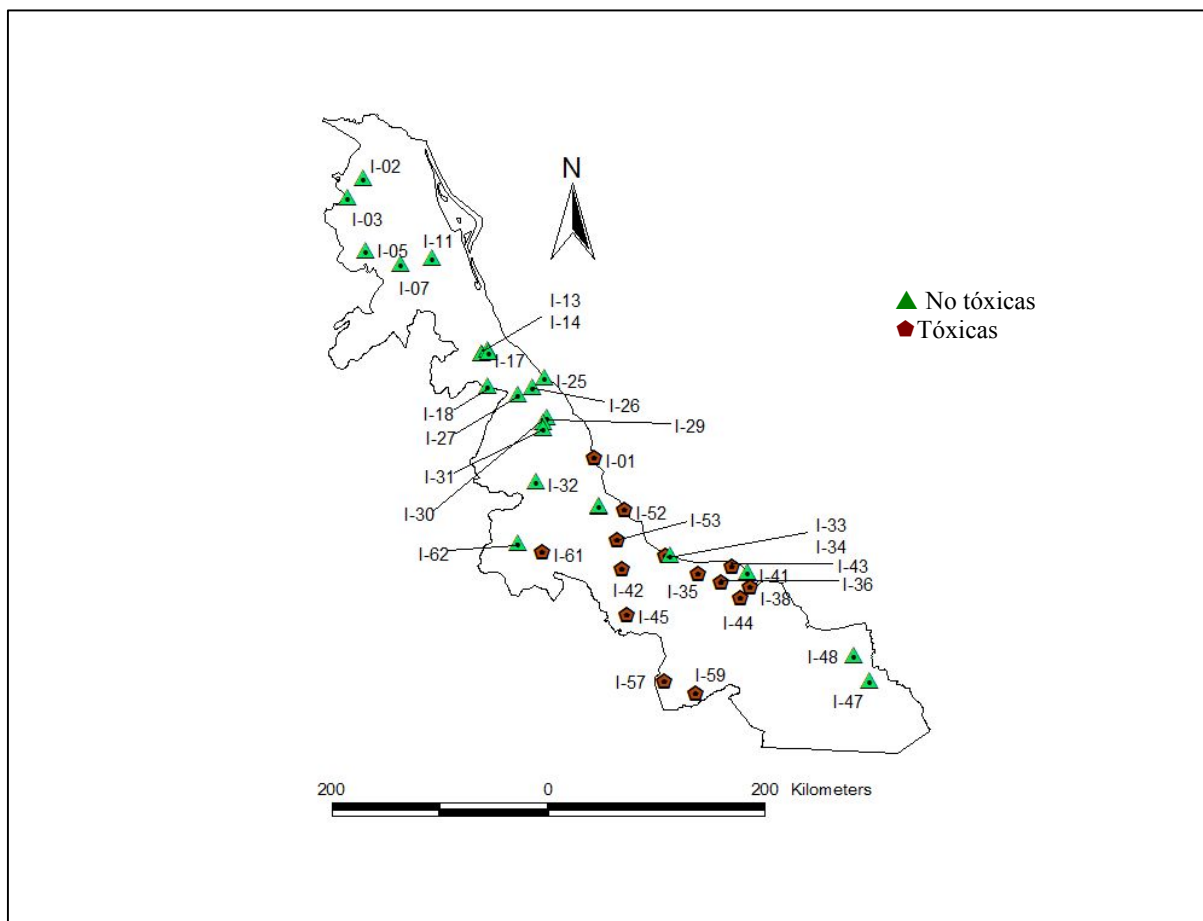


Figura 10. Distribución de accesiones tóxicas y no tóxicas de acuerdo con el sitio de recolecta en el estado de Veracruz

Los seis microsatélites utilizados, mostraron diferencias en el número y tamaño de los alelos obtenidos comparado al trabajo original de Pamidimarri *et al.* (2009). En los loci *jcds10*, *jcps9* y *jcps21*, el número de alelos disminuyó, con el locus *jcms30* se obtuvo un alelo más, mientras que con *jcds41* y *jcps6* el número de alelos fue el mismo. El tamaño de los alelos con excepción de *jcm30*, aumentó para todos los loci. La variación en el número y tamaño de los alelos registrados, deja ver las diferencias existentes entre el germoplasma mexicano y el de otras zonas

geográficas como ya se ha reportado ampliamente (Na-ek *et al.*, 2011; Ovando-Medina *et al.*, 2011a).

No obstante, entre las muestras estudiadas pudo observarse baja variabilidad genética, al observarse un déficit de heterocigotos y valores altos en el índice de fijación. La ocurrencia de un proceso de endogamia es un factor que pudiera estar contribuyendo fuertemente a esta situación. En *J. curcas* la presencia de endogamia puede estar influenciada por varios factores. Uno de ellos es su biología floral y reproductiva, dado que la producción de flores masculinas y femeninas se presentan en la misma inflorescencia, que si bien la apertura de ambas se da en forma asincrónica para evitar la autopolinización (Luo *et al.*, 2007), ésta sí llega a ocurrir con frecuencia. Recientemente Bressan *et al.* (2013), encontraron que *J. curcas* produce semillas por apomixis y una combinación de autopolinización y polinización cruzada. Aunado a esto, es común que a la planta se multiplique preferentemente por estacas (Basha *et al.*, 2009), siendo este método el de uso más común en el estado de Veracruz, situación que aumenta la probabilidad de cruzamiento entre organismos emparentados.

La presencia de alelos nulos también puede provocar que se subestime la presencia de heterocigotos (Espinoza *et al.*, 2007). Los loci *jcds10*, *jcps9*, *jcps21* y *jcps6* mostraron una alta frecuencia de alelos nulos, siendo más evidente esta condición con las accesiones I-40, I-63, I-60 e I-42. El ADN de estas accesiones amplificó con al menos uno de los loci probados, con lo que se descartó su ocurrencia como resultado del uso de ADN de mala calidad. Estas accesiones no mostraron ninguna diferencia fenotípica que las pudiera diferenciar a las demás, no obstante que en el fenograma se agruparon de forma independiente. Esto coincide con lo reportado por Pamidimarri *et al.* (2009), en relación a que los loci *jcds58*, *jcds66*, *jcps1*, *jcps6* y *jcms30* no cumplían con el equilibrio de Hardy-Weinberg y que estas desviaciones podían ser debidas a la presencia de alelos nulos o a disturbios en la dispersión natural de la planta debido al manejo antropogénico de la especie.

En el fenograma se observó que las accesiones recolectadas en el norte del estado se agruparon. Por otro lado, las accesiones de las regiones del centro y del sur del estado se distribuyeron entre los diferentes grupos formados. Esta distribución podría relacionarse con el uso que las personas dan a la planta en las distintas regiones del estado donde fueron colectadas. Mientras que en la región sur la planta se le utiliza preferentemente como cerco vivo (Reyes y Rosado, 2000), en la región del Totonacapan, ubicada en el norte del estado, las semillas de *J. curcas*, después de

tostarse, son empleadas en la preparación de alimentos (Herrera *et al.*, 2010). Datos no publicados sugieren que debido al alto aprecio que tienen estos habitantes por el consumo de las semillas, han transportado plantas originarias del norte hacia otras partes del estado.

Los resultados indican que el contenido de ésteres de forbol ha determinado el uso de la planta y con ello su distribución. La presencia de ésteres de forbol en accesiones ubicadas en las regiones centro y sur del estado, y la ausencia de los mismos en las accesiones de la región norte, puede tener un origen antropogénico de selección y domesticación de la especie por los antiguos Totonacos, y su distribución antrópica tendría relación con su uso comestible.

Los ésteres de forbol son una familia de compuestos químicos presentes en muchas especies de plantas de las familias Euphorbiaceae y Thymelaeaceae (Haas y Mittelbach, 2000). Existe gran interés por encontrar marcadores que puedan diferenciar plantas de *J. curcas* tóxicas y no tóxicas, lo que permitiría el desarrollo de nuevas variedades. De acuerdo con el fenograma obtenido en este estudio, ninguno de los seis microsatélites utilizados separaron las accesiones tóxicas de las no tóxicas, resultados similares pero con diferentes microsatélites fueron reportados por Na-ek *et al.* (2011). Sin embargo, Sudheer *et al.* (2009) reportaron la identificación de marcadores de RAPD, AFLP y microsatélites útiles en la diferenciación de accesiones tóxicas y no tóxicas. El locus de microsatélite jcms21, mostró un alelo homocigoto para la variedad tóxica. Por otra parte, Tanya *et al.* (2011) desarrollaron 49 loci de microsatélites de los cuales, cinco mostraron distintos patrones de bandeo entre 26 accesiones mexicanas no tóxicas y 10 accesiones asiáticas tóxicas.

Dado que *J. curcas* presenta polinización cruzada (Ganesh Ram *et al.*, 2008), existe el riesgo de la aparición de genotipos tóxicos, en áreas donde normalmente crecen los no tóxicos y donde sus semillas son usadas para la alimentación de las personas.

3.5 Conclusiones

Los marcadores moleculares de microsatélites resultaron muy útiles para conocer la diversidad de *J. curcas* en el estado de Veracruz. Los loci de microsatélites agruparon las accesiones de acuerdo con el sitio de recolecta, pero ninguno de ellos fue capaz de diferenciar entre genotipos tóxicos y no tóxicos. La presencia de ambos genotipos en el estado de Veracruz, requiere de mayor investigación sobre los factores evolutivos, genéticos, climáticos o fisiológicos que

influyen para el establecimiento de las accesiones no tóxicas de manera casi exclusiva en el estado de Veracruz, México.

3.6 Literatura citada

- Achten, W. M. J., L. Verchot, Y. J. Franken, E. Mathijs, V. P. Singh, R. Aerts y B. Muys. 2008. *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass and Bioenergy* 32: 1063-1084.
- Basha, S., F. George, H. Makkar, K. Becker y M. Sujatha. 2009. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. *Plant Science* 176: 812 - 823.
- Basha, S. D. y M. Sujatha. 2007. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific scar markers. *Euphytica* 156: 375-386.
- Benbouza, H., J. M. Jacquemin, J. P. Baudoin y G. Mergeai. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 10: 77-81.
- Botta, R., N. Scott, I. Eynard y M. Thomas. 1995. Evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing. *Vitis vinifera*: 99-102.
- Bressan, E. A., A. M. Sebbenn, R. R. Ferreira, T. S. G. Lee y A. Figueira. 2013. *Jatropha curcas* L.(Euphorbiaceae) exhibits a mixed mating system, high correlated mating and apomixis. *Tree Genetics & Genomes*: 1-9.
- Dempster, A. P., N. M. Laird y D. B. Rubin. 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 39: 1-38.
- Espinoza, J. L., E. Fuentes-Contreras, W. Barros y C. Ramírez. 2007. Utilización de microsatélites para la determinación de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) en Chile central. *Agricultura Técnica* 67: 244-252.
- Ganesh Ram, S., K. T. Parthiban, R. Senthil Kumar, V. Thiruvengadam y M. Paramathma. 2008. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 803-809.

- Goudet, J. 2001. Fstat, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9. 3).
- Grativol, C., C. Lira-Medeiros, A. Hemerly y P. Ferreira. 2011. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. *Molecular Biology Reports* 38: 4245-4256.
- Gupta, S., M. Srivastava, G. P. Mishra, P. K. Naik, R. S. Chauhan, S. K. Tiwari, M. Kumar y R. Singh. 2008. Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. *African Journal of Biotechnology* 7: 4230-4243.
- Haas, W. y M. Mittelbach. 2000. Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L. *Industrial Crops and Products* 12: 111-118.
- Herrera, J. M., A. L. M. Ayala, H. Makkar, G. Francis y K. Becker. 2010. Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *European Journal of Scientific Research* 39: 396-407.
- Luo, C.-w., K. Li, Y. Chen y Y.-y. Sun. 2007. Floral display and breeding system of *Jatropha curcas* L. *Forestry Studies in China* 9: 114-119.
- Makkar, H. y K. Becker. 1997. Potential of *J. Curcas* seed meal as a protein supplement to livestock feed; constraints to its utilization and possible strategies to overcome constraints. *DBV Graz*: 190 - 205.
- Makkar, H. P. S., K. Becker y B. Schmook. 1998. Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. *Plant Foods for Human Nutrition* 52: 31-36.
- Martínez-Herrera, J., P. Siddhuraju, G. Francis, G. Dávila-Ortíz y K. Becker. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food Chemistry* 96: 80-89.
- Na-ek, Y., A. Wongkaew, T. Phumichai, N. Kongsiri, R. Kaveeta, T. reewongchai y C. Phumichai. 2011. Genetic diversity of physic nut (*Jatropha curcas* L.) revealed by SSR markers. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 14: 105-110.

- Ovando-Medina, I., F. Espinosa-García, J. Núñez-Farfán y M. Salvador-Figueroa. 2011a. State of the art of genetic diversity research in *Jatropha curcas*. *Sci Res Essays* 6: 1709-1719.
- Ovando-Medina, I., A. Sánchez-Gutiérrez, L. Adriano-Anaya, F. Espinosa-García, J. Núñez-Farfán y M. Salvador-Figueroa. 2011b. Genetic diversity in *Jatropha curcas* populations in the state of Chiapas, Mexico. *Diversity* 3: 641-659.
- Pamidimarri, D. V. N. S., S. Mastan, H. Rahman y M. Reddy. 2010. Molecular characterization and genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. in India using RAPD and AFLP analysis. *Molecular Biology Reports* 37: 2249-2257.
- Pamidimarri, D. V. N. S., R. Sinha, P. Kothari y M. P. Reddy. 2009. Isolation of novel microsatellites from *Jatropha curcas* L. and their cross-species amplification. *Molecular Ecology Resources* 9: 431-433.
- Pecina-Quintero, V., J. L. Anaya-López, A. Z. Colmenero, N. M. García, C. A. Núñez Colín, J. L. Solís Bonilla, M. R. Aguilar-Rangel, H. R. Gill Langarica y D. J. Méjia Bustamante. 2011. Molecular characterisation of *Jatropha curcas* L. genetic resources from Chiapas, Mexico through AFLP markers. *Biomass and Bioenergy* 35: 1897-1905.
- Ranade, S. A., A. P. Srivastava, T. S. Rana, J. Srivastava y R. Tuli. 2008. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. *Biomass and Bioenergy* 32: 533-540.
- Reyes, S. A. y I. A. Rosado. 2000. Plantas utilizadas como cercas vivas en el estado de Veracruz. *Madera y Bosques* 6: 55-71.
- Rodríguez-Acosta, M., K. Vega-Flores, V. H. De Gante-Cabrera y J. Jiménez-Ramírez. 2009. Distribución del género *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) en el estado de Puebla, México. *Polibotánica*: 37-48.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: A complete re-implementation of the genepop software for windows and linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.
- Senthil Kumar, R., K. T. Parthiban y M. Govinda Rao. 2009. Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Biology Reports* 36: 1951-1956.
- Shen, J.-l., X.-n. Jia, H.-q. Ni, P.-g. Sun, S.-h. Niu y X.-y. Chen. 2010. AFLP analysis of genetic diversity of *Jatropha curcas* grown in Hainan, China. *Trees* 24: 455-462.

- Sirithunya, P. y K. Ukoskit. 2010. Population genetic structure and genetic diversity of *Jatropha curcas* germplasm as investigated by 5'-anchored simple sequence repeat primers. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 13: 147-153.
- Steinmann, V. W. 2002. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*: 61-93.
- Sudheer Pamidimarri, D. V. N., S. Singh, S. Mastan, J. Patel y M. Reddy. 2009. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. *Molecular Biology Reports* 36: 1357-1364.
- Sudheer, P. V. N., S. Mastan, H. Rahman, C. Ravi Prakash, S. Singh y M. Reddy. 2011. Cross species amplification ability of novel microsatellites isolated from *Jatropha curcas* and genetic relationship with sister taxa. *Molecular Biology Reports* 38: 1383-1388.
- Sun, Q.-B., L.-F. Li, Y. Li, G.-J. Wu y X.-J. Ge. 2008. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. *Crop Science* 48: 1865-1871.
- Tanya, P., S. Dachapak, M. Tar y P. Srinives. 2011. New microsatellite markers classifying nontoxic and toxic *Jatropha curcas*. *Journal of Genetics*: 1-3.
- Tatikonda, L., S. Wani y S. Kannan. 2009. Aflp-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L. a biofuel plant. *Plant Science* 176: 505 - 513.
- Varshney, R. K., A. Graner y M. E. Sorrells. 2005. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends in biotechnology* 23: 48-55.
- Weir, B. S. y C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wen, M., H. Wang, Z. Xia, M. Zou, C. Lu y W. Wang. 2010. Development of EST-SSR and genomic-SSR markers to assess genetic diversity in *Jatropha curcas* L. *BMC Research Notes* 3: 42.
- Yeh, F., R. Yang, T. Boyle, Z. Ye y J. Xiyan. 2000. Popgene32, microsoft windows-based freeware for population genetic analysis, version 1.32.

CAPITULO IV. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE SEMILLAS, CONTENIDO DE ACEITE Y TOXICIDAD EN ACCESIONES DE *Jatropha curcas* L. RECOLECTADAS EN VERACRUZ, MÉXICO

Resumen

Jatropha curcas es una planta oleaginosa nativa de México y Centroamérica. El aceite extraído de sus semillas fácilmente puede ser convertido a biodiesel. Debido a la falta de variedades comerciales disponibles existen problemas en su establecimiento y cultivo, afectándose la producción y el rendimiento de aceite. El presente estudio propone caracterizar la morfología de las semillas, contenido de aceite, ésteres de forbol y ácidos grasos en accesiones de *J. curcas* recolectadas en diferentes regiones del estado de Veracruz, México. Se determinó el número de semillas por fruto y se les midió el largo, ancho, grosor, esfericidad y peso. Se calculó el porcentaje de aceite en la semilla mediante extracción con hexano. Los ésteres de forbol se determinaron mediante HPLC y la concentración de ácidos grasos mediante cromatografía de gases. La mayoría de los frutos mostraron un contenido de tres semillas. La accesión I-61, colectada en la región de las Montañas, presentó las semillas más largas (2.00 ± 0.05 cm) y pesadas (0.91 ± 0.06 g). El porcentaje de aceite en semilla varió de 26 a 55 %. No se detectaron ésteres de forbol en los accesos colectados en las regiones Huasteca Alta, Huasteca Baja, Totonaca y Nautla. En las demás regiones se encontraron en concentraciones de 0.12 a 0.59 mg/g. Los ácidos grasos identificados en mayor proporción fueron el oléico y el linoléico. La accesión I-62 fue el mejor candidato para ser integrada a un programa de mejoramiento genético dadas sus características morfológicas de semilla, contenido de aceite y sin ésteres de forbol.

Palabras clave: *Jatropha curcas*, caracterización morfológica, ésteres de forbol, lípidos

MORPHOLOGICAL SEEDS TRAITS, OIL CONTENT AND TOXICITY OF *Jatropha curcas* L. ACCESSIONS RE COLLECTED FROM VERACRUZ, MEXICO

Abstract

Jatropha curcas is a native oleaginous plant in Mexico and Central America. The oil extracted from its seeds can easily be converted to biodiesel. Due to the lack of commercial varieties available there are problems in their establishment and cultivation, affecting production and oil yield. This study aimed to characterize the morphology of seeds, oil content, phorbol esters and fatty acids in *J. curcas* accessions collected from different regions of the state of Veracruz, Mexico. The number of seeds per fruit was determined and was measured the length, width, thickness, sphericity and weight. The percentage of oil in the seeds was estimated by extraction with hexane. Phorbol esters were determined by HPLC and the concentration of fatty acids by gas chromatography. Most of the fruits showed a content of three seeds. The I-61 accession, collected in the Montaña region, presented the longest seeds (2.00 ± 0.05 cm) and heavy (0.91 ± 0.06 g) seeds. The percentage of oil in seed, ranged from 26 to 55%. The phorbol ester content correlated with the collection region (0.63) and were found in concentrations of 0.12 to 0.59 mg / g. Oleic and linoleic fatty acids were identified in a greater proportion. The I-62 accession was the best candidate to be integrated into a breeding program given the best morphological traits, high oil yield (50%) and without phorbol esters.

Keywords: *Jatropha curcas*, morphological characterization, phorbol esters, lipids

4.1 Introducción

El uso de las energías alternas y renovables, se ha impulsando como una medida para atender las necesidades energéticas ante el agotamiento eventual de las reservas petroleras en el mundo. Para la producción de bioetanol y biodiesel, dos de los principales biocombustibles líquidos, se han utilizado diversas materias primas.

En el caso del bioetanol, destaca el uso de la caña de azúcar y el maíz, mientras que para el biodiesel, los aceites procedentes de oleaginosas como colza, girasol, soya y palma aceitera (Abdulla *et al.*, 2011). Sin embargo, la demanda creciente de éstos productos en la producción de biocombustibles afecta su precio en el mercado, ya que son utilizados en la alimentación humana y/o animal. Esto ha ocasionado la búsqueda de especies de bajo o nulo valor alimenticio que puedan ser utilizadas como materia prima en la producción de biocombustibles (Wang *et al.*, 2011). En esta búsqueda, el uso del aceite de *J. curcas* es una alternativa de gran potencial para la producción de biodiesel.

Jatropha curcas o “piñón” es un arbusto que pertenece a la familia Euforbiaceae, que se distribuye ampliamente regiones tropicales y subtropicales de México (Herrera *et al.*, 2010).

El interés por utilizar esta planta en la producción de biocombustibles se basa, es debido a su alto contenido de aceite en la semilla ($\approx 40\%$) (Achten *et al.*, 2008), su tolerancia a la sequía y a su rápido crecimiento vegetativo (Openshaw, 2000).

En varios estados del país se ha promovido el establecimiento de plantaciones de *J. curcas*, observándose variaciones en la producción de frutos, semillas, y aceite, así como una alta incidencia de plagas y enfermedades, lo que tiene relación con el germoplasma utilizado en la propagación, proviene de materiales semidomesticados sin un proceso previo de selección genética. Estudios recientes con marcadores moleculares en accesiones procedentes de varios países de América, África y Asia, han ubicado a México y Centroamérica como el centro de origen de *J. curcas* (King *et al.*, 2015; Trebbi *et al.*, 2015). Esta planta se distribuye en muchos estados de México, incluido Veracruz, estado donde se ha reportado el consumo de las semillas previamente tostadas (Martínez-Herrera *et al.*, 2006). No obstante que está ampliamente documentado la toxicidad en semillas de esta planta debido a la presencia de varios compuestos antinutricionales (Shukla *et al.*, 2015) y ésteres de forbol (de Azevedo Peixoto *et al.*, 2016). El estado de Veracruz se extiende del noroeste al sureste sobre la costa en México. La orografía genera condiciones edafoclimáticas contrastantes donde la planta de *J. curcas* crece, esto

puede tener un efecto sobre el contenido y toxicidad del aceite y otras características morfoproductivas de la planta, que permitan seleccionar materiales promisorios para programas de mejoramiento genético. La presente investigación tuvo como objetivo realizar una caracterización de *J. curcas* en cuanto a las características morfológicas de las semillas, y el contenido y toxicidad del aceite de accesiones de *J. curcas* recolectadas en Veracruz, México.

4.2 Materiales y métodos

Se recolectaron plantas de *J. curcas* en las 10 regiones que conforman al estado de Veracruz, clasificadas en base a las condiciones ecogeográficas y/o predominio de algún grupo étnico (INAFED, 2015). Una vez ubicadas las plantas, se tomaron los datos pasaporte de las accesiones. A 40 frutos maduros se les determinó el contenido de semillas y 50 semillas se pesaron, midieron, el largo, el ancho, el grosor y se calculó el índice de esfericidad de acuerdo con la fórmula:

$$\theta = \frac{abc}{a^3}^{1/3}$$

Donde:

θ = Esfericidad

a= largo

b= ancho

c= grosor

Se determinó el contenido de aceite, para lo cual las semillas se molieron con nitrógeno líquido, se liofilizaron y se realizó la extracción con hexano expresando el resultado en porcentaje.

Los ésteres de forbol se determinaron de acuerdo con el procedimiento descrito por Makkar y Becker (1997) con modificaciones menores. Las semillas se molieron en un mortero con nitrógeno líquido, posteriormente se tomó un gramo del endospermo de semilla de *J. curcas* y se sonicó (Sonicador Branson 5510) por tres minutos con 10 mL de metanol absoluto y centrifugado a 3,000 rpm durante 8 min. Se colectó el sobrenadante y se repitió la operación de extracción dos veces más. El sobrenadante recuperado, se secó con un rotavapor (Buchi R210) a 40 °C y posteriormente, los extractos secos se disolvieron en 1 mL de metanol y se transfirieron a

un vial de HPLC para su análisis. La cuantificación de ésteres de forbol se realizó en un HPLC (Agilent 1200), utilizando una columna RP18 (Phenomenex) de 150 x 4.6 mm y 5 m. Como fase móvil se emplearon gradientes de agua y acetonitrilo. Los picos resultantes se integraron y los resultados se expresaron como equivalentes al 12-miristato-13-acetatoforbol. El análisis estadístico descriptivo y categórico de los datos se hizo con el software Statistica, versión 7.1.

La cuantificación de ácidos grasos se realizó mediante cromatografía de gases, para la extracción se utilizaron 50 mg de semilla liofilizada de *J. curcas*, los cuales fueron centrifugados con 5 mL de hexano a 3500 rpm. Se recuperó el solvente y se añadieron 50 µL de ácido heptadecanoico a una concentración de 10 mg/mL, como estándar interno. El solvente se evaporó mediante un flujo de nitrógeno y se calculó el aceite recuperado. La derivatización de los ácidos grasos a metilésteres se realizó utilizando el procedimiento propuesto por Morrison y Smith (1964), donde al aceite extraído se le agregó un mL de solución de NaOH en metanol (0.2 g/mL) y la mezcla fue calentada a 75 °C por 30 min. La mezcla se dejó enfriar y se le agregó un mL de solución al 14 % de trifluoruro de boro en metanol por 20 min hasta su completa derivatización. La extracción de los metil ésteres de ácidos grasos (FAME) se extrajeron utilizando un mL de agua milli-Q y 2 mL de hexano. La fase orgánica fue colectada y la fase acuosa fue removida con sulfato de sodio. La solución fue transferida a un vial para cromatografía de gases y el solvente fue eliminado con un flujo de nitrógeno. El extracto final fue resuspendido en un mL de hexano. De esta solución se tomó 1 µL el cual fue inyectado a un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies). La separación cromatográfica se realizó mediante una columna DB-WAX recubierta con polietilenglicol como fase estacionaria. La temperatura inicial fue de 50 °C mantenida por un minuto e incrementada 25 °C/min hasta alcanzar los 200 °C, seguida por incrementos de 3 °C/min hasta alcanzar los 230 °C y mantenida por 18 min. Se utilizó helio como gas acarreador en un flujo de 24 mL/min. Como detector, se utilizó un espectrómetro de masas con una fuente electrospray y un analizador cuadrupole (Agilent Technologies 5975, USA).

El análisis estadístico y descriptivo de los datos se hizo con el software Statistica, versión 7.1. Se realizó un análisis de correlación entre las variables del tamaño, lugar de colecta, número de semillas por fruto, tamaño y peso de la semilla, contenido de aceite y perfil de lípidos.

4.3 Resultados y discusión

Se localizaron y georeferenciaron 40 accesiones de *J. curcas* en etapa de fructificación en diferentes regiones del estado de Veracruz, en altitudes desde los 4 m (I-01) hasta los 1,054 m (I-31). Sin embargo, el 80 % de las accesiones recolectadas se ubicaron en altitudes menores de 366 m (Cuadro 10). La presencia de la planta a altitudes mayores de 600 m y con presencia de clima templado fue baja (región Montañas y Capital). En estas condiciones las plantas mostraron poco desarrollo, coincidiendo con lo reportado por Maes *et al.* (2009), que mencionan que *J. curcas* es sensible a las bajas temperaturas (menos de 7 °C), presentando pérdida de hojas y una reducción en la producción de frutos; en contraste su mejor desarrollo se alcanza en climas tropicales y subtropicales (Núñez-Colín y Goytia-Jiménez, 2009).

Número de semillas por fruto

Se encontraron frutos que contenían de una a cuatro semillas. Los frutos con tres semillas se observaron con mayor frecuencia (Figura 11). Las accesiones que presentaron predominio de dos semillas por fruto fueron: I-04, I-13, I-14, I-77, I-61, I-33, I-34, I-44, I-47 y I-48; mientras que en I-22, recolectada en la región Totonaca, se caracterizó porque el 50 % de sus frutos contenían una única semilla. La frecuencia alta de frutos con tres semillas concuerda con lo encontrado en otros estudios (Makkar *et al.*, 1998). Por otra parte Navarro-Pineda *et al.* (2016), mencionan que las tres semillas encontradas, representan entre el 60 y 70 % del peso del fruto en base seca.

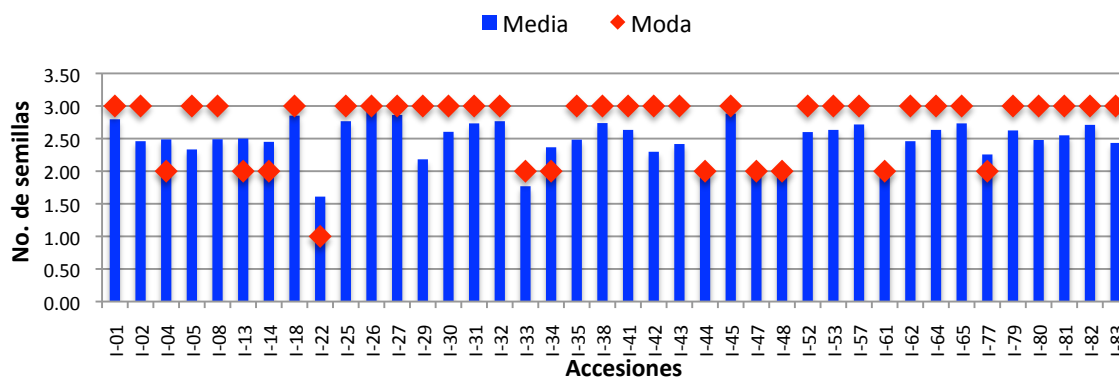


Figura 11. Media y moda de número de semillas por fruto de accesiones de *J. curcas* recolectadas en Veracruz, México

Características morfológicas de la semilla

El valor máximo para el longitud de semilla fue de 2.01 cm y observado en la accesión I-61 (Montañas) seguido por I-44 (Tuxtlas) y I-62 (Montañas) (Cuadro 10). El valor mínimo (1.67 cm) fue para el acceso I-32, seguido por I-27 y I-04. El diámetro de la sección media de la semilla varió de 0.93 a 1.12 cm, el acceso I-30 tuvo el máximo valor. El grosor de la semilla varió de 0.78 en I-04 a 0.99 cm en I-83. El valor máximo para el peso de la semilla fue para I-61 (0.91 g), seguido por I-22 (0.84 g). El menor peso lo obtuvo la accesión I-04 (0.54 g).

Los valores de esfericidad de la semilla estuvieron entre 0.61 y 0.70, siendo las semillas de la accesión I-32 las que tendieron a ser más redondas, mientras que las accesiones I-44, I-05 y I-18 tuvieron una forma más cercana a un elipsoide. Resultados similares observaron Sirisomboon *et al.* (2007), para semillas de *J. curcas* variedad “Kankueang” recolectadas en Tailandia.

La selección de materiales basada en las características de las semillas, puede simplificar la búsqueda de individuos para programas de mejoramiento genético. Debido a que la principal limitante en la selección de individuos, es identificar el grado de diversidad genética presente en el germoplasma de interés. Esto implica que se debe tener en cuenta que los caracteres cuantitativos determinantes del rendimiento productivo, tienen un alto grado de interacción con el ambiente, por lo que es importante discriminar entre las características discriminadas por la genética y las variaciones por la influencia del ambiente (Rao *et al.*, 2008).

La variación en la morfología de la semilla de *J. curcas* puede ser de gran ayuda en programas de mejoramiento, particularmente cuando se busca tener genotipos que tengan altos rendimientos de semillas y buen contenido de aceite (Kaushik *et al.*, 2007). Se ha reportado una correlación positiva entre el peso de las semillas y el contenido de aceite en las mismas (Divakara *et al.*, 2010).

Cuadro 10. Medidas de largo, ancho, grosor, peso y esfericidad de semillas de 40 accesiones de *J. curcas*.

| Clave Accesión | Largo promedio ± Dst (cm) | Ancho promedio ± Dst (cm) | Grosor promedio ± Dst (cm) | Peso promedio ± Dst (g) | Esfericidad promedio ± Dst |
|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| I-61 | 2.01 ± 0.05 | 1.03 ± 0.04 | 0.91 ± 0.04 | 0.91 ± 0.06 | 0.62 ± 0.01 |
| I-44 | 1.95 ± 0.07 | 1.00 ± 0.05 | 0.84 ± 0.05 | 0.72 ± 0.06 | 0.61 ± 0.02 |
| I-62 | 1.95 ± 0.06 | 1.00 ± 0.04 | 0.89 ± 0.04 | 0.78 ± 0.11 | 0.62 ± 0.01 |
| I-45 | 1.94 ± 0.09 | 1.01 ± 0.04 | 0.89 ± 0.04 | 0.78 ± 0.10 | 0.62 ± 0.02 |
| I-47 | 1.93 ± 0.09 | 0.99 ± 0.13 | 0.92 ± 0.04 | 0.78 ± 0.09 | 0.62 ± 0.03 |
| I-05 | 1.93 ± 0.06 | 0.99 ± 0.03 | 0.86 ± 0.04 | 0.77 ± 0.05 | 0.61 ± 0.02 |
| I-22 | 1.92 ± 0.06 | 1.04 ± 0.03 | 0.94 ± 0.05 | 0.84 ± 0.08 | 0.64 ± 0.01 |
| I-18 | 1.91 ± 0.08 | 0.99 ± 0.06 | 0.85 ± 0.05 | 0.73 ± 0.13 | 0.61 ± 0.02 |
| I-25 | 1.91 ± 0.08 | 1.04 ± 0.04 | 0.91 ± 0.06 | 0.82 ± 0.09 | 0.64 ± 0.02 |
| I-82 | 1.90 ± 0.07 | 0.99 ± 0.05 | 0.89 ± 0.03 | 0.76 ± 0.07 | 0.62 ± 0.02 |
| I-14 | 1.89 ± 0.07 | 1.01 ± 0.14 | 0.90 ± 0.03 | 0.73 ± 0.10 | 0.63 ± 0.03 |
| I-64 | 1.89 ± 0.06 | 1.08 ± 0.04 | 0.91 ± 0.04 | 0.82 ± 0.07 | 0.65 ± 0.01 |
| I-42 | 1.88 ± 0.07 | 1.04 ± 0.12 | 0.89 ± 0.04 | 0.67 ± 0.10 | 0.64 ± 0.02 |
| I-48 | 1.87 ± 0.08 | 0.94 ± 0.05 | 0.91 ± 0.05 | 0.72 ± 0.09 | 0.63 ± 0.01 |
| I-26 | 1.87 ± 0.06 | 0.97 ± 0.04 | 0.87 ± 0.04 | 0.71 ± 0.08 | 0.62 ± 0.01 |
| I-43 | 1.87 ± 0.06 | 1.00 ± 0.05 | 0.88 ± 0.03 | 0.73 ± 0.07 | 0.63 ± 0.01 |
| I-52 | 1.84 ± 0.09 | 1.08 ± 0.05 | 0.97 ± 0.04 | 0.80 ± 0.10 | 0.68 ± 0.01 |
| I-79 | 1.84 ± 0.06 | 0.97 ± 0.03 | 0.85 ± 0.03 | 0.68 ± 0.08 | 0.63 ± 0.01 |
| I-81 | 1.84 ± 0.06 | 1.00 ± 0.05 | 0.85 ± 0.03 | 0.65 ± 0.08 | 0.63 ± 0.01 |
| I-57 | 1.83 ± 0.07 | 1.07 ± 0.12 | 0.83 ± 0.04 | 0.61 ± 0.11 | 0.64 ± 0.01 |
| I-77 | 1.83 ± 0.05 | 0.95 ± 0.03 | 0.84 ± 0.04 | 0.65 ± 0.09 | 0.62 ± 0.01 |
| I-83 | 1.82 ± 0.09 | 1.08 ± 0.06 | 0.99 ± 0.06 | 0.79 ± 0.12 | 0.69 ± 0.02 |
| I-29 | 1.82 ± 0.07 | 1.00 ± 0.06 | 0.92 ± 0.05 | 0.70 ± 0.13 | 0.65 ± 0.02 |
| I-80 | 1.81 ± 0.10 | 1.03 ± 0.13 | 0.92 ± 0.05 | 0.74 ± 0.10 | 0.66 ± 0.02 |
| I-53 | 1.81 ± 0.09 | 1.02 ± 0.05 | 0.87 ± 0.05 | 0.71 ± 0.10 | 0.65 ± 0.02 |
| I-30 | 1.79 ± 0.09 | 1.12 ± 0.05 | 0.91 ± 0.05 | 0.81 ± 0.10 | 0.68 ± 0.03 |
| I-13 | 1.79 ± 0.07 | 0.98 ± 0.06 | 0.85 ± 0.07 | 0.66 ± 0.11 | 0.64 ± 0.02 |
| I-65 | 1.78 ± 0.07 | 0.98 ± 0.05 | 0.89 ± 0.05 | 0.69 ± 0.09 | 0.65 ± 0.01 |
| I-31 | 1.78 ± 0.04 | 1.05 ± 0.11 | 0.90 ± 0.03 | 0.77 ± 0.06 | 0.67 ± 0.02 |
| I-01 | 1.77 ± 0.07 | 1.08 ± 0.04 | 0.88 ± 0.04 | 0.64 ± 0.10 | 0.67 ± 0.01 |
| I-38 | 1.77 ± 0.06 | 1.00 ± 0.03 | 0.85 ± 0.04 | 0.66 ± 0.08 | 0.65 ± 0.01 |
| I-33 | 1.75 ± 0.06 | 0.97 ± 0.03 | 0.93 ± 0.05 | 0.72 ± 0.08 | 0.66 ± 0.01 |
| I-35 | 1.75 ± 0.06 | 0.93 ± 0.04 | 0.85 ± 0.03 | 0.59 ± 0.10 | 0.64 ± 0.01 |
| I-02 | 1.74 ± 0.07 | 0.93 ± 0.05 | 0.90 ± 0.06 | 0.67 ± 0.08 | 0.65 ± 0.01 |
| I-08 | 1.73 ± 0.08 | 0.96 ± 0.04 | 0.85 ± 0.04 | 0.66 ± 0.09 | 0.65 ± 0.02 |
| I-34 | 1.73 ± 0.06 | 1.03 ± 0.04 | 0.88 ± 0.04 | 0.69 ± 0.08 | 0.67 ± 0.02 |
| I-41 | 1.72 ± 0.07 | 0.98 ± 0.17 | 0.87 ± 0.05 | 0.65 ± 0.10 | 0.66 ± 0.02 |
| I-27 | 1.71 ± 0.09 | 1.00 ± 0.03 | 0.83 ± 0.03 | 0.61 ± 0.10 | 0.66 ± 0.02 |
| I-04 | 1.71 ± 0.07 | 0.93 ± 0.03 | 0.78 ± 0.03 | 0.54 ± 0.09 | 0.63 ± 0.01 |
| I-32 | 1.67 ± 0.06 | 1.00 ± 0.05 | 0.95 ± 0.05 | 0.72 ± 0.09 | 0.70 ± 0.01 |

Contenido de aceite

El contenido de aceite varió del 26 % al 55 %, siendo el valor máximo observado en la accesión I-65, recolectada en el predio de Tepetates, en la región de Sotavento (Cuadro 11). El contenido de aceite más bajo se registró en la accesión I-61, recolectada en la región de Montañas. Existe una gran variabilidad en cuanto al contenido de aceite de *J. curcas* reportado en la literatura, las determinaciones mediante equipo Soxhlet han mostrado rendimientos de 48 a 51 % en accesiones procedentes de África (Turinayo *et al.*, 2015) y hasta 57.4 % en accesiones de Sinaloa, México (Makkar *et al.*, 2011); y utilizando mezclas de solventes se han reportado rendimientos de 65 a 75 % de aceite (Lim y Lee, 2013).

Actualmente, la producción de biodiesel ha ganado mucha popularidad como una alternativa a los combustibles fósiles, dado que se considera una fuente de energía amigable al ambiente (Bhuiya *et al.*, 2016). El 95 % del biodiesel es producido a partir de aceites comestibles, lo cual causa un desequilibrio entre la producción destinada como energético y al consumo alimenticio (Wang *et al.*, 2011). El alto contenido de aceite en *J. curcas* hace que la planta tenga un gran potencial para su utilización como materia prima en la producción de biodiesel (Abdulla *et al.*, 2011).

Contenido de ésteres de forbol

De las accesiones analizadas, solo en el 35 % se detectaron ésteres de forbol. El valor máximo se tuvo en la accesión I-82 con 0.59 mg/g, mientras que el mínimo contenido se tuvo en la accesión I-38 con 0.12 mg/g. Los ésteres de forbol son uno de los principales compuestos tóxicos reportado en *J. curcas* y hasta el momento se ha logrado identificar seis de ellos (Sukla *et al.*, 2015). Los ésteres de forbol son los promotores de tumores más potentes conocidos (Wakandigara *et al.*, 2013). Otros efectos biológicos descritos en humanos y animales como ratas y rumiantes son: proliferación celular, activación de las plaquetas, mitogénesis de linfocitos, inflamación, producción de prostaglandinas y estimulación en la degranulación en neutrófilos (Haas y Mittelbach, 2000).

Cuadro 11. Información geográfica, contenido de aceite y ésteres de forbol de 40 accesiones de *J. curcas* recolectadas en Veracruz, México

| Accesión | Región | Latitud (N) | Longitud (O) | Altitud (m snm) | Contenido de aceite (%) | Esteres de forbol (mg/g) ♦ |
|----------|---------------|-------------|--------------|-----------------|-------------------------|----------------------------|
| I-02 | Huasteca Alta | 21°54' | 98°17' | 30 | 44 | ND |
| I-04 | Huasteca Alta | 21°18' | 98°20' | 130 | 30 | ND |
| I-05 | Huasteca Alta | 21°18' | 98°16' | 94 | 37 | ND |
| I-08 | Huasteca Baja | 21°11' | 97°59' | 228 | 36 | ND |
| I-13 | Totonaca | 20°27' | 97°19' | 173 | 47 | ND |
| I-14 | Totonaca | 20°27' | 97°19' | 170 | 33 | ND |
| I-18 | Totonaca | 20°11' | 97°15' | 119 | 37 | ND |
| I-22 | Totonaca | 20°28' | 97°15' | 43 | 45 | ND |
| I-25 | Totonaca | 20°15' | 96°48' | 5 | 35 | ND |
| I-77 | Totonaca | 20°15' | 97°15' | 78 | 39 | ND |
| I-79 | Totonaca | 20°23' | 97°12' | 114 | 43 | ND |
| I-26 | Nautla | 20°10' | 96°53' | 9 | 39 | ND |
| I-27 | Nautla | 20°06' | 96°00' | 70 | 47 | ND |
| I-29 | Nautla | 19°55' | 96°46' | 366 | 38 | ND |
| I-30 | Nautla | 19°53' | 96°48' | 631 | 42 | ND |
| I-31 | Nautla | 19°50' | 96°48' | 1054 | 50 | ND |
| I-80 | Nautla | 19°56' | 96°50' | 321 | 40 | ND |
| I-01 | Capital | 19°35' | 96°23' | 4 | 41 | 0.43 |
| I-32 | Capital | 19°24' | 96°52' | 892 | 34 | ND |
| I-52 | Sotavento | 19°10' | 96°8' | 10 | 48 | 0.23 |
| I-53 | Sotavento | 18°55' | 96°12' | 12 | 39 | 0.16 |
| I-64 | Sotavento | 19°11' | 96°20' | 16 | 52 | ND |
| I-65 | Sotavento | 19°11' | 96°20' | 15 | 55 | ND |
| I-61 | Montañas | 18°49' | 96°49' | 523 | 26 | 0.65 |
| I-62 | Montañas | 18°53' | 97°01' | 1006 | 50 | ND |
| I-33 | Papaloapan | 18°47' | 95°47' | 21 | 29 | 0.42 |
| I-34 | Papaloapan | 18°47' | 95°45' | 22 | 41 | ND |
| I-35 | Papaloapan | 18°38' | 95°31' | 5 | 46 | 0.45 |
| I-57 | Papaloapan | 17°44' | 95°48' | 77 | 46 | 0.23 |
| I-38 | Tuxtlas | 18°31' | 95°05' | 520 | 55 | 0.12 |
| I-41 | Tuxtlas | 18°38' | 95°06' | 8 | 37 | ND |
| I-42 | Tuxtlas | 18°40' | 96°09' | 30 | 43 | 0.28 |
| I-43 | Tuxtlas | 18°41' | 95°14' | 16 | 39 | 0.44 |
| I-44 | Tuxtlas | 18°26' | 95°10' | 258 | 34 | 0.43 |
| I-45 | Tuxtlas | 18°18' | 96°06' | 490 | 41 | 0.48 |
| I-81 | Tuxtlas | 18°31' | 95°03' | 68 | 44 | 0.33 |
| I-82 | Tuxtlas | 18°18' | 95°06' | 493 | 45 | 0.59 |
| I-47 | Olmecca | 17°45' | 94°06' | 50 | 31 | ND |
| I-48 | Olmecca | 17°57' | 94°13' | 42 | 31 | ND |
| I-83 | Olmecca | 18°04' | 94°53' | 75 | 45 | 0.28 |

♦ND: No detectado

Los contenidos de ésteres de forbol reportados en estudios con accesiones de *J. curcas*, han mostrado una gran variabilidad. Makkar *et al.* (1997) reportaron contenidos de 0.8 a 3.3 mg/g mientras que Nithiyantham *et al.* (2012), reportaron contenidos de 2 a 6 mg/g.

En la mayoría de las accesiones analizadas no se detectaron ésteres de forbol (65%). Resultados similares ha sido obtenidos por varios investigadores en accesiones procedentes de los mismos sitios de colecta (Makkar *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2006). La presencia de germoplasma con un contenido nulo o bajo de ésteres de forbol solo se ha reportado en accesiones de México. Debido a lo anterior, ha habido un consenso entre los investigadores a llamar a estos materiales como “*Jatropha* no tóxica”. Sin bien, el término se refiere a la ausencia de ésteres de forbol detectables, en las accesiones si se han encontrado otros compuestos tóxicos como: curcinas, saponinas, inhibidor de tripsina, inhibidores de proteasas, curcaina, fitatos, alcaloides, lectinas, lignanos, taninos, látex y péptidos cíclicos (Gu *et al.*, 2015).

Perfil de lípidos

En el Cuadro 12 se muestra el perfil de lípidos obtenido. En todas las accesiones estuvieron presentes: el ácido mirístico (C14), ácido palmítico (C16), ácido palmitoleico (C16-1), ácido esterárico (C18), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2), ácido linolenico (C18:3). Además en algunas accesiones pudo identificarse al ácido nonadecanoico, ácido cis-11-eicosenoico y al escualeno.

De los ácidos grasos identificados, el ácido oleico (27.1 a 45.9 %) y el linoleico (26.2 a 45.8 %) son los que se encontraron en mayor proporción. En el total de muestras analizadas no se observó la predominancia de alguno en particular, lo cual no coincidió con lo publicado por Akintayo (2004), que menciona que en el perfil de lípidos del aceite de *J. curcas*, el ácido graso predominante es el ácido oleico. Sin embargo, Martínez *et al.* (2006) encontró que la predominancia de uno u otro ácido graso, tiene relación con el tipo de suelo y las condiciones climáticas del sitio de recolecta. Es decir, una interacción genotipo-ambiente.

Cuadro 12. Perfil de ácidos grasos de 40 accesiones de *J. curcas* recolectadas en Veracruz, México

| Accesión | Ácido Mirístico (%) | Ácido Palmítico (%) | Ácido Palmitoleico (%) | Ácido Estéarico (%) | Ácido Oleico (%) | Ácido Linoleico (%) | Ácido Linolénico (%) |
|----------|---------------------|---------------------|------------------------|---------------------|------------------|---------------------|----------------------|
| I-02 | 0.1 | 11.6 | 0.6 | 6.8 | 39.2 | 34.2 | 0.1 |
| I-04 | 0.1 | 10.2 | 0.6 | 8.0 | 43.4 | 31.1 | 0.3 |
| I-05 | 0.1 | 10.5 | 0.5 | 8.3 | 35.7 | 36.7 | 0.2 |
| I-08 | 0.1 | 11.6 | 0.7 | 5.9 | 34.8 | 42.2 | 0.2 |
| I-13 | 0.2 | 11.7 | 0.6 | 8.4 | 36.7 | 33.4 | 0.1 |
| I-14 | 0.2 | 11.7 | 0.7 | 7.5 | 39.1 | 36.3 | 0.2 |
| I-18 | 0.3 | 12.4 | 0.7 | 7.3 | 36.5 | 39.1 | 0.2 |
| I-22 | 0.1 | 11.9 | 0.7 | 6.7 | 37.4 | 35.1 | 0.1 |
| I-25 | 0.1 | 11.2 | 0.6 | 7.1 | 38.0 | 39.4 | 0.2 |
| I-77 | 0.1 | 12.8 | 0.9 | 8.5 | 40.9 | 29.0 | 0.1 |
| I-79 | 0.1 | 11.0 | 0.6 | 8.3 | 34.4 | 38.3 | 0.2 |
| I-26 | 0.1 | 11.5 | 0.1 | 8.1 | 37.4 | 38.7 | 0.2 |
| I-27 | 0.1 | 11.2 | 0.5 | 7.3 | 35.8 | 37.4 | 0.2 |
| I-29 | 0.1 | 13.1 | 0.8 | 6.9 | 38.2 | 37.3 | 0.2 |
| I-30 | 0.2 | 12.6 | 0.8 | 6.3 | 32.2 | 44.7 | 0.2 |
| I-31 | 0.2 | 11.7 | 0.9 | 5.5 | 30.5 | 46.2 | 0.2 |
| I-80 | 0.1 | 11.9 | 0.7 | 6.9 | 34.6 | 37.0 | 0.2 |
| I-01 | 0.1 | 12.6 | 0.5 | 8.0 | 42.0 | 34.7 | 0.2 |
| I-32 | 0.3 | 11.2 | 0.7 | 5.3 | 32.2 | 45.0 | 0.2 |
| I-52 | 0.1 | 12.3 | 0.6 | 8.4 | 45.9 | 26.2 | 0.1 |
| I-53 | 0.3 | 11.3 | 0.5 | 7.2 | 30.9 | 41.6 | 0.2 |
| I-64 | 0.2 | 10.8 | 0.5 | 7.6 | 38.7 | 35.2 | 0.1 |
| I-65 | 0.1 | 10.1 | 0.4 | 7.9 | 39.7 | 35.3 | 0.1 |
| I-61 | 0.1 | 12.5 | 0.9 | 5.4 | 35.0 | 37.9 | 0.1 |
| I-62 | 0.3 | 11.2 | 0.8 | 5.3 | 32.1 | 43.4 | 0.2 |
| I-33 | 0.1 | 11.3 | 0.6 | 6.2 | 33.6 | 38.6 | 0.1 |
| I-34 | 0.2 | 13.7 | 0.9 | 8.1 | 39.8 | 33.6 | 0.2 |
| I-35 | 0.2 | 12.6 | 0.6 | 8.2 | 39.9 | 31.5 | 0.2 |
| I-57 | 0.1 | 12.1 | 0.9 | 7.4 | 40.0 | 32.6 | 0.3 |
| I-38 | 0.1 | 12.6 | 0.8 | 6.6 | 40.1 | 36.6 | 0.2 |
| I-41 | 0.2 | 11.1 | 0.5 | 7.2 | 34.6 | 42.3 | 0.2 |
| I-42 | 0.1 | 13.1 | 0.9 | 7.0 | 42.1 | 32.9 | 0.2 |
| I-43 | 0.2 | 12.8 | 0.7 | 8.3 | 39.6 | 35.0 | 0.2 |
| I-44 | 0.1 | 13.4 | 0.7 | 8.1 | 40.7 | 27.4 | 0.2 |
| I-45 | 0.3 | 11.3 | 0.6 | 6.4 | 27.1 | 45.8 | 0.2 |
| I-81 | 0.1 | 12.2 | 0.8 | 7.6 | 42.3 | 29.5 | 0.2 |
| I-82 | 0.2 | 11.6 | 0.7 | 6.5 | 30.3 | 43.6 | 0.1 |
| I-47 | 0.2 | 10.6 | 0.6 | 7.5 | 36.1 | 37.9 | 0.1 |
| I-48 | 0.1 | 10.6 | 0.5 | 7.4 | 36.9 | 36.9 | 0.1 |
| I-83 | 0.1 | 12.1 | 0.7 | 6.6 | 37.4 | 35.9 | 0.2 |

La proporción y composición de ácidos grasos del aceite utilizado en la producción de biodiesel afecta las características del biocombustible resultante. La composición ideal de un aceite utilizado en la producción de biodiesel debe incluir un alto porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (C16:1 y C18:1), una baja proporción de ácidos poliinsaturados (C18:2 y C18:3) y una cantidad controlada de ácidos grasos saturados (C16:0 y C18:0) (Wang *et al.*, 2011). El biodiesel producido con aceite de *J. curcas* presenta buenas propiedades de flujo en frío, ya que contiene cerca del 80 % de ácidos grasos insaturados, los metilésteres de los ácidos oleico y linoleico, se encuentran en mayor cantidad y por tal razón la estabilidad oxidativa y el punto de nube de este biodiesel son bajos (Aguilar *et al.*, 2015).

Análisis de Correlación

En el Cuadro 13 son presentados los resultados de un análisis de correlación entre las variables, morfológicas, de contenido de aceite y perfil de ácidos grasos. Se observó que el peso de la semilla correlacionó positivamente con el largo, ancho y grueso de las semillas. El tamaño de la semilla es una característica importante en los cultivos comerciales, debido a que las semillas de mayor tamaño muestran una mejor germinación y desarrollo de plantula (Kaushil *et al.*, 2007).

La esfericidad de la semilla se correlacionó negativamente con el largo de la semilla (-0.59) y positivamente con el ancho (0.55) y grosor (0.54). Lo que significa que las semillas de menor tamaño tendieron a ser más redondas en su forma, mientras las más grandes a un elipsoide.

El contenido de ésteres de forbol se correlacionó con la región donde se recolectó la accesión. Los ésteres de forbol solo se detectaron en las regiones que se encuentran en la zona centro y sur del estado, mientras que estos no fueron detectados en las accesiones recolectadas de las regiones de la zona norte del estado. En la región Totonaca, localizada al norte del estado, se ha documentado ampliamente el consumo de las semillas tostadas de *J. curcas* solas (Martínez *et al.*, 2006) o como ingrediente en platillos tradicionales (Valdes-Rodriguez *et al.*, 2013). La baja o nula presencia de ésteres de forbol en estas accesiones podría deberse a la ocurrencia de dos acontecimientos relacionados. Por una parte la presencia de mutaciones genéticas con la capacidad de silenciar genes (Gu *et al.*, 2015), en este caso, el o los asociados a la producción de ésteres de forbol, y por otra parte, a la selección de estos materiales por parte de los pobladores

de éstas localidades al hacer extensivo el uso de esta planta como alimento (selección de prueba y error).

También se observó una correlación negativa entre los ácidos grasos C18 y C18-1 y la altitud en la que se recolectaron las accesiones, ya que la concentración de estos disminuyó a mayores altitudes. Mientras que la concentración de C18-2, tuvo una correlación positiva dado que se incrementó en accesiones establecidas a mayores altitudes. Un comportamiento similar del C18-2 fue observado en lichi (*Plukenetia volúbilis* L.), la concentración se vio incrementada a altitudes superiores a los 900 m (Cai *et al.*, 2012). Aunque las rutas de biosíntesis de los ácidos grasos son ya conocidas, muy poco se sabe acerca del mecanismo mediante el cual las plantas regulan la cantidad y el tipo de lípido producido en los diferentes tejidos u órganos, especialmente en las semillas (Gu *et al.*, 2012).

Actualmente, los programas de mejoramiento genético de *J. curcas* están dirigidos a incrementar el rendimiento de aceite en la semilla (King *et al.*, 2015) y a eliminar los compuestos tóxicos, principalmente (Gu *et al.*, 2015). Pero hace falta seleccionar materiales con características relacionadas a la producción de frutos como es: tener una alta producción, incrementar el contenido de semillas y sincronizar la maduración de los frutos, características que son de gran importancia para asegurar la inclusión de la planta en sistemas comerciales de producción de biocombustibles.

Cuadro 13. Análisis de correlación de las variables de ubicación de las plantas, morfología de semilla, contenido de aceite, semillas por fruto y del perfil de ácidos grasos de las accesiones de *J. curcas*

| Variable | Variables de semilla | | | | | Variables de aceite | | Semillas por fruto | Perfil de ácidos grasos ♦ | | | | | | | |
|--------------------|----------------------|-------|-------|--------|-------------|---------------------|-------------|--------------------|---------------------------|-------|-------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| | Altitud | Largo | Ancho | Grosor | Peso | Esfericidad | Acetate (%) | | Esteres de forbol | C14 | C16 | C16-1 | C18 | C18-1 | C18-2 | C18-3 |
| Altitud | 1.00 | -0.01 | 0.27 | 0.01 | 0.19 | 0.15 | 0.24 | 0.05 | 0.18 | 0.23 | 0.14 | 0.39 | -0.61 | -0.50 | 0.53 | 0.23 |
| Largo | | 1.00 | 0.21 | 0.23 | 0.61 | -0.59 | -0.16 | 0.21 | -0.11 | 0.07 | 0.02 | -0.02 | 0.07 | -0.11 | 0.03 | -0.20 |
| Ancho | | | 1.00 | 0.48 | 0.54 | 0.55 | 0.34 | 0.03 | 0.23 | -0.02 | 0.27 | 0.39 | -0.32 | -0.07 | 0.14 | 0.18 |
| Grosor | | | | 1.00 | 0.73 | 0.54 | 0.04 | 0.03 | 0.01 | -0.09 | 0.05 | 0.04 | -0.39 | -0.12 | 0.17 | -0.38 |
| Peso | | | | | 1.00 | 0.13 | 0.02 | -0.04 | -0.09 | 0.08 | 0.00 | 0.05 | -0.28 | -0.30 | 0.29 | -0.37 |
| Esfericidad | | | | | | 1.00 | 0.31 | -0.14 | 0.20 | -0.10 | 0.15 | 0.23 | -0.41 | -0.02 | 0.13 | 0.06 |
| % Aceite | | | | | | | 1.00 | 0.01 | 0.41 | -0.07 | 0.12 | 0.02 | -0.06 | 0.08 | -0.04 | -0.12 |
| Esteres de forbol | | | | | | | | 1.00 | 0.16 | 0.17 | 0.30 | 0.18 | -0.10 | -0.08 | -0.08 | -0.16 |
| Semillas por fruto | | | | | | | | | 1.00 | 0.03 | -0.01 | -0.08 | -0.14 | -0.16 | 0.29 | 0.15 |
| C14 | | | | | | | | | | 1.00 | 0.04 | -0.08 | -0.11 | -0.53 | 0.49 | -0.02 |
| C16 | | | | | | | | | | | 1.00 | 0.66 | 0.02 | 0.30 | -0.32 | 0.17 |
| C16-1 | | | | | | | | | | | | 0.66 | 0.02 | 0.30 | -0.32 | 0.17 |
| C18 | | | | | | | | | | | | | 1.00 | 0.57 | -0.66 | -0.10 |
| C18-1 | | | | | | | | | | | | | | 1.00 | -0.90 | 0.10 |
| C18-2 | | | | | | | | | | | | | | | 1.00 | 0.10 |
| C18-3 | | | | | | | | | | | | | | | | 1.00 |

Las correlaciones marcadas en negritas son significativas ($p < 0.0500$).

♦ C14 = Ácido mirístico; C16 = Ácido palmítico; C16-1 = Ácido palmítico; C18 = Ácido estearico; C18-1 = Ácido oleico; C18-2 = Ácido linoleico; C18-3 = Ácido linolenico.

4.4 Conclusiones

La morfología de las semillas, la cantidad y composición del aceite de *J. curcas* varió entre las accesiones recolectadas. Esta variación puede explicarse dadas las diferentes condiciones agroclimáticas presentes en el estado de Veracruz en las que la planta crece. La altitud, la temperatura y el suelo son factores ambientales que pueden afectar la producción y síntesis de compuestos en *J. curcas*. La caracterización morfológica puede servir como una primera aproximación a la identificación y selección de materiales promisorios, teniendo en consideración que una característica determinada puede ser debida al ambiente o a factores genéticos. La existencia de accesiones con bajo o nulo contenido de ésteres de forbol pudiera estar relacionado a una mutación genética ligada a un proceso de selección fortuito por el hombre con fines alimenticios, aunque más información se requiere para validar esta hipótesis. La inclusión de *J. curcas* en un sistema productivo, requiere forzosamente la generación de variedades comerciales, con características como resistencia a plagas y enfermedades, rendimientos altos de frutos, semillas, aceite y una baja o nula toxicidad.

4.5 Literatura citada

- Abdulla, R., E. S. Chan y P. Ravindra. 2011. Biodiesel production from *Jatropha curcas*: A critical review. *Critical Reviews in Biotechnology* 31: 53-64.
- Achten, W. M. J., L. Verchot, Y. J. Franken, E. Mathijs, V. P. Singh, R. Aerts y B. Muys. 2008. *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass and Bioenergy* 32: 1063-1084.
- Aguilar, C. A., K. Rodríguez, S. C. González y L. A. Rios. 2015. Evaluación de la estabilidad oxidativa del biodiesel de *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) mediante el uso de antioxidantes sintéticos y biodiesel de palma. *Información tecnológica* 26: 51-60.
- Akintayo, E. 2004. Characteristics and composition of *Parkia biglobbosa* and *Jatropha curcas* oils and cakes. *Bioresource Technology* 92: 307-310.
- Bhuiya, M., M. Rasul, M. Khan, N. Ashwath y A. Azad. 2016. Prospects of 2nd generation biodiesel as a sustainable fuel—part: 1 selection of feedstocks, oil extraction techniques and conversion technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 55: 1109-1128.

- Cai, Z., D. Jiao, S. Tang, X. Dao, Y. Lei y C. Cai. 2012. Leaf photosynthesis, growth, and seed chemicals of *Sacha inchi* plants cultivated along an altitude gradient. *Crop Science* 52: 1859-1867.
- de Azevedo Peixoto, L., B. G. Laviola, L. L. Bhering, S. Mendonça, T. d. S. A. Costa y R. Antoniassi. 2016. Oil content increase and toxicity reduction in *Jatropha* seeds through family selection. *Industrial Crops and Products* 80: 70-76.
- Divakara, B., H. Upadhyaya, S. Wani y C. L. Gowda. 2010. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: a review. *Applied Energy* 87: 732-742.
- Gu, K., D. Tian, H. Mao, L. Wu y Z. Yin. 2015. Development of marker-free transgenic *Jatropha curcas* producing curcumin-deficient seeds through endosperm-specific RNAi-mediated gene silencing. *BMC plant biology* 15: 242.
- Haas, W. y M. Mittelbach. 2000. Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L. *Industrial Crops and Products* 12: 111-118.
- Herrera, J. M., A. L. M. Ayala, H. Makkar, G. Francis y K. Becker. 2010. Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *European Journal of Scientific Research* 39: 396-407.
- INAFED, 2015. Instituto nacional para el federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED). Tomado de http://www.e-local.gob.mx/wb/ELOCAL/EMM_veracruz. Fecha de consulta: 15 de octubre de 2015.
- Kaushik, N., K. Kumar, S. Kumar y S. Roy. 2007. Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. *Biomass and Bioenergy* 31: 497-502.
- King, A. J., L. R. Montes, J. G. Clarke, J. Itzep, C. A. Perez, R. E. Jongschaap, R. G. Visser, E. N. van Loo y I. A. Graham. 2015. Identification of QTL markers contributing to plant growth, oil yield and fatty acid composition in the oilseed crop *Jatropha curcas* L. *Biotechnology for biofuels* 8: 1.
- Lim, S. y K.-T. Lee. 2013. Influences of different co-solvents in simultaneous supercritical extraction and transesterification of *Jatropha curcas* L. seeds for the production of biodiesel. *Chemical engineering journal* 221: 436-445.
- Maes, W. H., A. Trabucco, W. M. J. Achten y B. Muys. 2009. Climatic growing conditions of *Jatropha curcas* L. *Biomass and Bioenergy* 33: 1481-1485.

- Makkar, H. y K. Becker. 1997. Potential of *Jatropha curcas* seed meal as a protein supplement to livestock feed; constraints to its utilization and possible strategies to overcome constraints. DBV Graz: 190 - 205.
- Makkar, H. P., V. Kumar, O. O. Oyeleye, A. O. Akinleye, M. A. Angulo-Escalante y K. Becker. 2011. *Jatropha platyphylla*, a new non-toxic *Jatropha* species: Physical properties and chemical constituents including toxic and antinutritional factors of seeds. Food Chemistry 125: 63-71.
- Makkar, H. P. S., A. O. Aderibigbe y K. Becker. 1998. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. Food Chemistry 62: 207-215.
- Martínez-Herrera, J., P. Siddhuraju, G. Francis, G. Dávila-Ortíz y K. Becker. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. Food Chemistry 96: 80-89.
- Morrison, W. R. y L. M. Smith. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. Journal of lipid research 5: 600-608.
- Navarro-Pineda, F. S., S. A. Baz-Rodríguez, R. Handler y J. C. Sacramento-Rivero. 2016. Advances on the processing of *Jatropha curcas* towards a whole-crop biorefinery. Renewable and Sustainable Energy Reviews 54: 247-269.
- Nithiyanantham, S., P. Siddhuraju y G. Francis. 2012. Potential of *Jatropha curcas* as a biofuel, animal feed and health products. Journal of the American Oil Chemists Society 89: 961-972.
- Núñez-Colín, C. A. y M. A. Goytia-Jiménez. 2009. Distribution and agroclimatic characterization of potential cultivation regions of physic nut in Mexico. Pesquisa Agropecuária Brasileira 44: 1078-1085.
- Openshaw, K. 2000. A review of *Jatropha curcas* L: An oil plant of unfulfilled promise. Biomass Bioenergy 19: 1 - 15.
- Rao, G., G. Korwar, A. K. Shanker y Y. Ramakrishna. 2008. Genetic associations, variability and diversity in seed characters, growth, reproductive phenology and yield in *Jatropha curcas* (L.) accessions. Trees 22: 697-709.

- Shukla, A., S. P. Singh y S. Tiwari. 2015. Transformation of toxic potential of *Jatropha curcas* (ratanjyot) into protein source: A mini-review. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 2: 89-94.
- Sirisomboon, P., P. Kitchaiya, T. Pholpho y W. Mahuttanyavanitch. 2007. Physical and mechanical properties of *Jatropha curcas* L. fruits, nuts and kernels. *Biosystems engineering* 97: 201-207.
- Trebbi, D., E. G. Papazoglou, E. Saadaoui, M. Vischi, M. Baldini, P. Stevanato, E. Cettul, A. P. Sanzone, L. Gualdi y A. Fabbri. 2015. Assessment of genetic diversity in different accessions of *Jatropha curcas*. *Industrial Crops and Products* 75: 35-39.
- Turinayo, Y. K., F. Kalanzi, J. M. Mudoma, P. Kiwuso, G. M. Asimwe, J. F. Esegu, P. Balitta y C. Mwanja. 2015. Physicochemical characterization of *Jatropha curcas* Linn oil for biodiesel production in Nebbi and Mokono districts in Uganda. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems* 5: 104.
- Valdes-Rodriguez, O. A., O. Sanchez-Sanchez, A. Perez-Vazquez y J. Caplan. 2013. The mexican non-toxic *Jatropha curcas* L., food resource or biofuel? *Ethnobotany Research and Applications* 11: 001-007.
- Wakandigara, A., L. Nhamo y J. Kugara. 2013. Chemistry of phorbol ester toxicity in *Jatropha curcas* seed-a review. *International Journal of Biochemistry Research & Review* 3: 146.
- Wang, R., M. A. Hanna, W.-W. Zhou, P. S. Bhadury, Q. Chen, B.-A. Song y S. Yang. 2011. Production and selected fuel properties of biodiesel from promising non-edible oils: *Euphorbia lathyris* L., *Sapium sebiferum* L. and *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technology* 102: 1194-1199.

CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

Contrastación de hipótesis

Con base en los resultados obtenidos, se tienen elementos para contrastar las hipótesis formuladas en el proyecto de investigación.

La hipótesis general indica que: Los accesos de *J. curcas* presentan diferencias morfológicas, genéticas y químicas, en función de las condiciones edafoclimáticas contrastantes en el estado de Veracruz. Se ubicaron plantas en diferentes condiciones edafoclimáticas, con marcadas diferencias morfológicas, se identificaron al menos tres grupos contrastantes en el estudio con marcadores moleculares, y se encontraron diferentes contenidos de aceite y ésteres de forbol, compuesto principal que le confiere la toxicidad a la planta. Por tanto la hipótesis general se acepta.

La hipótesis específica uno indica que: Existen diferencias morfológicas en *J. curcas* de acuerdo con la distribución de la planta en las diferentes regiones del estado de Veracruz. Se determinaron características morfológicas variables en las semillas de las accesiones recolectadas. Las semillas de mayor tamaño se registraron en la región de Montañas, donde predominan temperaturas bajas y una mayor altitud. Por lo tanto la hipótesis específica uno se acepta.

La hipótesis específica dos indica que: Las diferentes condiciones edafoclimáticas presentes en el estado de Veracruz contribuyen a incrementar la diversidad genética de *J. curcas*. Los marcadores moleculares de microsatélites, agruparon accesiones de acuerdo con su procedencia geográfica. Por lo tanto la hipótesis específica dos se acepta.

La hipótesis específica tres indica que: La composición y cantidad del aceite de *J. curcas*, varía en relación a las diferentes condiciones edafoclimáticas en las que la planta crece en el estado de Veracruz. De acuerdo con los resultados obtenidos, el contenido de aceite de las semillas y la concentración de ácidos grasos varió entre las regiones del estado de Veracruz. El contenido de ésteres de forbol también varió entre las diferentes regiones, aunque al parecer estas variaciones no dependen de las condiciones edafoclimáticas, sino por un fenómeno antropocéntrico derivado de su uso. De tal forma la hipótesis específica tres se acepta parcialmente.

Conclusiones generales

La distribución de *J. curcas* se comprobó en todas las regiones del estado de Veracruz, lo que demuestra la gran capacidad de adaptación que tiene la planta. El análisis morfológico de la semillas y del aceite demostró una gran variabilidad. Sin embargo, el uso de marcadores moleculares como RFLP'-s y microsátélites, mostraron baja variabilidad entre las accesiones encontradas, aunque esta variabilidad fue mayor a la encontrada en otros estudios, donde se han analizado materiales colectados en una superficie geográfica más amplia.

Los distintos contenidos de ésteres de forbol, constituyen en si mismos una evidencia más de la variabilidad de la planta. A la vez que muestra, cómo la ausencia de una sustancia potencialmente tóxica en un recurso genético, puede incrementar las capacidades de aprovechamiento de la planta en la industria farmacéutica, cosmética y alimentación humana o animal. Con los resultados obtenidos, es posible realizar una primera selección de materiales que puedan ser integrados a un sistema de mejoramiento genético que permita la obtención de variedades. La obtención de variedades es una condición imprescindible si es que se quiere utilizar a *J. curcas* con fines comerciales en la producción de biodiesel.

Recomendaciones generales

Hasta ahora, el mayor conocimiento sobre *J. curcas* reside en las personas que la han utilizado como medicina, alimento o cerco vivo. Es necesario realizar estudios de la fisiología, la incidencia de plagas y enfermedades, aspectos de su cultivo y producción.

Es necesario establecer un banco de germoplasma con los accesos recolectados y continuar con su caracterización morfológica y genética. A fin de poder reducir la influencia de factores climáticos sobre las características de producción.

Se debe continuar con la evaluación de los materiales que mostraron las mejores características productivas como: mejor tamaño de semilla, producción alta de aceite y principalmente, aquellos que no hayan mostrado ésteres de forbol detectables.

En lo que respecta a los aspectos metodológicos, se requiere generar nuevas secuencias de marcadores moleculares de microsátélites que tengan la capacidad de diferenciar entre accesiones tóxicas y no tóxicas de *J. curcas*.

Finalmente para futuras investigaciones en este tema, es importante generar variedades comerciales de esta planta. Así como también dilucidar que factores biológicos, fisiológicos y/o

genéticos determinan la falta o disminución en la expresión de ésteres de forbol en *J. curcas* en algunas regiones del estado de Veracruz.

ANEXO 1. Galeria fotográfica

Anexo 1.1. Planta de *Jatropha curcas* en producción



Anexo 1.2. Accesoión I-61 de gran tamaño, localizado en el munipio de Yanga, Veracruz



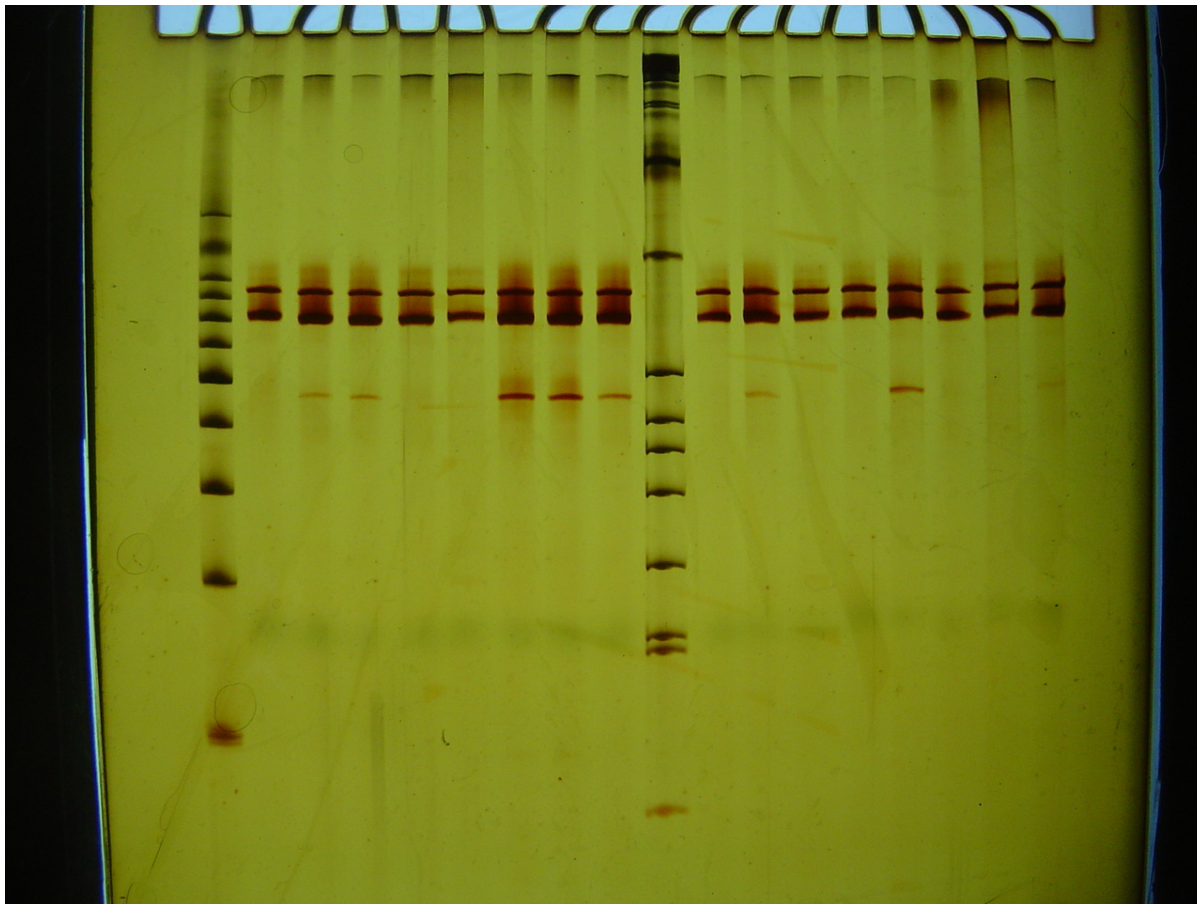
Anexo 1.3. Acceso I-16 ubicada en un traspatio en la región Totonaca, teniendo como uso principal el alimenticio



Anexo 1.4. Acesión I-53 utilizada como cerco vivo, ubicada en la Col. Ejidal en la región del Sotavento.



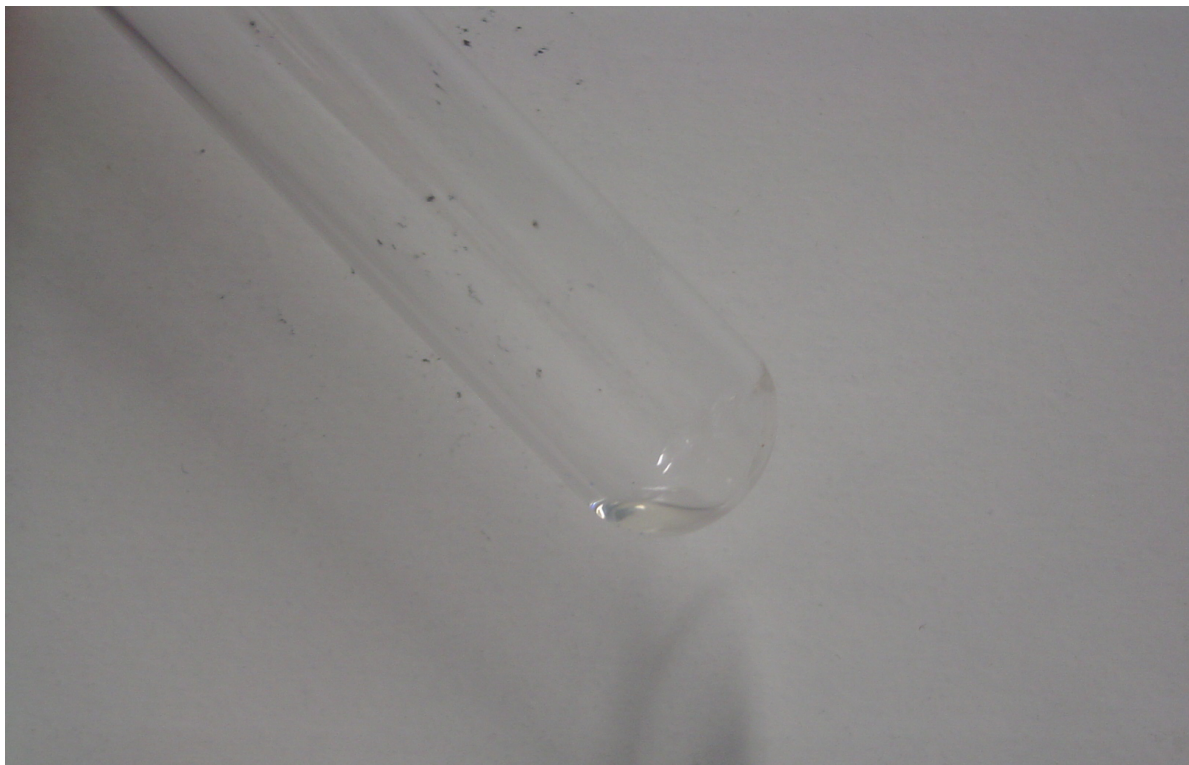
Anexo 1.5. Presencia de alelos revelados por marcadores moleculares de microsatélites en un gel de acrilamida



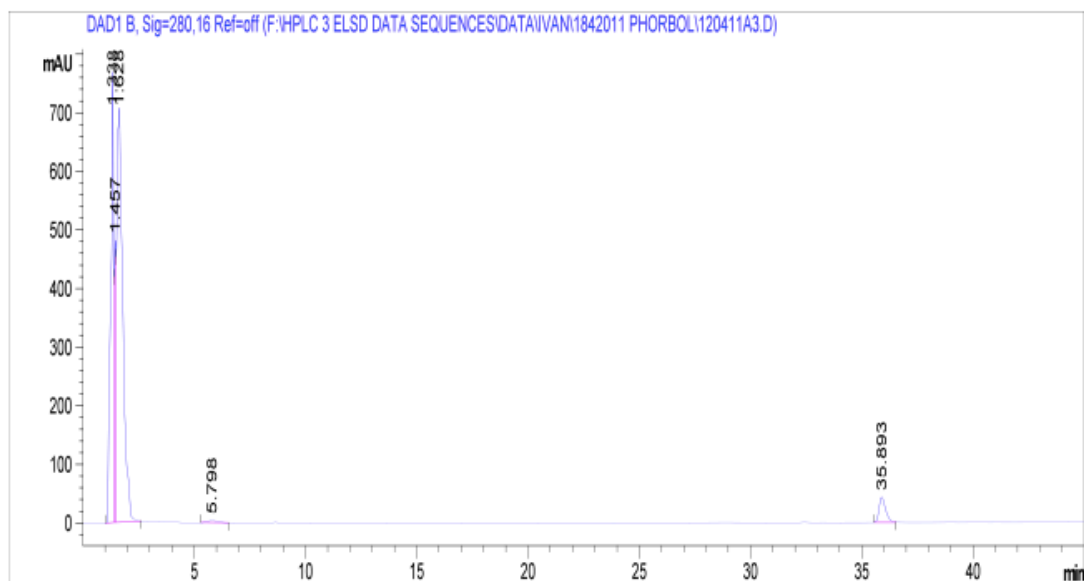
Anexo 1.6. Frutos de *J. curcas* conteniendo diferentes cantidades de semillas por fruto.



Anexo 1.7. Aceite de *J. curcas* extraído con hexano



Anexo 1.8. Cromatograma de HPLC de la accesión I-13, sin ésteres de forbol detectables



Anexo 1.9. Cromatograma de HPLC de la accesión I-66, con picos característicos correspondientes a la presencia de ésteres de forbol

