

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Actualmente, la fuente de energía más importante en el mundo son los combustibles fósiles, los cuales constituyen el 90% de toda la energía consumida (Alboudwarej, Felix & Tylor, 2006; International Energy Agency, 2008). Esta energía supe las necesidades mundiales de alimentación, salud, vestido, transporte y vivienda de toda la población, o al menos de la mayoría. Irónicamente, este esfuerzo por conseguir una mejor calidad de vida ha provocado graves problemas y desequilibrios que afectan al medio ambiente y por lo tanto, al bienestar de toda la humanidad (Amnesty International Publications, 2009).

Alrededor del tema petrolífero existen muchas consecuencias negativas en el ámbito social, económico y ambiental como: el continuo aumento del precio de los hidrocarburos, la disponibilidad limitada de estos recursos y los daños ambientales provocados por su explotación, comercialización y uso. Estos son los principales inconvenientes que impulsan a distintos entes en la sociedad a buscar alternativas que eliminen o minimicen los efectos desfavorables para el planeta y sus habitantes, como resultado del uso excesivo de combustibles fósiles (Andersson, 2006).

A pesar de que la producción de energías renovables mediante cultivos de especies oleaginosas es un tema bastante controversial, debido a la posible afectación que tendría sobre la seguridad alimentaria, constituye una alternativa que ofrece muchos beneficios (Sarin, Sharma, Sinharay & Malhotra, 2006). La especie *Jatropha curcas* L. o comúnmente llamada piñón, se destaca debido a las ventajosas características fisiológicas, agronómicas, ambientales y de producción que posee (Castro, Coello y Castillo, 2007). Además no compite con suelos destinados a la producción de cultivos

convencionales, pues se adapta a suelos áridos y pobres en nutrientes (King *et al.*, 2009).

Un problema considerable en el estudio de *Jatropha curcas* L. es el uso de las características morfológicas para describir la variabilidad genética, a pesar de que estas herramientas no demuestran la relación taxonómica exacta. Los caracteres morfológicos están influenciados en gran manera por las condiciones ambientales por lo que es necesario utilizar técnicas moleculares que describan la variabilidad genética de una manera más exacta y real (Kumar *et al.*, 2008).

1.2 Justificación del problema

El cultivo de *Jatropha curcas* L., se ha convertido en una interesante alternativa de producción de biodiesel, no sólo debido al gran rendimiento de aceite a partir de las semillas, sino también a las características propias de esta especie que la hacen aún más llamativa (Heller, 1996). El piñón se adapta a un gran rango de tipos de suelo, puede crecer en tierras áridas, semi-áridas, cascajosas, arenosas, salinas e incluso crecen en tierra pedregosa (Kumar & Sharma, 2008). Además, los niveles de nutrientes y de agua de los suelos donde crece el piñón suelen ser bajos, lo cual podría disminuir los costos de producción y cultivo de piñón (Achten *et al.*, 2008). Al ser *Jatropha curcas* L. un cultivo viable en suelos marginales, detiene la erosión de los mismos y debido a que estos suelos no están siendo utilizados por otros cultivos, *Jatropha curcas* L. no representa una amenaza para la seguridad alimentaria (King *et al.*, 2009).

Otra ventaja que tiene el cultivo de piñón es que produce frutos desde el primer año, a los cinco años se estabiliza y continúa produciendo frutos de buena calidad durante los siguientes 25-50 años (Kumar & Sharma, 2008). Asimismo, estudios indican que el piñón presenta resistencia a plagas (Qin, Ming-Xing, Ying, Xin-Shen &

Fang, 2005), propiedad que puede ser muy beneficiosa en cultivos a gran escala. El cultivo de *Jatropha curcas* L. posee cualidades potencialmente útiles tanto para la industria energética como para el mejoramiento de suelos. Los impactos que tendría este cultivo en la prometedora rama de los biocombustibles, generaría divisas importantes para los agricultores dedicados al cultivo de esta oleaginosa.

Las especies de *Jatropha* tienen una polinización cruzada, lo que permite un alto grado de variación genética. Esto ofrece amplias posibilidades para analizar y seleccionar características deseadas, así la selección es la actividad más importante en los programas de mejoramiento genético de especies (Gohil & Pandya, 2008; Kumar, Parthiban & Rao, 2008). Debido a que la variabilidad es un prerrequisito en un programa de mejoramiento, es necesario detectar y documentar la variación genética que existe dentro de las poblaciones y entre las poblaciones (Basha & Sujatha, 2007; Ram, Parthiban, Kumar, Thiruvengadam & Paramathma, 2008). Durante las dos décadas anteriores, el uso de marcadores moleculares ha demostrado ser muy útil para estudiar la variabilidad genética de especies, encontrando relaciones taxonómicas muy exactas, además de informar acerca de la historia del flujo de genes (Kumar *et al.*, 2008; Tatikonda *et al.*, 2009).

La mayoría de investigaciones relacionadas con esta especie buscan el cultivo masivo, la producción rentable de semillas y la multiplicación vegetativa; con el objetivo de lograr eficiencia en la obtención de biocombustibles. El éxito de estos trabajos depende de la identificación del material genético de las distintas variedades y del desarrollo de cultivos genéticamente superiores (Basha & Sujatha, 2007). Para ello, es indispensable el conocimiento y estudio de la variabilidad genética de esta especie, lo que resalta la importancia de esta investigación, pues no se han reportado estudios genéticos previos de *Jatropha curcas* L. en el Ecuador.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Estudiar la variabilidad genética de tres poblaciones de *Jatropha curcas* L. en la Provincia de Manabí utilizando marcadores moleculares ISSR's

1.3.2 Objetivos específicos

- a. Estandarizar la técnica de extracción de ADN en hojas de *Jatropha curcas* L.
- b. Optimizar las condiciones de PCR para los marcadores moleculares ISSR's.
- c. Analizar los datos obtenidos mediante herramientas bioinformáticas.
- d. Relacionar la información genética de las poblaciones con su ubicación geográfica.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Situación actual de los combustibles fósiles

La humanidad depende de varias fuentes de energía para su supervivencia y para el desarrollo industrial, comercial, tecnológico, investigativo y agronómico que se lleva a cabo mundialmente (PRAC, 2003; Tchung-Ming & Vinot, 2009). Dichas fuentes de energía son el sol, la biomasa, el viento, el curso del agua, el carbón, el gas natural y el petróleo. Actualmente, la fuente más importante de energía son los combustibles fósiles, que constituyen el 90% de toda la energía consumida a nivel mundial de donde el 34% corresponde al petróleo, 30% al carbón y el 24% al gas natural (Alboudwarej, Felix & Tylor, 2006; IEA, 2008).

Es preciso afirmar que el incremento de la demanda del petróleo y sus derivados están en función del aumento de habitantes que lo requieren (Population Reference Bureau, 2008; ONU, 2009). Como consecuencia al crecimiento poblacional, el consumo de petróleo es también influenciado de gran manera, es así que en 1970 la producción mundial de petróleo era de 48 millones de barriles al día, en 2004 era de 83 millones de barriles al día y para el año 2008 era de 85.5 millones de barriles al día (Chaize, 2006; EIA, 2009).

Los principales problemas en la explotación y uso de los hidrocarburos son: el alza de precios, reservas limitadas y los impactos ambientales provocados (Andersson, 2006). El incremento de los precios en el petróleo ha provocado la inflación más alta desde los años 90 en países como Estados Unidos, Alemania, Canadá, Francia y Japón, lo cual se traduce en mayor cantidad de impuestos sobre el consumo de combustibles (Schuldt y Acosta, 2006). Esto podría frenar el crecimiento económico con efectos críticos en todo el mundo, especialmente en países no petroleros en vías de desarrollo (Nuttall & Manz, 2008). De acuerdo al análisis que realizaron Kjærstad & Johnsson (2008), basándose en datos actuales disponibles y en literatura correspondiente al mercado de combustibles, las reservas de petróleo mundiales podrán satisfacer la demanda total hasta el año 2030. Por ello, nuevas tecnologías para obtención de energía deben ser desarrolladas prontamente para evitar un impacto desfavorable en la sociedad (Hernández, 2005).

En cuanto a los impactos ambientales que tiene la utilización de los combustibles de origen fósil cabe resaltar: la deforestación, el cambio climático, la destrucción de la capa de ozono, la contaminación del agua, del aire y del suelo, el desequilibrio en ecosistemas, los desastres naturales, la extinción de especies, las enfermedades, entre muchos otros más (Fontaine, 2003; Castro *et al.*, 2007; Amnesty International Publications, 2009). Los cambios climáticos resultan del calentamiento global causado por los gases de efecto invernadero, principalmente por el dióxido de carbono, el cual es producido durante la combustión de los combustibles fósiles (Escobar *et al.*, 2008). Esto sin duda, ha provocado cambios considerables en los

ecosistemas y más de 150 000 muertes cada año. El aumento en la temperatura promedio del planeta amenaza a la población con inundaciones, sequías, hambre y enfermedades como la malaria (Benedick, 1999; Escobar *et al.*, 2008).

Son todas estas situaciones desfavorables, las que han causado preocupación en gobiernos, investigadores, economistas, comerciantes, productores, agrónomos y en la sociedad en general, iniciando de esta manera una concientización que impulsa la búsqueda de soluciones y alternativas ante tales problemas (Benedick, 1999; Castro *et al.*, 2007). Algunas de las opciones para reemplazar la utilización de energía fósil, han sido investigadas y analizadas durante las últimas décadas, de las cuales se destacan energías renovables (energías que se reponen constantemente) como: energía hidráulica, solar, eólica, geotérmica, mareomotriz y energía producida a partir de biomasa (Siddiqi, 2007; Elhadidy & Shaahid, 2009).

1.4.2 Importancia de los biocombustibles

Los biocombustibles constituyen una relevante opción para superar los inconvenientes procedentes al uso excesivo de combustibles fósiles, plataforma importante para el desarrollo económico global (Nuttall & Manz, 2008). La biomasa constituye el material orgánico que se obtiene de forma natural en el ambiente (Perlack *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2007), la misma almacena energía que puede ser liberada por combustión (Fernández, 2002; Khan, Jong, Jansens & Spliethoff, 2008). Es por ello, que la biomasa representa una alternativa de gran potencial en la obtención de biocombustibles sólidos (biocarbón, leña), líquidos (bioetanol, biobutanol, biometanol, aceite vegetal y biodiesel) o gaseosos (biogás, biosingas y biohidrógeno). De todos estos, los que tienen mayor ventaja, son los biocombustibles líquidos debido a que pueden reemplazar al petróleo (Lora & Andrade, 2009). Como lo indica Demirbas (2009b), hoy en día las fuentes de biomasa más comunes en la producción de energía a parte de la madera son los residuos forestales, agrícolas (hojas, tallos, frutos de mala

calidad), frutos de plantaciones oleaginosas, estiércol de animales y gases que provienen de vertederos.

La biomasa suple el 10-15% de la demanda de combustibles en el mundo. En Estados Unidos, la biomasa provee más del 3% de energía del consumo total (Perlack *et al.*, 2005). En los países en desarrollo este porcentaje es mayor variando entre 20 a 38% y en pocos países (Nepal Chad y Tanzania) la biomasa incluso alcanza el 50 - 90% de la demanda total de energía (Schlamadinger & Marland, 1995; Khan *et al.*, 2008). A pesar de estas diferencias, la investigación y el desarrollo de la tecnología de biocombustibles tienen considerable relevancia en todos los países del mundo (Demirbas, 2009a).

Existen varias razones que hacen de los biocombustibles una alternativa acertada (Nuttall & Manz, 2008). Primero los biocombustibles pueden ser manejados en la infraestructura de las estaciones de combustibles ya existentes, lo cual permite una rápida introducción a gran escala de los mismos (Escobar *et al.*, 2008). Segundo, los biocombustibles pueden reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, disminuyendo los efectos nocivos en el ambiente (Demirbas, 2009a). Y tercero, los biocombustibles impulsan la seguridad energética, disminuyendo la dependencia de los hidrocarburos. Todo esto conlleva a la diversificación del sector energético, a la producción sustentable, a un mercado adicional para la agricultura y a la creación de trabajos, principalmente en sectores rurales (Zah & Ruddy, 2009).

A pesar de los beneficios de los biocombustibles, cabe recalcar que su producción y su uso pueden tener varios impactos ambientales y económicos desfavorables debido a la gran cantidad de agua requerida, a la destrucción de bosques, a la posible reducción en la producción de alimentos y a la erosión de los suelos debido a los fertilizantes (Hamelinck & Faaij, 2005). Por lo que, la identificación y la selección del tipo de cultivo en una determinada región es relevante para reducir los impactos y la

contaminación consecuente al proceso, así como también podría disminuir el uso de fertilizantes y agua (Escobar *et al.*, 2008; Duer & Christensen, 2009).

La producción global de biocombustibles (bioetanol y biodiesel) muestra un elevado monto de obtención, sin embargo se ha incrementado en un 70% hasta el año 2007 (Figura 1.1).

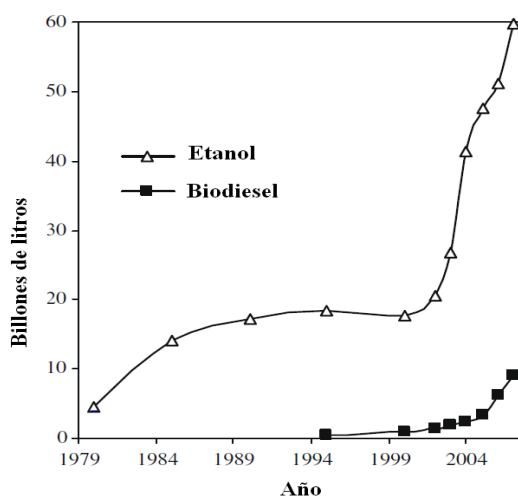


Figura 1.1 Producción mundial de bioetanol y biodiesel, desde el año 1980 hasta el año 2007 (Demirbas, 2009b).

Los Estados Unidos y Brasil son los principales productores de bioetanol, mientras que en Europa se produce en su mayoría biodiesel (Kjärstad & Johnsson, 2008). En la Tabla 1.1 se especifica la cantidad de bioetanol y biodiesel obtenido en los países productores más relevantes (Escobar *et al.*, 2008).

Tabla 1.1 Principales productores de bioetanol y biodiesel (Escobar *et al.*, 2008).

Bioetanol		Biodiesel	
País	Millones de Litros	País	Millones de Litros
Brasil	16 489	Alemania	1 919
Estados Unidos	16 217	Francia	511
China	1 998	Estados Unidos	291
Unión Europea	950	Italia	227
India	299	Austria	83

El biodiesel constituye una alternativa de energía renovable y amigable con el ambiente, obtenida mediante la transesterificación de aceites vegetales con alcohol (Sarin *et al.*, 2007; National Biodiesel Board, 2009). El biodiesel es miscible y posee características físicas y químicas similares al diesel, por lo que hoy en día es usado en forma pura, en mezcla o como aditivo de lubricidad principalmente en el sector transportista (Hill *et al.* 2006; Escobar *et al.*, 2008).

El biodiesel puede obtenerse de aceites vegetales usados, de grasa animal y de plantas oleaginosas. Zhang, Dubé, McLean & Kates (2003) realizaron ensayos de obtención de biodiesel a partir del aceite utilizado en restaurantes, hoteles e industrias. Gürü, Artukoglu, Keskin & Koca (2009) proponen aprovechar las grasas animales provenientes de mataderos, camales y mercados para la obtención de biodiesel. En una reciente investigación se discute incluso la producción de biodiesel a partir de microalgas, las cuales pudieran ser mucho más eficientes que los cultivos destinados a esta actividad (Mata, Martins & Caetano, 2009).

Sin embargo, los cultivos de especies oleaginosas, siguen considerándose como la mejor opción para la producción de biodiesel (Sarin *et al.*, 2006; Carlsson, 2009). Algunas de las especies oleaginosas más cultivadas son la colza (*Brassica napus*), el girasol (*Helianthus annuus*), la soya (*Glycine max*), la palma africana (*Elaeis guineensis*) y el piñón (*Jatropha curcas* L.). De las cuales, la especie *Jatropha curcas* L. se destaca notoriamente, teniendo la atención de investigadores, productores y empresarios, debido a las características fisiológicas, agronómicas, ambientales y de producción que posee (Castro *et al.*, 2007).

1.4.3 Especie *Jatropha curcas* L.

El nombre *Jatropha curcas* L. fue propuesto por Linnaeus en 1753, de acuerdo a la nomenclatura binomial, y es válido hasta la actualidad. Sin embargo, algunos de los nombres sinónimos que existen son *Curcas purgans*, *Curcas indica*, *Ricinus americanu* y *Jatropha edulis*. La especie *Jatropha curcas* L. es comúnmente conocida por calificativos propios de cada región, así se pueden citar los siguientes: tempate, piñoncillo, piñol, piñón, mupuluka, coquillo, tártago, entre otros (Heller, 1996; Divakara, Upadhyaya, Wani & Gowda, 2009). El término *Jatropha* proviene de las palabras griegas *iatrós* que significa doctor y *tropé* que significa comida, lo que indica que esta planta tiene propiedades medicinales (Divakara *et al.*, 2009).

1.4.3.1 Taxonomía

La familia Euphorbiaceae se divide en tres subfamilias: Acalyphoideae, Crotonoideae y Euphorbioideae, agrupando aproximadamente 300 géneros y 8000 especies. Dentro la subfamilia Crotonoideae se encuentra la tribu Joannesieae y dentro de ésta, se encuentra el género *Jatropha* que está conformada aproximadamente de 175 especies (Liu, Kirchoff, Wu & Liao, 2007). El género *Jatropha* se divide en dos subgéneros *Curcas* y *Jatropha*, con 10 secciones y 10 subsecciones con el fin de clasificar las especies del viejo y del nuevo mundo. El piñón o *Jatropha curcas* L. [sect. *Curcas* (Adans.) Griseb., subg. *Curcas* (Adans.) Pax] es considerada como la especie más primitiva del género *Jatropha* (Heller, 1996; Liu *et al.*, 2007).

1.4.3.2 Centro de origen y distribución

El centro de origen de la especie *Jatropha curcas* L. todavía no está bien definido, sin embargo, varias investigaciones indican que es una especie nativa de América, posiblemente de México y Centro América (Heller, 1996; Kumar & Sharma, 2008) como se indica en la Figura 1.2. Para determinar el centro de origen exacto de esta especie se debe realizar todavía muchos estudios, preferiblemente utilizando técnicas moleculares para mayor veracidad y exactitud en los resultados.

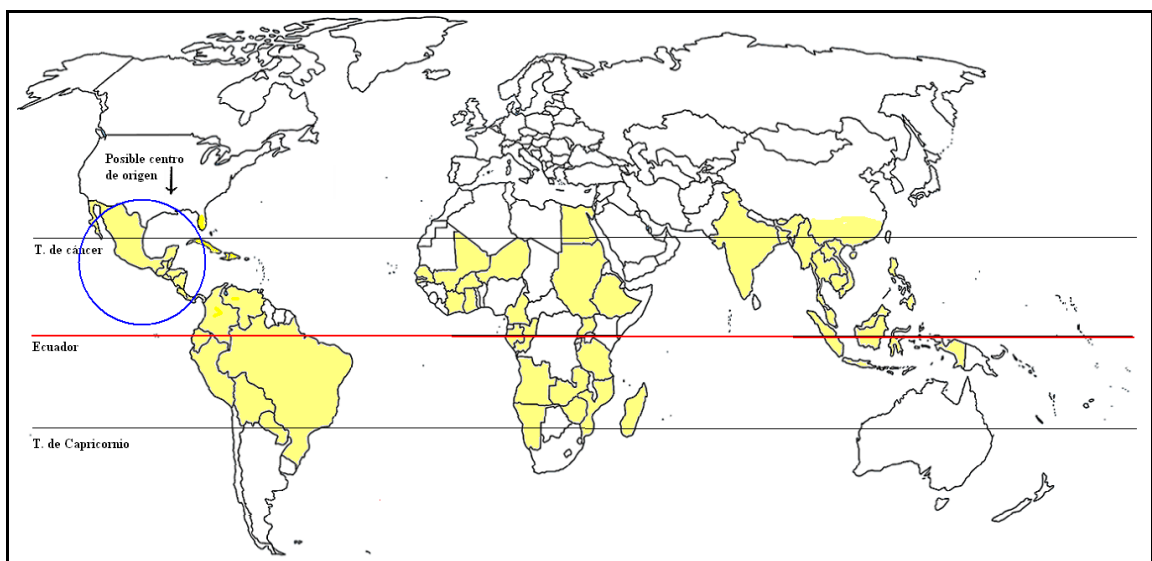


Figura 1.2 Distribución global de *Jatropha curcas* L. Las áreas marcadas muestran la presencia de esta especie y el círculo azul corresponde al posible centro de origen (King *et al.*, 2009).

La especie *Jatropha curcas* L. se encuentra distribuida en América Central, América del Sur, el Caribe, África, India y Asia. Su traslado hacia África y Asia se dio debido a la migración de portugueses desde el Caribe (Heller, 1996; King *et al.*, 2009). De acuerdo a Heller (1996) el piñón existe en México, Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá. En países del Caribe como Bahamas, Cuba, Dominica, República Dominicana, Haití, Puerto Rico, Santa Lucía, Santo Domingo, St. Croix, Trinidad y Tobago. Aunque en menor cantidad el piñón se localiza también en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador y las islas Galápagos, Paraguay, Perú y

Venezuela. Asimismo se ha encontrado esta especie en Florida. La Figura 1.2 muestra la distribución geográfica y el posible centro de origen de *J. curcas* L.

Aproximadamente existen 900 000 hectáreas sembradas con *J. curcas* L. en todo el mundo. Más del 85% de los cultivos se encuentran en Asia. En África existen cerca de 120 000 hectáreas y en América Latina existen 20 000 hectáreas con piñón. Se estima que para el año 2015 la cantidad de área cultivada con esta especie será de 13 millones de hectáreas según lo indica la WWF o World Wide Fund for Nature (2008). En el Ecuador, no existen registros de la cantidad de sembríos totales de *J. curcas* L., sin embargo el Consejo Provincial de Manabí asegura que existen 18 mil hectáreas sembradas con piñón en esta provincia y se estima plantar otras 23 mil hectáreas en 60 meses (Zambrano, 2008). Anzules (2008), Muñoz y Jiménez (2008) afirman que en la mayoría de territorio ecuatoriano existe *J. curcas* L. Así, esta especie ha sido identificada en las provincias de Esmeraldas, Guayas, Los Ríos, Pichincha, El Oro, Carchi, Imbabura, Loja y Manabí. De esta manera se confirma la flexibilidad de adaptación de esta especie a distintos ambientes y a diferentes tipos de suelo (Kaushik *et al.*, 2007).

La especie *J. curcas* L. crece en suelos áridos y semiáridos. Se ha encontrado en suelos arenosos, rocosos, salinos y pastizales, los mismos que se encuentran en su mayoría a alturas de 0 a 500 m, pudiendo existir hasta en los 1700 m. No se ha registrado presencia de piñón en regiones amazónicas húmedas (Heller, 1996; Kumar & Sharma, 2008; Achten *et al.*, 2008). Prefiere el clima tropical y subtropical, es decir crecen generalmente a una temperatura de 20-28 °C. Sin embargo puede crecer a temperaturas no menores de 10.5 °C, pues sus hojas no resisten a las heladas. A temperaturas menores a 7 °C la planta disminuye totalmente la producción de semillas e incluso puede morir. Se ha demostrado que el 95% de los cultivos de piñón se encuentran en áreas con un régimen de lluvia anual de 944 mm (Maes, Trabucco, Achten & Muys, 2009a).

1.4.3.3 Descripción Botánica

La especie *Jatropha curcas* L. es un arbusto que mide 5 m de altura pero en condiciones propicias puede alcanzar hasta los 10 m. Los tallos son cilindros vigorosos de donde nacen las ramas que producen un látex translúcido o rojizo. Cuando la planta proviene de una semilla se forman 5 raíces, 1 central y 4 periféricas, a diferencia de cuando la planta es propagada vegetativamente, donde no se forma la raíz central. Las hojas son ampliamente ovadas y se forman de 5 a 7 lóbulos grandes. Tienen un ancho de 9 a 15 cm y una longitud de 10 a 15 cm. Las hojas tienen pecíolos largos, 5 nervaduras (Figura 1.3b) y en el envés se encuentran pubescencias. En la Figura 1.3a se muestra la disposición de las hojas, siendo ésta de forma alterna con una filotaxis espiral (Heller, 1996; Octagon, 2006).

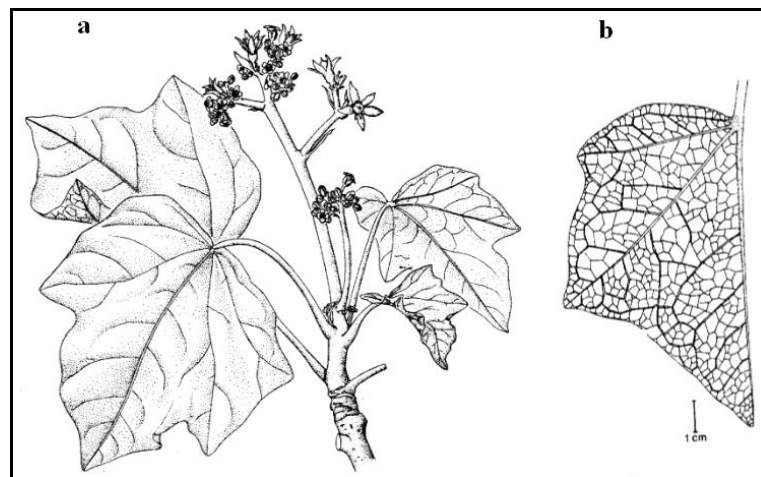


Figura 1.3 Morfología y disposición de las hojas de *Jatropha curcas* L. a) disposición de las hojas en una rama, b) nervaduras de una hoja (Heller, 1996).

Las inflorescencias son complejas y se forman en la parte terminal de las ramas, constituyendo la estructura paracladia, botánicamente conocida como cima (Figura 1.4a). La especie *J. curcas* L. es monoica (flores masculinas y femeninas en una misma planta) y sus flores son unisexuales, muy raramente son hermafroditas (Figura 1.4b). Por lo general *J. curcas* florece en época lluviosa dos veces al año, en

verano y en otoño. En regiones donde existe continua humedad esta especie florece en varias ocasiones (Heller, 1996; Achten *et al.*, 2008). Se ha observado que cuando existe un crecimiento continuo de esta especie, existe un desbalance en la producción de flores masculinas y femeninas, dando lugar a un mayor número de flores femeninas (Kumar & Sharma, 2008). Tanto las flores masculinas como femeninas miden de 6 a 8 mm, y poseen un color amarillo en el centro. Los pétalos de las flores miden 7 mm de largo y la longitud del pecíolo va entre 6-23 mm (Heller, 1996; Octagon, 2006).

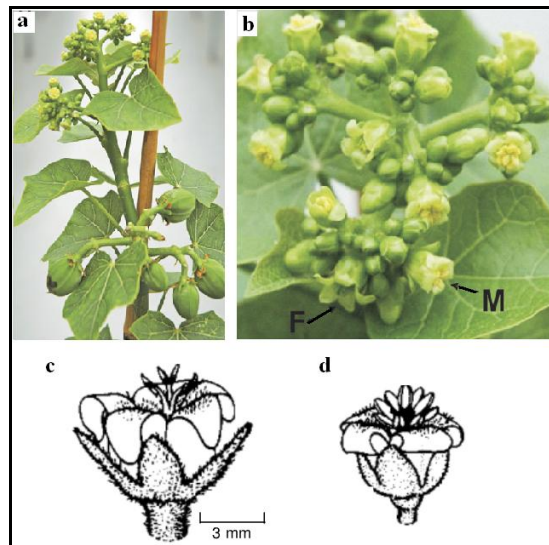


Figura 1.4 Estructura de las inflorescencias y flores de *J. curcas* L. a) inflorescencia en forma de cima y frutos al final de la rama, b) inflorescencia conformada por flores masculinas (M) y femeninas (F), c) flor femenina, d) flor masculina (Heller, 1996; King *et al.*, 2009).

La flor masculina posee un cáliz regular y elíptico dividido en 5 segmentos. La corola es acampanada, consta de 5 lóbulos connados (unidos entre sí) e internamente tiene tricomas (Figura 1.4c). Cada lóbulo contiene una glándula en la base. En el androceo se encuentran 10 estambres dispuestos en dos columnas distintas, de los cuales 5 están libres en la parte externa y los otros 5 connados en la parte interna. Las anteras están erectas y se forman de 2 tecas divididas por una hendidura (Liu, Kirchoff, Wu & Liao, 2007; Kumar & Sharma, 2008; Divakara *et al.*, 2009). La flor femenina tiene sépalos que miden 18 mm generalmente. Igual que en la flor masculina, el cáliz es

regular, de forma elíptica que se divide en 5 segmentos (Figura 1.4d). La corola posee 4 lóbulos unidos y vellos internos. El ovario es trilocular, de forma ovoide y su diámetro va desde 1.5 a 2 mm. El estilo es bífido y existen óvulos únicos en cada compartimiento (Divakara *et al.*, 2009).

Los frutos son cápsulas drupáceas, ovoides, triloculares de color verde y carnosas en un principio (Figura 1.5a) y color café oscuro y secas cuando maduran. Las dimensiones de los frutos son de 2.5 a 4 cm de largo por 2 cm de ancho (Figura 1.5b). Dentro de las cápsulas constan tres almendras bivalvas negras, las cuales miden 2 cm de largo y 1 cm de ancho (Figura 1.5c). Cada inflorescencia rinde un manojo de aproximadamente de 10 frutos. La semilla es cosechada de dos a cuatro meses después de la fertilización (Heller, 1996; King *et al.*, 2009).

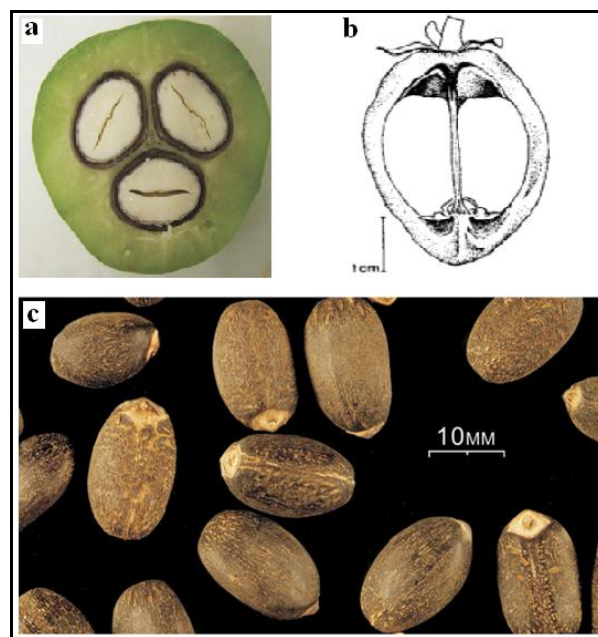


Figura 1.5 Frutos y semillas de *J. curcas*. a) corte transversal de un fruto que contiene tres semillas, b) corte longitudinal de un fruto, c) semillas maduras (Heller, 1996; King *et al.*, 2009).

La especie *J. curcas* L. tiene un número cromosómico de $2n=22$ (Perry, 1943; Carvalho, Clarindo, Praca, Araújo & Carels, 2008). Carvalho *et al.* (2008), determinaron que el tamaño del genoma de *J. curcas* L. es 416 Mb, el mismo que es considerado como pequeño. Asimismo se observó que existe similitud morfométrica entre los pares heterólogos, sugiriendo que *J. curcas* L. puede ser una especie autotetraploide. Recientemente, se ha completado la secuenciación del genoma de esta especie, lo que sin duda dará lugar a varios programas de mejoramiento genético (Divakara *et al.*, 2009).

1.4.3.4 Importancia del cultivo de *Jatropha curcas* L.

Heller (1996) asevera que mucho del interés en *J. curcas* L., es debido a su facilidad de crecer en suelos marginales, pues posee sistemas radicales profundos que pueden llegar a medir 5 m, favoreciendo la absorción de carbono, nutrientes y agua y evitando la erosión de los suelos. En períodos largos de sequía, el piñón resiste debido a que elimina la mayoría de sus hojas para reducir la pérdida de agua mediante la transpiración (Gübitz, Mittelbach & Trabi, 1999). Maes *et al.* (2009b), afirma que esta especie posee un tallo suculento (acumula cantidades considerables de agua) y es caducifolia (que pierde su follaje durante una etapa del año), determinando así el mecanismo fisiológico del piñón que le permite resistir al estrés de la sequía.

El piñón podría ser una excelente opción para reforestar suelos desérticos, que actualmente no tienen ninguna función productiva. Además esta especie no compite con otras plantas por este tipo de suelo, especialmente con cultivos comestibles, salvaguardando de ésta manera la seguridad alimentaria de la población donde se cultive el piñón (Achten *et al.*, 2008; Srinivasan, 2009). Incluso se ha investigado la posibilidad de realizar cultivos integrales, es decir sembríos de piñón junto con sembríos de otra especie, como por ejemplo con la especie maderera *Tectona grandis* o teca (Kumar & Sharma, 2008; Muñoz y Jiménez, 2008).

A través de varias investigaciones se ha determinado la composición química del piñón. La Tabla 1.2 muestra los compuestos encontrados en distintas partes de la planta, los mismos que pueden tener varias aplicaciones industriales. Las semillas de piñón contienen aproximadamente 24.6% de proteína, 47.25% de grasa, 5.54% de humedad y menos del 6% de almidón y azúcares totales. La grasa que contiene la semilla está compuesta de ácidos grasos saturados como ácido palmítico (14.1%) y ácido esteárico (6.7%) y de ácidos insaturados como ácido oleico (47%) y ácido linoleico (31.6%). Las semillas de la mayoría de variedades de piñón contienen compuestos tóxicos para humanos y animales como la curcina y forbol ésteres (Martínez, Siddhuraju, Francis, Dávila & Becker, 2006; Kumar & Sharma, 2008). Sin embargo, Martínez *et al.*, (2006) reporta que las variedades situadas en Veracruz, Castillo de Teayo, Pueblillo y Yautepec en México no son tóxicas, incluso los habitantes de estos lugares comen las semillas luego de tostarlas.

Tabla 1.2 Compuestos químicos obtenidos a partir de diferentes partes de la planta de *Jatropha curcas* L. (Kumar & Sharma, 2008).

Parte de la planta	Compuestos químicos
Partes aéreas	Ácidos orgánicos: ácido p-coumárico, ácido p-OH-benzoico, ácido protocatechuico, ácido resorsílico, saponinas y taninos.
Tallo	β - amirina, β - sitosterol y taraxerol
Hojas	Triterpenos cíclicos: estigmaste 5-en-3 β -7 β -diol, colest 5-en-3 β -7 β -diol, campesterol, β -sitosterol. Flavonoides: apigenina, vitexina, isovitexina. Dímerode un alcohol triterpeno y dos glicósidos flavoniodes.
Látex	Curcaciolina A, curcaina.
Semillas	Curcina, forbol ésteres, esterasas y lipasas.
Cáscara y residuos de la extracción	Fitatos, saponinas y un inhibidor de tripsina.
Raíces	B-sitosterol, marmesina, propacina, curculatiranes A y B, curcusones A y D, jatrolol y jatrololone A y B, coumerina tomentin, jatrophin y taraxerol.

Actualmente *J. curcas* L. es atractiva para varias entidades principalmente por el alto porcentaje de aceite (30-60%) que poseen sus semillas, dependiendo de la variedad y de la procedencia de las mismas. El aceite de piñón constituye una importante fuente de materia prima para obtener biodiesel (Basha, Francis, Makkar,

Becker & Sujatha, 2009). Además, alrededor de esta planta existen muchas otras ventajas que la hacen aún más interesante, siendo así, una prometedora alternativa de cultivo bioenergético (Foidl, Foidl, Sánchez, Mittelbach & Hackel, 1996; Gübitz *et al.*, 1999; Kumar & Sharma, 2008).

El aceite de *J. curcas* L. a más de ser utilizado en la producción de biodiesel, es también materia prima para producir jabones suaves y duraderos (Gübitz *et al.*, 1999; Openshaw, 2000). Así también, el glicerol que se obtiene como subproducto en la transesterificación del aceite puede ser utilizado para elaborar productos cosméticos naturales. En ciertas regiones de la India el aceite de piñón ha sido directamente utilizado como combustibles para lámparas. Además, el aceite de piñón es un potente insecticida en cultivos de algodón, papa y maíz (Kumar & Sharma, 2008; Achten *et al.*, 2008).

A más de producir biodiesel, el cultivo de *J. curcas* L., puede originar otros subproductos de valor comercial, utilizando de esta forma los desechos que pudieran causar problemas ambientales por acumulación en el futuro. Luego de la extracción mecánica del aceite de las semillas se obtiene también una parte sólida conocida como torta. La torta contiene de 4 a 12% de aceite y de 54 a 58.1% de proteína (Foidl *et al.*, 1996). Además contiene varias toxinas, nutrientes, forbol ésteres entre otros compuestos (Achten *et al.*, 2008).

La torta puede ser tratada para producir un biocompost activo, el cual posee más nutrientes que el estiércol de pollos y ganado (Sharma, Pandey & Lata, 2009). A la vez, puede ser utilizada como un biopesticida pues contiene compuestos tóxicos (Das, 1995; Adebawale & Adedire, 2006). Si la torta es purificada incluso puede constituir la materia prima en la elaboración de alimentos para animales (Rakshit *et al.*, 2008; Botha & Penrith, 2008). Mahanta, Gupta & Khare (2008) obtuvieron enzimas de uso industrial (proteasa y lipasa) mediante la fermentación en estado sólido de la torta. La

torta puede también ser fermentada anaeróbicamente utilizando consorcios bacterianos para la producción de biogás (Gübitz *et al.*, 1999).

Uno de los usos más comunes que tiene el piñón en casi todos los países donde crece, es servir como cerca viva de terrenos y plantaciones, pues al ser una planta tóxica los animales no se alimentan de ella y resulta ser una inversión a bajo costo (Openshaw, 2000; Dove Biotech Ltd., 2008). En los últimos años se ha sumado una interesante característica a la especie *J. curcas* L., convirtiéndola en un potencial cultivo fitoremediador de suelos (Kumar, Yadav, Thawale, Singh & Juwarkar, 2007). Investigaciones demuestran la capacidad del piñón de acumular en su estructura metales pesados como cromo, zinc y arsénico (Yadav *et al.*, 2009; Abhilash, Jamil & Singh, 2009).

La especie *Jatropha curcas* L. posee muchas propiedades medicinales en sus estructuras (Lentz *et al.*, 1998). Así, el extracto del tallo y de la corteza de piñón resultan efectivos para la curación de la tos, el dolor de estómago, úlceras, inflamación, parásitos intestinales, golpes, cólicos menstruales, hemorrácea y parto (Albuquerque, Monteiro, Ramos & Amorim, 2007). La raíz de piñón posee un efecto anti-inflamatorio (Mujumdar & Misar, 2004). El extracto de hojas se usa para el tratamiento de amebiasis, leishmaniasis y malaria (Cáceres *et al.*, 1998; Adamu, Kela & Suleiman, 2006).

El extracto de frutos de *J. curcas* L. tiene un efecto abortivo en ratas (Goonasekera, 1995; Ticktin & Dalle, 2005). El fruto del piñón también tiene acción purgativa y se lo utiliza para enfermedades de la piel y para disminuir el dolor causado por el reumatismo (Leonti, Sticher & Heinrich, 2003). Lin, Yan, Tang & Chen (2003) demostraron los efectos anti cancerígenos de la curcina que se encuentra en las semillas del piñón. El látex del piñón contiene la curciciclina A (Tabla 1.2), compuesto que inhibe la proliferación de células T humanas (Berg *et al.*, 1995). Asimismo se ha

demostrado que este látex tiene actividad coagulante en la sangre humana (Osoniyi & Onajobi, 2003).

Los beneficios de *J. curcas* L. han sido recientemente investigados en el área nanotecnológica, es así que Bar *et al.* (2009) describen la utilización del látex del tallo de piñón como agente de recubrimiento en la síntesis de nanopartículas de plata, desplazando la utilización de compuestos altamente tóxicos para el ambiente. La especie *J. curcas* L. incluso muestra utilidad en el área ambiental. Namasivayam, Sangeetha & Gunasekaran (2007), utilizaron el carbón activado obtenido a partir de las cáscaras de la fruta de piñón como un adsorbente económico de compuestos tóxicos presentes en el agua. En otra investigación se purifica el agua mediante la aplicación de extractos de la semilla de piñón (Pritchard, Mkandawire, Edmondson, O'Neill & Kululanga, 2009).

1.4.3.5 Diversidad y variabilidad de *Jatropha curcas* L.

Es oportuno describir y diferenciar los conceptos de diversidad y variabilidad genética, a pesar de que en muchas investigaciones moleculares se utilizan como sinónimos. La variabilidad genética es una medida de tendencia, de los genotipos individuales en una población, de variar unos a otros, es también el potencial que tiene un genotipo de variar frente a cambios ambientales. La diversidad genética es un nivel de diversidad biológica que se refiere al número total de rasgos genéticos en la composición genética de una especie. La diversidad genética es la variación real de una especie en una población a diferencia de la variabilidad genética, que describe la tendencia de las características genéticas para variar (Biology On line, 2009). La variabilidad genética es sumamente importante para la biodiversidad, pues tiene un rol fundamental en la capacidad de las poblaciones para responder a los cambios ambientales (Debouck, Ebert, Peralta, Barandiarán & Ramírez, 2008).

Muchos esfuerzos se han realizado, especialmente en la India, para evaluar la variabilidad genética en el germoplasma de *J. curcas* L. usando marcadores morfológicos (rasgos cuantitativos) y marcadores moleculares. A nivel morfológico se han analizado características como altura de la planta, diámetro de la corola, número de ramas primarias, número de ramas secundarias, área promedio de las hojas, tamaño del pecíolo, configuración del botón floral y altura a la que crece la primera rama (Gohil & Pandya, 2008; Sunil *et al.*, 2008). Mishra (2009) analiza incluso el rendimiento de semillas, el ciclo de siembra, el contenido de aceite, la robustez de la planta y el tiempo de floración, a diferencia de Kaushik *et al.* (2007), quienes consideran que los rasgos morfológicos de la semilla como tamaño, peso y contenido de aceite pueden ser útiles en el estudio de la variabilidad genética de piñón.

A pesar de que por mucho tiempo se han utilizado rasgos morfológicos para la caracterización de especies, es conveniente aclarar que esta variabilidad morfológica tiene limitaciones. Esto debido a que cambian durante los estados de desarrollo de la planta y además pueden ser ambiguos debido a las influencias ambientales (Somasundaram & Kalaiselvam, 2007).

El desarrollo y el uso de marcadores moleculares para la detección y exploración de polimorfismos en el ADN es uno de los más importantes logros de la genética molecular. Los marcadores moleculares de ADN como RAPDs (polimorfismos de ADN amplificados al azar), ERAPDs (polimorfismos de ADN amplificados al azar mejorado), SSRs (repeticiones de secuencia simple), SCARs (regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas), AFLPs (polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados) e ISSRs (secuencias internas de repeticiones simples) pueden ser utilizados a través de MAS (selección asistida con marcadores) para seleccionar variedades élites de piñón en estado de plántula (Sujatha *et al.*, 2008; Divakara *et al.*, 2009).

Como se afirmó anteriormente, la mayoría de investigaciones de caracterización molecular están limitadas al análisis de especies pertenecientes al género *Jatropha*, incluida la especie *J. curcas* L. provenientes de la India y un par de accesiones de *J. curcas* L. provenientes de México. También existen trabajos realizados con material vegetal de China. Sin embargo, estudios de variabilidad genética de piñón en América, utilizando técnicas moleculares, todavía no se registran.

La mayoría de trabajos muestran una alta variabilidad genética interespecífica (entre especies) dentro del género *Jatropha* (Ram *et al.*, 2008; Basha & Sujatha, 2009) y una baja variabilidad genética entre los individuos de piñón (He *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008; Popluechai *et al.*, 2009). Esta información es útil para evaluar las posibles hibridaciones interespecíficas (con otras especies) que pueden darse con *J. curcas* L, en busca de características específicas deseadas (Pamidimarri, Sinha, Kothari & Reddy, 2009).

Es por esta razón que es necesario llevar a cabo un análisis muy minucioso del germoplasma existente con el fin de conocer la variabilidad genética disponible para los programas de mejoramiento y para realizar el mapeo de poblaciones. Actualmente, existen varias estrategias para la obtención de nuevas variedades en plantas, incluyendo el mejoramiento convencional, la creación de híbridos interespecíficos, el mejoramiento por mutaciones y la ingeniería genética (Divakara *et al.*, 2009).

Algunos de los rasgos que deben considerarse en los programas de mejoramiento de *Jatropha curcas* L. se describen a continuación. El rendimiento de semillas puede mejorarse aumentando el número de flores y de ramas y por ende de semillas mediante la identificación de loci de caracteres cuantitativos o QTLs. El contenido de aceite puede incrementarse al alterar los niveles de expresión de enzimas en la ruta biosintética de los triglicéridos y de reguladores en la acumulación de aceite en la semilla (Nambisan, 2007). En cuanto a la toxicidad de la semilla, se han

identificado ya marcadores polimórficos específicos para reconocer y diferenciar variedades de piñón tóxicas de las no tóxicas (Pamidimarri, Singh, Mastan, Patel & Reddy, 2009). De igual manera, sería importante tomar en cuenta en los programas de mejoramiento la sincronía de la floración, la reducción del espesor de la testa, el tiempo de maduración, la resistencia a enfermedades y pestes, la tolerancia a la sequía, la reducción de la altura de la planta y la separación de ramas (Divakara *et al.*, 2009; King *et al.*, 2009).

Una vez que se hayan identificado variedades genéticamente distintas, éstas servirán como un recurso muy útil para la creación de variedades adecuadas a diferentes climas, distintos tipos de suelo y con características específicas deseadas. La clave de éxito para cualquier programa de mejoramiento radica en una adecuada variabilidad genética y en la disponibilidad de accesiones con los rasgos deseados y con una divergencia máxima (Sujatha, Reddy & Mahasi, 2008). En el caso de piñón, existe limitada información disponible acerca de la variabilidad genética, de los efectos medio ambientales y de las interacciones genotipo-ambiente, lo que hace del cultivo de piñón un negocio riesgoso. Es por ello que la información genética obtenida a través de la exploración global, introducción, caracterización y evaluación de accesiones de piñón proveerán una sólida base para el desarrollo de variedades élites (Divakara *et al.*, 2009).

1.4.4 Genética de Poblaciones

La genética de poblaciones es una ciencia que se refiere a los procesos de herencia individual y su efecto en la composición de poblaciones. También analiza los cambios de dicha composición a través del tiempo y el espacio. Se define entonces a una población como un grupo de individuos de la misma especie que se encuentran reproductivamente separados de otros grupos afines (Gardner, Simmons & Snustad, 2003; Griffiths *et al.*, 2005). Dichos cambios pueden ser observados dentro y entre poblaciones de cualquier especie, en el fenotipo y en las secuencias de aminoácidos de

proteínas. Se dice que un gen o un rasgo fenotípico es polimórfico cuando existe más de una forma del gen o más de un rasgo fenotípico para un carácter dentro de una población (Buckler & Thornsberry, 2002; Griffiths *et al.*, 2005).

La genética de poblaciones permite describir la variabilidad genética entre individuos de poblaciones y estima las tasas de los procesos de apareamiento, flujo génico, mutación, recombinación, selección natural y deriva génica aleatoria. Dichos fenómenos son importantes de analizar para poder relacionar los procesos genéticos básicos a nivel individual con la composición genética de una población (Griffiths *et al.*, 2005).

1.4.4.1 Procesos de apareamiento

Los tipos de apareamiento son el apareamiento al azar (ley de Hardy-Weinberg), la endogamia (cruzamiento consanguíneo), la exogamia y el apareamiento no al azar (selectivo).

La ley de Hardy-Weinberg describe las frecuencias esperadas de genotipos que resultan de un apareamiento al azar en grandes poblaciones diploides. Esta ley asume que la población tiene un tamaño infinito, el apareamiento es al azar y no existe selección natural, migración o mutación (Mitton, 2005). Esta ley según Griffiths *et al.* (2005), permite la pérdida de variación a largo plazo y como consecuencia todos los miembros de la población llegarán a poseer el mismo fenotipo en algún momento. Es preciso afirmar que la ley de Hardy-Weinberg describe una población hipotética. En situaciones reales, las frecuencias alélicas y genotípicas de las poblaciones cambian todo el tiempo, es decir están experimentando un cambio evolutivo (Campbell & Reece, 2005).

La endogamia o cruzamiento consanguíneo es el proceso de apareamiento no al azar que se da entre individuos que comparten un ancestro en común, es decir algún tipo de relación genética (Griffiths *et al.*, 2005). La autogamia es el ejemplo más extremo de endogamia y es muy común en plantas. Como resultado de estos procesos se incrementa la frecuencia de homocigotos y se disminuye la frecuencia de heterocigotos, anulando la validez del equilibrio Hardy-Weinberg en este caso. Al aumentar la homocigocidad en las plantas por lo general se conduce a una depresión endogámica, es decir, se reduce la aptitud (fitness en inglés) de los individuos y por lo tanto disminuye la viabilidad de toda la población (Lienert, 2002; Gardner *et al.*, 2003).

La exogamia es el apareamiento de individuos no emparentados preferiblemente. Algunas especies de plantas han desarrollado muy bien este sistema de reproducción, asegurando que los homocigotos no se formen en la población (Golz, Clarke & Newbiggin, 1995). Las líneas endógamicas no siempre poseen buenas características, es por esto que en la producción agrícola en ciertos casos, se busca la aplicación de la exogamia, obteniendo una descendencia que posee un vigor híbrido (heterosis) resultante de la heterocigocidad en los genes (Gardner *et al.*, 2003). Cuando un individuo tiende a escoger a su pareja debido a su semejanza en alguna característica y no debido a que son emparentados, se está dando un apareamiento no al azar o selectivo (Griffiths *et al.*, 2005).

1.4.4.2 Fuentes de cambios de las frecuencias alélicas

A través del tiempo las poblaciones cambian. Dependiendo de condiciones como recursos alimenticios, clima, disponibilidad de área de reproducción y de factores como depredadores y parásitos, el número de individuos va a aumentar o disminuir en una población. A nivel genético existen tres fuentes de variación de las frecuencias alélicas de las poblaciones: mutación, recombinación y flujo génico (Gardner *et al.*, 2003; Griffiths *et al.*, 2005).

Una mutación es el cambio hereditario permanente de la secuencia de nucleótidos de un cromosoma; por lo general en un único gen y suele producir una alteración en la función del producto génico (Lodish *et al.*, 2004). Todos los organismos poseen mutaciones debido a operaciones normales de las células o a interacciones al azar con el ambiente (Sánchez, 2003; Lewin, 2004). El efecto de las mutaciones en cualquier población es mínimo, sin embargo con el transcurso del tiempo existe una acumulación de mutaciones con consecuencias evolutivas considerables; si la selección se da a favor de los individuos que posean una mutación específica, la frecuencia de dicha mutación aumentará con el tiempo. Esto sin duda conduce a la obtención de especies con nuevos rasgos e incluso de nuevas especies (Lienert, 2002; Gardner *et al.*, 2003).

La recombinación ocurre durante la meiosis de organismos diploides y se da debido a un intercambio físico de material cromosómico entre dos copias de cada cromosoma (Lewin, 2004). El objetivo de la recombinación entre genes es obtener al azar combinaciones de alelos para diferentes genes en cada generación. La obtención de variabilidad genética a través de recombinación puede ser mucho más rápida que a través de mutaciones (Griffiths *et al.*, 2005).

El flujo génico se da cuando una población, al no estar completamente aislada, recibe material genético adicional de otras poblaciones con frecuencias genéticas diferentes. De esta manera cualquier población puede contribuir a la constitución genética de otras por medio de la migración (Griffiths *et al.*, 2005). En plantas el flujo génico ocurre a través de la migración de propágulos vegetativos, semillas o polen y por lo general depende de las distancias que recorran los polinizadores. Dichos recorridos son específicos de cada polinizador, por ejemplo, los murciélagos pueden volar 100 km, las abejas 20 km pero la mayoría de polinizadores no sobrepasan los 1000 m (Lienert, 2002).

1.4.4.3 Selección

Los procesos de mutación, recombinación, flujo génico y de apareamiento no explican porque los organismos están adaptados a su ambiente. Los cambios en las especies como respuesta a cambios en el ambiente ocurren debido a que los diferentes genotipos poseen distintos niveles de aptitud para sobrevivir y reproducirse. La selección se refiere a las tasas de sobrevivencia y reproducción y altera las frecuencias de genotipos en una población, permitiendo que el alelo responsable de una mejor aptitud en un individuo aumente su frecuencia en la población. Por lo que se puede describir a la selección como un proceso que aumenta la aptitud de una población (Marone *et al.*, 2002; Griffiths *et al.*, 2005).

1.4.4.4 Deriva génica aleatoria

La deriva génica es un proceso que mediante la reproducción de organismos, produce cambios aleatorios en las frecuencias alélicas en una población (Gardner *et al.*, 2003). A lo largo de muchas generaciones la deriva génica conduce a la pérdida de variabilidad genética dentro de una población (Slatkin, 1994). Los casos extremos de deriva génica se producen por dos fenómenos conocidos como efecto fundador y cuello de botella. El efecto fundador es el establecimiento de una nueva población a partir de un grupo pequeño de individuos provenientes de una población más grande. El cuello de botella se da lugar cuando el tamaño de la población disminuye drásticamente debido a catástrofes ambientales o a falta de alimento. En ambos casos el número de alelos disminuye y las frecuencias alélicas van a ser mucho mayores a las frecuencias de la población original debido a la acción de la deriva génica (Slatkin, 2004; Mancera, 2007).

1.4.4.5 Equilibrio Genético

La composición genética de una población está en función de la actividad combinada de los procesos de apareamiento, mutación, flujo génico, selección y deriva génica. Cuando estos factores actúan en direcciones opuestas se da lugar a un estado de equilibrio genético. En dicho equilibrio las características de una población se mantienen estables, es decir no experimentan cambios. Comúnmente las situaciones que llevan al equilibrio genético de una población son la selección equilibradora, el equilibrio mutación-selección y el equilibrio mutación-deriva (Gardner *et al.*, 2003).

La selección equilibradora genera un estado de equilibrio genético conocido como polimorfismo equilibrado o también como selección con sobredominancia, en donde la selección favorece a los heterocigotos. En este caso los alelos permanecerán en la población aún cuando sean deletéreos en condición homocigota (Kemp, 1928). Una población alcanza el equilibrio mutación-selección cuando la producción de alelos dañinos por mutación se iguale con la eliminación de estos alelos por medio de la selección. Asimismo una población logra el equilibrio mutación-deriva cuando una mutación repone la variación que se ha perdido por la deriva (Gardner *et al.*, 2003).

1.4.5 Técnicas Moleculares

1.4.5.1 Extracción y Cuantificación de ADN

La extracción y purificación de ácidos nucleicos (ADN) constituye la primera etapa de los estudios de biología molecular y de las técnicas de recombinación de ADN (Somma, 2002). La calidad y el buen estado del ADN son imprescindibles, debido a que la amplificación de fragmentos a partir de cantidades pequeñas de ADN constituye un paso importante en las investigaciones moleculares, especialmente cuando se utilizan los marcadores ISSRs. Existen innumerables protocolos para extraer y purificar ADN y

la mejor elección depende principalmente del tipo de muestra a utilizarse. Es importante también considerar que el método de extracción sea simple, rápido y de bajo costo, especialmente cuando el número de muestras es grande (Narayanan *et al.*, 2006). La preparación de la muestra consiste básicamente de los siguientes pasos: ruptura celular, remoción de proteínas y ARN, concentración y determinación de la pureza y concentración de ADN (Dieffenbach & Dveksler, 2003; Ochoa, Proaño y Jiménez, 2008).

La ruptura celular puede realizarse mediante métodos mecánicos, químicos o enzimáticos. Los métodos mecánicos utilizan la sonicación, la molienda y el licuado. Los métodos químicos emplean detergentes que destruyen la membrana celular. También se utilizan enzimas para debilitar la membrana celular de una manera muy suave. Para la remoción de proteínas y ARN se usan solventes orgánicos, gradientes de densidad, proteinasas y RNasas. Estos métodos son útiles debido a las diferencias físicas entre ADN, proteínas y ARN. En la concentración de ADN se elimina la solución desproteinizadora removiendo así la mayoría de impurezas. La concentración de ADN puede realizarse precipitando el ADN con alcoholes o retirando el agua del ADN mediante compuestos absorbentes de agua (Somma, 2002; Ochoa *et al.*, 2008).

Para cualquier ensayo molecular se requiere conocer la pureza y la concentración de ADN en las soluciones obtenidas en el proceso de extracción y de purificación. Para ello son útiles las técnicas de espectrofotometría, fluorometría y de visualización. En la espectrofotometría la cuantificación se realiza midiendo la solución de ADN a 260 nm y comparando con un blanco. Se puede obtener la pureza de la solución midiéndola también a 280 nm y calculando el coeficiente A_{260}/A_{280} . La solución de ADN está pura cuando este coeficiente tiene un valor aproximado de 1.8 (Somma, 2002). En la fluorometría se utiliza la capacidad del ADN de unirse a ciertos colorantes fluorescentes. Esta unión permite que sean detectados, cuantificados y comparados con muestras de cantidad conocida de ADN (Held, 2006). En la cuantificación de ADN por visualización se emplea geles de agarosa, en donde se corre

la solución de ADN junto con marcadores moleculares de peso conocido, los mismos que son visualizados con luz UV (Somma, 2002).

1.4.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es un proceso repetitivo de síntesis bidireccional de ADN, que mediante la utilización de primers, se amplifica una región específica del ADN (Dieffenbach & Dveksler, 2003). En la PCR es indispensable la capacidad de desnaturalizar el ADN de doble hebra e hibridar las hebras simples complementarias en una forma controlada (Lodish *et al.*, 2004).

La PCR comienza con la desnaturalización a altas temperaturas de una muestra de ADN de cadena doble, separándola en dos cadenas simples (plantillas). Cuando baja la temperatura se permite que los oligonucleótidos sintéticos (primers), que se encuentran a altas concentraciones, se hibriden complementariamente a las plantillas. Esta unión permite que la enzima Taq polimerasa, que es resistente a la temperatura, actúe sintetizando la cadena de ADN en presencia de desoxinucleótidos (dNTP). Cuando se completa la síntesis, se vuelve a calentar la muestra para desnaturalizar las hebras de cadena doble recién formadas. Luego, se baja la temperatura y nuevamente empieza el proceso, conocido como ciclo. En cada ciclo se duplica la cantidad de copias de la secuencia que se encuentra entre los sitios del primer, produciendo así un incremento exponencial. Los otros fragmentos de ADN de la muestra original se mantienen sin amplificar (Lodish *et al.*, 2004).

1.4.5.3 Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa es muy utilizada para separar y monitorear moléculas de ADN. Esta técnica molecular no es solamente utilizada como un método analítico también es útil para la purificación de fragmentos específicos de ADN. El gel es una red compuesta de moléculas poliméricas de agarosa (Old & Primrose, 1993). Las moléculas de ADN tienen una carga negativa cerca del pH neutro, esta característica les permite moverse hacia el electrodo positivo durante la electroforesis en gel. Las moléculas que tienen diferentes longitudes migran a través de la matriz del gel como bandas distintas, debido a que las moléculas más pequeñas se mueven más rápido que las grandes. Se ha determinado que la velocidad a la que se mueven las moléculas de ADN es inversamente proporcional al logaritmo de sus pesos moleculares (Lodish *et al.*, 2004).

Para visualizar las bandas de ADN separadas generalmente se incuba el gel en una solución que contenga bromuro de etidio, el cual intercala el ADN. Esta unión permite que las bandas de ADN puedan ser visualizadas al ser expuestas a una luz ultravioleta (Lodish *et al.*, 2004). Por lo general, se corren las muestras de ADN en presencia de un marcador molecular de ADN de tamaño conocido lo que permite determinar, mediante interpolación, el peso molecular de las bandas de ADN obtenidas (Old & Primrose, 1993).

1.4.5.4 Marcadores moleculares

El desarrollo y la aplicación de tecnologías basadas en la utilización de marcadores moleculares constituyen herramientas poderosas y adecuadas para revelar polimorfismos a nivel de ADN. Razón por la cual son eficientes tanto para la investigación básica (análisis filogenéticos, búsqueda de genes útiles, detección de variabilidad genética entre individuos y entre poblaciones) como para la investigación

aplicada (MAS, pruebas de paternidad, trazabilidad de alimentos). La selección de la mejor técnica a utilizarse depende de los objetivos planteados, del material que se analizará y del tipo de datos que se obtendrá (Somasundaram & Kalaiselvam, 2007; Venkatachalam, Sreedhar & Bhagyalakschmi, 2008).

Los marcadores moleculares son localizaciones específicas en un cromosoma y son muy utilizados en estudios de variabilidad genética debido a que presentan muchas ventajas (Kumar, 1999). Jiménez & Collada (2000) sostienen que los marcadores moleculares no se ven afectados por variaciones ambientales ni de desarrollo, muestran la variación de los individuos a nivel de ADN, permiten seleccionar regiones concretas en el ADN, el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado y permiten analizar tanto la información que se expresa fenotípicamente como la que no es expresada.

Existen ciertos marcadores que utilizan la hibridación y otros que utilizan la PCR. Aquellos que se basan en hibridación permiten la unión de sondas con secuencias específicas de ADN y son los RFLPs (polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción) y los VNTR (repeticiones en tándem de número variable). Aquellos que se basan en la PCR permiten la amplificación de productos de ADN. Pueden ser los RAPDs, AFLPs, ISSRs entre otros, más conocidos como MAAPs (perfiles múltiples de amplicones arbitrarios), término usado cuando se emplean oligonucleótidos arbitrarios (Kumar, 1999; Somasundaram & Kalaiselvam, 2007).

Los marcadores moleculares pueden ser divididos como haploides o diploides, dependiendo del tipo de genoma de que provengan, y como dominantes o codominantes. Los marcadores dominantes (RAPDs, AFLPs, ISSRs) permiten analizar solamente el alelo dominante de los individuos heterocigotos. Al contrario de los marcadores codominantes (RFLPs, SSRs), los cuales distinguen ambos alelos, dominantes y recesivos en individuos heterocigotos. De igual forma un marcador

molecular puede ser monomórfico, cuando es invariable en todos los organismos estudiados y polimórfico cuando presenta diferencias (Jiménez & Collada, 2000).

Marcadores Moleculares SSRs

Las repeticiones de secuencias simples (SSRs), más conocidas como microsatélites, son repeticiones cortas de nucleótidos dispuestos en tándem. Los microsatélites son hipervariables, se encuentran a lo largo de todo el genoma y se estima que en el genoma de plantas existen de 5×10^3 a 3×10^5 microsatélites. Los fragmentos correspondientes a los SSRs pueden ser amplificados mediante PCR, utilizando primers específicos que limiten dicho fragmento. Así también se puede amplificar las secuencias que se encuentran entre SSRs. Estos marcadores moleculares son conocidos como ISSRs y son útiles para detectar polimorfismos genéticos (Nagaoka & Ogihara, 1997).

Marcadores Moleculares ISSRs

Los marcadores dominantes ISSRs son muy usados en estudios de variabilidad genética debido a que no se requiere previa información del genoma, su desarrollo tiene un bajo costo y los procedimientos de laboratorio son fácilmente transferibles a cualquier especie de planta. Los marcadores ISSRs se asemejan a los marcadores RAPDs, sin embargo los ISSRs son secuencias de nucleótidos más largas, por lo que la temperatura de alineamiento es más alta dando más reproductibilidad de bandas que los RAPDs (Culley, Sbita & Wick, 2007). La adición de una base diferente en un extremo de los marcadores ISSRs hace que el reconocimiento de su secuencia complementaria en el ADN sea más específico y reproducible (Barth, Melchinger & Lubberstedt, 2002; Kumar *et al.*, 2008).

La presencia de un fragmento ISSR indica que el individuo es homocigoto dominante o heterocigoto, sin poder distinguirlos entre ambos. La ausencia de banda puede representar la presencia de un homocigoto recesivo o también puede ser el resultado de cambios de nucleótidos en la secuencia de unión del primer. Por lo tanto esto puede dar estimaciones inexactas de relaciones (Jiang & Mo, 1998; Cortés, McCauley & Ballard, 2006). Cada marcador ISSR puede amplificar múltiples fragmentos al azar a lo largo de todo el cromosoma, dando lugar a bandas altamente polimórficas (Vergara *et al.*, 2008). Por ello, estos marcadores dominantes son muy informativos y permiten realizar distinciones entre genotipos y también entre primers utilizados.

Poder de Resolución

La propiedad funcional conocida como RP (poder de resolución) correlaciona adecuadamente la capacidad de los primers para distinguir entre genotipos. Esta propiedad logra realizar comparaciones entre primers, entre combinaciones de primers y enzimas o entre combinaciones de sondas y enzimas generados en los análisis utilizando RAPDs, ISSRs, AFLPs y RFLPs. En sí, el RP proporciona datos cuantitativos que permiten comparaciones entre primers, incluidos los que son capaces de distinguir todos los genotipos evaluados en un estudio. El RP puede también ser utilizado para estimar el rendimiento de un grupo de primers (Venkatachalam *et al.*, 2008).

1.4.6 Análisis de datos

La conformación de los genes de los individuos en una población es el resultado de situaciones al azar, lo cual aumenta el nivel de aleatoriedad al patrón de variabilidad a lo largo del genoma. Esto lleva a que la mayoría de métodos clásicos estadísticos, que analizan muestras independientes, no sean aplicados a los datos provenientes de estudios de genética de poblaciones (Nordborg & Innan, 2002).

1.4.6.1 Estadística Comparativa de Variabilidad

Los resultados de los análisis con marcadores dominantes se los examinan con la metodología de presencia de bandas, utilizando el valor 1, o ausencia de bandas, utilizando el valor 0, dando lugar a un perfil para cada individuo (Mariette, Chagne & Lezier, 2001). De los tres posibles genotipos (AA, Aa, aa) que se pueden encontrar en un organismo diploide, sólo dos de éstos (homocigotos dominantes: AA y heterocigotos: Aa) son registrados por lo marcadores dominantes, mientras que los homocigotos recesivos (aa) no se registran. Esta limitación hace que el análisis de genética de poblaciones con marcadores dominantes no sea tan certero como con marcadores codominantes, los cuales si registran ambos alelos dominantes y recesivos. Sin embargo avances recientes en los métodos estadísticos han permitido el análisis de datos provenientes de marcadores moleculares dominantes, a pesar de que algunos problemas todavía no se han eliminado completamente. Una ventaja muy notable de los marcadores dominantes es que pueden mostrar un gran número de polimorfismos en todo el genoma (Hollingsworth & Ennos, 2004; Satovic *et al.*, 2004).

Coefficientes de similitud

Los perfiles de los marcadores dominantes establecidos para cada individuo se usan para generar matrices de distancias genéticas o de similitud (Hollingsworth & Ennos, 2004). Para ello, este método utiliza métricas llamadas coeficientes de similitud, las mismas que se interpretan como medidas de distancias. Dichos coeficientes permiten calcular una medida de la variabilidad genética en la población. Las distancias genéticas exponen una idea general de cuán similares o diferentes son las poblaciones (Bonin, Ehrich & Manel, 2007).

Algunos de los coeficientes más utilizados, debido a que se excluye de sus análisis la ausencia de bandas y además no se asume el equilibrio Hardy-Weinberg, son

el coeficiente de Jaccard y el coeficiente de Dice (conocido también como coeficiente de Nei, Li's o Sorensen). Existen otros coeficientes de similaridad que incorporan en sus fórmulas la ausencia de bandas lo que implica su cuidadosa utilización en los análisis. De este grupo resalta el coeficiente de simple agrupamiento (Culley, 1999).

El coeficiente de Jaccard considera la presencia de bandas en al menos uno de los dos individuos y por lo tanto no es afectado por la ausencia de bandas homoplásicas (cuando la ausencia de una banda se debe a distintas mutaciones). El coeficiente de Dice considera la presencia de bandas en los dos individuos, es decir pone más énfasis en la similaridad de los individuos que en su disimilaridad. El coeficiente de simple agrupamiento considera todos los loci registrados, es decir las bandas presentes y ausentes, maximizando la cantidad de información obtenida (Bonin *et al.*, 2007).

Representaciones visuales

Una vez calculadas las distancias genéticas, éstas se pueden utilizar en distintos análisis multivariados como en el ACP (análisis de coordenadas principales) y en algoritmos creadores de árboles como el UPGMA (método no ponderado de apareamiento de grupos a través de la media aritmética), los cuales darán lugar a representaciones visuales de las relaciones genéticas existentes entre los individuos analizados (Hollingsworth & Ennos, 2004). El ACP utiliza directamente la información de los datos reunidos en la matriz de similaridad, para extraer información más relevante y así generar nuevas variables denominadas como componentes principales. Esta herramienta estadística multivariada permite realizar análisis de agrupamiento (Tomita, Park & Sotomayor, 2002).

El UPGMA es el método más simple para construir árboles arraigados, más conocidos como dendogramas, a partir de matrices de distancias genéticas. El UPGMA emplea un algoritmo de agrupamiento secuencial, en el que se identifican las relaciones

de las distancias genéticas por orden de similitud. Este método asume una tasa constante de evolución (hipótesis del reloj molecular) y es considerado como poco eficiente para inferir árboles filogenéticos, a menos que esta hipótesis ya haya sido justificada para el conjunto de datos que se está utilizando. Así el árbol es construido de una manera gradual (Backeljau *et al.*, 1996; Opperdoes, 1997).

Test de Mantel

El test de Mantel es un análisis estadístico que estima el grado de correlación existente entre dos matrices del mismo rango. Se trata, por tanto, de evaluar si la asociación (positiva o negativa) es más robusta de lo que se esperaría por puro azar. Este test puede ser muy útil en la genética de poblaciones por ejemplo, una matriz puede contener estimaciones de las distancias genéticas entre los individuos analizados, mientras que la otra podría contener las estimaciones de la distancia geográfica a la que se encuentran los individuos o poblaciones (Reynolds & Houle, 2002; Luzuriaga y Olano, 2006).

1.4.6.2 Estructura genética

Aproximaciones de la estructura genética o del grado de diferenciación entre poblaciones pueden ser calculadas usando varios análisis, incluyendo el AMOVA (método de análisis de la varianza molecular), uno de los métodos más utilizados (Culley, 1999).

El término F de Wright es un término referido al aumento de la homocigocidad resultante de la endogamia. Las divisiones que soportan las poblaciones conllevan a una pérdida de variación genética (heterocigocidad) entre las subpoblaciones debido al tamaño pequeño de las mismas y a la deriva génica a la que están expuestas. Wright

propuso tres coeficientes de índices para evaluar la subdivisión de poblaciones: F_{IS} (entre individuos), F_{ST} (entre poblaciones) y F_{IT} (población total).

El coeficiente de índice F_{IS} es también conocido como coeficiente de endogamia y es la probabilidad de que dos alelos en un individuo sean idénticos debido a que tienen un mismo descendiente. El valor de F_{IS} va de -1 a +1. Valores negativos indican exceso de heterocigocidad y valores positivos deficiencia de heterocigocidad (Gardner *et al.*, 2003). El coeficiente de índice F_{ST} o también llamado índice de fijación mide el efecto de las divisiones de una población en la heterocigocidad de las subpoblaciones debido a la deriva génica. Este coeficiente es el más útil y el más utilizado para determinar las divergencias genéticas entre las subpoblaciones. El coeficiente de índice F_{ST} es siempre positivo. Tiene un valor cercano a 0 cuando no hay subdivisión, ocurre apareamientos al azar y no existe divergencias genéticas en la población y tiene un valor cercano a 1 cuando existe subdivisión extrema (aislamiento completo). Valores de F_{ST} menores a 0.05 indican una diferenciación genética insignificante mientras que valores mayores a 0.25 muestran una diferenciación genética muy grande dentro de la población analizada. El coeficiente de índice F_{IT} es el coeficiente global de endogamia de un individuo en relación a la población total, sin embargo rara vez es utilizado en los análisis (Dorak, 2009).

AMOVA

El AMOVA es utilizado para determinar la varianza total existente dentro de poblaciones y entre poblaciones y puede ser realizado a partir de una matriz de distancias genéticas (Culley, 1999). La varianza entre poblaciones se representa como F_{ST} , término antes mencionado. El AMOVA no fue exactamente diseñado para analizar datos de marcadores dominantes, por lo que éstos perfiles deben ser considerados como haplotipos moleculares, es decir, se asume que los datos resultan de sitios enlazados completamente sin recombinación, cuando en realidad los datos de marcadores dominantes resultan de sitios independientes con recombinación. Esto conlleva a que

los resultados obtenidos con marcadores dominantes no puedan ser comparados con los resultados de marcadores codominantes (Culley, 1999).

1.5 Sistema de hipótesis

- La variabilidad genética de *Jatropha curcas* L. entre poblaciones es mayor que dentro de poblaciones.
- La variabilidad genética de las tres poblaciones de *Jatropha curcas* L. tiene relación con su respectiva ubicación geográfica.