



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**EVALUACION DE LOS ÉSTERES DE FORBOL DE VARIANTES
TÓXICAS Y NO TÓXICAS de *Jatropha curcas* L. COMO
AGENTES ANTIFÚNGICOS.**

TESIS.

PARA OBTENER TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO.

P R E S E N T A:

HOMERO MAYO HERMENEGILDO

DIRECTOR: DOCTOR EN CIENCIAS. FRANCISCO J. ESPINOSA GARCÍA.

CO-ASESOR: BIOLOGA. YOLANDA M. GARCÍA RODRÍGUEZ.

Morelia, Michoacán, Marzo 2014



DEDICATORIAS

Este logro va dedicado a mis padres, pilares fundamentales en mi vida a quienes agradezco por darme la vida, por su apoyo moral, dedicación, orientaciones, esfuerzos, sacrificios y comprensión en todo momento de mi formación profesional.

A mis hermanos por todo su apoyo, esfuerzo y confianza en especial a Enrique quien fue la persona que influyó mucho para que este logro llegara.

A mi esposa y mi hijo quienes fueron la fuente de inspiración, dedicación y de superación.

A mis amigos quienes estuvieron siempre a mi lado para compartir momentos increíbles, sueños, esperanzas y anhelos convertidos en realidad.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Francisco J. Espinosa García por haberme brindado la oportunidad de trabajar con él y por todo el apoyo que me brindó.

Este trabajo fue realizado con apoyo del Proyecto PAPIIT IT215511-3 del Dr. Francisco J. Espinosa García “*La función de diversidad de los MS defensivos y la prospección de inhibidores de contradefensas de organismos resistentes a xenobioticos*”; también fue apoyado por el Centro de Investigaciones en Ecosistemas de la UNAM a través de POFJEG.

“Tesis apoyada por el Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán”.

A la Biól. Yolanda M. García Rodríguez por la revisión de mi trabajo y por sus valiosas aportaciones y por todo el tiempo que me dedicó al resolverme las dudas que me surgieron en el proceso de mi trabajo y por la gran persona que es.

A la Dra. Lupita por la revisión de mi trabajo y sus valiosas aportaciones y por la gran persona que es.

Al Q.F.B Ernesto y a la M.C Cinthya por haberme ayudado con la revisión de la tesis.

A Yesenia Martínez Díaz por la ayuda que me brindó en el proceso de realización de la tesis, revisión y por sus aportaciones a mi trabajo.

Al Dr. Josué Altamirano Hernández y a la Dra. Lourdes Macías Rodríguez por haberme ayudado con el análisis de los ésteres de forbol por HPLC.

Al Ing. Héctor Rómulo Rico Ponce del INIFAP Campus Apatzingán por haberme proporcionado las semillas de *Jatropha curcas* que fueron de gran ayuda en mi trabajo.

A mis compañeros Celso, Maricruz, Fátima, Judith, Ángel y Lupita, quienes hicieron que el trabajo fuera más fácil y a quienes le pedí ayuda en más de una ocasión. Muchas gracias por su amistad.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRAC.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 Taxonomía.....	13
2.2 Nombres comunes.....	13
2.3 Descripción botánica.....	13
2.4 Distribución geográfica.....	14
2.5 Problemática en México.....	15
2.6 Los extractos de la plantas como agentes de biocontrol.....	15
2.7 Los ésteres de forbol.....	17
2.8 Plagas de <i>J. curcas</i>	20
2.9 Enfermedades más comunes en <i>J. Curcas</i>	21
2.10 Hongos que atacan <i>Jatropha curcas</i> L y al maíz.....	21
2.10.1 <i>Pythium ultimum</i>	21
2.10.2 <i>Phytophthora capsici</i>	22
2.10.3 <i>Phoma herbarum</i>	24
2.10.4 <i>Fusarium moniliforme</i>	24
3. HIPÓTESIS.....	26
3.1 Pregunta.....	26
3.2 Predicción.....	26

4. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivo específicos	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 Extracción de aceites por el método de soxhlet	27
5.2 Extracción de ésteres de forbol (EF)	28
5.3 Método para la cuantificación de los ésteres de forbol por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	28
5.4 Método de cálculo de la concentración de los ésteres de forbol	29
5.5 Hongos que atacan a <i>Jatropha curcas</i>	30
5.6 Aislamiento de hongos que atacan al maíz	30
5.7 Preparación de medios de cultivos y resiembra de hongos	31
5.8 Experimentos y toma de datos	32
5.9 Análisis estadísticos	33
6. RESULTADOS	34
7. DISCUSIÓN	42
8. CONCLUSIONES	45
9. BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Análisis de varianza del efecto de los ésteres de forbol y el tipo de hongo en el crecimiento de <i>Pythium ultimum</i> , <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Phoma herbarum</i> y <i>Fusarium moniliforme</i>	34
Tabla 2. Análisis de varianza del efecto de los ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de <i>Pythium ultimum</i>	36
Tabla 3. Análisis de varianza del efecto de los ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de <i>Phytophthora capsici</i>	38
Tabla 4. Análisis de varianza del efecto de los ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de <i>Phoma herbarum</i>	39
Tabla 5. Análisis de varianza del efecto de los ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de <i>Fusarium moniliforme</i>	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Ésteres de forbol presentes en <i>Jatropha curcas</i> : (A) Tigliano, (B) Deoxi-16-hidroxi-forbol, (C) 12- Deoxi-16-hidroxi-forbol-4%-[12%,14%-butadienil]-6%-[16%,18%,20% -nonatrienil]-biciclo [3.1.0] hexano-(13-O)-2% -[carboxilato]-(16-O)-3%-[8%-butenoico-10%] ate (DHPB) y (D) moléculas identificadas como ésteres de forbol (Haas & Mittelbach, 2000).....	19
Fig. 2 Síntesis de diterpenos.....	20
Fig. 3 Extracción de aceites por el método de soxhlet: <i>Jatropha curcas</i> (A) y aceite (B).....	27
Fig. 4 Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) utilizado para la cuantificación de los ésteres de forbol.....	29
Fig. 5 Cromatograma del estándar (forbol-12-miristato 13-acetato).....	29
Fig. 6 Cromatograma de la muestra de <i>Jatropha curcas</i>	30
Fig. 7 Hongos aislados de granos de maíz: <i>Fusarium moniliforme</i> (A) y <i>Phoma herbarum</i> (B).....	31
Fig. 8 Tratamientos de los hongos (A) y crecimiento de hongos en condiciones controladas (B).....	32
Fig. 9 Efecto de los ésteres de forbol y el tipo de hongo en el crecimiento de <i>Pythium ultimum</i> , <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Phoma herbarum</i> y <i>Fusarium moniliforme</i> ($F_{(9,64)}=2.6077$, $p=0.01246$).....	35

Fig. 10 Comparación de testigo con el control (+) benomil.....	37
Fig. 11 Efecto de la concentración de ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de <i>Pythium ultimum</i> ($F_{(6,48)}=2.0511$, $p=0.07684$).....	36
Fig. 12 Efecto de la concentración de ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de <i>Phytophthora capsici</i> . ($F_{(9,64)}=3.8742$, $p=0.00058$).....	38
Fig. 13 Efecto de la concentración de ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de <i>Phoma herbarum</i> . ($F_{(9,64)}=0.76784$, $p=0.64615$).....	39
Fig. 14 Efecto de la concentración de ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de <i>Fusarium moniliforme</i> . ($F_{(9,64)}=2.7566$, $p=0.00$).....	41

RESUMEN

Jatropha curcas (Euphorbiaceae) es una especie nativa de México y Centroamérica que crece en regiones tropicales, tanto en suelos bien drenados como en áreas pedregosas, poco fértiles y con bajo contenido de nutrientes. Su uso permite recuperar nutrientes, restaurar y rehabilitar suelos afectados por la erosión y mejorar la captura de carbono por el suelo.

Jatropha curcas se está utilizando como fuente alternativa para la obtención de biodiesel por su alto contenido de aceite en sus semillas (50-60%), por eso, se está cultivando en diferentes partes del mundo y en México.

En México existen dos variantes de *J. curcas*: la tóxica y no tóxica. Lo que caracteriza a la tóxica son concentraciones elevadas de ésteres de forbol (EF) y la no tóxica tiene una baja concentración de estos compuestos químicos.

El cultivo de variantes tóxicas impide el uso forrajero de los residuos (llamados “torta”) que quedan después de la extracción del aceite de las semillas. En promedio, el 70% de todos los EF son retenidos en el aceite y el resto se encuentra en la torta. La eliminación de los EF de la torta es muy costosa, por lo que se está evaluando la posibilidad de sembrar la variedad no tóxica para aumentar la rentabilidad del cultivo. Sin embargo, se ha observado que las plantas no tóxicas parecen más sensibles a las enfermedades fungosas que las plantas tóxicas.

En este trabajo se probó la hipótesis de que los ésteres de forbol (EF) están asociados a la resistencia a los hongos o pseudohongos fitopatógenos, por lo que se probó la predicción de que los EF inhiben *in vitro* el crecimiento de hongos fitopatógenos con mayor magnitud a medida que se aumenta su concentración.

Se aislaron EF de semillas de *J. curcas* tóxica y se cuantificaron por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Varias concentraciones de EF, de 0 a 1 mg/mL, se incorporaron en medios de cultivo que se inocularon con micelio de fitopatógenos: *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Phoma herbarum* y *Fusarium moniliforme*. Las dos primeras especies han sido reportadas como fitopatógenas en plantaciones de *J. curcas*.

Se encontró que mientras mayor fue la concentración de EF en el medio de cultivo, mayor fue la inhibición en todas las especies fitopatógenas probadas. Se concluye que los EF tienen actividad antifúngica *in vitro*, por lo que se sugiere corroborar *in vivo* esta actividad, y de corroborarse, recomendar sembrar variantes tóxicas en ambientes favorables para fitopatógenos y variantes no tóxicas en ambientes desfavorables para los hongos o pseudohongos patógenos.

Palabras claves: ésteres de forbol, *Jatropha curca*, agentes antifúngicos.

ABSTRACT

Jatropha curcas (Euphorbiaceae) is a species native to Mexico and Central America that grows in tropical regions, both well drained and stony areas , low fertility and low nutrient soils. Its use to retrieve nutrients, restore and rehabilitate land affected by erosion and improving carbon sequestration by the soil .

Jatropha curcas is being used as an alternative source for biodiesel production for its high oil content seeds (50-60 %) , therefore, being grown in different parts of the world in Mexico and .

In Mexico there are two variants of *J. curcas* : toxic and nontoxic. What characterizes high concentrations are toxic phorbol esters (EF) and has a low non-toxic concentrations of these chemicals .

Culturing prevents toxic variants utilizing waste feed (called " cake ") that remain after the extraction of oil from seeds. On average , 70 % of all EF are retained in oil and the rest is in the cake. Eliminating EF cake is very expensive, so it is considering planting nontoxic variety to increase the profitability of farming . However, it was observed that the non-toxic plants seem more susceptible to the toxic plants to fungal diseases .

In this paper hypothesizes that phorbol esters (EF) are related to the resistance to phytopathogenic fungi or pseudofungi tested , so that prediction EF inhibit in vitro the growth of phytopathogenic fungi and higher magnitude tested as its concentration is increased.

EF toxic *J. curcas* seed were isolated and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). EF various concentrations of from 0 to 1 mg / mL, were added in culture media were inoculated with mycelium of phytopathogenic : *Pythium ultimum* , *Phytophthora capsici* , *Phoma herbarum* and *Fusarium moniliforme* . The first two species have been reported as phytopathogenic *J. curcas* plantations .

It was found that the higher the concentration of EF in the culture medium , the greater the inhibition in all species tested phytopathogenic . We conclude that EF have antifungal activity in vitro , so it is suggested to corroborate this activity in vivo , and corroborated , recommend planting in favorable variants toxic and nontoxic plant pathogenic variants in unfavorable environments for fungi or pathogens pseudofungi environments.

Keywords : phorbol esters, *Jatropha curcas* , antifungal agents .

1. INTRODUCCIÓN.

Jatropha curcas L. es de la familia Euphorbiaceae. En México es conocida como piñón o piloncillo, y en Centroamérica se lo conoce como tempate. Esta planta crece en regiones tropicales, en suelos bien drenados así como en áreas pedregosas, poco fértiles y con bajo contenido de nutrientes, permite recuperar nutrientes, restaurar y rehabilitar suelos afectados por la erosión y mejorar la captura de carbono por el suelo (Heller, 1996). Se considera nativa de México y países de América Central (Makkar y Becker, 1999).

Jatropha curcas es utilizada como fuente alternativa para la obtención de biodiesel por su alto contenido de aceite en sus semillas (50-60%) por eso se están realizando cultivos en diferentes partes del mundo incluyendo a México.

La *torta* que resulta de la extracción de aceite de las semillas, es comúnmente utilizada para fertilización pero tiene alto potencial para uso en la alimentación de ganado, ya que es alta en proteína (50-58%) (Wink *et al* 1997). La toxicidad de la semilla puede ser causada por varios componentes incluyendo lectinas, saponinas, inhibidores de proteasas, ácido curcalónico y ésteres de forbol. De los cuales las lectinas y los inhibidores de proteasas son vulnerables a tratamientos térmicos y los ésteres de forbol y saponinas presentan mayor resistencia a altas temperaturas (160°C) (Aregheore *et al* 2003). De estos los que más contribuye a la toxicidad de la semilla, el aceite y la *torta* son los ésteres de forbol (Wink *et al* 1997). Han sido caracterizados seis tipos de ésteres de forbol (EF), todos ellos con esqueleto básico de tigliano con cuatro anillos, la hidroxilación de esta estructura en diferentes posiciones y la unión de ésteres de varios grupos de ácidos resultan en la formación de los EF (Goel *et al* 2007).

En México existen dos variantes de *J. curcas*, la tóxica y no tóxica. Lo que caracteriza a las dos variantes es que la tóxica contiene concentraciones elevadas de EF y la variante no tóxica, tiene una baja concentración de estos compuestos químicos (Haas *et al.*, 2000).

El cultivo de variantes tóxicas impide el uso forrajero de los residuos (llamados “torta”) que quedan después de la extracción del aceite de las semillas. En promedio, el 70% de todos los EF son retenidos en el aceite y el resto se encuentra en la torta. La eliminación de los EF de la torta es muy costosa, por lo que se está evaluando la posibilidad de sembrar la variedad no tóxica para aumentar la rentabilidad del cultivo. Sin embargo, hay observaciones no publicadas indicando que las plantas no tóxicas parecen más sensibles a las enfermedades fungosas que las plantas tóxicas (Ingrid García y Yesenia Martínez, comunicación personal).

Existen varias hipótesis sobre la defensa vegetal en las que se trata de explicar la función y origen de la diversidad química de los metabolitos secundarios. Una de ellas postula que cuando existe una mayor diversidad química, existe una alta protección de la planta; (Berenbaum, 1985; Kubo y Hanke 1985; Jones y Lawton 1991; Jones y Firns 1991). Esto implica que el incremento de la presión de consumidores favorece una mayor diversidad. En esta hipótesis se supone que cada metabolito funciona contra algún consumidor o bien que las mezclas interaccionan en forma aditiva o sinérgica potenciando su actividad biológica y ampliando su espectro de acción contra los consumidores (Berenbaum, 1985; Anaya *et al* 2001).

La defensa de las plantas es costosa ya que se invierten recursos en algunos compuestos que pueden ser utilizados para el crecimiento o la reproducción (Rhoades, 1979). Por lo anterior, se supone que las variantes no tóxicas de *J. curcas* podrían crecer más rápido que las variantes tóxicas, pero entonces la protección contra hongos que ofrecerían los EF sólo se observaría en las variantes tóxicas.

Aunque los EF hasta ahora solo se han aislado de frutos y semillas de *J. curcas*, suponemos que las variantes tóxicas también presentan estos compuestos en las hojas, pues los terpenoides solo se sintetizan en el tejido foliar y las hojas de variantes tóxicas son usadas como antifúngicas (Makkar y Becker, 2009). En este trabajo se utilizaron los EF extraídos del aceite de las semillas de *J. curcas* y cuatro especies de fitopatógenos, dos de los cuales se reportan como atacantes de *J. curcas*.

El propósito del presente estudio es probar si los EF tienen actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos: *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Phoma herbarum* y *Fusarium moniliforme*. Las dos primeras especies han sido reportadas como fitopatógenas en plantaciones de *J. curcas*.

La importancia de este trabajo es explicar la interacción que hay entre los EF como parte de la defensa de *J. curcas* y los hongos fitopatógenos. Además también se pueden hacer recomendaciones que permitan obtener mayor rendimiento en los cultivos de *J. curcas* afectados por hongos fitopatógenos. Una práctica de manejo para estos cultivos sería la de asperjar EF en las hojas de *J. curcas*, en concentraciones de las variantes tóxicas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Taxonomía. Reino: Plantae. Subreino: Tracheobionta. División: Magnoliophyta. Clase: Magnoliopsida. Subclase: Rosidae. Orden: Euphorbiales. Familia: Euphorbiaceae. Género: *Jatropha* L. Especie: *Jatropha curcas* L. (Trópicos 2009).

2.2 Nombres comunes. En México se conoce con los nombres de piñón, piñoncillo, cuipuy, piñón de Indias, piñón purgante, cuauhayohuachtli, almendra de calabaza arbórea ahsti, pistache mexicano, habillo, yaga-be-lape (zapoteca), sikli-te, zikil-te o sikilte (náhuatl) (Hernández-Aponte *et al.* 1978; Cano-Asseleih y Hernández-Aponte 1984; Schmook y Sánchez-Sánchez 2000).

2.3. Descripción botánica

J. curcas es un arbusto o árbol pequeño, de crecimiento rápido que alcanza en promedio 6m de altura; su corteza es blanco grisácea y exuda un látex translucido color ámbar o rojizo viscoso. Los tallos son cilíndricos, verdes robustos que producen ramas con savia lechosa o rojiza viscosa. Se forman 5 raíces de cada arbusto, 1 central y 4 periféricas. Las hojas son ovadas con 5 a 7 lóbulos pocos profundos y grandes. Tienen peciolo largos con una longitud de 10 a 15 cm; anchura de 9 a 15 cm, ovadas. Hay flores masculinas y femeninas en la misma planta algunas son hermafroditas, se forman en el lado axial del peciolo, formando una inflorescencia compuesta a manera de panícula. Las flores son pequeñas de 6-8 mm de largo, son blanquecinas, verdoso amarillentas (Pabón y Hernández-Rodríguez 2012). Los frutos son cápsulas drupáceas ovoides y lisas, de color verde que cuando maduran cambian a amarillas. El desarrollo del fruto necesita 90 días desde la floración hasta que madura la semilla. El fruto produce tres almendras negras (Pabón y Hernández-Rodríguez 2012).

2.4. Distribución geográfica

En la república mexicana *J. curcas* L. se encuentra en forma silvestre en los estados: Sinaloa, Oaxaca, Quintana Roo, Veracruz, Yucatán, Morelos, Sonora, Tamaulipas, Chiapas, Hidalgo, Puebla, Guerrero y Tabasco (Heller 1996). Su dispersión en Sudamérica abarca Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Galápagos, Paraguay, Perú y Venezuela, llegando a la Argentina (Heller 1996).

A nivel mundial hay grandes extensiones de tierras de cultivos degradados disponibles para hacer plantaciones extensivas de *J. curcas*, sin embargo no se puede poner en peligro la seguridad alimentaria a costo de producir bioenergía. Por otro lado, se sabe que el establecimiento de *J. curcas* en estas zonas, reduce las emisiones de gases de efecto invernadero y crea oportunidades para los trabajadores rurales.

Al contrario de otros biocombustibles, el uso de *J. curcas* representa verdaderas ventajas (tiene una excelente capacidad de adaptación a una gran variedad de condiciones del suelo y climas). Se encuentra prosperando en suelos secos, pedregosos, muy poco profundos y entre rocas desnudas en las islas de Cabo Verde (África).

Jatropha está adaptada a condiciones de baja a muy baja fertilidad del suelo, y a deficiencia de minerales, es resistente a sequías prolongadas, inundaciones y heladas ligeras. La producción de aceite es mayor que las fuentes convencionales de biocombustibles, como el maíz y caña de azúcar (Azan *et al.*, 2005; Chelmicki y Varnhagen 1841; Ávila 1949; Livingston y Zamora 1983). La temperatura que necesita para un buen crecimiento es de 25 a 35.7 °C, pero puede ser encontrada en temperaturas por encima de los 40.7 °C (Martin y Mayeux, 1984.)

2.5. Problemática en México

Los hongos fitopatógenos, a nivel mundial, causan pérdidas que ascienden a miles de millones de dólares al año dañando cultivos de importancia económica como tomate, frijol, pimienta, papa y calabaza, por mencionar algunos (National Academy of Science 1980).

En México se produce una gran variedad de cultivos, entre los que destacan la caña de azúcar, maíz, sorgo, naranja, trigo, plátano, jitomate, limón y papa, entre otros, siendo esta actividad de gran importancia alimentaria y económica. No obstante, los problemas asociados por microorganismos fitopatógenos producen grandes pérdidas en estos cultivos (Benítez *et al.*, 2005).

La solución a este problema comprende la aplicación de plaguicidas, y fungicidas, que permiten la protección de los cultivos contra plagas y enfermedades. Sin embargo, el uso de productos químicos ha tenido efectos negativos sobre el ambiente, relacionados con la calidad de vida de las poblaciones humanas. Además, se ha demostrado que su eficacia puede ser de corta duración y que algunas plagas y patógenos pueden hacerse resistentes a ellos (López *et al.*, 2005).

2.6. Los extractos de plantas como agentes de biocontrol

Los extractos de plantas pueden actuar como agentes para el control biológico de plagas y enfermedades. Es decir algunos extractos vegetales poseen actividad antimicrobiana y antifúngica que no perjudican, sino por el contrario favorecen la producción o el rendimiento de las cosechas. Entre ellos se encuentran los extractos de cáscara de nuez (Weerasena *et al.*, 1993), aceites esenciales de orégano y canela (García-Camarillo *et al.*, 2006) y los extractos de aceites de semillas y hojas de *J. curcas* (Liu *et al.*, 1997; Meshram *et al.*, 1996; Nwosu y Okafor, 1995; Rug y Ruppel 2000; Solsoloy y Solsoloy, 1997)

El látex de *J. curcas* es un antiséptico y analgésico para heridas en algunas partes de Asia; la raíz se utiliza como antídoto para la mordedura de serpiente; en África, el núcleo de la planta se utiliza para la interrupción de embarazos no deseados. Las hojas se utilizan en Nigeria contra la tiña; esta enfermedad es causada por hongos. Lo que indica que las hojas tienen efecto contra hongos y posiblemente los EF son los causantes del efecto. Las variedades no tóxicas se utilizan en la elaboración de platillos tradicionales y en medicina tradicional en México (Devappa *et al.*, 2010). Los órganos de *J. curcas* se pueden utilizar para una amplia gama de propósitos, por ejemplo el aceite de semillas de *J. curcas* que ha sido utilizado durante décadas para la elaboración de jabón en Mali y otros países africanos, puede actuar como antimicrobiano (Eshilokun *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2004; Onuh *et al.*, 2008; Alyelaagbe *et al.*, 2007.)

Por ejemplo los extractos metanólicos de semillas y hojas han mostrado propiedades molusquicidas, insecticidas y fungicidas (Liu *et al.*, 1997; Meshram *et al.*, 1996; Nwosu y Okafor, 1995; Rug y Ruppel 2000; Solsoloy y Solsoloy, 1997). Por ejemplo, se reporta que el extracto metanólico de semillas de *J. curcas* fue capaz de inhibir el crecimiento micelial de *Colletotrichium musae*, que causa la enfermedad de la antracnosis del plátano (Thangavelu *et al.*, 2004). También mostró efecto insecticida contra *Busseola fusca*, *Sesamia calamistis* (Mengual *et al.*, 1997) *Lipaphis erysimi* (Li *et al.*, 2004) *Sitophilus zeamays*, *Callosobruchus chinensis* (Solsoloy y Solsoloy, 1997). También se reporta que su extracto metanólicos foliar detiene el crecimiento de *Sclerotium sp.*, hongo patógeno que causa la enfermedad de Azolla en el cultivo del arroz (García y Lawas, 1990).

Las semillas de *J. curcas* tienen otros compuestos químicos que también son defensivos como fitatos, lectinas, taninos, saponinas, glucósidos cianógenos, saponinas, inhibidores de tripsina, alcaloides e inhibidores de proteasa (Enneking y Wink, 2000). Sin embargo son los EF a los que se les atribuye la principal toxicidad que causa envenenamiento en el ser humano (Haas *et al.*, 2000).

Se han reportado actividad biológica de diferentes compuestos extraídos de *J. curcas*, por ejemplo, la curcina extraída de las semillas puede tener efecto antitumoral (Lin *et al.*, 2003) y antifungico (Wei *et al.*, 2004). También se ha reportado el efecto de un compuesto sintetizado a partir de los EF, el anti-VIH del 12-deoxyfobol-13-fenilacetato de metilo, que puede inhibir la entrada del VIH en la célula blanco (Wender *et al.*, 2008). Las semillas de *J. curcas* contienen concentraciones de EF, que van desde menos de 1 mg/g a más de 7 mg/g. En promedio, el 70% de todos los EF son retenidos en el aceite y el resto se encuentran en la harina (Makkar y Becker, 2009).

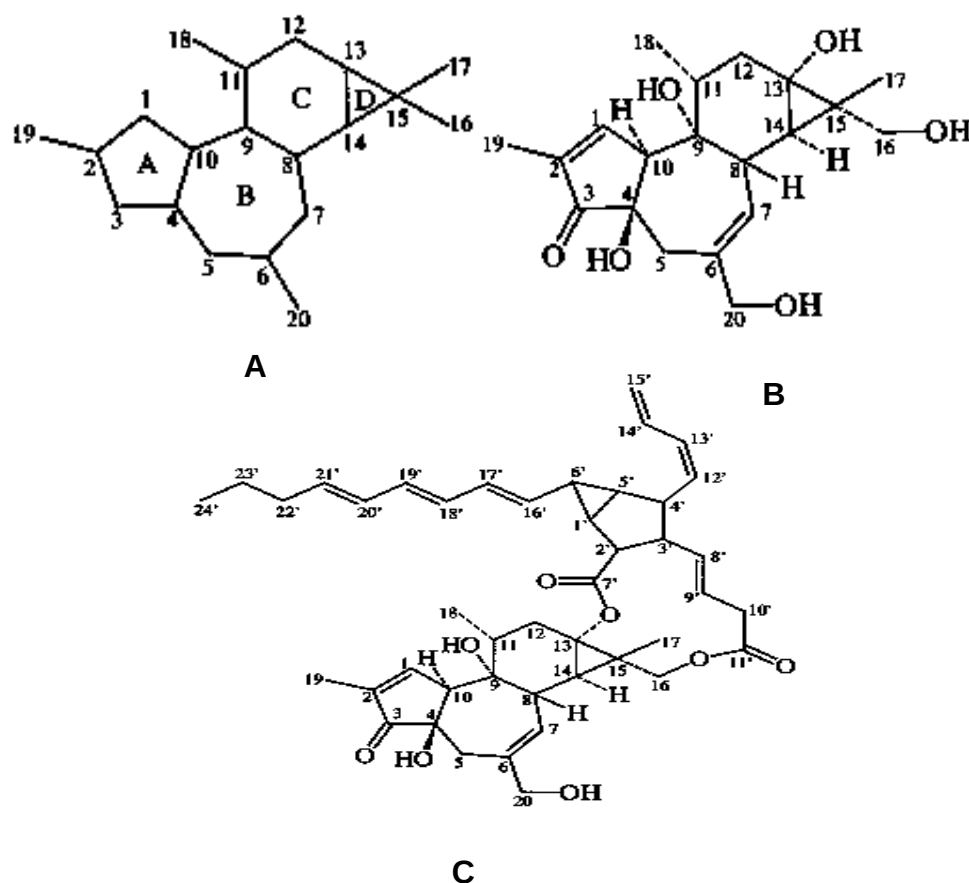
2.7. Los ésteres de forbol

Los EF son diterpenos que contienen 20 átomos de carbono formado por 4 unidades de isopreno (Haas *et al.*, 2002). Son moléculas anfífilas que tienen tendencia a unirse a los receptores de membrana de fosfolípidos y actuar como un análogo de DAG (diacilglicerol) y activadores de PKC (proteína quinasa C). Se han descrito alguna moléculas (Haas *et al.*, 2000), la cuales se nombran en función de la posición del grupo tinglano (Fig. 1). Los EF por ellos mismos no inducen tumores, sino que promueven el crecimiento tumoral después de la exposición a dosis carcinogénicas. Por lo que se les considera como compuestos co-cancerígenos (Goel *et al.*, 2007).

Los efectos biológicos de los EF incluyen la activación de plaquetas de la sangre, la mitogénesis de los linfocitos, eritema de la piel, la producción de prostaglandinas y la estimulación de la desgranulación de los neutrófilos (Aitken, 1986). Tiene propiedades analgésicas, antihelmínticas, contra el cáncer, anticonvulsivas, antidiabéticas, antifertilidad, antihipertensiva, contra la malaria, antimicrobiana, antioxidante, anti-tuberculosis, antiviral, diurética, hemostática, hepatoprotectora, insecticida, larvicida y molusquicidas. Estas propiedades están estrechamente relacionadas con su estructura química (Evans, 1986).

La síntesis de EF ha sido poco estudiada, lo que se conoce es que al igual que todos los diterpenos se generan a partir de un tetraprenol denominado geranil-geranil difosfato, el cual es producido a partir de la prenilación del pirofosfato de farnesilo (Fig. 2).

Estos compuestos se pueden almacenar en diferentes estructuras. Como en frutos y hojas. Los tejidos donde se encuentran en mayor concentración son las semillas, para las que se ha reportado una concentración de hasta de 7 mg por gramo de peso seco (Makkar y Becker, 2009).



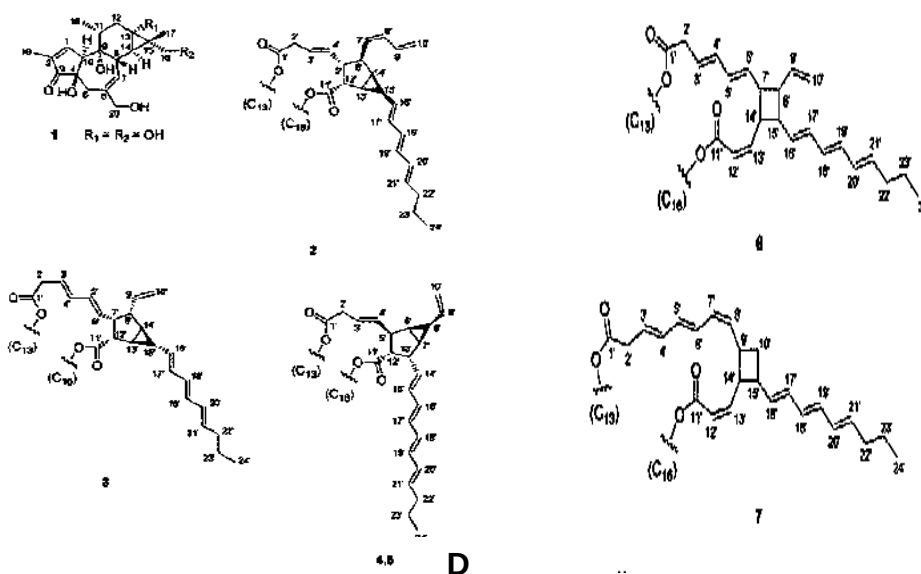


Fig. 1 Ésteres de forbol presentes en *Jatropha curcas*: (A) Tigliano, (B) Deoxi-16-hidroxiforbol, (C) 12-Deoxi-16-hidroxiforbol-4%-[12%,14%-butadienil]-6%-[16%,18%,20% -nonatrienil]-biciclo [3.1.0] hexano-(13-O)-2% -[carboxilato]-(16-O)-3%-[8%-butenoico-10%] ate (DHPB) y (D) moléculas identificadas como ésteres de forbol (Haas *et al.*, 2000).

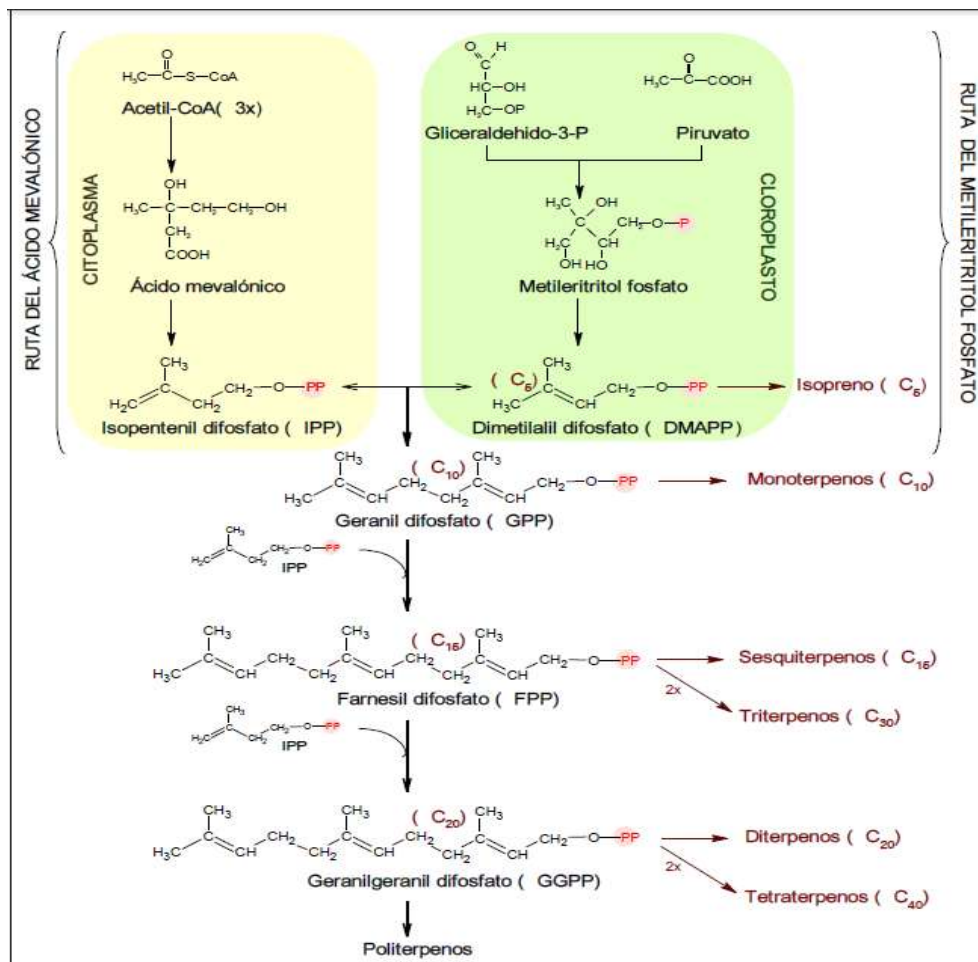


Fig. 2 Síntesis de diterpenos.

2.8. Plagas de *J. curcas*.

A pesar de que *J. curcas* contiene compuestos químicos que le sirven como mecanismo de defensa es atacada frecuentemente por plagas entre las que se incluyen: saltamontes y langostas (*Shistocerca nitens*), chinche patas de hoja (*Leptoglossus zonatus*), cochinilla harinosa (*Planococcus* sp.), ácaro rojo (*Panonychus citri*), gallina ciega (*Phyllophaga* sp.), barrenador del tallo (*Lagocherius undatus*), *Proxis punctulatus* (Pentatomidae), *Conoderus rodriguezi* (Elateridae), *Diceroprocta* sp. (Cicadidae), *Dworena hyacintha* (Flatidae), *Alceis* sp. (Curculionidae), *Pseudococcus* sp. *Lobometopon guatemalenses* (Tenebrionidae), *Shistocerca nitens* (Locustidae), *Alagoala* sp. (Chysomelidae). Las principales plagas que causan malformación de las semillas y aborto en frutos son *Pachycoris klugii* y *Leptoglossus zonatus*. (Picado, 1997; Vásquez-Mendez, 1998).

2.9. Enfermedades más comunes en *J. curcas*.

Las enfermedades más comunes en *J. curcas* son: mancha angular del piñón: (bacteria *Xanthomonas* sp.), pequita o mancha circular (hongo *Dothiorella* sp.) mildiu polvoso (causada por varios tipos de hongos y pseudohongos, *Oidium* sp, *Phytophthora infestans*, *Alternaria* sp.), pudrición seca de las ramas (hongo *Fusarium* sp.), antracnosis (hongos *Colletotrichum* sp., *Discula* sp., *Venturia* p., *Gnomonia* sp., *Septoria* sp., *Phyllosticta* sp.) (Ibarra, 1996; Benavides-García y Chávez-Valerio, 1998; Aguilar-Valerio, 1998).

2.10. Hongos que atacan *J. curcas* y al maíz

2.10.1. *Pythium ultimum* (Trow)

Pythium ultimum es el hongo que causa podredumbre de la raíz en una amplia variedad de plantas. Su distribución esta en todo el mundo y cuenta con una amplia gama de hospederos incluidos muchos cultivos de importancia económica. *Pythium ultimum* también puede infectar a cultivos como la col, zanahoria, pepino, melón, césped, trigo, etc. *Pythium ultimum* es común en la mayoría de los suelos de los cultivos agronómicos y bosques, En general, la humedad abundante y las alta temperatura del suelo son los dos factores ambientales más importantes que regulan la distribución de *Pythium ultimum*. Los síntomas de las plantas enfermas son a menudo retraso en el crecimiento o cloróticas, que son muy similares a la deficiencia de nitrógeno. La infección moderada por *Pythium ultimum* causa marchitez en las plantas, reduce poblaciones de plantas y retarda la maduración, mientras que la infecciones graves a menudo conducen a un colapso y muerte de la planta (Allen et al., 2004).

Ecología y ciclo de vida

Pythium ultimum puede crecer y sobrevivir en el suelo y en los residuos de raíces. Cuando las condiciones son favorables, los hongos comienzan a infectar las semillas y/o puntas de raíces de las plantas. Las hifas vegetativas pueden penetrar directamente en las células vegetales.

El crecimiento micelial y el movimiento de zoosporas pueden facilitar la propagación de *Pythium ultimum* a otras plantas susceptibles. *Pythium ultimum* puede reproducirse sexual y asexualmente. Para la reproducción asexual, en el saco se forman los esporangios. Los esporangios pueden germinar directamente como hifas. Para la reproducción sexual, serán producidos un oogonio y un anteridio en forma de bastón. Cuando se ponen en contacto uno con el otro, los núcleos de estas dos estructuras forman un cigoto, se forma entonces una pared gruesa-oospora. Tanto esporangios y zoosporas son de corta duración en los suelos, mientras que las oósporas pueden sobrevivir en el suelo durante períodos más largos. Por ejemplo, los esporangios se han encontrado siendo viables durante 11 meses en el suelo (Hendrix y Campbell, 1973), mientras que las oósporas pueden sobrevivir en el suelo durante casi 12 años (Allen *et al.* 2004).

2.10.2 *Phytophthora capsici* (Leoniense)

Phytophthora capsici es un oomyceto patógeno de plantas que infecta el pepino, la calabaza, el melón, el pimiento, el tomate y la berenjena. Las especies de *Phytophthora* se pueden reproducir sexual o asexualmente. Las oósporas son formaciones reproductivas del tipo sexual. Los órganos de reproducción asexual comprenden los esporangios, zoosporas y clamidosporas. Las clamidosporas son generalmente esféricas y pigmentadas y pueden tener una pared celular gruesa, que actúa como una estructura de supervivencia.

P. capsici produce esporangioforos en simpodio simple. Esporangios de forma ovoide, elongada, elipsoidal, fusiforme y piriforme de 60 X 36 µm en promedio, aunque pueden variar de 32.8 - 65.8 µm de largo por 17.4 – 38.7 µm de ancho, generalmente papilados, pero en ocasiones con semipapilas. Ocasionalmente puede haber con 2 o 3 papilas por esporangio con un grosor que varía de 1.4 a 9.2 µm. (Leonian, 1992). Los esporangios producen zoosporas a 12 °C y germinan a temperaturas mayores de 18 °C (Romero, 1988).

Ciclo de la enfermedad.

Las oósporas son la fuente de inoculo primario, sobreviven en el suelo más de dos años en ausencia del hospedante. El micelio es una fuente importante de inoculo secundario y se ha observado que no sobrevive más de 7 días en suelo seco. El patógeno vive como saprobio sobre restos de materia orgánica y teniendo una humedad constante produce esporangios y zoosporas que son distribuidas por el agua. Las zoosporas son los propágulos más efectivos para causar infección ya que puedan nadar o simplemente ser arrastradas por la corriente de agua. Las zoosporas después de un determinado tiempo y de acuerdo con las condiciones del medio ambiente, se enquistan y absorben sus flagelos; inmediatamente después, emiten un tubo germinativo que penetra los tejidos de la planta por medio de apresorio (Cruz *et al.*, 1998; Nuez *et al.*, 2003). La lluvia y el mal drenaje favorece la infección, por lo que la enfermedad se presenta después del trasplante, las infecciones en el cuello de la planta se debe a que las zoosporas del patógeno son llevadas por el agua e inician la infección por la heridas o por las lenticelas. El marchitamiento se debe a una secreción de toxinas del patógeno y el taponamiento de los vasos conductores. Las lesiones en rama y hojas se presentan porque el inóculo es diseminado por el salpique del agua de lluvia. El patógeno sobrevive de una estación a otra en los residuos de la cosecha, los esporangios se forman en la base del tallo liberando zoosporas en las semillas atacadas o en el suelo como micelios u oósporas, que al ciclo siguiente germinan e infectan de nuevo (Mendoza, 1996). Las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo son: alta humedad de suelos y temperaturas frescas. En algunas zonas productoras la última etapa del cultivo es más afectada. Ya que coinciden con la épocas más lluviosas. En semillas el patógeno solamente forma micelio y no sobrevive por más de un mes.

2.10.3 *Phoma herbarum* (Westend Deuteromycetes: Sphaeropsidaceae)

(= *P. urticares*, *P. oleracea*, *P. violácea*, *P. Pigmentivora*, *P.hibernica* y *P.lignicola*)

El género *Phoma* se encuentran ampliamente distribuidos y usualmente se presenta como patógeno en muchas plantas, tanto herbáceas como leñosas. Su actividad patógena esta considerablemente restringida a los cultivos de cereales y pastos (Zillinsky, 1984). Este género se caracteriza por presentar picnidios negros, globosos, los cuales pueden estar inmerso en el tejido hospedante o desarrollarse superficialmente, provistos de un ostiolo cortó. Sus conidióforos son simples y los conidios pequeños, unicelulares, hialinos ovales o alargados. Los clamidosporos son solitarios, de color café oscuro y granulado (Watanabe, 1994).

Las especies del genero *Phoma* se observa frecuentemente como invasores secundarios en hojas y brácteas florales de los cereales durante la etapa de maduración (Zillinsky, 1984). Se han registrado 1600 formas de este hongo, las cuales tienen hospederos en abundancia: plátano, remolacha, cítricos, tomate, hule, achiote, apio, esparrago, etc. (Romero, 1993). *Phoma herbarum* se considera un hongo saprobio (Farr, *et al.*, 1989)

2.10.4 *Fusarium moniliforme* (Schawabe Deuteromycetes: Moniliaceae).

Hongo con amplia distribución e importancia económica: entre sus principales hospederos se encuentra el maíz, el arroz, la caña de azúcar y el plátano, en los que ocasiona ahogamiento, pudrición y marchitez foliar entre otras enfermedades (Romero, 1993). En el maíz causa infección en los tallos de las plantas y puede llegar hasta la base de los granos, donde causa pudrición de la mazorca en puntos dispersos. En condiciones de almacenamiento crecen en los orificios hechos por gusanos e insectos que atacan la mazorca. Para desarrollarse requiere grandes contenidos de humedad, por lo que en un almacenamiento normal interrumpe su desarrollo. Sin embargo, si el maíz no es desgranado y las mazorcas se almacenan húmedas, este hongo continua creciendo (Moreno, 1988).

Esta especie es productora de varias micotoxinas: zearalenona, moniliformina y fusarina. Se ha encontrado que el ácido fusarico inhibe la acción de las enzimas detoxificación en insectos herbívoros (Down, 1989).

F. moniliforme se caracteriza por tener coloración rosa y grande esporas: macroconidios curvos y microconidios ovoides en cadena. Los macroconidios son producidos por esporodoquios o en micelio aéreo, y los más abundantes presentan tres septos. Las colonias son de color blanco, durazno, crema pálida, violeta o lilas. Su aspecto es pulverulento (Moreno, 1988).

3. HIPÓTESIS.

Los ésteres de forbol afectan el crecimiento de *Fusarium moniliforme*, *Phoma herbarum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*.

3.1. PREGUNTA:

¿Los ésteres de forbol funcionan como antifúngicos contra hongos o pseudohongos fitopatógenos que atacan a *Jatropha curcas*?

3.2. PREDICCIÓN.

A mayor concentración de los ésteres de forbol menor crecimiento de los fitopatógenos y viceversa.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo general.

- Realizar evaluación de los ésteres de forbol de variantes tóxicas y no tóxicas de *J. curcas* como agentes antifúngicos contra hongos fitopatógenos.

4.2. Objetivos específicos.

- Extraer EF de las semillas de *J. curcas*.
- Cuantificar EF en las semillas de *J. curcas*. de variantes tóxicas y no tóxicas mediante HPLC.
- Cultivar *Fusarium moniliforme*, *Phoma herbarum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, para realizar bioensayos con EF a diferentes concentraciones.

5. MATERIALES Y METODOS.

5.1. Extracción de aceites por el método de soxhlet.

Para obtener el aceite de *J. curcas* se pesaron 5 kg de semillas, semillas donadas por el Ing. Héctor Rómulo Rico Ponce del INIFAP Campus Apatzingán. A estas semillas se les removió la cascara y se les molió en una licuadora para obtener una harina muy fina que posteriormente se pesó. Esta harina se colocó en un cartucho poroso elaborado de papel filtro con un tapón de algodón para evitar que se derramara la harina, para hacer una extracción exhaustiva por soxhlet. Se le agregó 80 mL de hexano a un matraz balón, el cual fue llevado a ebullición hasta un condensador de reflujo que vierte el condensado sobre el cartucho poroso con la muestra en su interior. De esta forma se produce el ascenso del hexano cubriendo el cartucho hasta un punto donde se produce el reflujo que vuelve al matraz balón con el aceite extraído. Este proceso se repite 80 veces aprox. Que son necesaria para que el aceite quede agotado de la muestra (harina). La eliminación del hexano se realizó calentándolo en la estufa a 50 °C (Núñez, 2012).

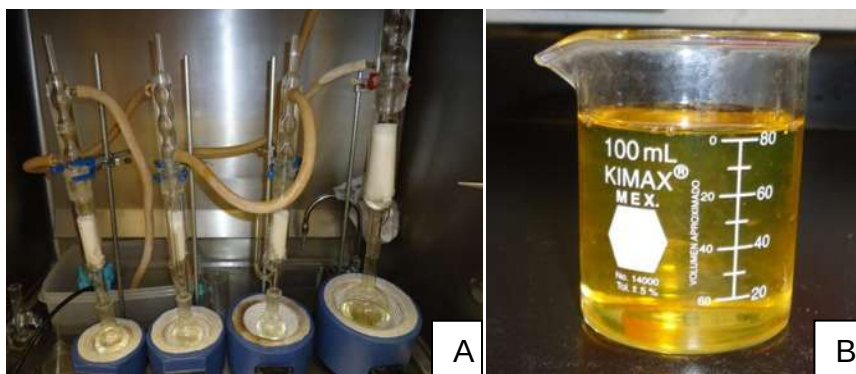


Fig. 3 Extracción de aceites por el método de soxhlet (A) y aceite (B).

5.2. Extracción de ésteres de forbol (EF).

Las semillas de *J. curcas* fueron molidas en una licuadora la extracción del aceite se realizó por el método de soxhlet. La extracción de los ésteres de forbol se realizó según (Devappa *et al.* 2010). El aceite se mezcla con metanol (1:2, v/ v), se agitó por 30 s en el vortex y se centrifugó a 3150 rpm durante 5 minutos para obtener la capa metanólica en la parte superior y en la inferior la oleosa este procedimiento se repitió 4 veces para cada muestra. La capa metanólica se evaporó con nitrógeno líquido.

5.3. Método para la cuantificación de los ésteres de forbol por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Se inyectaron 20 µl de muestra en un equipo HPLC Agilent Technologies serie 1200. La columna analítica utilizada fue Eclipse XDDC18 (4.6mm x 156mm x 5mm Agilent Technologies). Los disolventes grado HPLC que se usaron fueron:

1. Ácido orto-fosfórico al 85% (1.75 mL de en 1L de agua destilada) **(A)**
2. Acetonitrilo **(B)**.
3. Tetrahidrofurano**(C)**.

Los disolventes se filtraron y se degasificaron sonicandolos por 30 minutos.

El gradiente utilizado fue el siguiente: el 60% de A y el 40% de B en el arranque. Disminuimos A al 50% y aumentamos B a 50% en los siguientes 10 min, disminuimos A al 25% y aumentamos B a 75% en los siguientes 30 min, se aumenta B a 100% en los siguientes 15 min. Posteriormente la columna se lavó con C al 100% en los siguientes 15 min, luego la columna se ajustó a las condiciones de partida (60% A y 40% de B).

La separación se realizó a temperatura ambiente (aprox. 22 °C) con un flujo de 1,3 mL/min. Los EF aparecen entre los 41 y 45 min. Los picos se integran en 280 nm, y el estándar externo utilizado es forbol-12-miristato 13-acetato, que aparece a los 33 min (Makkar y Becker, 1997).



Fig. 4 Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) utilizado para la cuantificación de los EF.

5.4. Método de cálculo de la concentración de los esteres de forbol.

Se inyectaron 20 μL del estándar (forbol-12-miristato 13-acetato) a una concentración de 0.250 mg/mL, el cual tuvo un tiempo de retención de 33.615 min. Posteriormente se dió una corrida de limpia con tetrahidrofurano para poder inyectar la muestra, la cual tuvo un tiempo de retención de 34.135 min. Estas inyecciones, la de estándar y de la muestra se hicieron por triplicado. La concentración de la muestra se calculó por el método de área.

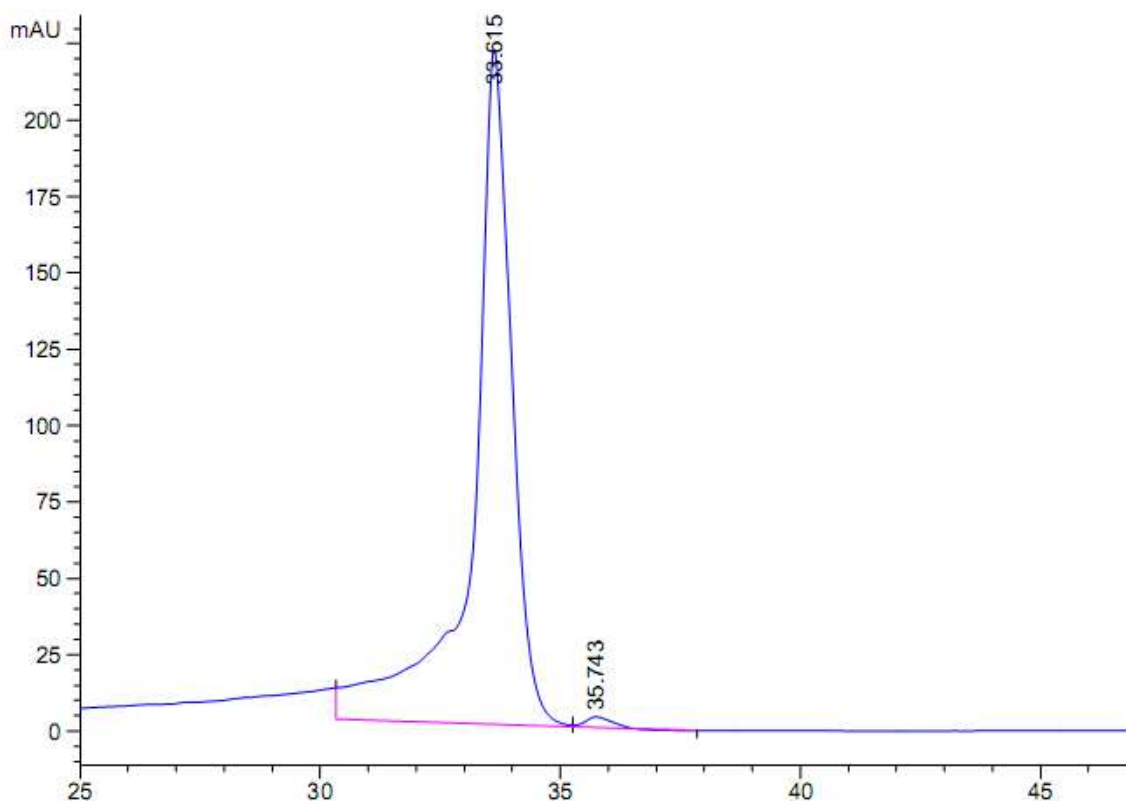


Fig. 5 Cromatograma del estándar externo: forbol-12-miristato 13-acetato.

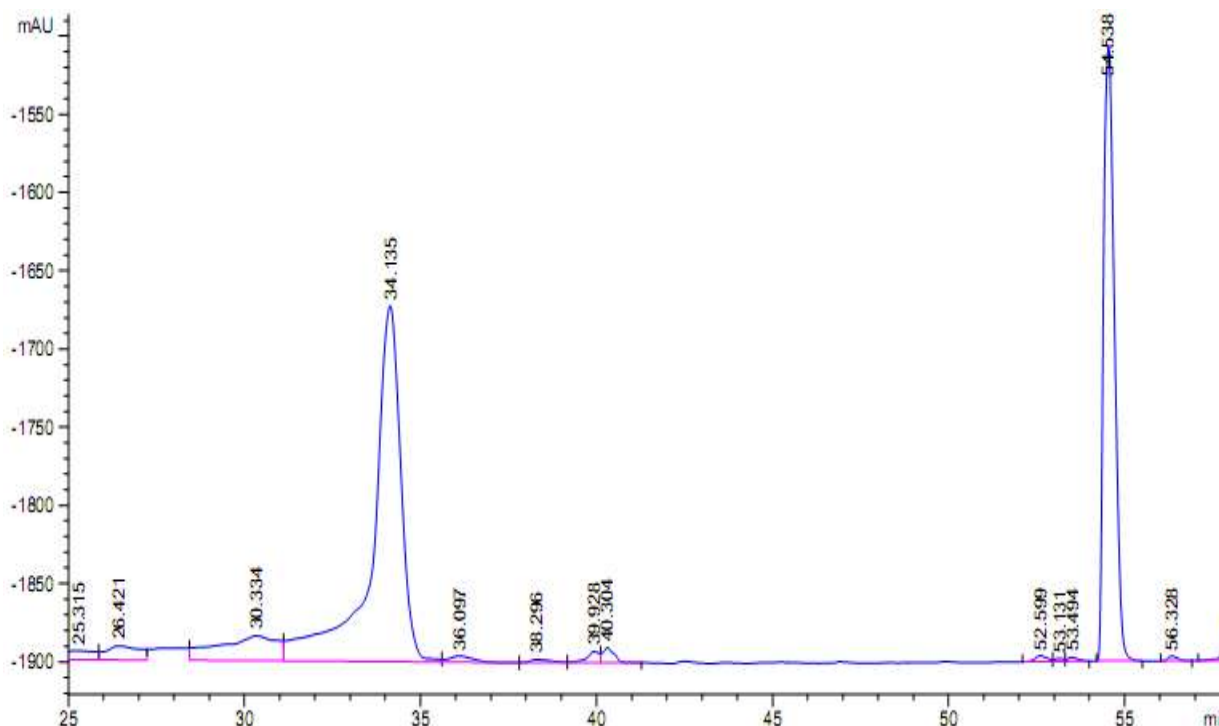


Fig. 6 Cromatograma de la muestra de *Jatropha curcas*.

5.5. Hongos que atacan a *Jatropha curcas*.

Las cepas de *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, fueron donadas por el Dr. John Larsen del laboratorio de Agroecología del Cieco, UNAM Campus Morelia.

5.6. Aislamiento de hongos que atacan al maíz.

Se prepararon medios de cultivos agar papa dextrosa (PDA) para aislar algunos de los hongos que atacan a los granos de maíz. Para preparar el medio de cultivo PDA se agregaron 3.9 gr de agar en 100 mL de agua destilada. Se llevó a esterilizar a 15 libras de presión y 121 °C por 15 minutos. Este medio fue vaciado en caja de petri de 9 cm de diámetro.

Se tomaron 20 granos de maíz y se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 3 minutos, posteriormente realizamos dos lavados con agua estéril por 3 minutos cada uno. Se sembraron 6 granos de maíz por caja de petri y se incubaron a 27 °C por 7 días (Moreno, 1988). Después de 5 días se observaron 3 colonias de hongos diferentes y se sembraron en (PDA) para identificarlos.

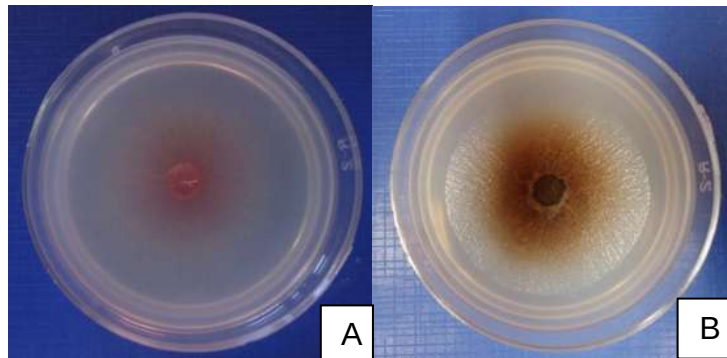


Fig. 7 Hongos aislados de granos de maíz: *Fusarium moniliforme* (A) y *Phoma herbarum* (B).

5.7. Preparación de medios de cultivos y resiembra de hongos.

Se preparó medio de cultivo PDA agregando 3.9 gr de agar en 100 mL de agua destilada, se utilizó un agitador magnético para disolver el agar ya disuelto se le tomó el pH, el cual se ajustó a 5.6 ± 0.2 con una solución de HCl al 1%. Se llevó a esterilizar a 15 libras de presión y 121°C , por 15 minutos. Este medio se vació en cajas petri de 9 cm de diámetro.

Se tomaron los hongos para resembrarlos *Fusarium moniliforme*, *Phoma herbarum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*. Con un sacabocados estéril se realizaron cortes del micelio del hongo, cortes que son colocados en cajas Petri con PDA que se incubaron a 27°C por 7 días. Posteriormente se refrigeraron para detener su crecimiento. Estos hongos deben de ser resembrados cada 3 meses para tener viable las cepas.

5.8. Experimentos y toma de datos.

Para estudiar las respuesta de crecimiento de *Fusarium moniliforme*, *Phoma herbarum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, a los ésteres de forbol se usó el método de (Lindig *et al.* 1997). Esta repuesta fue estudiada con 5 concentraciones diferentes de ésteres de forbol para cada uno de los hongos. Los medios de cultivo se prepararon con PDA: para 100 mL, de medio se agregaron 3.9 g de PDA en 100 mL de agua destilada mezclándolos perfectamente con un agitador magnético y esterilizándolos a 15 lb de presión y 121 °C por 15 minutos (Moreno, 1988). A estos medios de cultivo se les agregaron los ésteres de forbol en diferentes concentraciones, los cuales se usaron para llenar tubos capilares de 50 µL. Estos tubos capilares se insertaron en las tapas de las cajas de petri de modo que apenas tocaran el micelio del hongo (Fig. 8).

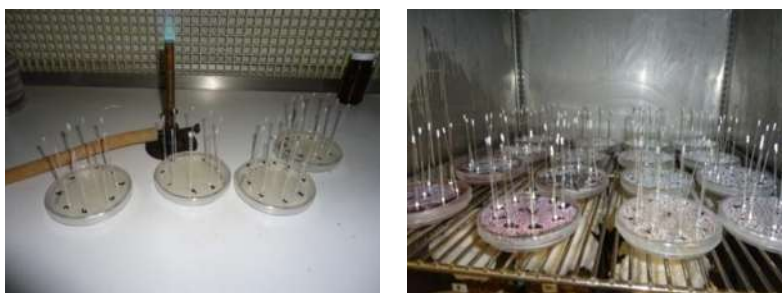


Fig. 8 Tratamientos de los hongos (A) y crecimiento de hongos en condiciones controladas (B).

Las concentraciones de los ésteres de forbol utilizadas, con cinco repeticiones, fueron:

1. - 1 mg/mL.
2. - 0.5 mg/mL.
3. - 0.250 mg/mL.
- 4.- 0 mg/mL.

Se utilizó como control (+) benomil; como control (-) metanol y como testigo el PDA sin tratamiento alguno. Estos tratamientos y los controles fueron incubados a 27°C. Posteriormente se midió el diámetro de inhibición a partir de las 24 hrs y hasta las 120 hrs.

5.9 Análisis estadísticos

El efecto de los EF en el crecimiento de *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Phoma herbarum* y *Fusarium moniliforme*, se probó con un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. Posteriormente se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de t-Tukey.

También se analizó la respuesta del crecimiento de los hongos, con respecto a la concentración y el tiempo mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías.

6. RESULTADOS.

Efecto de los ésteres de forbol en el crecimiento de los hongos.

El crecimiento de *Phytium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Phoma herbarum*, *Fusarium moniliforme*, fue afectada significativamente por la concentración de los EF, especie de hongo y en menor proporción por la interacción de ambas variables (Tabla 1). El 91% de la variación en el crecimiento del hongo, es explicado por la concentración de los EF, 7% por hongo; 2% por la interacción de las dos variables y el resto por el error.

Tabla 1. Análisis de varianza del efecto de los ésteres de forbol y el tipo de hongo en el crecimiento de *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Phoma herbarum* y *Fusarium moniliforme*.

Efecto	SS	MS	F	P
Hongo	3136.6	1045.5	8.738	0.000061
Concentración	43695.5	14565.2	121.723	0.000000
Hongo*concentración	2808.3	312.0	2.608	0.012457
Error	7658.1	119.7		

Los resultados de la comparación múltiple, mostraron que al aumentar la concentración de los EF el crecimiento de *Phytium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Phoma herbarum* y *F. moniliforme*, disminuyó (Fig. 9).

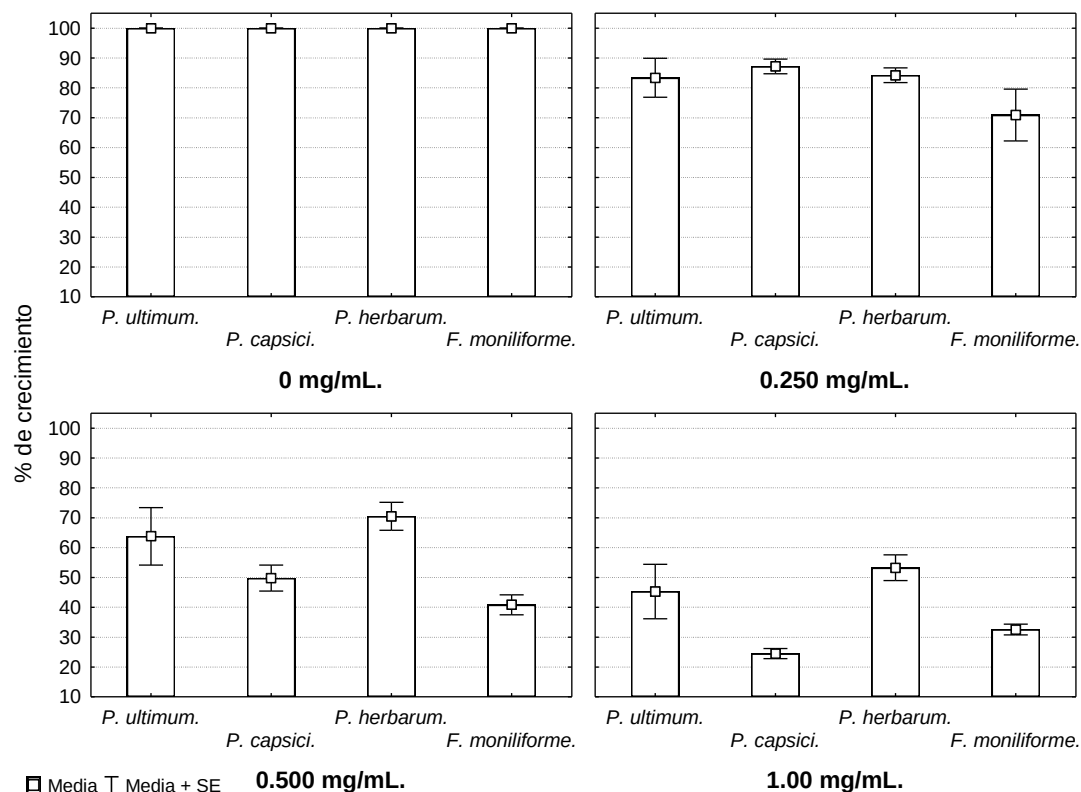


Fig. 9 Efecto de los ésteres de forbol a diferentes concentraciones y el tipo de hongo en el crecimiento de *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Phoma herbarum* y *Fusarium moniliforme* ($F_{(9,64)}=2.6077$, $p=0.01246$).

La mayor inhibición de los hongos *Pythium ultimum* y *Phoma herbarum* ocurrió a la dosis de 1.00 mg/mL de EF, en *Phytophthora capsici* la inhibición más fuerte fue a la dosis 0.500 mg/mL y 1.00 mg/mL de EF. En *F. moniliforme* la inhibición comenzó a la dosis 0.250 mg/mL y se mantuvo hasta la dosis 1.00 mg/mL de EF, lo que se pudo observar es que *Phytophthora capsici* y *Fusarium moniliforme* son los hongos más susceptibles a los EF.

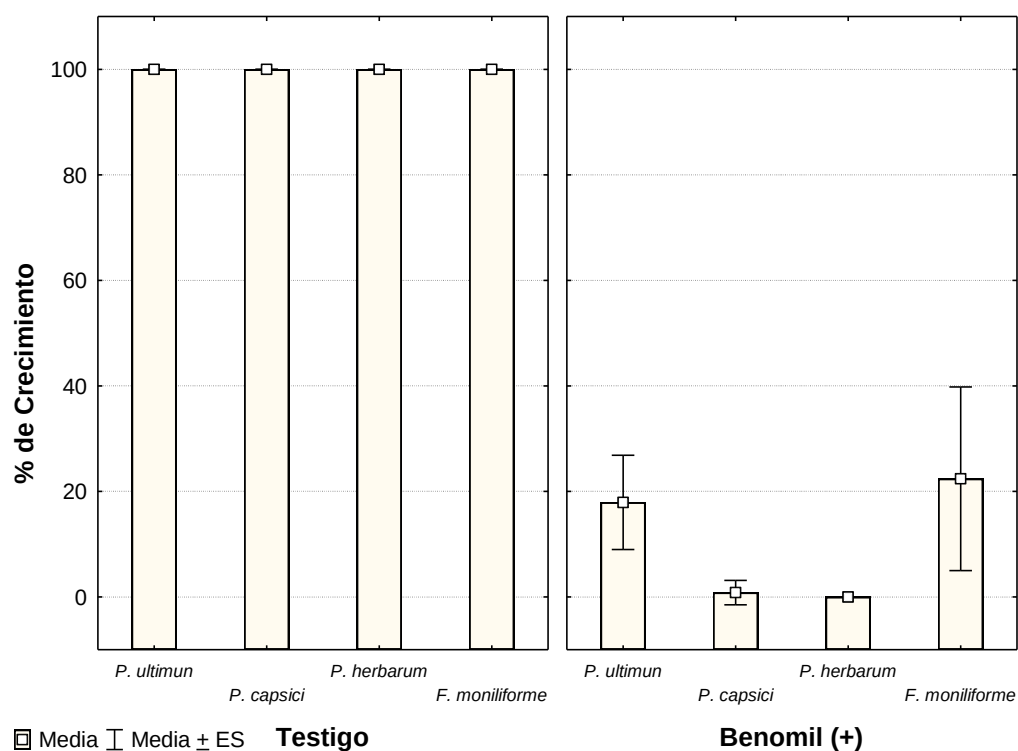


Fig. 10. Comparación del testigo con el control (+) benomil

Efecto del tiempo en el crecimiento de los hongos

***Pythium ultimum*.** El crecimiento de *Pythium ultimum* fue afectado significativamente por la dosis, el tiempo y en menor proporción por la interacción de ambas variables. El 81% de la variación en el crecimiento del hongo, es explicado por la concentración de los EF, 17% por el tiempo; 2% por la interacción de las dos variables y el resto por el error (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de varianza del efecto de los ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de *Pythium ultimum*

Efecto	SS	MS	F	P
Tiempo	5351.6	2675.8	16.501	0.000004
Concentración	38793.7	12931.2	79.743	0.000000
Tiempo*concentración	1995.7	332.6	2.051	0.076842
Error	7783.7	162.2		

La comparación múltiple mostró que al aumentar la concentración de los EF, el crecimiento de *Pythium ultimum* disminuyó. Sin embargo, al aumentar el tiempo de exposición no aumentó la inhibición. La mayor inhibición en el crecimiento de *Pythium ultimum*, en las tres dosis ocurrió a las 24 horas (Fig. 10), pasado ese tiempo el hongo se recupera y sigue creciendo.

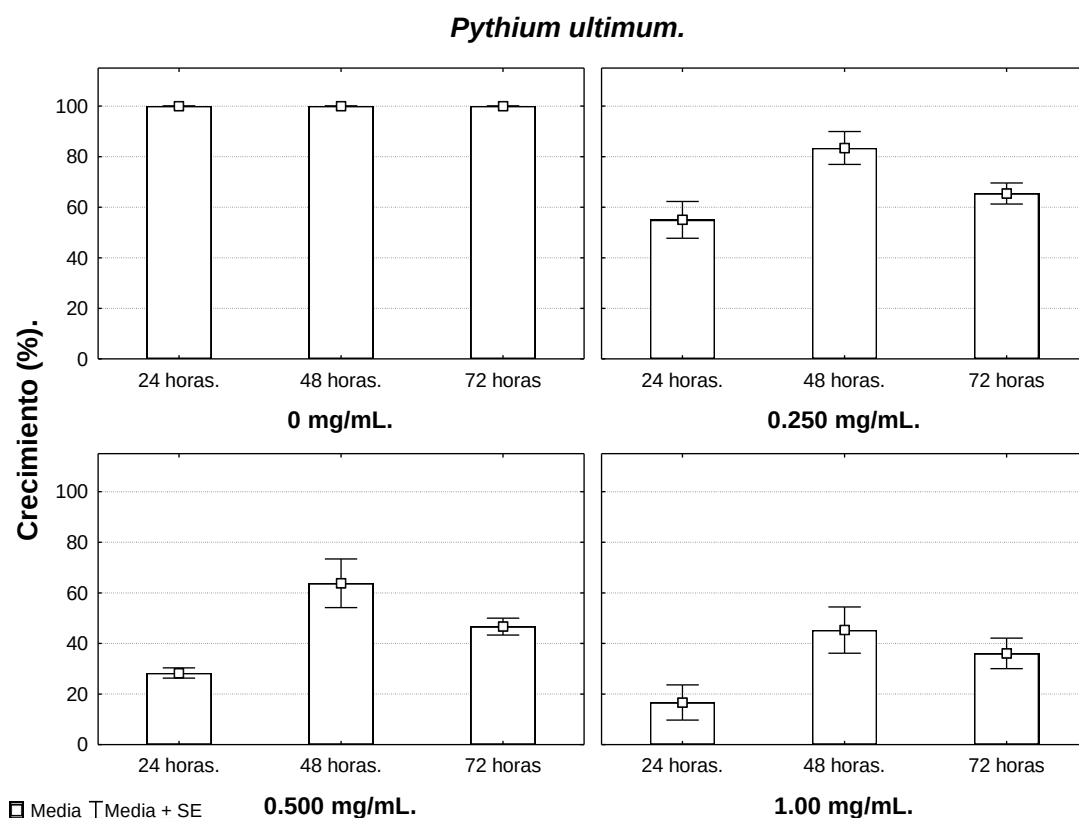


Fig. 11 Efecto de la concentración de ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de *Pythium ultimum* ($F_{(6,48)}=2.0511$, $p=0.07684$).

Phytophthora capsici. La respuesta del crecimiento de *Phytophthora capsici* fue afectada significativamente por la dosis, el tiempo y en menor proporción por la interacción de ambas variables. El 95% de la variación en el crecimiento del hongo, es explicado por la concentración de los EF, 3% por el tiempo; 2% por la interacción de las 2 variables y el resto por el error (Tabla3). La comparación múltiple mostró que al aumentar la concentración de los EF, el crecimiento de *Phytophthora capsici* disminuyó; Sin embargo, al aumentar el tiempo no aumentó la inhibición.

Tabla 3. Análisis de varianza del efecto de los ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de *Phytophthora capsici*.

Efecto	SS	MS	F	P
Concentración	57429.2	19143.1	180.330	0.000000
Tiempo	1700.9	567.0	5.341	0.002399
Tiempo*concentración	3701.4	411.3	3.874	0.000581
Error	6794.0	106.2		

Por otro lado, el efecto del tiempo en el crecimiento del hongo fue variable (Fig. 11). A la dosis 0.250 mg/mL de EF, la mayor inhibición del crecimiento de *Phytophthora capsici* ocurre a las 48 y 72 horas, a la dosis 0.500 mg/mL y 1.0 mg/mL de EF, no hay diferencia en la inhibición con respecto al tiempo.

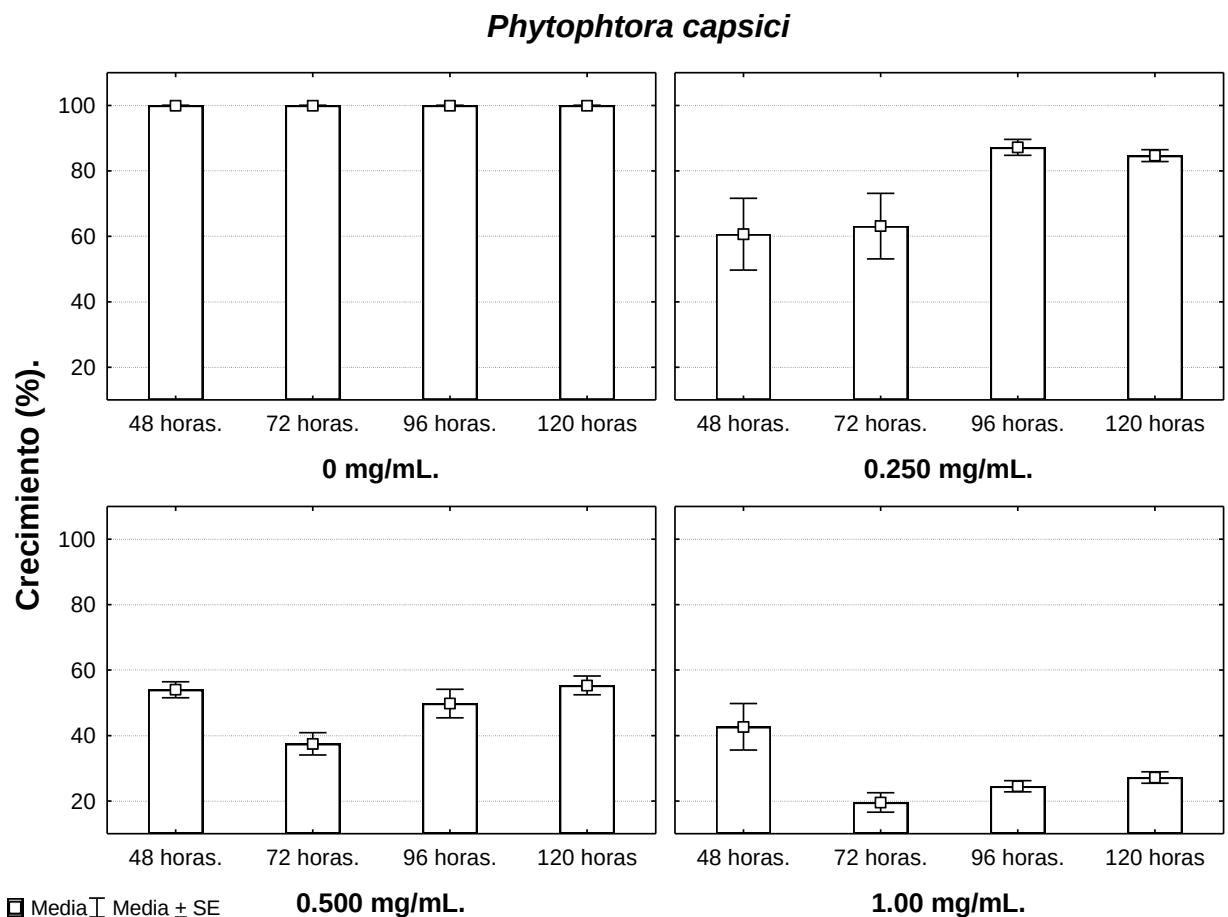


Fig. 12 Efecto de la concentración de ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de *Phytophthora capsici*. ($F_{(9,64)}=3.8742$, $p=0.00058$).

Phoma herbarum La respuesta del crecimiento de *P. herbarum* fue afectada solamente por la dosis. No hay efecto del tiempo en el crecimiento de *Phoma herbarum* (Tabla 4) (Fig.12).

Tabla 4. Análisis de varianza del efecto de los ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de *Phoma herbarum*.

Efecto	SS	MS	F	P
Concentración	27566.3	9188.8	32.991	0.000000
Tiempo	949.2	316.4	1.136	0.341277
Tiempo*concentración	1924.7	213.9	0.768	0.646154
Error	17825.2	278.5		

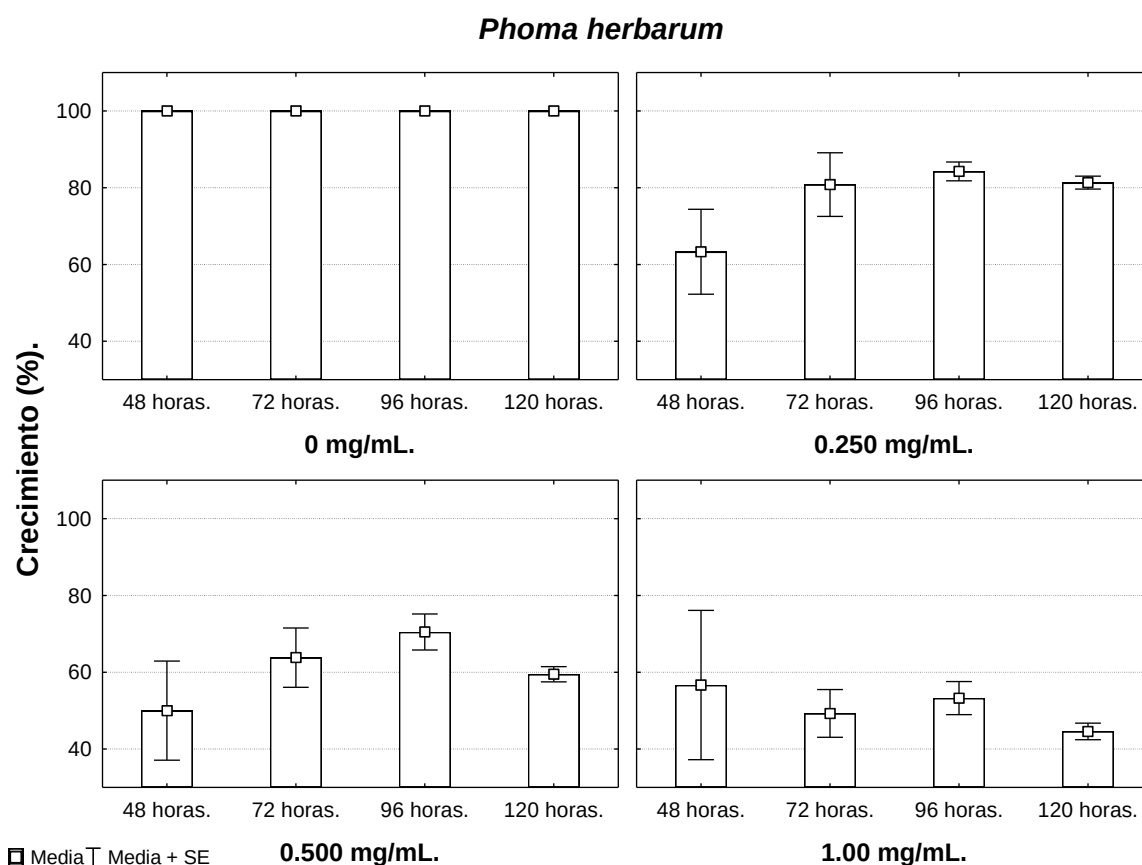


Fig. 13 efecto de la concentración de ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de *Phoma herbarum*. ($F_{(9,64)}=0.76784$, $p=0.64615$).

***Fusarium moniliforme*.** La respuesta del crecimiento de *F. moniliforme* fue afectada significativamente por la dosis, el tiempo y en menor proporción por la interacción de ambas variables. El 90% de la variación en el crecimiento del hongo, es explicado por la concentración de los EF, 6% por el tiempo; 3% por la interacción de las 2 variables y el resto por el error.

La comparación múltiple mostró que no hay efecto del tiempo en el crecimiento de *F. moniliforme*, a la dosis 0.250 mg/mL de EF. Sin embargo, a las dosis 0.500 mg/mL y 1.0 mg/mL EF, la mayor inhibición del crecimiento de *F. moniliforme* ocurre a las 96 horas.

Tabla 5. Análisis de varianza del efecto de los ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de *Fusarium moniliforme*.

Efecto	SS	MS	F	p
Concentración	35414.7	11804.9	84.989	0.000000
Tiempo	2704.9	901.6	6.491	0.000664
Tiempo*concentración	3446.0	382.9	2.757	0.008670
Error	8889.6	138.9		

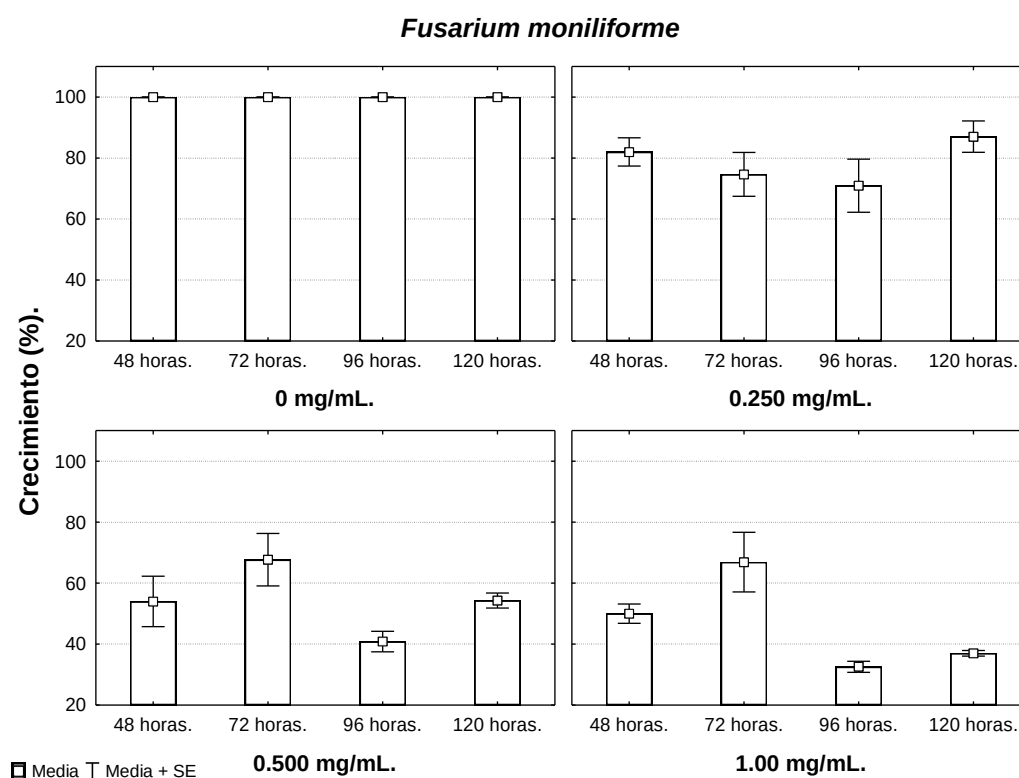


Fig. 14 Efecto de la concentración de ésteres de forbol y el tiempo en el crecimiento de *Fusarium moniliforme*. ($F_{(9,64)}=2.7566$, $p=0.00867$).

Además, los resultados mostraron que los EF fueron menos eficaces que el fungicida comercial (benomil). Esto se pudo observar ya que el benomil tuvo una inhibición en *Phytophthora capsici* del 99%, *Pythium ultimum* del 88%, *Phoma herbarum* del 80% y *Fusarium Moniliforme* 81% esta inhibición es mayor comparada con la inhibición provocada por los EF.

En este trabajo se observó que el efecto de los ésteres de forbol es a partir de 0.250 mg/mL y que la inhibición máxima se alcanza con 1mg/mL. Sin embargo, esta inhibición es menor que la que causa el fungicida comercial (benomil).

7. DISCUSIÓN.

Los resultados *in vitro* concuerdan con la hipótesis de que los ésteres de forbol (EF) pueden proteger a *J. curcas* del ataque de fitopatógenos. Los resultados obtenidos indican que los EF tienen un amplio espectro, ya que inhiben el crecimiento de pseudohongos que han sido reportados como fitopatógenos (*Pythium ultimum* y *Phytophthora capsici*), en plantaciones de *J. curcas*. Mostramos que los EF tienen actividad fungiestática, en hongos generalistas que no atacan a *J. curcas* como *Phoma herbarum* y *Fusarium moniliforme*.

Los EF afectan el crecimiento de *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Phoma herbarum* y *Fusarium moniliforme*, al igual que los hongos y pseudohongos reportados por (Saetae y Suntornsuk 2009), quienes trabajaron con siete tipos de hongos fitopatógenos generalistas (*Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Pythium aphanidermatum*, *Lasiodiplodia theobromae*, y *Curvularia lunata*). Ellos encontraron que al incrementar la concentración del extracto crudo de los EF la inhibición del crecimiento micelial aumentó, al igual que sucedió en nuestro trabajo. Existen otros trabajos que reportan que los EF pueden inhibir el crecimiento micelial de los hongos *F. oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Curvularia lunata* y *Colletotrichum capsici* a en concentraciones que van de 4 a 6 mg/mL (Saetae y Suntornsuk, 2009). Sin embargo, para inhibir del crecimiento micelial de hongos como *C. gloeosporioides* se requiere una concentración de hasta 10 mg/mL (Saetae & Suntornsuk, 2009).

La inhibición del crecimiento micelial es mayor al aumentar la concentración, independientemente de la especie de hongo y del tiempo de exposición a estos compuestos, como ha sido reportado en otros trabajos (Saetae & Suntornsuk, 2009; Ayanbimpe et al 2009; Devappa et al 2012;).

En general el efecto de los EF *in vitro* fue diferente en cada uno de los hongos ya que se observó una variabilidad en el crecimiento de su micelio a diferentes concentraciones. Sin embargo, la mayor inhibición en el crecimiento del micelio en todos los hongos ocurrió a la concentración más alta (1mg/ml). En este trabajo se observó que *Phytophthora capsici* y *Fusarium moniliforme* fueron lo más susceptibles con respecto al control, 25 y 33 % respectivamente.

Sin embargo, esta inhibición es menor que la que causa el fungicida comercial (benomil). Estos pueden ser debido a que los EF no están en forma pura y el fungicida comercial si lo está.

A concentraciones bajas los EF inhiben el crecimiento micelial, pero esta inhibición disminuye con el tiempo, posiblemente debido a que el hongo se recupera y continua creciendo. Probablemente esta respuesta a bajas concentraciones se deba a que los hongos activan su mecanismo de defensa cuando se exponen a una sustancia y responden de manera diferente, respuesta que aparentemente ocurrió en este trabajo. Mellado *et al.*, (2002) y Steffens *et al.* (1996) han reportado que los hongos filamentosos que son expuestos a sustancias tóxicas, activan un mecanismo de defensa durante el cual sus células crean una barrera de permeabilidad o sistema de bombeo activo sacando el compuesto al exterior. Esto incapacita a la sustancia tóxica para alcanzar a la molécula blanco de la célula propiciando la resistencia del hongo (Mellado *et al.*, 2002; Steffens *et al.*, 1996).

La actividad fungistática de los ésteres de forbol es congruente con la hipótesis de antagonismo balanceado entre las plantas y sus fitopatógenos (Shultz, *et al.*, 2002). Bajo este escenario, las plantas poseen sustancias que inhiben a los fitopatógenos pero no los matan, mientras que los fitopatógenos tienen sustancias que pueden dañar a la planta que no son producidas por la inhibición ejercida por las plantas. Sin embargo, si hay un desequilibrio fisiológico que causa la disminución en la concentración de las sustancias antipatógenas, en este caso EF.

Los hongos se desarrollan y producen sustancias fitotóxicas que causan enfermedad en su hospedero. Los desequilibrios fisiológicos pueden ser causados por el ataque de insectos o patógenos resistentes a los EF, sequías o choques térmicos. En el caso de las variantes de *J. curcas* sin EF, no existiría un antagonismo balanceado mediado por los EF, aunque podrían intervenir otros tipos de metabolitos secundarios presentes en *J. curcas*. Si la resistencia o susceptibilidad de *J. curcas* a las enfermedades fungosas estuviera mediada por EF, entonces se puede predecir que las variantes no tóxicas solo podrían prosperar en ambientes desfavorables a los hongos mientras que las tóxicas prosperarían en ellos.

El cultivo de variantes no tóxicas en ambientes favorables a fitopatógenos requeriría del uso de fungicidas, lo que añadiría costos a la producción de biodiesel, aunque la producción de tortas no tóxicas, podría servir para compensar ese gasto y aún así añadir valor al cultivo de *J. curcas*. Sin embargo, también habría que evaluar los costos ambientales del uso de fungicidas para determinar si es conveniente o no sembrar las variantes no tóxicas de *J. curcas* en zonas propicias para los fitopatógenos.

Aunque algunos autores han sugerido el uso de extractos de *J. curcas* con EF para tratar enfermedades fungosas de las plantas (Saetae y Suntornsuk, 2009; Ayanbimpe et al 2009; Devappa et al 2012) yo no la recomiendo por la actividad co-cancerígena que se ha demostrado con varios de estos compuesto (Goel et al, 2007).

Este trabajo solo se realizó *in vitro*, por lo que se sugiere corroborar en campo esta actividad. De corroborarse, se recomienda sembrar variantes tóxicas en ambientes favorables para fitopatógenos y variantes no tóxicas en ambientes desfavorables para los hongos u pseudohongos patógenos.

8. CONCLUSIONES.

Los EF detienen el crecimiento micelial de los hongos *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Phoma herbarum* y *Fusarium moniliforme in vitro*.

La importancia de este trabajo es que se utilizaron dos especies de hongos que han sido reportada como fitopatógenas en plantaciones de *J. curcas*: *P. ultimum* y *P. capsici*, donde mostramos que los EF tienen actividad fungiestática, al igual que en hongos generalistas como *P. herbarum*, *F. moniliforme*, hongos que no atacan a *J. curcas*.

9. BIBLIOGRAFÍA.

Aguilar-Valerio, X. N. 1998. Comportamiento de dos variedades de *Jatropha curcas* L. en el Pacífico de Nicaragua. UNAN.

Aitken, A. 1986. The biochemical mechanism of action of phorbol esters. In: Evans, F.J. (Ed.), Naturally Occurring Phorbol Esters. CRC Press, Boca Raton. pp. 271 – 288.

Allen, T. W., Martínez, A. y Burpee, L. L. 2004. Pythium plaga del césped. Consultado en: <http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/pythiumblight/default.htm>.

Alyelaagbe, O. O., Adesogan, E. K., Ekundayo, O., Gloer, J. B. 2007. Antibacterial diterpenoids from *Jatropha podagrica* Hook. Phytochemistry 68: 2420–2425.

Anaya, A. L., Espinosa-García, J. F., y Cruz-Ortega, R. 2001. Relaciones químicas entre organismos aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Plaza Valdes. 6: 231-245.

Aregheore, E. M., K. Becker y H. Makkar. 2003. Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats. Journal of Natural Science, 21: 50-56.

Ávila, J. G. 1949. Breves Instruções para a Cultura da Purgueira. In: Repartição Técnica dos Serviços Agrícolas, Florestais e Pecuários. Imprensa Nacional de Cabo Verde, Praia (Cape Verde).

Ayanbimpe, G. M., Afolabi, E. F. Opara, Orsaah, S. Ojerinde, O. 2009. Evaluación de extractos de *Jatropha curcas* y *Moringa oleífera* en medios de cultivo para la inhibición selectiva de hongos contaminantes saprofitos. J Clin Lab Anal. 23(3): 161pp.

- Azan, M. M., Waris, A., Nahar, N. M. 2005. Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. *Biomass Bioenergy* 29: 293–302.
- Benavides-García, M. M. y Chávez-Valerio, M. V. 1998. Fenología de la Floración del *Jatropha curcas*. UNAN.
- Benítez, B. A. 2005. Avances recientes en Biotecnología vegetal e Ingeniería Genética de plantas, Reverté, Barcelona España.
- Berenbaum, M. 1985. Brementown revisited: interactions among Allelochemicals in plants. *Recent Advances in Phytochemistry* 19: 139-171.
- Berenbaum, M. R. 1988. Allelochemicals in insect-microbe-plant-interactions: Agents provocateurs in coevolutionary arms race. Pp. 97-124. En: Barbosa, P. & Lentourneau, D.K., (eds.) *Novel Aspects of Insect-Plant Interactions*. John Wiley & Sons. New York.
- Bermejo, M. E., Chel, L. A., Lozano, S. E., Félix, J. G., Martinez, A. L. 2012. Cuantificación de esteres de forbol en semillas de *Jatropha curcas* silvestres y cultivadas en México. Consultado en: <http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Documento/JatrophaContrataciones/ESTE RESFORBOLENMEXICO.pdf>.
- Bernays, E.A., and Chapman, R.F. 1994. Host Plant Selection by Phytophagous Insects. Chapman y Hall. New York. 312 pp.
- Cano-Asseleih, L. M. y Hernández-Aponte, C. 1984. El piñoncillo, *Jatropha curcas* recurso biótico silvestre del Trópico. Cuaderno de divulgación, Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, Xalapa, Veracruz. 16 pp.
- Chelmicki, J. C. C. y Varnhagen, F. A. 184. Geografia Cabo Verdiana on Descripcao Geografico – Historica da Prov. das Ilhas de Carbo Verde e Guiné. Vol. 1, 2. Typ. by L. C. da Cunha, Lisboa (Portugal).

- Chumkaew, P., Karalai, C., Ponglimanont, C., and K. Chantrapromma. 2003. Antimycobacterial activity of phorbol esters from the fruits. *Journal Natural Product* 66: 540-543.
- Cruz, O. J., García E. A., Facio, C. 1998. *Enfermedades de las hortalizas*. Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán Rosales, Sinaloa, México. 225 pp.
- Devappa, R. K., Angulo-Escalante, M. A., Makkar, H. P. S., Becker, K. 2012. Potential of using phorbol esters as an insecticide against *Spodoptera frugiperda*. *Industrial Crops and Products*.38: 50-53.
- Devappa, R. K., Makkar, H. P. S., Becker, K. 2010. Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha* oil. *Biomass Bioenergy* 34: 1125–1133.
- Dowd, P. F. 1989. Fusarica secondary fungal metabolite that synergizes toxicity of co-occurring host allelochemical to the corn earworm, *Heliothis zea* (Lepidoptera). *Journal of Chemical Ecology* 15: 249-254.
- Eshelokun, A. O., Kasali, A. A., Ogunwande, I. A., Walker, T. M., Setzer, W. N. 2007. Chemical composition and anti- microbial studies of the essential oils of *Jatropha integerrima* Jacq. (leaf and seeds). *Natural Product Communication* 2:853–855.
- Enneking, D. y Wink, M. 2000. Towards the elimination of anti-nutritional factors in grain legumes. R Knight (ed.) *Linking Research and Marketing Opportunities for pulses in the 21st Century*, Pp. 671 – 683. Kluwer Academic Publisher. Netherlands.
- Espinosa-García, F. J. y Langenheim, J. L. 1991. Effects of sabinene and γ -terpinene from coastal redwood leave acting singly or in mixtures on the growth of some their fungus endophytes. *Biochemical Systematics and Ecology*. 8:643-650.
- Erich, P. R., y Raven, P. H. 1964. *Butterflies and Plants. A study in coevolution*. *Evolution* 18: 586-608.
- Evans, F.J. 1986. Phorbol: its esters and derivatives. In: Evans, F.J. (Ed.), *Naturally Occurring Phorbol Esters*.CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 171 – 215.

Farr, D. F., Bills, F. Gerald, Bills. Chamuris, G. P., Rossman, A. Y. 1989. Fungion plants and plant products in the United States. APS Press. Minnesota, USA. 1252 pp.

Fenny. 1976. Plant apparency and Chemical defense. Recent Advances in Phytochemistry 10: 1-140.

García-Camarillo, E. A., Quezada-Viay, M. Y., Moreno, L. J., Sánchez, H. G., Moreno, M. E., Pérez-Reyes, M. C. J. 2006. Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera. Revista Mexicana de Fitopatología 24: 8-12.

García, R. P. y Lawas, P. 1990. Potential plant extracts for the control of Azolla fungal pathogens. Philippine Agriculturist 73: 343 -348.

Goel, G., Makkar, H.P.S., Francis, G., Becker, K. 2007. Phorbol esters: structure, biological activity and toxicity in animals. International Journal of Toxicology 26: 279–288.

Gubitz, G. M., Mittelbach, M., Trabi, M. 1998. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. Bioresource Technology 67: 73 – 82.

Haas, W., Strerk, H., Mittelbach, M. 2000. Detoxification experiments with seed oil from *Jatropha curcas* L. Industrial Crops and Products 12: 111 -118.

Haas, W., Strerk, H., Mittelbach, M. 2002. Novel 12 deoxy-16-hidroxiforbol diesters isolates from the seed oil of *Jatropha curcas* J. Natural of Product 65: 1434–1440.

Heller, J. 1996. Physic Nut *Jatropha curcas* L., Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops. 1. International Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben (Germany), International Plant Genetic Resources Institute, Rome (Italy).

Hendrix, F. F. y Campbell, W. A. 1973. Pythiums como patógenos de plantas. Annu. Rev. Phytopathol. 11: 77-98.

Hernández-Aponte, C. Cano-Asseleih, L. M. y Pardo-Tejeda E. 1978. El Piñoncillo. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos (INIREB). Comunicado no 27 sobre recursos bióticos potenciales del país.

Ibarra, C. M. 1996. Caracterización Física y Química de los aceites de las semillas de las plantas de *Jatropha curcas* L. (Var. Cabo Verde y Var. Nicaragua), *Molting Oleifera*, Lamk., *Simarouba glauca*, D.C.

Jones, C. G. y Lawton, J. H. 1991. Plant chemistry and insect species richness of British Umbellifers. Journal of Animal Ecology 60: 767-777.

Jones, C. G. y Firms, R. D. 1991. On the evolution of plant secondary Chemical diversity. Philosophical transactions of the Royal Society of London. B333: 273-280.

Kubo, I., Hanke, F. J. 1985. Multifaceted chemically based resistance in plants. Recent Advances in Phytochemistry 19: 171-194.

Leonian, L. H. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici*. Phytopathology 12: 401-408.

Levingston, R. y Zamora, R. 1983. Medicine trees of the tropics. Unasylla 140: 7–10.

Li, C. Y., Devappa, R. K., Liu, J. X., Makkar, H. P. S., Becker, K. 2010. Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. Food and Chemical Toxicology 48: 620–625.

Li, J., Yan, F., Wu, F. H., Yue, B. S. y Chen, F. 2004. Insecticidal activity of extracts from *Jatropha curcas* seed against *Lipaphis erynsi*. Journal Plant Protection 31: 276–282.

Lin, J., Yan, F., Tang, L., Chen, F. 2003. Anti-tumor activity of curcin, a ribosome-inactivating protein from seeds of *Jatropha curcas*, and N-glycosidase activity. Acta Pharmacologica Sinica 24: 241–246.

Lindig-Cisneros, R., Benrey, B., Espinosa-García, F.J. 1997. Phytoalexins resistance traits and domestication status in *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus lunatus* L. (Fabaceae). *Journal of Chemical Ecology* 23: 1997-2011.

Liu, S. Y., F. Sporer, M. Wink, J. Jourdan, R. Henning, Y. L. Li, y A. Ruppel. 1997. Anthraquinones in *Rheum palmatum* and *Rumex dentatus* (Polygonaceae) and phorbol esters in *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) with molluscicidal activity against the schistosome vector snails *Oncomelania*, *Biomphalaria* and *Bulinus*. *Tropical Medicine & International Health* 2: 179-188.

López, B. A., López Betancourt, S. R., Vázquez Badillo, M. E., Rodríguez Herrera, S. A., Mendoza E. M., Padrón C. E. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante extractos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23 (2): 183-190.

Makkar, H.P.S. y Becker, K. 1997. Potential of *Jatropha curcas* seed meal as a protein supplement to livestock feed, constraints to its utilisation and possible strategies to overcome constraints. In: Gubitz, G.M., Mittelbach, M., Trabi, M. (Eds.), *Biofuels and Industrial Products from Jatropha curcas*. Dbv, Graz. pp. 190 – 205.

Makkar, H.P.S. y Becker, K. 1999. Potential of *J. curcas* seed meal as a protein supplement to livestock feed, constraints to its utilization er possible strategies to overcome termos. En: *Biofuels and Industries products from Jatropha curcas*. Proceedings from a symposium held in Managua, Nicaragua, February 1997. (Eds. Gubitz G.M., Mittelbach, Trabi M.) Technical University of Graz, Graz, Australia. Pp. 190-205.

Makkar, H.P.S. y Becker, K. 2009. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111: 773–787.

- Makkar, H.P.S., Becker, K., Sporer, F., Wink, M. 1997. Studies on Nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas* J. Agricultural and Food Chemistry 45: 3152–3157.
- Martin, G. y Mayeux, A. 1984. Reflèxions sur les cultures oléagineuses energetiques. 2. Le pourghère (*Jatropha curcas* L.): Un carburant possible. Oléagineux 39: 283–287.
- Mendoza, Z. C. 1996. Enfermedades fungosas de hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo, Parasitología Agrícola. México. 85 pp.
- Mengual, L. 1997. Extraction of bioactive substances from *Jatropha curcas* L. and bioassays on *Zonocerus variegatus*, *Sesamia calamistis* and *Brusseola fusca* for characterization of insecticidal properties. In: Biofuels and Industrial Products from *Jatropha curcas*. Eds. G. M. Gübitz, M. Mittelbach, M. Trabi, Dbv-Verlag für Technische Universität Graz, Graz (Austria), pp. 211–215.
- Meshram, P. B., N. Kulkarni, and K. C. Joshi. 1996. Antifeedant activity of *Azadirachta indica* and *Jatropha curcas* against *Papilio demoleus* L. Journal Environmental Biology 17: 295- 298.
- Moreno, M.E. 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. UNAM. 109 pp.
- National Academy of Sciences. Desarrollo y Control de las Enfermedades de las Plantas. Control de Plagas de Plantas y Animales. Editorial Limusa. México. 1980: 1, 223.
- Nuez, V. F., Gil, O. R., y Costa, G. J. 2003. El cultivo de Pimientos, Chiles y Ajíes. Mundi Prensa. Barcelona, Madrid, España. 607 pp.
- Núñez, C. E. Extracciones con equipo soxhlet. Consultado en: <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSohxlet.pdf>. 4 de diciembre del 2012.
- Nwosu, M. O. y J. I. Okafor. 1995. Preliminary studies of the antifungal activities of some medicinal plants against *Basidiobolus* and some other pathogenic fungi. Mycoses 38: 191-195.

- Onuh, M. O., Ohazurike, N. C., Emeribe, E. O. 2008. Efficacy of *Jatropha curcas* leaf extract in the control of brown blotch disease of cowpea (*Vigna unguiculata*). Biological Agriculture & Horticulture 25: 201-207.
- Padilla Castillo, J. D., Torres Flores, A. L. 1993. Comportamiento de dos Variedades de Tempate en el Pacífico de Nicaragua. UNAN.
- Pabón, L. C. y P. Hernández Rodríguez. 2012. Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales. Revista Cubana de Plantas Medicinales 17:194-209.
- Picado, L. C. 1997. Evaluación de las Relaciones Genéticas entre y dentro de cuatro cultivares importados de *Jatropha curcas* L.; establecidas en el Banco de Germoplasma de la UNAN- León. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León,
- Rhoades, D. F. 1979. Evolution of plant Chemical defense against herbivores. Pp. 3-54. En: Rosenthal, G.A. y Janzen, D.H. (eds.) Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites. Academic Press, Nueva York, USA.
- Romero, C.S. 1993. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 347 pp.
- Rug, M. y Ruppel, A. 2000. Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against intermediate snail hosts and larvae of schistosomes. Tropical Medicine & International Health 5: 423 - 430.
- Saetae, D. y Suntornsuk, w. 2009. Antifungal Activities of Ethanolic Extract from *Jatropha curcas* Seed Cake. Journal Microbiol. Biotechnol. 20(2): 319-324.
- Schmook, B. y Sánchez-Sánchez O. 2000. Usos y potencial de *Jatropha curcas* L en la península de Yucatán, México. Foresta Veracruzana 2(2): 7-11.
- Schultz, B., Boyle, C. Draeger, S., Rommert, A.K., Krohn, K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. Micological Research 106 (9): 996-1004.

Schultz, J.C. 1988. Many factors influence the evolution of herbivore diets, but plant chemistry is central. *Ecology* 69: 896-8.

Solsoloy, A.D. y Solsoloy, T.S. 1997. Pesticida lefficacy of formulated *Jatropha curcas* oil on pests of selected field crops. In: *Biofuels and Industrial Products from Jatropha curcas*. Eds. G. M. Gübitz, M. Mittelbach, M.Trabi, Dbv-Verlagfür Technische Universität Graz, Graz (Austria), 216–226 pp.

Thangavelu, R., P. Sundararaju, y S. Sathiamoorthy. 2004. Management of anthracnose disease of banana caused by *Colletotrichum musae* using plant extracts. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79: 664-668.

Tropicos. 2009. Botanical information system at Missouri Botanical Garden. Consultado en: <http://www.tropicos.org/name/12800067>

Vásquez Méndez, M. I. 1998. Insectos del Tempate en Plantaciones Comerciales. UNAN.

Watanabe, T. 1994. Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species. CRC Press, Inc. Florida, USA. 411pp.

Weerasena O. V. D. S. J., Amarasekara A.S., Wijesundera R.L.C. 1993. “Fungicidal Activity of synthetically modified cashew nut shell liquid” *Journal of Natural Science* 21(2): 253 -258.

Wei, Q., Liao, Y., Zhou, L., Zhou, J., Wang, S., y Chen, F. 2004. Anti- fungal activity of curcin from seed sof *Jatropha curcas*. *Chinese Journal of Oil Crop Scieives* 26:71–75.

Wender, P. A., Kee, J. M., Warrington, J. M. 2008. Practical synthesis of prostratin, DPP, and their analogs, adjuvant leads against HIV. *Science* 320: 649–652.

Wink, M., C. Koschmierder, M. Sauerwein y F. Sporer. 1997. Phorbol Esters of *J. curcas*- Biological Activities and Potential Applications, Instituto para la farmacologia botanica de la Universidad de Heidelberg, Alemania.

Zeng, L., Yan, F., Chen, F. 2004. In vitro bacteriostasis of *Jatropha curcas* L. extract against chicken *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. China Poultry Science 8: 35–37.

Zillinsky, F. J. 1984. Enfermedades comunes de los cereales de grano pequeño: una guía para su identificación. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT, El Batán, México. 141 pp.