



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD  
ECOLOGÍA

**VARIACIÓN QUÍMICA Y GENÉTICA EN LAS POBLACIONES DE *JATROPHA*  
*CURCAS* L. Y SU RELACIÓN CON LA HERBIVORÍA**

**TESIS**

QUE OPTA PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA  
**YESENIA MARTÍNEZ DÍAZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DOCTOR FRANCISCO JAVIER ESPINOSA GARCÍA**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DOCTOR ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

**DOCTOR EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS**  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

**MÉXICO, D.F. ENERO, 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD  
ECOLOGÍA

**VARIACIÓN QUÍMICA Y GENÉTICA EN LAS POBLACIONES DE *JATROPHA*  
*CURCAS* L. Y SU RELACIÓN CON LA HERBIVORÍA**

# **TESIS**

QUE OPTA PARA OBTENER EL GRADO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA  
**YESENIA MARTÍNEZ DÍAZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DOCTOR FRANCISCO JAVIER ESPINOSA GARCÍA**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DOCTOR ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

**DOCTOR EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS**  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

**MÉXICO, D.F. ENERO, 2016**

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 12 de octubre de 2015, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **Doctora en Ciencias**, de la alumna **Martínez Díaz Yesenia** número de cuenta **510020558** del Posgrado en Ciencias Biológicas, con la tesis titulada **"Variación química y genética en las poblaciones *Jatropha curcas* L. y su relación con la herbivoría"**, bajo la dirección del **Dr. Francisco Javier Espinosa García**, Tutor principal:

Presidente: Dr. Ricardo Reyes Chilpa.  
Vocal: Dra. Ek del Val de Gortari.  
Secretario: Dr. Antonio González Rodríguez.  
Suplente: Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas.  
Suplente: Dr. Isidro Ovando Medina.

Sin otro particular, me despido.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de noviembre de 2015

*M. del Coro Arizmendi*  
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por brindarme la oportunidad y el privilegio de cursar el doctorado en esta institución y al Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES), por darme las facilidades para realizar este trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico otorgado para la realización de los estudios de doctorado. Este estudio fue financiado por el Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM (POFJE); UNAM-PAPIIT (IN215511); y fondos personales FJE.

Agradezco especialmente a mi tutor Dr. Francisco J. Espinosa García así como a los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Antonio González Rodríguez y el Dr. Guillermo Delgado Lamas, muchas gracias por sus enseñanzas durante estos años.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Quiero agradecer de manera muy especial, a mi tutor, el Dr. Francisco J. Espinosa García, quien guio mi camino en este proceso de formación académico. Gracias por sus enseñanzas, por el tiempo obsequiado para atender mis inquietudes y por todo su apoyo.

Quiero reafirmar mi agradecimiento a los miembros de mi comité tutor, Dr. Antonio González Rodríguez y el Dr. Guillermo Delgado Lamas, por sus valiosas aportaciones de sus respectivas áreas de conocimiento para consolidar este proyecto.

A los miembros del jurado de examen: Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dra. Ek del Val, Dr. Antonio González Rodríguez, Dr. Guillermo Delgado Lamas y Dr. Isidro Ovando Medina, cuyas observaciones nos permitieron mejorar el producto final del proyecto

Al Dr. Víctor Rocha, gracias infinitas por compartir conmigo su conocimiento en el área de genética, por tener siempre lo que me faltaba para terminar mis análisis y por levantarme el ánimo cuando el panorama era incierto. También quiero agradecer a la señora Dolores Lugo por facilitarme material para mis análisis.

Al Dr. Jorge Martínez Herrera del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, Yautepic, Morelos, por permitirme hacer una estancia en su laboratorio y a Miyamin Miranda por compartir conmigo los tips para cuantificar los compuestos químicos y por hacer grata mi estancia en su laboratorio.

A Maricruz Quintana López y Carmen J. Figueredo por su ayuda en el procesamiento de muestras para el análisis genético.

A mis compañeros del laboratorio de Ecología Química, Guadalupe Torres, Ángel Bravo, Roberto Gómez, Guadalupe Ramírez, Homero Mayo, Judith Sánchez, Alicia Bautista y Claudio Meléndez, gracias por su ayuda en este tiempo compartido.

A Yolanda García técnico del laboratorio de Ecología Química, por sus facilidades técnicas en el laboratorio.

Al Dr. Isidro Ovando y a sus alumnos de CenBIO- UNACH, al Ing. Héctor Rómulo del INIFAP, Campo Experimental Valle de Apatzingán, a Ingrid García y a Teodoro Carlón por su apoyo en la colecta de campo.

Al Dr. Ken Oyama, por permitirme la entrada y uso de laboratorio de ecología genética y molecular.

Agradezco a toda mi familia, en especial a mis padres Lázaro Martínez y Judith Díaz, por guiar mis pasos y por motivarme a llegar cada vez más lejos. A mis hermanos Omar y Manuel, por brindarme su apoyo siempre y a mis sobrinos Agui y Nathanael por contagiarme su alegría. Finalmente quiero agradecer a mi esposo Teodoro y a mi hija Sughey por la dicha de compartir nuestras vidas, por su apoyo incondicional en los momentos difíciles y por sus constantes motivaciones para concluir esta meta.



## **DEDICATORIA**

A Lázaro y Judith, mis padres

A Sugey, mi hija

Teodoro, mi esposo

## ÍNDICE GENERAL

<b>LISTA DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>CAPÍTULO I</b> .....	8
Introducción general.....	9
Hipótesis.....	12
Objetivo general.....	12
Objetivos particulares.....	12
Estructura de la tesis.....	12
Referencias.....	13
<b>CAPÍTULO II</b> .....	17
“Geographic structure of chemical variation in wild populations of the fuel crop <i>Jatropha curcas</i> L. in Mexico”. Martínez-Díaz Y, González-Rodríguez A, Delgado Lamas G. and Espinosa-García F.J.....	17
<b>ABSTRACT</b> .....	18
<b>Introduction</b> .....	18
<b>Materials and methods</b> .....	19
Chemical analysis.....	19
Trypsin inhibitors.....	19
Phytic acid.....	19
Phenols.....	19
Measurement of herbivory.....	19

Data analysis.....	20
<b>Results</b> .....	20
Chemical analysis.....	20
Quantification of herbivory.....	21
Relationship between herbivory intensity, total phytochemical content, altitude, and precipitation.....	21
<b>Discussion</b> .....	21
<b>Conclusions</b> .....	22
<b>Acknowledgements</b> .....	22
<b>References</b> .....	22
<b>CAPÍTULO III</b> .....	24
“Diversidad genética y su relación con los compuestos químicos del aceite de las semillas en poblaciones de <i>Jatropha curcas</i> L. nativas de México”. Martínez-Díaz Y, González-Rodríguez A, Rocha-Ramírez V., Ovando-Medina I., Espinosa-García F. J... 25	25
<b>Resumen</b> .....	26
<b>Introducción</b> .....	27
<b>Materiales y métodos</b> .....	30
Colección de muestras.....	30
Análisis de los compuestos químicos del aceite.....	32
Extracción de aceite.....	32
Preparación de metil ésteres de ácidos grasos.....	32
Determinación de la composición de ácidos grasos.....	32
Extracción y análisis de ésteres de forbol.....	33
Análisis genético.....	34

Extracción de ADN.....	34
Condiciones de PCR.....	35
Análisis estadísticos.....	35
<b>Resultados</b> .....	37
Composición química del aceite de las semillas de <i>J. curcas</i> .....	37
Diversidad y estructura genética.....	43
Relación entre la variación química y la diversidad genética.....	48
<b>Discusión</b> .....	49
<b>Conclusión</b> .....	55
<b>Agradecimientos</b> .....	55
<b>Referencias</b> .....	56
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	65
<b>Discusión general</b> .....	66
Variación química foliar y su relación con la herbivoría.....	66
Correlación de la composición química del aceite y la diversidad genética.....	69
Referencias.....	72
<b>ANEXOS</b> .....	75
Anexo I.....	76
Referencias.....	78
Anexo II.....	81

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

### TABLAS

#### CAPÍTULO II

<b>Table 1.</b> Geographic location and concentration of phorbol esters in the seeds of the sampled populations of <i>Jatropha curcas</i> .....	20
<b>Table 2.</b> Variation in the total content of phytochemicals in the populations of <i>Jatropha curcas</i> .....	20
<b>Table 3.</b> Correlation between the foliar concentrations of four groups of phytochemicals in <i>Jatropha curcas</i> .....	20
<b>Table 4.</b> Summary of the multiple linear regression analysis between herbivory intensity, total phytochemical content, and geographic and climatic variables at the sites of origin in the populations of <i>Jatropha curcas</i> .....	22

#### CAPÍTULO III

<b>Tabla 1.</b> Localización geográfica de las poblaciones muestreadas de <i>J. curcas</i> .....	31
<b>Tabla 2.</b> Contenido total de aceite y ácidos grasos insaturados.....	39
<b>Tabla 3.</b> Concentración promedio de cada uno de los tipos de ácidos grasos identificados e índice de información de Shannon (I) de diversidad química en cada una de las poblaciones estudiadas.....	40
<b>Tabla 4.</b> Muestra compuesta poblacional del contenido de ésteres de forbol en el aceite de las semillas e índice de diversidad de Shannon (I).....	43
<b>Tabla 5.</b> Descriptores de diversidad genética de 17 poblaciones de <i>Jatropha curcas</i> ...	45

<b>Tabla 6.</b> Análisis de varianza molecular (AMOVA) de seis loci de microsatélites de 17 poblaciones de <i>Jatropha curcas</i> .....	46
<b>Tabla 7.</b> Resumen del análisis de regresión lineal múltiple entre el aceite total, variables genéticas, climáticas y geográficas.....	49

## FIGURAS

### CAPÍTULO II

<b>Figure. 1.</b> Principal component analysis of the total foliar content of phenols, saponins, trypsin inhibitors, and phytic acid of eight wild populations of <i>Jatropha curcas</i> . The populations were labeled in the following manner: Chiapas populations (HTA- red asterisk, MEL-empty red circle, SNB-red square and TAP-full red triangle lying), Michoacán (ARJ-empty blue diamont and CMB-blue triangle filled), and Veracruz (SNJ-green triangle filled and VNC-empty green inverted triangle).....	20
--	----

<b>Figure. 2.</b> Variation in herbivory among wild populations of <i>Jatropha curcas</i> . See Table 1 for acronym definitions of the populations. The VNC population is non-toxic, whereas the rest are toxic. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ )...	20
---	----

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1.</b> Correlación entre el contenido de ácidos grasos insaturados y la altitud ( $r = 0.604$ , $P = 0.011$ ).....	41
--	----

<b>Figura 2.</b> Análisis discriminante canónico de la concentración de ácidos grasos del aceite de las semillas de <i>J. curcas</i> . La distribución está representada en un espacio geométrico bidimensional basada en la función 1 y 2.....	42
---	----

**Figura 3.** Estructura genética de 17 poblaciones de *J. curcas* de tres estados de México: Michoacán, Veracruz y Chiapas. a) Número estimado de grupos genéticos (k) derivados del análisis de cluster de Structure. b)  $\Delta k$  fue calculado usando el método de Evanno et al. (2005). b) Cluster genético obtenido con dos grupos genéticos (k=2)..... 47

**Figura 4.** Proporción de grupos genéticos por población obtenida con el análisis bayesiano..... 48

## RESUMEN

*Jatropha curcas* L (Euprobiaceae) es un arbusto que ha llamado la atención a nivel mundial debido al uso del aceite de su semilla para la producción de biodiesel. Se han cultivado millones de hectáreas de esta planta principalmente en Asia, África, India y América Latina. Sin embargo, las expectativas de producción no han sido las esperadas, por lo tanto el cultivo de esta planta no ha alcanzado su potencial para la producción de biodiesel. Entre los factores que han obstaculizado el éxito de las plantaciones en México es la falta de conocimiento del manejo de plagas, principalmente de insectos folívoros las cuales llegan a defoliar completamente las plantas, y el uso de semillas importadas para los cultivos. Algunos estudios consideran que mientras más variación genética neutra más viable será la conservación y manejo de las especies, incluyendo las cultivadas. Sin embargo, se ha mostrado que los compuestos químicos defensivos, así como las características que determinan el rendimiento y la calidad del biodiesel (contenido total de aceite en las semillas y su perfil químico, composición de ácidos grasos), incluyendo los ésteres de forbol (compuestos tóxicos que afectan el valor comercial del aceite), tienen una base genética y son adaptativas. Para la construcción de un modelo exitoso en el cultivo sustentable de *J. curcas*, se deben considerar la variabilidad genética y química de este arbusto así como el ambiente biótico y abiótico en que se desarrolla en un contexto geográfico. Este trabajo primero se enfocó en determinar si la variabilidad química foliar y su relación con la herbivoría estaba estructurada geográficamente. Para esto, cuantificamos el contenido foliar total de inhibidores de tripsina, ácido fítico, fenoles y saponinas, y la intensidad de la herbivoría en poblaciones de *J. curcas* nativas de Chiapas, Michoacán y Veracruz. Encontramos que la variabilidad en el contenido de los compuestos químicos foliares está estructurada geográficamente. Además, un análisis de regresión lineal múltiple



mostró que el contenido de inhibidores de tripsina, y el ácido fítico, la altitud y la precipitación explican la herbivoría. Estos resultados sugieren que la caracterización fitoquímica en cada región podría ser una estrategia para diseñar plantaciones donde la intensidad de la herbivoría sea minimizada mediante la selección de varios arbustos con fenotipos químicos distintos pero adecuados a cada región. Después, queríamos entender si la variación genética neutra está correlacionada con la variación genética adaptativa, en este caso, las características que determinan el rendimiento y la calidad del biodiesel. Además, queríamos saber si la estructura genética geográfica obtenida con la variación neutra coincidía o no con la estructura obtenida con la variación adaptativa. Para esto, examinamos la relación entre la diversidad genética y la diversidad química del aceite mediante secuencias simples repetidas (SSRs) y el contenido total de aceite en las semillas, su perfil de ácidos grasos, y su contenido de ésteres de forbol. Encontramos que el perfil químico del aceite agrupó a los individuos de acuerdo a su origen geográfico. Además, el contenido de ácidos grasos insaturados estuvo correlacionado con la altitud. La estructura genética de las poblaciones no fue explicada por el aislamiento por distancia, ni por barreras geográficas. Un análisis de asignación bayesiano reveló dos grupos genéticos y confirmó que la estructura genética no está asociada con el origen geográfico de las poblaciones. A pesar de que se obtuvo el valor más alto de diversidad genética neutra reportado hasta el momento para *J. curcas*, no hubo correlación con la diversidad química de las semillas de la planta. Por lo tanto, en el caso de *J. curcas* no es adecuado considerar únicamente a la variación genética neutra para conformar las plantaciones, pues la variación genética neutra no se correlaciona con la variación genética adaptativa, como la variación química de las semillas y posiblemente con la variación química foliar.

## ABSTRACT

*Jatropha curcas* L (Euphorbiaceae) is a shrub that has drawn attention around the world due to the use of its seed oil to produce biodiesel. Millions of hectares of this plant have been cultivated, mainly in Asia, Africa, India and Latin America. However, production expectations have not been fulfilled, and therefore the plant cultivation has not reached its biodiesel potential production. Among the factors that have hindered the success of plantations in Mexico is the lack of knowledge on insect pests, mainly folivores which may defoliate completely the plant, and the use of imported seed in the crops. Some studies consider that for wild and cultivated plants, the more neutral genetic variation the more viable the conservation and management of a species is. However, variation in defensive chemicals and characteristics that determine the yield and quality of biodiesel have genetic basis and are adaptive. Although neutral genetic variation should correlate with adaptive genetic variation, some studies have shown that this is not always the case. We proposed that a successful model for sustainable cultivation of *J. curcas* should consider its neutral genetic variability, chemical variability, and the environmental characteristics (biotic and abiotic) in which the shrub develops in a geographic context. Our work first focused on determined whether the foliar chemical variability and its relation to herbivory were structured geographically. Then, we studied the correlation of neutral genetic variability with the total oil content in the seeds and the oil composition (fatty acid composition profile, and phorbol esters concentration). First, we quantified the total content of trypsin inhibitors, phytic acid, phenols and saponins in leaves, and intensity of herbivory on native populations of *J. curcas* of Chiapas, Michoacán and Veracruz. We found that the variability in the content of chemicals compounds is structured geographically at the state level. Also, a multiple linear regression analysis showed that content of trypsin inhibitors and phytic

acid, altitude and precipitation explained herbivory. These results suggest that phytochemical characterization in each region could be an adequate strategy to design *J. curcas* plantations minimizing herbivory intensity by selecting various shrubs with different chemical phenotypes and adapted to each region. Afterwards, we wanted to understand whether neutral genetic variation is correlated with adaptive genetic variation, in this case, the characteristics that determine the yield and quality of biodiesel. We also wanted to know whether the neutral genetic variation geographic structure coincided or not with the structure obtained with adaptive variation. For this, we examined the relationship between genetic diversity and chemical diversity of oil, using simple sequence repeats (SSRs) and total oil content in the seeds, fatty acid profile, and phorbol ester content. The genetic structure of populations was not explained by isolation by distance. Bayesian analysis assignment revealed two genetic groups and confirmed that neutral genetic structure is not associated with the geographical origin of populations. Although the highest neutral genetic diversity reported so far for *J. curcas* value was obtained, it was not correlated with the chemical diversity of seeds of this plant. Therefore, in the case of *J. curcas* an appropriate model to design plantations, or other forms of cultivation of this plant, should consider the neutral genetic variation and the genetically based adaptive traits such as seed and foliar chemical variability.

## **CAPÍTULO I**

---

### **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## Introducción general

*Jatropha curcas* L es un arbusto tropical de la familia Euphorbiaceae que se establece fácilmente, crece relativamente rápido y es tolerante a la sequía (Heller, 1996). También se le han atribuido una multitud de usos, como son la formación de cercas vivas, medicinal, o para controlar la erosión del suelo, entre otros (Jongschaap et al., 2007). Hay dos variantes de *J. curcas*, la no-tóxica que únicamente se encuentra en México y cuyas semillas son consumidas por humanos en Yucatán, Puebla, Veracruz y Quintana Roo (Makkar et al., 1997; Martínez-Herrera et al., 2006) y la tóxica, cuyas semillas contienen ésteres de forbol que ocasionan efectos adversos a diferentes organismos (Makkar et al., 1997).

Esta planta es nativa de México y Centro América, pero se ha introducido a otros países tropicales y subtropicales desde hace ya varios siglos (Heller, 1996; Kumar y Sharma, 2008). De acuerdo a Ginwal et al. (2005) y Ganesh (2008) individuos de México fueron introducidos a África vía la isla Cabo Verde; en la India se cree que fue introducida por marineros portugueses durante el siglo XVI (Singh et al., 2010). En los últimos años esta planta ha ganado importancia económica debido a la posibilidad de convertir el aceite de las semillas en biodiesel (Dyer y Mullen, 2008; Fairless, 2007).

A pesar de no tener variedades de *J. curcas* adaptadas a condiciones agronómicas, se ha impulsado su cultivo en millones de hectáreas en Asia, África y América Latina (Renner y Zelt, 2008; Fairless, 2007). En las plantaciones se ha obtenido un desajuste total entre las expectativas de producción y la producción real de *J. curcas* en campo (Van Eijck et al., 2014; Edrisi et al., 2015). En México se manifiestan varias razones que han obstaculizado el éxito de las plantaciones, entre ellas, la falta de conocimiento del manejo de plagas, lo que ha ocasionado pérdidas en la cosecha por la incidencia de insectos herbívoros (Ando et

al., 2012; Valero-Padilla et al., 2011) y el uso de semillas importadas principalmente de la India, las cuales tienen una diversidad genética reducida (Basha y Sujatha, 2007; Tatikonda et al., 2009) en comparación con las poblaciones nativas de México (Ovando-medina et al., 2011b).

A partir de este contexto, la presente investigación abordó dos aspectos. En el primero se consideró que se podría entender la relación entre variación química y herbivoría para aprovechar este conocimiento en la posible disminución de la intensidad de herbivoría en plantaciones de *J. curcas*. Así, se disminuiría el uso de insecticidas, lo que reduciría los efectos adversos al ambiente y consecuentemente se reducirían los costos de producción. Un segundo aspecto fue dilucidar si las características que determinan la calidad del biodiesel (contenido y composición de aceite) incluyendo los ésteres de forbol (compuestos tóxicos que afectan el valor comercial del biodiesel y el uso de la torta residual después de la extracción del aceite) están asociados con la diversidad genética.

En el primer aspecto se consideró a la teoría del mosaico geográfico para predecir la variación fitoquímica entre las poblaciones. Esta teoría establece que la forma de selección entre las especies interactuantes varía a través del paisaje, creando una mezcla de puntos calientes, donde la presión de selección recíproca es fuerte, y puntos fríos, donde la presión de selección es débil o ausente (Thompson, 2005). Por lo tanto, la composición y abundancia de los compuestos fitoquímicos puede variar entre regiones geográficas (Bravo-Monzón et al., 2014), en asociación con grupos específicos de herbívoros (Zust et al., 2012; Bernhardsson et al., 2013). Para el cultivo de *J. curcas*, el conocimiento de la estructura de la variación química en su distribución nativa así como la interacción con los herbívoros locales facilitaría el diseño de poblaciones viables adaptadas a su ambiente local. Por lo

tanto, el primer capítulo estuvo centrado en contestar la siguiente pregunta: ¿La variación en el contenido total de compuestos químicos foliares en *J. curcas* está estructurada geográficamente y a su vez está asociada con la intensidad de herbivoría?

En lo que respecta al segundo aspecto, una de las características más estudiadas en *J. curcas* es la diversidad genética mediante marcadores genéticos neutros, sin embargo se desconoce si esta variabilidad está asociada con características de la composición química de las semillas (contenido total de aceite, perfil de ácidos grasos y contenido de ésteres de forbol) que determinan la calidad del biodiesel (Foidl et al., 1996). Los ésteres de forbol son compuestos tóxicos que impiden utilizar los restos de las semillas después de la extracción del aceite como alimento para los animales (Martínez-Herrera et al., 2006), por lo que limitan el valor comercial de *J. curcas*. Algunos estudios han mostrado que la variación en el contenido total y en la composición del aceite es generada por factores ambientales, tales como las variables climáticas, acidez del suelo y la altitud (Heller, 1996; Ovando-Medina et al., 2011a; Wen et al., 2012). En cambio, otros estudios sugieren que la composición química del aceite es altamente heredable (Kaushik et al., 2007), lo que sugiere una influencia limitada del ambiente. Incluso, los ácidos grasos han sido usados para estimar la diversidad genética en *J. curcas* (Ovando-Medina et al., 2011a).

Esta segunda parte de la tesis está centrada en contestar la siguiente pregunta ¿Existe correlación entre variación de la composición química del aceite y la diversidad genética? Este estudio nos permitirá identificar a los individuos o poblaciones con mayor diversidad genética y variación química foliar, además proporcionará información sobre si la diversidad genética obtenida mediante SSRs está asociada con la variación química del aceite de la semilla.

## **Hipótesis**

La variación química foliar está estructurada geográficamente y a su vez está asociada con la intensidad de herbivoría en las poblaciones de *J. curcas*.

La variación genética está asociada con la variación de la composición química del aceite (contenido y composición del aceite, incluyendo los ésteres de forbol).

## **Objetivo general**

Analizar la variación química y genética de poblaciones silvestres de *Jatropha curcas* y su relación con la herbivoría

## **Objetivos particulares**

1. Determinar si existe correlación entre el contenido total de inhibidores de tripsina, saponinas, fenoles y ácido fítico y la herbivoría en hojas de *J. curcas*.
2. Determinar si existe asociación entre la variación química del aceite de las semillas (contenido de aceite total, ácidos grasos y ésteres de forbol) y la diversidad genética en *J. curcas*.

## **Estructura de la tesis**

Esta tesis está dividida en cuatro capítulos. El primer capítulo corresponde a la introducción general la cual constituye el marco conceptual dentro del cual se desarrolla esta investigación. En el segundo capítulo analizamos si la variación química foliar está estructurada geográficamente y si a su vez está asociada con la intensidad de herbivoría. Este capítulo es un artículo publicado por Martínez-Díaz et al. (2015) en la revista



Industrial Crops and Products. El tercer capítulo está enfocado a la diversidad genética y su correlación con características que determinan la calidad del biodiesel (contenido y composición del aceite, incluyendo los ésteres de forbol). Este capítulo está en preparación para su publicación. En el cuarto capítulo corresponde a la discusión general de la tesis en donde se presenta una reflexión sobre los diferentes tópicos que se abordaron en este trabajo.

## Referencias

Ando, T., Tsunekawa, A., Tsubo, M., y Kobayashi, H. (2012). Identification of factors impeding the spread of *Jatropha* cultivation in the state of Chiapas, Mexico. *Sustain. Agric. Res.* 2, p54.

Basha, S.D., y Sujatha, M. (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.

Bernhardsson, C., Robinson, K. M., Abreu, I. N., Jansson, S., Albrechtsen, B.R., Ingvarsson, P. K. (2013). Geographic structure in metabolome and herbivore community co-occurs with genetic structure in plant defence genes. *Ecol. Lett.* 16, 791–798.

Bravo-Monzón, A. E., Ríos-Vásquez, E., Delgado-Lamas, G., Espinosa-García, F.J. (2014). Chemical diversity among populations of *Mikania micrantha*: geographic mosaic structure and herbivory. *Oecologia*. 174, 195–203.

Dyer, J.M., y Mullen, R.T. (2008). Engineering plant oils as high-value industrial feedstocks for biorefining: the need for underpinning cell biology research. *Physiol. Plant.* 132, 11–22.

Edrisi, S.A., Dubey, R.K., Tripathi, V., Bakshi, M., Srivastava, P., Jamil, S., Singh, H.B., Singh, N., Abhilash, P.C. (2015). *Jatropha curcas* L.: A crucified plant waiting for resurgence. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 41, 855–862.

Fairless, D. (2007). Biofuel: The little shrub that could - maybe. *Nat. News* 449, 652–655.

Foidl, N., Foidl, G., Sanchez, M., Mittelbach, M., Hackel, S. (1996). *Jatropha curcas* L. as a source for the production of biofuel in Nicaragua. *Bioresour. Technol.* 58, 77–82.

Ganesh, R.S., Parthiban, K.T., Senthil Kumar, R., Thiruvengadam, V., Paramathma, V.M. (2008). Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genet Resour Crop Evol.* 55:803 –809.

Ginwal, H.S., Phartyal, S.S., Rawat, P.S., Srivastava, R.L. (2005). Seed source variation in morphology, germination and seedling growth of *Jatropha curcas* Linn. in Central India. *Silvae Genet.* 54, 76–80.

Heller, J. (1996). Physic Nut, *Jatropha curcas* L. (Bioversity International).

Jongschaap, R.E., Corré, W.J., Bindraban, P.S., y Brandenburg, W. (2007). Claims and Facts on *Jatropha Curcas* L.: Global *Jatropha curcas* Evaluation, Breeding and Propagation Programme (Plant Research International).

- Kaushik, N., Kumar, K., Kumar, S., Kaushik, N., Roy, S. (2007). Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. *Biomass Bioenergy*. 31, 497–502.
- Kumar, A., y Sharma, S. (2008). An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Ind. Crops Prod.* 28, 1–10.
- Makkar, H.P.S., Becker, K., Sporer, F., y Wink, M. (1997). Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3152–3157.
- Martínez-Herrera, J., Siddhuraju, P., Francis, G., Dávila-Ortíz, G., y Becker, K. (2006). Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food Chem.* 96, 80–89.
- Ovando-Medina, I., Espinosa-García, F., Núñez-Farfán, J., y Salvador-Figueroa, M. (2011a). Genetic variation in Mexican *Jatropha curcas* L. estimated with seed oil fatty acids. *J. Oleo Sci.* 60, 301–311.
- Ovando-Medina, I., Sánchez-Gutiérrez, A., Adriano-Anaya, L., Espinosa-García, F., Núñez-Farfán, J., y Salvador-Figueroa, M. (2011b). Genetic Diversity in *Jatropha curcas* populations in the state of Chiapas, Mexico. *Diversity* 3, 641–659.
- Renner, A., y Zelt, T. (2008) Global Market Study on *Jatropha*. Brussels: Gexsi, pp. 1–30.

Singh, A., Reddy, M.P., Chikara, J., y Singh, S. (2010). A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas*—A biodiesel plant. *Ind. Crops Prod.* 31, 209–213.

Tatikonda, L., Wani, S.P., Kannan, S., Beerelli, N., Sreedevi, T.K., Hoisington, D.A., Devi, P., y Varshney, R.K. (2009). AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. *Plant Sci.* 176, 505–513.

Thompson, J.N. (2005). *The Geographic Mosaic of Coevolution* (University of Chicago Press).

Valero-Padilla, J., Villar, C. S., H., y Vela, C. M. P. (2011). El proyecto de biocombustibles en Chiapas: experiencias de los productores de piñón (*Jatropha curcas*) en el marco de la crisis rural. *Estud. Soc. Hermosillo Son* 19, 119–144.

Van Eijck, J., Romijn, H., Balkema, A., Faaij, A. (2014). Global experience with jatropha cultivation for bioenergy: An assessment of socio-economic and environmental aspects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 32, 869–889.

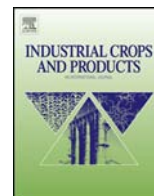
Wen, Y., Tang, M., Sun, D., Zhu, H., Wei, J., Chen, F., y Tang, L. (2012). Influence of climatic factors and soil types on seed weight and oil content of *Jatropha Curcas* in Guangxi, China. *Procedia Environ. Sci.* 12, 439–444.

Züst, T., Heichinger, C., Grossniklaus, U., Harrington, R., Kliebenstein, D.J., Turnbull, L. A. (2012). Natural enemies drive geographic variation in plant defenses. *Science.* 338, 116–119.

## CAPÍTULO II

---

**“Geographic structure of chemical variation in wild populations of the fuel crop *Jatropha curcas* L. in Mexico”**



## Geographic structure of chemical variation in wild populations of the fuel crop *Jatropha curcas* L. in Mexico



Yesenia Martínez-Díaz<sup>a,b</sup>, Antonio González-Rodríguez<sup>b</sup>, Guillermo Delgado-Lamas<sup>c</sup>, Francisco J. Espinosa-García<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>b</sup> Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, Antigua carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-hacienda de San José de la Huerta, C.P. 58190 Morelia, Michoacán, Mexico

<sup>c</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 México D.F., Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 November 2014

Received in revised form 20 April 2015

Accepted 27 April 2015

#### Keywords:

*Jatropha curcas* plantations

Fuel crops

Geographic structure of phytochemical variation

Phytic acid

Trypsin inhibitors

### ABSTRACT

*Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) is a shrub that produces seeds with a high oil content that can be converted to biodiesel. Some studies have shown that this plant contains phytochemicals that cause adverse effects on herbivores; however, it is not known whether the phytochemical variation is geographically structured and, in turn, if it is associated with herbivory intensity. This knowledge would enable the selection of individuals with adequate chemical variation to decrease the herbivory of this plant. With this objective, total foliar content of saponins, trypsin inhibitors, phytic acids, and phenols were analyzed and herbivory quantified in eight wild populations of *J. curcas* in Chiapas, Michoacán, and Veracruz, Mexico. Using principal components analysis (PCA), the content of phenols, saponins, trypsin inhibitors, and phytic acids grouped individuals to their state or frequently to their population. A multiple linear regression model considering total phytochemical content, altitude and precipitation, explained herbivory intensity (multiple adjusted  $R^2 = 0.62$ ). The concentration of trypsin inhibitors (par. corr. = 0.51,  $P < 0.0001$ ) and altitude (par. corr. = 0.769,  $P < 0.0001$ ) were positively associated with herbivory, whereas the concentration of phytic acid (par. corr. = -0.299,  $P < 0.019$ ) and precipitation (par. corr. = -0.503,  $P < 0.0001$ ) were negatively associated. It can be concluded that phytochemical variation is structured geographically at the local level and that herbivory intensity is associated with the total phytochemical content, precipitation, and altitude.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) is a native shrub of Mexico and Central America (Heller, 1996), which is drought tolerant and can grow on marginal lands (Jones and Miller, 1992). Also, it is used to prevent soil erosion, as living fence and for traditional medicine (Jongschaap et al., 2007). The seeds of this plant are toxic due to their high content of phorbol esters, but in Mexico, there are non-toxic variants used in traditional dishes in the states of Veracruz and Puebla (Makkar et al., 1997; Martínez-Herrera et al., 2006). *J. curcas* has gained economic importance because it produces seeds with high oil content capable of being transformed into biodiesel. Because of its potential, there has been a rapid expansion of *J.*

*curcas* cultivation areas and new demand for the development of improved cultivars in India, China, and Brazil (Sorell et al., 2010).

In Mexico, thousands of hectares in different states are currently being used to cultivate *J. curcas* from imported seeds. For example, between 2009 and 2012, 10,000 ha were planted in Chiapas, 200,000 in Veracruz, and 6000 ha in Michoacán (Valdés-Rodríguez et al., 2014). The intention of these state governments was to increase the area of *J. curcas* plantations.

While *J. curcas* grows wild in Mexico, plantations are developed using imported seeds adapted for other countries. These seeds are of the toxic variant and produce populations with less genetic variation than that found in Mexican wild populations (Ovando-Medina et al., 2011). In Mexico, the planting of imported seeds in places where biotic and abiotic environmental conditions are different from the countries where they were “improved”, along with low genetic variability, have caused major harvest losses due to insect pests (Valero-Padilla et al., 2011; Ando et al., 2012).

\* Corresponding author. Tel.: +52 443 3222721; fax: +52 443 3222719.

E-mail address: [espinosa@cieco.unam.mx](mailto:espinosa@cieco.unam.mx) (F.J. Espinosa-García).

A wide variety of active phytochemicals have been reported in *J. curcas*, among which are proteins, peptides, diterpenes, saponins, trypsin inhibitors, phytic acid, and phorbol esters (Makkar et al., 1997; Aregheore et al., 1998; Pradhan et al., 2012); all of these cause adverse effects on herbivores (Ratnadass and Wink, 2012).

Although studies reporting phytochemical variation are abundant, our work focuses on the geographic structure of such variability. To our knowledge, this is the first attempt to analyze the structure of phytochemical variation in native populations of *J. curcas*, and to evaluate the structure of phytochemical variation in relation to herbivory. For biofuel crops, knowledge of the geographic structure of chemical variation in their native distribution and the interaction with local natural enemies facilitates the design of viable biofuel plantations adapted to local environments.

The geographic mosaic theory can be used to predict variations in phytochemical composition among populations. This theory, states that the form of selection among interacting species varies across the landscape, creating a mixture of hot spots where reciprocal selection is strong and cold spots where reciprocal selection is weak or absent (Thompson, 2005). Therefore, the composition and abundance of phytochemicals may vary among geographic regions (Bravo-Monzón et al., 2014) associated with the specific clusters of herbivores (Züst et al., 2012; Bernhardsson et al., 2013).

The aims of study were (1) analyze if the variation in the total content of phytochemicals is geographically structured in wild populations of *J. curcas* native to Mexico, and (2) analyze if the variation in the total content of phytochemicals is associated with herbivory intensity.

For this study, wild populations were selected from three states with *J. curcas* plantations (Michoacán, Veracruz, and Chiapas), and the total foliar content of four phytochemicals, as well as herbivory intensity, were evaluated. In wild populations, there must be a considerable amount of phytochemical variation that can be exploited during the development of a sustainable crop. This information could be useful for the selection of individuals with adequate phytochemical variation associated with the geographical region to design *J. curcas* plantations with minimized herbivory damage.

## 2. Materials and methods

Mature leaves from eight wild populations were collected from *J. curcas* (Table 1). The collection was performed when plants from all sites were in reproductive status and all individuals of each population were sampled. The collection was obtained from September to October, 2010.

Of the selected populations, the Venustiano Carranza (VNC) population is considered non-toxic because the residents of the area use the seeds in food preparation; however, the Manuel Lazos (MEL), Huixtla (HTA), Playa San Benito (SNB), Tapachula (TAP), San Julian (SNJ), Arronjadero (ARJ), and Manga de Coimbo (CMB) populations are considered toxic because the seeds are not consumed and there have been recorded cases of poisoning from these variants. This classification was subsequently corroborated by quantifying the phorbol esters from the seed oil of *J. curcas* (Table 1).

Initially, it was planned to quantify the phorbol esters in the leaves; however, the protocol published for the extraction and quantification of phorbol esters in seeds (Makkar et al., 1997; Devappa et al., 2010) was not effective in leaves. Therefore, only the total content of saponins, trypsin inhibitors, phytic acid, and phenols were quantified from the leaves.

### 2.1. Chemical analysis

The total content of saponins, trypsin inhibitors, phytic acid, and phenols was measured by spectrophotometry (Thermoscientific

genesis 20). For each individual, 0.25 g of dried foliar tissue was ground in a mortar with inert sand into a fine powder. The samples were placed 15 mL tubes. All samples were shaken in a Labtech Model LS1-3016R equipment and were centrifuged in a Hermle Model Z230 centrifuge. Each type of compound was quantified as described in the following sections.

#### 2.1.1. Saponins

The extraction of saponins was performed with 10 mL of 80% MeOH. The samples were shaken for 20 min. The tubes were centrifuged at 3800 rpm for 10 min, and the supernatant was collected. Then, 20  $\mu$ L of supernatant, 230  $\mu$ L of methanol, 250  $\mu$ L of vanillin (1.6 g of vanillin diluted in 20 mL of methanol), and 2.5 mL of sulfuric acid (72%) were mixed thorough. The absorbance was recorded at 544 nm (Hiai et al., 1976). The concentration was determined from a calibration curve using different diosgenin (Sigma, St. Louis, MO, USA) concentrations diluted in 80% methanol, and the results are expressed as mg of diosgenin per  $g^{-1}$  of dry leaf.

#### 2.1.2. Trypsin inhibitors

Trypsin inhibitors were extracted with 12.5 mL of NaOH (0.01 M). The samples were shaken for 30 min after the pH was adjusted from 9.4 to 9.6. The tubes were centrifuged at 3600 rpm for 10 min, and the supernatant was collected. Then, 500  $\mu$ L of supernatant, 1.5 mL of distilled water, 2 mL of trypsin solution (20 mg of trypsin diluted in 1 L of HCl 0.001 M), and 5 mL of BAPNA solution (24 mg of *N*- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide dissolved in 600  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide, graduated to 60 mL with Tris buffer 0.5 M pH 8.2) were mixed. After being incubated in a hot water bath (37 °C) for 10 min, 1 mL of acetic acid (30%) was added. The solution was mixed thorough and absorbance was read at 410 nm (Smith et al., 1980). Trypsin inhibitor activity was determined indirectly by inhibiting the activity of trypsin. The results were expressed as mg trypsin inhibited  $g^{-1}$  of dry leaf.

#### 2.1.3. Phytic acid

The extraction of phytic acid was performed with 10 mL of 3.5% HCl. The samples were shaken for 1 h. The tubes were centrifuged at 3400 rpm for 10 min and the supernatant was collected. Then, 50  $\mu$ L of supernatant, 1.95 mL of distilled water, and 1 mL of Wade reagent (15 mg of  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  and 150 mg of sulfosalicylic acid) were mixed thorough. The absorbance was measure at 500 nm (Vaintraub and Lapteva, 1988). The concentration was determined from a calibration curve of different concentrations of phytic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA). The results are expressed in mg of phytic acid per  $g^{-1}$  of dry leaf.

#### 2.1.4. Phenols

The extraction of phenols was performed with 10 mL of 80% MeOH. The samples were shaken for 20 min. The tubes were centrifuged at 3800 rpm for 10 min and the supernatant was collected. Then, 5  $\mu$ L of supernatant, 495  $\mu$ L of distilled water, 250  $\mu$ L of Folin-Cicalteau reagent (1N), and 1.25 mL of sodium carbonate (20%) were mixed thoroughly. After 40 min of incubation in the dark, absorbance was measured at 725 nm (Makkar et al., 1997). The concentration was determined from a calibration curve of different concentrations of tannic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA). The results are expressed in mg of tannic acid per  $g^{-1}$  of dry leaf.

All measurements were performed in triplicate.

### 2.2. Measurement of herbivory

In this work, herbivory is defined as the leaf area consumed accumulated from leaf emergence to leaf maturity by chewing insect herbivores. Forty mature leaves were collected randomly from each population and were digitized. The foliar area consumed

**Table 1**Geographic location and concentration of phorbol esters in the seeds of the sampled populations of *Jatropha curcas*.

Population	State	Altitude (masl)	Precipitation (mm)	Latitude	Longitude	No. individuals	Average phorbol esters <sup>a</sup> (mg g <sup>-1</sup> of oil)
Manuel Lazos (MEL)	Chiapas	420	4250	14°58'41.1"	92°10'35.2"	10	2.03
Huixtla (HTA)	Chiapas	34	2250	15°52'33.3"	92°25'27.8"	9	2.2
Playa San Benito (SNB)	Chiapas	0	1350	14°43'44.5"	92°25'56.0"	9	0.35
Tapachula (TAP)	Chiapas	85	1900	14°49'46.9"	92°17'42.4"	5	0.46
San Julian (SNJ)	Veracruz	22	1350	19°14'58.1"	96°15'42.1"	11	2.23
Venustiano Carranza (VNC)	Veracruz	108	1100	20°27'19.9"	97°17'21.1"	10	N.D
Arronjadero (ARJ)	Michoacán	695	900	18°51'46.6"	101°39'46.2"	11	4.12
Manga de Coimbo (CMB)	Michoacán	514	900	18°53'29.3"	101°45'48.4"	7	2.34

ND= not detected.

<sup>a</sup> Quantification of phorbol esters was carried out using oil from the seeds of *J. curcas* according to Makkar et al. (1997) and Devappa et al. (2010) (Martínez-Díaz, unpublished data).**Table 2**Variation in the total content of phytochemicals in the populations of *Jatropha curcas*.

Population	Saponins <sup>a</sup> (mg g <sup>-1</sup> )	Trypsin inhibitors <sup>b</sup> (mg g <sup>-1</sup> )	Phytic acid <sup>c</sup> (mg g <sup>-1</sup> )	Phenols <sup>d</sup> (mg g <sup>-1</sup> )
MEL	1.68 ± (0.37)a	39.18 ± (7.46)ab	0.88 ± (0.06)a	1.06 ± (0.06)a
HTA	5.31 ± (0.48)b	90.46 ± (3.54)c	0.81 ± (0.05)a	1.94 ± (0.06)c
SNB	3.56 ± (0.83)ab	37.04 ± (10.84)ab	0.76 ± (0.05)a	1.53 ± (0.19)b
TAP	2.95 ± (0.43)ab	45.45 ± (4.71)b	0.82 ± (0.09)a	1.48 ± (0.12)ab
SNJ	3.48 ± (0.45)ab	104.08 ± (2.30)c	1.02 ± (0.07)ab	1.72 ± (0.06)b
VNC	4.34 ± (0.39)b	48.12 ± (4.90)b	1.20 ± (0.10)b	1.75 ± (0.07)bc
ARJ	4.54 ± (0.48)b	49.62 ± (6.81)b	1.18 ± (0.07)b	1.65 ± (0.13)b
CMB	2.42 ± (0.23)a	21.08 ± (10.15)a	1.30 ± (0.06)b	0.86 ± (0.07)a

Values in parentheses indicate the standard error. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).<sup>a</sup> mg diosgenin.<sup>b</sup> mg pure inhibited trypsin.<sup>c</sup> mg phytic acid.<sup>d</sup> mg tannic acid.

was used as an index of herbivory and was quantified using Assess 2002 software (The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA). The results are expressed as a percentage of the foliar area consumed.

### 2.3. Data analysis

The total concentration of each phytochemical group was transformed to the natural logarithm to obtain a normal distribution of the data; in the case of trypsin inhibitors, the data were not transformed because they had a normal distribution. The herbivory percentage was transformed using the arcsine square root. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test, was used to determine differences in the total phytochemical content and herbivory intensity among the populations. To identify the groups of compounds that best explained the population grouping, principal components analysis (PCA) was performed using JMP 11(SW) Inc. software. A simple correlation analysis was used to determine the association between the concentrations of saponins, trypsin inhibitors, phytic acid, and phenols. A forward stepwise multiple regression analysis was conducted to determine if the total content of phytochemicals (saponins, trypsin inhibitors, phytic acid, and phenols), altitude, and precipitation of the sampling localities were associated with herbivory intensity. Analyses were performed using Statistics 7 software (StatSoft).

## 3. Results

### 3.1. Chemical analysis

The chemical composition of the leaves was variable among the populations. The saponins content varied from 1.68 mg g<sup>-1</sup> to 4.54 mg g<sup>-1</sup>, trypsin inhibitors content varied from 21.08 mg g<sup>-1</sup> to 104.08 mg g<sup>-1</sup>, phytic acid content varied from 0.76 mg g<sup>-1</sup>

to 1.30 mg g<sup>-1</sup>, and phenols content varied from 0.86 mg g<sup>-1</sup> to 1.94 mg g<sup>-1</sup> (Table 2).

The concentrations of phenols and saponins were highly correlated ( $r = 0.85$ ) and the trypsin inhibitors were significantly correlated with both the phenols ( $r = 0.65$ ) and saponins ( $r = 0.34$ ). Phytic acid content was not significantly associated with the content of any of the other three types of compounds (Table 3).

Principal component analysis showed that 81% of the total variation is explained by the first two principal components (PC). In PC1, the phenols, saponins, and trypsin inhibitors have the highest contribution (0.96, 0.86, 0.74, respectively), whereas in PC2, phytic acid has the highest contribution (0.98). Most individuals were grouped at least with individuals from their own state, and frequently with individuals from their own population (Fig. 1). In the negative upper left quadrant of the graph, the PC1 separated individuals of the CMB population from Michoacán, and the positive upper right quadrant of the graph separated individuals of the SNJ and VNC populations from Veracruz and ARJ individuals from Michoacán. However, two individuals of the ARJ population, one of the SNJ and another of the VNC were scattered along PC2 mostly in the positive part of PC1.

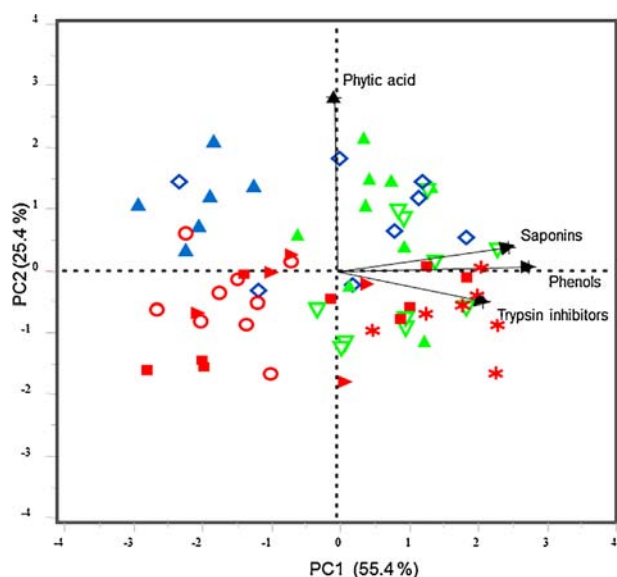
In the negative area of the "y" axis, the PC2 separated the individuals from the Chiapas populations where the MEL and HTA individuals were grouped with their population, whereas TAP and

**Table 3**Correlation between the foliar concentrations of four groups of phytochemicals in *Jatropha curcas*.

	Trypsin inhibitors	Phytic acid	Phenols	Saponins
Trypsin inhibitors	–			
Phytic acid	-0.066	–		
Phenols	<b>0.622</b>	-0.004	–	
Saponins	<b>0.344</b>	0.038	<b>0.825</b>	–

Note: Significant correlations ( $P < 0.05$ ) are indicated in bold.





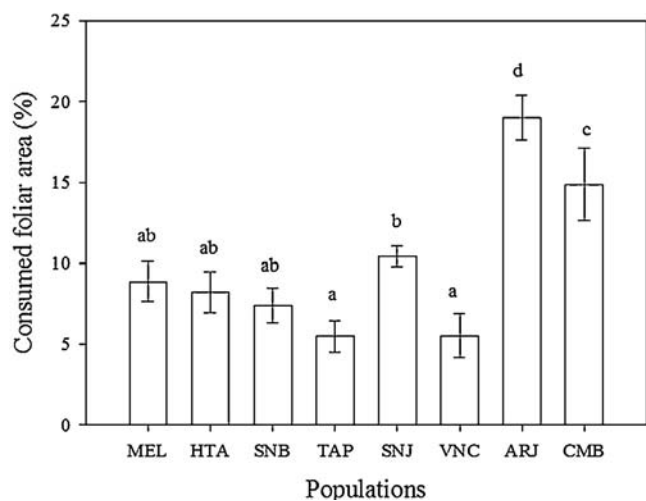
**Fig. 1.** Principal component analysis of the total foliar content of phenols, saponins, trypsin inhibitors, and phytic acid of eight wild populations of *Jatropha curcas*. The populations were labeled in the following manner: Chiapas populations (HTA-\*, MEL-○, SNB-■ and TAP-▲), Michoacán (ARJ-◇ and CMB-▲), and Veracruz (SNJ-▲ and VNC-▽).

SNB individuals were scattered along PC1 and mainly below zero in PC2 (Fig. 1).

### 3.2. Quantification of herbivory

The consumed foliar area was significantly different between the populations of Veracruz (SNJ and VNC) and Michoacán (ARJ and CMB), whereas among the populations of Chiapas (MEL, HTA, SNB, and TAP), the difference was not significant (Fig. 2). The average herbivory was 10%.

In the non-toxic population (VNC), the herbivory was lower compared to that of the more toxic populations (ARJ and CMB, Fig. 2). These two populations were considered to be the most toxic in this study, according to the phorbol ester content of the seed oil (Martínez-Díaz, unpublished results, Table 1).



**Fig. 2.** Variation in herbivory among wild populations of *Jatropha curcas*. See Table 1 for acronym definitions of the populations. The VNC population is non-toxic, whereas the rest are toxic. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

### 3.3. Relationship between herbivory intensity, total phytochemical content, altitude, and precipitation

Multiple linear regression analysis indicates that herbivory is explained by the concentration of phytochemicals, altitude, and precipitation (multiple  $R^2$  adjusted = 0.62,  $F(5, 59) = 21.91$ ,  $P < 0.0001$ ). Significant positive partial correlations (par. corr.) were found between herbivory and the concentration of trypsin inhibitors (par. corr. = 0.510,  $P < 0.0001$ ) and altitude (par. corr. = 0.769,  $P < 0.0001$ ), whereas the partial correlation of the concentration of phytic acid (par. corr. = -0.299,  $P < 0.019$ ) and precipitation (par. corr. = -0.503,  $P < 0.0001$ ) with herbivory were significant and negative. Saponins were excluded from this analysis due to their high correlation with phenols ( $r = 0.85$ , Table 3); therefore, the content of phenols and saponins was not significantly associated with herbivory intensity.

## 4. Discussion

According to the model of the geographic mosaic, it was expected that the variation pattern in the content of chemical compounds among populations had a geographic structure. It was found that the contents of the analyzed phytochemicals sorted individuals within their own state or populations (Fig. 1). This structured phytochemical variation probably occurs when different communities of herbivores determine the phytochemical composition of a population, as shown in wild populations of *Arabidopsis thaliana* and its herbivores (Züst et al., 2012).

Multiple regression analysis indicated that only two of the four analyzed compounds were associated with herbivory intensity. Plant protease inhibitors have shown anti-nutritional effects on insects (Orr et al., 1994) and the soybean trypsin inhibitor was shown to be toxic for the larva *Tribolium confusum* (Lipke et al., 1954). Contrary to this, the herbivores *Spodoptera frugiperda* (Jongsma et al., 1995) and the larvae of Lepidoptera (Broadway, 1997) adapted to the protease inhibitor activity. It was found that higher concentrations of trypsin inhibitors intensified herbivory (Table 4). It is, therefore, possible that *J. curcas* herbivores are adapted to trypsin inhibitors.

Phytic acid reduces digestibility in insects through the formation of minerals and protein complexes. This compound affects the growth and survival of Lepidoptera larvae (Green et al., 2001). Our results indicate that an increase in phytic acid concentrations reduces herbivory intensity (Table 4), which suggests that phytic acid could have a defensive role.

Despite the fact that phenols and saponins cause various adverse effects on herbivores (Green et al., 2003; Ikbāl et al., 2007; Usha Rani and Pratyusha, 2013), no significant association with herbivory was found in this study (Table 4). However, it is possible that phenols and saponins are associated with certain diseases because some studies have shown their antifungal activity (Nicholson and Hammerschmidt, 1992; Mert-Türk, 2006).

Therefore, the association between phytochemicals and herbivory can be positive or negative because the effects of phytochemicals in herbivores are diverse. For example, some have a general effect on herbivores (Feeny, 1976), whereas others may only have an effect on a specific group of consumers (Macel et al., 2005; Leiss et al., 2009) and others are most effective in combination with another group of defense chemicals. Specialists herbivores adapt or even benefit from specialized phytochemical defenses (Green et al., 2001; Karban and Agrawal, 2002; Després et al., 2007).

On the other hand, Cárdenas et al. (2014) showed that foliar defense against herbivores results from a combination of chemical,

**Table 4**

Summary of the multiple linear regression analysis between herbivory intensity, total phytochemical content, and geographic and climatic variables at the sites of origin in the populations of *Jatropha curcas*.

Phytochemical compounds, altitude and precipitation	Beta ± SE	Beta ± SE	Partial correlation	Tolerance	T (59)
Trypsin inhibitors	0.469 ± 0.10	0.09 ± 0.01	0.510	0.559	4.556***
Phytic acid	-0.223 ± 0.09	-4.33 ± 1.79	-0.299	0.693	-2.409*
Phenols	-0.115 ± 0.10	1.40 ± 1.27	-0.142	0.551	-1.105 <sup>NS</sup>
Altitude	0.908 ± 0.10	0.02 ± 0.002	0.77	0.617	9.225***
Precipitation	-0.392 ± 0.09	-0.002 ± 0.0004	-0.503	0.773	-4.472***

NS = non-significant.

\*  $P < 0.02$ .

\*\*\*  $P < 0.0001$ .

physical, and phenological characteristics. Therefore, the chemical defense determines partially the resistance against herbivores.

Phorbol esters are considered the principal toxic compounds of *J. curcas* (Makkar et al., 1997); however, these compounds are sequestered by the herbivore specialist *Pachicoris klugii* (Wink et al., 2000). This may explain why the herbivory intensity was greater in toxic populations (Fig. 2) or, in other words, this herbivore, or some other adapted to phorbol esters, is more abundant in toxic populations than in non-toxic populations.

Baldini et al. (2014) have recently shown in *J. curcas* that the content of phorbol esters in leaves and seeds, then it can be assumed that in leaves of toxic populations content phorbol esters are greater than the leaves non-toxic populations, where these compounds may be absent.

It was also expected that the geographic and climate variables in the natural habitat had an effect on herbivory intensity. It was found that at higher altitudes herbivory intensity increases (Table 4). One possible explanation is that the nutritional quality of plants located at higher altitudes may be greater than that of plants at lower altitudes, as in the case of *Sanguisorba tenuifolia* (Suzuki, 1998). Another possibility is that herbivorous specialists are more abundant at higher altitudes because they are less sensitive than generalist herbivores to environmental stress caused by altitude (Scheidel and Bruelheide, 2005).

The results also show that herbivory intensity decreases when precipitation is higher (Table 4). This result can be explained in terms of the nutritional quality of the plants; for example, species of the Montane forest in Hawaii showed a decrease in foliar nitrogen content as well as a decrease in available nitrogen in the soil with increasing precipitation (Schuur and Matson, 2001). Plants growing where precipitation is abundant are probably less palatable for herbivorous insects.

Therefore, the phytochemical characterization of *J. curcas* in each region could be a strategy for designing plantations where herbivory intensity is minimized because each population could be interacting with a certain community of herbivores in specific abiotic environmental conditions.

In this study, the measurement of phytochemicals concentrations and herbivory at one point in time could have potentially impacted our findings of the association between the concentration of chemical compounds and herbivory intensity. To establish this relationship further, it would be necessary to assess the temporal variation of herbivory intensity and the concentration of chemical compounds for several months or in different seasons.

## 5. Conclusions

Our results show that chemical variation in native populations of *J. curcas* is geographically structured. Furthermore, chemical variability and local climatic conditions were associated with herbivory. These results suggest that the current practice of cultivating *J. curcas* plantations, grown from “improved” seeds imported from India, within the native range of *J. curcas* is suboptimal or non-viable

due to insect pests. Therefore, it can be suggested that *J. curcas* plantations should be developed based on the region so that individuals with adequate phytochemical variation can be selected. By using this strategy, the incidence of herbivory would decrease on the plantations.

## Acknowledgements

We thank Dr. Jorge Martínez and Miyamin Miranda for their technical help in the quantification of chemical compounds. We are also grateful to Dr. Isidro Ovando of the Autonomous University of Chiapas, Ingrid García, and Teodoro Carlón for his assistance in plant collection. We thank Heberto Ferreira for his help with technical support. This work is presented by Y. Martínez-Díaz as a partial fulfillment for a doctoral degree at the Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. This study was funded by the Centro de Investigaciones en Ecosistemas at UNAM (POFJE); UNAM-PAPIIT (IN215511) and with FJE personal funding. Y. Martínez-Díaz acknowledges to the Posgrado en Ciencias Biológicas and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for the scholarship provided during her doctoral studies (CONACyT, 164420).

## References

- Ando, T., Tsunekawa, A., Tsubo, M., Kobayashi, H., 2012. Identification of factors impeding the spread of *Jatropha* cultivation in the state of Chiapas, Mexico. *Sustain. Agric. Res.* 2, 54–59. <http://dx.doi.org/10.5539/sar.v2n2p54>
- Aregheore, E.M., Makkar, H.P.S., Becker, K., 1998. Assessment of lectin activity in a toxic and a non-toxic variety of *Jatropha curcas* using latex agglutination and haemagglutination methods and inactivation of lectin by heat treatments. *J. Sci. Food Agric.* 77, 349–357.
- Baldini, M., Ferfua, C., Bortolomeazzi, R., Verardo, G., Pascali, J., Piasentier, E., Franceschi, L., 2014. Determination of phorbol ester in seeds and leaves of *Jatropha curcas* and in animal tissue by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ind. Crop Prod.* 59, 268–276. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.034>
- Bernhardsson, C., Robinson, K.M., Abreu, I.N., Jansson, S., Albrechtsen, B.R., Ingvarsson, P.K., 2013. Geographic structure in metabolome and herbivore community co-occurs with genetic structure in plant defence genes. *Ecol. Lett.* 16, 791–798. <http://dx.doi.org/10.1111/ele.12114>
- Bravo-Monzón, A.E., Ríos-Vásquez, E., Delgado-Lamas, G., Espinosa-García, F.J., 2014. Chemical diversity among populations of *Mikania micrantha*: geographic mosaic structure and herbivory. *Oecologia* 174, 195–203. <http://dx.doi.org/10.1007/s00442-013-2748-y>
- Cárdenas, E.R., Valencia, R., Kraft, J.B.N., Argoti, A., Dangles, O., 2014. Plant traits predict inter- and intraspecific variation in susceptibility to herbivory in a hyperdiverse neotropical rain forest tree community. *J. Ecol.* 102, 939–952. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2745.12255>
- Després, L., David, J.P., Gallet, C., 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol. Evol.* 22, 298–307. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2007.02.010>
- Devappa, R.K., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2010. Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha* oil. *Biomass Bioenergy* 34, 1125–1133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.03.001>
- Feeny, P., 1976. Plant apparency and chemical defense. In: Wallace, J.W., Mansell, R.L. (Eds.), *Biochemical Interaction Between Plants and Insects, Recent Advances in Phytochemistry*. Springer, US, pp. 1–40.
- Green, E.S., Zangerl, A.R., Berenbaum, M.R., 2001. Effects of phytic acid and xanthotoxin on growth and detoxification in caterpillars. *J. Chem. Ecol.* 27, 1763–1773.
- Green, P.W.C., Stevenson, P.C., Simmonds, M.S.J., Sharma, H.C., 2003. Phenolic compounds on the pod-surface of pigeonpea, *Cajanus cajan*, mediate feeding

- behavior of *Helicoverpa armigera* larvae. *J. Chem. Ecol.* 29, 811–821, <http://dx.doi.org/10.1023/A.1022971430463>
- Heller, J., 1996. *Physic Nut. Jatropha curcas* L. Promoting the Conservation and Use Underutilized and Neglected Crop. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Hiai, S., Oura, H., Nakajima, T., 1976. Color reaction of some saponins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Med.* 29, 116–122, <http://dx.doi.org/10.1055/s-0028-1097639>
- Ikbal, C., Mounia, B.H., Habib, B.H., 2007. Toxicity experiments of the saponic extract of *Cestrum parqui* (Solanaceae) on some insect species. *J. Entomol.* 4, 113–120, <http://dx.doi.org/10.3923/jje.2007.113.120>
- Jones, N., Miller, J.H., 1992. *Jatropha curcas*: A Multipurpose Species for Problematic Sites. 40 pp. World Bank, Asia Technical Department, Agriculture Division, Washington, D.C.
- Jongschaap, R.E.E., Corré, W.J., Bindraban, P.S., Brandenburg, W.A., 2007. *Claims and Facts on Jatropha curcas* L.: Global *Jatropha curcas* Evaluation. Breeding and Propagation Programme. Plant Research International; 158. Plant Research International, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, The Netherlands.
- Jongsma, M.A., Bakker, P.L., Peters, J., Bosch, D., Stiekema, W.J., 1995. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8041–8045.
- Karban, R., Agrawal, A.A., 2002. Herbivore offense. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 33, 641–664, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150443>
- Leiss, K.A., Maltese, F., Choi, Y.H., Verpoorte, R., Klinkhamer, P.G.L., 2009. Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in chrysanthemum. *Plant Physiol.* 150, 1567–1575, <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.138131>
- Lipke, H., Fraenkel, G.S., Liener, I.E., 1954. Effect of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*. *J. Agric. Food Chem.* 2, 410–414.
- Macel, M., Bruinsma, M., Dijkstra, S.M., Ooijendijk, T., Niemeyer, H.M., Klinkhamer, P.G.L., 2005. Differences in effects of pyrrolizidine alkaloids on five generalist insect herbivore species. *J. Chem. Ecol.* 31, 1493–1508.
- Makkar, H.P.S., Becker, K., Sporer, F., Wink, M., 1997. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3152–3157, <http://dx.doi.org/10.1021/jf970036j>
- Martínez-Herrera, J., Siddhuraju, P., Francis, G., Dávila-Ortiz, G., Becker, K., 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food Chem.* 96, 80–89, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.059>
- Mert-Türk, F., 2006. Saponins versus plant fungal pathogens. *J. Cell Mol. Biol.* 5, 13–17.
- Nicholson, R.L., Hammerschmidt, R., 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30, 369–389, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.002101>
- Ovando-Medina, I., Espinosa-García, F.J., Núñez-Farfán, J.S., Salvador-Figueroa, M., 2011. State of the art of genetic diversity research in *Jatropha curcas*. *Sci. Res. Essays* 6, 1709–1719.
- Pradhan, S., Naik, S.N., Khan, M.A.I., Sahoo, P., 2012. Experimental assessment of toxic phytochemicals in *Jatropha curcas*: oil, cake, biodiesel and glycerol. *J. Sci. Food Agric.* 59, 511–519, <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.4599>
- Ratnadass, A., Wink, M., 2012. The phorbol ester fraction from *Jatropha curcas* seed oil: potential and limits for protection against insect pests. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 16157–16171, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms131216157>
- Scheidel, U., Bruelheide, H., 2005. Effects of slug herbivory on the seedling establishment of two montane Asteraceae species. *Flora – Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 200, 309–320, <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2004.08.003>
- Schuur, E.A., Matson, P.A., 2001. Net primary productivity and nutrient cycling across a mesic to wet precipitation gradient in Hawaiian montane forest. *Oecologia* 128, 431–442, <http://dx.doi.org/10.1007/s004420100671>
- Smith, C., van Megen, W., Twaalfhoven, L., Hitchcock, R., 1980. The determination of trypsin inhibitor levels in foodstuffs. *J. Sci. Food Agric.* 31, 341–350, <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2740310403>
- Sorell, S., Miller, R., Bentley, R., Speir, J., 2010. Oil futures: a comparison of global supply forecast. *Energy Policy* 38, 4990–5003, <http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2010.04.020>
- Suzuki, S., 1998. Leaf phenology, seasonal changes in leaf quality and herbivory pattern of *Sanguisorba tenuifolia* at different altitudes. *Oecologia* 117, 169–176, <http://dx.doi.org/10.1007/s004420050645>
- Thompson, J.N., 2005. *The Geographic Mosaic of Coevolution*. University of Chicago Press.
- Usha Rani, P., Pratyusha, S., 2013. Defensive role of *Gossypium hirsutum* L. anti-oxidative enzymes and phenolic acids in response to *Spodoptera litura* F. feeding. *J. Asia-Pac. Entomol.* 16, 131–136, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2013.01.001>
- Vaintraub, I.A., Lapteva, N.A., 1988. Colorimetric determination of phytate in unpurified extracts of seeds and the products of their processing. *Anal. Biochem.* 175, 227–230, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90382-Xe](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(88)90382-Xe)
- Valdés-Rodríguez, O.A., Vázquez, A.P., Muñoz-Gamboa, C., 2014. Drivers and consequences of the first *Jatropha curcas* plantations in Mexico. *Sustainability* 6, 3732–3746.
- Valero-Padilla, J., Villar, C., Sergio, H., Coiffier, V., Patricia, M., 2011. El proyecto de biocombustibles en Chiapas: experiencias de los productores de piñón (*Jatropha curcas*) en el marco de la crisis rural. *Estud. Soc. Hermosillo Son.* 19, 119–144.
- Wink, M., Grimm, C., Koschmieder, C., Sporer, F., Bergeot, O., 2000. Sequestration of phorbol esters by the aposematically coloured bug *Pachycoris klugii* (Heteroptera: Scutelleridae) feeding on *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). *Chemoecology* 10, 179–184, <http://dx.doi.org/10.1007/PL00001820>
- Züst, T., Heichinger, C., Grossniklaus, U., Harrington, R., Kliebenstein, D.J., Turnbull, L.A., 2012. Natural enemies drive geographic variation in plant defenses. *Science* 338, 116–119, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1226397>

### **CAPÍTULO III**

---

**“Diversidad genética y su relación con los compuestos químicos del aceite de las semillas en poblaciones de *Jatropha curcas* L. nativas de México”**

**Diversidad genética y su relación con los compuestos químicos del aceite de las semillas en poblaciones de *Jatropha curcas* L. nativas de México**

Yesenia Martínez-Díaz <sup>a, b</sup>, Antonio González-Rodríguez <sup>b</sup>, Víctor Rocha-Ramírez <sup>b</sup>, Isidro Ovando-Medina <sup>c</sup>, Francisco J. Espinosa-García <sup>b\*</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México

<sup>b</sup> Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Antigua carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex -hacienda de San José de la huerta C.P. 58190, Morelia, Michoacán, México

<sup>c</sup> Centro de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas, Carretera a Puerto Madero Km 2.0, Tapachula, Chiapas, México

\*Autor de Correspondencia: [espinosa@cieco.unam.mx](mailto:espinosa@cieco.unam.mx). Tel.: + 55 443 3222721

## Resumen

Una de las características más estudiadas de la oleaginosa *Jatropha curcas* L. es la diversidad genética mediante marcadores genéticos neutros, es decir que no son influenciados por el ambiente. Un aspecto importante de entender es si la variación genética neutra está correlacionada con la variación genética adaptativa, en este caso el contenido total y perfil químico (concentración relativa de ácidos grasos) del aceite utilizado para la producción de biodiesel, incluyendo los ésteres de forbol (compuestos tóxicos que afectan el valor comercial de aceite). En este estudio analizamos la asociación entre la diversidad genética dentro y entre las poblaciones, obtenida mediante secuencias simples repetidas (SSRs) y la variación en la composición química del aceite (contenido total y el perfil químico del aceite, y el contenido de ésteres de forbol) en 17 poblaciones de *J. curcas* nativas de México. El análisis discriminante usando el perfil químico del aceite agrupó a los individuos de acuerdo a su origen geográfico a escala estatal. El contenido de ácidos grasos insaturados estuvo correlacionado con la altitud. Se obtuvo el valor más alto de diversidad genética ( $H_e = 0.686$ ) hasta el momento reportado en esta especie. La estructura genética de las poblaciones no fue explicada por el aislamiento por distancia, ni por barreras geográficas. Un análisis de asignación bayesiano reveló dos grupos genéticos y confirmó que la estructura genética no está asociada con el origen geográfico de las poblaciones. La distancia genética entre las poblaciones no estuvo asociada con las distancias del perfil químico del aceite ( $r = -0.024$ ,  $P = 0.087$ ). El contenido de ésteres de forbol y la diversidad genética no estuvieron asociados de manera significativa. El análisis de regresión lineal múltiple mostró que el contenido total de aceite no fue explicado por la diversidad genética, en cambio estuvo asociado con la altitud y la estacionalidad de la temperatura. Concluimos que la diversidad genética obtenida con SSRs no está asociada

con la variación de la composición química del aceite en *J. curcas*, en cambio los factores ambientales locales juegan un papel importante en la variación de estos compuestos.

**Palabras clave:** ácidos grasos, *Jatropha curcas*, microsátélites, diversidad genética, México, ésteres de forbol

## 1. Introducción

*Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) es un arbusto nativo de México y Centro América (Basha y Sujatha, 2007; Heller, 1996), que ha sido utilizado como cerca viva, medicina tradicional, y para controlar la erosión del suelo (Jongschaap et al., 2007). Hay dos variantes de *J. curcas*, la no-tóxica, que únicamente se encuentra en México y cuyas semillas son consumidas por humanos en Yucatán, Puebla, Veracruz y Quintana Roo (Makkar et al., 1997; Martínez–Herrera et al., 2006); en cambio las semillas de las variantes tóxicas contienen ésteres de forbol que ocasionan efectos adversos a diferentes organismos (Makkar et al., 1997). En la última década, *J. curcas* ha ganado importancia económica debido a que el aceite de sus semillas se puede convertir en biodiesel (Openshaw, 2000). Por esta razón, esta planta se cultiva extensamente, se estima que en el año 2015 se habrán plantado 12.8 millones de hectáreas alrededor del mundo (Fairless, 2007; Renner et al., 2008). Esto ha impulsado la búsqueda de genotipos con mayor diversidad genética y con características agronómicas adecuadas para ser utilizados en las plantaciones extensivas en diferentes países.

De acuerdo con Aitken et al. (2008) y Jump et al. (2009), el mantenimiento de la diversidad genética dentro y entre las poblaciones o cultivos de plantas es de vital

importancia ya que les permite responder de manera eficiente ante la incidencia de plagas y enfermedades así como a los cambios ambientales; por lo tanto, es esencial para la sobrevivencia de cualquier especie. En este sentido, algunos estudios consideran que en *J. curcas* la evaluación de la diversidad genética realizada mediante marcadores moleculares neutros (es decir que no son influenciados por el ambiente) es suficiente para la conservación de la especie o incluso para el manejo del cultivo (Ganesh et al., 2007; Jubera et al., 2009; Ikbal et al., 2010; Machua et al., 2011; Osorio et al., 2014; Montes et al., 2014). En este contexto la diversidad genética de *J. curcas* se ha estimado principalmente con secuencias simples repetidas (SSRs), polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) y secuencias inter-simple repetidas (ISSR). Aunque *J. curcas* se originó en México y América Central (Heller, 1996) existen estudios se han realizado en accesiones introducidas a la India (Basha y Sujatha, 2007; Pamidimarri et al., 2009a), Brasil (Rosado et al., 2010) y en otras partes del mundo (Osorio et al., 2014; Sanou et al., 2015; Siju et al., 2015). También se ha estudiado la variación genética en las poblaciones de México por Ovando-Medina et al., (2011a), Pecina-Quintero et al., (2011, 2014), y Salvador-Figueroa et al., (2015), quienes han mostrado que existen altos niveles de diversidad genética en las poblaciones mexicanas.

Por otra parte, las características del contenido de aceite y su perfil químico en las semillas determinan el rendimiento del aceite y la calidad del biodiesel (Foidl et al., 1996), por lo que deben ser consideradas en la selección de los individuos para su cultivo. Otro tipo de compuestos presentes en la semilla de las variantes tóxicas son los ésteres de forbol, compuestos tóxicos que impiden utilizar los restos de las semillas después de la extracción del aceite como alimento para los animales (Martínez-Herrera et al., 2006). Los ésteres de



forbol también han mostrado ser co-carcinógenos (Hirota et al., 1988; Makkar y Becker, 2009), por lo que también limitan el valor comercial de *J. curcas*.

Un aspecto de vital importancia es entender si la diversidad genética obtenida con marcadores moleculares neutros está asociada con características de interés en la planta que determinan el rendimiento del aceite y la calidad del biodiesel.

Algunos estudios han mostrado que la variación del contenido total y el perfil químico del aceite es generada por factores ambientales, tales como las variables climáticas, acidez del suelo y la altitud (Heller, 1996; Ovando-Medina et al., 2011b; Wen et al., 2012). En cambio, otros estudios sugieren que el contenido total y el perfil químico son altamente heredables (Kaushik et al., 2007; Ovando-Medina et al., 2011b), lo que sugiere una influencia limitada del ambiente. Incluso, los ácidos grasos han sido usados para estimar la diversidad genética en *J. curcas* (Ovando-Medina et al., 2011b).

Los objetivos de este estudio fueron (1) Analizar la variación en la composición química del aceite y la diversidad genética en poblaciones de *J. curcas* nativas de México (2) Determinar si existe correlación entre la variación en la composición química del aceite y la diversidad genética. Para este estudio se seleccionaron poblaciones nativas de *J. curcas* de Michoacán, Veracruz y Chiapas, y se cuantificaron los compuestos químicos del aceite (contenido total y perfil químico del aceite, y ésteres de forbol), y la diversidad genética se analizó mediante SSRs.

Este estudio permitirá identificar a los individuos o poblaciones con mayor diversidad genética y la composición química de la semilla más adecuada para la producción biodiesel, los cuales pueden ser promovidos para su uso en las plantaciones. También nos proporcionará información sobre si la diversidad genética neutra (SSRs) es suficiente para detectar la variación química del aceite de las semillas.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Colección de muestras.**

Se seleccionaron poblaciones silvestres de variantes tóxicas y no tóxicas de Michoacán, también se incluyeron poblaciones de Veracruz y Chiapas (Tabla 1). Las poblaciones silvestres están formadas por un número reducido de individuos. En el muestreo únicamente se incluyeron a los individuos en estado de fructificación. Se recolectaron hojas jóvenes y semillas. Las poblaciones seleccionadas son utilizadas de manera diferente por los habitantes de las localidades. Las poblaciones de Michoacán (CND, SNP, BNA, BUE, ANU, CHA, NEI, OLV, GMR, AJR y COB) no tienen ningún uso. En Veracruz, las semillas de la población VEC son utilizadas en la elaboración de platillos tradicionales, mientras que la población SAJ del mismo estado es utilizada como cerca viva. Los individuos de las poblaciones de Chiapas (TPL, MUL, SAB y HUI) son utilizados como cercas vivas.

**Tabla 1. Localización geográfica de las poblaciones muestreadas de *J. curcas*.**

<b>Poblaciones (POP)</b>	<b>Estados</b>	<b>N. de individuos</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>	<b>Altitud msnm</b>	<b>Precipitación mm</b>
El ceñidor (CND)	Michoacán	4	19°00'19.7"	102°11'25.0"	361	643
San Pedro (SNP)	Michoacán	4	18°52'35.1"	101°41'48.8"	525	797
Buenos Aires (BNA)	Michoacán	4	19°04'27.0"	102°10'54.2"	481	739
Buenos Aires (BUE)	Michoacán	4	19°03'45.3"	102°11'19.7"	446	721
Antúnez (ANU)	Michoacán	4	19°00'52.8"	102°12'04.6"	367	644
Chandío (CHA)	Michoacán	4	19°05'28.6"	102°24'17.8"	278	687
Nueva Italia (NEI)	Michoacán	4	19°00'47.9"	102°05'38.8"	398	690
Los Olivos (OLV)	Michoacán	4	18°50'38.8"	102°08'31.3"	183	682
Gambara (GMR)	Michoacán	4	18°55'55.5"	102°06'44.0"	281	676
Arronjadero (AJR)	Michoacán	10	18°51'46.6"	101°39'46.2"	695	795
Manga de Coimbo (COB)	Michoacán	7	18°53'29.3"	101°45'48.4"	514	812
Venustiano Carranza (VEC)	Veracruz	10	20°27'19.9"	97°17'21.1"	108	1202
San Julián (SAJ)	Veracruz	11	19°14'58.1"	96°15'42.1"	22	1195
Tapachula (TPL)	Chiapas	5	14°49'46.9"	92°17'42.4"	85	1881
Manuel Lazos (MUL)	Chiapas	10	14°58'41.1"	92°10'35.2"	420	4355
San Benito (SAB)	Chiapas	9	14°43'44.5"	92°25'56.0"	0	1476
Hiuxtla (HUI)	Chiapas	9	15°52'33.3"	92°25'27.8"	34	1644

## **2.2 Análisis de los compuestos químicos del aceite**

### **2.2.1 Extracción de aceite**

Las semillas fueron secadas al sol durante 8 días, después se eliminó la cubierta manualmente. Posteriormente, aproximadamente 100 g de almendra de cada individuo se molieron en una licuadora hasta obtener un polvo fino. La harina obtenida se pesó y colocó en cartuchos de papel filtro para desgrasarse con hexano (70 ° C) en un aparato Soxhlet. Los resultados son expresados como porcentaje de aceite en las semillas pulverizadas con la siguiente formula: % de aceite =  $m_2 - m_1 / m_3 \times 100$  ( $m_1$ = peso del matraz,  $m_2$ = peso del matraz con aceite,  $m_3$ = peso de la harina)

### **2.2.2 Preparación de metil ésteres de ácidos grasos**

En tubos previamente lavados con hexano y puestos en una estufa a 300° C durante 2 horas se adicionó 20 ml de hexano y 40 mg de aceite. Los tubos se pusieron en baño maría (40 ° C) durante 1 minuto, después se adicionaron 200 µL de NaOH diluido en metanol (2.0 M). La mezcla se agitó en un vórtex durante 2 minutos y se volvió a poner en baño maría durante 1 minuto. La muestra se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante (hexano), que contenía los metil ésteres, fue recolectado (Ichihara et al., 1996).

### **2.2.3 Determinación de la composición de ácidos grasos**

El perfil químico del aceite (concentración relativa de los ácidos grasos) se analizó por cromatografía de gases /espectrometría de masas (Cromatógrafo Agilent 6890 y espectrómetro de masas Agilent 5973). Se inyectaron 0.3 µL de metil ésteres de cada individuo en una columna (Equity TM -5 Supelco 28089-U. 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm),

con el siguiente gradiente de temperatura: 150 ° C, 3° C min<sup>-1</sup> a 200 ° C, 6 ° C min<sup>-1</sup> a 220 ° C. Se usó helio como gas acarreador (7.48 psi). El inyector se programó en modo split 70:1 con una temperatura de 280 ° C, modo Scan y un rango de masas de 50 a 550 m/z. Los compuestos de cada una de las muestras fueron identificadas por la comparación de su espectro de masas con los espectros de la Librería National Institute of Standards and Technology (NIST02). La concentración de cada compuesto se obtuvo por la comparación de la abundancia relativa del estándar interno el ácido nonadecanóico metil éster (Sigma, St. Louis, MO, USA). La concentración de cada ácido graso es reportado en mg /mg<sup>-1</sup> de aceite. El porcentaje de los ácidos grasos se obtuvo considerando la concentración total como 100%.

#### **2.2.4 Extracción y análisis de ésteres de forbol**

La extracción de ésteres de forbol se realizó de acuerdo al método de Devappa et al. (2010). Brevemente, a partir de 0.25 g de aceite de cada individuo se realizó la extracción de ésteres de forbol con 0.5 mL de metanol, el proceso de extracción se repitió tres veces con sonicación y centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos. La concentración de ésteres de forbol se obtuvo mediante la evaporación del metanol bajo presión reducida sin exceder los 40° C. La muestra se ajustó a un volumen final de 200 µl, se filtró y se inyectó manualmente (20 µl) en el HPLC (Water<sup>TM</sup> 600 MS).

El análisis se realizó de acuerdo al método de Makkar et al. (1997) con algunas modificaciones. El HPLC estaba equipado con un detector de arreglo de fotodiodo. La columna analítica fue una C18 fase inversa (125 A ° Bondapack, 10µm, 300 x 3.9 mm I.D). Disolventes usados: A) ácido fosfórico (85%, 1.75 mL de ácido fosfórico en 1 L de agua destilada) y B) acetonitrilo. Gradiente usado: al inicio A al 60% y B al 40%, después A

decrementó al 50 % y B incrementó al 50 % en los próximos 10 minutos, luego A decrementó al 25 % y B incrementó al 75% en los próximos 30 minutos, finalmente B se incrementó al 100 % durante los próximos 10 minutos. La columna se lavó con B al 100% durante 10 minutos. La separación se realizó a temperatura ambiente con un flujo de 1.3 mL por minuto. Los picos con absorbancia máxima a 280 nm se consideraron como ésteres de forbol (Devappa et al., 2010; He et al., 2011; Makkar et al., 1997) y la concentración de cada pico se obtuvo mediante una curva de calibración con forbol 12-myristato 13-acetato (Sigma, St. Louis, MO, USA). El análisis se realizó por duplicado.

## **2.3 Análisis genético**

### **2.3.1 Extracción de ADN**

Las hojas jóvenes se deshidrataron con gel de sílice y se mantuvieron a -20 ° C hasta su procesamiento. El ADN total se extrajo de 0.2 g de tejido, cada muestra se molió en un mortero con nitrógeno líquido. La muestra obtenida se mezcló con 1 mL de buffer de CTAB (Tris-HCl (1M), H<sub>2</sub>O destilada, NaCl (5 M), EDTA (0.5 M), PVP-40, ácido ascórbico, DIECA, 2- mercapto etanol) y se incubó a 60 °C durante 30 minutos. Para la extracción del ADN se adicionaron 500 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se recolectó y la precipitación del ADN se realizó con 600 µL de isopropanol. La pastilla de ADN se obtuvo por centrifugación a 12000 rpm durante 3 minutos, el sobrenadante se desechó. La pastilla se secó a temperatura ambiente y el ADN se disolvió en 60 µL de agua desionizada. La calidad del ADN se determinó por electroforesis en un gel de agarosa (0.8%) teñido con bromuro de etidio.

### **2.3.2 Condiciones de PCR**

Utilizamos seis loci de microsatélites: Jcds10, Jcds41, Jcps9, Jcps20, Jcps21 y Jcms21, desarrollados para *Jatropha curcas* (Pamidimarri et al., 2009b), en reacciones múltiple con primers marcados con fluorescencia. La amplificación de los microsatélites se realizó en un Eppendorf Mastercycler® thermocycler, el volumen de reacción fue de 5 µL que contenían 50 ng de ADN, 2.5 de multiplex PCR Kit (QUIAGEN®), 0.5 de cada primer y 1.5 de agua desionizada. La temperatura para la amplificación del PCR consistió en una activación inicial a 95° C durante 1 minuto, la temperatura de alineamiento fue específica para cada primer (45.8 °C para Jcds10, 59.5 °C para Jcds41, 48.4 °C para Jcps9, Jcps21 y Jcms21, 51.1 °C para Jcps20) durante 3 minutos y la extensión a 72 °C durante 1 minuto. Después de cada ciclo hubo una elongación final a 72 °C durante 7 minutos.

La mezcla del producto de PCR (1 µL), 10 µL de formamida altamente desionizada (Hi-Di) y 0.3 µL de estándar de tamaño GeneScan-500 LIZ (Applied Biosystems) se sometió durante 2 minutos a 95 °C para desnaturalizar el ADN y se analizó por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism 3100-*Avant*® (Applied Biosystems, Hitachi, Japón). Para analizar el tamaño de los fragmentos amplificados utilizamos Peak Scanner™ versión 1.0 (Applied Biosystems) y para identificar la presencia de alelos nulos en cada locus por población utilizamos el software Micro-Checker ver. 2.2.3.

### **2.4. Análisis estadísticos**

El contenido total y el perfil químico del aceite entre las poblaciones se compararon con análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguidos de una prueba de Tukey con el software Statistica 8 (Statsoft). Para estimar la diversidad química individual y poblacional

se utilizó el índice de Shannon. El índice de Shannon individual se calculó con el número de compuestos y su concentración relativa en el aceite, y el índice de Shannon poblacional se calculó como el promedio de la diversidad química de los individuos de cada población. Usando la concentración relativa de los ácidos grasos se realizó un análisis discriminante con el Software JMP 8 para identificar los compuestos que clasifican a las poblaciones. Para probar la hipótesis de aislamiento por distancia se realizó una prueba de Mantel con la matriz de distancias euclidianas del perfil químico y las distancias geográficas con el software XLSTAT ver. 2015.1.02 (addinsoft). La asociación entre el porcentaje de los ácidos grasos insaturados y la altitud se realizó con un análisis de correlación con el software Statistica 8 (Statsoft).

La diversidad genética poblacional fue estimada con el número promedio de alelos por locus ( $N_a$ ), el promedio del número efectivo de alelos ( $N_e$ ), el índice de información de Shannon ( $I$ ), la heterocigocidad observada ( $H_o$ ), heterocigocidad esperada ( $H_e$ ) y el índice de endogamia ( $F$ ) con el software GenAlex Versión. 6.501 (Peakall y Smouse, 2006).

Para determinar la ubicación de las principales discontinuidades genéticas entre las poblaciones muestreadas (i. e. barreras genéticas) aplicamos el algoritmo de Monmonier a la matriz de distancia de Nei usando el software Barrier 2.2 (Manni et al., 2004). La subdivisión de la variación genética entre y dentro de las poblaciones se analizó mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) y el índice de diferenciación  $F_{ST}$  se calculó con el software GenAlex Versión 6.501.

La estructura genética de las poblaciones se determinó con estadística Bayesiana usando el programa Structure, Version 2.2 (Pritchard et al., 2000), con 50,000 quemas y 100,000 repeticiones de las cadenas de Markov Monte Carlo. Para obtener el valor más probable de  $K$  se probaron los valores de  $K$  de 1 a 8, con 10 corridas independientes para



cada K. El valor más probable de K fue estimado calculando el valor más alto de  $\Delta K$  (Evanno et al., 2005) con el programa Structure Harvester versión 0.693 (Earl y vonHoldt, 2011).

Se realizó una prueba de Mantel con 10,000 permutaciones para determinar la correlación entre la matriz de distancias euclidianas del perfil químico del aceite y la matriz de distancia genética de Nei con el software XLSTAT ver. 2015.1.02.

Para analizar la asociación entre el contenido total de ésteres de forbol y la diversidad genética, se realizó un análisis de correlación simple. Para explorar la posible relación entre el contenido total de aceite, la diversidad genética ( $N_a$ ,  $N_e$ ,  $F$ ,  $H_e$ , porcentaje de ancestría genética e  $I$ ), la altitud y variables climáticas (obtenidas de <http://www.worldclim.org>) se realizó un análisis de regresión lineal múltiple modalidad stepwise con el software Statistica 8 (Statsoft). De las 19 variables climáticas se eliminaron las que estaban altamente correlacionadas y solo seis variables se incluyeron en el modelo (rango de la temperatura anual, temperatura mínima del mes más frío, estacionalidad de la temperatura, estacionalidad de la precipitación, precipitación anual y temperatura media anual).

### **3. Resultados**

#### **3.1 Composición química del aceite de las semillas de *J. curcas***

El contenido total de aceite en las semillas de los individuos varió entre 31.15 y 68.54%, mientras que el contenido promedio de las poblaciones varió de 42.35 a 55.39 %; la diferencia entre las poblaciones fue significativa ( $F_{(16, 86)} = 2.564$ ,  $P = 0.003$ ; Tabla 2). Se encontraron ocho ácidos grasos: ácido tetradecanóico (ácido mirístico 14:0), ácido

hexadecanóico (ácido palmítico 16:0), ácido 9-hexadecanóico (ácido palmitoléico 16:1), ácido heptadecanóico (ácido margárico 17:0), ácido octadecanóico (ácido esteárico 18:0), ácido 9-octadecanóico (ácido oléico 18:1), ácido 9,12-octadecanóico (ácido linoléico 18:2) y el ácido eicosanóico (ácido araquídico 20:0). Los más abundantes fueron el ácido linoleico, el ácido oleico, el ácido palmitoléico y el ácido esteárico (Tabla 3). La concentración de los ocho ácidos grasos encontrados fue significativamente variable entre las poblaciones excepto en el caso del ácido araquídico (Tabla 3). El índice de Shannon mostró que la diversidad química entre las poblaciones varió entre 1.48 y 1.67 (Tabla 3). La población MUL (Chiapas) mostró el nivel más alto de diversidad química, mientras que en la población VEC (Michoacán) se encontró el nivel más bajo de diversidad química (Tabla 3). El porcentaje de ácidos grasos insaturados entre los individuos varió entre 73.77 y 80.30 %, mientras que la variación entre poblaciones fue entre 74.95 y 77.68 %, la diferencia fue significativa ( $F(16,84) = 7.93$ ,  $P = 0.0000$ ; Tabla 2). El porcentaje de los ácidos grasos insaturados estuvo correlacionado de manera significativa con la altitud ( $r = 0.603$ ,  $P = 0.011$ ; Figura 1).

**Tabla 2. Contenido total de aceite y ácidos grasos insaturados.**

<b>Población</b>	<b>Estado</b>	<b>Porcentaje de aceite total en las semillas</b>	<b>Porcentaje de ácidos grasos insaturados en el aceite</b>
CND	Michoacán	44.05(1.69)a	74.95(0.44)ab
SNP	Michoacán	50.47(2.14)ab	76.90(0.80)b
BNA	Michoacán	43.89(1.79)a	75.72(0.15)ab
BUE	Michoacán	54.12(1.79)b	77.00(1.08)b
ANU	Michoacán	49.70(1.86)ab	75.98(0.44)ab
CHA	Michoacán	51.59(2.38)ab	76.26(0.46)ab
NEI	Michoacán	42.35(1.76)a	75.86(0.19)ab
OLV	Michoacán	42.83(1.39)a	75.73(0.37)ab
GMR	Michoacán	47.92(0.56)ab	75.71(0.15)ab
AJR	Michoacán	53.10(3.13)b	77.68(0.23)b
COB	Michoacán	55.39(1.76)b	77.09(0.35)b
VEC	Veracruz	48.07(3.28)ab	76.92(0.55)b
SAJ	Veracruz	50.01(3.03)ab	74.44(0.33)a
TPL	Chiapas	48.29(6.08)ab	74.95(0.93)a
MUL	Chiapas	47.96(1.72)a	74.86(0.33)a
SAB	Chiapas	45.11(1.57)a	74.91(0.39)a
HUI	Chiapas	53.42(2.22)b	73.51(0.26)a

Los valores entre paréntesis indican el error estándar, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 3. Concentración promedio (mg) de cada uno de los tipos de ácidos grasos identificados e índice de información de Shannon (I) de diversidad química en cada una de las poblaciones estudiadas.**

POP	Ácido mirístico (14:0)	Ácido palmitoléico (16:01)	Ácido palmítico (16:0)	Ácido margárico (17:0)	Ácido linoléico (18:2)	Ácido oléico (18:1)	Ácido esteárico (18:0)	Ácido araquídico (20:0)	I
CND	0.25(0.01)b	0.39(0.02)b	1.75(0.06)ab	0.14(0.007)a	2.78(0.09)ab	2.79(0.10)ab	1.43(0.05)b	0.18(0.02)a	1.66
SNP	0.24(0.03)b	0.41(0.03)b	1.69(0.16)ab	0.08(0.02)a	2.69(0.23)ab	2.64(0.23)ab	1.19(0.12)ab	0.03(0.03)a	1.59
BNA	0.25(0.02)b	0.37(0.04)b	1.78(0.17)ab	0.11(0.04)a	2.85(0.28)ab	2.83(0.22)ab	1.40(0.12)ab	0.07(0.04)a	1.60
BUE	0.24(0.02)b	0.33(0.04)b	1.72(0.19)ab	0.13(0.02)a	2.99(0.36)ab	3.00(0.33)ab	1.15(0.21)b	0.09(0.06)a	1.60
ANU	0.28(0.04)bd	0.37(0.04)b	1.86(0.19)ab	0.16(0.01)ab	3.13(0.34)b	3.23(0.32)b	1.63(0.18)b	0.13(0.05)a	1.63
CHA	0.27(0.04)bd	0.38(0.06)b	1.81(0.30)ab	0.78(0.65)b	2.55(0.51)ab	3.03(0.49)ab	1.48(0.26)b	0.08(0.05)a	1.66
NEI	0.21(0.02)b	0.30(0.03)ab	1.48(0.15)ab	0.07(0.03)a	2.35(0.22)ab	2.42(0.24)ab	1.19(0.12)ab	nd	1.58
OLV	0.25(0.02)b	0.32(0.01)ab	1.66(0.08)ab	0.10(0.03)a	2.71(0.13)ab	2.71(0.11)ab	1.37(0.07)ab	0.11(0.04)a	1.62
GMR	0.24(0.02)b	0.33(0.02)abc	1.60(0.07)ab	0.13(0.009)ab	2.57(0.10)ab	2.10(0.09)ab	1.35(0.05)ab	0.10(0.05)a	1.63
AJR	0.16(0.01)abc	0.28(0.03)ab	1.34(0.11)ab	0.07(0.02)a	2.39(0.18)ab	2.18(0.16)ab	1.08(0.08)a	0.10(0.02)a	1.60
COB	0.22(0.02)b	0.32(0.01)b	1.71(0.14)ab	0.08(0.02)a	2.94(0.61)b	2.61(0.21)ab	1.27(0.08)ab	0.11(0.03)a	1.60
VEC	0.09(0.02)a	0.17(0.03)a	1.21(0.13)a	nd	1.88(0.21)a	2.05(0.23)a	0.90(0.07)a	nd	1.48
SAJ	0.20(0.007)b	0.38(0.02)b	1.79(0.15)ab	0.11(0.01)a	2.78(0.20)ab	2.54(0.18)ab	1.28(0.08)ab	0.12(0.03)a	1.63
TPL	0.18(0.03)ab	0.38(0.06)b	1.56(0.21)ab	0.10(0.01)a	2.37(0.29)ab	2.45(0.23)ab	1.23(0.14)ab	0.12(0.05)a	1.64
MUL	0.18(0.01)b	0.45(0.02)d	1.68(0.08)ab	0.14(0.004)a	2.57(0.10)ab	2.53(0.12)ab	1.24(0.03)ab	0.16(0.02)a	1.67
SAB	0.21(0.02)b	0.49(0.04)cd	1.86(0.13)b	0.10(0.02)a	2.71(0.18)ab	2.86(0.22)ab	1.29(0.07)ab	0.15(0.03)a	1.65
HUI	0.17(0.01)abc	0.42(0.009)d	1.66(0.05)ab	0.10(0.10)a	2.47(0.07)ab	2.44(0.08)ab	1.25(0.03)ab	0.16(0.02)a	1.66

Los valores entre paréntesis indica el error estándar; nd, no detectado; las letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

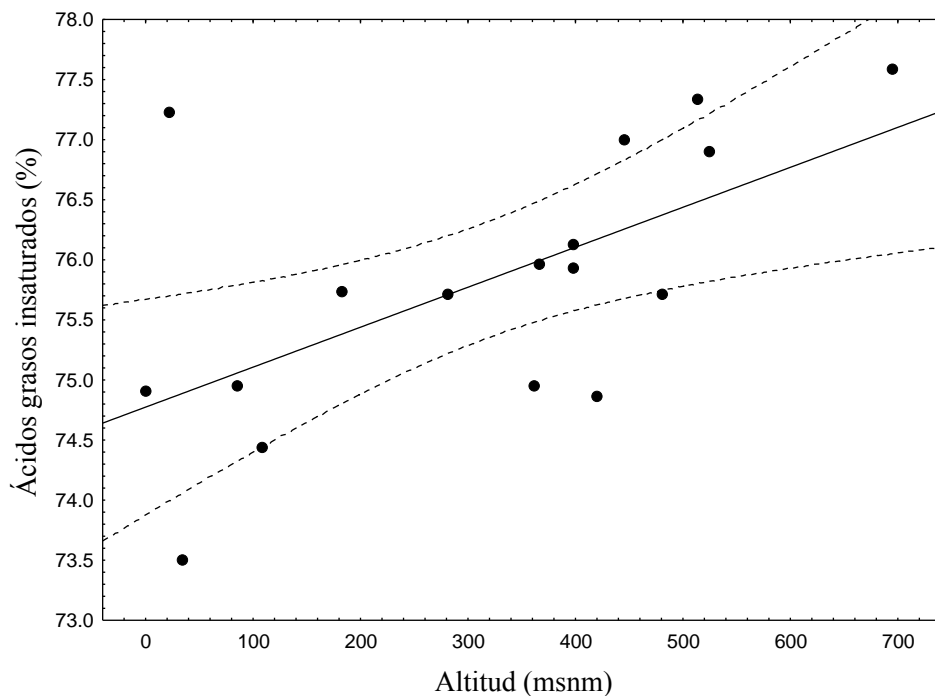


Figura 1. Correlación entre el contenido de ácidos grasos insaturados y la altitud ( $r = 0.604$ ,  $P = 0.011$ ).

El análisis discriminante usando el perfil químico del aceite separó a los individuos de las poblaciones de acuerdo a su origen geográfico a escala estatal. En la función 1 del gráfico los individuos de las poblaciones de Michoacán se encuentran en la parte negativa, los individuos de Veracruz se encuentran en la parte intermedia y los individuos de Chiapas se encuentran en la parte positiva del gráfico (Figura 2). Los coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes 1 y 2 para cada variable fueron las siguientes: ácido mirístico - 1.393 y -0.015, ácido palmitoléico 0.831 y 1.705, ácido palmítico 3.107 y -4.933, ácido margárico -0.913 y 0.264, ácido linoléico -3.508 y 1.564, ácido oléico 0.791 y 2.353, ácido esteárico 0.188 y 0.168 y ácido araquídico 0.545 y -0.206. Las variables con mayor poder

discriminante fueron: el ácido linoléico, el ácido palmítico y el ácido mirístico (Figura 2). La estructura geográfica del perfil químico no fue explicada por el aislamiento por distancia, ya que la prueba de Mantel no fue significativa ( $r = -0.022$ ,  $P = 0.737$ ).

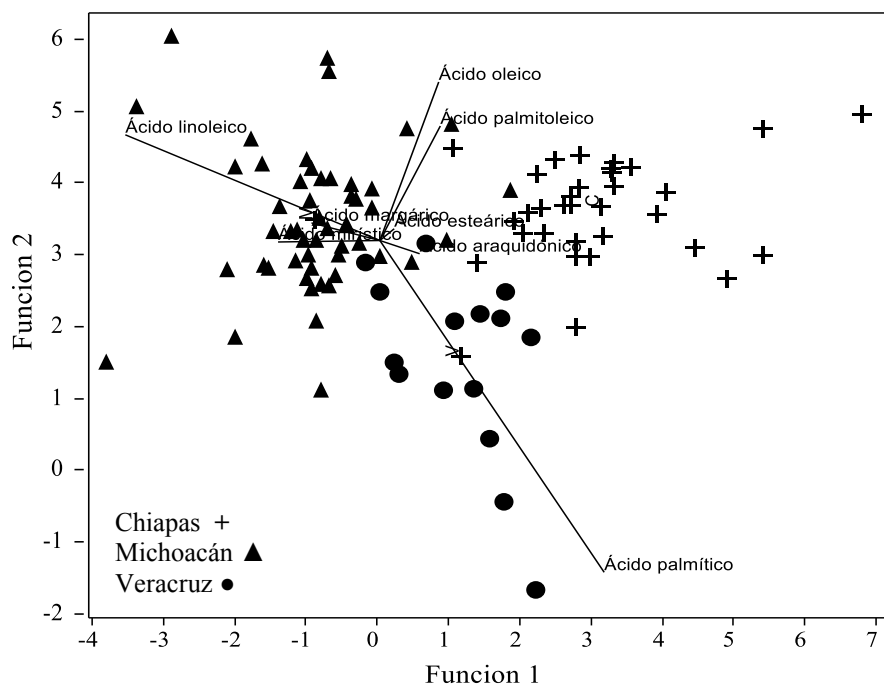


Figura 2. Análisis discriminante canónico de la concentración de ácidos grasos del aceite de las semillas de *J. curcas*. La distribución está representada en un espacio geométrico bidimensional basado en las funciones 1 y 2.

Se identificaron 5 picos de ésteres de forbol (tiempo de retención: 47-51 minutos), la proporción de cada uno de ellos fue variable entre las poblaciones (Tabla 4). El contenido total más alto de ésteres forbol se encontró en la población ARJ de Michoacán ( $4.120 \text{ mg/g}^{-1}$ ), mientras que en algunas poblaciones el contenido de estos compuestos fue de 0. El índice de diversidad de Shannon varió entre 0.009 y 1.04 (Tabla 4).

**Tabla 4. Muestra compuesta poblacional del contenido de ésteres de forbol en el aceite de las semillas e índice de diversidad de Shannon (I).**

POP	Estado	Ésteres de forbol (mg/g <sup>-1</sup> )					Total	I
		Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5		
CND	Michoacán	nd	nd	nd	nd	nd	0	-
SNP	Michoacán	nd	nd	nd	nd	nd	0	-
BNA	Michoacán	nd	nd	nd	nd	nd	0	-
BUE	Michoacán	nd	nd	nd	nd	nd	0	-
ANU	Michoacán	nd	nd	nd	nd	nd	0	-
CHA	Michoacán	nd	nd	nd	nd	nd	0	-
NEI	Michoacán	nd	nd	nd	nd	nd	0	-
OLV	Michoacán	nd	nd	nd	nd	nd	0	-
GMR	Michoacán	nd	nd	nd	nd	nd	0	-
AJR	Michoacán	1.74	0.74	1.30	0.21	0.13	4.12	1.04
COB	Michoacán	1.03	0.52	0.63	0.12	0.03	2.34	0.43
VEC	Veracruz	nd	nd	nd	nd	nd	0	-
SAJ	Veracruz	1.45	0.52	0.26	nd	nd	2.23	0.40
TPL	Chiapas	0.21	0.15	nd	nd	nd	0.35	0.28
MUL	Chiapas	0.88	0.44	0.58	0.13	nd	2.03	0.49
SAB	Chiapas	0.18	0.10	0.10	0.07	nd	0.46	0.009
HUI	Chiapas	1.22	0.49	0.27	0.22	nd	2.20	0.87

nd, no detectado.

### 3.2 Diversidad y estructura genética

Las poblaciones analizadas mostraron altos niveles de diversidad genética. Na varió de 4.000 a 6.833, Ne varió de 2.667 a 5.739, I varió de 0.909 a 1.783, Ho varió de 0.778 a 0.925 y He varió de 0.557 a 0.805 (Tabla 5). En todas las poblaciones, excepto COB y NEI, los valores de F fueron negativos, lo que indica un exceso de heterocigotos (Tabla 5).

El análisis de varianza molecular (AMOVA) reveló que la mayor proporción de la varianza genética ocurre dentro de las poblaciones (93%, Tabla 6). El índice de diferenciación  $F_{ST}$  tuvo un valor de 0.067 lo que indica una moderada diferenciación entre poblaciones (Tabla 6). La prueba de Mantel realizada con la matriz de distancia genética de Nei y la matriz de

distancia geográfica no fue significativa ( $r = -0.017$ ,  $P = 0.860$ ), por lo tanto la diferenciación de las poblaciones no fue debida al aislamiento por distancia; tampoco se identificaron barreras geográficas que pudieran intervenir en el intercambio genético entre las poblaciones.



**Tabla 5. Descriptores de diversidad genética de 17 poblaciones de *Jatropha curcas*.**

<b>POP</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>I</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>F</b>
CND	4.333(0.333)	3.440(0.314)	1.321(0.096)	0.792(0.119)	0.693(0.036)	-0.111(0.141)
SNP	4.167(0.401)	3.718(0.361)	1.342(0.103)	0.778(0.165)	0.716(0.031)	-0.073(0.238)
BNA	4.000(0.632)	3.474(0.548)	1.244(0.169)	0.792(0.164)	0.671(0.054)	-0.189(0.249)
BUE	3.833(0.601)	3.191(0.561)	1.165(0.172)	0.917(0.083)	0.633(0.064)	-0.470(0.122)
ANU	3.667(0.211)	3.025(0.185)	1.185(0.060)	0.875(0.085)	0.663(0.020)	-0.330(0.146)
CHA	2.833(0.401)	2.841(0.372)	0.909(0.131)	0.875(0.125)	0.557(0.054)	-0.567(0.226)
NEI	4.000(0.557)	3.509(0.515)	1.259(0.157)	0.694(0.150)	0.678(0.053)	0.046(0.197)
OLV	4.333(0.667)	3.787(0.625)	1.318(0.182)	0.792(0.109)	0.687(0.061)	-0.171(0.188)
GMR	3.333(0.333)	2.958(0.297)	1.112(0.104)	0.875(0.125)	0.644(0.036)	-0.389(0.223)
AJR	7.500(1.360)	5.739(1.242)	1.783(0.169)	0.870(0.088)	0.794(0.031)	-0.092(0.103)
COB	5.667(0.803)	5.031(0.738)	1.585(0.204)	0.782(0.159)	0.753(0.069)	0-048(0.194)
VEC	5.500(0.563)	4.586(0.520)	1.569(0.113)	0.833(0.167)	0.768(0.025)	-0.059(0.213)
SAJ	5.000(0.894)	3.622(0.557)	1.336(0.182)	0.801(0.133)	0.687(0.050)	-0.222(0.252)
TPL	5.167(0.401)	4.177(0.227)	1.521(0.068)	0.892(0.049)	0.757(0.013)	-0.182(0.076)
MUL	6.833(0.792)	5.362(0.504)	1.758(0.104)	0.856(0.062)	0.805(0.018)	-0.067(0.087)
SAB	3.833(0.307)	2.674(0.135)	1.108(0.051)	0.925(0.050)	0.621(0.018)	-0.489(0.076)
HUI	3.500(0.500)	2.667(0.358)	1.027(0.134)	0.868(0.072)	0.593(0.050)	-0.491(0.129)
Promedio	4.481(0.237)	3.678(0.145)	1.311(0.037)	0.829(0.020)	0.686(0.011)	-0.221(0.045)

Na, número de alelos; Ne, número efectivo de alelos; I, índice de información de Shannon; Ho, heterocigocidad observada; He, heterocigocidad esperada; F, índice de endogamia. Los números entre paréntesis indican el error estándar.

**Tabla 6. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de seis loci de microsatélites de 17 poblaciones de *Jatropha curcas*.**

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Componentes de la Varianza</b>	<b>Variación (%)</b>	<b>Índice de diferenciación (F<sub>ST</sub>)</b>
Entre regiones	2	14.282	0.038	2	
Entre poblaciones	14	55.187	0.133	5	0.067 ***
Dentro de las poblaciones	195	446.842	2.394	93	
Total	211	536.311	2.565	100	

\*\*\* P < 0.001

El análisis bayesiano reveló que el número más probable de grupos genéticos fue K=2 (Figura 3a), y confirmó que la diferenciación genética no está asociada con el origen geográfico de las poblaciones. Los dos colores usados representan los dos grupos genéticos identificados por Structure. Cada individuo está representado por una barra vertical, la proporción de cada color en la barra indica la proporción de ancestría genética procedente de uno de los dos grupos identificados por Structure en el genotipo individual (Figura 3b). En las poblaciones de Michoacán ANU, CHA, OLV y GMR el grupo genético representado con verde se encuentra en mayor proporción, mientras que en las poblaciones BUE, BNA, y AJR el grupo genético representado con rojo se encuentra en mayor proporción. En las poblaciones NEI, COB y SND los grupos genéticos rojo y verde se encuentran más o menos en la misma proporción. En las poblaciones de Chiapas y Veracruz el grupo genético representado con rojo se encuentra en mayor proporción y el grupo verde en menor proporción (Figura 4).

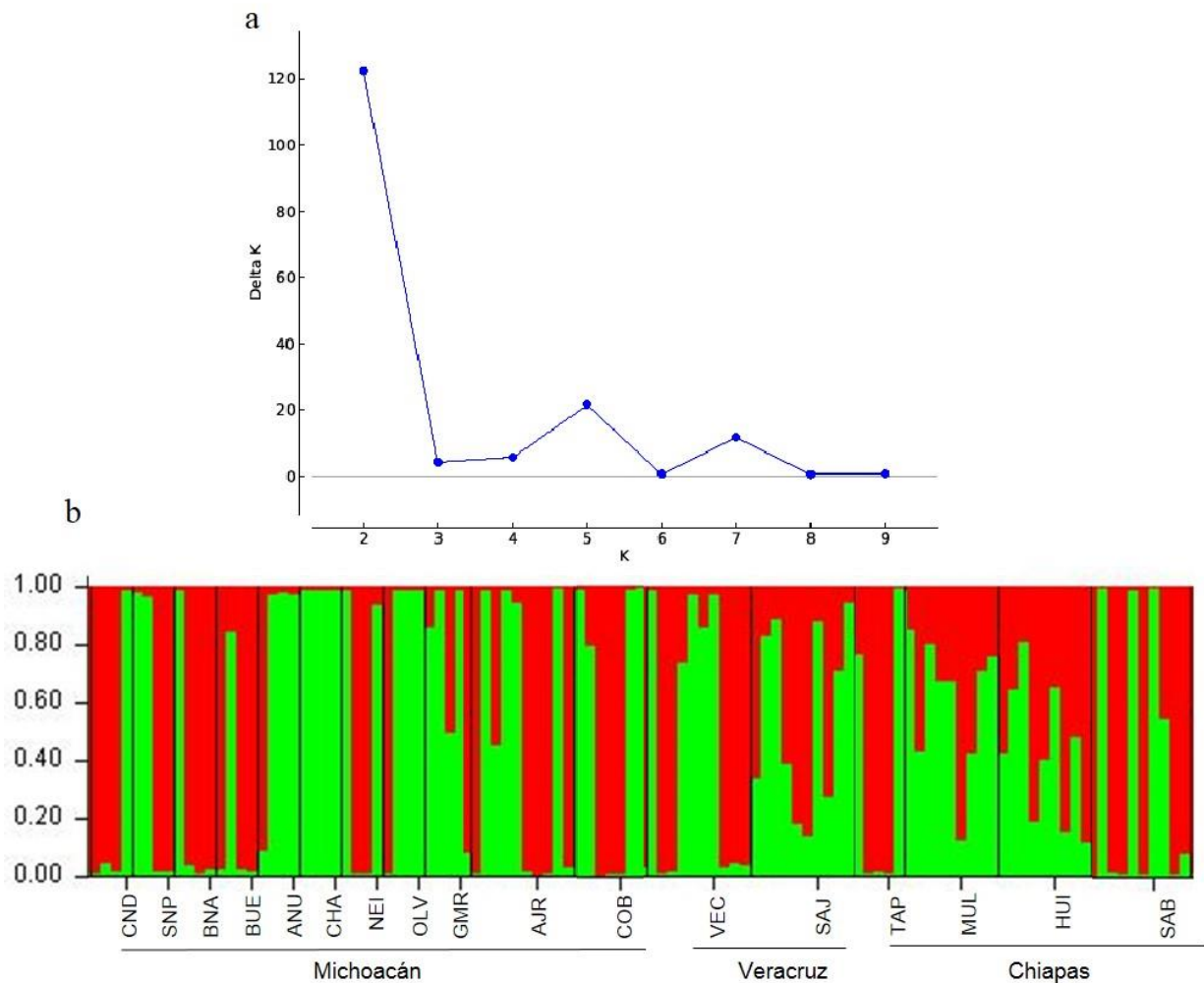


Figura 3. Estructura genética de 17 poblaciones de *J. curcas* de tres estados de México: Michoacán, Veracruz y Chiapas. a) Número estimado de grupos genéticos (k) derivados del análisis de agrupamiento bayesiano de Structure.  $\Delta k$  fue calculado usando el método de Evanno et al. (2005). b) Estructura genética obtenida con dos grupos genético (K=2).

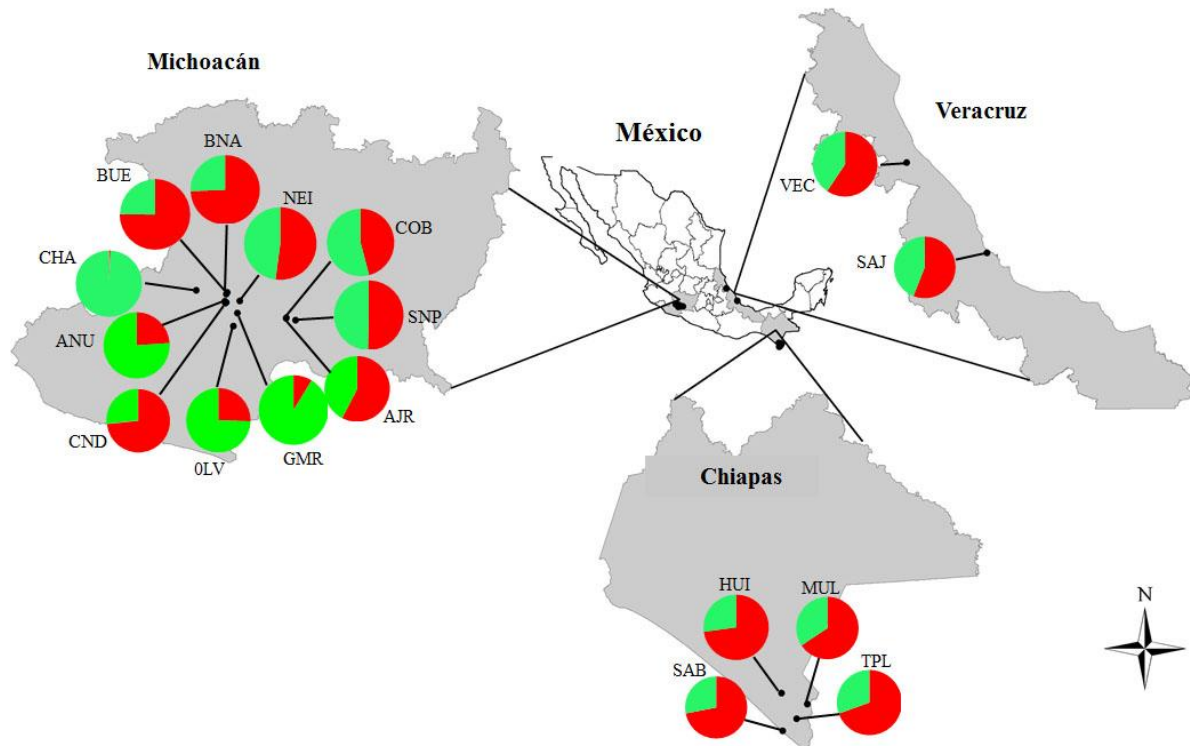


Figura 4. Proporción de grupos genéticos por población obtenida con el análisis bayesiano.

### 3.3 Relación entre la variación química y la diversidad genética.

La prueba de Mantel mostró que las distancias genéticas de Nei y las distancias euclidianas del perfil químico del aceite no estuvieron correlacionadas significativamente ( $r = -0.024$ ,  $P = 0.087$ ). El contenido total de ésteres de forbol no mostró una correlación significativa con  $H_e$  (Spearman = 0.304,  $P = 0.235$ ) ni con el índice de Shannon de diversidad genética (Spearman = 0.412,  $P = 0.10$ ). La asociación entre el índice de diversidad de Shannon de diversidad de ésteres de forbol y de diversidad genética no fue significativa (Spearman = -0.461,  $P = 0.062$ ). La diversidad genética tampoco explicó el

contenido total de aceite, en cambio la altitud y la estacionalidad de la temperatura sí estuvieron asociados significativamente con el contenido total de aceite significativamente ( $F_{(3,13)} = 8.583$ ,  $P < 0.002$ ,  $R^2$  múltiple ajustada = 0.587; Tabla 7).

**Tabla 7. Resumen del análisis de regresión lineal múltiple entre el aceite total, variables genéticas, climáticas y geográficas.**

<b>Variables climáticas y geográficas</b>	<b>Beta ± EE</b>	<b>B ± EE</b>	<b>Correlación parcial</b>	<b>Tolerancia</b>	<b>T(13)</b>
Altitud	0.732±0.162	0.003±0.0009	0.782	0.987	4.523 ***
Estacionalidad de la temperatura	0.518±0.197	0.0009±0.0003	0.588	0.663	2.625 *
Temperatura mínima del mes más frío	0.249±0.198	0.0189±0.014	0.249	0.661	1.260 <sup>NS</sup>

<sup>NS</sup>, no significativo; \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

#### 4. Discusión

En este estudio encontramos que la variación en el contenido total de aceite y al menos de los cuatro ácidos grasos más abundantes son similares a lo reportado previamente en poblaciones mexicanas (Martínez-Herrera et al., 2006; Ovando-Medina et al., 2011b) y en accesiones de Asia, África, América del Sur y América Central (Osorio et al., 2014). El contenido de ésteres de forbol es similar a lo reportado por Martínez-Herrera et al. (2010).

El perfil químico del aceite de las semillas agrupó parcialmente a las poblaciones de *J. curcas* de acuerdo a su origen geográfico, lo que fue explicado por el aislamiento por distancia (Ovando-Medina et al., 2011b). El análisis discriminante usando el perfil químico del aceite en este estudio separó a los individuos de acuerdo a su origen geográfico a escala estatal (Figura 2), pero la prueba de Mantel no detectó estructuración

significativa, lo que indica que las distancias del perfil químico y las distancias geográficas no están asociadas de manera significativa. Una posible explicación es que puede ser un problema de muestreo, pues para detectar aislamiento por distancia hay que muestrear de manera homogénea en el espacio y en este estudio el muestreo fue totalmente agrupado. Otra posibilidad es que los factores ambientales locales tengan influencia en la variabilidad del perfil químico del aceite, pero al mismo tiempo varíen de manera continua. Por ejemplo, encontramos una correlación significativa entre la altitud y el porcentaje de los ácidos grasos insaturados (Figura 1). De forma similar, Ovando-Medina et al. (2011b) reportaron una asociación significativa entre la altitud y el contenido de los ácidos grasos insaturados.

Linder (2000) sugiere que la temperatura de germinación es un importante agente de selección en la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados en el aceite de las semillas. La explicación es que en ambientes fríos (mayor altitud o latitud) el catabolismo de ácidos grasos insaturados es más fácil comparado con los ácidos grasos saturados. Así, las semillas con más ácidos grasos insaturados germinan primero en bajas temperaturas al inicio de la estación propicia para las plantas y las plántulas crecen más rápido, lo que incrementa su adecuación. En cambio, los ambientes cálidos (menor latitud o altitud) son más estables y las semillas que contienen mayor proporción de ácidos grasos saturados son favorecidas ya que contienen más energía (Linder, 2000). Lo mencionado anteriormente, no aplica para *J. curcas* ya que es una especie tropical y se ha favorecido en gran proporción el contenido de ácidos grasos insaturados.

Posiblemente otros factores relacionados con la altitud por ejemplo, la humedad, la acidez del suelo y la intensidad de luz, favorezcan la abundancia de los ácidos grasos

insaturados en *J. curcas*. En este sentido, Ovando-Medina et al. (2011a) sugieren que la humedad del suelo podría ejercer presión de selección en la proporción de ácidos grasos insaturados en las semillas, ya que *J. curcas* es resistente a la sequía pero susceptible al anegamiento (Dehgan y Schutzman, 1994); en este sentido, en la región tropical de Mesoamérica el inicio de la floración y producción de semillas coincide con la época de lluvias, así las semillas requieren de una alta proporción de ácidos grasos insaturados para germinar rápidamente y establecerse como una planta antes de que incremente la humedad del suelo hasta el anegamiento (Ovando-Medina et al., 2011a). Así, nosotros especulamos que un ambiente con lluvias cortas o impredecibles favorecería la germinación y el establecimiento de las plántulas en comparación con ambientes con un periodo de lluvia larga y abundante.

Con respecto al análisis de variación genética con marcadores neutros, se obtuvieron los niveles más altos de diversidad genética reportados hasta el momento para *J. curcas* (Tabla 5). En otros estudios de diversidad genética realizados con SSRs se encontraron altos niveles de polimorfismo en poblaciones de Chiapas (Salvador-Figueroa et al., 2015) y en accesiones de América Central (Osorio et al., 2014). En *J. curcas* se favorece el proceso de polinización cruzada (Raffi et al., 2012), esto podría explicar los altos niveles de diversidad genética. Los altos niveles de diversidad genética encontrados en este estudio también apoyan la idea que Mesoamérica es el centro de origen de *J. curcas* al encontrarse en esta región los mayores niveles de diversidad en comparación con otras partes del mundo (Osorio et al., 2014; Siju et al., 2015). Por lo tanto, las poblaciones analizadas representan una fuente de germoplasma potencialmente útil para la selección y conservación de genotipos de interés agronómico.

Con respecto a la estructura genética, se encontró una moderada diferenciación entre las poblaciones (Tabla 6), la cual no fue explicada por el aislamiento por distancia. De manera similar, el análisis de accesiones de *J. curcas* de diferentes países mostraron que su variabilidad genética no está asociada con su procedencia geográfica (Maghuly et al., 2015; Rao et al., 2008). Nuestros resultados sugieren que la variación genética obtenida con SSRs en las poblaciones estudiadas de *J. curcas* no está espacialmente estructurada, es decir que las poblaciones cercanas fueran genéticamente similares y las poblaciones lejanas genéticamente distintas. En este sentido, el análisis Bayesiano confirmó que no hay una estructura geográfica de la variación genética (Figura 4).

Es bien sabido que la diferenciación genética entre poblaciones de plantas depende del flujo de genes en función de la dispersión del polen y de las semillas (Loveless y Hamrick, 1984). En el caso de las plantas cultivadas, la estructura genética puede ser también influenciada por la selección artificial y por su modo de propagación (Aradhya et al., 2003). Las poblaciones de Chiapas son utilizada extensamente como cerca vivas donde los individuos se propagan por clonación; además los agricultores intercambian germoplasma a escala regional (Salvador-Figueroa et al., 2015). Lo anterior podría explicar la semejanza en los grupos genéticos en las poblaciones de Chiapas (SAB, HUI, MUL y TPL).

La población VEC de Veracruz proviene de una variante no tóxica que comúnmente se selecciona y se cultiva en los huertos familiares, sin embargo no hay una diferenciación clara con la población SAJ, la cual es utilizada como cerca viva en el mismo estado. Las poblaciones de Michoacán no tienen ningún uso y por lo tanto no son manejadas por el hombre, en cambio los árboles son talados o destruidos, lo que ha



ocasionado la reducción de individuos en las poblaciones. De acuerdo con Aldrich et al. (1998) y Cascante et al. (2002) la reducción del tamaño de las poblaciones puede provocar una disminución del flujo génico que conduciría a un incremento de la autopolinización, al aumento la divergencia entre poblaciones y puede ocasionar un cuello de botella genético. Así en el caso de las poblaciones que no tienen ningún uso, su eliminación puede provocar la pérdida de diversidad genética de la especie.

Por otra parte, en este estudio encontramos variación en la composición química del aceite y altos niveles de diversidad genética en las poblaciones estudiadas. Sin embargo la correlación entre el contenido de ésteres de forbol y la diversidad genética neutra no fue significativa. Posiblemente se debe a que estos compuestos son heredados por vía materna (He et al., 2011; King et al., 2013), por lo tanto la diferenciación entre variantes tóxicas y no tóxicas no fue detectable con un marcador genético nuclear (SSRs).

En otros estudios realizados con marcadores nucleares como RAPD, AFLP y SSRs si encontraron diferenciación entre las variantes tóxicas y no tóxicas (Pamidimarri et al., 2009; Vischi et al., 2013). Posiblemente estos marcadores distinguieron a las accesiones por su origen geográfico y no por su toxicidad, ya que consideran a las accesiones mexicanas como no tóxicas y las accesiones de África, América del Sur y la India como tóxicas. Otra posibilidad es que la variación de los ésteres de forbol en parte puede depender de la presión de selección impuesta por los herbívoros especialistas como *Pachicoris Klugii* (Wink et al., 2000) y la larva *Hyles euphorbiae* (Hundsdoerfer et al., 2005) que secuestran este compuesto, por lo tanto es una característica que puede estar sujeta a selección natural.

Po otro lado, la correlación entre la matriz de distancia genéticas de Nei y las distancias euclidianas del perfil químico no fue significativa. La falta de correlación entre la distancia genética y las distancias euclidianas del aceite esencial también se mostró en *Oreganum onites* L. (Tonk et al., 2010). En *Ocimum basilicum* los datos de la composición del aceite esencial y los datos moleculares obtenidos con RAPD (Masi et al., 2006) y AFLP (Labra et al., 2004) tampoco estuvieron correlacionados de manera significativa.

Una posible explicación es que SSRs es un marcador genético neutro comúnmente usado para estudios de diversidad molecular en regiones no codificantes del genoma (Collard et al., 2005), en contraste, la variación genética representada en los perfiles químicos del aceite o en los ésteres de forbol, no es neutra y estaría expuesta a selección natural por los agentes propios de cada localidad. Esto concuerda con la variación geográfica de la variación obtenida con otros compuestos químicos en *J. curcas* (Martínez-Díaz et al., 2015). Así, la diversidad genética obtenida con SSRs no es suficiente para inferir características adaptativas importantes en el manejo y conservación de *J. curcas*.

El análisis de regresión múltiple indicó que el contenido total de aceite tampoco estuvo asociado con la diversidad genética, en cambio fue explicado por la altitud y la estacionalidad de la temperatura (Tabla 7). De forma similar, otros estudios han mostrado que el contenido total de aceite está asociado con la altitud en *J. curcas* (Pant et al., 2006; Ovando-Medina et al., 2011b). Este resultado es congruente con el obtenido con los ácidos grasos insaturados, ambos sugieren que la altitud es una variable importante que está asociada con la cantidad y calidad del aceite, por lo tanto debe ser considerada en la

estrategia para el diseño de plantaciones intensivas. En estudios posteriores es importante probar genotipos en ambientes con diferentes altitudes y seleccionar aquellos con la composición de ácidos grasos deseada y cultivarlos a escala regional.

## **5. Conclusión**

Los resultados de este trabajo mostraron que la diversidad genética individual, poblacional y regional obtenida con SSRs no refleja la variación en la composición química del aceite. Esto indica que posiblemente se puede seleccionar o diseñar genéticamente cultivares de *J. curcas* con el perfil de ácidos grasos deseados sin perder variación genética en otros ámbitos de la vida de la planta. Por otra parte en este estudio también se mostró que los factores ambientales juegan un papel importante en la variación del contenido total y del perfil químico del aceite. Por lo tanto se sugiere las plantaciones se desarrollen a escala regional en donde se seleccionen individuos con la composición química del aceite deseada para su cultivo.

## **6. Agradecimientos**

Agradecemos a Carmen J. Figueredo y Maricruz López por su ayuda en el procesamiento de muestras para el análisis genético. También agradecemos al Ing. Héctor Rómulo, Ingrid García y Teodoro Carlón por su ayuda en la colecta de la planta. Este trabajo constituye el cumplimiento parcial del programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Este estudio fue financiado por (Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM (POFJE); UNAM-PAPIIT (IN215511); y fondos personales FJE). Y. Martínez- Díaz agradece al Posgrado de

ciencias Biológicas por la formación recibida durante su estudio doctoral y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, 164420) por la beca financiada.

## 7. Referencias

Aitken, S.N., Yeaman, S., Holliday, J.A., Wang, T., y Curtis-McLane, S. (2008). Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evol. Appl.* 1, 95–111.

Aldrich, P.R., Hamrick, J.L., Chavarriaga, P., y Kochert, G. (1998). Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Mol. Ecol.* 7, 933–944.

Aradhya, M.K., Dangl, G.S., Prins, B.H., Boursiquot, J.-M., Walker, M.A., Meredith, C.P., y Simon, C.J. (2003). Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. *Genet. Res.* 81, 179–192.

Basha, S.D., y Sujatha, M. (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.

Cascante, A., Quesada, M., Lobo, J.J., y Fuchs, E.A. (2002). Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conserv. Biol.* 16, 137–147.

Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., y Pang, E.C.K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*. 142, 169–196.

Devappa, R.K., Makkar, H.P.S., y Becker, K. (2010). Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha* oil. *Biomass Bioenergy*. 34, 1125–1133.

Earl, D.A., y VonHoldt, B.M. (2011). Structure harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 359–361.

Evanno, G., Regnaut, S., y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620.

Fairless, D. (2007). The little shrub that could-maybe. *Nature*. 5, 449-652.

Foidl, N., Foidl, G., Sanchez, M., Mittelbach, M., y Hackel, S. (1996). *Jatropha curcas* L. as a source for the production of biofuel in Nicaragua. *Bioresour. Technol.* 58, 77–82.

He, W., King, A.J., Khan, M.A., Cuevas, J.A., Ramiaramananana, D., y Graham, I.A. (2011). Analysis of seed phorbol-ester and curcin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 1183–1190.

Heller, J. (1996). Physic Nut, *Jatropha Curcas* L. (Bioversity International).

Hirota, M., Suttajit, M., Suguri, H., Endo, Y., Shudo, K., Wongchai, V., Hecker, E., y Fujiki, H. (1988). A new tumor promoter from the seed oil of *Jatropha curcas* L., an intramolecular diester of 12-deoxy-16-hydroxyphorbol. *Cancer Res.* 48, 5800–5804.

Holderegger, R., Kamm, U., y Gugerli, F. (2006). Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Landsc. Ecol.* 21, 797–807.

Ichihara, K., Shibahara, A., Yamamoto, K., y Nakayama, T. (1996). An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids. *Lipids.* 31, 535–539.

Jump, A.S., Marchant, R., y Peñuelas, J. (2009). Environmental change and the option value of genetic diversity. *Trends Plant Sci.* 14, 51–58.

Kaushik, N., Kumar, K., Kumar, S., Kaushik, N., y Roy, S. (2007). Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha (Jatropha curcas L.)* accessions. *Biomass Bioenergy.* 31, 497–502.

King, A.J., Montes, L.R., Clarke, J.G., Affleck, J., Li, Y., Witsenboer, H., van der Vossen, E., van der Linde, P., Tripathi, Y. y Tavares, E. (2013). Linkage mapping in the oilseed crop *Jatropha curcas* L. reveals a locus controlling the biosynthesis of phorbol esters which cause seed toxicity. *Plant Biotechnol. J.* 11, 986–996.

Kirk, H., y Freeland, J.R. (2011). Applications and implications of neutral versus non-neutral markers in molecular ecology. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 3966–3988.

Pant K. S., Khosla, V., Kumar, D., Gairola, S. (2006). Seed oil content variation in *Jatropha curcas* Linn. in different altitudinal ranges and site conditions in H.P. India. *Lyonia J. Ecol. Appl.* 11, 31–34.

Labra, M., Miele, M., Ledda, B., Grassi, F., Mazzei, M., y Sala, F. (2004). Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Plant Sci.* 167, 725–731.

Linder, C.R. (2000). Adaptive Evolution of Seed Oils in Plants: Accounting for the Biogeographic Distribution of Saturated and Unsaturated Fatty Acids in Seed Oils. *Am. Nat.* 156, 442–458.

Loveless, M.D., y Hamrick, J.L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 15, 65–95.

Maghuly, F., Jankowicz-Cieslak, J., Pabinger, S., Till, B.J., y Laimer, M. (2015). Geographic origin is not supported by the genetic variability found in a large living collection of *Jatropha curcas* with accessions from three continents. *Biotechnol. J.* 10, 536–551.

Makkar, H.P.S., y Becker, K. (1999). Nutritional studies on rats and fish (carp *Cyprinus carpio*) fed diets containing unheated and heated *Jatropha curcas* meal of a non-toxic provenance. *Plant Foods Hum. Nutr.* 53, 183–192.

Makkar, H.P.S., y Becker, K. (2009). *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 773–787.

Makkar, H.P.S., Becker, K., Sporer, F., y Wink, M. (1997). Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3152–3157.

Makkar, H.P.S., Becker, K., y Schmook, B. (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 Hum. Nutr.* 52, 31–36.

Manni, F., Guerard, E., y Heyer, E. (2004). Geographic patterns of genetic, morphologic, linguistic variation: how barriers can be detected by using monmonier's algorithm. *Hum. Biol.* 76, 173–190.

Martínez-Díaz, Y., González-Rodríguez, A., Delgado-Lamas, G., y Espinosa-García, F.J. (2015). Geographic structure of chemical variation in wild populations of the fuel crop *Jatropha curcas* L. in Mexico. *Ind. Crops Prod.* 74, 63–68.

Martínez-Herrera, J., Siddhuraju, P., Francis, G., Dávila-Ortíz, G., y Becker, K. (2006). Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food Chem.* 96, 80–89.

Martínez-Natarén, D.A., Parra-Tabla, V., Ferrer-Ortega, M.M., y Calvo-Irabién, L.M. (2013). Genetic diversity and genetic structure in wild populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) and its relationship with the chemical composition of the essential oil. *Plant Syst. Evol.* 300, 535–547.



Masi, L.D., Siviero, P., Esposito, C., Castaldo, D., Siano, F., y Laratta, B. (2006). Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). *Eur. Food Res. Technol.* 223, 273–281.

Openshaw, K. (2000). A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioenergy.* 19, 1–15.

Osorio, L.R.M., Salvador, A.F.T., Jongschaap, R.E.E., Perez, C.A.A., Sandoval, J.E.B., Trindade, L.M., Visser, R.G.F., and Van Loo, E.N. (2014). High level of molecular and phenotypic biodiversity in *Jatropha curcas* from Central America compared to Africa, Asia and South America. *BMC Plant Biol.* 14, 77.

Ovando-Medina, I., Espinosa-García, F., Núñez-Farfán, J., y Salvador-Figueroa, M. (2011a). Genetic variation in mexican *Jatropha curcas* L. Estimated with seed oil fatty acids. *J. Oleo Sci.* 60, 301–311.

Ovando-Medina, I., Sánchez-Gutiérrez, A., Adriano-Anaya, L., Espinosa-García, F., Núñez-Farfán, J., y Salvador-Figueroa, M. (2011b). Genetic Diversity in *Jatropha curcas* populations in the state of Chiapas, Mexico. *Diversity.* 3, 641–659.

Pamidimarri, D.V.N.S., Mastan, S.G., Rahman, H., y Reddy, M.P. (2009a). Molecular characterization and genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. in India using RAPD and AFLP analysis. *Mol. Biol. Rep.* 37, 2249–2257.

Pamidimarri, D.V.N.S., Sinha, R., Kothari, P., y Reddy, M.P. (2009b). Isolation of novel microsatellites from *Jatropha curcas* L. and their cross-species amplification. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 431–433.

Peakall, R., y Smouse, P.E. (2006). genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes.* 6, 288–295.

Pecina-Quintero, V., Anaya-López, J.L., Colmenero, A.Z., García, N.M., Núñez Colín, C.A., Solís Bonilla, J.L., Aguilar-Rangel, M.R., Gill Langarica, H.R., y Méjia Bustamante, D.J. (2011). Molecular characterisation of *Jatropha curcas* L. genetic resources from Chiapas, México through AFLP markers. *Biomass Bioenergy.* 35, 1897–1905.

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

Popluechai, S., Breviario, D., Mulpuri, S., Makkar, H.P.S., Raorane, M., Reddy, A.R., Palchetti, E., Gatehouse, A.M.R., Syers, K.J., O'Donnell, A.G., y Kohli, A. (2009). Narrow genetic and apparent phenetic diversity in *Jatropha curcas*: initial success with generating low phorbol ester interspecific hybrids. *Nat. Preced.*

Pritchard, J.K., Stephens, M., y Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 155, 945–959.

Rafii, M.Y., Shabanimofrad, M., Edaroyati, M.W.P., y Latif, M.A. (2012). Analysis of the genetic diversity of physic nut, *Jatropha curcas* L. accessions using RAPD markers. Mol. Biol. Rep. 39, 6505–6511.

Rao, G.R., Korwar, G.R., Shanker, A.K., y Ramakrishna, Y.S. (2008). Genetic associations, variability and diversity in seed characters, growth, reproductive phenology and yield in *Jatropha curcas* (L.) accessions. Trees. 22, 697–709.

Rosado, T.B., Laviola, B.G., Faria, D.A., Pappas, M.R., Bhering, L.L., Quirino, B., y Grattapaglia, D. (2010). Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop L. in Brazil. Crop Sci. 50, 2372.

Salvador-Figueroa, M., Magaña-Ramos, J., Vázquez-Ovando, J.A., Adriano-Anaya, M.L., y Ovando-Medina, I. (2015). Genetic diversity and structure of *Jatropha curcas* L. in its centre of origin. Plant Genet. Resour. 13, 9–17.

Sanou, H., Angulo-Escalante, M.A., Martínez-Herrera, J., Koné, S., Nikiema, A., Kalinganire, A., Hansen, J.K., Kjær, E.D., Graudal, L., y Nielsen, L.R. (2015). Loss of genetic diversity of *Jatropha curcas* L. through domestication: Implications for its genetic improvement. Crop Sci. 55, 749.

Siju, S., Ismanizan, I., y Wickneswari, R. (2015). Genetic homogeneity in *Jatropha curcas* L. individuals as revealed by microsatellite markers: implication to breeding strategies. Braz. J. Bot. 1–8.

Sunil, N., Sujatha, M., Kumar, V., Vanaja, M., Basha, S.D., y Varaprasad, K.S. (2011). Correlating the phenotypic and molecular diversity in *Jatropha curcas* L. *Biomass Bioenergy*. 35, 1085–1096.

Tonk, F.A., Yüce, S., Bayram, E., Giachino, R.R.A., Sönmez, Ç., Telci, İ., y Furan, M.A. (2010). Chemical and genetic variability of selected Turkish oregano (*Origanum onites* L.) clones. *Plant Syst. Evol.* 288, 157–165.

Wen, Y., Tang, M., Sun, D., Zhu, H., Wei, J., Chen, F., y Tang, L. (2012). Influence of climatic factors and soil types on seed weight and oil content of *Jatropha curcas* in Guangxi, China. *Procedia Environ. Sci.* 12, 439–444.

## **CAPÍTULO IV**

---

### **DISCUSIÓN GENERAL**

## **Discusión general**

Debido a la importancia de *J. curcas* como fuente de biodiesel se ha impulsado el cultivo de millones de hectáreas alrededor del mundo (Renner et al., 2008). El modelo de cultivo prevaleciente de esta planta es el de plantaciones en las que se producen variantes altamente productivas por semillas o a través de clonación. La presión de producir biodiesel rápidamente puede favorecer esquemas no sustentables de cultivo de *J. curcas*. Para la construcción de un modelo de cultivo sustentable de *J. curcas* se debe tener en cuenta su variabilidad genética, química, y ambiental (biótica y abiótica) en el ámbito geográfico. El conocimiento y uso de esta variación debe ser tan importante como las características de producción y calidad de aceite en la selección de individuos para su propagación y cultivo.

Lo anterior es con la finalidad de proponer la producción de cultivares (alta diversidad genética y contenido y composición de aceite deseada producidas por cultivares óptimos para cada región donde se cultiva o cultivaría *J. curcas*), los cuales podrían ser promovidos para su uso en los cultivos intensivos.

## **Variación química foliar y su relación con la herbivoría**

En *J. curcas* se ha reportado que contiene una gran cantidad de compuestos químicos activos que ocasionan efectos adversos a los herbívoros (Ratnadass y Wink, 2012). A pesar de su toxicidad, esta planta es vulnerable a la herbivoría, principalmente en el follaje, flores y frutos (Lama et al., 2015). Hay una lista grande de insectos herbívoros (78 especies representadas en 9 órdenes y 31 familias) que se alimentan de *J. curcas* a escala global. En América Central y del Sur, distribución nativa de *J. curcas*, se

documentaron 34 especies y en África donde la planta fue introducida, se documentaron 21 especies (López-Guillen et al., 2012; Lama et al., 2015). Entre las plagas de mayor importancia que atacan a las plantaciones de *Jatropha curcas* en México es el insecto del orden orthoptera: *Sphenarium purpurascens* e insectos del orden Hymenoptera: *Atta cephanotes* y *Atta mexicana*, los cuales llegan a defoliar completamente las plantas deteniendo su desarrollo (Quiroga et al. 2010).

Nuestros resultados fueron compatibles con el modelo del mosaico geográfico (Thompson, 2005), pues encontramos que la variación química está estructurada geográficamente y la intensidad de herbivoría está asociada con los compuestos químicos (ácido fítico e inhibidores de tripsina), y con las variables ambientales (altitud y precipitación) de las poblaciones (Véase capítulo dos). De acuerdo a nuestro conocimiento este es el primer trabajo donde se cuantifica la intensidad de herbivoría así como su relación con los compuestos químicos en *J. curcas*.

Estudios con otras especies de plantas han mostrado que la composición y abundancia de compuestos fitoquímicos pueden variar entre regiones geográficas (Bravo-Monzón et al., 2014) asociadas con grupos específicos de herbívoros (Zust et al., 2012; Berhardson et al., 2013) Por lo tanto, la caracterización química de *J. curcas* en cada región podría ser una estrategia para diseñar plantaciones donde se disminuiría la intensidad de herbivoría ya que cada población podría estar interactuando con una cierta comunidad de herbívoros en condiciones ambientales abióticas.

Otro aspecto relevante fue conocer si las variantes tóxicas y no-tóxicas experimentan herbivoría diferencial, aunque en este estudio por cuestiones técnicas no fue posible cuantificar los ésteres de forbol en las hojas (ver anexo 1). Baldini et al.

(2014) mencionan que el contenido de ésteres de forbol en las semillas y las hojas está correlacionado, por lo que asumimos que en las hojas de poblaciones tóxicas el contenido de ésteres de forbol es mayor que en las hojas de poblaciones no tóxicas.

Encontramos que la herbivoría en las poblaciones tóxicas es de dos a tres veces mayor en comparación con la población no-tóxica (Ver capítulo dos). Una posible explicación es que la larva especialista que metaboliza los ésteres de forbol (*Hyles euphorbiae*) sea más abundantes y además le resulte más favorable alimentarse de las poblaciones tóxicas que de las poblaciones no tóxicas. En cambio algunos estudios han mostrado que los extractos de ésteres de forbol ocasionan efectos adversos a herbívoros generalistas (Devappa et al., 2012; Ratnadass y Wink, 2012).

Por otra parte, en las poblaciones no-tóxicas localizadas en ambientes húmedos se observó una fuerte incidencia de hongos fitopatógenos, mientras que en poblaciones tóxicas la presencia de hongos fitopatógenos era mínima o ausente (observación personal en campo). Lo anterior nos sugiere que posiblemente los ésteres de forbol pueden ejercer un papel defensivo en contra de hongos fitopatógenos. Algunos estudios han mostrado que extractos de ésteres de forbol tienen efecto en contra de varias especies de hongos fitopatógenos (Donlaporn y Suntornsuk, 2009; Cordoba-Albores et al., 2014; Mayo et al., 2014).

Para comprobar si los ésteres de forbol son más efectivos contra los fitopatógenos y herbívoros generalistas que contra los herbívoros especialistas es necesario realizar bioensayos con las variantes tóxicas y no-toxicas y consumidores (insectos y fitopatógenos) especialistas y generalistas. Si los ésteres de forbol reducen la enfermedad, entonces sería posible promover el cultivo de la variante no-tóxica en ambientes poco



propicios para los fitopatógenos, ya que también en este estudio se mostró que la variante no-tóxica contiene mayor contenido de ácidos grasos insaturados (ver anexo dos). Además también resultaría más rentable cultivar la variante no-tóxica ya que se podría utilizar los restos de la semilla después de extraer el biodiesel como alimento para los animales.

### **Correlación de la composición química del aceite y la diversidad genética.**

Algunos estudios han mostrado que el contenido total de aceite (Kaushik et al., 2007; Gohil y Pandya, 2008) y el perfil químico del aceite (Ovando-Medina et al. 2011a) son características altamente heredables. Sorprendentemente, nuestros resultados mostraron que el contenido total de aceite no estuvo asociado con la diversidad genética, en cambio estuvo asociado con la altitud y la estacionalidad de la temperatura, características que juntas definen ambientes físicos locales (capítulo tres). De forma similar, otros estudios han mostrado que el contenido total de aceite está asociado con la altitud en *J. curcas* (Pant et al., 2006; Ovando-Medina et al., 2011a).

El contenido de aceite en las semillas proporciona la energía necesaria durante la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas antes del inicio de la fotosíntesis (Harwood, 1980; Hayashi et al., 1998; Germain et al., 2001). Las semillas con mayor contenido energético en el endospermo tienen mayor probabilidad de germinar y establecerse como una nueva planta comparada con aquellas donde el contenido energético es menor (Levin, 1974, Salisbury, 1942; Bewley y Black, 1994). Lo anterior sugiere que el contenido de aceite es una característica que puede estar sujeta a

selección natural y por lo tanto su variación depende en gran parte de las condiciones ambientales locales.

Por otra parte, la matriz de distancia del perfil químico del aceite no estuvo asociada con la matriz de distancia genética de manera significativa (capítulo tres). La falta de correlación entre la distancia genética y las distancias de compuestos químicos del aceite también se ha mostrado en otras especies (Tonk et al., 2010; Masi et al., 2006; Labra et al., 2004). Linder (2000), sugiere que la temperatura de germinación es un importante agente de selección en la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados en el aceite de las semillas. Así, las semillas que emergen primero tienen mayor probabilidad de sobrevivencia y establecerse como una plántula comparada con aquellas semillas que emergen después (Mercer et al., 2011).

Por otro lado, los ésteres de forbol son considerados como una característica heredada maternalmente, es decir que las madres no tóxicas producen semillas no tóxicas y árboles madre tóxicos producen semilla tóxica independiente del fenotipo del padre (King et al., 2013; Sujatha et al., 2008). Esto sugiere que no es posible una contaminación entre las variantes tóxicas (utilizadas preferencialmente en los cultivos de *J. curcas*) y no tóxicas (presentes de manera silvestres en México), es decir que las variantes no-toxicas pudieran llegar a ser tóxicas en caso de polinizarse con la variante tóxica. Por otra parte los ésteres de forbol son secuestrados por herbívoros especialistas como *Pachicoris klugii* (Wink et al., 2000) y la larva *Hyles euphorbiae* (Hundsdoerfer et al., 2005), por lo que la variación de este compuesto podría depender de la presión de selección impuesta por los herbívoros y por lo tanto podría estar sujeta a selección natural.

La falta de asociación entre la diversidad genética y los compuestos químicos de la semilla posiblemente se debe a que SSRs es un marcador genético neutro comúnmente usado para estudios de diversidad molecular en regiones no codificantes del genoma (Collard et al., 2005). En contraste, la variación genética representada en el contenido y los perfiles químicos del aceite, y en los ésteres de forbol, no son neutras y estarían expuestas a selección natural por los agentes propios de cada localidad. Aunque no lo estudiamos, es muy probable que la variación genética representada en los compuestos químicos estudiados en el capítulo dos tampoco esté correlacionada con la variación genética neutra.

Por lo tanto nuestros resultados muestran que la diversidad genética obtenida mediante SSRs, un marcador genético neutro no es suficiente para identificar a los individuos con el contenido y composición de ácidos grasos deseados para la producción de biodiesel.

En este estudio también se mostró que los factores ambientales locales juegan un papel importante en la variación de los compuestos químicos de las semillas, en la intensidad de herbivoría y en los compuestos químicos foliares en *J. curcas*. En conjunto estos resultados sugieren que para establecer plantaciones sustentables de *J. curcas* se deben seleccionar genotipos con la variación química y genética adecuada y cultivarlos de acuerdo a cada región.

## Referencias

Baldini, M., Ferfuaia, C., Bortolomeazzi, R., Verardo, G., Pascali, J., y Piasentier, E. (2014). Determination of phorbol esters in seeds and leaves of *Jatropha curcas* and in animal tissue by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ind. Crops Prod.* 268–276.

Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., y Pang, E.C.K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica.* 142, 169–196.

Hundsdoerfer, A.K., Tshibangu, J.N., Wetterauer, B., y Wink, M. (2005). Sequestration of phorbol esters by aposematic larvae of *Hyles euphorbiae* (Lepidoptera: Sphingidae)? *Chemoecology.* 15, 261–267.

King, A.J., Montes, L.R., Clarke, J.G., Affleck, J., Li, Y., Witsenboer, H., van der Vossen, E., van der Linde, P., Tripathi, Y., y Tavares, E.(2013). Linkage mapping in the oilseed crop *Jatropha curcas* L. reveals a locus controlling the biosynthesis of phorbol esters which cause seed toxicity. *Plant Biotechnol. J.* 11, 986–996.

Pant, V.K. (2006). Seed oil content variation in *Jatropha curcas* Linn. in different altitudinal ranges and site conditions in H.P. India. *Lyonia J. Ecol. Appl.* 11, 31–34.

Labra, M., Miele, M., Ledda, B., Grassi, F., Mazzei, M., y Sala, F. (2004). Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Plant Sci.* 167, 725–731.

Lama, A.D., Vuorisalo, T., y Niemelä, P. (2015). Global patterns of arthropod herbivory on an invasive plant, the physic nut (*Jatropha curcas* L.). *J. Appl. Entomol.* 139, 1–10.

Linder, C.R. (2000). Adaptive Evolution of Seed Oils in Plants: Accounting for the biogeographic distribution of saturated and unsaturated fatty acids in seed oils. *Am. Nat.* 156, 442–458.

López-Guillén, G., Gómez-Ruiz, J., Barrera, J. F., Herrera-Parra, E., Hernández-Arenas, M., Bravo Mosqueda, E., Solís-Bonilla, J. L., y Zamarripa-Colmenero, A. (2013). Artrópodos asociados a higuierilla (*Ricinus communis* L.) en el Sur de México. SAGARPA-INIFAP-CIRPAS. Campo Experimental Rosario Izapa, Folleto Técnico Núm. 28. Tuxtla Chico, Chiapas, México. 70 p.

Makkar, H.P.S., Becker, K., y Schmook, B. (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 Hum. Nutr.* 52, 31–36.

Masi, L.D., Siviero, P., Esposito, C., Castaldo, D., Siano, F., y Laratta, B. (2006). Assessment of agronomic, chemical and genetic variability in common basil (*Ocimum basilicum* L.). *Eur. Food Res. Technol.* 223, 273–281.

Mercer, K.L., Alexander, H.M., y Snow, A.A. (2011). Selection on seedling emergence timing and size in an annual plant, *Helianthus annuus* (common sunflower, Asteraceae). *Am. J. Bot.* 98, 975–985.

Ovando-Medina, I., Espinosa-García, F., Núñez-Farfán, J., y Salvador-Figueroa, M. (2011a). Genetic variation in Mexican *Jatropha curcas* L. estimated with seed oil fatty acids. *J. Oleo Sci.* 60, 301–311.

Quiroga, M. R.; Aguilar, E.; Morales, C. J.; Rosales, María de los A. y Gil, G. (2010). Guía ilustrada de insectos y arañas asociados al Piñón (*Jatropha curcas* L.) en Chiapas, México, con énfasis en la depresión central. Chiapas, México: Universidad Autónoma de Chiapas.

Ratnadass, A., y Wink, M. (2012). The phorbol ester fraction from *Jatropha curcas* seed oil: potential and limits for crop protection against insect pests. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 16157–16171.

Sujatha, M., Reddy, T.P., y Mahasi, M.J. (2008). Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. *Biotechnol. Adv.* 26, 424–435.

Thompson, J.N. (2005). *The Geographic Mosaic of Coevolution* (University of Chicago Press).

Tonk, F.A., Yüce, S., Bayram, E., Giachino, R.R.A., Sönmez, Ç., Telci, İ., y Furan, M.A. (2010). Chemical and genetic variability of selected Turkish oregano (*Origanum onites* L.) clones. *Plant Syst. Evol.* 288, 157–165.

Wink, M., Grimm, C., Koschmieder, C., Sporer, F., y Bergeot, O. (2000). Sequestration of phorbolsters by the aposematically coloured bug *Pachycoris klugii* (Heteroptera: Scutelleridae) feeding on *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). *Chemoecology*. 10, 179–184.

## **A N E X O S**



## ANEXO I

---

### **Búsqueda de ésteres de forbol en hojas mediante protocolos publicados para la extracción de ésteres de forbol en las semillas de *Jatropha curcas* L.**

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) acoplada con un detector de arreglo de diodos es un método bien establecido para detectar y cuantificar el contenido de ésteres de forbol en el aceite y la harina de las semillas de *J. curcas*. Sin embargo el contenido de estos compuestos en las hojas se ha deducido pero no cuantificado. Aún no hay protocolos publicados para la cuantificación foliar de ésteres de forbol. En este estudio intentamos cuantificar estos compuestos con protocolos publicados para su cuantificación en aceite y harina de las semillas de *J. curcas*.

Primero, usamos el protocolo publicado por Makkar et al. (1997) con algunas modificaciones. Se molió 1 g de hojas (hojas de poblaciones tóxicas) con arena inerte hasta obtener polvo fino y la muestra se colocó en tubos de 15 mL. La extracción se realizó con 10 ml de diclorometano, la muestra se agitó en un sonicador (BRANSON 1510) durante 30 minutos y se centrifugó (Centrifuge 5424) durante 10 minutos a 14,000 rpm. El proceso de extracción se repitió tres veces y el sobrenadante fue colectado. La muestra se evaporó a sequedad en un rotavapor no excediendo los 40 ° C y se resuspendió con 300 µl de metanol HPLC. La muestra se filtró y 20 µl se inyectaron en el HPLC.

El análisis se realizó de la siguiente manera. Disolventes usados: A) ácido fosfórico (85%, 1.75 mL de ácido fosfórico en 1 L de agua destilada) y B) acetonitrilo. Gradiente usado: al inicio A al 60% y B al 40%, después A decremento al 50 % y B

incrementó al 50 % en los próximos 10 minutos, luego A decremento al 25 % y B incrementó al 75% en los próximos 30 minutos, finalmente B se incrementó al 100 % durante los próximos 10 minutos. La columna se lavó con B al 100% durante 5 minutos. Como resultado detectó un pico achatado con un tiempo de retención de 25 minutos con absorbancia de 280 nm (longitud de onda a la que absorben los ésteres de forbol de acuerdo con Makkar et al. (1997). La forma del pico nos sugería que otros compuestos presentes en la muestras tenían gran afinidad con la fase estacionaria (columna) lo que impedía la obtención de picos definidos o resueltos como se obtienen cuando se analizan estos compuestos del aceite de las semillas. Intentamos resolver este problema extendiendo el tiempo de corrida en la proporción de disolvente en la que apareció el pico (90% disolvente A y 10% disolvente B), con la finalidad de separar los picos, pero esto no ocurrió. Después consideramos modificar la polaridad de los solventes de análisis de acuerdo a lo reportado por Ahmed y Salimon (2009) pero tampoco funcionó. Posteriormente realizamos una búsqueda de métodos más eficientes para la extracción de ésteres de forbol y de acuerdo con Devappa et al. (2010) reportan que el metanol es más eficiente para la extracción de los ésteres de forbol, sin embargo tampoco se obtuvieron resultados exitosos.

Como última opción consideramos purificar el extracto de ésteres de forbol, para esto pasamos la muestra por una columna de silica gel y se fraccionó con diclorometano y acetonitrilo (7:3) (Pradhan et al., 2012). Las fracciones resultantes fueron analizadas en el HPLC, en este caso no se detectó ningún pico, lo que especulamos que los ésteres de forbol se quedaron retenidos en la columna, por lo cual optamos por manipular la polaridad de los eluyentes pero tampoco se obtuvo éxito.

Todo lo anterior nos indicaba que la cuantificación de los ésteres de forbol en hojas era muy complicado y que no podía ser resuelto con un HPLC acoplado con un detector de diodos. En un artículo publicado recientemente por Baldini et al. (2014) mencionan que resulta difícil cuantificar los ésteres de forbol en matrices tan complejas como las hojas por la presencia de compuestos que interfieren con los ésteres de forbol. Baldini et al. (2014) lograron superar este problema mediante técnicas más selectivas tales como el HPLC acoplado con la detección de espectrofotometría de masas (LC-MS/MS).

### **Referencias**

Ahmed, W.A., y Salimon, J. (2009). Phorbol ester as toxic constituents of tropical *Jatropha Curcas* seed oil. *European Journal of Scientific Research*. 31, 429–436.

Baldini, M., Ferfuia, C., Bortolomeazzi, R., Verardo, G., Pascali, J., y Piasentier, E. (2014). Determination of phorbol esters in seeds and leaves of *Jatropha curcas* and in animal tissue by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ind. Crops Prod*. 268–276.

Devappa, R.K., Makkar, H.P.S., y Becker, K. (2010). Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha* oil. *Biomass Bioenergy*. 34, 1125–1133.

Makkar, H.P.S., Becker, K., Sporer, F., y Wink, M. (1997). Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *J. Agric. Food Chem*. 45, 3152–3157.

Pradhan, S., Naik, S.N., Khan, M.A.I., y Sahoo, P. (2012). Experimental assessment of toxic phytochemicals in *Jatropha curcas*: oil, cake, bio-diesel and glycerol. *J. Sci. Food Agric.* 92, 511–519.

## ANEXO II

---

### Variación en el contenido total de aceite y ácidos grasos insaturados en las variantes no tóxicas (NT) y tóxicas (T) de *J. curcas*.

El contenido total de aceite en las semillas de la variante NT varió entre 37.35 % y 58.67%, mientras que en la T la variación fue entre 31.15 % y 68.54 %, la diferencia entre ambas variantes no fue significativa ( $F(1,101) = 3.30, P = 0.723$ ; Figura 1).

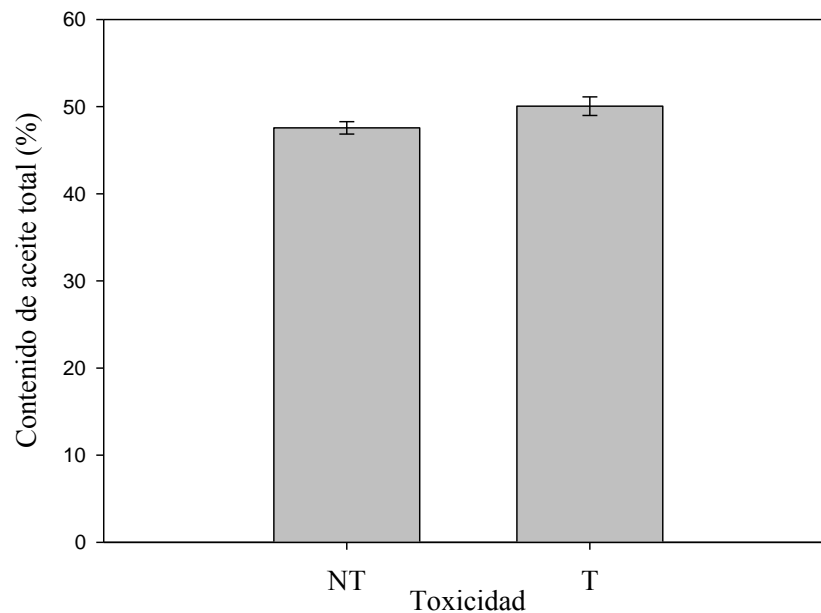


Figura 1. Análisis de varianza (ANOVA) del contenido de aceite total de las semillas en las semillas de variantes no tóxicas (NT) y tóxicas (T).

El contenido de ácidos grasos insaturados en la variante NT varío de 73.93% a 80.30%, mientras que en la T la variación fue entre 72.27% y 78.65%, la diferencia entre ellas fue significativa ( $F(1,100) = 8.32, P = 0.0048$ ; Figura 2).

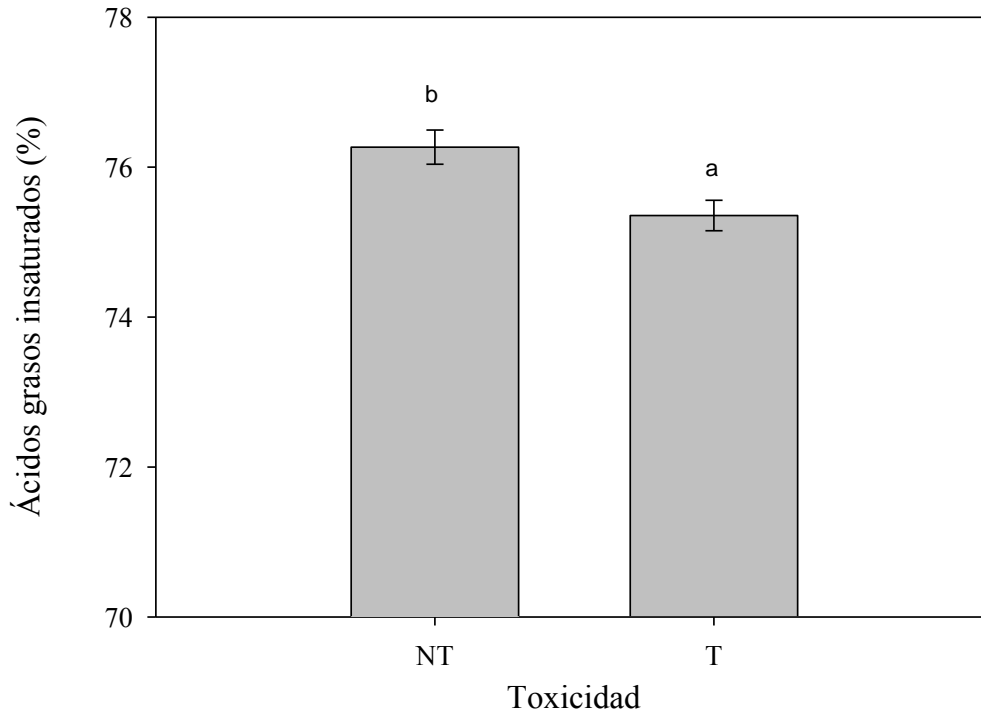


Figura 2. Análisis de varianza (ANOVA) del contenido de ácidos grasos insaturados en el aceite de las semillas de variantes no-tóxicas y tóxicas.