



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

**FITOPATÓGENOS QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE
BIOMASA PARA LA OBTENCIÓN DE BIODIESEL A
PARTIR DE *Jatropha curcas* L.**

Tesis que presenta

MC ABRIL JESÚS DÍAZ BRAGA

**En opción al título de
DOCTOR EN CIENCIAS EN
ENERGÍA RENOVABLE**

Mérida, Yucatán., Junio 2016

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar estudios de posgrado en el programa de Doctorado en Ciencias en Energía Renovable.

A mi Comité Tutorial conformado por la Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito, el Dr. Raúl Tapia Tussell, el Dr. Javier Orlando Mijangos Cortés, y la Dra. Sara Elena Solís Pereira, por su orientación, consejos y sus revisiones pertinentes durante todo el doctorado.

Al jurado examinador durante la evaluación predoctoral integrado por la Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito, el Dr. Raúl Tapia Tussell, la Dra. Patricia Ester Lappe Oliveras y la Dra. Sara Elena Solís Pereira, por sus observaciones y sugerencias al proyecto de tesis.

Al laboratorio GeMBio, en especial al ingeniero Alberto Cortés Velázquez, a los M. en C. Teresita Valencia, Rodolfo Martín Mex, Ángel Nexticapan Garcés y Andrés Quijano Ramayo por todo su apoyo técnico, pero sobre todo por su paciencia y enseñanzas durante el desarrollo de las actividades relacionadas con el trabajo de doctorado.

A la Dra. Daisy de la C. Pérez Brito, por su dedicación, paciencia y enseñanza; pero sobre todo por esos consejos que han sido guía para mi formación profesional y para mi vida cotidiana.

Al Dr. Raúl Tapia Tussell por sus consejos y enseñanzas tan acertadas, pero mucho más por ponerse la bata de laboratorio junto conmigo en todo este camino, por todo el cariño y paciencia brindada, me llevo a un amigo.

A todos mis amigos de laboratorio, Beto, Emy, Rubí, Erick, Erick Aguilera, Gamaliel, Claudia, Raúl, Anuar, Isabel, Jackelin, Sandi, Tere y Diana, por todos esos buenos consejos y por acompañarme en toda esa travesía maravillosa que es el posgrado.

Pero mucho más a mi familia, por confiar siempre en mí y por motivarme en todo momento.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
RESUMEN.....	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN.....	9
CAPÍTULO 1.....	11
ANTECEDENTES.....	11
1.1 Biocombustibles: una opción de energía renovable	11
1.1.1 Bioetanol	11
1.1.2 Biogás	12
1.1.3 Biohidrógeno	12
1.1.4 Biodiesel.....	12
1.2 Cultivo de <i>Jatropha curcas</i> para la producción de biodiesel.....	16
1.2.1 Descripción taxonómica y botánica de <i>Jatropha curcas</i>	16
1.2.1.1 Flor	17
1.2.1.2 Flor	17
1.2.1.3 Fruto	18
1.2.1.4 Semillas	19
1.2.1.5 Raíz	20
1.2.2 Distribución geográfica de <i>Jatropha curcas</i>	20
1.2.2.1 Distribución mundial de <i>Jatropha curcas</i>	20
1.2.2.2 Distribución de <i>Jatropha curcas</i> en la República Mexicana.....	22
1.2.3 Requerimientos ecológicos de <i>Jatropha curcas</i>	23
1.2.4 Practicas agronómicas	24
1.2.5 Usos y productos de <i>Jatropha curcas</i>	25
1.2.5.1 Mitigación de problemas ambientales	25
1.2.5.2 Uso medicinal	25

1.2.5.3 Extracción de aceite.....	27
1.2.5.4 Generación de productos.....	28
1.2.5.5 Bioplaguicida	28
1.2.6 Plagas y enfermedades en <i>Jatropha curcas</i>	29
1.3 Justificación	32
1.4 Hipótesis.....	33
1.4 Objetivos.....	34
1.4.1 Objetivo general	34
1.4.2 Objetivos particulares	34
CAPÍTULO 2.....	35
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA	35
2.1 Estrategia experimental general.....	35
2.2 Materiales y métodos.....	36
2.2.1 Colecta de Muestras.....	36
2.2.2 Aislamiento y purificación de fitopatógenos cultivables.....	38
2.2.3 Pruebas de patogenicidad.....	39
2.2.4 Pruebas fisiológicas y bioquímicas para caracterización de aislamientos bacterianos	40
2.2.5 Caracterización morfológica e identificación a nivel de género de los aislados fúngicos.....	43
2.2.6. Análisis moleculares.....	43
2.2.6.1 Extracción de ADN genómico	43
2.2.6.2 Identificación de los fitopatógenos por secuenciación de regiones génicas ..	44
2.2.6.3 Identificación de hongos con iniciadores especie-específicos	46
2.2.6.4 Perfiles de restricción por PCR-RFLP	47
2.2.7 Estudio del hongo no cultivable <i>Phakopsora jatrophiicola</i>	47
2.2.7.1 Caracterización morfológica.....	47
2.2.7.2 Germinación de urediniosporas	48

2.2.7.3 Caracterización ultraestructural con microscopía electrónica de barrido (MEB)	48
2.2.7.4 Bioensayo de patogenicidad de <i>Phakopsora jatrophicola</i> en <i>Jatropha curcas</i>	49
2.2.8. Distribución temporal y rango de colonización de los hongos asociados a lesiones en <i>Jatropha curcas</i>	50
CAPÍTULO 3	51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.1 Aislamiento y purificación de fitopatógenos cultivables	51
3.2 Bacterias	51
3.3 Pruebas de Koch de los aislamientos bacterianos	52
3.4 Pruebas fisiológicas y bioquímicas para caracterización a nivel género de los aislados bacterianos	52
3.5 Caracterización morfológica e identificación a nivel de género de los aislados fúngicos	54
3.5 Análisis moleculares	58
3.5.1 Identificación de fitopatógenos por secuenciación de regiones génicas	58
3.5.2 Identificación de hongos con iniciadores especie-específicos	63
3.5.3 Perfiles de restricción por PCR-RFLP	63
3.6 Estudio del hongo no cultivable <i>Phakopsora jatrophicola</i>	68
3.6.1 Caracterización morfológica	68
3.6.2 Germinación de urediniosporas	70
3.6.3 Caracterización ultraestructural con microscopía electrónica de barrido (MEB)	71
3.6.4 Bioensayo de patogenicidad de <i>Phakopsora jatrophicola</i> en <i>Jatropha curcas</i>	72
3.7 Distribución temporal y rango de colonización de los hongos asociados a lesiones de tejidos de <i>Jatropha curcas</i>	75
CONCLUSIONES	80
PERSPECTIVAS	81
BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXO	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1 Reacción común para el proceso de producción del biodiesel	13
Figura 1. 2 Planta de <i>Jatropha curcas</i>	17
Figura 1. 3 Inflorescencia de <i>Jatropha curcas</i>	18
Figura 1. 4 Frutos de <i>Jatropha curcas</i>	19
Figura 1. 5 Semillas de <i>Jatropha curcas</i>	20
Figura 1. 6 Distribución de <i>Jatropha curcas</i> en el continente americano y centro de origen propuesto.....	21
Figura 1. 7 Distribución de <i>Jatropha curcas</i> en África y Asia.....	22
Figura 1. 8 Distribución de variedades de <i>Jatropha curcas</i> según su toxicidad en México.....	23
Figura 2. 1 Estrategia experimental para determinar los principales fitopatógenos que afectan la producción de <i>Jatropha curcas</i>	35
Figura 2. 2 Sitios de colecta en la Península de Yucatán, México, de muestras de <i>Jatropha curcas</i> con síntomas de enfermedad.....	36
Figura 2. 3 Aislamientos de los patógenos cultivables de <i>Jatropha curcas</i>	37
Figura 2. 4 Exudado bacteriano en tejidos de <i>Jatropha curcas</i>	38
Figura 2. 5 Prueba de Koch de los aislados bacterianos.....	40
Figura 3. 1 Prueba de tinción de Gram de los aislados bacterianos.....	51
Figura 3. 2 Prueba de patogenicidad (Koch) por inyección axilar de los aislamientos bacterianos en <i>Jatropha curcas</i>	52
Figura 3. 3 Crecimiento de los aislados bacterianos	53
Figura 3. 4 Prueba de producción de citocromo oxidasa.....	53
Figura 3. 5 Colonias de los aislamientos fungosos obtenidos de <i>J. curcas</i> crecidos en PDA.....	55
Figura 3. 6 Amplificación del gen 16S ADNr de las cepas bacterianas en <i>Jatropha curcas</i>	58
Figura 3. 7 Relaciones filogenéticas de los hongos asociados a lesiones en <i>Jatropha curcas</i>	61
Figura 3. 8 Árbol filogenético de los aislados de <i>Fusarium</i> asociados a lesiones en <i>Jatropha curcas</i>	62
Figura 3. 9 Perfil de restricción de <i>Sphingomonas</i> spp. y <i>Burkholderia cepacia</i>	63

Figura 3. 10 Síntomas de roya (<i>Phakopsora jatrophiicola</i>) en hojas de piñon (<i>Jatropha curcas</i>).....	68
Figura 3. 11 Estructuras morfológicas de <i>Phakopsora jatrophiicola</i> en <i>Jatropha curcas</i> observadas al microscopio de luz	69
Figura 3. 12 Germinación de las esporas de <i>Phakopsora jatrophiicola</i> colectadas de hojas de <i>J. curcas</i>	71
Figura 3. 13 Fotomicrografías electrónicas de barrido de <i>Phakopsora jatrophiicola</i> dentro del tejido vegetal.....	72
Figura 3. 14 Evaluación de infectividad de las urediniosporas de <i>Phakopsora jatrophiicola</i> usando un ensayo con hojas separadas.....	73
Figura 3. 15 Frecuencia de colonización (FC) de hongos asociados a lesiones de muestras de <i>J. curcas</i>	76
Figura 3. 16 Frecuencia de especies de hongos asociados a lesiones de plantas de <i>J. curcas</i> L durante el estudio 2013-2015	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. 1 Contenidos de aceite en semillas de plantas utilizadas para biodiesel y que usualmente no son comestibles.....	15
Tabla 1. 2 Descripción, ventajas y desventajas de los métodos de propagación de <i>J. curcas</i>	24
Tabla 1.3 Usos medicinales de <i>Jatropha curcas</i>	26
Tabla 1. 4 Plagas reportadas en cultivos de <i>Jatropha curcas</i>	30
Tabla 1. 5 Enfermedades reportadas en cultivos de <i>Jatropha curcas</i>	31

RESUMEN

El piñón (*Jatropha curcas* L) es un árbol pequeño, resistente a la sequía, originario de México y América Central, que se ha distribuido a nivel mundial. El cultivo de *J. curcas* ha sido ampliamente considerado como una opción de las más prometedoras, para solucionar parte de los problemas existentes en la obtención de la energía y a los creados por el cambio climático, debido a sus semillas ricas en aceite, las cuales representan una materia prima de alta calidad para la producción de biodiesel. Sin embargo, el piñón es afectado por varios fitopatógenos, por lo que la presunta tolerancia de esta planta a las plagas y enfermedades es errónea. En México existen pocos estudios de los fitopatógenos que afectan a la producción del piñón. Así, el objetivo de este estudio, fue conocer los principales fitopatógenos presentes en plantaciones comerciales de *J. curcas* establecidas en cuatro localidades de Yucatán y una localidad de Chiapas, México, en diferentes épocas del año, ya que no existen reportes previos sobre el manejo de los mismos. Mediante estudios morfológicos y moleculares con materiales procedentes de plantas con síntomas de enfermedad, se aislaron e identificaron a las bacterias *Burkholderia cepacia* y *Sphingomonas* sp. También, se obtuvieron 15 especies fúngicas (*Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Curvularia akaii*, *Curvularia cymbopogonis*, complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti*, complejo de especies *Fusarium fujikuroi*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum magnum*, *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassiicola*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Diaporthe phaseolorum*, *Pestalotiopsis clavispora* y *Exserohilum rostratum*) pertenecientes a 10 géneros. Paralelamente, se hizo la caracterización morfológica y ultraestructural, mediante MEB, y se determinó la capacidad infectiva de las urediniosporas de *Phakopsora jatrophiicola* en condiciones in vitro, obteniendo un promedio de 181.16 ± 19.5 pústulas/hoja observadas en el lado abaxial. La presencia de este patógeno se registró en todas las localidades muestreadas, observándose una alta defoliación de plantas de *J. curcas*. Este estudio demuestra la diversidad y asociación de especies, principalmente fúngicas, en plantaciones comerciales de piñón establecidas en México, motivo por el cual se ven afectados los rendimientos en dicho cultivo y a su vez hace promisorio el implemento de programas de manejo

Palabras clave: *Jatropha curcas* L, fitopatógenos, diversidad, *Phakopsora jatrophiicola*.

ABSTRACT

Physic nut (*Jatropha curcas* L) is a small tree native to Mexico and Central America, resistant to drought, which is distributed worldwide. The cultivation of *J. curcas* has been regarded widely as one of the most promising solutions for the problems created by climate change and uncertainty in obtaining energy, due to its oil-rich seeds, which represent a high quality raw material for the production of biodiesel. However, physic nut is frequently affected by plant pathogens, so its assumed tolerance to pests and diseases is mistaken. In Mexico there are few studies on plant pathogens that affect the production of physic nut, so the objective of this study was to find the main pathogens present in commercial plantations of *J. curcas* established in five locations in southeastern Mexico, in different times of the year, because there are no previous reports for their management. Using morphological and molecular studies on plants showing symptoms of disease, they were isolated and identified the bacteria *Burkholderia cepacia* and *Sphingomonas* sp. Also, fifteen fungal species belonging to 10 fungi genera and associated with lesions in physic nut plants, were obtained: (*Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria*, *Curvularia lunata*, *Curvularia akaii*, *Curvularia cymbopogonis*, *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex, *Fusarium fujikuroi* species complex, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum magnum*, *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassiicola*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Diaporthe phaseolorum*, *Pestalotiopsis clavispora* and *Exserohilum rostratum*) In parallel, were obtained the morphological ultrastructural by MEB and infectivity of the spores of *Phakopsora jatrophiicola* under in vitro conditions, obtaining an average of 181.16 ± 19.5 pustules/leaf observed in the abaxial side. The presence of this pathogen was recorded in all locations sampled, and a high defoliation of *J. curcas* plants was observed. This study demonstrates the diversity and association of species, mainly fungi, in commercial physic nut plantations established in Mexico, for this reason yields are impaired in this species and in turn makes promissory the implement of disease management programs.

Key words: *Jatropha curcas* L, phytopathogen, diversity, *Phakopsora jatrophiicola*.

INTRODUCCIÓN

El piñón (*Jatropha curcas* L) es un arbusto grande o un árbol pequeño, de la familia *Euphorbiaceae*, resistente a la sequía, originario de México y América Central, y está ampliamente distribuido en áreas silvestres o semi cultivadas de América Central y del Sur, África, India y del Sudeste asiático. A *J. curcas* se le atribuyen muchas cualidades: puede ser utilizada para prevenir la erosión del suelo, algunas partes de la planta tienen valor medicinal y cosmética, y su madera y frutos pueden ser utilizados para varios propósitos [1], [2], [3], [4]. Desde hace varios años, el cultivo del piñón ha sido considerado como una de las soluciones más prometedoras a los problemas creados por el incremento de las emisiones de gases de efecto invernadero, a la incertidumbre en la obtención de la energía y a la pobreza rural en los países subdesarrollados [2], [5], debido a sus semillas ricas en aceite, las cuales representan una materia prima de alta calidad para la producción de biodiesel [1]. Las semillas de *J. curcas* son generalmente tóxicas para los humanos y los animales, debido a la alta concentración de ésteres de forbol presentes en las mismas, que han sido identificados como los principales agentes tóxicos responsables de la toxicidad del piñón [5], [3]. A pesar de esto, la planta de *Jatropha* es afectada por muchas plagas de insectos y frecuentemente muestra síntomas de ataques de hongos y otros fitopatógenos [6]. La tolerancia que se asume del piñón a las plagas y enfermedades que han sido reportadas, se basa principalmente en la observación de árboles solitarios y no aplica en general para *J. curcas* crecida en plantaciones [7]. Por esta razón han sido registradas pérdidas significativas en los cultivos de piñón, por daños causados por insectos, hongos o virus [8], [9], [10]. Hay diferentes reportes por varios autores con los nombres científicos de los fitopatógenos y síntomas de las enfermedades que afectan a *J. curcas* a nivel mundial. Entre los fitopatógenos reportados se encuentran: *Fusarium* spp, *Pestalotiopsis versicolor*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides* [4], [11], [12], [13], *C. capsici* [14], *Phakopsora jatrophiicola*, *Cercospora jatrophiicola* [13], *Alternaria alternata* [15], *Xanthomonas* spp., *Indian cassava mosaic virus* [8], [16], *Cassava mosaic virus* [17], etc. En la mayoría de las localidades de México, donde se encuentra la planta de *Jatropha*, se ha utilizado como cerca viva hasta aproximadamente los últimos diez años, cuando se inició su cultivo intenso y poco después surgieron los problemas fitosanitarios, entre los que destacan las enfermedades

fúngicas que pueden obstaculizar seriamente el crecimiento de plantas y la producción de semillas. Como la información sobre las enfermedades que afectan a la planta de *Jatropha* en México es escasa [18], [15], [14], en este estudio se muestran las observaciones hechas sobre los principales patógenos que afectan a este cultivo en cuatro localidades de Yucatán (Temozón Mérida, Conkal, Chablekal y Tizimín) y una de Chiapas (Tuxtla Gutiérrez), los cuales fueron identificados y monitoreados durante tres años, con el objetivo de determinar su diversidad y distribución temporal y proponer estrategias que permitan el control de enfermedades con el fin de desarrollar un cultivo apropiado y a gran escala de *Jatropha* en México.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Biocombustibles: una opción de energía renovable

A nivel mundial se consumen aproximadamente 13 Terawatts de energía, de la cual el 80% es generada por la quema de combustibles fósiles; lo que ha incrementado la concentración de CO₂ en la atmósfera favoreciendo el calentamiento global y provocando el cambio climático. Sin embargo, ese calentamiento global podría ser lento y tal vez reversible si la sociedad remplazara a los combustibles fósiles por renovables. Entre las alternativas de energía renovable, se encuentra la bioenergía, en donde la energía solar es capturada y convertida en biomasa, la cual puede ser transformada a formas de energía útil para la sociedad moderna. La bioenergía debe ser generada en grandes cantidades y para ello existen varias opciones provenientes de biomasa, que pueden ser diferenciadas dependiendo de la forma de biomasa utilizada [19]. Por ejemplo, se ha identificado varios tipos de desechos que pueden servir para la generación de energía, tales como, restos de comida, residuos municipales, agrícolas, cultivos energéticos (aceite de semillas comestibles y no comestibles) y diversas microalgas y cianobacterias como fuentes de bioaceite [20].

1.1.1 Bioetanol

Los principales tipos de biocombustibles son: bioetanol, biogás, biohidrógeno y biodiesel. El bioetanol es un alcohol derivado de la fermentación de azúcares presentes en plantas, como cereales, remolacha, caña de azúcar, entre otros cultivos. Otra alternativa para la generación de bioetanol, es el uso de desechos agrícolas, forestales o industriales (paja de cereal, rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar, cáscaras de arroz o residuos sólidos). El bioetanol mezclado con la gasolina es utilizado como combustible alternativo para la automoción [21].

1.1.2 Biogás

El biogás es el producto gaseoso de un proceso biológico llamado “digestión anaerobia” debido a que ocurre en ausencia de oxígeno e involucra la acción de un grupo de bacterias. Este proceso puede ser aplicado en residuos agrícolas y pecuarios, y también puede ser empleado para el tratamiento de aguas residuales con alta carga orgánica, como las producidas en muchas industrias de alimentos. El gas generado mediante este proceso puede ser utilizada en las cocinas de los hogares [22].

1.1.3 Biohidrógeno

El hidrógeno es un tipo de energía renovable que tiene un alto contenido energético por unidad de peso (122 kJ/g). Actualmente, la producción biológica de hidrógeno puede ser por fotofermentación, realizada por bacterias (*Clostridium butyricum*) o microalgas (*Chlamydomonas reinhardtii*) bajo condiciones de luz en presencia de compuestos reducidos, como por ejemplo, ácidos orgánicos contenidos en sustancias de desecho, mediante la expresión de una enzima específica, la hidrogenasa, usando protones H^+ y electrones (e^-) de la transferencia en la cadena fotosintética, o por degradación fermentativa de una fuente de sustratos endógenos. También, la producción de hidrógeno se obtiene por fermentación oscura, realizada por bacterias anaerobias, que crecen en sustratos ricos en carbohidratos, bajo condiciones de oscuridad. Actualmente la producción del biohidrógeno vía fotofermentación es mayor que la obtenida por fermentación oscura [23], [24], [25], [26].

1.1.4 Biodiesel

El biodiesel es un combustible líquido, es una mezcla de ésteres monoalquilo de ácidos grasos de cadena larga, que se deriva de materias primas renovables, como el aceite vegetal o grasa animal y que se produce mediante un proceso de transesterificación (Figura 1.1). Sus principales ventajas, son que es un combustible renovable y biodegradable, además menos tóxicos comparado con el diésel fósil [20], [27]. Los cultivos oleaginosos, como la colza, la soya y el cultivo de microalgas han sido ampliamente evaluados como fuentes de biodiesel [28], [29], [30].

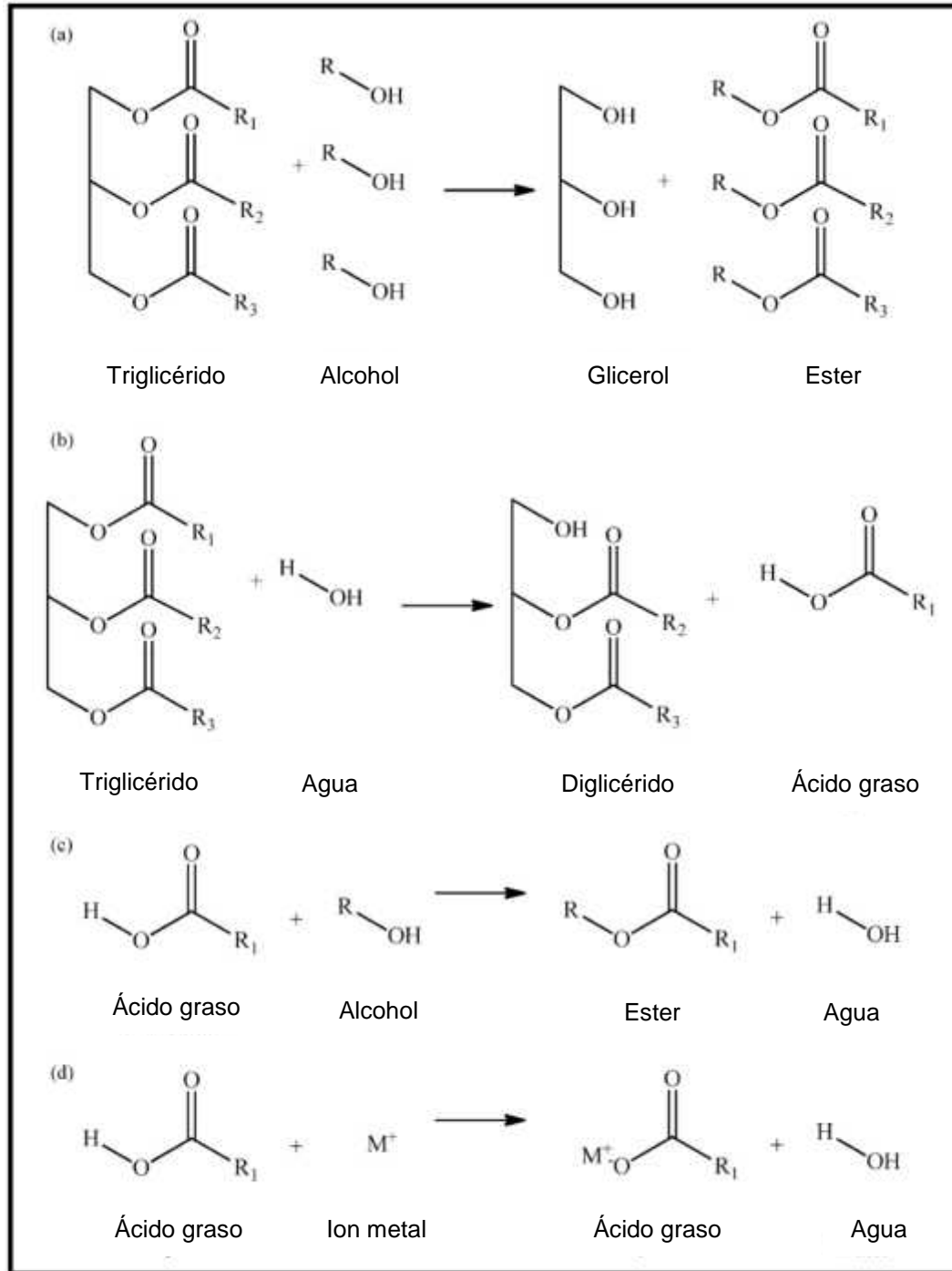


Figura 1. 1 Reacción común para el proceso de producción del biodiesel: a) transesterificación, b) hidrólisis, c) esterificación y d) saponificación [31].

Una de las ventajas más grandes del biodiesel, comparado con otros combustibles alternativos de transporte, es que puede ser utilizado en motores diesel existentes sin realizar modificaciones y además que es idóneo para mezclar en cualquier proporción con el diesel obtenido del petróleo [20]. Generalmente, el precio del biodiesel es relativamente alto y no compite con el diesel convencional, sin embargo, las fluctuaciones en el precio del diesel en la actualidad, han permitido, en ciertos momentos, que el biodiesel producido a partir de aceite vegetal refinado/usado o de grasa animal llegue a ser competitivo [31]. Cualquier proceso de producción de biodiesel, que pueda reemplazar exitosamente al combustible convencional, tiene que cumplir con tres requisitos básicos: Primero, debe producirse suficiente materia prima para la obtención del combustible a escala comercial, segundo, el costo debe ser menor que el del combustible fósil convencional; y tercero, debe cumplir con las especificaciones estándares de calidad de los combustibles [20].

La materia prima para la producción de biodiesel ha sido categorizada tradicionalmente en tres grupos principales: aceite vegetal (comestible y no comestible), grasa animal y desechos de aceite de cocina (materiales oleaginosos) [32]. Actualmente, los aceites comestibles son el principal recurso (más del 95%) para la producción de biodiesel a nivel mundial [33].

En el mundo se están utilizando diferentes tipos de cultivos oleaginosos como materias primas para la elaboración de biodiesel, debido al elevado contenido de aceite en sus semillas. Entre los aceites obtenidos de estas plantas están: el aceite de colza en Canadá, aceite de girasol en Europa, aceite de soya en EUA, aceite de palma (*Elaeis guineensis*) en el sudeste de Asia, aceite de coco en Filipinas, etc., los que al ser comestibles no deberían emplearse como materia prima para la producción de biodiesel.

Por lo tanto, la selección de materia prima para la producción de biodiesel, debe enfocarse en cultivos no comestibles y que puedan crecer en tierras áridas, entre estos se encuentran principalmente jatropha (*Jatropha curcas*), karanja (*Pongamia pinnata*), tabaco (*Nicotiana tabaccum*), mahua (*Madhuca indica*), neem (*Azadirachta indica*), árbol de caucho (*Hevea brasiliensis*), mango de mar (*Cerbera odollam*), higuera (*Ricinus communis*) y algodón (*Gossypium* sp.), por lo que son una alternativa prometedora de materia prima para la producción de biodiesel (Tabla 1.1) [32], [34].

Tabla 1. 1 Contenidos de aceite en semillas de plantas utilizadas para biodiesel y que usualmente no son comestibles.

Nombre científico	Nombre común	Contenido de aceite %	
		Semilla	Almendra
<i>Jatropha curcas</i>	Jatropha, piñón	20-60	40-60
<i>Pongamia pinnata</i>	Karanja, pungam	25-50	30-50
<i>Azadirachta indica</i>	Neem	20-30	25-45
<i>Madhuca indica</i>	Mahua	35-50	50
<i>Schleichera triguga</i>	Kusum	10.65	-
<i>Ricinus communis</i>	Ricino, higuera	45-50	-
<i>Linum usitatissimum</i>	Linaza	35-45	-
<i>Cerbera odollam</i> (<i>Cerbera manghas</i>)	Mango de mar, árbol suicida, mangle	54	6.4
<i>Gossypium sp.</i>	Algodón	17-25	-
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco	36-41	17
<i>Argemone mexicana</i>	Amapola espinosa mexicana	22-36	-
<i>Hevea brasiliensis</i>	Árbol de caucho	40-60	40-50
<i>Melia azedatach</i>	Árbol de paraíso	10	-
<i>Simmondsia chinensis</i>	Jjoba	45-55	-
<i>Thevetia peruviana</i>	Adelfa amarilla	8.41	67
<i>Moringa oleifera</i>	Moringa	33-41	2.9
<i>Thlaspi arvense</i>	Carraspique	20-36	-
<i>Euphorbia lathyris</i>	Tártago	48	-
<i>Sapium sebiferum</i>	Árbol de sebo	12-29	-
<i>Pistacia chinensis</i>	Pistacho chino	30	-
<i>Datura stramonium</i>	Estramonio	10.3-23.2	-

Fuente: [32]

1.2 Cultivo de *Jatropha curcas* para la producción de biodiesel

1.2.1 Descripción taxonómica y botánica de *Jatropha curcas*

Jatropha curcas es un arbusto alto o árbol pequeño, caducifolio, perteneciente al:

- Reino: *Plantae*
- División: *Magnoliophyta*
- Clase: *Magnoliopsida*
- Orden: *Malpighiales*
- Familia: *Euphorbiaceae*
- Subfamilia: *Crotonoideae*
- Tribu: *Jatrophaeae*
- Género: *Jatropha*
- Especie: *J. curcas* L.

Puede crecer hasta seis metros de altura; el diámetro aproximado del tronco es de 14-18 cm en arbustos adultos. Las ramas son robustas, con corteza lisa y delgada de color pardo claro. La médula poco resistente, de aproximadamente 20 cm de diámetro, de color blanco grisáceo; látex lechoso con sabor amargo que brota de cualquier herida. El tallo es corto y la planta crece de manera articulada (Figura 1.2) [35], [36], [37], [38].

1.2.1.1 Hojas

El piñón es una planta de hojas caducas, que duran de 7-8 meses y que también caen en condiciones de estrés. Éstas son verdes, amplias, delgadas y brillantes, largas y alternas, en forma de palma peciolada, la mayoría de 7-20 cm de largo y de ancho. Con margen entero, el ápice agudo, base cordada, pubescente por el envés, palminervada, con 5 nervios principales originados desde la base de la hoja. Normalmente se forman con 5 a 7 lóbulos acuminados, pocos profundos y grandes, con pecíolos largos de 10 a 15 cm. El haz de color verde claro con nervios mediales y secundarios de color amarillo que están ligeramente unidos. El envés es de color verde opaco con los nervios mediales y secundarios muy pronunciados [36], [37], [38].



Figura 1. 2 Planta de *Jatropha curcas*. (Foto proporcionada por: GeMBio-CICY).

1.2.1.2 Flor

Las flores son actinomorfas y dispuestas en racimos (Figura 1.3), constan de 5 sépalos, de 5-7 mm de largo, corola de color amarillo verdoso, campanulada, los pétalos de 0.5-1 cm de largo; 10 estambres unidos en la base (con algunos abortivos), los filamentos delgados, las anteras ditécicas, con dehiscencia longitudinal, 5 nectarios presentes a un costado de la inserción de los estambres, ovario súpero, trilocular con una placentación axilar, el estilo concrecente, el estigma dividido en seis partes [4].



Figura 1. 3 Inflorescencia de *Jatropha curcas*.

Las inflorescencias se forman en ramas terminales y presentan flores masculinas y femeninas en la misma inflorescencia, [4]. Normalmente una flor femenina está rodeada por un grupo de las flores masculinas, ambas pequeñas. Las flores masculinas se abren por un período de 8-10 días. Las flores femeninas abren solamente 2-4 días y puede haber flores bisexuales que abren, pero raramente el ovario es funcional. Después de la fertilización de los óvulos, los sépalos y los pétalos de las flores femeninas se agrandan gradualmente y protegen de las condiciones ambientales al embrión. Cada inflorescencia muestra un racimo de aproximadamente 5-10 frutos [36], [38].

1.2.1.3 Fruto

El fruto es una drupa oval, de 4 a 5 cm de largo y 3 a 4 cm de ancho. Inicialmente es de color verde (estado inmaduro), pasando a amarillo, luego a café y por fin negro, cuando alcanza el estado de maduración (Figura 1.4). Para el desarrollo del fruto se necesitan 90 días desde la floración hasta la madurez. El fruto es trilocular con una semilla en cada cavidad, aunque a veces se puede encontrar hasta 4 o 5 [36], [38].



Figura 1. 4 Frutos de *Jatropha curcas*

1.2.1.4 Semillas

Las semillas contienen distintos componentes tóxicos (ésteres de forbol, curcin, inhibidores de tripsina, lectinas y fitatos). Las semillas consisten en una cáscara dura que representa alrededor del 37% en peso del total y un grano blanco y suave al interior que representa el 63% restante. Las semillas secas tienen un contenido de humedad de alrededor del 7% y presentan un rango de 32 a 40% de aceite, contenido en su interior [37].

La semilla del piñón es elíptica, de color negro, de 2 cm de largo en promedio x 1 cm de diámetro y 10 mm de espesor. Es de forma convexa en la parte dorsal y tectiforme en la ventral, presentando algunas líneas amarillentas, con una línea blanquecina apical, indicando la posición de la carúncula. Debajo del tegumento de la semilla existe una película que cubre al endospermo (almendra) que es abundante, blanco, oleaginoso y que contiene al embrión. El embrión está formado por cotiledones foliáceos, de 10-13 mm de longitud, de color blanco crema [36], [38]. Las dimensiones de las semillas varían en una misma planta y entre semillas de diferentes procedencias. De igual forma el peso varía entre los 0.5 y 0.8 gramos por semilla, en general se producen de una a tres por cápsula, con un promedio de 1333 semillas por kilogramo (Figura 1.4) [35], [39], [37].

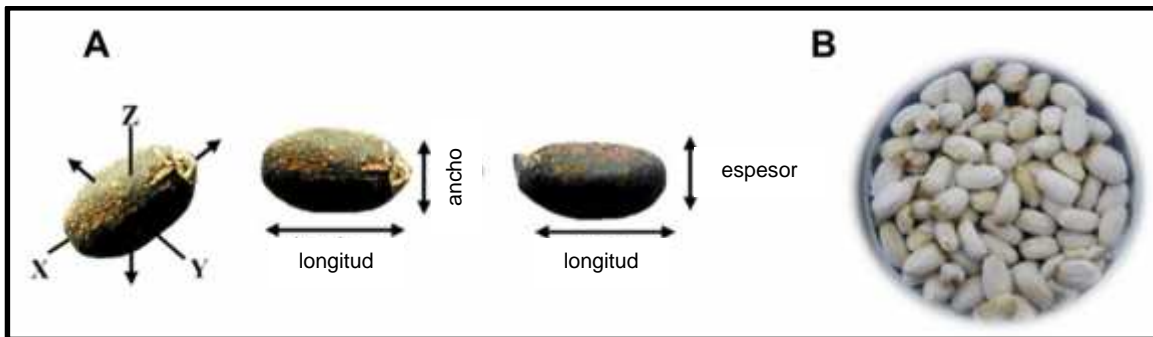


Figura 1. 5 Semillas de *Jatropha curcas*. a) Dimensiones de semillas del piñón, donde el eje X es la longitud, el eje Y es el ancho y el eje Z el espesor [40]; b) Semillas sin testa (almendras) [41].

1.2.1.5 Raíz

En general posee raíces cortas y poco ramificadas pero la forma de la raíz dependerá de la forma de propagación de la especie. Cuando las plántulas proceden de semilla, se forman cuatro raíces laterales (dos secundarias y dos terciarias), una raíz principal en el centro y abundantes raíces finas; y si las plántulas se originan de semilleros dispuestos en bolsas o tubos de plásticos, las raíces no crecen de forma normal. Éstas pueden formar algunos nodos, las raíces laterales llegan a presentar escamas y el desarrollo de raicillas es escaso, por lo que no pueden crecer tan profundamente [36], [38].

1.2.2 Distribución geográfica de *Jatropha curcas*

1.2.2.1 Distribución mundial de *Jatropha curcas*

El centro de origen de esta especie se encuentra en debate, sin embargo se considera que puede abarcar desde México hasta países de América Central (Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Panamá). También, al piñón se le ha registrado en el Caribe (Bahamas, Cuba, República Dominicana, Haití, Puerto Rico, etc), en países de Sudamérica (Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú y Venezuela) (Figura 1.5) [39], [4] y recientemente, se ha reportado en India, China, Tailandia y países

de África (Etiopía, Guinea, Madagascar, Mozambique, Nigeria y Egipto) (Figura 1.6) [42], [3], [43], [4].



Figura 1. 6 Distribución de *Jatropha curcas* en el continente americano y centro de origen propuesto [4].



Figura 1. 7 Distribución de *Jatropha curcas* en África y Asia [4].

1.2.2.2 Distribución de *Jatropha curcas* en la República Mexicana

En México, *J. curcas* se encuentra ampliamente distribuida en más de 15 estados, tales como Sonora, Sinaloa, San Luis Potosí, Guadalajara, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Yucatán, Quintana Roo, Veracruz, Tamaulipas, Puebla, Hidalgo y Morelos, donde se le conoce comúnmente como piñón, piñoncillo y como piñón mexicano. Se considera que México es el único país que cuenta de manera natural con variedades no tóxicas, las que se encuentran sólo en Puebla, Hidalgo y Veracruz (Figura 1.7) [44].



Figura 1. 8 Distribución de variedades de *Jatropha curcas* según su toxicidad en México. Variedades de no tóxicas (estados en amarillo) y tóxicas (estados en verde) [44].

1.2.3 Requerimientos ecológicos de *Jatropha curcas*

El piñón se adapta bien a condiciones áridas y semiáridas, crece casi en cualquier parte (en grava, arena y suelos salinos), excepto en tierras anegadas. Prefiere suelos aireados, bien drenados y con pH neutros (6.0-8.0). Las hojas que caen alrededor de la base de la planta durante el invierno y la actividad de las lombrices en el suelo, aumenta y mejora la fertilidad de la zona radicular. El piñón crece bien en los trópicos y subtropicos, incluso a temperaturas más bajas, soportando heladas ligeras. También puede crecer bajo una amplia gama de regímenes de lluvia que van desde los 250 mm a más de 1200 mm por año. En cuanto a la temperatura, *J. curcas* requiere un promedio anual de entre 18 °C y 28 °C, pero puede tolerar un promedio de temperatura máxima entre 35 °C y 45 °C [45], [46], [3].

1.2.4 Practicas agronómicas

Jatropha curcas es aún una planta semi domesticada. Sus propiedades agronómicas básicas no son del todo entendidas; se ha observado variabilidad en los rendimientos, lo que hace un poco previsible los de semilla. El piñón puede ser propagado por métodos vegetativos y por germinación (Tabla 1.2) [45]. Los árboles propagados por esquejes muestran una longevidad inferior y una baja resistencia a la sequía, si se comparan con plantas propagadas por semilla [4]. La baja resistencia a la sequía de los árboles propagados a partir de esquejes se explica debido a que no producen raíces pivotantes verdaderas sino pseudo raíces [3].

Tabla 1. 2 Descripción, ventajas y desventajas de los métodos de propagación de *J. curcas*.

Método	Descripción	Ventajas	Desventajas
Germinación directa	Secar las semillas por lo menos un mes Sembrar las semillas a 4-6 cm de profundidad	Método barato Produce plantas con raíz pivotante bien desarrollada	Baja tasa de sobrevivencia Crecimiento poco uniforme Productividad variable de la progenie Requerimiento de deshierbe Se depende de la temporada para el éxito del método (al comienzo de la temporada de lluvias)
Plántulas	Secar semillas por lo menos un mes Llenado de bolsas de plástico con suelo con altas concentraciones de materia orgánica ^a Sembrar semillas en bolsas de polietileno tres meses antes de la temporada de lluvias Riego hasta el trasplante Trasplantar las plántulas en hoyos de 20 cm de profundidad	Buena sobrevivencia de germinación Crecimiento uniforme de las plantas a través del control de humedad, sombra, suelo, arvenses, plagas y enfermedades	Altos costos Productividad variable de la progenie Inicialmente alto consumo de agua Las bolsas pueden entorpecer la formación normal del sistema radicular
Esquejes	Hacer cortes de al menos 30 cm de ramas más gruesas en la base de la planta Colocar directamente en suelos húmedos dejando 15 cm o más de la rama sobre el suelo Mantener el suelo regado Los primero brotes aparecen a las 3-4 semanas	Uniformidad genética Rápido establecimiento Rendimientos tempranos	Los esquejes no desarrollan una raíz pivotante verdadera: baja longevidad y baja resistencia a sequía y enfermedades Inicialmente alto consumo de agua

^a 1:1 Suelo franco arenoso-composta; 1:1:2 arena-suelo-composta; 1:1:1 arena-suelo-estiércol [45].

1.2.5 Usos y productos de *Jatropha curcas*

El piñón es considerado como un árbol de múltiples usos, con varios atributos que lo han hecho atractivo y motivo de investigación.

1.2.5.1 Mitigación de problemas ambientales

Jatropha curcas puede generar beneficios ambientales, como mejorar la calidad del suelo, prevenir la erosión, promueve la recuperación de tierras marginales y la remediación de suelos contaminados [47], [48], [49]. El piñón ha demostrado ser eficaz en la reducción de la erosión del suelo por el agua de lluvia. Esto es debido al desarrollo de una densa red de raíces finas cerca de la superficie, la cual se une al suelo, fija la tierra o piedras y previene de esa manera que el suelo sea lavado por fuertes lluvias. Por otra parte, las raíces cerca de la superficie reducen el escurrimiento del agua, lo que permite un mejor drenaje y favorece la absorción del agua. La estructura simétrica del sistema radicular juega un papel importante también para la estabilización de laderas y para el control de procesos de erosión [45], [46]. Se ha considerado a *J. curcas* para ser utilizada en fitorremediación debido a que es una especie de rápido crecimiento, con alta producción de biomasa, con un sistema radicular abundante, tolerante a condiciones adversas, no es comestible y beneficiosa económicamente [50]. En estudios realizados en condiciones de invernadero, donde se evaluaron los efectos de plomo y cadmio a concentraciones de 50 mg/Kg de suelo, se observó que no causaron efectos adversos en plantas de *J. curcas*, lo que la hace atractiva para procesos de fitorremediación [49].

También se ha demostrado que los suelos contaminados con metales pesados podrían ser restaurados mediante la plantación de *J. curcas* junto con una combinación de residuos orgánicos y biofertilizantes (*Azotobacter chroococcum*) [48].

1.2.5.2 Uso medicinal

Todas las partes del árbol de *J. curcas* (semillas, hojas y corteza, frescos o en cocción) han sido usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de varias enfermedades del hombre y animales (Tabla 1.3) [45], [50], [51], [52], [3], [53]. Algunos compuestos, como la curcaciclina A que presenta actividad antitumoral, ha sido encontrado en *Jatropha* [3].

También se ha observado que los extractos etanólicos de la hoja poseen actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y contra *Escherichia coli*. El látex del tallo es utilizado para controlar el sangrado de heridas, gracias a sus efectos coagulantes para tratar infecciones orales en niños, contra enfermedades de la piel y para curar llagas en el ganado; además se ha propuesto que el látex contenga alcaloides con actividad anticancerígena. Los extractos de la raíz de *Jatropha* ayudan a controlar el sangrado de las encías y probablemente contienen un antídoto contra veneno de serpiente; los extractos de semilla son usados como anticonceptivos o para inducir el aborto [45].

Tabla 1.3 Usos medicinales de *Jatropha curcas*.

Partes de la planta que se utilizan	Usos medicinales
Semillas	Gota, artritis, fracturas, quemaduras, cicatrización de heridas, purgante
Aceite de semilla	Eccema, enfermedades de la piel, para aliviar el dolor reumático, purgante
Tallo	Para dolor de dientes, inflamación y sangrado de encías, piorrea
Corteza del tallo	Para tratar enfermedades infecciosas, incluidas las de transmisión sexual
Savia	Enfermedades de la piel y mucosas
Extracto acuoso de ramas	VIH, tumores
Extracto de planta	Cicatrización de heridas, alergias, quemaduras, cortes, inflamaciones, lepra
Hojas y látex	Úlceras, moretones
Látex	Coagulación, dolor de boca, candidiasis oral, mordeduras de serpiente, heridas infectadas, dolor de garganta y boca
Raíz en polvo	Inflamación
Hoja	Sarna, eccema, sífilis, dolor de cabeza, gripe, tos, congestión
Fruto	Golpes, dolor de muelas, picadura de insecto

Fuente: [50]

1.2.5.3 Extracción de aceite

La producción de aceite a partir de semillas de *J. curcas* requiere varios pasos. Primero es el proceso de separar las semillas de la cáscara del fruto; segundo, quitar la testa de la semilla para separarla del endospermo (almendra) o se puede también optar por dejarla; tercero, extracción del aceite, donde además se genera la pasta de semilla como subproducto de la extracción; y por último, el proceso de limpieza del aceite para transformar el aceite crudo con impurezas, en aceite puro [45], [54]. Actualmente, se han identificado dos métodos para la extracción del aceite de las semillas: a) la extracción mecánica y b) la extracción química.

La extracción mecánica es llevada a cabo mediante prensas manuales, como la de pistón (Yenga o Bielenberg), para uso a pequeña escala, de 1-10 Kg de semilla/h, y la de tornillo (Sundhara expeller, Sayari expeller). En una prensa de tornillo, el tornillo gira en un cilindro de metal y amasa continuamente, transportándose las semillas desde un embudo, los rendimientos de aceite que se obtienen utilizando este tipo de maquinaria, a partir de 1000 Kg de semillas secas, es de alrededor de 220-260 L en 6-8 horas de trabajo, considerando que la eficiencia de extracción del aceite es de aproximadamente 75-80% [45].

La extracción química consiste en una extracción sólido-líquido, la cual implica la transferencia de una fracción soluble a partir de un material sólido a un disolvente líquido (con o sin enzima). Los principales métodos de extracción que se han estudiado y usado en semillas de *J. curcas* son: 1) extracción con *n*-hexano (95% de aceite), 2) extracción acuosa (40% de aceite), y 3) extracción enzimática acuosa (hemicelulasa, celulosa o proteasa alcalina) (70-80% de aceite). Los mayores rendimientos de aceite y con menor turbidez son las ventajas que se tienen extrayendo con disolventes, si lo comparamos con la extracción mecánica. La extracción con disolventes es rentable sólo en una producción a gran escala (arriba de 50 toneladas de aceite al día). Sin embargo, este método de extracción tiene un impacto negativo en el ambiente [45]. El aceite crudo de *J. curcas* contiene aproximadamente 45-55% de grasas crudas. El 14% de éstas son ácidos grasos libres, mientras que más del 60% son triglicéridos. El 70% de los triglicéridos son ácidos grasos insaturados y el 30% saturados. El 40% de ácidos grasos insaturados es el ácido oleico (18:1) y el 35% es el ácido linoleico (18:2); mientras que el 12% de los ácidos grasos saturados corresponden al ácido palmítico (16:0) y el 3% al ácido esteárico (18:0)

[44], [55]. La calidad del aceite puede deteriorarse si se maneja y almacena inapropiadamente, debido a varias reacciones químicas, tales como la hidrólisis, polimerización y la oxidación. El aceite debe ser almacenado en un lugar fresco (menos de 30 °C) y seco, evitando las variaciones de temperatura, la condensación de agua, exposición a la luz y al aire, y a las posibles sustancias volátiles gaseosas (como la gasolina). El contenedor de aceite preferentemente debe ser hermético y lleno hasta el máximo, con el fin de evitar la condensación de agua [45].

1.2.5.4 Generación de productos

En una plantación perenne de piñón, el rendimiento de fruto seco se incrementa en los primeros años y se estabiliza en aproximadamente de 12-13 toneladas por hectárea a partir del sexto hasta el vigésimo año. El rendimiento de semillas es del 70% de los frutos secos y de ese el 23% es de aceite. En algunas plantaciones, la densidad inicial es de 1 m x 1 m (10,000 árboles por hectárea) y para el segundo año se reduce a 2 m x 2 m (para favorecer la fotosíntesis). Para una plantación anual, se producen rendimientos de 7 toneladas de frutos y 24.5 toneladas de madera por hectárea [54].

La extracción del aceite de las semillas de *J. curcas*, genera también importantes subproductos, como las cáscaras del fruto, resultado del proceso de descortezado, que pueden ser utilizadas como materia prima en la producción de bioetanol. Otro subproducto de valor agregado son las testas de las semillas, generadas del proceso de descascarado, que pueden ser empleadas en la producción de pellets energéticos para sustituir al carbón y a la leña. Por otra parte, aproximadamente el 50-70% del peso original de la semilla, se mantiene en la pasta generada del proceso de prensado, ya mencionado anteriormente y que puede ser también utilizada para producir pellets [45].

1.2.5.5 Bioplaguicida

Similar a la composición de las semillas, el aceite de *J. curcas* contiene varios componentes tóxicos, como los ésteres de forbol, curcaínas e inhibidores de tripsina, lo que sin embargo, no provoca contaminación cuando se quema [45], [56]. El aceite o extractos del aceite pueden ser utilizados como bioplaguicidas, debido a la presencia de

agentes insecticidas, mulusquicidas, fungicidas y bactericidas. Se han evaluado fracciones ricas en ésteres de forbol, siendo éstas tóxicas para organismos modelo como *Physa fontinalis* (caracol), *Artemia salina* (artemia) y *Daphnia magna* (pulga de agua), con una concentración efectiva del 50% (CE₅₀) a las 48 h, de 0.33, 26.48 y 0.95 mg L⁻¹, respectivamente. También, estos ésteres se han evaluado en especies bacterianas como *Streptococcus pyogenes* y *Proteus mirabilis*, que muestran una alta susceptibilidad a una concentración de 250 mg L⁻¹; y en especies fúngicas, como *Fusarium* spp., *Aspergillus niger* y *Curvularia lunata* que presentan respectivamente una CE₅₀ de 58 mg L⁻¹ y de 70 mg L⁻¹ para las dos últimas especies [57].

1.2.6 Plagas y enfermedades en *Jatropha curcas*

En general se cree que *J. curcas* podría ser resistente al ataque de plagas y enfermedades, debido a su alto contenido de ésteres de forbol, principalmente en las semillas, pero no existe información disponible que confirme esta teoría [39]. Por otra parte, la resistencia que se ha reportado para *J. curcas* sólo se ha observado en individuos aislados [58]. Sin embargo, en estudios realizados en cultivos de variedades tóxicas y no tóxicas, se ha observado la presencia de insectos plaga como la chinche punto rojo (*Pachycoris klugii*) y chinche pata de hoja (*Leptoglossus zonatus*) [44], y de enfermedades ocasionadas por bacterias (*Xanthomonas* sp.) y por hongos (*Alternaria* sp. y *Colletotrichum* sp.) [45]. Recientemente se ha reportado a *Colletotrichum capsici*, como agente causal de la antracnosis de *J. curcas* en Yucatán, México, siendo los síntomas de la enfermedad necrosis foliar, cancro coronal y muerte apical de plántulas, tizón foliar y el 70% de defoliación [14]. A pesar que se han observado la presencia de todos esos agentes fitopatógenos en monocultivos de *J. curcas* en varias regiones del mundo (Tabla 1.4 y 1.5), la incidencia y severidad de los mismos en las plantaciones de varias regiones de la República Mexicana, incluyendo a la Península de Yucatán son aún desconocidas. De ahí la importancia de su estudio, ya podrían ocasionar grandes pérdidas de la materia prima destinada a la producción de biodiesel.

Tabla 1. 4 Plagas reportadas en cultivos de *Jatropha curcas*.

Plaga	Síntomas/Daños	Orden	Sitio	Referencia
<i>Agonosoma trilineatum</i> (chinche)	Se alimenta de las semillas	Hemiptera	-	[38]
<i>Hypselonotus intermedius</i> Distant	Se alimenta de las flores	Hemiptera		“
<i>Indarbela quadrinotata</i>	Barrenador de corteza	Lepidoptera		“
<i>Oxycetonia versicolor</i>	Daño en flor	Coleoptera		“
<i>Polyphagotarsonemus latus</i>	Daño en hoja y flor	Acari		“
<i>Scutellera nobilis</i>	Succiona la savia	Hemiptera		“
<i>Tetranychus bastosi</i>	Daño en hoja	Acari		“
<i>Proxis puntulatus</i> (chinche hedionda)	Succión de savia vegetal	Hemiptera	México	[27]
<i>Pachycoris klugii</i> (chinche punto rojo)	Daños en frutos de diferentes fases de desarrollo (aborto de los frutos)	Hemiptera	México	[7]
			Honduras	[30]
			Nicaragua	[12]
<i>Leptoglossus zonatus</i> (chinche pata de hojas)	Secado de las flores, malformación de la semilla y caída de fruto.	Hemiptera	México	[7]
			Honduras	[30]
			Nicaragua	[12]
<i>Pseudococcus</i> sp. (cochinilla harinosa)	Daños a los primordios foliares, aborto de flores.	Hemiptera	Honduras	[30]
<i>Bemisia tabaci</i> (mosquita blanca)	Trasmisor de virus	Hemiptera	Honduras	[30]

Tabla 1. 5 Enfermedades reportadas en cultivos de *Jatropha curcas*.

Enfermedad	Síntomas y daños	Reino/Virus	Sitio	Referencia
<i>Alternaria ricini</i>	Caída de yema y flor	Fungi	-	[38]
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Pudrición oscura en raíz	Fungi		
<i>Botrytis ricini</i>	Manchas negruzcas en fruto	Fungi		
<i>Cercospera</i> spp.	Manchas foliares	Fungi		
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Necrosis foliar	Fungi		
<i>Fusarium</i> spp.	Manchas foliares y pudrición en raíz	Fungi		
<i>Melampsora ricini</i>	Enfermedades de roya (defoliación)	Fungi		
<i>Phakopsora jatrophiicola</i>	"	Fungi		
<i>Rhizoctonia bataticola</i>	Pudrición en cuello	Fungi		
<i>Phytophthora</i> spp.	Pudrición en raíz	Protista		
<i>Dothiorella</i> sp.	Necrosis foliar	Fungi	México	[27]
<i>Alternaria</i> sp.	Necrosis foliar y madurez precoz en frutos	Fungi		
<i>Colletotrichum</i> sp. (antracnosis)	Necrosis foliar	Fungi		
<i>Colletotrichum capsici</i>	Necrosis foliar Cancro coronal y muerte apical de plántulas Tizón foliar Defoliación	Fungi	México	[13]
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Pudrición en cuello y raíz	Fungi	India Brasil	[14] [59]
<i>Xanthomonas pocks</i>	Necrosis foliar	Bacteria	-	[38]
<i>Xanthomonas ricinocota</i>	"	Bacteria		
<i>Xanthomonas</i> sp. (mancha angular del piñón)	Necrosis foliar	Bacteria	México	[27]
Genminivirus (mosaico amarillo)	Hojas cloróticas e interrupción del desarrollo	Virus	México	[27]
<i>Cassava mosaic virus</i> (Begomovirus)	Reducción de tamaño en hojas, y del crecimiento de las plantas	Virus	India	[17]
<i>Jatropha mosaic virus</i> (Begomovirus)	Reducción de tamaño en hojas, del crecimiento de plantas y deformaciones en las hojas	Virus	India	[60]

1.3 Justificación

Dada la importancia de *J. curcas* como fuente de materia prima para la producción de biodiesel, es necesario conocer aquellos factores fitosanitarios que puedan limitar potencialmente su producción de biomasa.

De igual manera, en un futuro es necesario generar programas de manejo para el control fitosanitario en *J. curcas*. Esto es relevante, ya que en plantaciones establecidas en la Península de Yucatán, no existen reportes sobre estrategias para su manejo fitosanitario.

1.4 Hipótesis

La disminución en la producción de biomasa de *Jatropha curcas* como materia prima para obtener biodiesel, está dada por la afectación ocasionada por las plagas y enfermedades presentes en el cultivo.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Determinar los principales fitopatógenos que afectan la producción de frutos en *Jatropha curcas* L.

1.4.2 Objetivos particulares

- Identificar a los hongos y bacterias asociados a lesiones en plantas de *Jatropha curcas* en un ciclo de producción.
- Determinar la frecuencia de hongos asociados a lesiones en diferentes tejidos de plantas de *J. curcas* en un ciclo de producción.
- Caracterizar por microscopía electrónica de barrido al agente causal de la roya en *J. curcas*.

CAPÍTULO 2.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

2.1 Estrategia experimental general

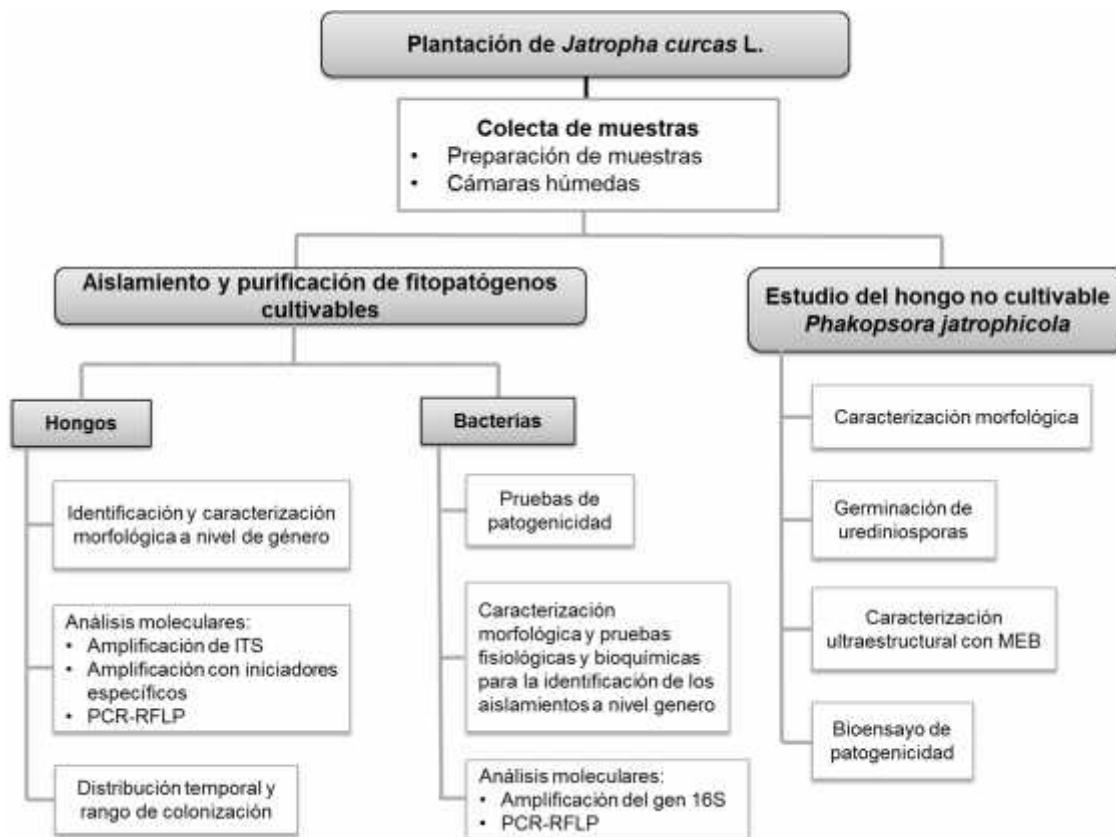


Figura 2. 1 Estrategia experimental para determinar los principales fitopatógenos que afectan la producción de *Jatropha curcas*.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Colecta de Muestras

La investigación se realizó en plantaciones de *Jatropha curcas*, ubicadas en cinco localidades del sureste de México, cuatro en el estado de Yucatán (Temozón Mérida, Conkal, Chablekal y Tizimín) (Figura 2.2) y una en Chiapas (Tuxtla Gutiérrez) a diferentes tiempos (de marzo 2013 a enero 2015).

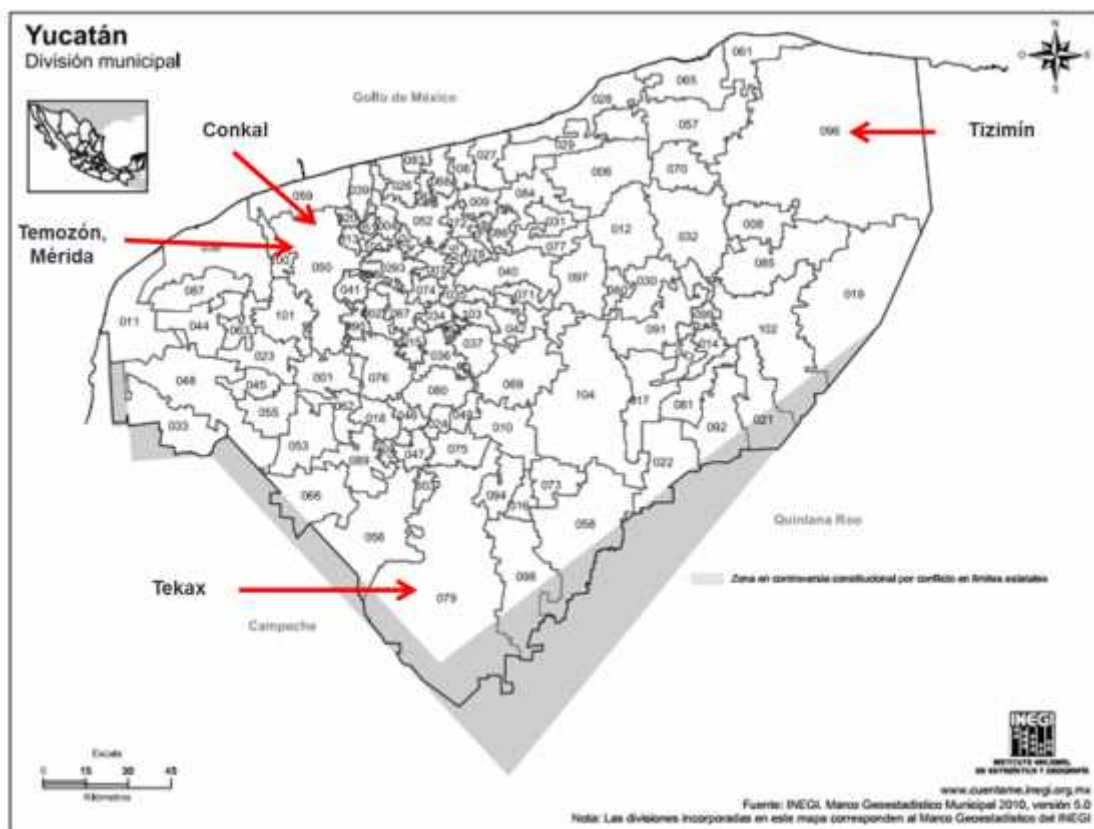


Figura 2. 2 Sitios de colecta en la Península de Yucatán, México, de muestras de *Jatropha curcas* con síntomas de enfermedad.

Se tomaron muestras de hojas, inflorescencias, frutos y/o tallos afectados, las cuales se colocaron en bolsas de plástico, se etiquetaron y se trasladaron al Laboratorio del Grupo

de Estudios Moleculares Aplicados a la Biología (GeMBio) del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) para su análisis.

Para el aislamiento de bacterias y hongos, los tejidos (hoja, inflorescencia, tallo y semilla) que se colectaron de plantas con síntomas de enfermedad, fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio al 2%, por un minuto y se enjuagaron con agua destilada. Posteriormente, los tejidos se cortaron en pequeñas porciones de aproximadamente 5 cm x 5 cm, se colocaron en cámaras húmedas, las cuales consistieron en placas de Petri de plástico que contenían papel filtro en el fondo, impregnado con agua destilada estéril, para conservar la humedad y se incubaron a 28 °C para favorecer el crecimiento de los microorganismos (Figura 2.3).

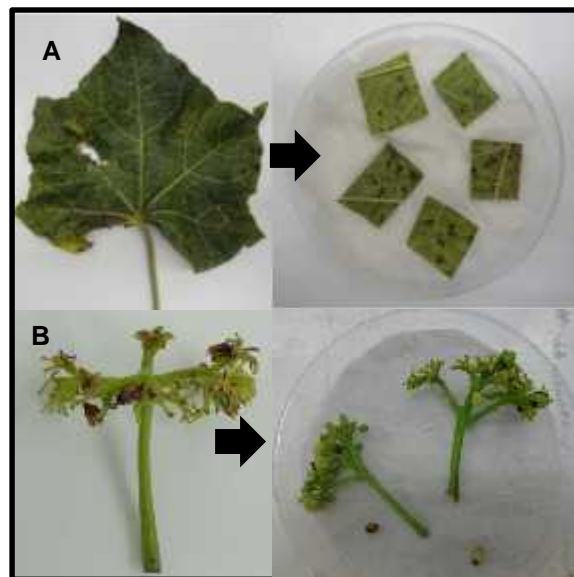


Figura 2. 3 Aislamientos de los patógenos cultivables de *Jatropha curcas* a) hojas y b) inflorescencias.

2.2.2 Aislamiento y purificación de fitopatógenos cultivables

Bacterias

El aislamiento, purificación e identificación morfológica y bioquímica de bacterias fitopatógenas, se llevó a cabo de acuerdo con las metodologías de los manuales de Schaad *et al.* (2001) [61] y Rodríguez, (2009) [62].

A las 48 horas de incubación de los tejidos (Figura 2.4), se sembraron en cajas con medio papa dextrosa agar (PDA, BD Bioxon™, México) por el método estría cruzada, los exudados presentes en las muestras.

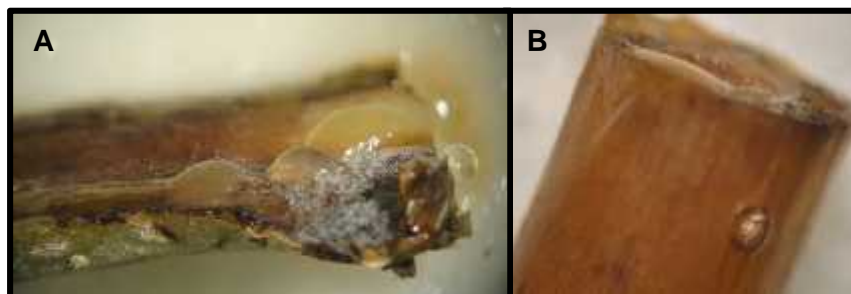


Figura 2. 4 Exudado bacteriano en tejidos de *Jatropha curcas*: a) Corte de ápice y b) Peciolo.

Para la obtención de cultivos puros, se utilizó la técnica de diluciones decimales seriadas. Para esto, se tomó una asada de cada crecimiento bacteriano y se depositó en un tubo con 5 mL de agua estéril [grado High-performance liquid chromatography (HPLC)]. Posteriormente, de cada tubo, se tomó un mililitro y se depositó en otro tubo que contenía 4 mL de agua HPLC estéril, y así sucesivamente hasta llegar a las diluciones 1×10^{-4} y 1×10^{-5} . Posteriormente de cada dilución se tomó una gota con un asa bacteriológica estéril, y sobre la superficie de una placa de NBY (Caldo nutritivo, Extracto de levadura, Agar, BD Bioxon™, México) se realizaron 5 estrías. Las cajas se incubaron a 28 ± 2 °C por 24-48 horas. Para la purificación de las cepas se realizaron subcultivos en medio NBY hasta la obtención de cultivos axénicos.

Hongos

Para el aislamiento de los hongos, se realizaron observaciones al microscopio a los 4 ó 5 días de incubación de las muestras en las cámaras húmedas, para verificar la presencia de los mismos y sembrarlos directamente en placas de papa dextrosa agar (PDA). La purificación se realizó mediante la técnica de punta de hifa. Posteriormente, los aislamientos obtenidos se mantuvieron en placas con PDA a 28 ± 2 °C.

2.2.3 Pruebas de patogenicidad

Bacterias

Para probar la patogenicidad de los aislados bacterianos obtenidos se utilizó la siguiente técnica:

Inyección de yemas axilares: Para esta metodología se preparó una suspensión de cada aislamiento bacteriano, mediante el estándar de turbidez de 0.5 de McFarland. Luego, con una jeringa de insulina estéril, se inyectaron 100 µL de cada suspensión a yemas axilares de *Jatropha curcas* y 100 µL de agua destilada estéril a una yema axilar, como testigo. La planta tratada se mantuvo a temperatura ambiente (20-28°C) (Figura 2.5) y fue monitoreada por 5-6 días posteriores a la inoculación. Si la zona inyectada presentaba necrosis, clorosis, pudrición o senescencia de la hoja, la prueba se consideró positiva [62].

Hongos

Las pruebas de patogenicidad de los principales hongos fitopatógenos aislados de *J. curcas*, relacionados con el presente estudio, fueron llevadas a cabo previamente por el grupo GeMBio del CICY [14], [63].

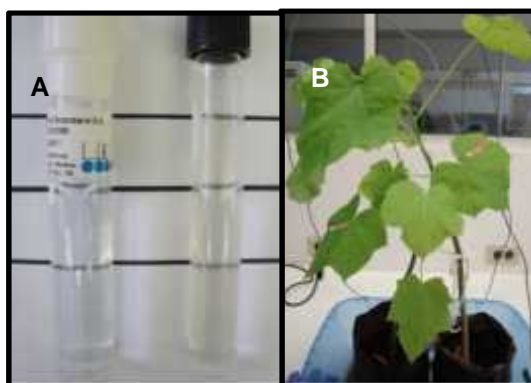


Figura 2. 5 Prueba de Koch de los aislados bacterianos: a) Ajuste de las suspensiones bacterianas mediante el estándar de turbidez 0.5 de McFarland; b) Inyección de yemas axilares de una planta de *Jatropha curcas* con los aislamientos bacterianos.

2.2.4 Pruebas fisiológicas y bioquímicas para caracterización de aislamientos bacterianos

Para la identificación a nivel género de los aislados bacterianos obtenidos se realizaron una serie de pruebas fisiológicas y bioquímicas, que se describen a continuación [61], [62].

Tinción de Gram: Esta prueba se llevó a cabo para la determinación de forma y agrupación de las bacterias, así como para separarlas en Gram negativas o Gram positivas. La prueba consistió en preparar un frotis de cada aislado con agua destilada estéril. Al frotis seco se le adicionó hasta inundar, la solución cristal violeta y se dejó actuar por un minuto. Posteriormente se decantó el colorante y se le adicionó la solución de Lugol durante un minuto. Luego se decantó el Lugol y se le adicionó la solución decolorante (acetona+isopropanol) hasta eliminar manchas del colorante. En seguida se adicionó la solución de safranina por un minuto; se realizaron enjuagues con agua destilada en cada etapa de tinción. Por último, se observaron al microscopio compuesto.

Prueba de metabolismo oxidativo y/o fermentativo de la glucosa: Para clasificar a las bacterias en oxidativas (aerobias) y/o fermentativas (anaerobias), con fines de

identificación, se utilizó el medio de Hugh y Leifson (peptona 2 g, NaCl 5 g, K_2HPO_4 0.3 g, agar 3 g, azul de bromotimol 0.0003 g, glucosa 10 g, agua destilada 1000 mL).

Se tomó una asada de cada aislado bacteriano y se sembró por picadura a dos tubos con medio Hugh y Leifson, procurando que el asa llegara al fondo del tubo. Posteriormente, a uno de los tubos se le adicionaron 2 mL de aceite mineral estéril. Como control se utilizó un tubo con medio sin inocular. Los tubos fueron incubados a 28 °C por 24-48 horas.

Morfología de las colonias bacterianas: Considerando que algunos medios de cultivo sirven para determinar el aspecto macroscópico de las colonias bacterianas, como color, forma, borde, elevación y aspecto o consistencia, se sembraron los aislamientos bacterianos en los siguientes medios:

Crecimiento en Caldo nutritivo, Extracto de levadura, Agar (NBY).

Este medio (NBY, BD Bioxon™) se utilizó para determinar la presencia de colonias amarillas. La formulación de dicho medio es: caldo nutritivo 8 g, extracto de levadura 2 g, K_2HPO_4 2 g, KH_2PO_4 0.5 g, agar 15 g, agua destilada 1000 mL; el medio se esterilizó a 121 °C con una presión de 20 libras por 15 minutos. Además se microfiltraron 5 mL de una solución de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 1M, los que se adicionaron asepticamente al medio ya estéril y con una temperatura de 40-45 °C.

Colonias mucoides en medio Extracto de levadura, Dextrosa, Carbonato de calcio (YDC).

Para determinar la consistencia de las colonias bacterianas se empleó este medio (YDC, BD Bioxon™). La formulación de dicho medio es: extracto de levadura 10 g, dextrosa 20 g, carbonato de calcio 20 g, agar 15 g, agua destilada 1000 mL; el medio se esterilizó a 121 °C con una presión de 20 libras por 15 minutos.

Posteriormente, se sembró una asada de cada uno de los aislados bacterianos por estría cruzada en una placa de YDC; las placas se incubaron a 30 °C por 24-48 horas, al cabo de las cuales se determinó la consistencia del cultivo con un asa.

Prueba de fluorescencia y de pigmentación difusible no fluorescente en medio B de King (KB): La formulación del medio KB es: proteasa peptona 20 gr, K_2HPO_4 1.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 g, glicerol 15 mL, agar 15 g, agua destilada 1000 mL; el medio se esterilizó a 121 °C con una presión de 20 libras por 15 minutos. Esta prueba sirvió para

observar, si las colonias bacterianas podían o no producir pigmentos fluorescentes difusibles o pigmentos difusibles no fluorescentes en el medio, al observar las placas bajo luz violeta con una longitud de onda de 365 nm; esto se realizó debido a que generalmente las especies que producen pigmentaciones fluorescentes pertenecen al género *Pseudomonas*.

Prueba de producción de ureasa: Dada la importancia taxonómica de esta prueba, se determinó si los aislados bacterianos producían esta enzima. Para ello, los aislados se crecieron en un medio rico en urea, el cual se preparó con $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaCl 5 g, extracto de levadura 0.01 g, rojo de Cresol 0.00016 g, urea 20 g, agua destilada 1000 mL. También, se preparó medio con todos los ingredientes mencionados con excepción de urea. Se dosificaron 5 mL del medio en tubos de ensayo y se esterizaron a 121 °C con una presión de 20 libras por 15 minutos. Una vez estériles los tubos se inocularon con una asada del cultivo bacteriano y se incubaron a 27 °C por siete días. El desdoblamiento de la urea del medio y la aparición de un color rojo magenta, indicó que la prueba era positiva.

Prueba de producción de citocromo oxidasa: Esta prueba se realizó para determinar, si los aislamientos bacterianos producen una enzima oxidasa en presencia de oxígeno atmosférico, citocromo C y un reactivo para oxidasa (N,N-dimetil-p-fenilendiamina). Las colonias bacterianas fueron crecidas en placas con medio KB, cuya composición ha sido anteriormente descrita.

Se preparó una solución acuosa al 1% de N,N-dimetil-p-fenilendiamina. Inmediatamente después y con la ayuda de un hisopo impregnado de la solución, se tomó una porción de crecimiento bacteriano desarrollado en la placa de KB. La prueba fue considerada positiva, si a los 10 segundos, el crecimiento bacteriano adquiría una coloración azul o morado intenso, y si no se presentaba dicha coloración a los 60 segundos la prueba fue considerada negativa.

Crecimiento a 28° y 40 °C en caldo NBY: Con esta prueba se determinó la temperatura óptima de crecimiento de los aislados bacterianos. Las bacterias se incubaron a 28° y 40 °C, en caldo NBY. La observación del incremento de sedimentación bacteriana se realizó a las 24 y a las 48 horas.

2.2.5 Caracterización morfológica e identificación a nivel de género de los aislados fúngicos

Discos de PDA con micelio (5 mm de diámetro) de cada aislado puro fue colocado en el centro de una placa de PDA y se incubó bajo las mismas condiciones que los cultivos iniciales. Los aislados fúngicos asociados de lesiones de *Jatropha curcas* se identificaron a nivel de género, de acuerdo con sus características fenotípicas, como apariencia de la colonia, color y textura del micelio, forma y color de conidios. Para examinar la morfología conidial, los aislamientos fueron subcultivados en PDA y se observaron al microscopio en preparaciones semipermanentes, teñidas con azul de lactofenol. Su identificación se hizo con base en las claves de los tratados de Barnett y Hunter, (1998) [64] y Watanabe, (2002) [65].

2.2.6. Análisis moleculares

2.2.6.1 Extracción de ADN genómico

Para el aislamiento del ADN genómico se incrementó la biomasa de los aislados bacterianos en NBY incubado a 28 ± 2 °C) y de los fúngicos en PDA a 25 °C.

En el caso de bacterias, se tomó una asada bien cargada de biomasa bacteriana, que se resuspendió en tubos Eppendorf de 1.5 mL, que contenían 1 mL de agua ultra pura estéril, los que se conservaron a -80 °C. En condiciones de laboratorio, se tomaron 200 µL de cada suspensión bacteriana y se mezclaron con 500 µL de agua ultrapura estéril en nuevos tubos Eppendorf de 1.5 mL. La suspensión se agitó vigorosamente en el vórtex y posteriormente los tubos se congelaron a -80 °C por 10 minutos y se descongeló a 65 °C por tres minutos. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado. Los tubos se agitaron nuevamente en vórtex a máxima velocidad por tres minutos. Se transfirieron 300 µL de cada suspensión a tubos Eppendorf nuevos de 2 mL.

En el caso de hongos, se tomó el micelio de cada aislado desde la placa de PDA con la ayuda de una hoja de bisturí y se depositó en tubos Eppendorf de 2 mL, para posteriormente congelar a -80 °C. Posteriormente el micelio fue macerado en morteros estériles.

En ambos casos la obtención del ADN se realizó de acuerdo con el protocolo de Tapia-Tussell *et al.* (2006) [66]. A cada tubo se le añadieron 800 μ L del buffer de lisis dodecilsulfato de sodio (SDS) y 15 μ L de RNasa A (Invitrogen, EU) (10 mg/mL), y se mezcló vigorosamente en vórtex. En seguida el tubo se incubó a 65 °C durante 30 minutos, con inversión ocasional y se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente (TA). Posteriormente a cada tubo se añadieron 700 μ L de cloroformo- isoamílico y se mezclaron suavemente por inversión durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm (15682 x g) por 10 minutos a TA. El sobrenadante (aproximadamente 800 μ L) se transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 mL y se adicionaron 800 μ L de isopropanol frío. Se mezcló suavemente mediante inversión y se incubó a -20 °C por 10 minutos. Se centrifugó a 13000 rpm (15682 x g) por 10 minutos a TA. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 μ L de etanol al 70%. Por último, la pastilla se secó bajo centrifugación al vacío por 10 minutos y se resuspendió en 50 μ L de agua ultrapura estéril [66].

La concentración y la pureza del ADN extraído se determinaron mediante un biofotómetro (Eppendorf, CTR Scientific), con un factor de dilución de 3 μ L de muestra más 500 μ L de agua ultrapura. Las lecturas de cada muestra se realizaron por triplicado. Posteriormente se prepararon las diluciones de ADN a 20 ng/ μ L [67].

Para determinar la calidad e integridad del ADN se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE [Tris–borato (0.9 M)–EDTA (20 mM)], a 90 V por 30 minutos. El gel se tiñó previamente con bromuro de etidio (10 μ g/mL) y se visualizó en un fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (BIO-RAD).

2.2.6.2 Identificación de los fitopatógenos por secuenciación de regiones génicas

Amplificación del gen 16S ADNr

Se amplificó el ADN extraído de los aislados bacterianos utilizando los iniciadores específicos 16SS y 16SR de la región conservada del gen 16S ADNr [68]. La mezcla de reacción contuvo 1X de amortiguador para PCR (Promega, EU), 0.2 mM de dNTPs, 1.5

mM de MgCl₂ (Promega, EU), 1 μM de cada iniciador, 1 U de Go Taq Flexi DNA polimerasa (Promega, EU) y 50 ng de ADN en un volumen final de 50 μL.

La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp 9700 (Perkin-Elmer), con un programa que consistió de un primer paso de desnaturalización a 94 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 59 °C y 1 minuto a 72 °C, y un paso final de extensión de 10 minutos a 72 °C [68].

El producto de amplificación obtenido se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa (Invitrogen, EU) al 1.5 % (p/v) en amortiguador TBE 1 X (Tris-borato- EDTA), a 100 V por 40 minutos. El gel se tiñó previamente con bromuro de etidio. Se utilizó como marcador de peso molecular la escalera de 100 Kb. El gel se visualizó en un fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (BIO-RAD).

La cuantificación del producto de PCR, se llevó a cabo en un espectrofotómetro, con un factor de dilución de 3 μL de producto más 300 μL de agua ultrapura [67]. Posteriormente se prepararon diluciones del producto a 100 ng/μL, para un análisis de restricción.

Amplificación de la región ITS

Se amplificó el ADN extraído de las muestras fúngicas utilizando los iniciadores universales ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') [69]. La reacción de PCR se realizó en 25 μL de volumen de reacción, conteniendo 20 ng de ADN, 1X de amortiguador para PCR (Invitrogen, EU), 0.20 mM de cada dNTP (Invitrogen, EU), 1.5 mM de MgCl₂, 1 pmol de cada iniciador y 1U de Taq polimerasa (Invitrogen, EU). La amplificación se realizó en un termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (BIO-RAD) y la reacción consistió de en un primer paso de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 58 °C y 1 minuto a 72 °C, y un paso final de extensión de 7 minutos a 72 °C [70]. El producto de amplificación obtenido se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa y se cuantificó en un espectrofotómetro. Los productos de PCR obtenidos, fueron enviados a Macrogen Inc. (Corea). Las secuencias obtenidas fueron procesadas con el programa BioEdit Sequence Alignment [71] y comparadas contra la base de datos GenBank del NCBI usando un BLAST [72], lo cual sirvió para identificar a los aislados colectados.

La relación filogenética entre las especies fue analizada usando el software Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) versión 6.06 [73] donde se realizó un análisis de agrupamiento con el método Neighbour-Joining y UPGMA para la construcción de un árbol filogenético y estimar la distancia evolutiva [74][75]. Para estimar la robustez de la relación filogenética se realizó un análisis de Bootstrap usando 1000 réplicas [76]. Se utilizó como grupo externo a *T. hirsuta* (GQ280373.1).

2.2.6.3 Identificación de hongos con iniciadores especie-específicos

La identificación molecular se llevó a cabo utilizando los iniciadores específicos Cglnt e ITS4 para *Colletotrichum gloeosporioides* [77] y los específicos CcapF y CcapR para *Colletotrichum truncatum* [70]. Se utilizaron como controles positivos dos aislamientos de referencia (*C. truncatum* ATCC 48574 and *C. gloeosporioides* JG15).

La reacción de PCR se realizó en un volumen de reacción de 25 µl, conteniendo 20 ng de ADN, 1X de amortiguador para PCR (10x: 200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4; Invitrogen), 0.20 mM de cada dNTP (Invitrogen, EU), 2.5 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada iniciador y 1U de Taq polimerasa (Invitrogen, EU). La amplificación se realizó en un termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (BIO-RAD) y consistió en un primer paso de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, seguido por 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 62 °C y 2 minutos a 72 °C, y un paso final de extensión de 7 minutos a 72 °C [78]. El producto de amplificación obtenido se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa y se cuantificó en un espectrofotómetro.

2.2.6.4 Perfiles de restricción por PCR-RFLP

Aislamientos bacterianos

Los productos de amplificación del gen 16S (alícuotas de 10 µL) de 4 cepas bacterianas identificadas molecularmente como *Sphingomonas* sp. (3 aislamientos) y *Burkholderia cepacia* (1 aislamiento), fueron digeridos con las enzimas de restricción *RsaI*, *HaeIII*, *AluI* y *EcoRI* en un volumen final de reacción de 20 µL. Cada enzima se utilizó según las especificaciones dadas por el proveedor (Invitrogen, EU). Los productos de digestión fueron separados en un gel de agarosa al 2 % (NuSieves 3:1) en buffer TBE 1X y preteñido con bromuro de etidio. Los patrones de digestión fueron visualizados y analizados en un fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (BIO-RAD) [79].

Aislamientos fúngicos

Los productos de amplificación del gen 5.8S y la región ITS (alícuotas de 10 µL) de 13 cepas seleccionadas e identificadas morfológicamente como *Corynespora* sp, *Alternaria* sp, *Lasioidipodia* sp, *Fusarium* sp y las cepas control *Corynespora casicola*, *Alternaria alternata* y *Lasioidipodia theobromae*, fueron digeridos con las enzimas de restricción *HinfI* y *RsaI*; y 10 cepas (incluyendo las cepas control *Fusarium fujikuroi* y *Fusarium equiseti*) fueron digeridas con las enzimas de restricción *HinfI* y *HpaII* en un volumen de 20 µL [79]. Los productos de digestión fueron separados, visualizados y analizados como previamente se ha descrito.

2.2.7 Estudio del hongo no cultivable *Phakopsora jatrophiicola*

2.2.7.1 Caracterización morfológica

La descripción morfológica del hongo, se llevó a cabo, mediante la elaboración de preparaciones permanentes con anillos de cera en glicerina, con cortes transversales de las estructuras observadas en la superficie abaxial de las hojas. Con un microscopio de luz (Zeiss, Axiostar plus) a una magnificación de 40X, se hizo un análisis morfométrico de 33 uredios, 60 urediniosporas, 13 paráfisis uredinales, 33 telios y 23 teliosporas,

seleccionadas al azar. La identificación del hongo a nivel género y especie se realizó con el uso de claves especializadas [80], [81].

2.2.7.2 Germinación de urediniosporas

El porcentaje de germinación de las urediniosporas de *P. jatrophiicola* se evaluó mediante la metodología reportada para *Phakopsora pachyrhizi* [82]. Con la ayuda de una aguja estéril, se colectaron las esporas de hojas con síntoma de roya y se depositaron en tubos Eppendorf (1 mg/tubo) que contenían 1 mL de agua destilada estéril y Tween 20 al 0.01%. Las esporas se incubaron a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo 12 horas luz/ 12 horas oscuridad. La germinación de las esporas se evaluó a las 12, 24, 36, 48, 72 y 96 horas, y se determinó el porcentaje de esporas germinadas. Para cada evaluación, la suspensión de esporas se homogeneizó y tres submuestras de 20 μL fueron tomadas desde el tubo de microcentrífuga y se examinó al microscopio de luz. El porcentaje de esporas germinadas se determinó con base en el número total de esporas germinadas en relación al total de esporas contadas en por lo menos 24 campos de la cámara de Neubauer (a 40X de magnificación). El porcentaje de germinación en cada tiempo de evaluación fue el promedio de tres réplicas.

2.2.7.3 Caracterización ultraestructural con microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las muestras seleccionadas fueron examinadas por MEB (Jeol, Jsm-6360LV). Para este propósito, el material vegetal con roya fue cortado con un bisturí en segmentos de 5 x 5 mm. Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5 % en un buffer de fosfato de sodio al 0.02 M (pH 7.1) por 48 horas (24 h a temperatura ambiente y 24 h a 4°C). Posteriormente, se realizaron seis lavados con la solución reguladora de fosfato de sodio (0.02 M) de a 30 minutos a 4°C . Las muestras se deshidrataron gradualmente con soluciones de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 85, 95 y 100% (v/v), con dos lavados de 30 minutos. Para el análisis MEB, las muestras se secaron a punto crítico con CO_2 después de la fijación y deshidratación. Finalmente, las muestras se montaron en películas de carbón y se recubrieron con oro de 15 nm. El análisis MEB se llevó a cabo usando un voltaje de aceleración de 20 kV [83].

2.2.7.4 Bioensayo de patogenicidad de *Phakopsora jatrophiicola* en *Jatropha curcas*

Cuarenta semillas de *J. curcas* fueron embebidas por 24 horas en el fungicida Eminence (sustancia activa Procloraz) a concentración de 1ml/L, posteriormente fueron escarificadas para promover su germinación y se colocaron en bandejas con algodón húmedo estéril, y se incubaron a 25 °C en oscuridad por tres días. Las plántulas de piñón obtenidas, se colocaron en bolsas con sustrato estéril y se crecieron bajo condiciones controladas en un invernadero con el propósito de obtener plantas sanas.

La infectividad de las esporas de *P. jatrophiicola*, fue evaluada usando un bioensayo *in vitro* bajo condiciones controladas, utilizando y modificando la metodología reportada por Park *et al.*, 2008 [82]. De hojas con síntomas de roya, se colectaron urediniosporas con la ayuda de una aguja estéril y fueron resuspendidas en agua desionizada estéril con Tween 20 al 0.01%. La concentración de esporas fue determinada utilizando una cámara de Neubauer y ajustada a 1×10^5 esporas/mL. El inóculo (200 μ L) con 20,000 esporas, fue aplicado de manera uniforme en la superficie adaxial de hojas individuales sanas de *J. curcas*, colectadas de plantas del invernadero. Las hojas previamente se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto y se lavaron tres veces con agua desionizada conteniendo Tween 20 al 0.01% y finalmente se dejaron secar sobre papel estraza estéril bajo el aire de una campana de flujo laminar. Las hojas inoculadas, se colocaron con la parte adaxial hacia arriba sobre papel filtro humedecido con agua destilada y colocado en el fondo de cajas Petri de vidrio (todo en condiciones de esterilidad). Las hojas inoculadas fueron incubadas a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con fotoperiodo de 12 horas.

La formación de pústulas fue determinada por inspección visual diaria. El porcentaje de humedad (75%) dentro de las cajas, se mantuvo mediante la adición de 4 mL de agua desionizada estéril cada 7 días. El rango de infección se determinó por el porcentaje de hojas con pústulas visibles contra el número total de hojas inoculadas. La densidad de pústulas se determinó por el número promedio de pústulas por hoja, 13 días después de la inoculación. El experimento se llevó a cabo por duplicado con cuatro réplicas cada uno. Cada réplica consistió de 24 hojas individuales de *J. curcas*, la mitad de ellas fueron inoculadas con urediniosporas y la otra mitad con el agua que contenía el Tween 20 al

0.01%. Se combinaron los datos de dos experimentos repetidos y de las cuatro replicas para calcular el promedio de la densidad de las pústulas.

2.2.8. Distribución temporal y rango de colonización de los hongos asociados a lesiones en *Jatropha curcas*

Se determinó la frecuencia de colonización (%) de hongos asociados a lesiones de diferentes tejidos (hoja, inflorescencia, fruto y tallo) de plantas de *J. curcas*. Esta frecuencia se estimó considerando el número de órganos de la planta colonizados por un solo patógeno, dividido por el número total de órganos observados por 100 [84]. También, se analizó la frecuencia de infección de las especies fitopatógenas obtenidas de los tejidos de piñón durante el estudio (3 años).

CAPÍTULO 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento y purificación de fitopatógenos cultivables

3.2 Bacterias

De tejidos de *J. curcas* con síntomas de enfermedad, se obtuvieron un total de cuatro aislamientos bacterianos puros (1aj-A, 1aj-B, 3aj y 4aj). Estos resultaron ser bacilos Gram negativos (Figura 3.1). Los aislamientos fueron conservados en crioviales con medio NBY y glicerol (1:1) a -80 °C.

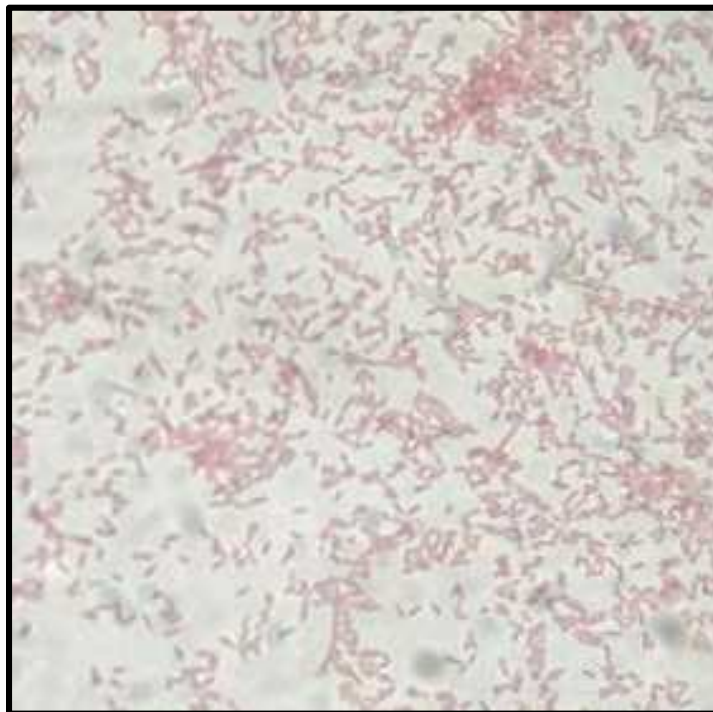


Figura 3. 1 Prueba de tinción de Gram de los aislados bacterianos: cepa bacteriana 1aj-A, la coloración rosa indica que la bacteria es Gram negativa (-).

3.3 Pruebas de Koch de los aislamientos bacterianos

A los seis días de la inyección axilar de los aislamientos bacterianos 1aj-B, 3aj y 4aj ocasionaron clorosis en las hojas y provocaron la senescencia de las mismas, por lo que se consideró positiva la prueba de patogenicidad. Se observó además que la cepa 1aj-A no ocasionó daño alguno a la hoja, manteniéndose igual a la hoja testigo (Figura 3.2). Al final del experimento, se logró reaislar a las cepas bacterianas 1aj-A, 3aj y 4aj.

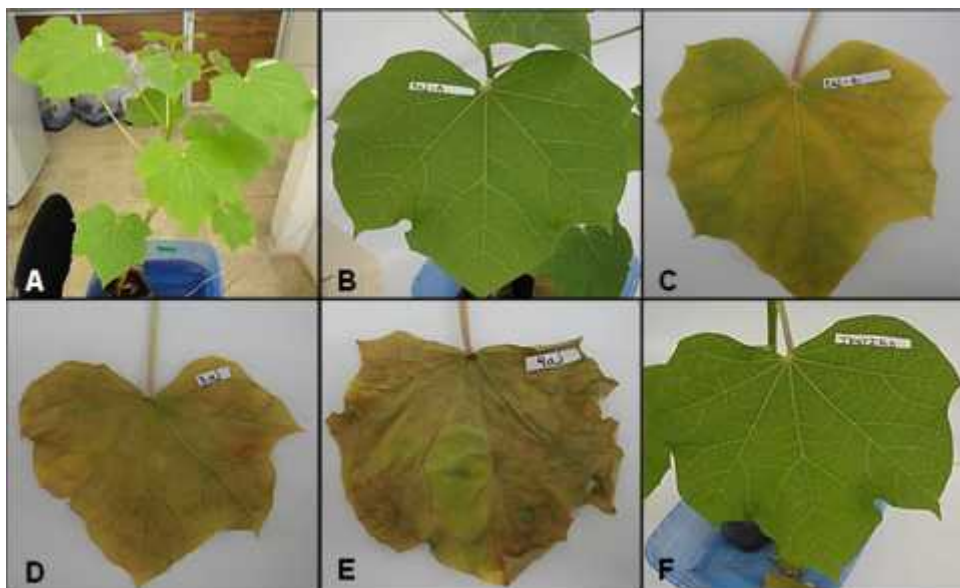


Figura 3. 2 Prueba de patogenicidad (Koch) por inyección axilar de los aislamientos bacterianos en *Jatropha curcas*: A) Unidad experimental; B) 1aj-A; C) 1aj-B; D) 3aj; E) 4aj; F) Testigo.

3.4 Pruebas fisiológicas y bioquímicas para caracterización a nivel género de los aislados bacterianos

Los aislamientos bacterianos 1aj-A, 1aj-B y 4aj, formaron colonias de color amarillo intenso brillante. Estas colonias presentaron una elevación convexa, bordes lisos y una consistencia mucoide. El aislamiento bacteriano 3aj, formó colonias de color blanco a blanco grisáceo, convexas, de bordes lisos y consistencia fluida (Figura 3.3).

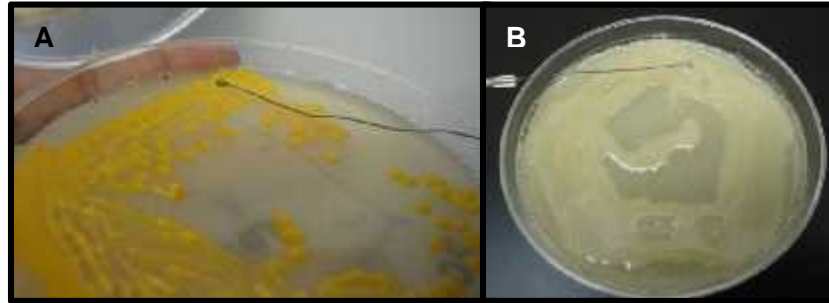


Figura 3. 3 Crecimiento de los aislados bacterianos: a) Colonias amarillas del aislado 1aj-A); b) Colonias blancas del aislado 3aj.

Ninguno de los aislamientos produjo pigmentación fluorescente bajo luz ultravioleta, ni pigmentos difusibles no fluorescentes. Fueron de metabolismo oxidativo y resultaron negativos a la prueba de la ureasa. Únicamente el aislamiento 3aj, fue positivo a la prueba de producción de citocromo oxidasa, ya que a los 10 segundos de exposición a la solución N,N-dimetil-p-fenilendiamina, se observó una coloración azul intensa (Figura 3.4). Los aislamientos 1aj-A y 1aj-B, tuvieron un crecimiento óptimo a 28 °C y a 40 °C no se observó crecimiento alguno en ambos aislamientos. Las colonias 3aj y 4aj tuvieron un crecimiento óptimo a los 28 y 40 °C.



Figura 3. 4 Prueba de producción de citocromo oxidasa: a) Exposición a N,N-dimetil-p-fenilendiamina, sin cambio de coloración en el aislado 1aj-A); b) Prueba de citocromo oxidasa positiva para el aislado 3aj.

3.5 Caracterización morfológica e identificación a nivel de género de los aislados fúngicos

Un total de 97 aislamientos fueron obtenidos de plantas de *J. curcas* de diferentes regiones de la Península de Yucatán, México; 15 de ellos fueron morfológicamente diferentes. En la figura 3.5 se pueden observar las diferencias morfológicas encontradas en cuanto a color, forma y el margen de las colonias. Las diferencias fenotípicas entre los aislamientos se presentan en la Tabla 3.1. De acuerdo a las características de cultivo y de las esporas observadas, los aislamientos se separaron en 10 géneros.

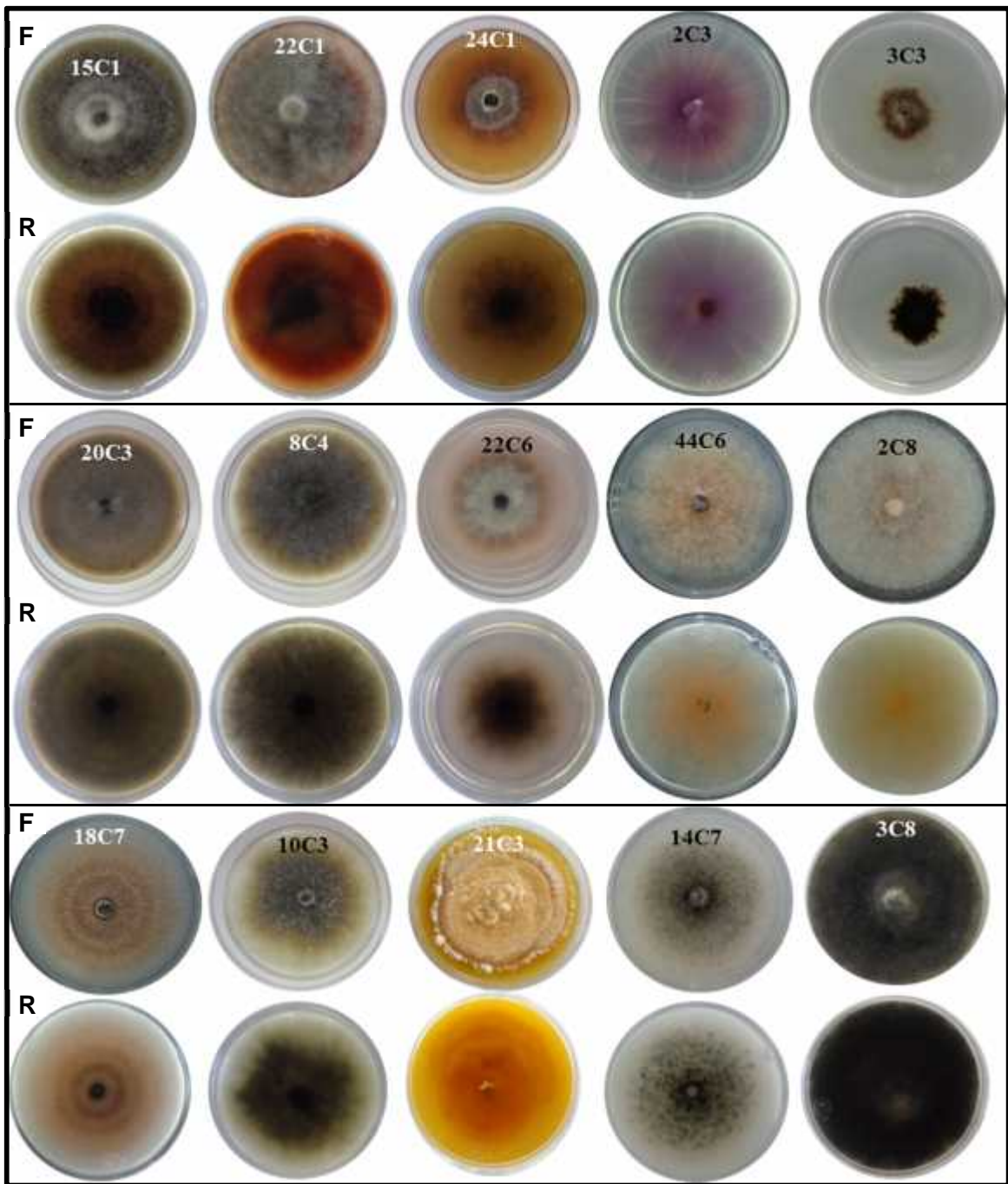


Figura 3. 5 Colonias de los aislamientos fúngicos obtenidos de *J. curcas* crecidos en PDA. F: frente, R: reverso.

Tabla 3. 1 Características fenotípicas de los aislados fúngicos obtenidos de plantas de *Jatropha curcas*

Aislamiento	Apariencia de colonia			Espora	
	Forma	Margen	Color	Forma	Color
15C1	Circular	Entero	Gris pálido a café, anillos concéntricos	Elipsoidal	Café
22C1	Circular	Entero	Gris a café rojizo	Ligeramente curvadas y rectas, elipsoidal	Café a café oscuro
24C1	Circular	Rizoide	Café pálido a café	Elipsoidal a cilíndrica, muriforme	Café claro
2C3	Rizoide	Rizoide	Blanco a púrpura claro	Curvada	Hialino
3C3	Irregular	Irregular	Café claro a oscuro	-	-
10C3	Irregular	Irregular	Café a café oscuro	Elipsoidal	Hialino
20C3	Circular	Entero	Café a gris	Curvada	Café claro a café
8C4	Circular	Entero	Café oscuro a gris	-	-
22C6	Circular	Entero	Café a gris claro	Larga cilíndrica	Café pálido
14C7	Circular	Entero	Naranja pálido a negro	Cilíndrica	Hialino
44C6	Irregular	Lobulado	Naranja claro	Falcada	Hialino
2C8	Circular	Entero	Naranja pálido	Curvada	Hialino
3C8	Circular	Entero	Negro	Elipsoidal	Café oscuro
21C3	Irregular	Irregular	Blanco a naranja, anillos concéntricos	Fusiforme con 4 septos	Células basales hialinas y tres células medias café
18C7	Circular	Entero	Naranja a café claro, anillos concéntricos	Cilíndrica	Hialino

El aislado 22C1 identificado como *Bipolaris* sp, presentó un micelio algodonoso, no aéreo de color gris a café rojizo. Mientras que la cepa 24C1 identificada como *Alternaria* sp mostró un micelio no aéreo, de color café pálido a café. Los aislados 2C3 y 2C8 se clasificaron como pertenecientes al género *Fusarium*, el aislado 2C3 presentó un micelio no aéreo, de color blanco a púrpura claro. También se observó la excreción de un pigmento púrpura difusible en el medio (Figura 3.5). Mientras que el aislado 2C8 mostró un micelio aéreo flocoso, denso, de color naranja pálido.

Los aislados 15C1, 3C3 y 20C3 se clasificaron como del género *Curvularia*, el 15C1 mostró un micelio algodonoso no aéreo, de color gris pálido a café formando anillos concéntricos. La cepa 3C3 presentó un micelio no aéreo de color café claro a café, y 20C3 desarrolló un micelio abundante de color café a gris. El aislado 10C3, mostró un micelio no aéreo, café a café oscuro y fue identificado como *Diaporthe* sp. La cepa 8C4 fue identificada como *Exserohilum* sp, sus colonias mostraron un micelio algodonoso y no aéreo de color café oscuro a gris. *Corynespora* sp (22C6) presentó un micelio algodonoso y aéreo de color café a gris claro. Por otra parte, tres aislados (44C6, 14C7 y 18C7) pertenecieron al género *Colletotrichum*. Las colonias del aislado 44C6 mostraron un micelio algodonoso de color naranja claro y el aislado 14C7 presento un micelio no aéreo de color naranja pálido a negro, y el aislado 18C7 desarrolló un micelio no aéreo de color naranja a café claro, formando anillos concéntricos. Por último, *Lasiodiplodia* sp (3C8) presentó un micelio algodonoso, aéreo, de color negro y *Pestalotiopsis* sp (21C3) mostró un micelio no aéreo de color blanco a naranja, con anillos concéntricos. En general, los aislados formaron esporas hialinas o cafés, con diferentes formas (Tabla 3.1).

3.5 Análisis moleculares

3.5.1 Identificación de fitopatógenos por secuenciación de regiones génicas

Bacterias

Se obtuvo el ADN genómico de los cuatro aislados obtenidos a partir de tejidos con síntomas de enfermedad en plantas de *J. curcas* y de los tres reisolamientos de la prueba de patogenicidad en plantas de la misma especie.

Al amplificar el gen 16S del ADNr se observó un amplicon de 1300 pb aproximadamente (Figura 3.6).

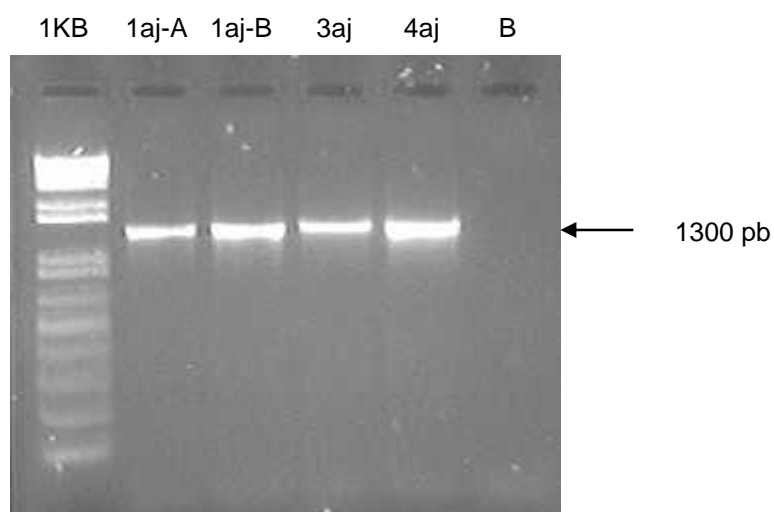


Figura 3. 6 Amplificación del gen 16S ADNr de las cepas bacterianas en *Jatropha curcas*.

Al comparar las secuencias obtenidas de las cepas bacterianas contra la base de datos GenBank del NCBI usando un BLAST, se identificaron los aislados 1aj-A, 1aj-B y 4aj como *Sphingomonas* spp. con un 98 % de similitud para los tres casos. El aislado 3aj correspondió a *Burkholderia cepacia* con un 98 % de similitud.

Hongos

La identificación molecular de los aislados fúngicos obtenidos a partir de tejidos dañados de plantas de *J. curcas* se presentan en la tabla 3.2.

Tabla 3. 2 Identificación molecular de los aislados fúngicos obtenidos a partir de tejidos dañados de plantas de *Jatropha curcas*.

Identificación molecular			
Aislamiento	GenBank (número de accesoión)	Identidad (%)	Especie
15C1	JQ783057.1	99	<i>Curvularia cymbopogonis</i>
22C1	JQ753977.1	100	<i>Bipolaris sorokiniana</i>
24C1	KJ735925.1	100	<i>Alternaria alternata</i>
2C3	KJ000444.1	99	<i>Fusarium fujikuroi</i>
3C3	HF934922.1	100	<i>Curvularia akaii</i>
10C3	GU066637.1	99	<i>Diaporthe phaseolorum</i>
20C3	HQ607991.1	100	<i>Curvularia lunata</i>
8C4	KJ830934.1	100	<i>Exserohilum rostrata</i>
22C6	-	-	<i>Corynespora cassiicola</i>
14C7	KF053199.1	99	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
44C6	KP784422.1	100	<i>Colletotrichum truncatum</i>
2C8	KJ018790.1	99	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>
3C8	KF294006.1	99	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
21C3	JN943634.1	100	<i>Pestalotiopsis clavispora</i>
18C7	HM163183.1	99	<i>Colletotrichum magnum</i>

La identificación taxonómica de los aislados fúngicos se realizó con un porcentaje de identidad de 97-100 % después de compararlas con las secuencias del GenBank (Tabla 3.2). Basados en las secuencias de la región ITS del ADNr, 37 aislados fúngicos fueron identificados como *Fusarium* spp. y otros 34 aislamientos correspondieron a diferentes

especies de otros géneros (*Colletrotrichum*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Diaporthe*, *Pestalotiopsis*, *Lasiodiplodia* y *Corynespora*).

Los resultados de los árboles filogenéticos (Figura 3.7 y Figura 3.8) demostraron la riqueza y relación genética entre las especies fúngicas que representan los diferentes géneros que afectan al Piñón. Todas las especies aisladas pertenecen a la división Ascomycota, específicamente a los órdenes Pleosporales, Botryosphaerales, Diaporthales, Hypocreales, Amphisphaerales e Incerta sedis. El orden Pleosporales (46.6 %) fue el dominante en plantas de *J. curcas*. El 20% correspondió a orden Incerta sedis seguido de Hypocreales (13.3 %). En menor frecuencia se observaron los órdenes Botryosphaerales, Diaporthales y Amphisphaerales (todos en un 6.6 %) (Figura 3.7).

También, se realizó un análisis filogenético de *Fusarium* spp. utilizando las secuencias ITS1-5.8S-ITS2, las cuales indicaron que los aislados de *Fusarium* pertenecen a los complejos de especies *F. incarnatum-equiseti* (FIESC) y *F. fujikuroi* (FFSC). En este análisis se observó una clara divergencia entre ambos complejos (Figura 3.8).

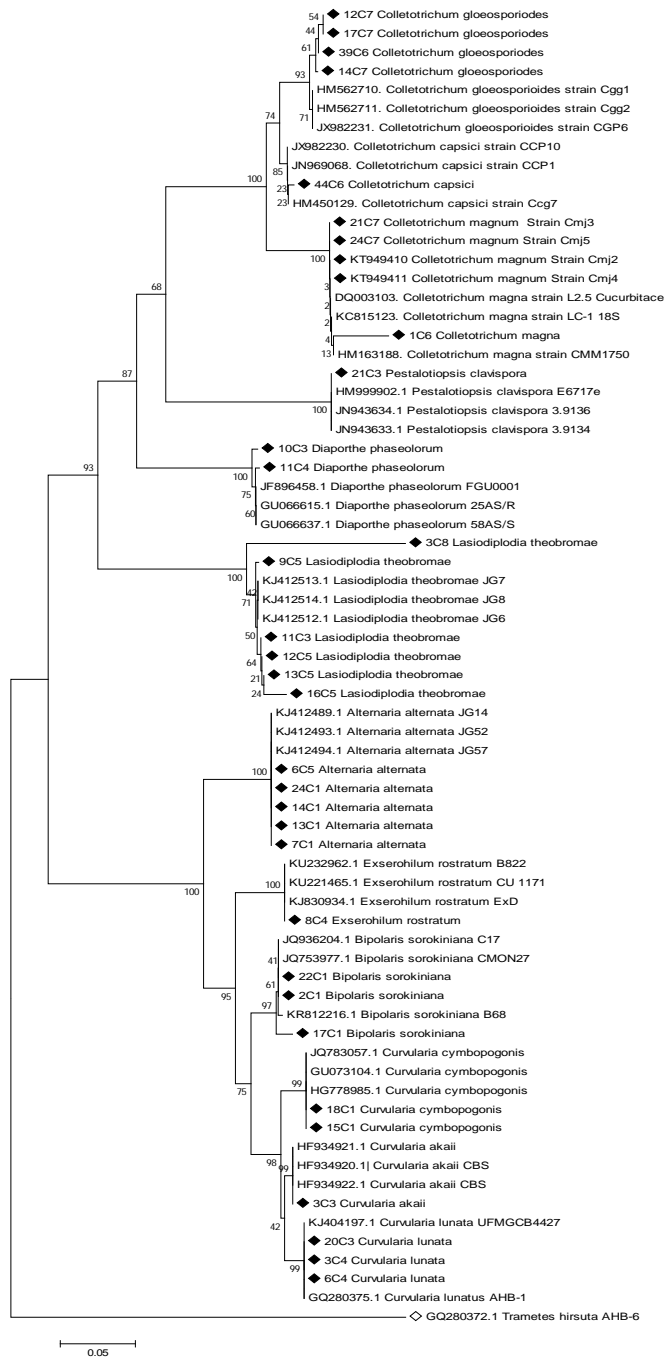


Figura 3. 7 Relaciones filogenéticas de los hongos asociados a lesiones en *Jatropha curcas* () y sus secuencias referencia. El árbol fue construido usando el método Neighbour-Joining basado en las secuencias ITS1-5.8S-ITS2. El basidiomiceto *Trametes hirsuta* fue incluido como grupo externo (). Los valores bootstrap en porcentaje (basados en 1000 réplicas) se observan en los nodos.

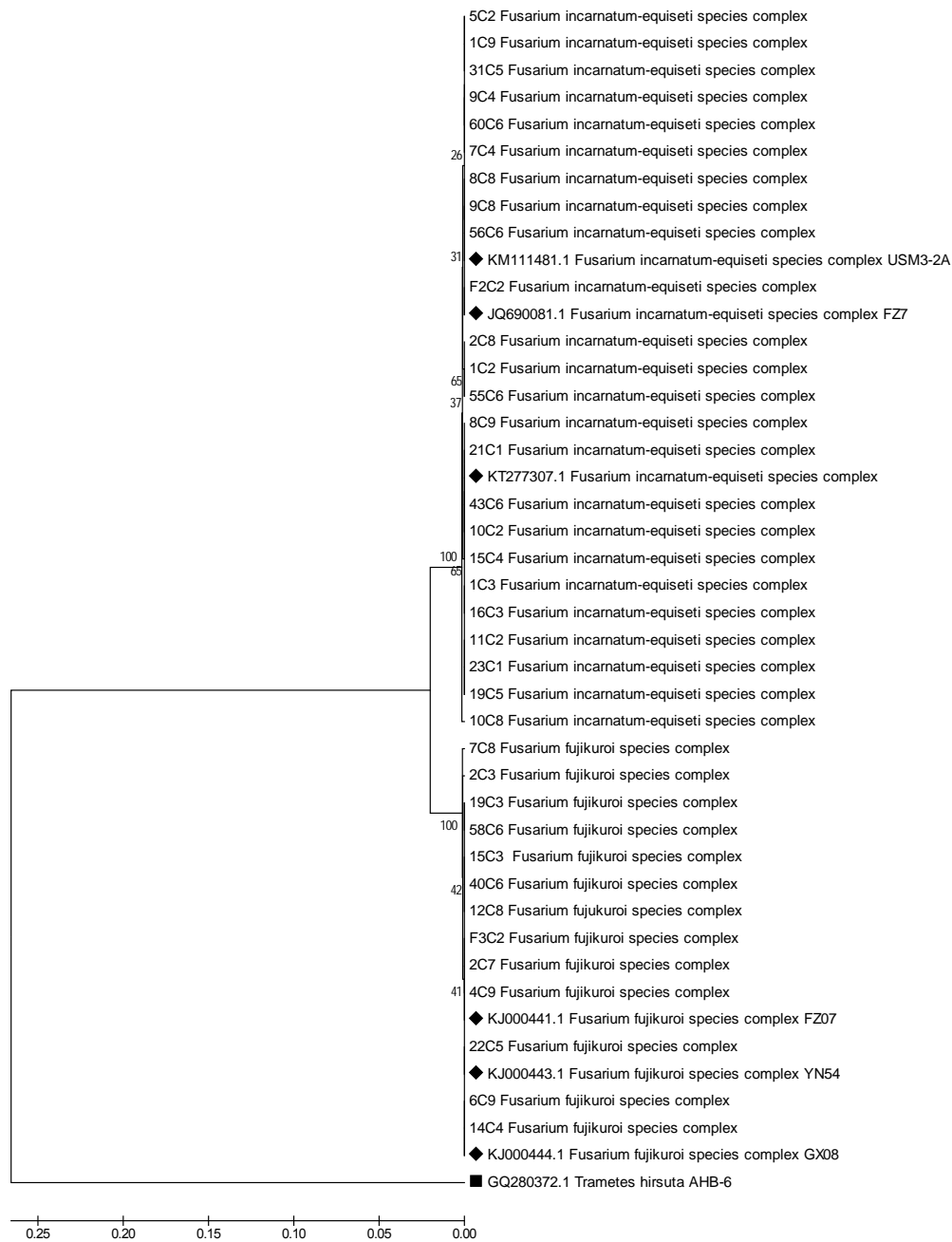


Figura 3. 8 Árbol filogenético de los aislados de *Fusarium* asociados a lesiones en *Jatropha curcas* y sus secuencias referencia (). El árbol fue construido usando el método UPGMA basado en las secuencias ITS1-5.8S-ITS2. El Basidiomiceto *Trametes hirsuta* fue incluido como grupo externo (). Los valores bootstrap en porcentaje (basados en 1000 réplicas) se observan en los nodos.

3.5.2 Identificación de hongos con iniciadores especie-específicos

De los siete aislamientos que morfológicamente se clasificaron en el género *Colletotrichum*, tres se identificaron como *C. gloesporioides* (teleomorfo: *Glomerella cingulata*) al producir un fragmento de ADN de 450 pb con los iniciadores CglInt e ITS4. Los restantes cuatro aislamientos se identificaron como *C. truncatum* (teleomorfo: *Glomerella truncata*) al producir un fragmento de ADN de 390 pb con los iniciadores CcapF y CcapR específicos de *C. truncatum* y la cepa referencia *C. truncatum* ATCC 48574.

3.5.3 Perfiles de restricción por PCR-RFLP

Bacterias

El perfil de restricción de los aislados correspondientes a *Sphingomonas* spp. y de *B. cepacia*, a partir de los productos de amplificación del gel 16S ADNr con las enzimas *RsaI*, *HaeIII*, *AluI* y *EcoRI* se presenta en la Figura 3.6. La separación de los productos de la digestión con las enzimas por medio de electroforesis, dio un patrón similar en el tamaño de los fragmentos entre los aislados del género *Sphingomonas*, probablemente pertenecen a la misma especie. Por otra parte, el perfil de restricción en el caso de *B. cepacia* fue diferente a los de los aislados ya mencionados.

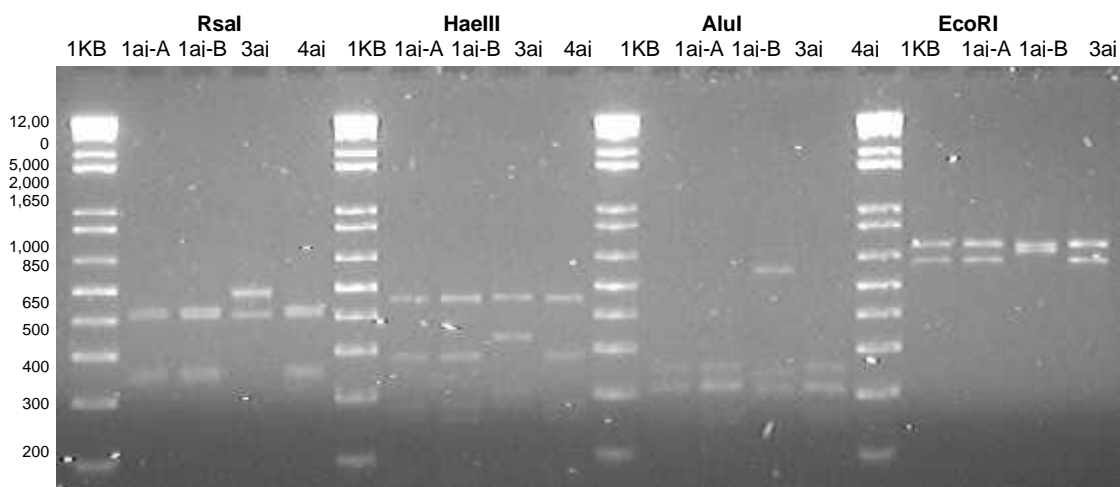


Figura 3. 9 Perfil de restricción de *Sphingomonas* spp. y *Burkholderia cepacia*.

Se puede observar en la Tabla 3.3, el tamaño de los productos de digestión de todos los aislados.

Tabla 3. 3 PCR-RFLP del gen 16S ADNr de *Sphingomonas* sp. y *Burkholderia cepacia*.

Especie	Tamaño del fragmento (pb)			
	RsaI	HaeIII	AluI	EcoRI
<i>Sphingomonas</i> sp. 1aj-A	410	490	260	740
<i>Sphingomonas</i> sp. 1aj-B	250	300	210	640
<i>Sphingomonas</i> sp. 4aj		200		
		190		
<i>Burkholderia cepacia</i> 3aj	500	490	625	720
	410	360	250	660
		210	210	
		200		

En este estudio se aislaron e identificaron dos especies bacterianas (*Burkholderia cepacia* y *Sphingomonas* sp.) asociadas a lesiones de *J. curcas* en Yucatán, México. Respecto a las enfermedades ocasionadas por bacterias para el género *Jatropha* en la literatura existen pocos registros. Sin embargo, se han reportado bacterias de los géneros *Xanthomonas* y *Erwinia*, los que ocasionan mancha angular y tizón de fuego, respectivamente. Para *J. curcas* específicamente, sólo se han reportado fitopatógenas las especies *Xanthomonas* sp., *X. malvacearum* y *X. axonopodis* pv. *manihotis* [13].

Otros estudios han demostrado la presencia de *B. cepacia* y *Sphingomonas* sp. en plantas y en humanos [85], [86], [87]. *B. cepacia* ha sido aislada como fitopatógeno, ocasionando pudrición bacteriana de bulbos en cebolla [88], [89], [90], en frutos en albaricoque [91], en puntas de plátano [92] y necrosis foliar en ave de paraíso (*Strelitzia reginae*) [93]. También, *B. cepacia* se ha registrado como un agente de control biológico contra patógenos Oomicetos (*Pythium aphanidermatum* y *Aphanomyces euteiches*) en chícharo (*Pisum sativum* L.) [94] y para el control de *Rhizoctonia solani* en plantas de noche buena (*Euphorbia pulcherrima*) [95]. Por otra parte, la capacidad de *B. cepacia* por producir lipasas y ser utilizadas para la obtención de biodiesel a partir de aceite vegetal,

ha sido bien documentada [96]. La lipasa inmovilizada de *B. cepacia* ha sido probada en aceite crudo de *J. curcas* para la producción de biodiesel, mostrando una alta estabilidad y eficiencia como biocatalizador [97], [98], [99]. Sin embargo, no existe reporte previo de *B. cepacia* como fitopatógeno en plantas de *J. curcas*, por lo que, este es el primer reporte.

A las especies del género *Sphingomonas* se las ha asociado principalmente en el campo de la biorremediación, por la alta capacidad que tienen para biodegradar una amplia gama de compuestos recalcitrantes (dibenzo-*p*-dioxina, hidrocarburos policíclicos aromáticos, difenil, dibenzofuranos, etc.) en ambientes contaminados. Por otra parte, han sido registradas como patógenas oportunistas en humanos por causar diversas enfermedades (meningitis, bacteremia, septicemia, peritonitis e infecciones neonatales) [87], [100]. También, se les ha reportado como endófitos en semilla, hoja y tallo de plantas de arroz [101], [102], en granos de maíz [103] y como fijadoras de nitrógeno en la rizosfera de arroz [104]. Escasamente se les ha registrado como especies fitopatógenas [105], por ejemplo, *Sphingomonas melonis* sp. nov., se ha reportado como causante de daños en frutos de melón español [106]. Recientemente, *Sphingomonas* sp. fue registrado como parte de la microbiota del suelo de plantaciones de *J. curcas* [107]. Sin embargo, para *J. curcas* no existe reportes previos de *Sphingomonas* sp., como fitopatógeno, por lo que este es el primer estudio que asocia este género con lesiones de tejidos de plantas de piñón.

Como puede apreciarse en los resultados obtenidos, las dos especies bacterianas identificadas en la presente investigación, y que no habían sido reportadas como fitopatógenas de *J. curcas* en nuestra región de estudio, sí se comportaron como microorganismos patógenos afectando diversos tejidos de los cultivos de esta especie.

Puede considerarse que el hecho de que el piñón sólo había sido utilizado como cerca viva en esta área de estudio y su implementación como cultivo es reciente (no más de 10 años) ha influido en que diferentes especies de microorganismos hayan evolucionado o se hayan adaptado para colonizar a esta planta. Sería importante profundizar en las relaciones hospedante-patógeno de este cultivo, ya que muchas de las variedades y/o accesiones de *J. curcas* que se están plantando en la Península de Yucatán, tienen su

origen en otras regiones y tal vez su adaptación al ambiente en el que están ahora no ha favorecido su fitosanidad.

Hongos

Los productos de amplificación fueron procesados por análisis de RFLP y digeridos con diferentes endonucleasas. La enzima *HinfI* produjo fragmentos específicos alrededor de 280, 180 y 120 pb para todos los aislados de *C. cassiicola*, mientras que con la digestión de *RsaI* se generaron bandas específicas de alrededor de 410 y 150 pb. En el caso de *A. alternata*, la enzima *HinfI* generó fragmentos de alrededor de 250, 180 y 130 pb y con la enzima *RsaI* se produjeron fragmentos alrededor de 280, 230 y 105 pb para todos los aislados. Bandas específicas a 290 y 210 pb, fueron visualizadas con la digestión de *HinfI* para *L. theobromae*, mientras que con *RsaI* fueron generadas bandas específicas alrededor de 490 y 80 pb (Tabla 3.4). Por otra parte, la enzima *HinfI* generó fragmentos alrededor de 280, 190 y 100 pb para *F. equiseti* y *F. fujikuroi*; mientras que con la enzima *HpaII*, no se encontró sitio de reconocimiento para esta región del DNAr de *F. equiseti*, pero para *F. fujikuroi* fueron generadas bandas específicas de alrededor de 460 y 105 pb (Tabla 3.5.).

Tabla 3. 4 PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2 de *Alternaria alternata*, *Corynespora casicola* y *Lasiodiplodia theobromae*. Longitud de fragmentos (pb) obtenidos de la digestión endonucleasa con *Hinfl* y *Rsal*.

Especie	Tamaño de fragmento (pb)	
	Hinfl	Rsal
<i>Corynespora cassicola</i>	280	410
	180	150
	120	
<i>Alternaria alternata</i>	250	280
	180	230
	130	105
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	290	490
	210	

Tabla 3. 5 PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2 del complejo de especies *Fusarium equiseti* y *Fusarium fujikuroi*. Longitud de fragmentos (pb) obtenidos de la digestión endonucleasa con *Hinfl* y *HpaII*.

Especie	Tamaño de fragmento (pb)	
	Hinfl	HpaII
<i>F. fujikuroi</i>	280	460
	190	105
	100	
<i>F. equiseti</i>	280	Nd
	190	
	100	

3.6 Estudio del hongo no cultivable *Phakopsora jatrophicola*

Durante los tres años de estudio se observó de Noviembre a Febrero (16 a 23 °C) una alta incidencia (30 a 70%) de roya en plantaciones comerciales de piñón en tres municipios de Yucatán, México. Un total de 140 muestras de hojas de *J. curcas* con síntomas típicos de roya fueron colectadas, las hojas presentaron halos cloróticos irregulares en la superficie adaxial, que más tarde se convirtieron en necróticos, mientras que en el área abaxial, predominaron pústulas errumpentes (uredios) de color café rojizo, también, fueron observados telios de color café oscuro (figura 3.10).

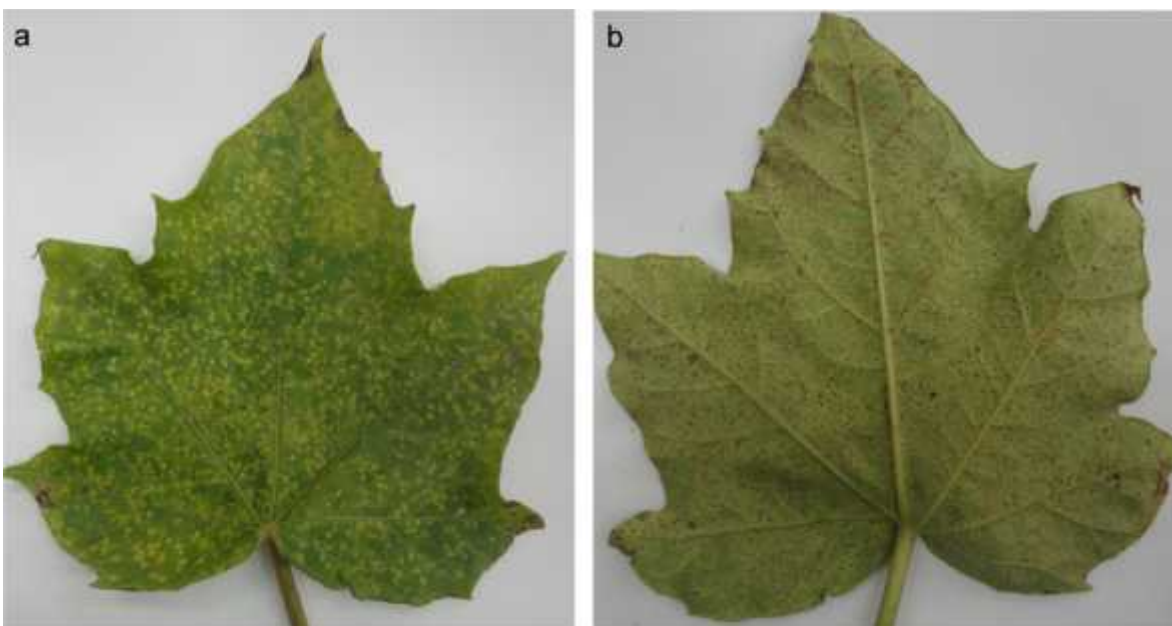


Figura 3. 10 Síntomas de roya (*Phakopsora jatrophicola*) en hojas de piñon (*Jatropha curcas*). a) Halos cloróticos en la superficie adaxial de la hoja; b) Síntomas de roya en la superficie abaxial de la hoja.

3.6.1 Caracterización morfológica

Observaciones al microscopio de luz mostraron que los uredios de *P. jatrophicola* (Figura 3.11a) fueron hipófilas, ocasionalmente epífilas. Estaban en grupos pequeños sobre las manchas foliares y delimitadas por las venas de la hoja, de color café, elipsoidales,

subepidermales, errumpentes y abiertas por un poro. Los telios (Figura 3.11b) fueron hipófilas, subepidermales, no errumpentes, de color amarillo a café, consistentes de una costra de teliosporas adheridas lateralmente, formando una capa de 6-10 esporas de profundidad cubiertas por la epidermis. Numerosas paráfisis periferales, incurvadas, cilíndricas, claviformes, no septadas, inusualmente con paredes dorsales gruesas (5 μm) (Figura 3.11c) superando al tejido peridial, las cuales se proyectan fuera del hospedero, con paredes hialinas a color amarillento. Las urediniosporas (Figura 3.11d) fueron mayormente obovoides en un rango de 15 a 20 μm de ancho, sésiles, con pared equinulada, hialina a color café, con grosor uniforme de 0.5-1 μm y con poro germinativo no visible. Las teliosporas (Figura 3.11e) fueron sésiles, en un rango de 17 a 30 μm de longitud, dispuestas irregularmente, unicelulares y de forma elipsoidal a poligonal, la pared fue usualmente de color café a café rojizo. Los datos de las características morfológicas de *P. jatrophiicola* tomadas en los tres sitios de muestreo en la Península de Yucatán están presentes en la tabla 3.6.

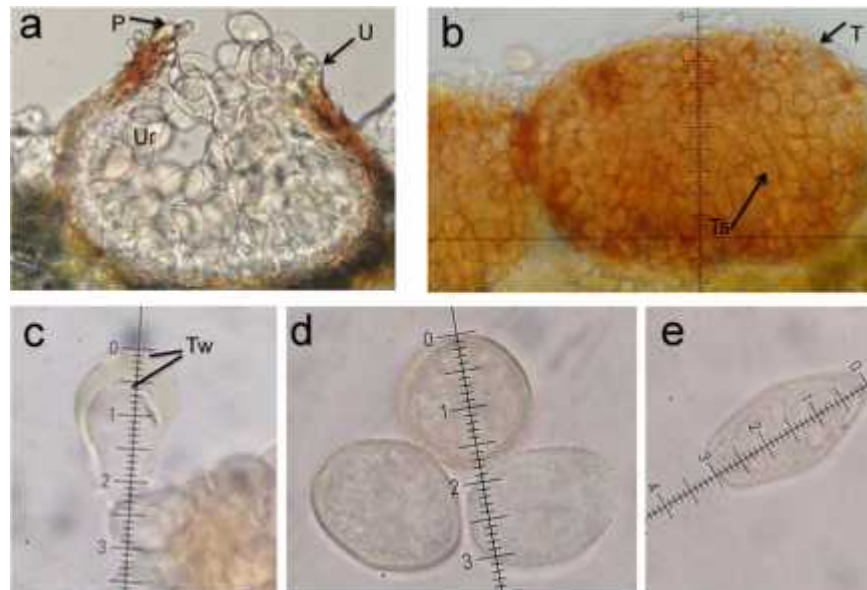


Figura 3. 11 Estructuras morfológicas de *Phakopsora jatrophiicola* en *Jatropha curcas* observadas al microscopio de luz. a) Uredio (U) subepidermal, errumpente, abierto en un poro rodeado por paráfisis (P) y con urediniosporas (Ur) en el interior; b) Telio (T) subepidermal, no errumpente con teliosporas (Ts); c) Paráfisis encorvadas, pared engrosada dorsalmente (Tw); d) Urediniosporas sésiles, obovoides; e) Teliospora.

Tabla 3. 6 Características morfológicas de *Phakopsora jatrophiicola* colectada de *Jatropha curcas* en Yucatán.

Estructura fúngica	Alto	Ancho		
	Rango (µm)	Media ±D.E (µm)	Rango (µm)	Media ±D.E (µm)
Uredio	105-187.5	133.1 ± 17.4	130-225	163.3 ± 22.1
Uredinospora	19-26	23.1 ± 1.8	15-20	16.9 ± 1.2
Paráfisis	20-35	26.07 ± 4.5	7.5-15	12.2 ± 2.7
Telio	100-187.5	149.6 ± 19.9	117.5-240	171.04 ± 35.9
Teliospora	17-30	21.6 ± 2.5	10-16	11.6 ± 1.2

3.6.2 Germinación de uredinosporas

Las esporas de *P. jatrophiicola* fueron colectadas a partir de hojas de *J. curcas* recolectadas en plantaciones comerciales. El mayor número de esporas visto en una cámara de Neubauer fue de 43 y el número más bajo fue de 13, con un promedio de 20.45 ± 6.4 esporas por campo.

El valor más alto de germinación se obtuvo a las 96 horas (18%), pero este valor no fue diferente de los obtenidos en las mediciones restantes (15% a las 12 y 24 h, y 17% a las 36, 48 y 72 h). Todas las uredinosporas germinadas mostraron el tubo germinativo y el apresorio (Figura 3.12).

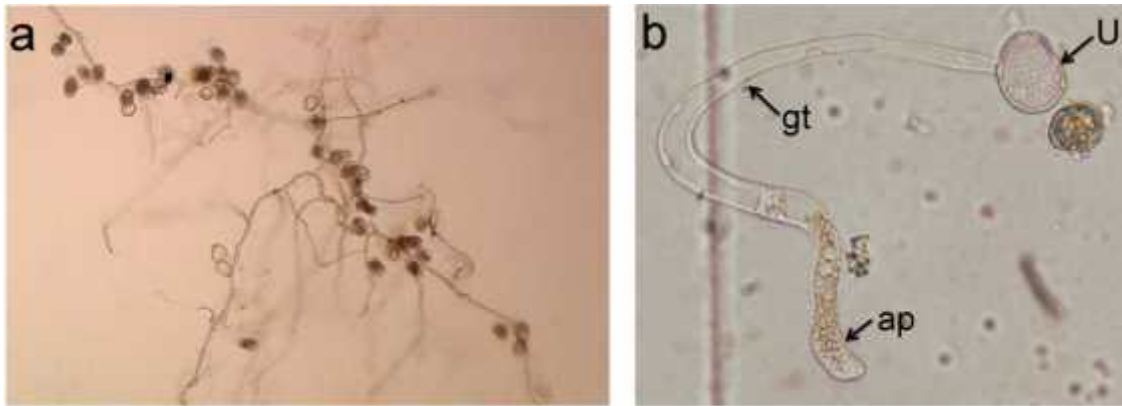


Figura 3. 12 Germinación de las esporas de *Phakopsora jatrophiicola* colectadas de hojas de *J. curcas*. La germinación de esporas se examinó con un microscopio de luz. a) Esporas germinadas después de 12 h de incubación; b) Urediniosporas (U) con el tubo germinativo (gt) y apresorio (ap).

3.6.3 Caracterización ultraestructural con microscopia electrónica de barrido (MEB)

Se observó en detalle al uredio errumpente, con un poro abierto (25 a 35 μm de diámetro) que contenían numerosas urediniosporas y paráfisis periferales cubriendo al tejido peridial (Figura 3.13a). También se observó un uredio errumpente asociado con un telio embebidos en el tejido de *J. curcas*, el telio fue subepidermal, no errumpente, consistente en una costra de teliosporas adheridas lateralmente, alrededor del uredinio (Figura 3.13b). Imágenes MEB de *P. jatrophiicola* también mostraron la escultura superficial de las esporas, siendo estas equinuladas (Figura 3.13c y 3.13d). En la figura 3.13e se observó el tejido de hoja con numerosos uredios errumpentes de *P. jatrophiicola*.

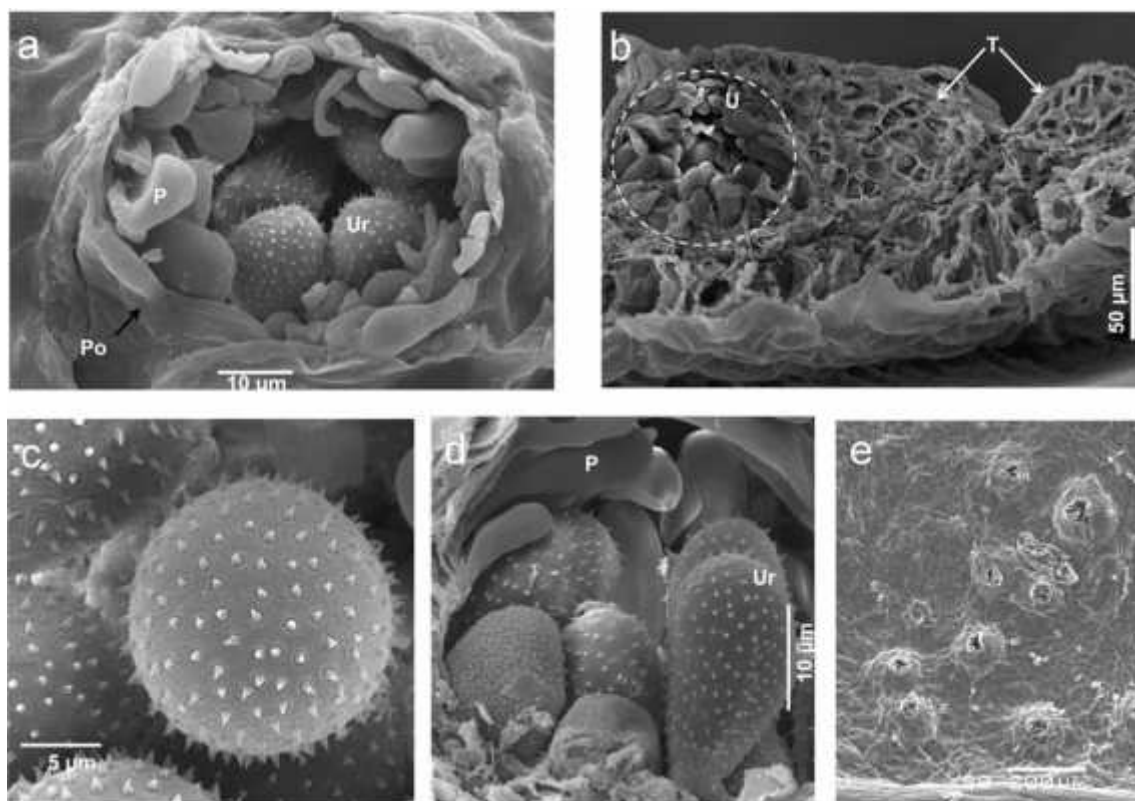


Figura 3. 13 Fotomicrografías electrónicas de barrido de *Phakopsora jatrophicola* dentro del tejido vegetal. a) Corte transversal de hoja de *Jatropha curcas* con uredio de la roya *P. jatrophicola*, detalle de un poro abierto (Po) con paráfisis periferales (P) y urediniosporas (Ur); b) Corte transversal de hoja con uredio (U) y telios (T) con teliosporas; c) Vista superior de la superficie equinulada de urediniosporas; d) Corte transversal de uredio con paráfisis (P) y vista lateral de urediniosporas (Ur); e) Vista superior de uredios errumpentes en hoja de *Jatropha curcas*.

3.6.4 Bioensayo de patogenicidad de *Phakopsora jatrophicola* en *Jatropha curcas*

Las hojas separadas de *Jatropha* fueron capaces de permanecer verdes hasta 25 días después de la incubación en condiciones controladas. Las esporas colectadas desde hojas de piñón con síntomas de roya mantuvieron su infectividad y fueron capaces de producir nuevas pústulas cuando se inocularon en hojas sanas separadas de *J. curcas*. Se observaron pústulas en el 50% de las hojas inoculadas 13 días después a la inoculación. La capacidad infectiva de las esporas se mantuvo hasta 30 días después de

la inoculación. Además, la densidad de pústula en las hojas inoculadas se registró a los 14 días después de la inoculación (Figura 3.14), con un promedio de 181.16 ± 19.5 pústulas/hoja observadas en el lado abaxial. Un promedio de 15.5 ± 2.3 lesiones/hoja y 12.63 ± 2.4 pústulas/lesión fueron también registrados.

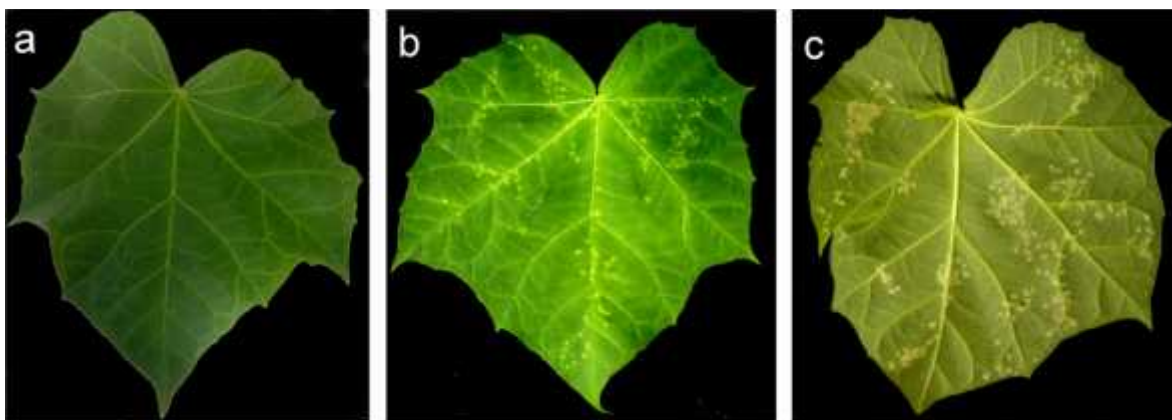


Figura 3. 14 Evaluación de infectividad de las urediniosporas de *Phakopsora jatrophiicola* usando un ensayo con hojas separadas. a) Hoja sana de *Jatropha curcas* antes de la inoculación; b) Lado adaxial de la hoja 13 días después de la inoculación; c) Lado abaxial de la hoja 13 días después de la inoculación.

En este estudio, encontramos que los especímenes de *P. jatrophiicola* obtenidos de diferentes plantaciones comerciales de piñón, al ser examinados bajo al microscopio de luz, mostraron estructuras reproductivas y diferentes dimensiones de esporas similares a los descritos en estudios previos de *P. jatrophiicola* en *J. curcas* [108], [109].

Adicionalmente, en el presente estudio también se examinaron las características morfológicas de esta roya a través de microscopía electrónica de barrido (MEB) por primera vez, capaces de proporcionar una clara evidencia de cortes transversales de fragmentos de hoja de *J. curcas* con uredios, paráfisis periferales y urediniosporas, donde en la escultura superficial equinulada de las urediniosporas se pudieron observar en detalle. Además, las imágenes de MEB mostraron el telio y teliosporas en una hoja de *J. curcas* y cortes transversales de la hoja con el uredio y telio juntos.

Hasta hace pocos años el piñón únicamente utilizaba como cerca viva, y su cultivo intensivo es relativamente reciente, por lo que hay poca información disponible sobre el manejo del cultivo. Con el fin de establecer un control adecuado de la enfermedad, los fitopatólogos necesitan entender la biología del patógeno, las interacciones hospedero-patógeno y las condiciones ambientales que favorecen el establecimiento y desarrollo de la roya. Investigaciones similares a las del presente estudio, se ha llevado a cabo con otros patógenos del género *Phakopsora* con el fin de obtener información valiosa [82], [110]. Se ha reportado que la defoliación natural de las hojas de *J. curcas* puede ser confundida con los síntomas de la enfermedad de la roya debido al hecho de que, cuando la infección es severa, *P. jatrophycola* provoca la defoliación completa en plantas de *J. curcas*, ocasionando que la tasa fotosintética sea afectada y por lo tanto los rendimientos en la biomasa de las plantas atacadas desciendan drásticamente [111], [112]. El comportamiento de la enfermedad en muchas variedades cultivadas de piñón en Yucatán con el fin de obtener biocombustible, fue similar a la reportada.

Se ha reportado, la presencia de *P. jatrophycola* (Sinonimia *Phakopsora arthuriana*) en un campo no comercial (120 plantas) en Puebla, México y se señaló que la importancia fitosanitaria y económica de la roya en *J. curcas* en México, radica en los altos niveles de incidencia y severidad que ocurren cuando las condiciones ambientales son favorables, tales como el clima húmedo templado con lluvias todo el año. También se planteó la hipótesis de que en cultivos comerciales de *J. curcas*, ubicados en lugares donde predomina un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano, como la Península de Yucatán, este patógeno no puede establecerse [18]. Nuestros resultados y observaciones realizadas en los campos comerciales de piñón de la Península de Yucatán contradicen esta hipótesis, dado que del 30 al 70% de las 3000 hectáreas cultivadas en esta región de México se ven afectadas por la roya.

P. jatrophycola es un patógeno obligado, por lo tanto es muy difícil mantener las muestras con el fin de trabajar, por ejemplo, en el mejoramiento genético para la resistencia del piñón a roya, a través de inoculaciones artificiales. En este sentido, la posibilidad de tener esporas viables durante un período considerable de tiempo es muy importante. El ensayo con hojas separadas que se ha utilizado en el cultivo de patógenos roya [82], [110], [113] proporciona un método que supera las limitaciones de tiempo y espacio de las

evaluaciones de invernadero y de campo. Park *et al.*, [82] señalaron un aspecto crítico en el uso del ensayo de hojas separadas; que es el de mantener el tejido vegetal sano durante el período de tiempo que se requiere para el desarrollo de la enfermedad, y en este caso, también para la reproducción *P. jatrophicola*. Esta prueba demostró la utilidad de esta técnica, no sólo para determinar la infectividad de las esporas en un corto período de tiempo, sino también en el mantener vivas y libres de contaminantes fúngicos las esporas de *P. jatrophicola* bajo condiciones *in vitro*. Dado que se ha reportado que la roya puede ser parasitada por otros patógenos [114], [18], este método también permitiría la secuenciación de diferentes regiones génicas con el fin de desarrollar iniciadores específicos para el diagnóstico molecular de esta especie.

Se ha reportado que la tasa de germinación promedio de urediniosporas de la roya de la soya (*P. pachyrhizi*) recién colectadas en campo, es muy variable (de 93% a 15%), lo que depende del momento de la colecta y del microambiente al cual las esporas fueron expuestas antes de la colecta [82]. Las esporas de *P. jatrophicola* utilizadas en este estudio para medir la tasa de germinación, tenían bajo porcentaje de germinación en las condiciones establecidas, estos valores coinciden con el valor más bajo reportado en otros trabajos. Sin embargo, no existen reportes previos sobre porcentajes de germinación para *P. jatrophicola*. El presente estudio es la base de nuevas investigaciones encaminadas a evaluar los diferentes factores que afectan la biología de este patógeno y tener así un mejor entendimiento del mismo. Previo a este estudio no hay reportes acerca de esta técnica ni para *P. jatrophicola* ni para *Jatropha curcas*, por lo que estos resultados proporcionan nueva información y servirán como base para nuevos estudios sobre el mejoramiento de piñón para la resistencia a dicha enfermedad.

3.7 Distribución temporal y rango de colonización de los hongos asociados a lesiones de tejidos de *Jatropha curcas*

En este estudio se aisló una comunidad de especies fúngicas asociadas a lesiones de *J. curcas*, donde fueron identificadas 15 diferentes especies fúngicas (*Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Curvularia akaii*, *Curvularia cymbopogonis*, complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti*, complejo de especies *Fusarium fujikuroi*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum magnum*, *Colletotrichum*

truncatum, *Corynespora cassiicola*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Diaporthe phaseolorum*, *Pestalotiopsis clavispora* y *Exserohilum rostratum*).

Durante el período del estudio, el máximo número de hongos asociados a lesiones fue aislado de muestras de hojas de *J. curcas* (78.35 %) en comparación con los provenientes de las inflorescencias (12.37 %), frutos (7.21 %) y tallos (2.06 %) (Figura 3.15). Este hallazgo confirma la importancia que tienen las enfermedades fungosas en el decrecimiento de la fotosíntesis en el cultivo y consecuentemente en la producción de biomasa.

Entre esos quince aislamientos, el complejo de especies *F. incarnatum-equiseti* mostró una alta presencia (28.86 %) seguido por el complejo de especies *F. fujikuroi* (17.52 %). En contraste, *A. alternata* y *L. theobromae* (ambos con 8.24 %), *C. gloeosporioides* (7.21 %), *C. casicola* (6.18 %), *C. truncatum* y *C. magnum* (ambos con 5.15 %), *B. sorokiniana* y *C. lunata* (ambos con 3.09 %), *D. phaseolorum* y *C. cymbopogonis* (ambos con 2.06 %), *C. akaii*, *P. clavispora* y *E. rostratum* (todos con 1.31 %) mostraron una baja frecuencia de colonización (Figura 3.16).

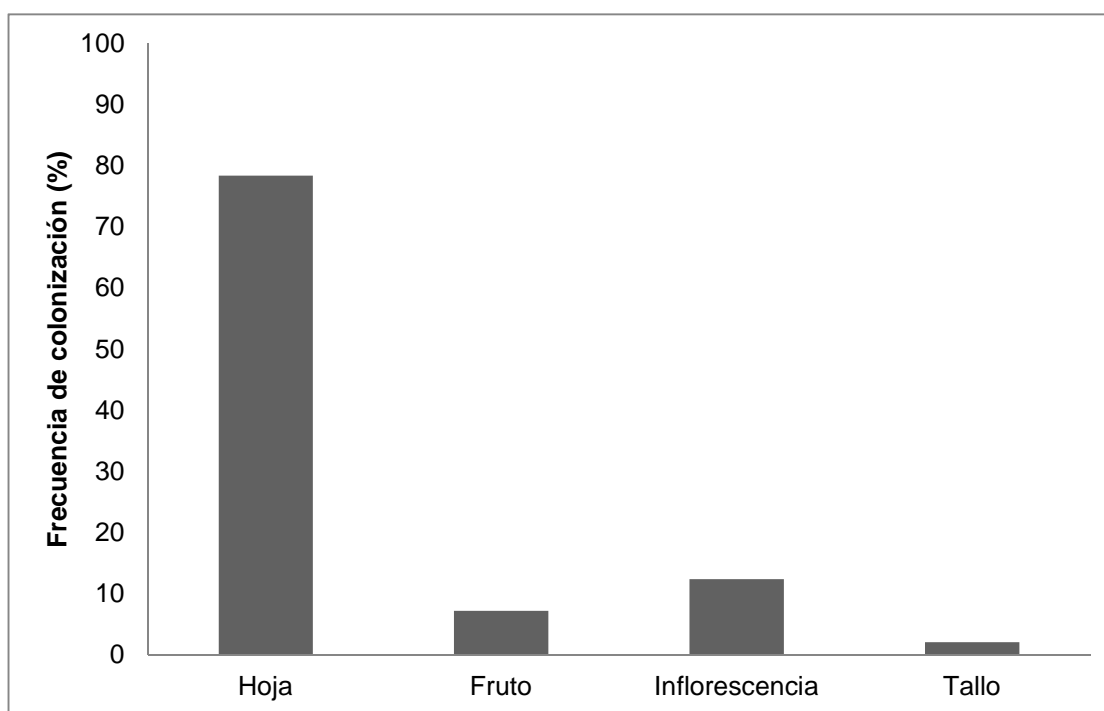


Figura 3. 15 Frecuencia de colonización (FC) de hongos asociados a lesiones de muestras (hoja, fruto, inflorescencia y tallo) de *J. curcas*.

Estudios previos en México y otros países (India, Brasil, USA, China, Indonesia, etc.) han demostrado la existencia de una comunidad diversa de hongos asociados a hoja, fruto, semilla, tallo, raíz e inflorescencia de *J. curcas* y han sido clasificados como endófitos pertenecientes a especies potencialmente patógenas, debido a que ciertas especies fúngicas, que son notoriamente patogénicas en algunos tipos de plantas, podrían comportarse como endófitos en otras, por lo que no inducen síntomas de enfermedad [115], [14], [116], [13], [117], [118], [119]. Sin embargo, algunas de las especies aisladas en este estudio no corresponden a las reportadas. Se ha reportado que tanto las diferentes condiciones ambientales entre las regiones, así como las metodologías utilizadas para la toma de muestras vegetales, la desinfección superficial del tejido vegetal, el aislamiento e identificación de los hongos, podrían influir en la obtención de las comunidades fúngicas entre los estudios [116], [117], [107].

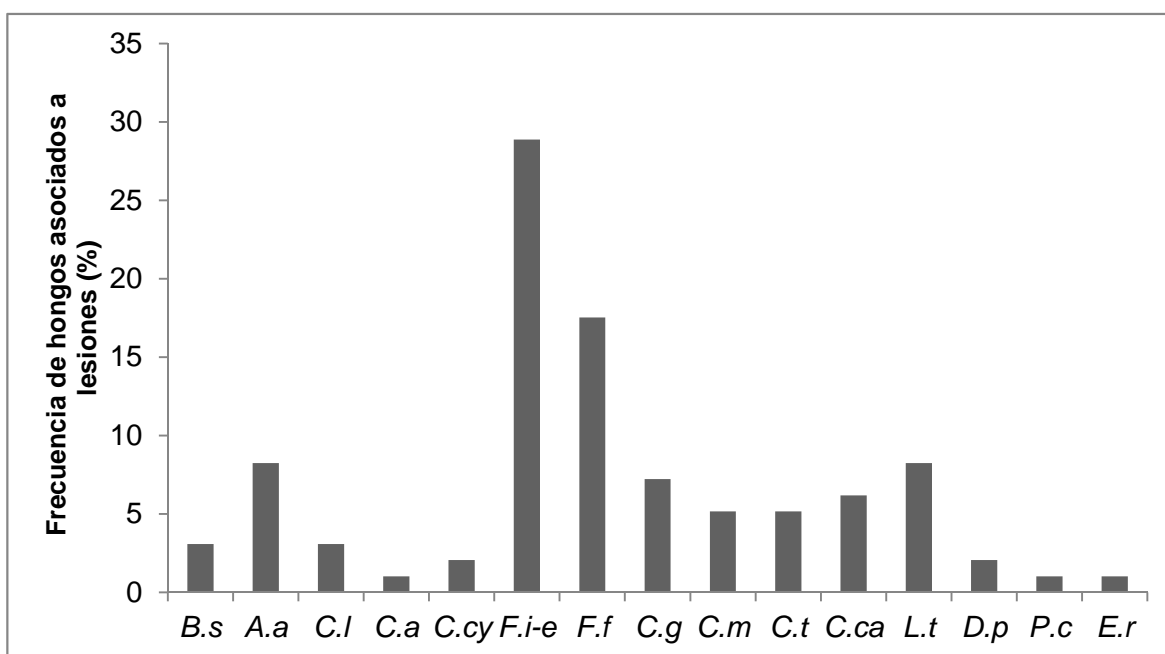


Figura 3. 16 Frecuencia de especies de hongos asociados a lesiones de plantas de *J. curcas* L durante el estudio 2013-2015. *Bipolaris sorokiniana* (B.s); *Alternaria alternata* (A.a); *Curvularia lunata* (C.l); *Curvularia akaii* (C.a); *Curvularia cymbopogonis* (C.cy); Complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* (F.i-e); Complejo de especies *Fusarium fujikuroi* (F.f); *Colletotrichum gloeosporioides* (C.g); *Colletotrichum magnum* (C.m); *Colletotrichum truncatum* (C.t); *Corynespora casicola* (C.ca); *Lasiodiplodia*

theobromae (L.t); *Diaporthe phaseolorum* (D.p); *Pestalotiopsis clavispora* (P.c); *Exserohilum rostratum* (E.r).

Cabe destacar que, en este estudio se encontró una gran diversidad de taxones fúngicos en lesiones de plantas de *J. curcas* que no ha sido reportada anteriormente para México. En nuestra investigación, se aisló por primera vez a *Bipolaris sorokiniana*, *Curvularia akaii*, *Curvularia cymbopogonis*, *Corynespora cassiicola*, *Diaporthe phaseolorum*, *Pestalotiopsis clavispora*, y el complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* de lesiones de plantas de *J. curcas* en México. Estas especies han sido identificadas previamente en otras especies de plantas como endófitos o patógenos y como patógenos en humanos.

B. sorokiniana ha sido señalado como un fitopatógeno económicamente importante en trigo [120], en *Panicum virgatum* L. [121] y muchas otras especies [122]. *C. akaii* y *C. cymbopogonis* han sido aislados como endófitos y patógenos en plantas y como patógenos en humanos [123], [124], [125]. *C. akaii* ha mostrado la capacidad de producir amilasa, aislado como hongo endófito de *Thymus kotschyanus* [126] y *C. cymbopogonis* ha sido aislado como un endófito asociado con la planta medicinal China *Achyranthes bidentate* [127], como un patógeno de *Rottboellia exaltata* [128] y dentro de la micoflora de semilla del sorgo [129]. La asociación patogénica de *Corynespora cassiicola* ha sido bien documentada y reportada desde plantas cultivables, incluyendo la soya, pepino, papaya, tomate y diversos hospederos [130], [131], [132]. Diferentes variedades de *Diaporthe phaseolorum* han sido principalmente registradas como patógenas en plantas, entre esas, *Phaseolus lunatus* L., [133] y soya [134], causando severas lesiones en diferentes partes de tejido vegetal (hoja, tallo, semilla y vaina) [135]. *Pestalotiopsis clavispora* ha sido aislado de hoja, tallo, raíz y fruto como fitopatógeno, causando mancha foliar gris en Mango [136], mancha parda en árbol de fresa China [137], pudrición de raíz y corona en fresa [138] y otras plantas [139], [140]. *Exserohilum rostratum* ha sido aislado como fitopatógeno desde hojas con síntomas de mancha parda en arroz [141], mancha foliar *Exserohilum* en plátano [142] y algunas veces como patógeno oportunista en humanos causando brotes de meningitis [143].

Adicionalmente, en la presente investigación, las especies aisladas con mayor frecuencia fueron los complejos de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* y *Fusarium fujikuroi*,

dominantemente asociados a lesiones de plantas de *J. curcas*. El género fúngico *Fusarium* es uno de los más importantes y bien conocidos fitopatógenos de cultivos agrícolas, así como, parásitos o endófitos de plantas hospederas saludables y afectando a la salud humana [144], [145], [146]. *Fusarium fujikuroi* ha sido aislado como un patógeno de plantas, causando pudrición de raíz en *Jatropha* [147], dentro de la micoflora de sus semillas [116] y como un miembro de la diversidad microbiana de suelo en una plantación de *J. curcas* [107]. Sin embargo, el complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* no ha sido reportado en estudios previos para *J. curcas*, para nuestro conocimiento, este es el primer reporte del complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* en piñón. FIESC ha sido reportado como un saprofito asociado con frutos en descomposición y como un patógeno de un amplio rango de cereales cultivables (trigo, maíz, avena y arroz) y otros cultivos sustentables [148], [145], [149]. En relación con estudios previos en *J. curcas* [107], los ascomicetos fueron altamente representados en nuestra colección fúngica. Dentro de los ascomicetos, la mayoría de las especies, pertenecieron a Pleosporales, Melanconiales e Hypocreales. Los taxones *Fusarium*, *Alternaria* y *Colletotrichum* fueron dominantes dentro de los Hypocreales, Pleosporales y Melanconiales, respectivamente. Este estudio provee evidencia que la frecuencia de las comunidades fúngicas en *J. curcas* podría variar entre las localidades de acuerdo al ecosistema. Esto es importante para el control de las poblaciones fúngicas presentes en plantaciones de *J. curcas*, debido a que sus semillas son utilizadas como materia prima para la fabricación de biodiesel. Un estudio previo en la península de Yucatán reportó rendimientos de 72.76 frutos/árbol de *J. curcas*, los cuales fueron considerados prometedores para la obtención de biodiesel [150]. En este estudio se registraron rendimientos de 22.66 frutos/árbol enfermo. Estos bajos rendimientos muy probablemente se deben a la presencia de los fitopatógenos aislados, ya que el daño ocasionado por los mismos en diversas plantas ha sido bien documentado a lo largo de este estudio. Una estrategia alternativa es el uso de paquetes fitosanitarios para el manejo del cultivo y el adecuado establecimiento de los mismos para el control de las enfermedades, ya que no hay programas previos de manejo.

CONCLUSIONES

- Se identificaron a las bacterias *Burkholderia cepacia* y *Sphingomonas* sp., como fitopatógenas del cultivo de *Jatropha curcas* en el sureste de México.
- Las especies fúngicas *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Curvularia akaii*, *Curvularia cymbopogonis*, complejo de especies *Fusarium incarnatum-equiseti*, complejo de especies *Fusarium fujikuroi* species complex, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum magnum*, *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassiicola*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Diaporthe phaseolorum*, *Pestalotiopsis clavispora* y *Exserohilum rostratum* se encontraron asociadas a lesiones de plantas de *J. curcas* provocando enfermedades.
- En *J. curcas*, los órganos con mayor afectación por hongos (78.35 %), fueron las hojas, lo que confirma el efecto dañino que pueden tener las enfermedades fungosas sobre el rendimiento de la planta al afectar el sistema fotosintético.
- Los complejos de especies *Fusarium incarnatum-equiseti* y *Fusarium fujikuroi* fueron los que se presentaron con mayor frecuencia en *J. curcas* durante el período de 2013 a 2015.
- Se caracterizó al fitopatógeno no cultivable *Phakopsora jatrophiicola* por primera vez mediante microscopía electrónica de barrido.
- Se constató la afectación de los fitopatógenos sobre la producción del cultivo al obtenerse rendimientos de frutos/árbol enfermo menores al 50% que los reportados para *J. curcas* en la región.

PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos, se establecen las bases para desarrollar programas de manejo fitosanitario para el control de los patógenos presentes en cultivos comerciales de piñón, establecidos en la Península de Yucatán. Esto con el fin de garantizar buenos rendimientos para la producción de biodiesel.

Se recomienda realizar estudios moleculares para el diagnóstico de *Phakopsora jatrophiicola* en cultivos de *Jatropha curcas* y el establecimiento del manejo fitosanitario para su control.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Terren; S. Savery; P. Jacquet de Haveskercke; S. Winandy; G. Mergeai, Attempted cultivation of *Jatropha curcas* L. in the lower Senegal river valley: Story of a Failure, *Tropicultura* 30 (4), 204-208, 2012.
- [2] S. Kumar; S. Sharma; D.V. Pathak; J. Beniwal, Integrated management of *Jatropha* root rot caused by *Rhizoctonia bataticola*, *JTFS* 23 (1), 35-41, 2011.
- [3] A. Kumar; S. Sharma, An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review, *Ind Crop Prod*, 28 (1), 1-10, 2008.
- [4] J. Heller, Physic nut. *Jatropha curcas* L., en *Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research*, Gatersleben, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 1996, 66 p.,.
- [5] W.M.J. Achten; L. Verchot; Y.J. Franken; E. Mathijs; V.P. Singh; R. Aerts; B. Muys, *Jatropha* bio-diesel production and use, *Biomass Bioenergy*, 32 (12), 1063-1084, 2008.
- [6] M. Terren; J. Mignon; C. Declerck; H. Jijakli; S. Savery; P. Jacquet de Haveskercke; S. Winandy; G. Mergeai, Principal disease and insect pests of *Jatropha curcas* L. in the Lower Valley of the Senegal River, *Tropicultura* 30 (4), 222-229, 2012.
- [7] R.E.E. Jongschaap; W.J. Corré; P.S. Bindraban; W.A. Branderburg, Claims and Facts on *Jatropha curcas* L. Report 158. *Plant Research International B.V., Wageningen*, 66 p, 2007.
- [8] S.Q. Gao; J. Qu; N.H. Chua; J. Ye, A new strain of Indian cassava mosaic virus causes a mosaic disease in the biodiesel crop *Jatropha curcas*, *Arch. Virol.* 155 (4), 607–612, 2010.
- [9] C. Grimm, Evaluation of damage to physic nut (*Jatropha curcas*) by true bugs. *Entomol. Exp. Appl.* 92 (2), 127-136, 1999.
- [10] C.S. Rao; M.P. Kumari; S.P. Wani; S. Marimuthu, Occurrence of black rot in *Jatropha curcas* L. plantations in India caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Curr. Sci.* 100 (10), 1547-1549, 2011.
- [11] A.R. Machado; O.L. Pereira; Major Diseases of the Biofuel Plant, Physic Nut (*Jatropha curcas*), Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications, Zhen Fang (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/52336. 2013.
- [12] P. Latha; V. Prakasam; A. Kamalakannan; C. Gopalakrishnan; T. Raguchander; M.

- Paramathma; R. Samiyappan, First report of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl causing root rot and collar rot disease of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in India. *Australas. Plant Dis. Notes*, 4,19–20, 2009.
- [13] K. Anitha; K.S. Varaprasad, *Jatropha* pests and diseases, an overview. In: Carels, N., Sujatha, M., Bahadur, B. (eds.). *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop*, Springer, New York, USA, pp 175-218, 2012.
- [14] C. Torres-Calzada; R. Tapia-Tussell; A. Nexticapán-Garcez; R. Martín-Mex; A. Quijano-Ramayo; A. Cortez-Velazquez; I. Higuera-Ciapara; D. Pérez-Brito, First report of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in *Jatropha curcas* in Yucatan, Mexico. *New Dis. Rep.* 23, 6, 2011.
- [15] M.A. Espinoza-Verduzco; M.E. Santos-Cervantes; E. Fernández-Herrera; M.G. Espinoza-Mancillas; J.A. Chávez-Medina; E.M. Bermúdez-Álvarez; A.L. Martínez-Ayala; J. Méndez-Lozano; N.E. Leyva-López, First report of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing inflorescence blight in *Jatropha curcas* in Sinaloa, Mexico, *Can. J. Plant Pathol.* 34(3), 455-458, 2012.
- [16] S.K. Snehi; A. Srivastava; S.K. Raj, Biological characterization and complete genome sequence of a possible strain of *Indian cassava mosaic virus* from *Jatropha curcas* in India, *J. Phytopathol.* 160, 547-553, 2012.
- [17] S.K. Raj; S.K. Snehi; S. Kumar; M.S. Khan; U. Pathre, First molecular identification of a begomovirus in India that is closely related to *Cassava mosaic virus* and causes mosaic and stunting of *Jatropha curcas* L. *Australas. Plant Dis. Notes*, 3, 69-72, 2008.
- [18] G.V. Nolasco; E.V. Ayala; P.J.M. Tovar; L.E.G. Ríos; C.H.G. Calyecac; R.A. Miranda; Primer reporte de *Phakopsora arthuriana* en *Jatropha curcas* en México, *Rev. mex. fitopatol.* 31, 70-73, 2013.
- [19] B.E. Rittmann, Opportunities for Renewable Bioenergy Using Microorganisms, *Biotechnol. Bioeng.* 100 (2), 203-212, 2008.
- [20] J. Singh; S. Gu, Commercialization potential of microalgae for biofuels production, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14, 2596-2610, 2010.
- [21] M.Y. Lin; S. Tanaka, Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, *Appl Microbiol Biotechnol*, 69, 627-642, 2006.
- [22] S. Ke; Z. Shi; H.H.P. Fang, Applications of two-phase anaerobic degradation in industrial wastewater treatment. *Int. J. Environment and Pollution* 23 (1), 65-80,

2005.

- [23] X.M. Guo; E. Trably; E. Latrille; H. Carrere; J.P. Steyer, Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int. J. Hydrogen Energy*, 35, 10660-10673, 2010.
- [24] A. Bedoya; J.C. Castrillón; J.E. Ramírez; J.E. Vásquez; M.A. Zabala, Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. *Dyna*, 75, 137-157, 2008.
- [25] M.L. Chong; N.A.A. Rahman; P.L. Yee; S.A. Aziz; R.A. Rahim; Y. Shirai; M.A. Hassan, Effects of pH, glucose and iron sulfate concentration on the yield of biohydrogen by *Clostridium butyricum* EB6. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 8859–8865, 2009.
- [26] S. Wu; L. Xu; R. Wang; X. Liu; Q. Wang, A high yield mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* for photoproduction of hydrogen. *Int. J. Hydrogen Energy*, 36, 14134-14140, 2011.
- [27] P. Kumar; V. Chandra; M. Kumar, *Jatropha curcas* phytotomy and applications: Development as a potential biofuel plant through biotechnological advancements, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 59, 818-838, 2016.
- [28] P. Mukherjee; A. Varshney; T.S. Johnson; T.B. Jha, *Jatropha curcas*: a review on biotechnological status and challenges. *Plant Biotechnol Rep*, 5, 197-215, 2011.
- [29] T.M. Mata; A.A. Martins; N.S. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14, 217-232, 2010.
- [30] G.H. Huang; F. Chen; D. Wei; X.W. Zhang; G. Chen, Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl. Energy*, 87, 38-46, 2010.
- [31] R. Sawangkeaw; K. Bunyakiata; S. Ngamprasertsith, A review of laboratory-scale research on lipid conversion to biodiesel with supercritical methanol (2001–2009). *J. Supercrit. Fluids*, 55, 1-13, 2010.
- [32] I.B. Bankovic-Ilic; O.S. Stamenkovic; V. B. Veljkovic, Biodiesel production from non-edible plant oils. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 16, 3621-3647, 2012.
- [33] M.M. Gui; K.T. Lee; S. Bhatia, Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock, *Energy*, 33, 1646-1653, 2008.
- [34] M. Basili; F. Fontini, Biofuel from *Jatropha curcas*: Environmental sustainability and option value. *Ecol. Econ.* 78, 1-8, 2012.
- [35] Á.A. González; M.K.P. García; G.M.A. Hernández; O.R. Teniente; B.J.L. Solís; C.A.

- Zamarripa, en *Guía para cultivar Piñón Mexicano (Jatropha curcas L.) en Jalisco*. Folleto Técnico Núm. 6 INIFAP-CIRPAC Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México, 2011, 1-43.
- [36] O.R. Teniente; L.M.V. Tapia; A.A. González; A.C. Zamarripa; J.L.B. Solís; B.V. Martínez; M.M Hernández en *Guía técnica para la producción de piñón mexicano (Jatropha curcas L.) en Michoacán*, Folleto Técnico No. 2 SAGARPA. INIFAP-CIRPAC Campo Experimental Valle de Apatzingán. Apatzingán, Michoacán, México 2011, 52.
- [37] E.V.D. Putten; Y.J. Franken; J. Jongh en *Manula de Jatropha*. FACT, Holanda, 2009, 7-14.
- [38] B.J.A. Alfonso, Manual para el cultivo de piñon (*Jatropha curcas*) en Honduras. <http://www.gotaverde.org/userfiles/file/D17c%20Manual%20Cultivo%20Jatropha.pdf>, 2008.
- [39] W.M.J. Achten; W.H. Maes; R. Aerts; L. Verchot; A. Trabucco; E. Mathijs; V.P. Singh; B. Muys, en *Jatropha: From global hype to local opportunity. J. Arid Environ.* 74, 164-165, 2010.
- [40] S. Karaj; J. Müller, Determination of physical, mechanical and chemical properties of seeds and kernels of *Jatropha curcas* L. *Ind. Crops. Prod.* 32, 129-138, 2010.
- [41] T. Leela; B. Naresh; M.S. Reddy; N.Ch. Madhusudhan; P.D. Cherku, Morphological, physico-chemical and micropropagation studies in *Jatropha curcas* L. and RAPD analysis of the regenerants. *Appl. Energy*, 88, 2071-2079, 2011.
- [42] M. Ye; C. Li; G. Francis; H.P.S. Makkar, Current situation and prospects of *Jatropha curcas* as a multipurpose tree in China, *Agroforest Syst*, 76, 487-497, 2009.
- [43] R.K. Henning, en *Jatropha curcas L in Africa*, Global Facilitation Unit of Underutilized Species. http://www.underutilizedspecies.org/Documents/PUBLICATION/jatropha_curcas_africa.pdf, 2004.
- [44] H.J. Martinez; A.L. Martinez; H. Makkar; G. Francis; K. Becker, Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Eur. J. Sci. Res.* 39 (3), 396-407, 2010.
- [45] N. Contran; L. Chessa; M. Lubino; D. Bellavite; P.P. Roggero; G. Enne, State-of-the-art of the *Jatropha curcas* productive chain: From sowing to biodiesel and by-products. *Ind. Crop. Prod.* 42, 202-215, 2013.

- [46] B.N. Divakara; H.D. Upadhyaya; S.P. Wani; C.L.L. Gowda, Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. *Appl. Energy*, 87, 732-742, 2010.
- [47] G. Francis; R. Edinger; K. Becker, A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. *Nat Resour Forum* 29, 12-24, 2005.
- [48] G.P. Kumar; S.K. Yadav; P.R. Thawale; S.K. Singh; A.A. Juwarkar, Growth of *Jatropha curcas* on heavy metal contaminated soil amended with industrial wastes and Azotobacter – A greenhouse study. *Bioresour. Technol.* 99, 2078-2082, 2008.
- [49] S. Mangkoedihardjo; Surahmida, *Jatropha curcas* L. for phytoremediation of lead and cadmium polluted soil. *World Appl. Sci. J.* 4 (4), 519-522, 2008.
- [50] V.C. Pandey; K. Singh; J.S. Singh; A. Kumar; B. Singh; R.P. Singh, *Jatropha curcas*: A potential biofuel plant for sustainable environmental development, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 16, 2870-2883, 2012.
- [51] O.O. Aiyelaagbe; A.A. Hamid; E. Fattorusso; O. Taglialatela-Scafati; H.C. Schroder; W.E.G. Muller, Cytotoxic activity of crude extracts as well as of pure components from *Jatropha* species, plants used extensively in African traditional medicine, eCAM, 1-7, 2011.
- [52] S.B. Mishra; M. Vijayakumar; S.K. Ojha; A. Verma, Antidiabetic effect of *Jatropha curcas* L. leaves extract in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Int.J.Ph.Sci.*, 2 (1), 482-487, 2010.
- [53] H.P.S. Makkar; A.O. Aderibigbe; K. Becker, Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors, *Food. Chem.* 62 (2), 207-215, 1998.
- [54] K. Prueksakorn; S.H. Gheewala; P. Malakul; S. Bonnet, Energy analysis of *Jatropha* plantation systems for biodiesel production in Thailand, *Energy. Sustain. Dev.* 14, 1-5, 2010.
- [55] J. Martínez-Herrera; P. Siddhuraju; G. Francis; G. Dávila-Ortíz; K. Becker, 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, 2006.
- [56] A.A. Abou-Arab; F.M. Abu-Salem, Nutritional quality of *Jatropha curcas* seeds and effect of some physical and chemical treatments on their anti-nutritional factors, *Afr.*

- J. Food Sci*, 4 (3), 93-103, 2010.
- [57] R.K. Devappa; S.K. Rajesh; V. Kumar; H.P.S. Makkar; K. Becker, Activities of *Jatropha curcas* phorbol esters in various bioassays, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 57-62, 2012.
- [58] K.D. Ouwens; G. Francis; Y.J. Franken; W. Rijssenbeek; A. Riedacker; N. Foidl; R. Jongschaap; P. Bindraban, Position paper on *Jatropha curcas* state of the art, small and large scale project development. Position Paper on *Jatropha* and Large Scale Project Development, *FACT*, 1-7, 2007.
- [59] O.L. Pereira; D.C. Dutra; L.A.S. Dias, *Lasiodiplodia theobromae* is the causal agent of a damaging root and collar rot disease on the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, *Australas. Plant Dis. Notes*, 4, 120-123, 2009.
- [60] D.S.N. Aswatha; K.S. Shankarappa; M.R. Govindappa; H.A. Prameela; M.R.R. Gururaj; K.T. Rangaswamy, Natural occurrence of *Jatropha mosaic virus* disease in India, *Curr Sci*, 91 (5), 584-586, 2006.
- [61] N. W. Schaad; J.B. Jones; W. Chun, en *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, APS PRESS, U.S.A., 2001.
- [62] M.L. Rodríguez-Mejía, en *Manual para la identificación de Bacterias fitopatógenas*, Universidad Autonoma Chapingo, Departamento de parasitología agrícola, 2009, 62.
- [63] T.J. Valencia, Identificación y caracterización molecular de los hongos patógenos que afectan a *Jatropha curcas* en el estado de Yucatán, Tesis de Maestría, CICY, México, 2014.
- [64] H.L. Barnett; B.B. Hunter, en *Illustrated genera of imperfect fungi*, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota U.S.A. 1998, 218.
- [65] T. Watanabe, en *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*, 2nd ed. *CRC PRESS*, 2002.
- [66] R. Tapia-Tussell; P. Lappe; M. Ulloa; A. Quijano-Ramayo; M. Cáceres-Farfán; A. Larqué-Saavedra; D. Perez-Brito, A Rapid and simple method for DNA extraction from yeasts and fungi isolated from *Agave fourcroydes*, *Mol Biotechnol*, 33 (1), 67-70, 2006.
- [67] D.J. Sambrook; E. F. Fritsch; T. Maniatis, en *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory, cold spring harbor, N.Y., 2000.
- [68] J. Magnusson; K. Strom; S. Roos; J. Sjogren; J. Schnurer, Broad and complex

- antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol Lett*, 219, 129-135, 2003.
- [69] T.J. White; T. Bruns; S. Lee; J. Taylor, en *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*, M.A. Innis; D.H. Gelfand; J.J. Shinsky; T.J. White (eds).; Academic Press, San Diego, 1990, 315-322.
- [70] C. Torres-Calzada; R. Tapia-Tussell; A. Quijano-Ramayo; R. Martin-Mex; R. Rojas-Herrera; I. Higuera-Ciapara; D. Perez-Brito, A Species-specific polymerase chain reaction assay for rapid and sensitive detection of *Colletotrichum capsici*, *Mol Biotechnol*, 49, 48-55, 2011.
- [71] T.A. Hall, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucleic Acid Symposium Series, 41, 95-98, 1999.
- [72] S.F. Altschul; W. Gish; W. Miller; E.W. Myers; D.J. Lipman, Basic Local Alignment Search Tool, *J Mol Biol*, 215, 403-410, 1990.
- [73] K. Tamura; G. Stecher; D. Peterson; A. Filipski; S. Kumar, MEGA6 : Molecular evolutionary genetics analysis version 6 .0., *Mol Biol Evol*, 30, 2725-2729, 2013.
- [74] N. Saitou; M. Nei, The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol Biol Evol*, 4, 406-425, 1987.
- [75] K. Tamura; M. Nei; S. Kumar, Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 11030-11035, 2004.
- [76] J. Felsenstein, Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap, *Evolution* 39, 783-791, 1985.
- [77] P. Mills; S. Sreenivasaprasad; A.E. Brown, Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiol Lett*, 98, 137-143, 1992.
- [78] C. Torres-Calzada; R. Tapia-Tussell; I. Higuera-Ciapara; D. Perez-Brito, Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L), *Eur J Plant Pathol*, 135, 67-79, 2013.
- [79] R. Tapia-Tussell; A. Quijano-Ramayo; A. Cortes-Velazquez; P. Lappe; A. Larque-Saavedra; D. Perez-Brito, PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L .) in the Yucatan Peninsula, *Mol*

Biotechnol, 40, 293-298, 2008.

- [80] C.P. Buriticá, La familia Phakopsoracea en el Neotrópico III, géneros: *Batistopsora* y *Phakopsora*. *Revista Acad. Colomb. Ci. Exact.* 23, 271-305, 1999.
- [81] G.B. Cummins; Y. Hiratsuka, en *Illustrated genera of rust fungi*, 3rd edn. APS, St. Paul, MN, 2003.
- [82] S. Park; Z.Y. Chen; A.K. Chanda; R.W. Schneider; C.A. Hollier, Viability of *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores under simulated southern Louisiana winter temperature conditions, *Plant Dis*, 92, 1456-1462.
- [83] E. Alves; G.C. Lucas, E.A. Pozza; A.M. Carvalho, en *Scanning electron microscopy for fungal sample examination*, V.K. Gupta; M.G. Tuohy, Eds.; Springer, Heidelberg, 2013, 133-150.
- [84] K. Tiwari; M. Chittora, Assessment of genetic diversity and distribution of endophytic fungal communities of *Alternaria solani* isolates associated with the dominant Karanja plants in Sanganer Region of Rajasthan, *Springerplus*, 2(1), 313, 2013.
- [85] J.L. Parke; D. Gurian-Sherman, Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains, *Ann. Rev. Phytopathol.* 39, 225-58, 2001.
- [86] C.D. Mohr; M. Tomich; C.A. Herfst, Cellular aspects of *Burkholderia cepacia* infection, *Microbes Infect*, 3, 425-435, 2001.
- [87] E. Yabuuchi; Y. Kosako, *Sphingomonas*, *BMSAB*, 1-39, 2015.
- [88] W.H. Burkholder, Sour skin, a bacterial rot of Onion bulbs, *Phytopathology*, 5-9, 1950.
- [89] B.K. Schroeder; J.L. Humann; L.J. du Toit, Effects of postharvest onion curing parameters on the development of sour skin and slippery skin in storage, *Plant Dis*, 96,1548-1555.
- [90] N. Sotokawa; Y. Takikawa, Occurrence of bacterial rot of onion bulbs caused by *Burkholderia cepacia* in Japan, *J. Gen. Plant. Pathol.* 70, 348-352, 2004.
- [91] Y. Fang; B. Li; F. Wang; B. Liu; Z. Wu; T. Su; W. Qiu; G. Xie, Bacterial fruit rot of apricot caused by *Burkholderia cepacia* in China, *Plant. Pathol. J.* 25(4), 429-432, 2009.
- [92] Y.A. Lee; Y.Y. Shiao; C.P. Chao, First report of *Burkholderia cepacia* as a pathogen of banana finger-tip rot in Taiwan, *Plant Dis*, 87(5), 601, 2003.
- [93] C.P. You; M M. Xiang; Y.X. Zhang, First Report of Bacterial Leaf Streak of *Strelitzia*

- reginae* caused by *Burkholderia cepacia*, *Plant Dis*, 98(5), 682, 2014.
- [94] K. Heungens; J.L. Parke, Postinfection biological control of Oomycete pathogens of Pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1, *Phytopathology*, 91, 383-391, 2001.
- [95] J. Hwang; D.M. Benson, Biocontrol of rhizoctonia stem and root rot of Poinsettia with *Burkholderia cepacia* and binucleate *Rhizoctonia*, *Plant Dis*. 86, 47-53.
- [96] A.M. Baron; N. Barouh; B. Barea; P. Villeneuve; D.A. Mitchell; N. Krieger, Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support, *Fuel*, 117, 458-462, 2014.
- [97] Q. You; X. Yin; Y. Zhao; Y. Zhang, Biodiesel production from jatropha oil catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase on modified attapulgit, *Bioresour. Technol.* 148, 202-207, 2013.
- [98] R. Abdulla; P. Ravindra, Immobilized *Burkholderia cepacia* lipase for biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L . oil, *Biomass Bioenergy*, 56, 8-13, 2013.
- [99] K. Kawakami; Y. Oda; R. Takahashi, Application of a *Burkholderia cepacia* lipase-immobilized silica monolith to batch and continuous biodiesel production with a stoichiometric mixture of methanol and crude *Jatropha* oil, *Biotechnol Biofuels*, 4, 42, 2011.
- [100] D.L. Balkwill; J.K. Fredrickson; M.F. Romine, *Sphingomonas* and related genera, *Prokaryotes*, 7, 605-629, 2006.
- [101] H. Mano; F. Tanaka; A. Watanabe; H. Kaga; S. Okunishi; H. Morisaki, Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field, *Microbes. Environ.* 21 (2), 86-100, 2006.
- [102] H. Mano; F. Tanaka; C. Nakamura; H. Kaga; H. Morisaki, Culturable endophytic bacterial flora the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field, *Microbes. Environ.* 22 (2), 175-185, 2007.
- [103] T. Rijavec; A. Lapanje; M. Dermastia; M. Rupnik, Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels, *Can. J. Microbiol.* 53, 802-808, 2007.
- [104] S.S. Videira; J.L. Simoes de Araujo; L.da S. Rodrigues; V.L.D. Baldani; J.I. Baldani, Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil, *FEMS Microbiol Lett*, 293, 11-19, 2009.
- [105] R. Bounaurio; V.M. Stravato; C. Cappelli, Brown spot caused by *Sphingomonas* sp. on yellow Spanish melon fruits in Spain, *Plant Pathol*, 50, 397-401, 2001.

- [106] R. Buonauro; V.M. Stravato; Y. Kosako; N. Fujiwara; T. Naka; K. Kobayashi; C. Cappelli; E. Yabuuchi, *Sphingomonas melonis* sp. nov., a novel pathogen that causes brown spots on yellow Spanish melon fruits, *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, 2081-2087, 2002.
- [107] P. Agarwal; S. Singh; S.G. Mastan, K.G. Vijayanand; P.K. Agarwal; A. Ghosh, Soil microbial diversity shift as affected by conversion of shallow and rocky wastelands to *Jatropha curcas* L. plantation, *Int J Environ Stud*, 1-19, 2015.
- [108] G.B. Cummins, Descriptions of tropical rusts, *Bull Torrey Bot Club*, 64, 39-44, 1937.
- [109] A.P. Viégas, Alguns fungos do Brasil IV. Uredinales. *Bragantia* 5, 1-144, 1945.
- [110] M. Twizeyimana; G.L. Hartman, Culturing *Phakopsora pachyrhizi* on detached leaves and urediniospore survival at different temperatures and relative humidities, *Plant Dis*, 94, 1453-1460, 2010.
- [111] J.R.J. Vieira; C.F. De Freitas; R.R. Barros; A.R. Rostand; A.L. Marcolan; M.L.G. Oliveira; N.R. Dantas; D.S. Da Silva, Ocorrência da ferrugem (*Phakopsora jatrophiicola*) em pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) no Estado de Rondônia, *Embrapa Rondônia* 341, 1-4, 2009.
- [112] C.L. Beadle; S.P. Long, Photosynthesis-is it limiting to biomass production?, *Biomass*, 8, 119-168, 1985.
- [113] H. Chang; L.A. Miller; G.L. Hartman, Melanin-independent accumulation of turgor pressure in appressoria of *Phakopsora pachyrhizi*, *Phytopathology*, 104, 977-984, 2014.
- [114] N.A. Ward; R.W. Schneider; M.C. Aime, Colonization of soybean rust sori by *Simplicillium lanosoniveum*, *Fungal Ecol*, 4 (5), 303-308, 2011.
- [115] G. Fu; S.L. Huang; J.G. Wei; G.Q. Yuan; J.G. Ren; W.H. Yan; Z.L. Cen, First record of *Jatropha podagrica* gummosis caused by *Botryodiplodia theobromae* in China, *Australas. Plant Dis. Notes*, 2, 75-76, 2007.
- [116] S. Srivastava; A. Sinha; C.P. Srivastava, Screening of seed-borne mycoflora of *Jatropha curcas* L., *Res. J. Seed Sci*, 4(2), 94-105, 2011.
- [117] S. Kumar; N. Kaushik, Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity, *PLOS ONE*, 8(2), e56202, 2013.
- [118] P.S. Machado; M. Glen; O.L. Pereira; A.A. Silva; A.C. Alfenas, Epitypification of *Puccinia psidii*, causal agent of guava rust, *Trop. plant pathol.* 40, 5-12, 2015.
- [119] A.R. Machado; D.B. Pinho; O.L. Pereira, Phylogeny, identification and pathogenicity

- of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Divers*, 67, 231-247, 2014.
- [120] N. Dong; X. Liu; Y. Lu; L.P. Du; H. X; H. Liu; Z. Xin; Z. Zhang, Overexpression of *TaPIEP1*, a pathogen-induced ERF gene of wheat, confers host-enhanced resistance to fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana*, *Funct Integr Genomics*, 10, 215-226, 2010.
- [121] A.L. Vu; M.M. Dee, K.D. Gwinn; B.H. Ownley, First report of spot blotch and common root rot caused by *Bipolaris sorokiniana* on switchgrass in Tennessee, *Plant Dis*, 95(9), 1195, 2011.
- [122] J. Kumar; P. Schäfer; R. Hückelhoven; G. Langen; H. Baltruschat; E. Stein; S. Nagarajan; K. Kogel, *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control, *Mol Plant Pathol*, 3, 185-195, 2002.
- [123] D.S. Manamgoda; L. Cai; A.H. Bahkali, E. Chukeatirote; K.D. Hyde, *Cochliobolus*: an overview and current status of species, *Fungal Divers*, 51, 3-42, 2011.
- [124] H. Madrid; K.C. Cunha; J. Gené; J. Dijksterhuis; J. Cano; D.A. Sutton; J. Guarro; P.W. Crous, Novel *Curvularia* species from clinical specimens, *Persoonia*, 33, 48-60, 2014.
- [125] D.S. Manamgoda; A.Y. Rossman; L.A. Castlebury; E. Chukeatirote; K.D. Hyde, A taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (*Pleosporaceae*): human and plant pathogens, *Phytotaxa*, 212 (3), 175-198, 2015.
- [126] S. Masumi; S. Mirzaei; R. Kalvandi; D. Zafari, Asparaginase and amylase activity of thyme endophytic fungi, *J. Crop Prot.* 3 (Supplementary), 655-662, 2014.
- [127] B.D. Sun; A.J. Chen; W.W. Gao; Y.G. Zhou; H.Y. Liu, Endophytic fungi associated with the medicinal plant, *Achyranthes bidentata* Blume (Amaranthaceae). *Afr. J. Microbiol. Res*, 7(15), 1357-1365, 2013.
- [128] H.L. Walker; J.C. White, *Curvularia cymbopogonis*, a pathogen of itchgrass (*Rottboellia exaltata*) in southern Louisiana, *Plant Dis Rep*, 63(8), 642-644, 1979.
- [129] J.I. Yago; J.H. Roh; S. Bae; Y.N. Yoon; H.J. Kim; M. Nam, The effect of seed-borne mycoflora from sorghum and foxtail millet seeds on germination and disease transmission, *Mycobiology*, 39(3), 206-218, 2011.
- [130] L.J. Dixon; R.L. Schlub; K. Pernezny; L.E. Datnoff, Host specialization and

- phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*, *Phytopathology*, 99, 1015-1027, 2009.
- [131] J.H. Park; M.J. Park; S.H. Lee; C.K. Lee; H.D. Shin, First report of corynespora leaf spot on beach vitex caused by *Corynespora cassiicola* in Korea, *Plant Dis*, 97 (11), 1512, 2013.
- [132] B.J. Li; J.X. Chuan; M. Yang; G.F. Du, First report of corynespora leaf spot caused by *Corynespora cassiicola* on gynura in China, *Plant Dis*, 98(11), 1007, 2014.
- [133] F. Mahmodi; J.B. Kadir; A. Puteh; M.Y. Wong; A. Nasehi, First report of pod and stem blight of lima bean caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* in Malaysia, *Plant Dis*, 97(2), 287, 2013.
- [134] S. Sun; K. Van; M.Y. Kim; K.H. Min; Y.W. Lee; S.H. Lee, *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, a causal agent for both stem canker and seed decay on soybean, *Plant Pathol J*, 28(1), 55-59, 2012.
- [135] D. Udayanga; L.A. Castlebury; A.Y. Rossman; E. Chukeatirote; K.D. Hyde, The *Diaporthe sojae* species complex: Phylogenetic re-assessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops, *Fungal Biol.* 119, 383-407, 2015.
- [136] A.M. Ismail; G. Cirvilleri; G. Polizzi, Characterisation and pathogenicity of *Pestalotiopsis uvicola* and *Pestalotiopsis clavispورا* causing grey leaf spot of mango (*Mangifera indica* L.) in Italy, *Eur J Plant Pathol*, 135, 619-625, 2013.
- [137] L.M. Lu; G.Q. Chen; X.R. Hu; D.C. Du; Z.X. Pu; A.T. Peng; B.P. Cheng, Identification of *Pestalotiopsis clavispورا* causing brown leaf spot on Chinese bayberry in China, *Can J Plant Pathol*, 37(3), 397-402, 2015.
- [138] M. Chamorro; A. Aguado; B. De los Santos, First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispورا* (*Neopestalotiopsis clavispورا*) on Strawberry in Spain, *Plant Dis*, Posted online, 2016.
- [139] Y.R. Feng; B.S. Liu; B.B. Sun, First report of leaf blotch caused by *Pestalotiopsis clavispورا* on *Rosa chinensis* in China, *Plant Dis*, 98(7), 1009, 2014.
- [140] S.S.N. Maharachchikumbura; K.D. Hyde; J.Z. Groenewald; J. Xu; P.W. Crous *Pestalotiopsis* revisited, *Stud Mycol*, 79, 121-186, 2014.
- [141] A.S. Mahmad; Z.A. Mior; M.Y. Wong, First report of *Exserohilum rostratum* as pathogen of rice brown spot in Malaysia, *Plant Dis*, 100(1), 226, 2016.
- [142] S.H. Lin; S.L. Huang; Q.Q. Li; C.J. Hu; G. Fu; L.P. Qin; Y.F. Ma; L. Xie; Z.L. Cen;

- W.H. Yan, Characterization of *Exserohilum rostratum*, a new causal agent of banana leaf spot disease in China, *Australas Plant Pathol*, 40, 246-259, 2011.
- [143] D. Wu; B.G. Turgeon, *Setosphaeria rostrata*: Insights from the sequenced genome of *Setosphaeria turcica*, *Fungal Genet. Biol.* 61, 158-163, 2013.
- [144] T. Aoki; K. O'Donnell; D.M. Geiser, Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges, *J Gen Plant Pathol*, 80(3), 189-201, 2014.
- [145] G. Castella; F.J. Cabañes, Phylogenetic diversity of *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex isolated from Spanish wheat, *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(2), 309-317, 2014.
- [146] S.A. Palacios; A. Susca; M. Haidukowski; G. Stea; E. Cendoya; M.L. Ramírez; S.N. Chulze; M.C. Farnochi; A. Moretti; A.M. Torres, Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* isolated from durum wheat grains in Argentina, *Int. J. Food Microbiol.* 201, 35-41, 2015.
- [147] S. Sharma; J.C. Kaushik; N. Kaushik, *Fusarium moniliforme* causing root rot of *Jatropha*, *Indian Phytopathol*, 54, 275-277, 2001.
- [148] D. Palmero; M. de Cara; C. Iglesias; L. Gálvez; J.C. Tello, Comparative study of the pathogenicity of seabed isolates of *Fusarium equiseti* and the effect of the composition of the mineral salt medium and temperature on mycelial growth, *Braz J Microbiol*, 42, 948-953, 2011.
- [149] P. Marín; M. Jurado; M.T. González-Jaén, Growth rate and TRI5 gene expression profiles of *Fusarium equiseti* strains isolated from Spanish cereals cultivated on wheat and barley media at different environmental conditions, *Int. J. Food Microbiol.* 195, 40-47, 2015.
- [150] E.A. Aguilera-Cauich; D. Pérez-Brito; A. Navarrete; G. López-Puc; G. Castañón; J. Sacramento; C. Rubio; A. Uc-Vázquez; C. Góngora-Canul; J.O. Mijangos-Cortes, Assessment of phenotypic diversity and agronomic contrast in American accessions of *Jatropha curcas* L., *Ind Crops Prod*, 77, 1001-1003, 2015.



Ultrastructural characterization of *Phakopsora jatrophiicola* pathogen of *Jatropha curcas* in Yucatan, Mexico

Caracterización ultraestructural de *Phakopsora jatrophiicola* patógeno de *Jatropha curcas* en Yucatán, México

Abril Díaz-Braga, Raul Tapia-Tussell, Tanit Toledano-Thompson*, Rodolfo Martín-Mex, Ángel Nexxicapan-Garcéz, Andrés Quijano-Ramayo, Daisy Pérez-Brito

*Laboratorio Gel/Etío, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 43 # 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida 97200, Yucatán, México.

†Unidad de Energía Renovable, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 43 # 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida 97200, Yucatán, México.

RESUMEN

El piñón (*Jatropha curcas*) ha sido considerado a nivel mundial como una fuente de aceite, a partir de sus semillas, para la producción de biocombustible. En Yucatán, México, este cultivo ha sido afectado por la roya causada por *Phakopsora jatrophiicola* (syn. *P. arthuriana*), un hongo biotrófico obligado, que se ha convertido en una limitación importante en la obtención de los rendimientos esperados. Actualmente, poco se conoce sobre la biología de *P. jatrophiicola*. Dado que no existen estudios previos a nivel de la morfología ultramicroscópica, en este trabajo se realizó el primer estudio de microscopía electrónica de barrido (MEB) de esta especie y un bioensayo en hojas individuales de *J. curcas*, con el fin de probar la infectividad de las esporas. El análisis de MEB reveló uredias erumpentes con 25 a 35 µm de diámetro de poro abierto, que contenían urediniosporas equinuladas de 23 µm largo x 11 µm de ancho. Además, las esporas colectadas de las hojas de piñón, fueron capaces de producir nuevas pustulas después de 13 días de la inoculación en hojas sanas separadas de *J. curcas*. Estos resultados proporcionan las bases para futuras investigaciones de esta interacción hospedero-patógeno, y pueden ser útiles en el desarrollo de nuevos métodos moleculares para el diagnóstico de esta especie.

PALABRAS CLAVE: microscopio electrónico de barrido, urediniosporas, roya, piñón.

ABSTRACT

Physic nut (*Jatropha curcas*) has been considered worldwide as a source of seed oil for the production of biofuel. In Yucatan, Mexico, this crop has been affected by rust caused by *Phakopsora jatrophiicola* (syn. *P. arthuriana*), an obligate biotrophic fungus, which has become a major constraint in obtaining expected yields. Currently, little is known about the biology of *P. jatrophiicola*. Since there are no previous studies at ultramicroscopic morphology level, we conducted the first Scanning electron microscopy (SEM) examination of this species and a bioassay on *J. curcas* detached leaves in order to test the spore infectivity. SEM analysis revealed erumpent uredinia with 25 to 35 µm diameter open pore, containing 23 µm length x 11 µm wide equinulated urediniospores. Moreover, spores harvested from Physic nut leaves were able to produce new pustules after 13 days of inoculation on healthy detached *J. curcas* leaves. These results provide the basis for further researches of this host-pathogen interaction, and may be useful in the development of new molecular methods for diagnostic of this specie.

KEYWORDS: scanning electron microscopy, urediniospores, rust, physic nut.

Recibido / Received: 14/12/2015

Aceptado / Accepted: 02/05/2016

Autor para correspondencia / Corresponding author:

Daisy Pérez Brito
daisy pb@cicy.mx