

**Instituto Tecnológico de Costa Rica
Vicerrectoría de Investigación y Extensión
Dirección de Proyectos**

**Informe final de proyectos de investigación y extensión
Escuela de Biología
Escuela de Ingeniería Forestal**

Optimización de la producción de biodiesel a partir de plantaciones de *Jatropha curcas* (tempate): contribuciones a la problemática mundial sobre la sincronía floral de la especie.

Elizabeth Arnáez Serrano
Ileana Moreira González
Dagoberto Arias Aguilar
Marvin Castillo Ugalde
Elemer Briceño Elizondo
Karla Valerín Berrocal
Karol Jiménez Quesada

**CARTAGO
MARZO, 2016**

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINAS
Índice de figuras	3
Índice de cuadros	4
Aspectos generales	5
Autores y direcciones	5
Resumen	6
Abstract	7
Introducción	8
Marco Teórico	8
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
Metodología	10
COMPONENTE 1. Evaluar el factor de luminosidad sobre la floración del tempate y estimar la influencia de la fertilización con nitrógeno sobre la floración en <i>Jatropha curcas</i>	11
COMPONENTE 2: Determinación de los perfiles de expresión de componentes claves de la red genética para la regulación de la floración en <i>Jatropha curcas</i> .	16
COMPONENTE 3 Determinación del nivel mínimo de irradiancia requerido para la floración de <i>Jatropha curcas</i>	17
COMPONENTE 4 Analizar el efecto del factor podas sobre la expresión floral en <i>Jatropha curcas</i>	19
Resultados y Discusión	21
COMPONENTE 1.	21
COMPONENTE 2	24
COMPONENTE 3	29
COMPONENTE 4	32
Conclusiones	33
Recomendaciones	33
Agradecimientos	33
BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXOS	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Contenido	Página
1	Primeros cubículos hechos con sarán	11
2	Cubículos con “Cober”	11
3	Muestra de pruebas con diferentes tipos de lámparas	12
4	Resultados de Pruebas iniciales de Luz y Fotosíntesis : a) Pruebas iniciales con bombillos 100 watts incandescentes, B) Pruebas con Luz Led de 250 Watts, C) Pruebas con Reflector LED de 150 Watts. Pruebas B y C realizadas con una unidad y una planta.	13
5	Potes utilizados	14
6	Mapa del diseño de distribución del ensayo de podas en <i>Jatropha curcas</i>	20
7	Crecimiento de plantas en cubículos por tratamiento (luz al 50, 75 y 100%) y nutrientes (5,10 y 20%).	21
8	Número de hojas en cubículo promedio por planta.	22
9	Electroforesis en gel de agarosa. A. Muestras de ARN extraídas con el protocolo 1. B. Electroforesis de ADN copia obtenido a partir de ARN que se muestra en la imagen A.	25
10	Electroforesis en gel de agarosa de muestras procesadas mediante el protocolo 2 para la obtención de ARN.	26
11	Electroforesis en gel de agarosa para muestras de ARN extraídas mediante el protocolo 3 (proporcionado por UC Davis).	26
12	Electroforesis de productos de PCR obtenidos utilizando imprimadores ITS. 1. Control Positivo. 2 y 3. Muestras extraídas con protocolo 1. 4 y 5. Muestras extraídas con protocolo 2. 6 y 7, muestras extraídas con protocolo 3.	27

ÍNDICE DE CUADROS

Número	Contenido	Página
1	Porcentajes de intensidad lumínica y de nutrientes en ensayo de floración en <i>Jatropha curcas</i>	12
2	Concentraciones de ARN obtenidas en los diferentes protocolos de extracción utilizando el nanodrop lite de ThermoScientific.	24

ASPECTOS GENERALES

Código y Título del proyecto

Código 1510037

Optimización de la producción de biodiesel a partir de plantaciones de *Jatropha curcas* (tempate): contribuciones a la problemática mundial sobre la sincronía floral de la especie.

Autores y direcciones

Nombre y apellidos	Escuela	Grado académico
Elizabeth Arnáez Serrano (coordinadora)	Biología	MSc
Ileana Moreira González	Biología	MSc
Dagoberto Arias Aguilar	Ing. Forestal	PhD
Marvin Castillo Ugalde	Ing. Forestal	Lic.
Elemer Briceño Elizondo	Ing. Forestal	PhD
Karla Valerín Berrocal	Biología	MBA
Karol Jiménez Arias (por un semestre, en sustitución de la Ing. Valerín)	Biología	Lic

Escuelas o instituciones participantes	
Escuelas	Instituciones u organizaciones
Biología e Ingeniería Forestal	ITCR (Instituto Tecnológico de Costa Rica)
Ing. Jesús Hernández López	UCR (Universidad de Costa Rica-Estación Experimental Fabio Baudrit) y Ministerio de Agricultura y Ganadería
Charles Aker	Universidad Nacional de Chiapas-México
Miguel Salvatore	Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León
Yamil Macedo	EMBRAPA-Brasil

Nota: Con financiamiento externo ganado en un concurso internacional, en la propuesta presentada por Costa Rica, México, Nicaragua, Colombia y Brasil, cuyo nombre es: "Regulation of the flowering of *Jatropha curcas* to improve the sustainability of biofuel feedstock production by farmers in Latin America and the Caribbean" aprobado por LAC-Brasil.

Resumen

Los biocombustibles como fuente energética poseen grandes beneficios al compararla con los combustibles fósiles tradicionales, pues pueden generar energía carbono-neutra. A nivel mundial, los cultivos para biocombustibles y en particular biodiesel, consideran un amplio espectro de especies, pero presentan sus diferencias en cuanto a productividad, calidad del aceite, adaptación al cambio climático y la oferta de otros servicios ecosistémicos. Durante los últimos 4 años, un grupo de investigadores de las universidades estatales del país han realizado estudios sistemáticos sobre el cultivo de *Jatropha curcas* (Tempate) para su uso comercial como fuente de aceite para producir biodiesel. Esta especie está siendo ampliamente estudiada a nivel mundial, siendo México el centro de distribución genética.

Por ser una planta no domesticada, son muchas las necesidades de investigación que aún se deben realizar, todas tendientes a garantizar las condiciones geográficas, de manejo y de producción que permitan el establecimiento del cultivo a nivel comercial y bajo el enfoque de producción sustentable. Una de las limitantes más significativas a nivel mundial es la falta de sincronía floral y la irregularidad por eso el presente trabajo se basó en estudiar los factores climáticos y los aspectos genéticos que estimulen este fenómeno fisiológico. Los ensayos establecidos en la Estación Experimental Fabio Baudrit de la Universidad de Costa Rica, ubicada en la Garita de Alajuela, permitieron determinar la longitud de onda óptima para un mejor desempeño fotosintético, el protocolo de extracción de ARN, la identificación genética del Banco de Germoplasma y la influencia de las podas en la floración.

Palabras clave: *Jatropha curcas*, tempate, Biología floral, biodiesel, piñón manso, fisiología de la floración.

Abstract

Biofuels as an energy source have great benefits when compared to traditional fossil fuels, due to the fact of its emission neutrality. Globally, biofuel crops and in particular biodiesel, considers a broad spectrum of species, however differences in productivity, oil quality, climate change adaptation and supply of other ecosystem services give rise to difficulties. Over the past 4 years, a group of researchers from state universities have conducted systematic studies on the cultivation of *Jatropha curcas* (Tempate) for commercial use as a source of oil to produce biodiesel. This species is being widely studied worldwide, with Mexico at the center of its genetic distribution.

Being a non-domesticated plant, further research must still be done, to ensure geographical condition control, as well as production and management which would enable the establishment of commercial cultivation and under the focus of sustainable production. One of the most significant limiting factors worldwide is the lack of floral synchrony and its irregularity, hence this work aimed at studying climatic factors and genetic aspects that stimulate this physiological phenomenon. Trials set out at the Experimental Station Fabio Baudrit of the UCR, located in Garita, Alajuela allowed to determine the optimum wavelength for better photosynthetic performance, RNA protocol extraction, genetic profiling of the gene bank and the influence that pruning has on flowering.

Key words: *Jatropha curcas*, tempate, floral synchrony, biodiesel, piñón manso, floral physiology

1. Introducción

Los biocombustibles como fuente de energía poseen grandes beneficios al compararla con los combustibles fósiles tradicionales, pues pueden generar energía carbono-neutro. A nivel mundial, los cultivos para biocombustibles consideran un amplio espectro de especies, pero presentan sus diferencias en cuanto a productividad, calidad del aceite, adaptación al cambio climático y la oferta de otros servicios ecosistémicos, por ejemplo la capacidad para el aumento y mantenimiento del secuestro de carbono (C) fijado en la biomasa y en el suelo. Proyecciones para Costa Rica anticipan que ante un escenario creciente de demanda energética, las fuentes tradicionales de energías limpias del país no podrán crecer más a partir del 2032.

Durante los últimos 4 años, un grupo de investigadores de las universidades estatales del país han realizado estudios sistemáticos sobre el cultivo de *Jatropha curcas* (Tempate) para su uso comercial como fuente de aceite para producir biodiesel. Esta especie está siendo ampliamente estudiada a nivel mundial, siendo México el centro de distribución genética. En Costa Rica es una planta nativa, presente en ambas vertientes y conocida por nuestros agricultores como Tempate.

En el país se han iniciado los estudios sobre la domesticación de este cultivo y con la colaboración de empresarios y agricultores se ha incursionado en la siembra de *Jatropha*, la cual es utilizada como cerca viva, o en pequeñas plantaciones para la obtención de semillas. Por ser una planta no domesticada, son muchas las necesidades de investigación que aún se deben realizar, todas tendientes a garantizar las condiciones geográficas, de manejo y de producción que permitan el establecimiento del cultivo a nivel comercial y bajo el enfoque de producción sustentable. Una de las limitantes más significativas a nivel mundial es la falta de sincronía floral y la irregularidad en la producción de frutos.

El presente trabajo buscó relacionar los factores climáticos y los aspectos genéticos para entender mediante un modelo fisiológico, la manera en que los genes responsables de la sincronía floral responden a estímulos ambientales (luz, agua y nutrientes). No existe a nivel mundial un abordaje científico como el que se planteó en la presente propuesta.

2. Marco Teórico

La especie *Jatropha curcas* es una especie de la zona mesoamericana, que se caracteriza por tener un gran potencial económico, basado en el uso medicinal de la misma, así como su uso para la extracción de aceite de alta calidad. Este potencial permite que se pueda estudiar su uso en humanos en diferentes tipos de fitoterapias ya que es de gran importancia ir caracterizando nuestra flora en este sentido especialmente en las interacciones hierba y drogas. (Pulok *et al*, 2011). La planta crece muy bien si se le brindan todos los requerimientos como cualquier cultivo, sin embargo se debe estudiar su Biología Reproductiva (Loiza *et al* 2012), para evitar lo que algunos expertos llaman el colapso de *Jatropha* como biocombustible global (Wu, 2011), lo que se requiere es inversión en estudios más minuciosos en la floración, especialmente partiendo de que la especie

presenta flores femeninas y masculinas en una proporción de 1:4 (Loaiza *et al* 2012). Al ser esta especie de esta zona Mesoamericana vale la pena hacer esfuerzos en su domesticación, orientados a investigar los factores disparadores de la floración y la influencia de los mismos en la expresión de la sexualidad de las flores, buscando así que se pueda mejorar la expresión de flores femeninas.

Según Thomas (2006) los estudios fisiológicos por largos períodos han demostrado que la luz actúa regulando la floración, específicamente si se toma en cuenta variables como calidad, cantidad y duración. El modelo probado en *Arabidopsis* permite sugerir que hay que revisar la calidad y el fotoperíodo de la planta. Coincidiendo con esto Ausin *et al*, (2004) indican que el inicio de la floración en plantas es controlado por el ambiente y los signos endógenos por lo que es necesario añadir a estos estudios la caracterización genética de todos los estadios para determinar la expresión de los genes y generar así mejores conclusiones sobre lo que está pasando en las plantas.

Actualmente los mecanismos de regulación genética han avanzado mucho y permiten repetir los modelos en plantas como la *Jatropha*, repitiendo también la aplicación de reguladores de crecimiento que permitan disparar los procesos fisiológicos que se buscan (Ausin, et al, 2004; Sun et al; 2012). Los cambios a nivel de citokinesis en el interior de las plantas floreadas, evidencian cambios a nivel de fragmoplasto, pared, membrana etc, que deben estudiarse profundamente (Heese, et al 1994) estudios que son el punto de partida para que se profundice en la caracterización de los procesos.

Los estudios sobre floración requieren de tener acceso a material identificado genéticamente en un banco de germoplasma debidamente establecido donde se haya hecho una caracterización y recolecta a nivel país o regional que contemple descriptores similares a los de otros bancos para homologar los resultados (Sunil et al, 2013). Los marcadores moleculares y los estudios comparativos de características bioquímicas de los aceites validarían aún más los resultados (Basha et al, 2009).

Objetivo general:

Determinar el mecanismo de regulación natural de la floración de *Jatropha curcas* por medio de la validación del modelo fisiológico de metabolitos que participan en este fenómeno.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el factor de luminosidad sobre la floración del Tempate bajo condiciones controladas
2. Estimar la influencia de la fertilización con nitrógeno sobre la floración.
3. Iniciar el proceso de validación de un modelo fisiológico para la regulación de la floración que incluya la caracterización de espacios temporales de la expresión de los genes.
4. Determinar el nivel mínimo de irradiancia requerido para la floración de *Jatropha*.
5. Analizar la influencia del factor riego y manejo mediante podas sobre la expresión floral.

6. Transferir los resultados a los productores y la comunidad nacional e internacional, mediante el enfoque de “green growth”

3. Metodología

Los ensayos se llevaron a cabo en la Estación Experimental Fabio Baudrit (880 msnm), situada en la Garita de Alajuela, Costa Rica. De octubre del 2013 a diciembre del 2015.

Las investigaciones realizadas correspondió a los objetivos específicos establecidos, dentro del marco del proyecto internacional “Regulation of the flowering of *Jatropha curcas* to improve the sustainability of biofuel feedstock production by farmers in Latin America and the Caribbean”, fue un proyecto del “Working Group on the Synchronization of Flowering of the LAC *Jatropha* Network, financiado por Agricultural Innovation MKTPlace. Llevado a cabo en conjunto con Nicaragua, México y Brasil.

Para incorporar de mejor forma los trabajos realizados se dividió el informe en componentes, cada uno con los objetivos correspondientes de la siguiente manera:

NOTA:

En el siguiente apartado se agruparon los objetivos dentro de cinco componentes:

Componente	Objetivos específicos que contempla
1	1 y 2
2	3
3	4
4	5

El objetivo 6 corresponde a la transferencia de los resultados, que se encuentra descrita en el **documento 2**.

Componente 1.

Evaluar el factor de luminosidad y estimar la influencia de la fertilización con nitrógeno sobre la floración del Tempate bajo condiciones controladas

Para realizar estos ensayos se habilitó un invernadero ubicado en la Estación Fabio Baudrit de la Universidad de Costa Rica, con el fin de validar un modelo que permitiría explicar la regulación natural de la floración de *Jatropha curcas*.

Se construyeron 9 cubículos de 2.55 m de alto, por 1.75 de ancho, con el fin de lograr una oscuridad total al inicio cada uno se cubrió con sarán (Fig. 1), pero como todavía quedaba con mucha luz, se rediseñaron y se les colocó una cobertura de tipo “Cober” (Fig. 2), que limita aún más el paso de la luz.



Figura 1. Primeros cubículos hechos con sarán



Figura 2: Cubículos con “Cober”

Se estableció un diseño experimental de bloques completos al azar, con 3 niveles de irradiancia (100, 75 y 50%) y 3 niveles de nutrientes (5, 10 y 20%). (Cuadro 1)

Cuadro 1: Porcentajes de intensidad lumínica y de nutrientes en ensayo de floración en *Jatropha curcas*

Cubículo	% Intensidad Lumínica	% de nutrientes
1	75	10
2	75	5
3	75	20
4	100	10
5	50	10
6	50	20
7	100	20
8	50	5
9	100	5

Para determinar las intensidades lumínicas que activaran la fotosíntesis en las plantas, se realizaron pruebas con diferentes tipos de bombillos y lámparas que cumplieran con este requisito. Para ello se hicieron mediciones comparativas de la intensidad lumínica en condiciones naturales.

Dentro de las primeras pruebas se contó con los siguientes materiales: 6500K grow bulb 24 watts, 6500K grow bulb 54 watts, 3000K grow bulb 54 watts, ultra sun dual arc tube lamp, 600W 2K high pressure sodium lamp, panel luces LED Azul-Rojo-Naranja-Blanco, panel luces LED azul-blanco, panel Luces LED azul-rojo, panel luces LED rojo, panel luces LED azul. A pesar de todas las pruebas realizadas no se logró la tasa de fotosíntesis buscada, se recurrió a la empresa ubicada en Costa Rica denominada "Innovaciones Ecosolares". Se probaron dos tipos de lámparas en los cubículos ubicados en el invernadero de la Estación Experimental Fabio Baudrit, con el equipo CIRAS II (Fig. 3)



Figura 3: Pruebas con diferentes tipos de lámparas

Después de realizar los últimos ensayos con bombillos incandescentes, luz tipo lámpara y luz tipo reflector se concluyó que la que podría ofrecer mejores resultados para el experimento sería la lámpara tipo campana. (Fig. 4)

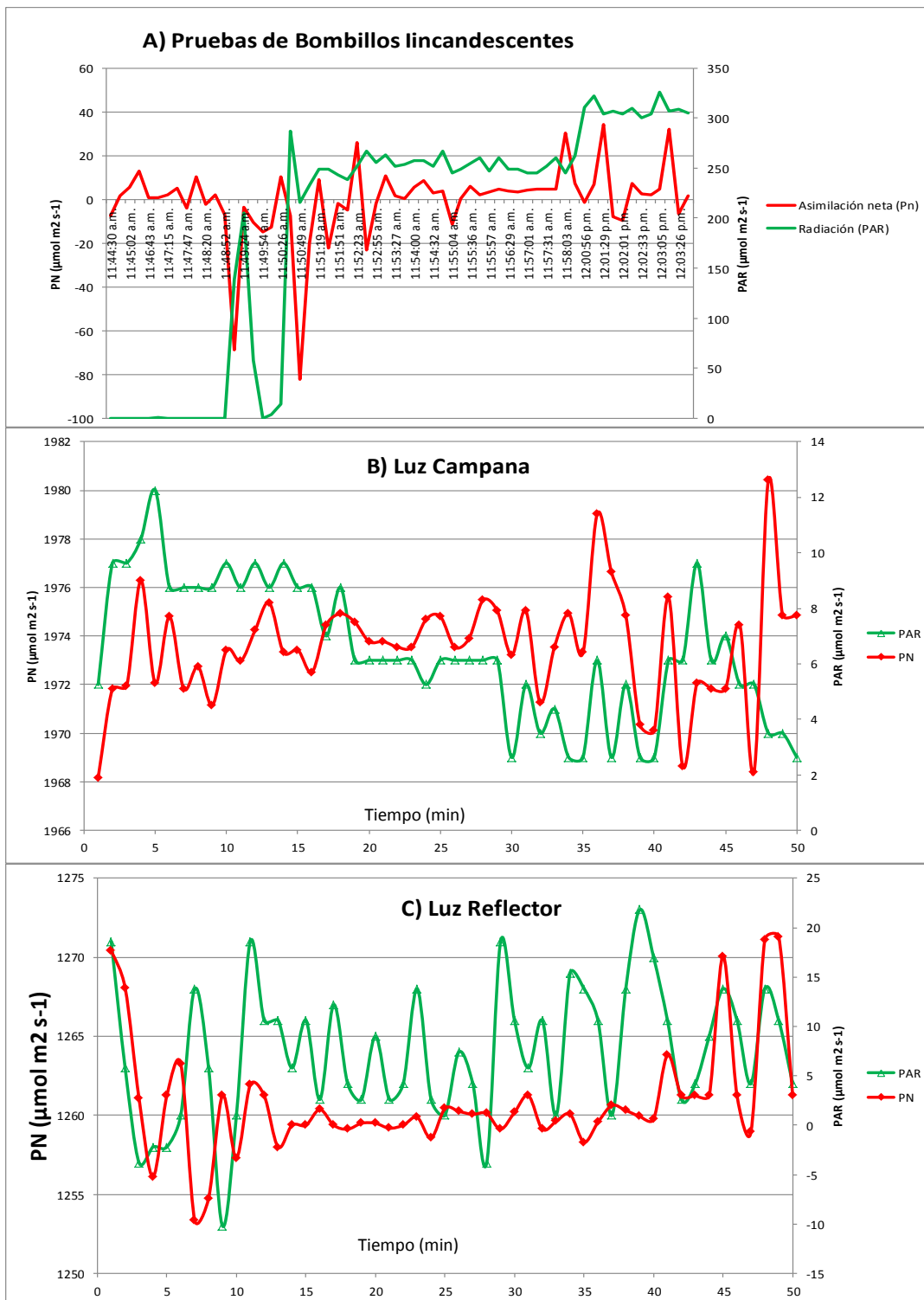


Figura 4. Resultados de Pruebas iniciales de Luz y Fotosíntesis : a) Pruebas iniciales con bombillos 100 watts incandescentes, B) Pruebas con Luz Led de 250 Watts, C) Pruebas con Reflector LED de 150 Watts. Pruebas B y C realizadas con una unidad y una planta.

Se estimó que para la intensidad de 100% se colocarían 4 lámparas, 3 para el 75% y 2 para el 50%, 9 plantas por cubículo, tomándose al azar una de ellas para las mediciones de fotosíntesis respectivas. Para un total 9 cubículos y 81 plantas dentro del ensayo.

La accesión escogida en este ensayo fue Comayagua, debido a su alta producción y comportamiento en el campo. Como sustrato se utilizó suelo producido a partir de lombricompost obtenido de los residuos del café de COOPETARRAZU. Se realizó una mezcla con arena la cual se desinfectó previamente con kilol (2 galones en un estañón) junto con vitavax y se cubrió con un plástico.

Una vez desinfectado el material se realizó la mezcla de las diferentes concentraciones de sustrato según el peso al 5, 10 y 20% de lombricompost con arena y se pusieron en potes de plástico de 20 litros (todos del mismo alto y tamaño); para no tener exceso de agua y no perder lixiviados se puso un plato plástico en la base de cada pote. (Figura 5)



Figura 5: Potes utilizados

Se instaló un sistema eléctrico automático de riego por planta y de iluminación (12 luz y 12 oscuridad) por cubículo.

Se contó con los datos de una estación meteorológica instalada en el invernadero.

MEDICIONES REALIZADAS:

- 1- Cada 2 semanas para cada una de las plantas se midió:
 - a. Altura de la planta (hasta el meristemo apical).
 - b. Período de aparición de las primeras hojas.
 - c. Número de hojas en el tallo principal (también se contaron las cicatrices de las hojas caídas)

- 2- Se midió la tasa de fotosíntesis en las hojas seleccionadas de cada planta por tratamiento por medio del CIRAS II.

Consideraciones generales:

El CIRAS-2 requiere un calentamiento previo al inicio de las mediciones de aproximadamente 10 minutos. El equipo permite la visualización simultánea, en pantalla a color y en tiempo real, de hasta 15 variables de medición y gráficos, en el entorno de Microsoft Windows.

Antes de iniciar el trabajo con el CIRAS-2 hay que considerar los siguientes aspectos:

1. El tipo de cámara que porta la pinza y el área foliar que abarca (se recomienda cubrir toda la superficie de la cámara, para evitar problemas en la determinación del área foliar).
 - a. La ventana de 2,5 cm²
2. El flujo de aire (se recomienda un valor de 200 mL min⁻¹, pero obviamente el seteo debe hacerse en función del material con el que se va a trabajar).
 - a. El flujo a tomar será de 200 mL min⁻¹
3. El tipo de luz en uso 4. La relación estomática entre las caras de la hoja (valores por defecto si no se conoce esta información). La Luz a usar se especifica a continuación:
4. El tipo de control del vapor de H₂O (% del ambiental o valor fijo).
 - a. La Humedad relativa (RH) estará en un rango de 46 como mínimo a 70% como máximo
5. El tipo de control del CO₂ (valor aproximado o exacto). En la pantalla del equipo se muestran los valores medidos y calculados en cada instante, así como los valores fijados por el usuario
 - a. La concentración del CO₂ en la cámara se fijara a la más aproximada al ambiente, (380 ppm)

Métodos de Medición:

Curva de Luz: Para lograr el correcto registro de información, se recomienda realizar una curva de Luz previo a las mediciones de tratamientos en cada campaña de medición para verificar que los sellos estén trabajando correctamente y tener un estimado de los valores máximos a alcanzar el día de medición:

- CO₂ a 380 ppm ($\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{ mol}(\text{air})^{-1}$).
- “Photon flux density” (PFD) de 0 a 2000 $\mu\text{mol}(\text{quanta}) \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.
- Humedad Relativa (RH) en el rango de 46 a 70%.
- El flujo a tomar será de 200 mL min⁻¹

Medición en el tiempo: La medición que se realizó estuvo basada en el método de medición en lapsos de tiempo corto, este método resulta interesante para evaluar la fotosíntesis de una hoja en determinado momento del día, bajo condiciones naturales de luz y temperatura.

COMPONENTE 2:

Determinación de los perfiles de expresión de componentes claves de la red genética para la regulación de la floración en *Jatropha curcas*.

En el marco del proyecto se apoyó la ejecución de un proyecto de tesis de maestría del CIBCM (UCR), el cual se encuentra en proceso, denominado: **Cuantificación mediante qPCR de genes implicados en floración en *Jatropha curcas***. A cargo de Carolina Muñoz Flores., el cual concluirá en diciembre del 2016.

Por otro lado, se colectaron muestras vegetativas y se estableció el protocolo de extracción de ARN, para posteriores determinación de genes inductores de floración, tomando una muestra de planta por cubículo, según ensayo establecido en el componente 1.

Protocolo 1. Se pesaron aproximadamente 125 mg de material fresco, a este se le adicionó 200 ul de buffer de extracción (150mM LiCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris HCl, pH 9.0 y 5% SDS). Se maceró utilizando el macerador marca Retsch®, 30 golpes por segundo durante 2 minutos. Una vez macerado se centrifugó a 14000 revoluciones por minuto (rpm), se tomó el sobrenadante y se trasvasó a un tubo de 1,5 ml nuevo. Se adicionó un volumen de Fenol/Cloroformo/alcohol Isoamílico. Luego de agitar y centrifugar a 12000 rpm durante 15 min, se separa la fase acuosa y se adicionó 0,2 volúmenes de ácido acético 1M y 0,7 volúmenes de etanol absoluto. Se dejó precipitando toda la noche a -20°C. Al cabo de este tiempo, se centrifugó la muestra a 12 rpm durante 20 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se secó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se resuspendió en 100 ul de acetato de sodio 3M y se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos, esto se hizo dos veces y se descartó el sobrenadante, el precipitado se lavó con etanol 70% y se resuspendió en agua tratada con DEPC. (Adaptado de Madriz, 2010)

Estas muestras fueron purificadas con el Kit de extracción de la marca Macherey-Nagel®, eliminando los puntos 1, 2 y 3 del protocolo suministrado por el fabricante, que corresponden al proceso de lisis celular.

Protocolo 2. Consistió en el procedimiento descrito en el protocolo 1 pero no se purificó con el kit Macherey Nagel®, sino que las muestras fueron tratadas con ADNasa para eliminar cualquier resto de ADN que pudiera afectar el resultado. Las muestras se incubaron a 4°C durante 45 min, posteriormente se incubaron a 65°C para inactivar la enzima ADNasa.

Protocolo 3. En este caso se probó un protocolo proporcionado por la Universidad de Davis, California (USA), con algunas modificaciones. Se pesaron aproximadamente 125 mg de muestra en un tubo de 1,5 ml para microcentrífuga. Se coloca en nitrógeno líquido por 30 segundos. La muestra se maceró con un micropistilo estéril y frío evitando la rehidratación del tejido, inmediatamente se agregó 500 ul de Buffer CTAB (1g de CTAB, 1g de PVP, 5ml de Tris-HCl pH8 1M, 5,8g de NaCl, 2,5 ml de EDTA 0,5M y 20ul de β -Mercaptoetanol por cada ml de Buffer). Se maceró nuevamente la muestra utilizando el macerador Retsch® durante 3 min, 30 golpes por segundo. Posteriormente, se incubaron a 65°C por 5 minutos, luego se agitaron en vortex por 5 segundos. Se agregó 1 volumen de Feno/Cloroformo/Isoamilalcohol en

proporción 25:24:1 a pH 6,7. Se mezclaron con vortex y se colocaron en hielo por 2 minutos. Se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregó igual volumen de Fenol/Cloroformo/Isoamilalcohol. Se centrifugaron nuevamente y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo. Se agregó 1/10 de volumen de NaOAc 1M. Se centrifugaron nuevamente y se trasvasó el sobrenadante a tubo nuevo, se agregó ¼ de volumen de LiCl 10M. Se mezcló por inversión y se colocó a -20°C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó durante 45 minutos y se eliminó el sobrenadante y el pellet se dejó secar en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, las muestras fueron purificadas con el kit de extracción de ARN Macherey-Nagel®

Síntesis de ADN Copia

Para sintetizar el ADN copia se utilizó el kit comercial RETRo-Script® de Ambion, con el protocolo descrito por el fabricante sin el paso de desnaturalización previa del ARN. El ADN copia obtenido fue amplificado con imprimadores ITS, los cuales son genéricos, esto para verificar la viabilidad del ADN copia obtenido. Posteriormente, se realizó un PCR utilizando los imprimadores específicos para genes de floración de *J. curcas*.

Además, se utilizó el kit comercial OneStep RT-PCR de Quiagen®. Con este kit se debe hacer la síntesis de ADN copia y la amplificación por PCR en un solo paso, no permite hacer ambos pasos de forma separada.

Para cuantificar tanto el ARN como el ADN copia se realizaron mediciones con el el Nanodrop Lite de ThermoScientific. (Cuadro 1) Las electroforesis se hicieron en geles de agarosa al 1,5% y se corrieron durante 1 h a 80 V.

Componente 3

Determinación del nivel mínimo de irradiancia requerido para la floración de *Jatropha curcas*

En las instalaciones de la Estación Experimental Fabio Baudrit (UCR), Alajuela. Costa Rica, se estableció un banco de germoplasma de tempate con 52 accesiones (2009). Este repositorio fue reubicado en el 2010. El suelo se preparó con maquinaria agrícola, se aró, rastrilló y alomilló. Las plantas fueron sembradas a una distancia de 3 x 2 m., se aplicó riego una vez por semana. Para el control de malezas se ha usado glifosato, así como deshierba en forma mecánica con motoguadaña. Se han presentado pocos problemas de plagas y enfermedades sin embargo, se ha aplicado como fungicida oxiclورو de cobre.

Se realizó la caracterización molecular de las accesiones presentes en el banco de germoplasma. Tomando hojas jóvenes de 50 plantas del banco de germoplasma de la Estación Experimental Fabio Baudrit, el material fue congelado y liofilizado después de la extracción de ADN. Los ácidos nucleicos se extrajeron mediante el Möller et al. (1992) de protocolo, y se cuantificó con un Nanodrop (Applied

Biosystems). Se amplificaron y secuenciaron, la toxicidad de las adhesiones se evaluó con tres marcadores de SSR (Vischi *et al.*, 2009).

Se hizo una evaluación de la capacidad fotosintética de las plantas por accesión utilizando el CIRAS 2, mencionado en el componente 1.

A partir de la caracterización morfológica realizada en dicho banco dentro del proyecto “Generación de información técnico-científica para el desarrollo del cultivo de *Jatropha curcas* (Tempate) en Costa Rica para su uso como fuente de energía alternativa y mitigación del cambio climático” (Arnález *et al.*, 2014), se seleccionaron 3 individuos de las 10 accesiones más productivas denominadas: Turrubares JCCR36, Jacó JCCR-3, El Barro de Turrubares, JCCR-43, Orotina JCCR-1, Marichal JCCR-42, Tempate 1 JCCR-6, San Vito 2 JCCR-30, México 2 JCCR-31, India JCCR-27, Tempate 1-Guanacaste JCCR-23. De tal forma que se monitorearon 30 plantas por semana desde febrero del 2014 hasta junio 2015. Cada semana se contó el número de inflorescencias, flores femeninas abiertas por inflorescencia y frutos verdes.

Para los análisis estadísticos se utilizó el período con mayor productividad de frutos verdes, inflorescencias y flores femeninas tanto del primer como segundo semestre del 2014 y 2015; para la evaluación entre las accesiones se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis debido a la no normalidad de los datos. Las pruebas se realizaron con una significancia del 0,05 en el programa STATISTICA 9.0

Además se evaluó la productividad de las accesiones mediante un índice de Productividad de la planta (IPP) generado a partir de los supuestos de multi producción de Fumero *et al.* (2016) y los análisis de relación de productividad foliar y reproductiva de seis especies en distintas condiciones climáticas (McCormack *et al.* 2015) que presenta valores porcentuales de 0 a 100, donde valores altos reflejan productividades mayores.

$$IPP = \left(\left(\frac{IF_N}{IF_{N \max}} * 0,33 \right) + \left(\frac{FF_N}{FF_{N \max}} * 0,33 \right) + \left(\frac{FV_N}{FV_{N \max}} * 0,33 \right) \right) * 100$$

Donde: IF_N es la inflorescencias en el momento N ; $IF_{n \max}$ es la inflorescencia máxima en el momento N ; FF_N es la cantidad de flores femeninas en el momento N , $FF_{n \max}$ es la la cantidad de flores femeninas máximas en el momento N ; FV_N es la cantidad de frutos verdes en el momento N , $Fv_{n \max}$ es la cantidad de frutos verdes máxima en el momento N ; FFN

Se determinó la viabilidad de flores femeninas anual como la división del total de flores femeninas entre el total de frutos verde de cada año. Las pruebas se realizaron con una significancia del 0,05 en el programa STATISTICA 9.0. Montaldo (2000) y Navarro *et al* (2000), determinan la eficiencia reproductiva por el cociente de número de frutos entre número de flores producidas. Y el éxito reproductivo (viabilidad) de flores femeninas anual como la división del total de flores femeninas entre el total de frutos verdes de cada año.

Los datos de productividad de flores femeninas e inflorescencias se correlacionaron con la precipitación, temperatura y la radiación solar, se considera que tienen alguna correlación cuando los valores obtenidos sean mayores a 0,40.

Componente 4

Análisis del factor podas sobre la expresión floral en *Jatropha curcas*

El ensayo se estableció en la Estación Experimental Fabio Baudrit, en la Garita de Alajuela, Costa Rica situada a 800 msnm, en octubre del año 2013. El suelo fue preparado con maquinaria agrícola (arado, rastreado y alomillado). Se sembraron 80 semillas de la accesión Comayagua de manera directa y a una distancia de 4 metros entre hileras y 4 metros entre plantas. Se mantuvo el riego dos veces a la semana hasta enero del 2014 y a partir de febrero de ese mismo año una vez por semana hasta la finalización del experimento. Se sustituyeron las plantas muertas por otras de la misma edad que se encontraban en el invernadero. Se sembraron plantas de tempate alrededor de todo en ensayo para eliminar el efecto de borde. En las primeras etapas se aplicó una deshierba en forma manual, pero cuando las plantas tuvieron una altura de 40 cm se procede a usar motoguaña.

En febrero del 2014 se estableció un diseño experimental bifactorial con bloques completos al azar y 4 repeticiones, distinguiendo cada bloque con su debida identificación. Tratamiento 1 y 2 corresponde a plantas que fueron podadas y los tratamientos 3 y 4 no podadas, el tratamiento (Figura 6). A partir de ese momento se midió la altura en todas las plantas, se podó el bloque correspondiente cuando la planta alcanzó una altura de 40 cm y lo mismo cuando las ramas producto de esta poda alcanzaron los 50 cm. A partir de esta última poda se esperó que se diera la floración y fructificación para realizar así la primera poda de formación dejando la planta con un tamaño máximo de 1.30 m. Se tomaron datos de número de inflorescencias, número de flores femeninas, frutos verdes y maduros, de los frutos cosechados se contó el número de semillas y se midió el peso fresco y seco de las mismas.

Se contabilizó el número de hojas al momento de la floración así como el número de ramas a las que se le ha estado midiendo el crecimiento en longitud.

Para el análisis estadístico se utilizaron las fechas que mostraron mayor productividad de frutos verdes, inflorescencias y flores femeninas tanto del primer como segundo semestre del 2014 y 2015; los resultados obtenidos de los cuatro tratamientos se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) siguiendo un diseño experimental de bloques al azar en el cual se valoraron si existían diferencias entre bloques (para descartar significancias en los resultados por esta variable) y diferencias entre tratamientos; en caso encontrar diferencias se realizó la prueba de Tukey a una significancia de 0,05; en cuanto al crecimiento se realizó para cada fecha nuevamente una ANOVA para definir diferencias en tratamientos en cuanto crecimiento. Las pruebas se realizaron con el programa STATISTICA 9.0

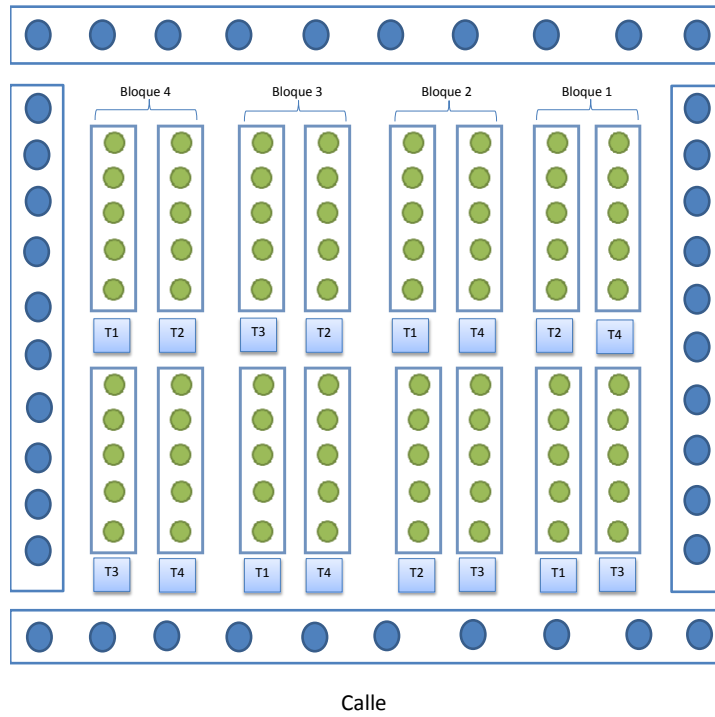


Figura 6: Mapa del diseño de distribución del ensayo de podas en *Jatropha curcas*.

4. Resultados y Discusión

Con la información obtenida se realizaron cinco artículos científicos, el extenso de los mismos se encuentra en el anexo. A continuación se presenta un resumen de cada uno de ellos:

COMPONENTE 1.

Se observó que las plantas que se encontraban a menores concentraciones de nutrientes presentan el crecimiento más lento, evidenciando que el efecto de los nutrientes y la iluminación influyen en esta variable (Fig. 7). Las plantas presentaron un rápido crecimiento vegetativo durante el año que se realizó el ensayo, sin observarse brotes florales.

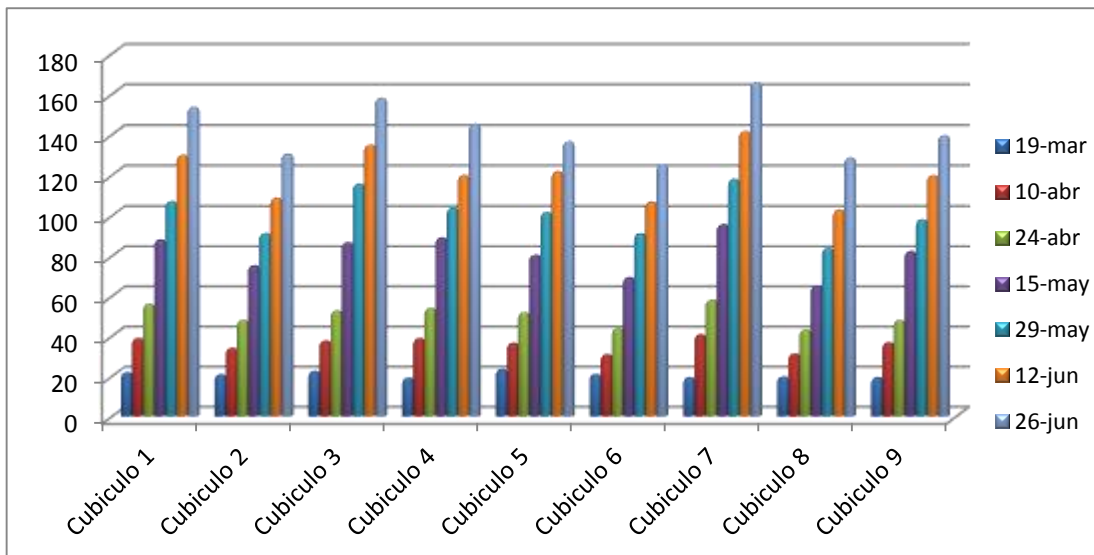


Figura 7: Crecimiento de plantas (centímetros) en cubículos por tratamiento (luz al 50, 75 y 100%) y nutrientes (5,10 y 20%).

Durante las semanas de observación la planta mostró un aumento constante en el número de hojas, de tal forma que alrededor de los cinco meses del ensayo la planta posee un promedio de 33 hojas por planta (Fig. 8). Esta variable fue contemplada partiendo del supuesto cierto número de hojas realizando el proceso fotosintético, contribuyen como disparadores de la floración y llenado de frutos, sin embargo por el tiempo que duró el ensayo no se logró la floración, lo que no permitió comprobar esta hipótesis.

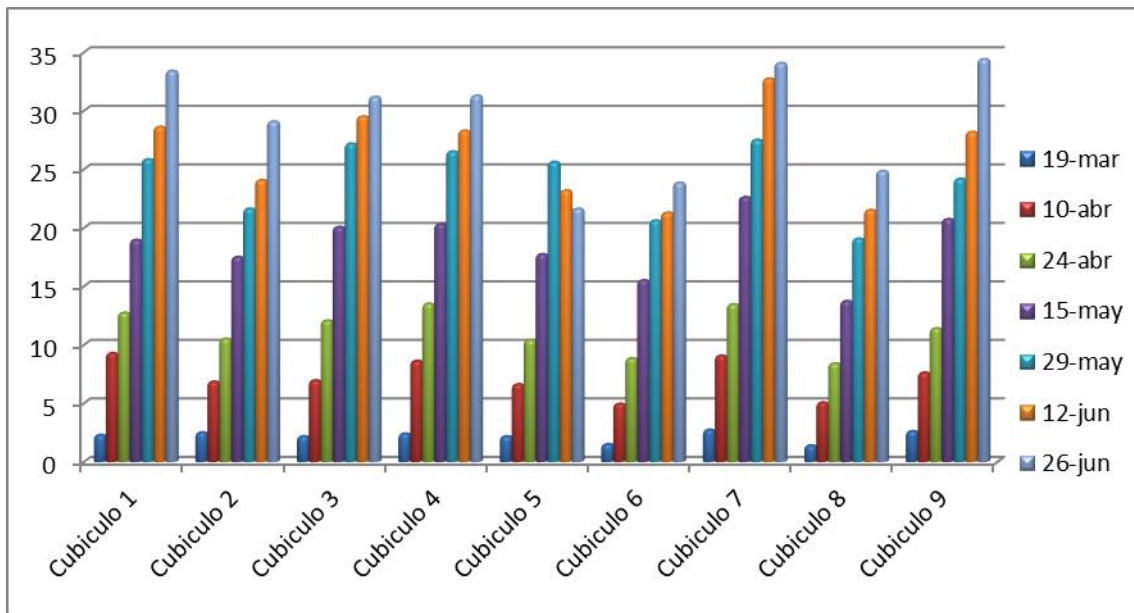


Figura 8: Número de hojas en cubículo promedio por planta.

En el Anexo 1 se observa el artículo derivado de los resultados de este componente. Se incorpora el resumen respectivo.

Net CO₂ assimilation of *Jatropha curcas* in controlled chambers for different levels of light intensity and compost mixing.

Elemer Briceño Elizondo¹; ebriceno@itcr.ac.cr
Elizabeth Arnaez²; earnaez@itcr.ac.cr
Ileana Moreira²; imoreira@itcr.ac.cr
Marvin Castillo¹; mcastillo@itcr.ac.cr
Dagoberto Arias Aguilar¹; darias@itcr.ac.cr
Jesus Hernandez³; jesus_hernandez_lopez@yahoo.com

- 1: Forest Engineering School, Instituto Tecnológico de Costa Rica
- 2: Biology School, Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- 3: Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica

Abstract

A multifactorial-factorial experiment (light and fertilization) was set to monitor growth and CO₂ assimilation to the combination of different light intensities (full artificial exposition at the Experimental Station of the UCR Fabio Baudrit, at Alajuela, Costa Rica. The experiment was based on the notion of photosynthetic active radiation (PAR) quality. A defined number of LED lamps (4: 100%) and a reduction of the number per chamber (3:75%; 2: 50%), determined light variation. For nutrient levels, a mixture of different percentages of vermicompost (20%, 10% and 5% of the substrate) was set. The results of the experiment were averse to what it was expected. The necessary PAR was never reached, although the lamp had the capacity to raise more than 2000 μmol (quanta) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, where the quanta decreased when trying to make light distribution uniform, and reported assimilation was below, by far, the levels reported by the species.

COMPONENTE 2.

En el cuadro 2 se muestra las diferentes concentraciones de ARN obtenidas con cada uno de los métodos de extracción, así como la relación 260/280 que permite tener una idea de la pureza del material genético extraído. Además, se muestran estos mismos datos para el ADN copia que se sintetizó a partir de las muestras de ARN. Según estos datos, con el protocolo 2 se logra una concentración más alta de ARN, sin embargo, la pureza es muy baja, ya que para ARN se considera aceptable una relación 260/280 cercana a 2, esto podría indicar contaminación con ADN o Fenoles.

Cuadro 2. Concentraciones de ARN obtenidas en los diferentes protocolos de extracción utilizando el nanodrop lite de ThermoScientific.

Protocolo	ARN total		ADN copia	
	Concentración ng/ul	Relación 260/280	Concentración ng/ul	Relación 260/280
1	171,6	1,71	960,9	1,66
1	243,9	2,04	840,3	1,53
2	686,5	1,57	999,3	1,62
2	541,7	1,48	837,4	1,71
3	41,6	1,83	1767,9	1,64
3	186,2	1,99	1799,2	1,64

La figura 9, muestra una electroforesis realizada a las muestras extraídas con el protocolo 1. En la figura 9A se puede observar unas bandas tenues de ARN, para ambas muestras, sin embargo, evidentemente hubo degradación ya que se observa un barrido y no están bien definidas. En la figura 9B, se señala lo que podría corresponder a ADN copia, pero la calidad de las bandas es muy baja y muestra mucha degradación por lo que no puede haber certeza de la presencia de ADN copia.

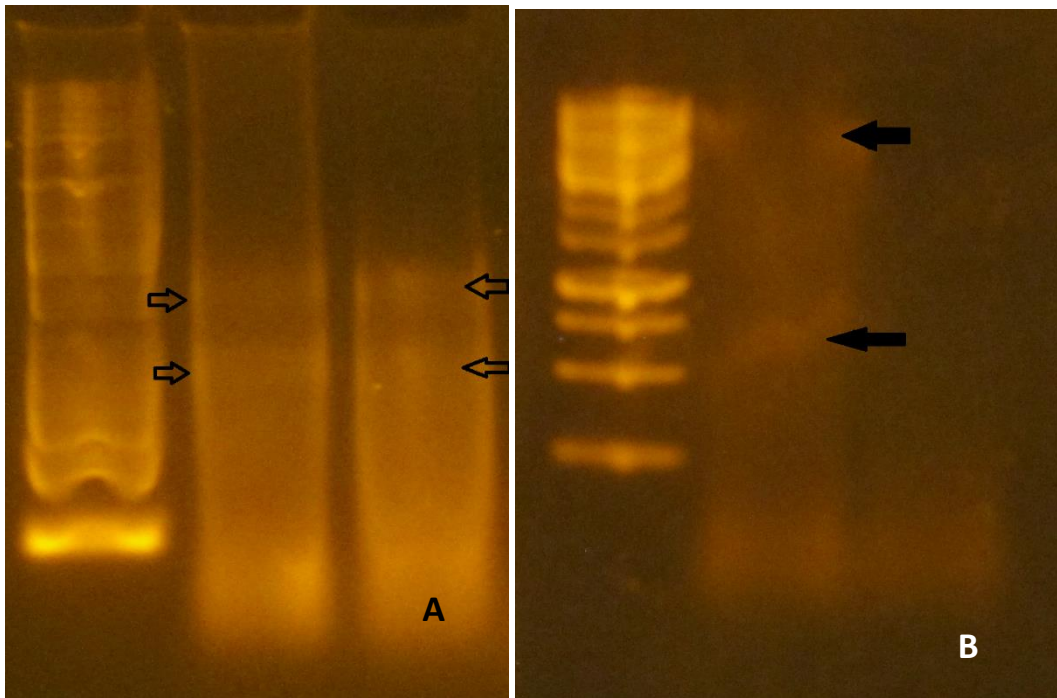


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa. A. Muestras de ARN extraídas con el protocolo 1. B. Electroforésis de ADN copia obtenido a partir de ARN que se muestra en la imagen A.

Con el protocolo 2 no se obtuvo ARN íntegro, (Fig. 10), además, se observó una banda intensa en la parte superior de cada uno de los carriles de corrida, que podría deberse a la presencia de ADN contaminante, lo que supondría que no funcionó el tratamiento con ADNasa, además una banda difusa en la parte inferior del carril de corrida, que podría deberse a ARN degradado. A pesar de que los resultados de la concentración obtenidos con el nanodrop indican valores altos, esto no garantiza la integridad del material genético, ya que, el nanodrop no hace distinción entre material genético íntegro y el degradado.

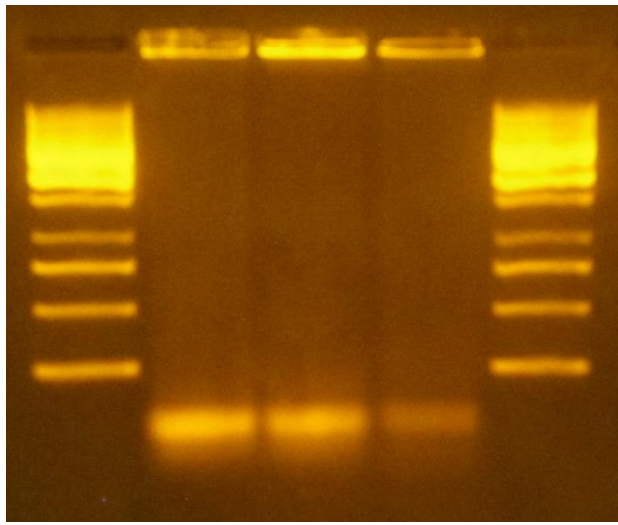


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de muestras procesadas mediante el protocolo 2 para la obtención de ARN.

Con respecto al protocolo 3, a pesar de que las concentraciones no fueron altas, se logró observar en la electroforesis la presencia de ARN. (Fig. 11)

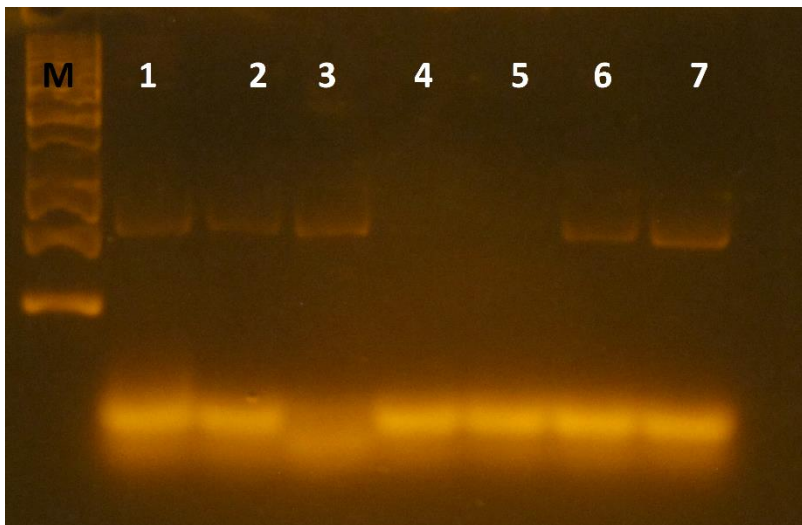


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa para muestras de ARN extraídas mediante el protocolo 3 (proporcionado por UC Davis).

Luego de sintetizar el ADN copia y hacer el PCR con imprimadores ITS, se logró obtener bandas que evidenciaban la amplificación con las muestras obtenidas mediante protocolo 1 y 3, no así con el protocolo 2 (figura 12). Sin embargo, a la hora de hacer PCR utilizando los imprimadores específicos para genes de floración de *J. curcas*, no se lograron obtener bandas para ninguna de las muestras.

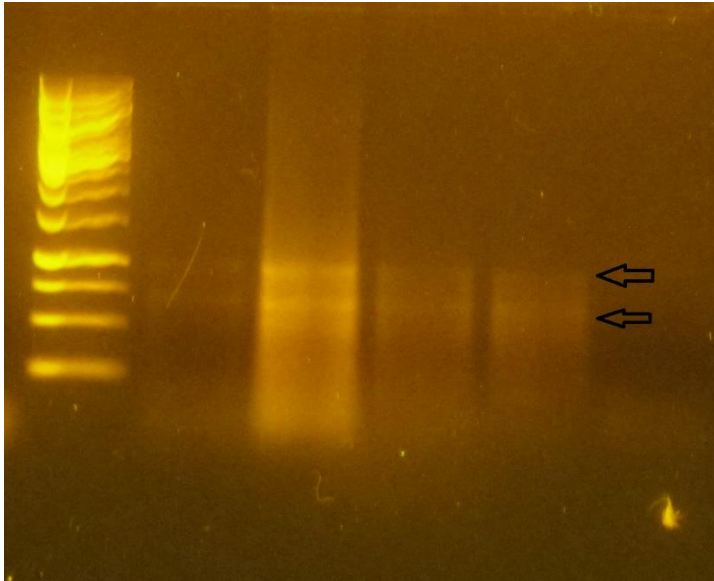


Figura 12 Electroforesis de productos de PCR obtenidos utilizando imprimadores ITS. 1. Control Positivo. 2 y 3. Muestras extraídas con protocolo 1. 4 y 5. Muestras extraídas con protocolo 2. 6 y 7, muestras extraídas con protocolo 3.

DISCUSIÓN

La extracción de ácidos nucleicos es un punto crucial en la investigación del material genético, ya que, dependiendo de la integridad y pureza del mismo, los pasos posteriores en la investigación serán exitosos o no. *J. curcas* es una planta que produce gran cantidad de metabolitos secundarios, responsables de muchas de las propiedades deseables de esta especie, sin embargo, se ha visto que este tipo de compuestos puede afectar de forma negativa la extracción de ADN y sobre todo de ARN, el cual es mucho más inestable y susceptible.

La obtención de ARN integro que se pudiera utilizar en los siguientes pasos de la investigación se vio limitado debido a la alta concentración de compuestos polifenólicos. El aislamiento de ARN en *J. curcas* es muy difícil debido a que el tejido contiene exceso de polisacáridos, polifenoles, terpenos y metabolitos secundarios que pueden co-precipitar con el ARN comprometiendo la calidad y el rendimiento del mismo. Los compuestos fenólicos se oxidan y se unen covalentemente a los ácidos nucleicos, mientras que los polisacáridos pueden precipitar con el ARN. (Kumar *et al*, 2011)

Según los resultados obtenidos, el método de extracción más adecuado es el protocolo 1, ya que con este se logró mayor concentración, además las electroforesis mostraron dos bandas, sin embargo, el grado de pureza no es el mejor en todas las pruebas realizadas lo que podría interferir en la obtención de ADN copia o en la reacción de PCR.

Chaudhary *et al*, reportan el uso de PVP en protocolos de extracción para tejidos con altos contenidos de polifenoles, polisacáridos y metabolitos secundarios, sin embargo, hacen la aclaración de que es incompatible con extracciones basadas en fenol, este pudo ser uno de los factores que influyeron en la degradación del ARN obtenido por este método.

El uso de kit comercial no logra buenos resultados en tejidos como los de *J. curcas*, debido a que los buffer de lisis contienen clorhidrato de guanidina (GHC) o tiocianato de guanidina (GTC) –que inducen la formación de una sustancia viscosa cuando entran en contacto con los diferentes metabolitos secundarios, polifenoles y polisacáridos que puede tener el tejido, lo cual bloquea las columnas que utilizan estos kits, dando como resultado ARN degradado y en baja concentración (Kumar, 2011), razón por la cual en el protocolo 1 se hizo una purificación previa usando fenol/cloroformo/isoamilalcohol, para tratar de eliminar la mayor parte de compuestos y posteriormente purificar con kit comercial. A pesar de que inicialmente este fue el que mejores resultados generó, en extracciones posteriores, se perdía mucho ARN, provocando que luego de la purificación, las concentraciones fueran muy bajas y en algunas ocasiones no detectables por electroforesis.

A pesar de que se logró amplificar el ADN copia con imprimadores ITS, no se logró amplificar las muestras cuando se utilizaron los imprimadores específicos para genes de floración. Se cree que las causas pueden ser varias: I. El ARN es muy inestable y pudo degradarse durante el proceso, II. Los imprimadores no funcionan adecuadamente y es necesario optimizarlos. III. Presencia de trazas de compuestos de la extracción que puedan estar afectando la reacción de PCR. La amplificación lograda con los imprimadores ITS podría deberse a la presencia de restos de ADN contaminante en la muestra, ya que al ser universales es más fácil que se unan a cualquier ADN presente en la muestra, mientras que los imprimadores para genes de floración, al ser más específicos, disminuye su probabilidad de apareamiento.

COMPONENTE 3

A continuación se presentan los resúmenes de tres artículos derivados de este componente. El extenso de cada uno se encuentra en los anexos del 2 al 4.

Molecular evaluation of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) accessions from Costa Rica

Marcela Vazquez^a, Eric Fuchs^b, Eduardo Hernandez^c, Frankin Herrera^d, Jesus Hernandez^e, Ileana Moreira^f, Elizabeth Arnaez^f, Natalia Barboza^{c,g,h*}

a Sistema de Estudios de Posgrado, Universidad de Costa Rica,

b Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica

c Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica

d Estacion Experimental Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica

e Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica

f Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica

g Escuela de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica

h Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica

*Corresponding author at: Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Ciudad de la Investigación, 11501-2060, San Jose, Costa Rica. E-mail address: natalia.barboza@ucr.ac.cr .

ABSTRACT

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae) has attracted worldwide attention as a promising biofuel crop. For its large scale cultivation, genetic analysis of the available material is necessary. A germplasm bank exists in Costa Rica with 50 accessions from Costa Rica, Mexico, India, Brazil, El Salvador, Ecuador, Uganda, Honduras, Colombia and South Africa. In this work, we analyzed the genetic diversity of the *J. curcas* germplasm bank using 18 EST-SSR, one G-SSR and nrDNA-ITS markers. Toxicity of the accessions was evaluated with SSR and SCAR markers. A Neighbor-Joining (NJ) tree was constructed with the SSR information, a Maximum Likelihood (ML) tree was constructed with the ITS sequences, and population structure was assessed. Heterozygosity was moderate to high ($H_e=0.375$), but considerable when compared to H_e values for *J. curcas* diversity worldwide. The PIC was moderate (PIC=0.274) and a low inbreeding coefficient (f) was observed for all accessions. Clustering was not related to the geographical origin of the accessions. *J. curcas* in Costa Rica appears to consist of a single population. One non-toxic accession (JCCR-24) was identified.

Light-response curves for *Jatropha curcas* provenances under field conditions in Costa Rica.

Elemer Briceño Elizondo¹ ; ebriceno@itcr.ac.cr
Elizabeth Arnaez²; earnaez@itcr.ac.cr
Ileana Moreira²; imoreira@itcr.ac.cr
Marvin Castillo¹; mcastillo@itcr.ac.cr
Dagoberto Arias Aguilar¹ ; darias@itcr.ac.cr

1: Forest Engineering School, Instituto Tecnológico de Costa Rica

2: Biology School, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Address: 800m South of "Basílica de Los Angeles", Cartago, Costa Rica
PO box: 159-7050 Cartago, Costa Rica; Phone: +506-25502279.

Abstract:

Widespread attention on the potential for *Jatropha curcas* to produce biodiesel has recently brought attention on the species. However little solid information on key physiological and management aspects exist on the species for Central America.

A gene bank, established at the Experimental Station Fabio Baudrit, located in La Garita de Alajuela, Costa Rica, comprised of a number of 52 accessions from around the country and abroad, identified 10 potential provenances of importance. Through annual monitoring, the provenances Turrubares, Cruce Jaco, Barro Turrubares, Orotina, Marichal, Tempate 1, San Vito, Mexico, India, Tempate, were identified as the most productive. Data gathering was made during the same hours of the morning from 8 am to 11 am, through the beginning of the rainy season (June-August). A characterization of the quantum yield of individuals from these provenances was performed. The light saturation point ranged from 154 $\mu\text{mol}(\text{photon}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (eq.1, Provenance Orotina) to 988 $\mu\text{mol}(\text{photon}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (eq. 1 Provenance San Vito). The maximum assimilation rate was exhibit by San Vito provenance (16.6 $\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), which is consistent with other variables such as respiration and its light compensation point. Respiration ranged from 1 $\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tempate) to 5 $\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Turrubares). The data from Turrubares exhibited inconsistencies and the curve did not adjust well; fluctuations in cloud cover and stomatal closure affected data from this site, signaling the sensitivity of the species but also its quick adaptation to changing consitions

Keywords: *Jatropha curcas*, CO₂ assimilation, light curves, modelling.

Análisis fenológico comparativo de las accesiones más productivas de un banco de germoplasma de *Jatropha curcas* (tempate), en Costa Rica

Ileana Moreira²; imoreira@itcr.ac.cr
Elizabeth Arnaez²; earnaez@itcr.ac.cr
Marvin Castillo¹; mcastillo@itcr.ac.cr
Elemer Briceño Elizondo¹; ebriceno@itcr.ac.cr
Dagoberto Arias Aguilar¹; darias@itcr.ac.cr

1: Forest Engineering School, Instituto Tecnológico de Costa Rica
2: Biology School, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Address: 800m South of "Basílica de Los Angeles", Cartago, Costa Rica
PO box: 159-7050 Cartago, Costa Rica; Phone: +506-25509146.

RESUMEN

La especie *Jatropha curcas* (tempate) es típica de la zona mesoamericana, su centro de origen se ha establecido en México. Ha sido domesticada para uso en cercas vivas y por su valor medicinal según el conocimiento tradicional. En la actualidad se cataloga como una especie de alto valor para la producción de aceites que pueden tener uso en biocombustibles o como diluyente de pinturas. En Costa Rica se ha establecido un banco de germoplasma en la estación experimental Fabio Baudrit de la Universidad de Costa Rica, ubicada en la Garita de Alajuela. Comprende un total de 52 accesiones procedentes de todo el país y algunas de ellas de origen internacional. Producto del seguimiento anual del mismo se tuvo conocimiento de que las procedencias Turrubares JCCR36, Jacó JCCR-3, El Barro de Turrubares JCCR-43, Orotina JCCR-1, Marichal JCCR-42, Tempate 1 JCCR-6, San Vito 2 JCCR-30, México 2 JCCR-31, India JCCR-27, Tempate 1-Guanacaste JCCR-23, fueron las más productivas y de cada una se seleccionaron 3 individuos a los que se les dio un seguimiento semanal estimando el número de flores femeninas, masculinas, número de inflorescencias, número de frutos. A los datos se les aplicó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis y los resultados se correlacionaron con el nivel de irradiación y precipitación. Lo que permitió estimar que las procedencias más productivas fueron San Vito 2 JCCR-30, México 2 JCCR-31 y Tempate 1-Guanacaste-23. La mayor tasa de irradiancia se registró en los meses de febrero-marzo en el 2014 y marzo-abril en el 2015, se encontró correlaciones inversas mayores a 0,40 entre la radiación solar para los años 2014 y 2015, con respecto a la producción de flores, mientras que el comportamiento de la producción de inflorescencias presentó correlaciones con la precipitación y la radiación solar.

COMPONENTE 4

Los resultados de este componente se presentan en el anexo5, a continuación se presenta un resumen del artículo:

Uso de podas en el manejo agrícola de *Jatropha curcas* (tempate) sobre la expresión floral de la planta.

Ileana Moreira²; imoreira@itcr.ac.cr
Elizabeth Arnaez²; earnaez@itcr.ac.cr
Marvin Castillo¹; mcastillo@itcr.ac.cr
Elemer Briceño Elizondo¹; ebriceno@itcr.ac.cr
Dagoberto Arias Aguilar¹; darias@itcr.ac.cr

1: Forest Engineering School, Instituto Tecnológico de Costa Rica
2: Biology School, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Address: 800m South of "Basílica de Los Angeles", Cartago, Costa Rica
PO box: 159-7050 Cartago, Costa Rica; Phone: +506-25509146.

RESUMEN

La especie *Jatropha curcas* (tempate) es típica de la zona mesoamericana, su centro de origen se ha establecido en México. Ha sido domesticada para uso cercas vivas y por su valor medicinal según el conocimiento tradicional. En la actualidad que se cataloga como una especie de alto valor para la producción de aceites que pueden tener uso en biocombustibles o como diluyente de pinturas. En Costa Rica desde el año 2005 se han iniciado estudios para lograr una domesticación favorable para la utilización de esta especie en cultivos agroenergéticos en alternancia con algún cultivo agroalimentario. Sin embargo, los procesos de manejo del cultivo aún son incipientes y se debe profundizar en este tema para lograr una cosecha de mayor valor económico. En la Estación Fabio Baudrit se estableció una plantación proveniente de semilla de la variedad Comayagua y se estableció un ensayo de bloques al azar a los que se le dio un seguimiento estricto en longitud para aplicar una primera poda a los 40 cm y posteriormente un seguimiento a las ramas hasta que inicie la floración y la cosecha. La producción de frutos verdes se comportó de manera similar a la producción de inflorescencias y flores femeninas. Las plantas podadas no mostraron una diferencia significativa de producción de frutos en el primer año, pero en el segundo año, superan a las plantas no podadas.

5. Conclusiones

- 1- Las accesiones más productivas fueron las denominadas como San Vito, México y Tempate 23.
- 2- La floración resultó con una correlación inversa con la irradiancia.
- 3- Se determinó que la precipitación y la temperatura tuvieron una correlación positiva con la producción de flores y frutos.
- 4- Se cuenta con una descripción molecular de las accesiones presentes en el banco de germoplasma.

6. Recomendaciones

Por los costos y las hipótesis que se deseaban demostrar, este ensayo debería ser de una mayor duración.

7. Agradecimientos

Se agradece al PhD. Charles Aker como coordinador general del proyecto, por su apoyo técnico y gestiones para la búsqueda de financiamiento externo, en la propuesta presentada por Costa Rica, México, Nicaragua, Colombia y Brasil, cuyo nombre es: "Regulation of the flowering of *Jatropha curcas* to improve the sustainability of biofuel feedstock production by farmers in Latin America and the Caribbean" aprobado por LAC-Brasil.

También expresamos nuestro agradecimiento al PhD. Werner Rodríguez, Director de la Estación Experimental Fabio Baudrit y al Ingeniero Jesús Hernández (Convenio MAG-UCR), por su apoyo técnico y en la logística de los ensayos.

8. BIBLIOGRAFÍA

La bibliografía que se presenta corresponde a la presente en este documento. Cada artículo cuenta con su propia bibliografía.

Arnález, E.; Moreira, I.; Arias, D.; Hernández, J, Castillo, M.; Herrera, F.; Ureña, A.; Barboza, N.; Lutz, G.; Hernández, E. 2014. Generación de información técnico-científica para el desarrollo del cultivo de *Jatropha curcas* (Tempate) en Costa Rica para su uso como fuente de energía alternativa y mitigación del cambio climático. Informe final de proyecto de investigación con recursos del fondo del Sistema 2011-2013 FEES-CONARE, SAN JOSÉ COSTA RICA. 92.

Ausín, I; Alonso, C; Jarillo,J; Ruiz, L; Martínez, J. 2004. Regulation of flowering time by FVE a retinoblastoma associated protein. *Nature genetics*. 36 (2):162-165

Basha, S.D; Francis G; Makkar,H; Becker, K; Sujatha, M. 2009. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. *Plant Science*. 176:812-823

Heese,M; Mayer,U and Jürgens,G. 1998. Cytokinesis in flowering plants: cellular process and development integration. *Plant Biology* 1:486-491

Mukherjee, P; Ponnusankar, S; Pandit S; Hazam, P;Ahmmed, M; Mukherjee, K. 2011. Botanical as medicinal food and their effects on drug metabolizing enzymes. *Food and Chemical Toxicology*. (doi:10.1016/j.fct.2011.09.015)

Sun, X;Qin, Q; Zhang J; Zhang Ch; Zhou M ;Paek, K; Cui Y. 2012. Isolation and characterization of the FVE gene of a *Doritaenopsis* hybrid involved in the regulation of flowering. *Plant Growth Regul* 68:77-86

Sunil, N; Kumar V; Sujatha, M; Rajeswara, G;Siva,K. 2013. Minimal descriptors for characterization and evaluation of *Jatropha curcas* L. germplasm for utilization in crop improvement. *Biomass and Bioenergy*, 48 :239-249

Thomas, B. 2006. Light signals and flowering. *Journal of Experimental Botany*. 57(13): 3387-3393.

Vischi, M., Raranciuc, S., Baldini, M., 2013. Evaluation of genetic diversity between toxic and non toxic *Jatropha curcas* L. accessions using a set of simple sequence repeat (SSR) markers. *African Journal of Biotechnology*. 12, 265-274

Wu.Sh. 2011. The extraordinary Collapse of *Jatropha* as a Global Biofuel. *Environmental Science and Technology*. Dx.doi.org/10.1021/es 201943v

ANEXO 1

Net CO₂ assimilation of *Jatropha curcas* in controlled chambers for different levels of light intensity and compost mixing.

Elemer Briceño Elizondo¹; ebriceno@itcr.ac.cr

Elizabeth Arnaez²; earnaez@itcr.ac.cr

Ileana Moreira²; imoreira@itcr.ac.cr

Marvin Castillo¹; mcastillo@itcr.ac.cr

Dagoberto Arias Aguilar¹; darias@itcr.ac.cr

Jesus Hernandez³; jesus_hernandez_lopez@yahoo.com

1: Forest Engineering School, Instituto Tecnológico de Costa Rica

2: Biology School, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

3: Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica

Abstract

A multifactorial-factorial experiment (light and fertilization) was set to monitor growth and CO₂ assimilation to the combination of different light intensities (full artificial exposition at the Experimental Station of the UCR Fabio Baudrit, at Alajuela, Costa Rica. The experiment was based on the notion of photosynthetic active radiation (PAR) quality. A defined number of LED lamps (4: 100%) and a reduction of the number per chamber (3:75%; 2: 50%), determined light variation. For nutrient levels, a mixture of different percentages of vermicompost (20%, 10% and 5% of the substrate) was set. The results of the experiment were averse to what it was expected. The necessary PAR was never reached, although the lamp had the capacity to raise more than 2000 μmol (quanta) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}\text{a}$, where the quanta decreased when trying to make light distribution uniform, and reported assimilation was below, by far, the levels reported by the species.

1 Introduction

A type of feedstock becoming relevant for the production of biodiesel is the so-called non-edible raw materials including non-food crops and waste oils and fats. Non-food crops, generally not suitable for human consumption or animal feed, have comparable or even higher oil yields (27–40% w/w) and lower resource consumption (i.e. cultivation inputs) than conventional food crops, which makes them specially suitable for a more sustainable biodiesel production. *Jatropha* is a particularly good example of a non-food crop for biofuel production since it thrives on poor soil and land unsuitable for food crops, actually creating topsoil, and gives a high oil yield (Luque et al 2008).

Jatropha curcas is a perennial shrub from the Euphorbiaceae family native to tropical America, which seeds are known for containing levels of oil that can be used as a diesel substitute (van Eijck et al. 2014). Widespread attention on the potential for *J. curcas* to produce biodiesel planting the species on marginal land with low inputs has recently created speculation on the species, specially its planting at marginal agricultural lands in different parts of the world (Everson et al. 2013); with some information in the scientific literature on growth and yield expectations as well as economic performance. (Maes et al. 2009).

Projections for Costa Rica anticipate that before a growing energy demand scenario traditional sources of clean energy in the country will not grow beyond 2032. Studies with species such as *Jatropha curcas* should be encouraged, as Mesoamerican species, it has a great potential to be used as a high energy crop. Drought has substantial negative influences on many physiological processes of plants such as photosynthesis, stomatal behavior, chlorophyll fluorescence and metabolite accumulation. *J. curcas* productivity depends on dry matter distribution within the plant, male to female flower distribution, size and weight of seeds, seed oil content, its soil quality, toxicity and floral synchrony.

J. curcas productive climax may present itself from the fourth year after planting. The species is reported to grow in areas with extreme climates and harsh soil conditions not suitable at all for agricultural crops of importance (Maes et al. 2009). However other studies have found that the species can be susceptible to plant competition, requiring a degree of management on weed control for example; such would increase management cost that needs to be considered when growing large areas for biofuel production (Everson et al. 2013). Costa Rica has, within the national biofuels program, the necessity to develop an industry that provides security on energy efficiency, that can also serve as a climate change mitigation option and with the capacity to reactivate the agricultural sector at national level. The objective of this paper is to test the assimilation capacity of *J. curcas* under different fixed levels of irradiance and substrates, to infer on biomass distribution and floral synchrony through time.

2 Material and Methods

2.1 Site and species of study

The research was carried out at the "Agricultural Experiment Station Baudrit Fabio Moreno (EEAFB)" research station of the University of Costa Rica located in the province of, Alajuela at 840 m.a.s.l.

Average annual rainfall is 1940 mm distributed from May to November with an annual average ambient temperature of 22 ° C.

2.2 Experimental design and treatments

For the installation and application of the treatments, nine cubicles of 2.55 m high by 1.75 m wide were constructed, a black mesh cover was used to wall each cubicle independently and to isolate light; openings at the bottom of the cubicle were placed to avoid overheating within the cubicle. An electric system was installed for lamp and irrigation installation and to control the daylight/nighttime hours (12 hrs light, 12 hrs dark). For the selection of Light quality, different trials with several types of lamps were performed (Figure 1), to determine the type of lamp which gives an acceptable PAR level. From this test, the selected lamp was a LED lamp Code: LLB-150W, voltage 85VAC - 265VAC, 150W, ≥ 13500 lumens white light (6000k) was selected, which reached up to $1975 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ during tests. The expected maximum level of PAR was set by the maximum level obtained from the lamps, with the sensor placed 15 cm directly under the leds(Figure 2). When the beams of all lamps mix, a unified light environment is considered. The lamps were placed according to the respective light intensity: 4 intensity lamps, represented 100%, 3 lamps 75% and 2 lamps 50% light intensity respectively. A number of 9 plants per cubicle were used with 3 individuals being measured through three measuring campaigns (Figure 2).

As substrate a vermicompost soil produced from coffee waste from the CoopeTarrazú company, was used. A given amount of sand was disinfected with Kilol and Vitavax to be prepared J.curcas seeds. Once disinfected the sand was mixed with the lombricompost at different substrate concentrations according to weight at 5, 10 and 20% and placed in plastic pots of 20 liters (all the same height and size); to avoid excess water and to avoid leakage a plastic plate was placed in the bottom of each pot. (Figure 3). The seeds used were from a provenance called Comayagua. The distribution of the cubicles was random for all combinations of three irradiance levels (100, 75 and 50%) and 3 nutrient levels (5, 10 and 20%), which form the independent data.

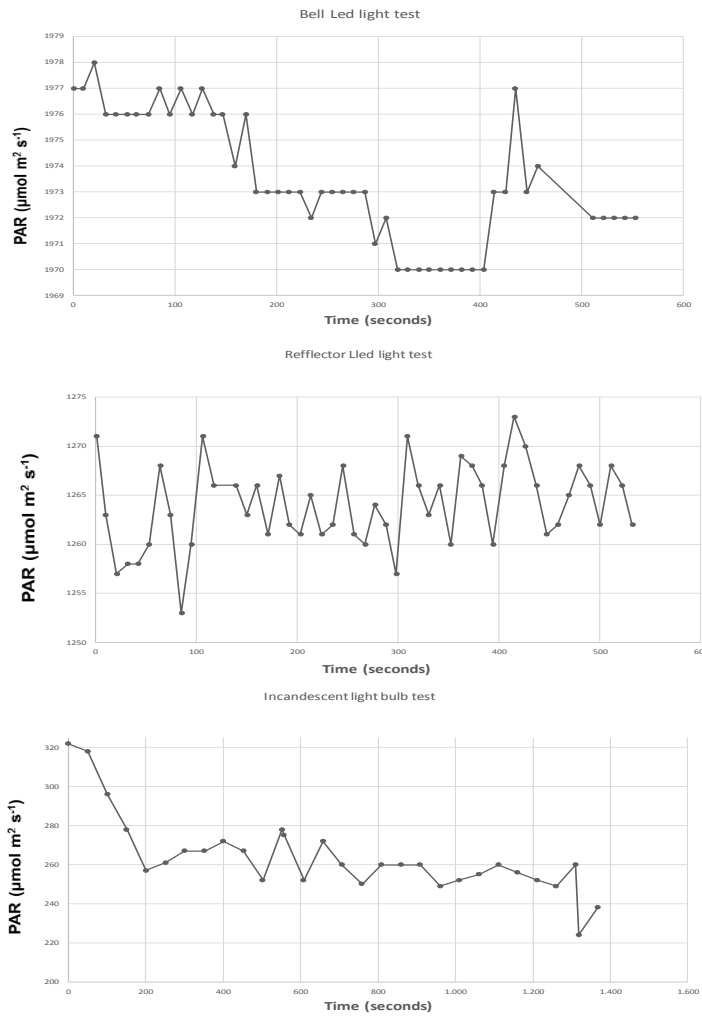


Figure 1. Individual PAR tests using three different option, Bell Led lamp, Reflector led lamp, and incandescent light bulbs.



Figure 2: Growth and measurement of photosynthesis within cubicles, under selected LED bell lamp.



Figura 3: Set up of experimental cubicle, with 9 plants under different treatments of light and nutrients.

2.3 Photosynthesis measurements.

The equipment used in the study was the gas exchange Ciras II (PP Systems[®]) system. The CIRAS-II requires a pre-boot measurement of about 10 minutes warming. The device allows simultaneous display in color screen and in real time, up to 15 measurement variables and graphs in Microsoft Windows environment. The manufacturer claims the computer screen has been optimized for use in the field, but in practice, it may be difficult to visualize, especially when working in bright sunlight. Prior to beginning any measurement, it is necessary to establish parameters program. Measurements on time series *J. curcas* were based on the light responses ($\mu\text{mol (quanta) m}^{-2} \text{s}^{-1}$), keeping an ambient CO_2 concentration (approximately 380 ppm ($\text{mol}(\text{CO}_2) \text{mol}(\text{air})^{-1}$), relative Humidity (RH) ranged from 46 to 70%, taking flow was 200 mL min^{-1} .

2.4 Statistical analysis

The data analysis was performed in the software package InfosStat[®]. Data measurements for P_N = net photosynthesis rate [$\mu\text{mol (CO}_2\text{) m}^{-2} \text{s}^{-1}$] were analyzed by using analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison tests using Tukey ($\alpha = 0.05$) to determine differences between treatments; classifying the data in the independent variable light intensities (light box), % nutrients, and the effect of interaction of these two variables. Assumptions of normality of the data were tested and verified. All analysis were carried out with the InfoStat[®] program.

3 Results and Discussion

Normally *Jatropha (Jatropha curcas)* optimal development zones range with average temperatures between 20 and 28 °C; however in tropical climates it can withstand up to 35 °C under full sun exposition; optimal rainfall range from 250 to 600 mm annually and is tolerant to drought periods. It develops well on deep, well-structured and well-drained soils so that the root system can develop to achieve nutritional needs. The species grows poorly in heavy clay soils (more than 40% clay), shallow soils (less than 20 cm), with constant moisture, poor aeration and poor drainage. It is recommended to plant at sites with a pH between six and seven (Loaiza *et al.* 2012).

The reasoning behind the experiment was to replicate normal growing conditions on a fully controlled environment. For this, the levels of light were adjusted using Led lamps capable of reaching an acceptable level of PAR (Figure 1), and from this, a simple proportional reduction on a number of lamps was set. As seen from figure 4, that assumption was not even reached. The maximum number of lamps was supposed to give a full sun exposition and an acceptable PAR to trigger photosynthesis; however

this never occurred and the light reached at best $143.54 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in average when three lamps were used. Illogically the 100% level was below in average to this value. The fundamental assumption that a reduction of lamps would decrease PAR level was not met. This can be corroborated in Table 1, where deviation standard for PAR as well as other variables have a wide range. CIRAS II has the PAR sensors in the upper part of the gas chamber; it is believed here that overshadowing from the same plant and light diffusion within the cubicle was responsible for the level reported. Even more, the plants, which were below the lamps directly regardless of the cubicle, grew directly towards the light.

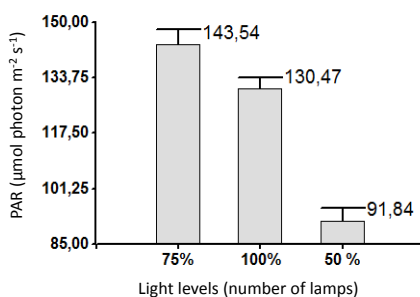


Figure 4. Average PAR levels ($\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) obtained from the experimental set up.

Table 1. Descriptive variables for *J.curcas* dark chamber experimental design, under different levels of light intensity and vermicompost percentage.

<u>Light level (%)</u>	Variable	PAR ($\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ¹⁾	Pn ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ¹⁾	Gs ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
50	n	180	180	180
50	Average	91.84	3.88	120.06
50	D.E.	50.77	1.44	43.3
50	E.E.	3.78	0.11	3.23
50	Min	1	1	55
50	Max	162	6.5	191
75	n	170	170	170
75	Average	143.54	4.42	136.52
75	D.E.	55.86	1.38	47.92
75	E.E.	4.28	0.11	3.68
75	Min	32	0	60
75	Max	294	7.4	232
100	n	180	180	180
100	Average	130.47	4.24	101.76
100	D.E.	46.39	1.48	58.68
100	E.E.	3.46	0.11	4.37
100	Min	0	0.9	21
<u>100</u>	Max	206	6.9	224

Consequently the levels of PAR were well below reported in literature (Briceño et al 2015, Silva et al 2012), where values from 9.88 to $15.18 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$ have been reported. The values here observed also give evidence of a lack of tendency for either levels of light, nutrient and combinations, subject to

low levels of PAR and stomatal conductance ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Table 2). All of the combination and obtained values obtained give evidence of the rapid growth effect of the plants in the cubicles, which nevertheless reported vegetative growth (Figure 5). Under a situation of stress, competition for light niche simply took place.

A strategy to keep on photosynthesizing despite changing levels of light could be a change in angle where horizontal leaves may be advantageous in light competition because the ability of light interception is higher in such leaves (Hikosaka, K., & Hirose 1997). Plants with a lower nutrient concentration have been observed to grow slower, hinting that not only light but also the vermicompost added had an influence on growth.

Table 2. Overall average values for assimilation (Pn: $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), photosynthetic active radiation (PAR $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), and stomatal conductance (Gs: $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) for three theoretical levels of irradiance and a nutrient percentage and their interactions for *J.curcas* at Experimental Station Fabio Baudrit, Alajuela, per month.

	Level		Pn ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	PAR ($\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Gs ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
Light intensity	100%		4.24b	130.47b	101.76a
	75%		4.36b	141.71c	135.80c
	50%		3.88a	91.84a	120.06b
Nutrient level	20		4.09a	112.58a	108.39a
	10		4.07a	127.46b	107.54a
	5		4.31a	123.99b	141.67b
Interactions	Light	Nutrient			
	100	20	5.38d	151.45cd	114.02bc
	100	10	2.80a	98.93b	70.20a
	100	5	4.54c	141.03c	121.05c
	75	20	3.11a	101.15b	121.42c
	75	10	4.49c	149.07c	131.48cd
	75	5	5.48d	174.92d	154.48d
	50	20	3.79b	85.13b	89.73ab
	50	10	4.94cd	134.38c	120.95bc
	50	5	2.91a	56.02a	149.48d

Averages with same letter are not significantly different ($p > 0,05$)

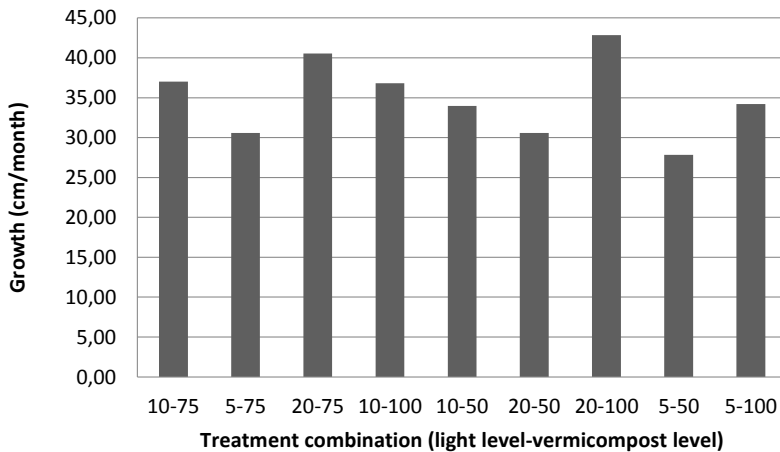


Figure 5: *Jatropha curcas* average growth for light (50, 75 and 100%) and vermicompost (5,10 and 20%) treatments within the cubicles.

The present study did not show satisfactory results, even though real growth was reported, the quality of light and the experimental set up did not established the desired levels. Plants at such short age would invest on vegetative growth utilizing and occupying the niches available to them.

Acknowledgements

The authors would like to give thanks to the project: "Regulation of the flowering of *Jatropha curcas* to improve the sustainability of biofuel feedstock production by farmers in Latin America and the Caribbean" financed by VIE-TEC and LAC Brazil.

4 References

- Chaoqiong, L.; Li, L.; Qiantang, F.; Longjian, N., Zeng-Fu, X. 2014. Identification and Characterization of the FT/TFL1 Gene Family in the Biofuel Plant *Jatropha curcas*. *Plant Mol Bio Rep*. DOI 10.1007/s11105-014-0747-8.45
- Everson, C. S., M. G. Mengistu, Gush, M.B. (2013). "A field assessment of the agronomic performance and water use of *Jatropha curcas* in South Africa." *Biomass and Bioenergy* 59, 59-69.
- Hikosaka, K., & Hirose, T. (1997). Leaf angle as a strategy for light competition: optimal and evolutionarily stable light-extinction coefficient within a leaf canopy. *Ecoscience*, 501-507.
- Kumar, G.; Eswaran, N.; Johnson, T. 2011. Isolation of high-quality RNA from various tissues of *Jatropha curcas* for downstream applications. *Analytical Biochemistry*, 413: 63-65.
- Loaiza Cárdenas, J; Arnáez Serrano, E; Moreira González, I; Herrera Murillo, F; Ureña Padilla, A; Hernández López, J. 2012. Guía técnica para el establecimiento y producción de *Jatropha curcas* (tempate) en Costa Rica. Cartago, CR, Editorial Tecnológica de Costa Rica. 92 p.
- Luque, R., Herrero-Davila, L., Campelo, J. M., Clark, J. H., Hidalgo, J. M., Luna, D., ... & Romero, A. A. (2008). Biofuels: a technological perspective. *Energy & Environmental Science*, 1(5), 542-564
- Maes, W.H., Trabucco, A., Achten, W.M.J., Muys, B. (2009). "Climatic growing conditions of *Jatropha curcas* L." *Biomass and Bioenergy* 33(10), 1481-1485.

Anexo 2

Molecular evaluation of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) accessions from Costa Rica

Marcela Vazquez^a, Eric Fuchs^b, Eduardo Hernandez^c, Frankin Herrera^d, Jesus Hernandez^e, Ileana Moreira^f, Elizabeth Arnaez^f, Natalia Barboza^{c,g,h*}

a Sistema de Estudios de Posgrado, Universidad de Costa Rica,

b Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica

c Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica

d Estacion Experimental Fabio Baudrit Moreno, Universidad de Costa Rica

e Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica

f Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica

g Escuela de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica

h Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica

*Corresponding author at: Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Ciudad de la Investigación, 11501-2060, San Jose, Costa Rica. E-mail address: natalia.barboza@ucr.ac.cr .

ABSTRACT

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae) has attracted worldwide attention as a promising biofuel crop. For its large scale cultivation, genetic analysis of the available material is necessary. A germplasm bank exists in Costa Rica with 50 accessions from Costa Rica, Mexico, India, Brazil, El Salvador, Ecuador, Uganda, Honduras, Colombia and South Africa. In this work, we analyzed the genetic diversity of the *J. curcas* germplasm bank using 18 EST-SSR, one G-SSR and nrDNA-ITS markers. Toxicity of the accessions was evaluated with SSR and SCAR markers. A Neighbor-Joining (NJ) tree was constructed with the SSR information, a Maximum Likelihood (ML) tree was constructed with the ITS sequences, and population structure was assessed. Heterozygosity was moderate to high ($H_e=0.375$), but considerable when compared to H_e values for *J. curcas* diversity worldwide. The PIC was moderate (PIC=0.274) and a low inbreeding coefficient (f) was observed for all accessions. Clustering was not related to the geographical origin of the accessions. *J. curcas* in Costa Rica appears to consist of a single population. One non-toxic accession (JCCR-24) was identified.

1. Introduction

The current need for alternative sources of energy has motivated new research all over the world. Wind and solar energy have become increasingly popular. Fossil fuels as a source of energy are losing support due to their role in global warming and fluctuating market prices. Thus, other fuel sources such as biodiesel from corn or palm oil have been explored (To and Grafton, 2015). *Jatropha curcas* is being explored as a new biofuel crop (Islam et al., 2014). It is planted on approximately 1.8 million ha in Indonesia, China, Brazil and Africa, and has potential in India and other tropical countries as a biofuel crop (Carels et al., 2013).

J. curcas belongs to the Euphorbiaceae family. The species is native to America and is distributed in the tropics worldwide. It can grow under unfavorable climatic and soil conditions, making it more attractive as a biofuel crop. Seeds contain an average of 40-45% oil (Jongshaap et al., 2007). Properties of the biofuel produced from this plant oil are similar to those of biofuels obtained from conventional crops like canola, linseed and sunflower, or higher, as in the case of soybean (Basili and Fontini, 2012).

The potential of *J. curcas* has not been fully developed mainly due to its variable and unpredictable oil yield which limits large-scale cultivation and warrants genetic improvement. Information about the genetic background and germplasm characterization are needed for the genetic improvement of any species (Mastan et al., 2012). Over the last decade germplasm resources have been evaluated molecularly in India, China, Brazil and Mexico (Basha and Sujatha, 2007; Rosado et al., 2010; Wen et al., 2010; Grativol et al., 2011; Pecina-Quintero, 2013).

Molecular markers such as RAPDs, ISSRs, AFLPs, genomic simple sequence repeats (G-SSR) and expressed sequence tags-SSR (EST-SSR) have been used to assess the genetic diversity of *J. curcas* collections. Most of these studies have revealed low genetic variability of *J. curcas* in India and Brazil (Sun et al., 2008; Rosado et al., 2010; Yi et al., 2010; Grativol et al., 2011; Yadav et al., 2011). Numerous authors consider Mexico and Central America to be the place of origin and/or diversification (Heller 1996; Openshaw 2000; Abdulla et al., 2009; Basha et al., 2009; Pamidimarri et al., 2008; Tatikonda et al., 2009; Pecina-Quintero et al., 2011; Pamidimarri and Reddy, 2014) and higher genetic diversity is expected in the region. The high diversity of *J. curcas* in Guatemala (Raposo et al., 2014) and Mexico supports the previous hypothesis (Ambrosi et al., 2010; Pecina-Quintero et al., 2011; Ovando-Medina et al., 2011, 2013; Pamidimarri and Reddy, 2014). Mexican germplasm has also provided non-toxic genotypes. A non-toxic seed cake would increase the acceptance of *J. curcas* because subproducts of the oil extraction process could also be utilized. Genotypes with variable seed oil-content and number of seeds may surface in other Latin-American regions and enrich *J. curcas* breeding programs all over the world.

A variety of molecular markers are available for genotype identification and evaluation. In the past decade, SSR markers have proven to be useful for analysis of genetic diversity. They are markers of choice because of their abundance in the genome, high reproducibility and hyperpolymorphism (Gupta et al., 2003). Microsatellites can be developed via a labor-intensive method of genome analysis or using cost effective EST libraries (Thiel et al., 2002). Simple sequence repeats can be found in EST libraries that identify variability in the transcribed region of the genome. They may facilitate the identification of functional candidate genes, increase the efficiency of marker-assisted selection and serve as anchor markers for comparative mapping (Varshney et al., 2005). Another type of marker used to evaluate organisms is the internal transcribed spacer (ITS) marker. ITSs are sequence-based markers that have been very popular in the past decade since they work with a wide range of taxonomic groups. PCR amplification of ITS is simple and the moderate size of the marker allows amplification and sequencing without internal primers. In addition, due to their levels of variation, ITS can be used for evolutionary studies at the species level (Nieto-Feliner and Rossello, 2007). ITS markers have been developed for *J. curcas* (Pamidimarri et al., 2008). It has been proposed that they be incorporated into the core barcode for seed plants (De-Zhu et al., 2011). ITS markers exhibit greater discriminatory capacity than plastid *rbck* and *matK* markers (China Plant BOL group, 2011). The two markers (SSR and ITS) give different perspectives and used together allow a better understanding of the evolution of an undomesticated species such as *J. curcas*.

Costa Rica has developed a germplasm bank that includes local and international accessions; however the genetic variability within the collection has not been studied. This study explores the molecular diversity of the accessions using EST-SSR and G-SSR. Phylogenetic relationships between accessions were evaluated with nuclear ribosomal ITS markers. Toxicity of *J. curcas* plants was evaluated with G-SSRs and SCAR markers.

2. Methods

2.1 DNA collection and extraction

Young leaves were collected from 50 plants in the *Jatropha curcas* germplasm bank located at the Fabio Baudrit Experimental Station at the Universidad de Costa Rica. The germplasm bank contains accessions primarily from Costa Rica, but also includes accessions from Brazil, India, Mexico, El Salvador, Ecuador, Uganda, Colombia and South Africa (Table 1). Vegetative material was frozen and later lyophilized for DNA extraction. Nucleic acids were extracted using the Möller et al. (1992) protocol and quantified with a Nanodrop (Applied Biosystem).

2.2 SSR analysis.

Eighteen EST-SSRs and one G-SSR markers (Wen et al., 2010) were used to analyze 50 accessions (Table 2). PCR was achieved in a final volume of 25 µL with 1X PCR buffer, 400µM dNTPs, 0.4µM of each primer, and 1U Taq DNA polymerase (Fermentas). Amplification conditions were as follows: an initial denaturation at 94°C for 1min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 42- 50°C for 1 min and 72°C for 1 min, with a final extension of 72°C for 10 min. Results were visualized in 4-6% polyacrylamide gels dyed with silver nitrate. To confirm the results, duplicates of 10% of the samples were made.

2.3 nrDNA-ITS region amplification and sequencing.

ITS primers were used to elucidate phylogenetic relationships between accessions. The primer pair JCITS-1-F(5'ACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAAA3') and JCITS- 2-R (5'CCTGGGGTCGCGATGTGAGCGT 3') was used (Pamidimarri et al., 2008) in a PCR reaction with a final volume of 25µl and a final concentration of 1X reaction buffer, 1.5mM MgCl₂, 0.2 µM of each primer, 0.2 mM dNTPs, 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas) and 50ng of DNA. The PCR program consisted of an initial denaturation step of 94°C for 1 min, followed by 30 cycles of 40s at 94°C, 65°C for 1min and 72°C for 1 min. The final extension step was 5 min at 72°C. The PCR products were sent to Macrogen® for sequencing. The obtained sequences were alignment and submitted to genbank (www.ncbi.com).

2.4 Data analysis

Acrylamide gels were analyzed manually in GIMP and a data matrix with band size data was created. Heterozygosity, polymorphism information (PIC) and the inbreeding coefficient (f) were calculated for each locus and for the total sample size with Powermarker 3.25 (Liu and Muse, 2005) with 50000 bootstraps. A genetic distance matrix was created in Populations software with the Goldstein model (1995) and was used to create a Neighbor-Joining tree. The tree was visualized in Phylip and edited with Adobe Illustrator. The genetic distance matrix was also used to create a PCA analysis in GenALEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012). STRUCTURE 2.3.4 software (Pritchard et al., 2000) was used to estimate population structure in Costa Rican accessions. A K from 1 to 10 was used with 10 iterations each. A 500000 burning period was defined and 1000000 MCMC were used. An admixture model with correlated allele frequencies was chosen. STRUCTURE results were analyzed with the UCLA STRUCTURE harvester software (Earl and von Holdt, 2012) using the Evanno model ([http://taylor=.biology.uclar.edu./struct harvest/](http://taylor=.biology.uclar.edu./struct%20harvest/)). The results from STRUCTURE were visualized in the CLUMPACK server and edited in Adobe Illustrator.

Sequences obtained from ITS markers were edited with BioEdit software and aligned with the MAFFT algorithm in the GUIDANCE server. jModelTest 2.1.7 (Darriba et al., 2012) was used to define the

optimum substitution model for the sequences and the GTR model (Tavaré, 1986) with uniform rates was chosen. A Maximum Likelihood tree was calculated in MEGA 6.5 software with 7000 bootstraps and *J. glandulifera* as the outgroup.

2.5 Toxicity evaluation

Toxicity of the accessions was evaluated with three SSR markers (Table 3) (Vischi et al., 2009). PCR amplification was achieved in a final volume of 25µl with a final concentration of 1X reaction buffer, 1.5mM of MgCl₂, 0.2µM of each primer, 0.2mM dNTPs, 1U Taq DNA polymerase (Fermentas) and 50ng/µl DNA sample. The PCR program had an initial denaturation of 94°C for 1 min, 30 cycles of 40s at 94°C, 65°C for 1 min, 72°C for 1 min and a final extension of 5 min at 72°C. Results were visualized by genotyping with fluorochromes (FAM, VIC and PET) (Shuelke et al., 2000) in a 3130 sequencer (Applied Biosystems). Two SCAR markers (ISPJ1 and ISPJ2) were also used to evaluate toxicity of the accessions following the protocol of Basha et al. (2009). ISPJ1 is specific for toxic genotypes and ISPJ2 is specific for non-toxic genotypes. Results were visualized in a 2% agarose gel run for one hour and dyed with gel red.

3. Results

3.1 Genetic diversity analysis

A total of 18 SSR-EST and one G-SSR markers were used to assess the genetic diversity of *J. curcas*. The observed heterozygosity of 0.3475 ± 0.0578 is considered moderate to high for EST-SSR markers. Polymorphism information contents (PIC) ranged from 0.0416 to 0.6766 with a mean of 0.274 ± 0.0369 . An inbreeding coefficient (f) of 0.0035 was obtained (Table 4).

Data from the NJ tree showed no clear clustering pattern (Fig. 1). Although small groups were formed, they were not related to the place of collection. The samples from Ecuador (JCCR-25) and Mexico (JCCR-24) appeared to have a close genetic relationship. The Indian accession (JCCR-INDIA) clustered close to JCCR-14 from Costa Rica. The South-African accession (JCCR-47) clustered with the accession from Honduras (JCCR-2). Near that group was the Brazilian accession (JCCR-16) which clustered with Costa Rican accessions. Two accessions, JCCR-36 and JCCR-13, seemed to differ from the other accessions from Costa Rica. Samples from the north of the country grouped with samples from the south, such as JCCR-20 and JCCR-7, which are separated by a distance of approximately 387 kilometers. Costa Rican accessions did not group together by collection site; nor did the two Mexican accessions or the Indian accessions. Accessions from countries located in close proximity such as Colombia (JCCR-38) and Ecuador (JCCR-25) did not seem to be genetically close to each other. Samples from distant locations clustered together, for example India (JCCR-INDIA)-Costa Rica (JCCR-14), South-Africa (JCCR-47)-Honduras (JCCR-2), Brazil (JCCR-16)-Costa Rica (JCCR-MIR) and México (JCCR-24)-Ecuador (JCCR-25). PCA analysis showed a scattered pattern of accessions regardless of the place of origin (Fig. 2) supporting the results from the NJ tree. These results were confirmed by STRUCTURE, which showed that accessions most likely belonged to a single population (K=1) (Fig. 3).

3.2 nrDNA-ITS sequence analysis

The Maximum Likelihood (ML) tree created with the ITS sequence data showed the same pattern observed with NJ and PCA analysis with no clear clustering (Fig. 4). International and national accessions were combined throughout the tree. Bootstrap support of the branches was low. Some international accessions such as Mexico (JCCR-31) and Brazil (JCCR-16) grouped close together, but others were scattered throughout the tree. *J. glandulifera* as an out group (Genbank accession number EU881726).

3.3 Toxicity evaluation

One accession was identified as non-toxic by all of the primer sets. The accession from Mexico (JCCR-24) was identified as non-toxic by the three SSR primer sets (JCT-31, JCT-27 and JcSSR-26) and both SCAR primers ISPJ1 and ISPJ2. Additional non-toxic genotypes were identified with ISPJ1 (JCCR-32 and JCCR-43), and ISPJ2 (JCCR-22 and JCCR-25), but results were not confirmed in other tests.

4. Discussion

4.1 Genetic diversity of *J. curcas*

Different authors support the idea that Mexico and Central America are the center of origin and diversification for *J. curcas* (Pecina-Quintero, 2014; Pamidimarri and Reddy, 2014) based on morphological and molecular evidence observed in accessions from these regions. Pecina-Quintero et al. (2014) demonstrated the considerable genetic diversity of *J. curcas* in Mexico with a Shannon's diversity index of $I: 0.059-0.267$. Diversity was lower in Brazil. Grativol et al. (2011) analyzed 332 accessions from 12 locations in Brazil using ISSR primers and reported a Shannon's diversity index ranging from 0.0782 to 0.2450. Similar results were found by Pamidimarri and Reddy (2014) in a phylogeographical and molecular diversity study of 42 accessions of *J. curcas*, mostly from India, evaluated with RAPD and AFLPs. The mean percentage of polymorphism (PP) of the 42 accessions with RAPDs was 26.47. The mean PP of the Mexican accessions, which represented only 14% of the total, was 33.18. The mean PP of the germplasm excluding the Indian accessions was 35.86, supporting the hypothesis that Indian germplasm is less diverse than other taxa (Ram et al., 2004; Colombo et al., 2000). In general, diversity has been found to be lower in Africa, Asia and South America. In contrast, genetic variability in Guatemala is high ($H=0.593$) (Raposo et al., 2014) and as presented previously, variability of Mexican accessions is higher than that of accessions from India, Brazil and China when evaluated with molecular markers.

In this research, the diversity index for *J. curcas* in Costa Rica was 0.3475 ± 0.0578 when evaluated with EST-SSR primers (Table 4). Diversity was expected to be higher in Costa Rica, as it may be part of the center of origin/or diversification for this species (Pecina-Quintero et al., 2014; Pamidimarri and Reddy, 2014). Since EST-SSR markers are less polymorphic than genomic SSRs (Song et al., 2012) an underestimation of genetic variability can be expected. EST-SSR are developed out of expressed sequence tag libraries. They are within genes, which makes them more prone to selection and less polymorphic than other markers (Ellis and Burke, 2007; Cova et al., 2012). Only two other studies have evaluated the diversity of *J. curcas* germplasm collections using EST-SSR. Wen et al. (2010) evaluated 45 accessions from Indonesia, Grenada, South America and two Chinese provinces, Yunnan and Hainan, and found a mean genetic diversity of 0.3819. The most diverse locations were South America and Yunnan with $H=0.33$ and $H=0.3473$, respectively. In other research, 25 accessions were evaluated using 50 EST-SSR primers (Yadav et al., 2011). In this case, the average diversity was $H=0.30$ and clustering of the accessions was independent of the geographical origin (Yadav et al., 2011). These results were similar to those obtained in the present study. Although diversity may be slightly underestimated with EST-SSR since they are constructed from expressed sequences, an association between the marker and a gene of interest could be made which might aid in marker-assisted selection (Song et al., 2012; Jain et al., 2014). The polymorphism information content (PIC) of the EST-SSR primers is also important.

The average PIC of the 19 markers used in this research was 0.27. This value is slightly higher than that obtained by Yadav et al. (2011) ($PIC=0.25\pm 0.16$) with 50 EST-SSR markers, but the level of

information given by the markers is comparable. PIC values of 0.25-0.50 are considered moderately informative and values over 0.5 are considered highly informative (Botstein et al., 1980). In addition to the previous values, a very low inbreeding coefficient was obtained ($f=0.0035$). This means that the probability of two homologous alleles being identical by descent is low (Hedrick, 2011). *J. curcas* is an outcrossing species that is also capable of selfing; however, 68% of its mating occurs through outcrossing, which lowers the possibility of inbreeding (Bressan et al., 2013). Although a low level of inbreeding was observed in the present study, low genetic diversity in other parts of the world, such as India and Brazil, has been attributed to inbreeding due to selfing or high paternity correlation (Bressan et al., 2013; Basha and Sujatha, 2007, Rosado et al., 2010). Low inbreeding coefficients were also obtained in Mexico and South America (Ambrosi et al., 2010).

Multiple studies of *Jatropha curcas* have shown that the place of collection of the accessions does not necessarily reflect the genetic relationships between them (Ambrosi et al., 2010; Maghuly et al., 2015). In the NJ tree and PCA analysis (Fig.1 and Fig.2), two Mexican accessions with the same origin, JCCR-24 and JCCR-31, clustered in different putative groups. Also, the two Indian accessions (JCCR-27 and JCCR-INDIA) did not seem to be related, according to the NJ tree built with information from 19 EST-SSR. The original source of the accessions, whether national or international, could be very diverse and accessions from the same country can vary significantly. Differences in variability were observed in accessions from Chiapas and Veracruz in Mexico (Pecina-Quintero et al., 2014; Maghuly et al., 2015). In the present study, Mexican accessions overlapped with accessions from Costa Rica and Brazil. Similarly, in other research, accessions from Cape Verde and Mali were clustered together with Mexican ones (Maghuly et al., 2015). The *J. curcas* collection site may not be informative in every case because it is a manipulated crop. Exchanges between American and African or Asian collections have occurred over the last 200 years (Heller, 1996) and may have propitiated a founder effect in Africa and Asia (Henning, 2007; Lengkeek, 2007; Pamidimarri and Reddy, 2014). According to Pamidimarri and Reddy (2014), Indian accessions came from the same origin via two different dispersal routes. They propose that ancestors of the current Indian germplasm were brought by Portuguese seafarers from Mexico and Central America to Cape Verde, where the dispersal route then divided into two. Dispersal of *J. curcas* continued throughout Africa, then to Madagascar and finally to India (Pamidimarri and Reddy, 2014). Another dispersal route passed through Spain and then to India (Pamidimarri and Reddy, 2014).

According to Wen et al. (2010), domestication of *J. curcas* started in America and continued overseas. However, about 200 years may not be long enough to see great changes in *J. curcas* genotypes (Maghuly et al., 2015). Similarities were observed in accessions from India, Uganda and Costa Rica which could explain the lack of observed population structure or genetic differentiation. The lack of structure in the accessions tested may be due to a significant gene flow between the locations where the samples were collected. Although it was not tested in the current study, research conducted in China, Africa and Malaysia showed high levels of gene flow between populations. Wen et al. (2010) found a gene flow index of 2.18 and their analyses clustered a group of accessions from Indonesia, Grenada, South America and two provinces from China. This confirms that geographically distant accessions may be genetically similar. Another investigation conducted in Africa exhibited a gene flow estimate of $Nm=0.568$, a value that is considered to be high. Local variation was mostly due to generations of selection by humans and rather than natural processes (Gupta et al., 2008). Considerable gene flow ($Nm=1.428$) was also present between *Jatropha curcas* populations in three states of Malaysia. Gene flow may have occurred in Costa Rica as well, since the collection sites are not very distant from each other and human-related manipulation may have occurred through the exchange between farmers of seeds or cuttings. The lack of genetic differentiation can be observed in the low scores of the ML tree. Low bootstrap scores reflect

a lack of confidence in the branch architecture (Hills and Bull, 1993). The small clusters may not be real, but rather reflect what other analyses have stated, that the accessions from the Costa-Rican germplasm bank are genetically similar and no population structure is present even on an evolutionary level. The low inbreeding coefficient obtained for the samples also supports the idea that considerable gene flow may be occurring in Costa Rican populations of *J. curcas*.

STRUCTURE clustered accessions from diverse origins (Fig. 3) and agreed with the ML and NJ trees in showing that the majority of the accessions belonged to a single population. Although not all of the accessions clustered equally in the different analyses, the general lack of population structure was maintained. Different markers were used for the analyses and therefore differences were expected. Also, the use of acrylamide gels to analyze microsatellites did not allow observation of small base changes and may have led to an underestimation of differences in the alleles. Analysis of genetic variation using nrDNA-ITS markers gave similar results. Since these markers are sequence based, the previously mentioned technical limitation was not relevant. Using EST-SSR, multiple loci throughout the genome are analyzed (Davies et al., 2002; Pamidimarri and Reddy, 2014) thereby taking into account a significant portion of the genetic variability present. Costa Rican diversity indices might be improved if the germplasm bank is enriched to include more of the country's potential genetic variability by adding accessions from the Caribbean and the southern parts of the country.

4.2 Toxicity evaluation of *J. curcas*

The toxicity of *J. curcas* plants is an important limitation to the utilization of its subproducts. The *J. curcas* seed cake (residual seeds without oil) is high in proteins and amino acids useful in the animal industry as animal feed and can even be used for human consumption (Francis et al., 2013). The cake is a good source of proteins, since it has high levels of essential amino acids, with the exception of lysine. The value of the crude protein (63.8%) equals that of the best oil cakes (Makkar et al., 1997). In this research, only one of the accessions, Mexican JCCR-24, was identified as non-toxic by all of the primers. JCCR-24, if confirmed non-toxic by *in vivo* evaluation, could be used as a parental plant in a breeding program to obtain dual-purpose non-toxic plants, thereby enhancing *J. curcas* as an attractive biofuel plant.

Some samples presented only one or two toxic alleles depending on the primers used. This may be because of variations present in the Costa Rican genotypes. The primers were elaborated from Mexican, Asian and African accessions (Basha et al., 2009; Phumichai et al., 2011) that may be different from genotypes from other parts of the world. Since SSR markers are very polymorphic (Powell et al., 1996), the Costa Rican accessions could present different-sized alleles. Toxic and non-toxic genotypes can vary by only a few base pairs (between six and 20bp). If the size of the amplified bands is not exactly as expected, the non-toxic nature of the accessions could be overlooked. Thus, more than one non-toxic accession may be present in the Costa Rican germplasm bank. An *in vivo* evaluation is needed to confirm this hypothesis.

5. Conclusions

A moderate level of genetic diversity was observed in 50 accessions of *J. curcas* in Costa Rica evaluated with G-SSRs and EST-SSR. EST-SSRs provided a useful tool for assessment of genetic variability. Clustering of Costa Rican and international accessions was independent of the collection site. A non-toxic genotype from Mexico was found. This work is the first assessment of the genetic diversity of *J. curcas* in Costa Rica, which is located in a region that is considered the center of origin or diversification

for the species. Further studies are needed for a thorough assessment of the genetic richness of *J. curcas* in Costa Rica and the toxicity of its accessions.

Acknowledgements

This work was supported by FEES-CONARE grant number VI-801-B1-660. We also thank to the Estacion Experimental Fabio Baudrit Moreno (EEFBM) of the University of Costa Rica, especially to J. Hernandez from Ministerio de Agricultura y Ganaderia (MAG) and F. Herrera from EEFBM for the collection and maintenance of the germplasm bank.

References

- Abdulla, J.M., Janagoudar, B.S., Biradar, D.P., Ravikumar, R.L., Koti, R.V., Patil, S.J., 2009. Genetic diversity analysis of elite *Jatropha curcas* L. genotypes using randomly amplified polymorphic DNA markers. *J. Agric. Sci* 22, 293-295.
- Ambrosi, D.G., Galla, G., Purelli, M., Barbi, T., Fabbri, A., Lucretti, S., Sharbel, T.F., Barcaccia, G., 2010. DNA Markers and FCSS Analyses Shed Light on the Genetic Diversity and Reproductive Strategy of *Jatropha curcas* L. *Diversity*. 2, 810-836.
- Basha S.D., Sujatha, M., 2007. Inter and intrapopulation variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica*. 156, 375-386.
- Basha, S.D., Francis, G., Becker, K., Makkar, H.P.S., Sujatha, M., 2009. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of relationships between *Jatropha curcas* germplasm in China. *Biomass and Bioenergy*. 7, 1-12.
- Basili, M., Fontini, F., 2012. Biofuel from *Jatropha curcas*: Environmental sustainability and option value. *Ecological Economics*. 78, 1-8.
- Botstein D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314-331.
- Bressan, E.A., Sebbenn, A. M., Rodrigues Ferreira, R., Lee, T.S.G., Figueira, A., 2013. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) exhibits mixed mating system, high correlate mating and apomixis. *Tree Genetics & Genomes*. 9, 1089-197.
- Carels, N., 2013. Towards the domestication of *Jatropha*: The integration of science. In: Bahadur, B., Sujatha, M., Carels, N. (Eds.) *Jatropha Challenges for a New Energy Crop vol 2*. Springer New York, pp.263-299.
- Cova, V., Perini, D., Soglio, V., Komjanc, M., van de Weg, E., Glessler, C., Gianfranceschi, L., 2012. Exploiting expressed sequence tag database for mapping markers associated with fruit development and fruit quality in apple. *Mol Breeding*. 29, 699-715.
- Colombo, C., Second, G., Charrier, A., 2000. Diversity within American cassava germ plasm based on RAPD markers. *Genet Mol Biol*. 23, 189-199.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9, 772.
- Davies, N., Bermingham, E., 2002. The historical biogeography of two Caribbean butterflies (Lepidoptera: heliconiidae) as inferred from genetic variation at multiple loci. *Evolution*. 56, 573-589
- De-Zhou, L., China Plant BOL Group et al., 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *PNAS* 108:19641-19646

- Earl, D.A., vonHoldt, B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 4, 359-361.
- Ellis, J.R., Burke, J.M., 2007. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity*. 99, 125–132.
- Francis, G., Oliver, J., Sujatha, M., 2013. Non-toxic *Jatropha* plants as a potential multipurpose multi-use oilseed crop. *Industrial crops and products*. 42, 397-401.
- Gerber, S., Mariette, S., Streiff, R., Bodenes, C., Kremer, A., 2000. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Mol. Ecol.* 9, 1037-1048.
- Golstein, D.B., Ruiz Linares, A., Cavalli Sforza, L.L., Feldman, M.W., 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetic Society of America*. 139, 463-471.
- Grativol, C., Lira Medeiros, C.F., Hemerly, A.S., Ferreira, P.C.G., 2011. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. *Mol Biol Rep.* 38, 4245-4256.
- Gupta, S., Srivastava, M., Mishra, G.P., Naik, P.K., Chauhan, R.S., Tiwari, S.K., 2008. Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. *Afr J Biotechnology*. 7, 4230-4243.
- Hedrick, P.W., 2011. *Genetic of populations*. Jones & Bartlett, Boston, pp. 675.
- Henning, R.K., 2007. *Jatropha curcas* L. In: van der Vossen, H.A.M., Mkamilo, G.S. (Eds), *Plant Resources of the Tropical Africa (Volume)*. Vegetable oils PROTA Foundation, Wageningen, The Netherlands. 14, 116–122.
- Hills, D.M., Bull, J.J., 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 42, 182-192.
- Jain, N., Patil, G.B., Bhargava, P., Nadgouda, R.S., 2014. In silico mining of EST-SSRs in *Jatropha curcas* L. towards assessing genetic polymorphism and marker development for selection of high oil yielding clones. *American Journal of Plant Sciences*. 5, 1521-1541.
- Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., Mayrose, I., 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
- Lengkeek, AG., 2007. The *Jatropha curcas* agroforestry strategy of Mali Biocarburant SA. In: *Proceedings of the FACT Seminar on Jatropha curcas L. Agronomy and Genetics*. Wageningen, The Netherlands.
- Liu, K., Muse, S.V., 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*. 21, 228-2129.
- Liu, P., Wang, C.M., Li, L., Sun, F., Liu, P., Yue, G.H., 2011. Mapping QTLs for oil traits and eQTLs for oleosin genes in *Jatropha*. *BMC Plant Biology*. 11, 132.
- Maghuly, F., Jankowicz-Cieslak, J., Parbinger, S., Till, B.J., Laimer, M., 2015. Geographic origin is not supported by the genetic variability found in a large living collection of *Jatropha curcas* with accessions from three continents. *Biotechnol. J.* 10, 536-551.
- Makkar, H.P.S., Becker, K., Sporer, F., Wink, M., 1997. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *J Agric Food Chem*. 45, 3152-3157.
- Möller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H., Geiger, H.H., 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucl Acids Res.* 22, 6115-6116.

- Nieto-Feliner, G., Roselló, J.A., 2007. Better the devil you know? Guideline for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44,911-919.
- Ovando-Medina, I., Espinosa, G.F., Nuñez, F.J., Salvador, F.M., 2011. Genetic variation in Mexican *Jatropha curcas* L. estimated with seed oil fatty acids. *J Oleo Sci*. 60, 301-311.
- Ovando-Medina, I., Adriano-Anaya, L., Vásquez-Ovando, A., 2013. Genetic diversity of *Jatropha curcas* in southern Mexico. In: Bahadur, B., Sujatha, M., Carels, N. (Ed.), *Jatropha Challenges for a New Energy Crop*. Springer, New York, pp. 263-299.
- Openshaw, K., 2000. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass and Bioenergy* 19, 1-15.
- Pamidimarri, S.D.V., Chattopadhyay, B., Reddy, M.P., 2008. Genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence. *Mol Biol Rep*. 36, 1929-1935.
- Pamidimarri, S.D.V., Reddy, M.O., 2014. Phylogeography and molecular diversity analysis of *Jatropha curcas* L. and the dispersal route revealed by RAPD, AFLP and nrDNA-ITS analysis. *Mol Biol Rep*. 41, 3225-34.
- Peakall, R., Smouse P.E., 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 28, 2537-2539.
- Pecina-Quintero, V., Amaya, J.L., Zamarripa, A., Montes, N., Núñez, C., Solis, J., 2011. Molecular characterisation of *Jatropha curcas* L. genetic resources from Chiapas, México through AFLP markers. *Biomass Bioenergy*. 35, 1897-1905.
- Pecina-Quintero, V., Anaya-Lopez, J. L., Zamarripa-Colmenero, A., Nunez-Colin, C. A. 2014. Genetic structure of *Jatropha curcas* L. in Mexico and probable centre of origin. *Biomass Bioenergy*, 60, 147–155.
- Phumichai, C., T. Phumichai, N. Kongsiri, A. Wongkaew, P. Sripichit, and R. Kaveeta. 2011. Isolation of 55 microsatellite markers for *Jatropha curcas* and its closely related species. *Biologia Plantarum* 55, 387-390.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breeding*. 2, 225-238.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155, 945-959.
- Ram, J., Kumar, A., Bhatt, J., 2004. Plant diversity in six forest types of Uttaranchal, Central Himalaya, India. *Current science*. 86, 975-978.
- Ranade, S.A., Srivastava, A.P., Rana, T.S., Srivastava, J., Tuli, R., 2008. Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) methods. *Biomass and Bioenergy*. 32, 533-540.
- Raposo, R.S., Souza, I.G.B., Veloso, M.E.C., Kobayashi, A.K., Laviola, B.G., Diniz, F. M., 2014. Development of novel simple sequence repeat markers from a genomic sequence survey database and their application for diversity assessment in *Jatropha curcas* germplasm from Guatemala. *Genet. Mol. Res*. 13, 6099-6106.
- Rosado, T.B., Laviola, B.G., Faria, D.A., Pappas, M.R., Bhering, L.L., Quirino, B., Grattapaglia, D., 2010. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. *Crop Sci*. 50, 2372-2382.

- Song, Y.P., Jiang, X.B., Zhang, M., Wang, Z.L., Bo, W.H., An, X.M., Zhang, D.Q., Zhang, Z.Y., 2012. Differences of EST-SSR and genomic-SSR markers in assessing genetic diversity in poplar. *For. Stud.China.* 14, 1-7.
- Sun, Q.B., Li, L.F., Li, Y., Wu, G.J., Ge, X.J., 2008. SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China. *Crop Sci.* 48, 1865-1871.
- Sun, F., Liu, P., Ye, J., Lo, L.C., 2012. An approach for *Jatropha* improvement using pleiotropic QTLs regulating plant growth and seed yield. *Biotechnol. Biofuels.* 5, 42.
- Tatikonda, L., Wani, P.S., Kannan, S., Beerelli, N., Sreedevi, K.T., Hoisington, A.D., 2009. AFLP based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., biofuel plant. *Plant Sci.* 176, 505-513.
- Tavaré, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences.* American Mathematical Society. 17, 57-86.
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R.K., Graner, A., 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Theor Appl Genet.* 106, 411-422.
- To, H., Grafton, Q., 2015. Oil prices, biofuels production and food security: past trends and future challenges. *Food Security.* 7, 323-336.
- Varshney, R.K., Graner, A., Sorrells, M.E., 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in biotechnology.* 23, 48-55.
- Vischi, M., Raranciuc, S., Baldini, M., 2013. Evaluation of genetic diversity between toxic and non toxic *Jatropha curcas* L. accessions using a set of simple sequence repeat (SSR) markers. *African Journal of Biotechnology.* 12, 265-274.
- Waples, R.S., Gaggiotti, O., 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol Ecol.* 15, 1419–1439.
- Wen, M., Wang, H., Xia, Z., Zou, M., Lu, C., Wang, W., 2010. Development of EST-SSR and genomic SSR markers to assess genetic diversity in *Jatropha curcas* L. *BMC Research notes.* 3, 42.
- Yadav, H.K., Ranjan, A., Asif, M.H., Mantri, S., Sawant, S.V., Tuli, R., 2011. EST-derived SSR markers in *Jatropha curcas* L. development, characterization, polymorphism, and transferability across the species/genera. *Tree Genet Genomes.* 7, 207-219.

Table1.

Germplasm bank identification number, geographical collection sites and Genbank Accession number of nrDNA-ITS region from each sample of *J. curcas* accessions in the Fabio Baudrit Experiment Station.

Germplasm code	Country	Location	Genbank accession number
JCCR-1	Costa Rica	Orotina	
JCCR-2	Honduras	Abangares	
JCCR-3	Costa Rica	Orotina	
JCCR-4	Costa Rica	San Mateo	
JCCR-5	Costa Rica	Cañas	
JCCR-6	Costa Rica	San Antonio	
JCCR-7	Costa Rica	Cañas	
JCCR-8	Costa Rica	Abangares	

JCCR-9	Costa Rica	Guapinol
JCCR-10	Costa Rica	Cañas
JCCR-11	Costa Rica	San Antonio
JCCR-12	Costa Rica	San Mateo
JCCR-13	Costa Rica	Orotina
JCCR-14	Costa Rica	Turrubares
JCCR-15	Costa Rica	Abangares
JCCR-16	Brazil	
JCCR-18	Costa Rica	Bagaces
JCCR-19	Costa Rica	Cañas
JCCR-20	Costa Rica	San Vito
JCCR-21	Costa Rica	Capulin
JCCR-22	Uganda	Uganda
JCCR-23	Costa Rica	San Antonio
JCCR-24	Mexico	Mexico
JCCR-25	Ecuador	Manabí
JCCR-26	Costa Rica	Capulin
JCCR-27	India	India
JCCR-28	Costa Rica	Upala
JCCR-29	Costa Rica	Bagaces
JCCR-30	Costa Rica	Coto 54
JCCR-31	Mexico	Mexico
JCCR-32	Costa Rica	Bagaces
JCCR-33.1	Costa Rica	Los Santos
JCCR-33.2	Costa Rica	Los Santos
JCCR-34	Costa Rica	FabioBaudrit
JCCR-35	Costa Rica	Abangares
JCCR-36	Costa Rica	Turrubares
JCCR-37	Costa Rica	Unknown
JCCR-38	Colombia	
JCCR-40	Costa Rica	Lagunilla
JCCR-41	Costa Rica	CATIE
JCCR-43	Costa Rica	Turrubares
JCCR-44	El Salvador	
JCCR-45	Costa Rica	Comayagua
JCCR-46	Costa Rica	Diquis
JCCR-47	South Africa	
JCCR-MIR	Costa Rica	Miramar
JCCR-A	Costa Rica	Anabel
JCCR-MG	Costa Rica	Montaña Grande
JCCR-INDIA	India	India

JCCR-L

Costa Rica

Lepanto

Table 2. EST-SSR and G-SSR used for evaluation of *Jatropha curcas* germplasm. Annealing temperature (T_A), expected band size, and sequences of the forward and reverse primers are specified in the table.

ID	Forward Primer	Reverse Primer	$T_A(^{\circ}\text{C})$	Expected size(bp)
JESR-001	AACCACAGGAGTTGGTAATG	GAAAGAAGCAACAGAAATGG	50	307
JESR-028	ACTTCCTTCAGATCATGCAC	CTGGGTAATCTTGTTCCAAA	52	292
JESR-047	GTTGATACTGGAAGTGAGCC	TGTGTTCAAAGGTGATGAGA	52	398
JESR-086	TCCCTCTCCTTCAGATTA	ATGATAGCCAAACAGCAACT	54	333
JESR-092	CTCTGAGAATTGAACCATCC	GGGAACAAAGAAATTACTGG	54	378
JESR-093	CACCTCCCATTAGGGTTT	CTAATCGACGCTGATAATCC	54	239
JESR-095	AATGAGTCTGACAATCAGGG	GCATGCTCTGTTCTGCTT	54	336
JESR-096	ACACAAACACAATCAACAGC	CGCGACTCACTTTGTATGTA	54	244
JESR-098	AGATCACAAGGATCACAAGG	GCAGTTGTCAAACACTAGCA	54	290
JESR-099	ATAATGGCAAACAAGTGGTC	TGGTAGTGTGTTCTTGCGAG	54	305
JESR-101	ATCCTAACACAGTTGCCATC	AAACTCAACCAAACCACAAC	54	230
JESR-102	ATCCTTCTGCAGTAGCCATA	TTATATGCTACACATCAACCT G	54	278
JESR-103	CAAGTTCGAGGAGTACAAGG	TGTTACAACGAGATGAGTGC	54	292
JESR-104	CCACAGTTCATCCTCAATTT	GATATTCCTCTGGAACCCA	54	308
JESR-118	CTAAAGGCTGTGAAGAAGGA	TCCGAGCCAATTTCTTATTA	54	276
JESR-161	AAGAAGTGTATGGGTTGCAC	TACGATACCTAGGGCTACGA	56	323
JESR-162	ACTGATGGGTATGTGAGAGG	TTCTTCATCATGGCTACCTT	56	220
JESR-163	CAGAAACGGAGAGGTCTG	AGATTGGAAGAGGAGAGGA G	56	144
JESR-164	AGCCCAGTCTCGCGGAAG	CAGTTCCTTCAGAAGCTC	56	231
JESR-178	CTTTAGTCCACCTCAAGTGC	TGCAGCAATCAACTCTACTG	56	375
JSSR-203	ATCCTTGCCTGACATTTTGC	TTCGAGAGTCCAATTGTTG	55	210

Table 3.

SSR Primers used to evaluate toxicity of accessions in the germplasm bank.

Primer ID	T_m(°C)	Expected size non-toxic (bp)	Expected size toxic (bp)
JCT27	60	259	253
JcSSR-26	55	210	230
JCT31	59	214	208

Table 4.

Parameters of genetic diversity and information contents of eighteen EST-SSR markers and one SSR used to analyze 50 *J. curcas* accessions.

SSR name	He	PIC	f
JEST-01	0.375	0.5512	0.4106

JEST-28	0	0.04251	0.001
JEST-47	0.05	0.0475	-0.01298
JEST-86	0	0.3360	00.001
JEST-92	0.8139	0.3700	-0.6535
JEST-93	0.3265	0.2498	-0.1601
JEST-95	0.2173	0.1749	-0.111
JEST-96	0.38	0.2604	-0.22500
JEST-98	0.04347	0.1144	0.6498
JEST-99	0.28	0.2364	-0.1100
JEST-101	0.5	0.35726	-0.0616
JEST-102	0.325	0.2351	-0.1818

JEST-118	0.3125	0.228	-0.175
JEST-161	0.0434	0.0416	-0.011
JEST-162	0.5	0.6766	0.2995
JEST-163	0.2448	0.1918	-0.1294
JEST-164	0.7209	0.35477	-0.555
JEST-178	0.5116	0.3638	-0.0584
JSSR-203	0.9318	0.3748	-0.8616
<hr/>			
Mean	0.3475	0.2758	0.0035
SD	0.0578	0.0356	0.1031

H: Heterozygosity, PIC: Polymorphism information content, f: inbreeding coefficient.

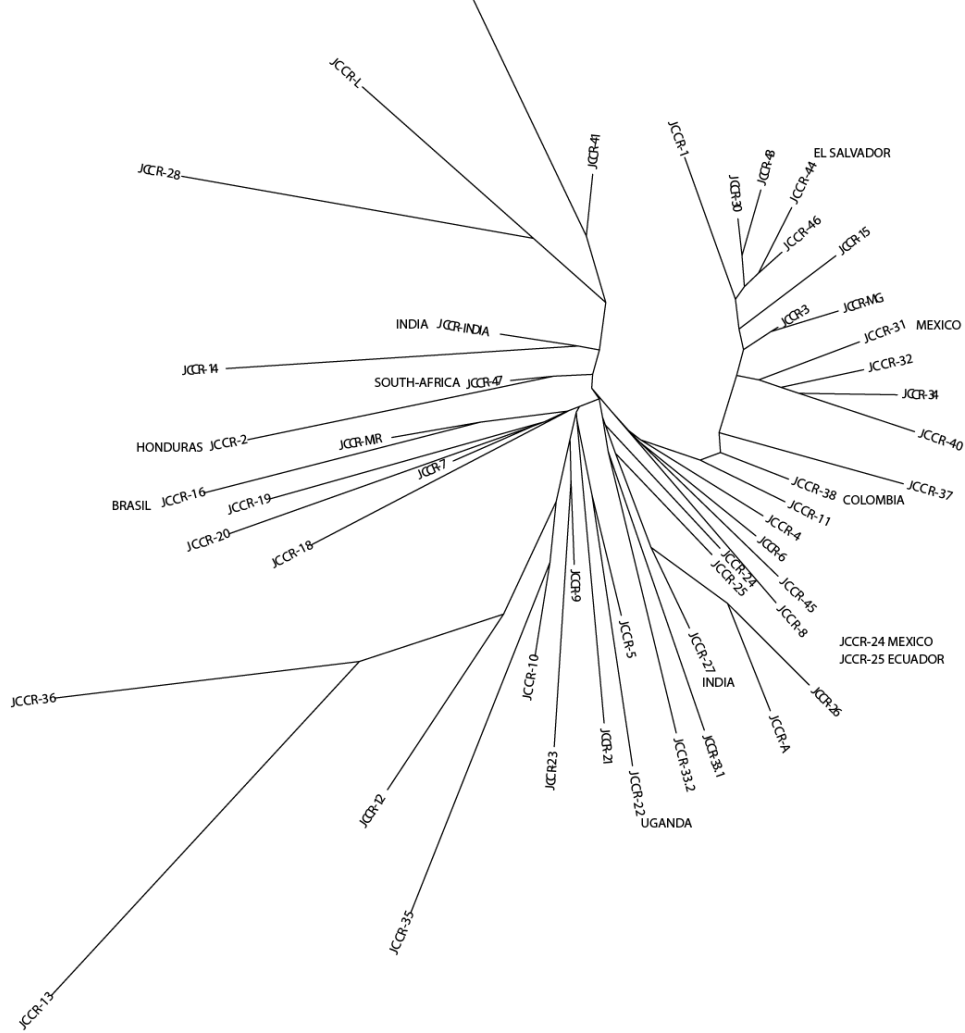


Fig. 1. Neighbor-Joining (NJ) tree analysis based on a genetic distance matrix from 19 microsatellite data from 50 germplasm accessions of *J. curcas*.

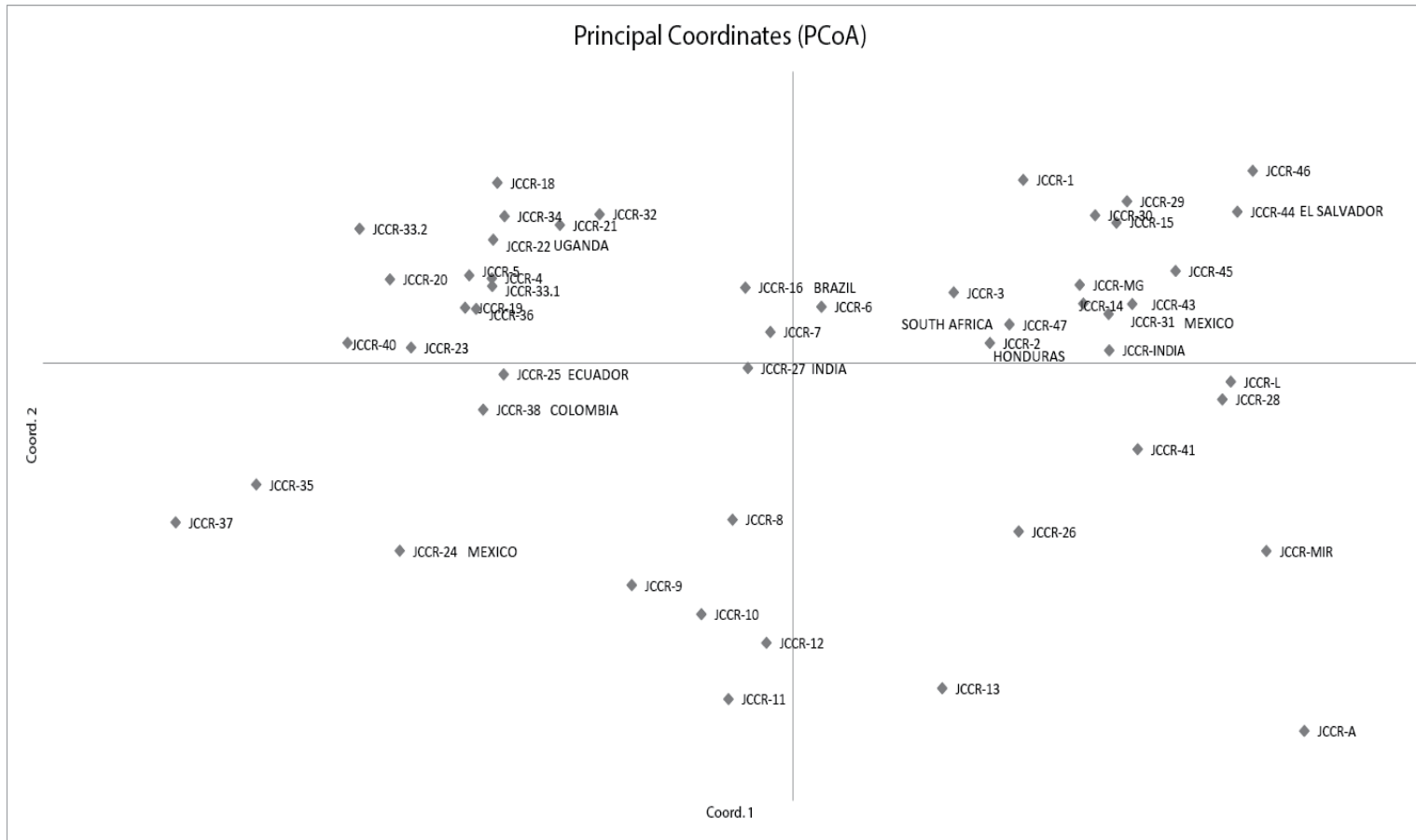


Fig. 2. Principal coordinate analysis created with GenAlEx with a genetic distance matrix created in Populations software with the Goldstein model.

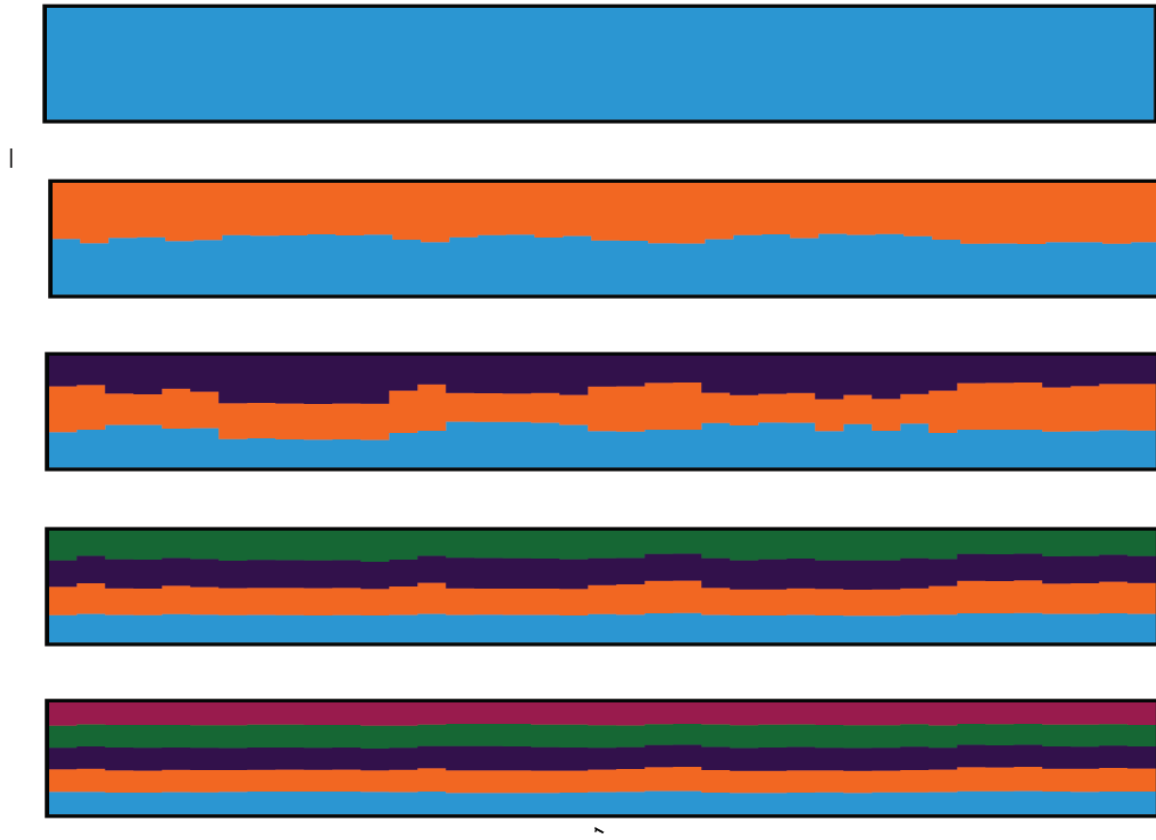


Fig. 3. STRUCTURE results of the analysis of Costa Rican germplasm bank accessions processed with CLUMPACK with K=1 to K=5.

Nota: Copia del correo recibido

De: em.mole.0.48f620.ccb395ee@editorialmanager.com [mailto:em.mole.0.48f620.ccb395ee@editorialmanager.com] En nombre de Molecular Biology Reports (MOLE)

Enviado el: miércoles, 03 de febrero de 2016 09:50 p.m.

Para: Elizabeth Arnaez Serrano

Asunto: MOLE-D-16-00134 - Submission Notification to co-author

Re: "Molecular evaluation of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) accessions from Costa Rica"

Full author list: Marcela Vazquez-Mayorga, Master; Eric Fuchs, Doctor; Eduardo Hernandez; Franklin Herrera, Doctor; Jesus Hernandez; Ileana Moreira, Master; Elizabeth Arnaez, master; Natalia Barboza Vargas

Dear MSc Arnaez,

We have received the submission entitled: "Molecular evaluation of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) accessions from Costa Rica" for possible publication in Molecular Biology Reports, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Ms Natalia Barboza Vargas who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Molecular Biology Reports

Anexo 3

Light-response curves for *Jatropha curcas* provenances under field conditions in Costa Rica.

Elemer Briceño Elizondo¹; ebriceno@itcr.ac.cr

Elizabeth Arnaez²; earnaez@itcr.ac.cr

Ileana Moreira²; imoreira@itcr.ac.cr

Marvin Castillo¹; mcastillo@itcr.ac.cr

Dagoberto Arias Aguilar¹; darias@itcr.ac.cr

1: Forest Engineering School, Instituto Tecnológico de Costa Rica

2: Biology School, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Address: 800m South of “Basilica de Los Angeles”, Cartago, Costa Rica

PO box: 159-7050 Cartago, Costa Rica; Phone: +506-25502279.

Abstract:

Widespread attention on the potential for *Jatropha curcas* to produce biodiesel has recently brought attention on the species. However little solid information on key physiological and management aspects exist on the species for Central America.

A gene bank, established at the Experimental Station Fabio Baudrit, located in La Garita de Alajuela, Costa Rica, comprised of a number of 52 accessions from around the country and abroad, identified 10 potential provenances of importance. Through annual monitoring, the provenances Turrubares, Cruce Jaco, Barro Turrubares, Orotina, Marichal, Tempate 1, San Vito, Mexico, India, Tempate, were identified as the most productive. Data gathering was made during the same hours of the morning from 8 am to 11 am, through the beginning of the rainy season (June-August). A characterization of the quantum yield of individuals from these provenances was performed. The light saturation point ranged from 154 $\mu\text{mol}(\text{photon}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (eq.1, Provenance Orotina) to 988 $\mu\text{mol}(\text{photon}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (eq. 1 Provenance San Vito). The maximum assimilation rate was exhibit by San Vito provenance (16.6 $\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), which is consistent with other variables such as respiration and its light compensation point. Respiration ranged from 1 $\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tempate) to 5 $\mu\text{mol}(\text{CO}_2) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Turrubares). The data from Turrubares exhibited inconsistencies and the curve did not adjust well; fluctuations in cloud cover and stomatal closure affected data from this site, signaling the sensitivity of the species but also its quick adaptation to changing consitions

Keywords: *Jatropha curcas*, CO₂ assimilation, light curves, modelling.

1. Introduction

The use of biofuels can potentially contribute to climate change mitigation, rural development and energy security. Widespread attention on the potential for *J. curcas* to produce biodiesel planting the species on marginal land with low inputs has recently created speculation on the species. This has led to large plantations in Asia, Africa and America. Work with *J. curcas* has shown low water use, good growth on marginal and degraded lands, high oil yields, and low labor costs (Everson et al. 2013). This species is characterized by its resistance to drought, its fast growing nature, its easy reproduction and its short life cycle (Jongschaap et al 2007; Kumar and Singh 2014; Lowe et al 2012; MAG, 1991). Its productivity depends on the plant-specific factors such as the distribution of dry matter, the proportion of female / male flowers, the size and weight of the seed, seed oil content, toxicity, the floral induction and floral sync. (Chikara et al. 2013).

As a general expectation, aided by models and empirical data, increase in CO₂ levels can have either positive or negative effects on plant acclimation which affects net primary production (Griffits and Jarvis 2005, Griggs 2002). Drought has substantial negative influences on many physiological processes of plants such as photosynthesis, stomatal behavior, chlorophyll fluorescence and metabolite accumulation. According to Maes et al (2009), there are two great concerns regarding cultivation of the species: i) little information on the basic agricultural aspects of plantation and ii) it is considered a wild species, with an almost null improvement or domestication degree. In fact, a small amount of information exists on species' physiology, although drought resistance is widely studied (Abou Kheira and Atta 2009; Kesava *et al.* 2012). The objective of this paper is to obtain a photosynthetic rate profile of the selected provenances at the EEFB under normal field conditions.

2. Material and Methods

2.1. Site and species of study

The research was carried out at the "Agricultural Experiment Station Baudrit Fabio Moreno (EEAFB)" research station of the University of Costa Rica located in the province of, Alajuela at 840 m.a.s.l. Average annual rainfall is 1940 mm distributed from May to November with an annual average ambient temperature of 22 ° C. The plantation was established in 2009 with a 3x2 m arrangement and received constant pruning and weed maintenance. Three individuals with three repetitions each from the ten most productive provenances were measured using a gas exchange measuring equipment. The selected provenances were: Turrubares, Cruce Jaco, Barro Turrubares, Orotina, Marichal, Tempate 1, San Vito, Mexico, India, Tempate,



Figure 1: Germoplasm bank of *Jatropha curcas*, at Fabio Baudrit Experimental station, La Garita, Costa Rica.

2.2. Photosynthesis at light saturation and Light curves

The equipment used in the study was the gas exchange Ciras II (PP Systems[®]) system. The CIRAS-II requires a pre-boot measurement of about 10 minutes warming. The device allows simultaneous display in color screen and in real time, up to 15 measurement variables and graphs in Microsoft Windows environment. The manufacturer claims the computer screen has been optimized for use in the field, but in practice it may be difficult to visualize, especially when working in bright sunlight. Prior to beginning any measurement, it is necessary to establish parameters program. Light curves were recorded for *Jatropha curcas*, details of treatment measurements listed as follows: CO₂ to 380 ppm (mol (CO₂) mol (air)⁻¹) averaged with ambient CO₂ control, "Photon flux density" (PFD) of 0-2000 mol (quanta) m⁻² s⁻¹, in 100 mol (quanta) m⁻² s⁻¹, Relative Humidity (RH) ranging from 46 to 70%.

To adjust the net photosynthetic data to PN/PAR curves, the Ye et al 2007 model was employed. The model, based on the analysis by Lobo et al (2013), present a nonrectangular hyperbola-based model (Eqs. 1). His and further models are well described in the literature (Ye 2007, Abe et al 2009, Kaipainen 2009, Prioul, et al 1977). The model is presented below:

$$P_N = \varphi_{(I_0 - I_{comp})} \times [(1 - \beta \times I)/(1 + \gamma \times I)] \times (I - I_{comp}) \quad (\text{Eq. 1})$$

Where: P_N = net photosynthesis rate [$\mu\text{mol (CO}_2\text{) m}^{-2} \text{s}^{-1}$]

$\varphi_{(I_0 - I_{comp})}$ = quantum yield from I_0 to I_{comp} [$\mu\text{mol (CO}_2\text{) } \mu\text{mol}^{-1}(\text{photons})$]

β = adjusting factor

γ = adjusting factor

I = photosynthetic photon flux density [$\mu\text{mol (photons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$]

I_{comp} = light compensation point [$\mu\text{mol (photons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$]

3. Results and Discussion

3.1. CO₂ assimilation curves with increasing PAR.

Figure 1 shows the CO₂ assimilation curves as a function of PAR per provenance on selected plants of *J. curcas*. The behavior of the curves for all treatments presents several phases; at start, from absence of light until the light compensation point is reached we can see an increase with increasing photon flux density (PAR); where the CO₂ assimilated by photosynthesis (Pn) is in balance with respiration; after this point and up until 250 μmol (photon) m⁻²s⁻¹, an exponential increase can be seen where already at this point we can see differences in assimilation levels among provenances. It can be inferred from the figure that there is already a difference in maximum quantum yield, which is the slope in that range. Between 200 and 800 μmol (photon) m⁻²s⁻¹ there is a region of slow decline on a logarithmic behavior. India and Orotina reached this point earlier, proven by the light saturation point (Table 1).

The main result from the analysis of the curves are to determine the maximum Pn obtained from each provenance. Yong et al (2010) determined this value to be approximately 800 μmol (photon) m⁻²s⁻¹, which is in line with the findings of the current study. In order to accurately describe the net CO₂ assimilation by a plant leaf (PN) as a function of an increase in the photosynthetic photon flux density (PAR), the net data from the CIRAS-II was fitted to a photosynthetic light-response curve (Eq 1) ranging from 0 to approximately 2 000 μmol (photon) m⁻²s⁻¹. The best response curve for each site is presented in figure 2; assimilation parameters, including respiration are described in table 1.

The maximum quantum yield φ_{max}, interpreted as the quantum yield (φ) between the light compensation point (I_{comp}) and the point and the φ(I), at a I= 200 μmol(photon) m⁻²s⁻¹ ranges from 0.0194 (Tempate) to 0.0471 (India) μmol (CO₂) μmol⁻¹ (photons); exception is Turrubares, which did not adjust well to the curve. In this paper the R² values are as good as in Lobo et al (2013) (Table 1); which suggests that the data here presented adjusts well with the models presented; which is the best way to compare the models as the use of R² for model selection, has no obvious meaning for nonlinear regression).

The same author considers that there is no single definitive mathematical model to describe the assimilation curve ideal for all sets of data or situations, therefore suggesting that the best PN/PAR curve is the one among all available that fits best the original data; issue that it was verified on the present data as well.

Table 1. Maximum values from regression model employed to fit the net photosynthetic light response curves for 10 provenances of *Jatropha curcas* provenances. I_{comp}: light compensation point [μmol(photon) m⁻² s⁻¹]; I_{max}: light saturation point [μmol(photon) m⁻² s⁻¹]; P_Nmax: Light-saturated net CO₂ uptake [μmol(photon) m⁻² s⁻¹]; R_D : dark respiration [μmol(CO₂) m⁻² s⁻¹]; φ(I_{comp}_I200): Quantum yield between I_{comp} and I200 [μmol (CO₂) mmol⁻¹ (photons)]; P_gMax: Maximum gross photosynthesis rate [μmol(CO₂) m⁻² s⁻¹].

Provenance	Light compensation point	Light saturation point	Light-saturated net CO ₂ uptake	Dark respiration	Quantum yield between I _{comp} and I ₂₀₀	Maximum gross photosynthesis rate	R ²
	I _{comp} [μmol(phot on) m ⁻² s ⁻¹]	I _{max} [μmol(phot on) m ⁻² s ⁻¹]	PN(I _{max}) [μmol(CO ₂) m ⁻² s ⁻¹]	RD [μmol(CO ₂) m ⁻² s ⁻¹]	φ(I _{comp} _I ₂₀₀)= μmol (CO ₂) mmol ⁻¹ (photons)	PgMax [μmol(CO ₂) m ⁻² s ⁻¹]	
Barro							
turrubares	26.1	555	12.4	1.2	0.0379	16.5	0,994
Cruce							
Jaco	52.7	829	17.1	3.2	0.0458	26.3	0,998
India	80.8	502	12.4	4.2	0.0471	18.5	0,974
Marichal	91.2	648	13.2	3.8	0.0385	19.7	0,973
Mexico	29.3	705	15.2	2.5	0.0466	24	0,983
Orotina	19.7	154	6.8	2.1	0.033	9.2	0,940
Pozon	38.2	803	16.6	1.9	0.0417	23.9	0,998
San Vito	54.3	988	18	3.6	0.0437	30.6	0,969
Tempate	52.9	642	9.4	1	0.0194	12.1	0,991
Turrubares	46.5	49	0.3	5	0.0003	5.5	0,099

This can be easily observable in figure 2, which suggests that the model used can explain satisfactorily the behaviour for *J. curcas* regardless of provenance. However the same author suggests that the Ye (2007) (equation 1) approach to calculation of (I) produces a result that is much more realistic and useful, since Pn can be seen changing with changing “I”, which for ecophysiological purposes are focus of analysis when Pn is above the light compensation point, which means that a net CO₂ uptake is taking place.

This species resources to tolerance strategies to cope with stress on its habitat. Major abiotic stress which is often accompanied with high temperature is light intensity. Light varies in intensity both temporally (as a result of the diurnal cycle) and spatially (as a result of shading by clouds and other organisms and objects) throughout the day. Excess light leads to photo-inhibition, a sustained decline in photosynthetic efficiency, associated with damage to P680 (Mathur et al. 2014). The values of PAR and precipitation are described in figure 3. Measurements took place during the onset of the rainy season, which rules out stress by water deficit in the soil, and as observed by the range of maximum and minimum radiation present, the exposure remains steady throughout these months.

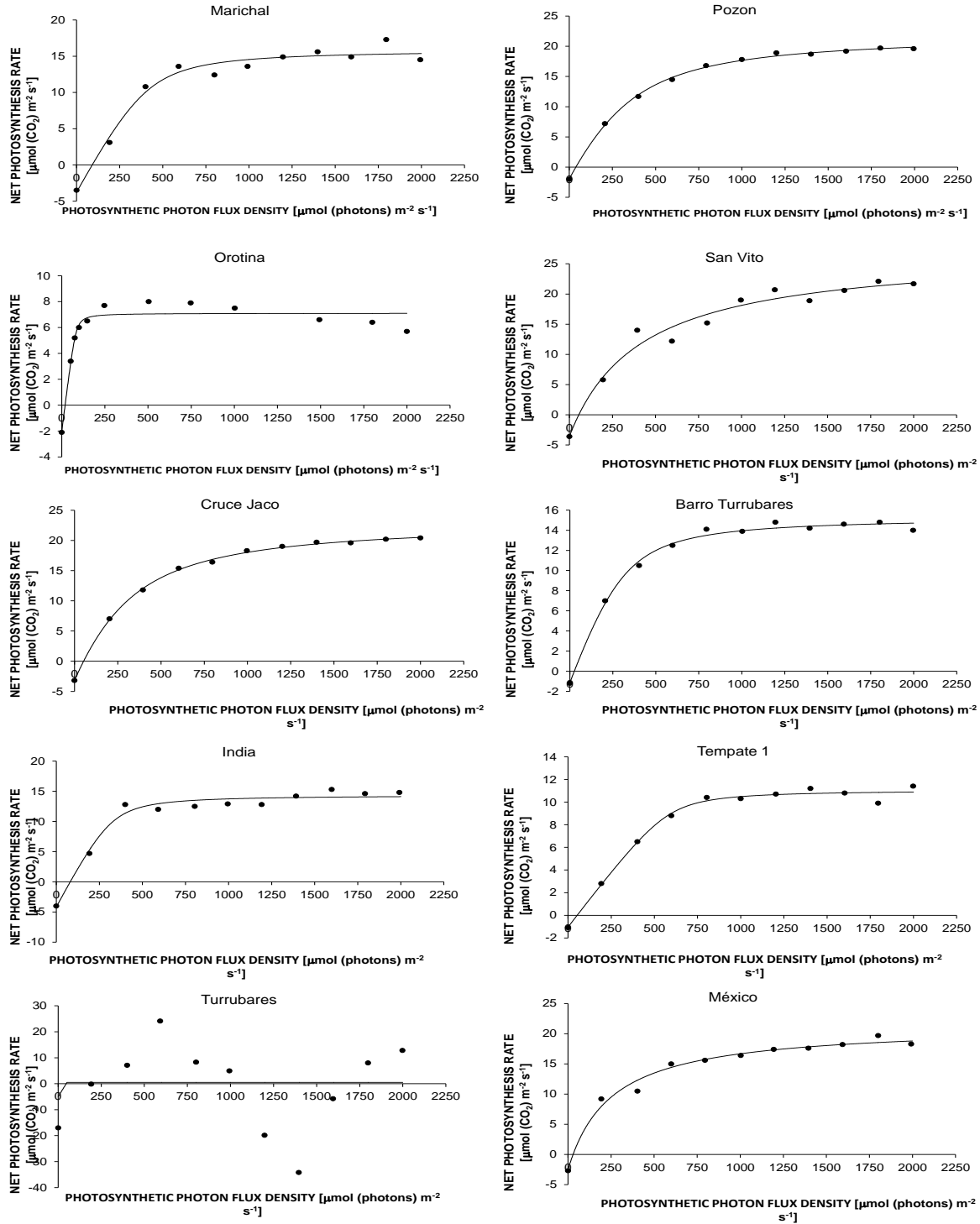


Figure 2. Highest best fitted Light-saturated net CO_2 uptake response curves from 10 chosen provenances at a *J. curcas* germoplasm bank at the EEFBM, Costa Rica.

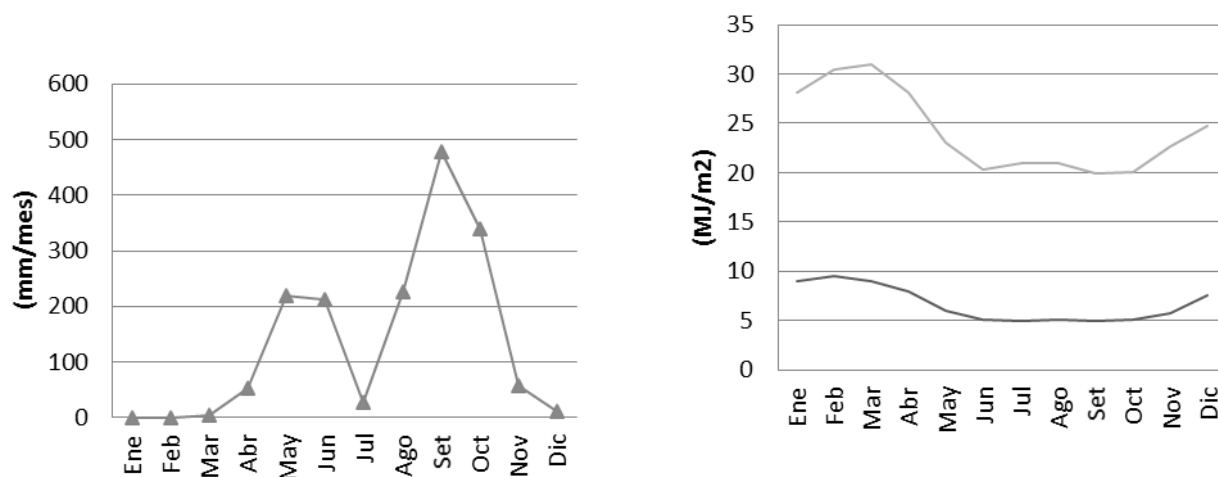


Figure 3. Average monthly precipitation and average monthly maximum and minimum radiation at Estación Experimental Fabio Baudrit, 2014

Jatropha curcas has been receiving attention lately as a potential oily seed producing species which can be converted to biodiesel; however growing conditions on its performance such as temperature range and sites have scarcely been studied. *J. curcas* is distributed over the arid and semi-arid areas of Mesoamerica and in all tropical regions. Photosynthesis is one of the most sensitive processes to drought stress. The inhibitory effects of drought on photosynthesis may be associated with low CO₂ availability due to low stomatal conductance and/or impairments in carbon assimilation metabolism (Silva et al. 2012). As a conclusion, as with Lobo *et al* 2014 it is considered optimum to employ *Excel* routines to identify best fits for Pn/I curves to test the sensitivity of field data. Other aspects such as reproductive cycle synchrony, can aid to understand peaks on photosynthetic activity and response to stress.

Acknowledgements

The authors would like to give thanks to the project: "Regulation of the flowering of *Jatropha curcas* to improve the sustainability of biofuel feedstock production by farmers in Latin America and the Caribbean" financed by VIE-TEC and LAC Brazil.

4. References

- Abe, M., Yokota, K., Kurashima, A., Maegawa M.: High water temperature tolerance in photosynthetic activity of *Zostera japonica* Ascherson & Graebner seedlings from Ago Bay, Mie Prefecture, central Japan. - Fisheries Sci. 75: 1117-1123, 2009.
- Abou Kheira, A. A., Atta, N.M.M. (2009). "Response of *Jatropha curcas* L. to water deficits: Yield, water use efficiency and oilseed characteristics." Biomass and Bioenergy 33(10), 1343-1350.
- Everson, C. S., M. G. Mengistu, Gush, M.B. (2013). "A field assessment of the agronomic performance and water use of *Jatropha curcas* in South Africa." Biomass and Bioenergy 59, 59-69.

- Griggs, D. J., & Noguera, M. (2002). Climate change 2001: the scientific basis. Contribution of working group I to the third assessment report of the intergovernmental panel on climate change. *Weather*, 57(8), 267-269.
- Kaipainen, E.L. (2009). Parameters of photosynthesis light curve in *Salix dasyclados* and their changes during the growth season.— *Russ. J. Plant Physiol.* 56, 445-453.
- Kesava Rao, A. V. R., Wani, S. P., Singh, P., Srinivasa, R.Ch. (2012). "Water requirement and use by *Jatropha curcas* in a semi-arid tropical location." *Biomass and Bioenergy* 39, 175-181.
- Lobo, F. d. A., de Barros, M. P., Dalmagro, H.J., Dalmolin, A.C., Pereira, W.E., de Souza, E.C., Vourlitis, G.L., Rodriguez Ortiz, C.E. (2013). "Fitting net photosynthetic light-response curves with Microsoft Excel — a critical look at the models." *Photosynthetica* 51(3), 445-456.
- Maes, W.H., Trabucco, A., Achten, W.M.J., Muys, B. (2009). "Climatic growing conditions of *Jatropha curcas* L." *Biomass and Bioenergy* 33(10), 1481-1485.
- Mathur, S., Agrawal, D., Jajoo, A. (2014). "Photosynthesis: Response to high temperature stress." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 137(0), 116-126.
- Silva, E. N., Ribeiro, R.V., Ferreira-Silva, S.L., Vieira, S.A., Ponte, L.F.A., Silveira, J.A.G. (2012). "Coordinate changes in photosynthesis, sugar accumulation and antioxidative enzymes improve the performance of *Jatropha curcas* plants under drought stress." *Biomass and Bioenergy* 45(0), 270-279.
- Prioul, J.L., Chartier, P. (1977). Partitioning of transfer and carboxylation components of intracellular resistance to photosynthetic CO₂ fixation: A critical analysis of the methods used. - *Ann. Bot.* 41, 789-800.
- Ye, Z.-P. 2007. A new model for relationship between irradiance and the rate of photosynthesis in *Oryza sativa*. - *Photosynthetica* 45, 637-640.
- Yong, J. W. H., Y. F. Ng, S. N. Tan and A. Y. L. Chew (2010). "Effect of fertilizer application on photosynthesis and oil yield of *Jatropha curcas* L." *Photosynthetica* 48(2), 208-218

Anexo 4

Análisis fenológico comparativo de las accesiones más productivas de un banco de germoplasma de *Jatropha curcas* (tempate), en Costa Rica

Ileana Moreira²; imoreira@itcr.ac.cr
Elizabeth Arnaez²; earnaez@itcr.ac.cr
Marvin Castillo¹; mcastillo@itcr.ac.cr
Elemer Briceño Elizondo¹; ebriceno@itcr.ac.cr
Dagoberto Arias Aguilar¹; darias@itcr.ac.cr

1: Forest Engineering School, Instituto Tecnológico de Costa Rica
2: Biology School, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Address: 800m South of “Basílica de Los Angeles”, Cartago, Costa Rica
PO box: 159-7050 Cartago, Costa Rica; Phone: +506-25509146.

RESUMEN

La especie *Jatropha curcas* (tempate) es típica de la zona mesoamericana, su centro de origen se ha establecido en México. Ha sido domesticada para uso en cercas vivas y por su valor medicinal según el conocimiento tradicional. En la actualidad se cataloga como una especie de alto valor para la producción de aceites que pueden tener uso en biocombustibles o como diluyente de pinturas. En Costa Rica se ha establecido un banco de germoplasma en la estación experimental Fabio Baudrit de la Universidad de Costa Rica, ubicada en la Garita de Alajuela. Comprende un total de 52 accesiones procedentes de todo el país y algunas de ellas de origen internacional. Producto del seguimiento anual del mismo se tuvo conocimiento de que las procedencias Turrubares JCCR36, Jacó JCCR-3, El Barro de Turrubares JCCR-43, Orotina JCCR-1, Marichal JCCR-42, Tempate 1 JCCR-6, San Vito 2 JCCR-30, México 2 JCCR-31, India JCCR-27, Tempate 1-Guanacaste JCCR-23, fueron las más productivas y de cada una se seleccionaron 3 individuos a los que se les dio un seguimiento semanal estimando el número de flores femeninas, masculinas, número de inflorescencias, número de frutos. A los datos se les aplicó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis y los resultados se correlacionaron con el nivel de irradiación y precipitación. Lo que permitió estimar que las procedencias más productivas fueron San Vito 2 JCCR-30, México 2 JCCR-31 y Tempate 1-Guanacaste-23. La mayor tasa de irradiación se registró en los meses de febrero-marzo en el 2014 y marzo-abril en el 2015, se encontró correlaciones inversas mayores a 0,40 entre la radiación solar para los años 2014 y 2015, con respecto a la producción de flores, mientras que el comportamiento de la producción de inflorescencias presentó correlaciones con la precipitación y la radiación solar.

Palabras claves: Banco de germoplasma, *Jatropha curcas*, fenología.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la *Jatropha* ha cobrado importancia en los últimos años, ya que es una de las especies vegetales con mayor rendimiento de aceite (55%) y de ella se obtiene un biodisel de gran calidad. Es posible obtener rendimientos aproximados de 2500 kilogramos de semilla /hectárea (Loaiza *et al*, 2012). Es una especie perenne monoica perteneciente a la familia Euphorbiaceae, con una biología reproductiva en la cual se presentan pocas flores femeninas, lo que impide un mayor rendimiento en cantidad de semillas (Bang-Zhen y Zeng-Fu, 2011). Se caracteriza por ser una especie nativa de Mesoamérica que se ha cultivado en los trópicos y subtrópicos de diversas regiones, es un arbusto perenne, adaptado a suelos de baja fertilidad (Ram *et al* 2008). Debido a su habilidad de desarrollarse en sitios semiáridos y marginales, es utilizada además para el control de la erosión. Se trata de una alternativa agrícola que podría ser manejada y explotada para la mitigación de la pobreza y la generación de autoempleo en las zonas rurales, ya que permite optimizar el uso de la tierra y mano de obra (Sujatha *et al* 2005).

En Costa Rica, investigadores de la Estación Experimental Fabio Baudrit (Universidad de Costa Rica), el Instituto Tecnológico de Costa Rica y la Universidad Nacional han estudiado diferentes especies nativas en peligro de extinción, logrando que comunidades y asociaciones de productoras y productores se involucren en el rescate y reproducción de plantaciones en sus comunidades, obteniendo el máximo beneficio de las mismas, a través de incorporar mayor valor agregado a los diferentes productos y subproductos que obtienen del buen uso de las mismas. La *Jatropha curcas* (tempate) cumple con estas características y por ser una planta poco domesticada, son muchas las necesidades de investigación que se debe realizar para garantizar las condiciones geográficas, de manejo y producción que mejor permita el establecimiento del cultivo a nivel comercial. Producto de estos primeros pasos y por la importancia de este cultivo agroenergético, es que se implementó un banco de germoplasma en la Estación Experimental Fabio Baudrit que en la actualidad cuenta con 52 accesiones de todo el país, así como también de Brasil, México, India, entre otros a las que se le ha brindado las condiciones edafoclimáticas apropiadas y gracias a sus características de adaptabilidad crece muy bien (250 a 600 mm de lluvia/año y de 20 a 28 °C) (Loaiza *et al*, 2012). Es de suma importancia para cualquier país contar con bancos de germoplasma donde se conserve la diversidad de una especie como ésta, dónde se puede reservar la riqueza fitogenética de la misma (de Viana *et al*, 2011) Con el fin de caracterizar su comportamiento reproductivo y usarlo en futuros programas de mejoramiento genético, se hizo necesario un estudio comparativo de las diversas accesiones tomando como variables la producción de inflorescencias, de flores femeninas y de frutos y su correlación con condiciones meteorológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

En las instalaciones de la Estación Experimental Fabio Baudrit (UCR), Alajuela. Costa Rica, se estableció un banco de germoplasma de tempate con 52 accesiones caracterizadas morfológica y molecularmente. Este repositorio fue establecido en el 2009 y reubicado en el 2010. El suelo se preparó con maquinaria agrícola, se aró, rastrilló y alomilló. Las plantas fueron sembradas a una distancia de 3 x 2 m., se aplicó riego una vez por semana. Para el control de malezas se ha usado glifosato, así como deshierba en forma mecánica con motoguadaña. Se han presentado pocos problemas de plagas y enfermedades sin embargo, se ha aplicado como fungicida oxiclورو de cobre.

A partir de la caracterización morfológica realizada en dicho banco dentro del proyecto “Generación de información técnico-científica para el desarrollo del cultivo de *Jatropha curcas* (Tempate) en Costa Rica para su uso como fuente de energía alternativa y mitigación del cambio climático” (Arnáez *et al*, 2014), se seleccionaron 3 individuos de las 10 accesiones más productivas denominadas: Turrubares JCCR36, Jacó JCCR-3, El Barro de Turrubares, JCCR-43, Orotina JCCR-1, Marichal JCCR-42, Tempate 1 JCCR-6, San Vito 2 JCCR-30, México 2 JCCR-31, India JCCR-27, Tempate 1-Guanacaste JCCR-23. De tal forma que se monitorearon 30 plantas por semana desde febrero del 2014 hasta junio 2015. Cada semana se contó el número de inflorescencias, flores femeninas abiertas por inflorescencia y frutos verdes.

Se utilizó el período con mayor productividad de frutos verdes, inflorescencias y flores femeninas tanto del primer como segundo semestre del 2014 y 2015; la evaluación entre las accesiones se utilizó el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis debido a la no normalidad de los datos. Las pruebas se realizaron con una significancia del 0,05 en el programa STATISTICA 9.0

Además se evaluó la productividad de las accesiones mediante un índice de Productividad de la planta (IPP) generado a partir de los supuestos de multi producción de Fumero *et al.* (2016) y los análisis de relación de productividad foliar y reproductiva de seis especies en distintas condiciones climáticas (McCormack *et al.* 2015) que presenta valores porcentuales de 0 a 100, donde valores altos reflejan productividades mayores.

$$IPP = \left(\left(\frac{IF_N}{IF_{N \max}} * 0,33 \right) + \left(\frac{FF_N}{FF_{N \max}} * 0,33 \right) + \left(\frac{FV_N}{FV_{N \max}} * 0,33 \right) \right) * 100$$

Donde: IF_N es la inflorescencias en el momento N ; $IF_{n \max}$ es la inflorescencia máxima en el momento N ; FF_N es la cantidad de flores femeninas en el momento N , $FF_{n \max}$ es la la cantidad de flores femeninas máximas en el momento N ; FV_N es la cantidad de frutos verdes en el momento N , $FV_{n \max}$ es la cantidad de frutos verdes máxima en el momento N ; FFN

Además se determinó la viabilidad de flores femeninas anual como la división del total de flores femeninas entre el total de frutos verde de cada año. Las pruebas se realizaron con una significancia del 0,05 en el programa STATISTICA 9.0

Sin embargo (Montaldo, 2000; Navarro et al, 2000), determinan la eficiencia reproductiva por el cociente de número de frutos entre número de flores producidas. Y el éxito reproductivo (viabilidad) de flores femeninas anual como la división del total de flores femeninas entre el total de frutos verdes de cada año.

Se correlacionaron con la precipitación, temperatura y la radiación solar con la producción de flores femeninas e inflorescencias, se consideran que tienen alguna correlación cuando los valores obtenidos sean mayores a 0,40.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado del seguimiento fenológico se obtuvo la cantidad de inflorescencias promedios por planta en cada accesión. La accesión San Vito presenta la mayor producción de inflorescencias promedio por planta, superando a las otras accesiones como México y Tempate 23 (Figura. 1).

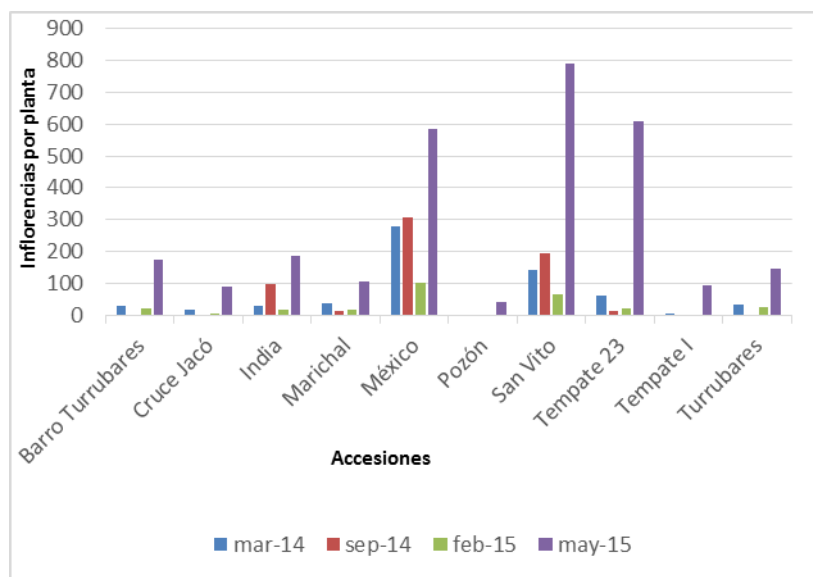


Figura 1. Inflorescencias promedio por planta por accesión producidas en dos años de medición

El análisis no paramétrico de Kruskal Wallis presentado en el cuadro 1, muestra que en el mes de marzo de 2014, las accesiones con mayor producción de inflorescencias son México y San Vito, pero no se evidencia diferencias significativas con las accesiones de Barro Turrubares, Turrubares, Marichal y Tempate 23. En el análisis realizado para la producción de inflorescencias en el mes de setiembre de 2014, no se observan diferencias significativas entre las mismas accesiones y se debe incluir a la accesión India. Pero al realizar el mismo análisis para la producción de inflorescencias en los meses de febrero y mayo de 2015, si se muestran diferencias entre las accesiones México y San Vito y para mayo 2015 estas no presentan diferencia con Tempate 23, si con las otras accesiones, (Cuadro 1).

Cuadro 1. Análisis no paramétrico de Kruskal Wallis, del número de inflorescencias por accesión por hectárea en cuatro diferentes épocas de producción.

Accesión	mar-14	sep-14	feb-15	may-15
Pozón	1067 A (1848)	4800 A (4233)	0 A (0)	65067 A (107204)
Tempate I	12267 A (18544)	0 AB (0)	3733 A (6466)	153067 A (87436)
Cruce Jacó	29333 AB (40011)	0 ABC (0)	6933 A (9375)	144000 A (84981)
India	45867 ABC (64802)	157867 ABCD (273433)	29333 A (29343)	298667 A (352604)
Barro Turrubares	46400 ABCD (39224)	3200 ABCD (3200)	34667 A (30484)	277333 A (92456)
Turrubares	52800 ABCD (42962)	0 BCD (0)	40000 A (51431)	235733 A (16343)
Marichal	62400 ABCD (27759)	20267 BCD (21723)	26667 A (14551)	169067 A 83267()
Tempate 23	97067 BCD (8812)	23467 CD (541326)	37867 A (331)	972800 AB (435632)
México	449067 D (476854)	492800 D (748897)	163200 B (140827)	937067 B (688423)
San Vito	226667 D (75900)	314133 D (54132)	107733 B (37261)	1261333 B (1043741)

LETRAS IGUALES SIGNIFICA QUE NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE ACCESIONES

En la Figura 2, se observa que las accesiones con mayor cantidad de flores femeninas son México, Tempate 23 y San Vito, que producen de 590 a 900 flores femeninas respectivamente para el año 2015. Comparativamente con lo mostrado en la figura 1, el comportamiento de producción de inflorescencias y la presencia de flores femeninas sigue dándose en mismas accesiones.

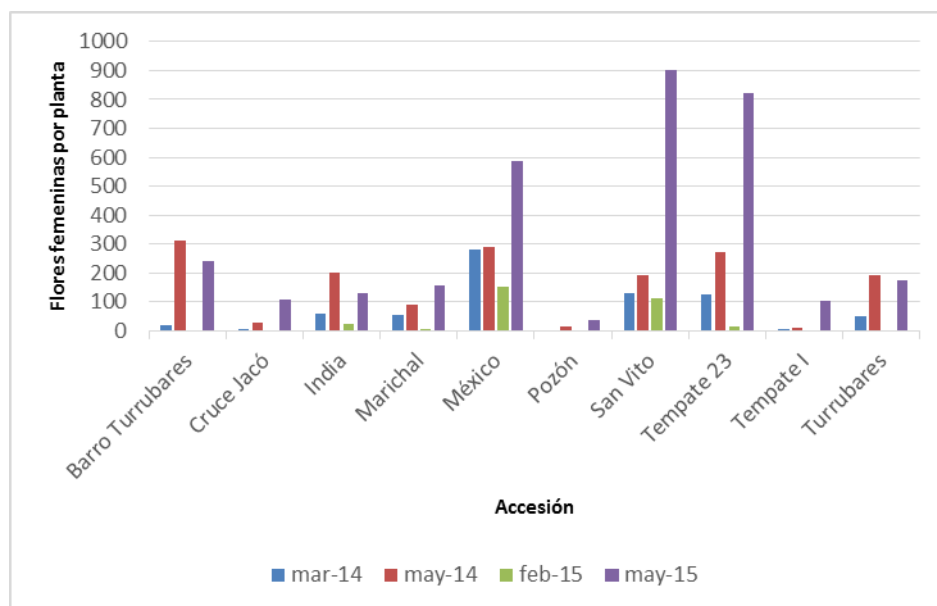


Figura 2. Producción de flores femeninas por planta en las accesiones en diferentes periodos.

Al realizar el análisis no paramétrico, con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre las accesiones seleccionadas, mostradas en el cuadro 2, para los periodos de mayor producción en el año 2014, se observan diferencias significativas entre las accesiones San Vito,

Tempate 23, México, con respecto a las demás accesiones, estas diferencias son más marcadas en el año 2015, donde la producción de inflorescencias y flores femeninas se duplica. Estadísticamente estas tres accesiones son superiores a las otras siete. Otro elemento a destacar es que la producción de flores femeninas se duplicó para el 2015 en la mayoría de las accesiones siendo superior a lo mostrado en el 2014, ya que según reporte de la literatura (Wu, 2011) la planta alcanza su nivel de producción máxima a los seis años de edad.

Cuadro 2. Análisis no paramétrico de Kruskal Wallis, del número de flores femeninas producidas por accesión por hectárea en cuatro diferentes épocas de producción.

Accesión	mar-14	sep-14	feb-15	may-15
Pozón	0 A (0)	20800 C (275132)	0 A (0)	61333 A (92722)
Tempate I	74677 C (9098)	13333 A (23094)	0 A (0)	163200 B (22228)
Cruce Jacó	10133 A (17551)	45333 AB (78520)	0 A (0)	173333 B (55893)
India	94400 ABC (147191)	320533 BC (108048)	39467 B (68358)	205333 B (300376)
Barro Turrubares	29333 AB (37807)	98133 C (160131)	0 A (0)	386133 B (35967)
Turrubares	78400 ABC (96013)	308800 C (22565)	0 A (0)	277867 B (89719)
Marichal	84800 ABC (62400)	144000 ABC (121062)	9600 B (9600)	246933 B (176620)
Tempate 23	201067 C (60044)	435200 C (350108)	19733 B (34179)	1314667 C (484497)
México	450667 C (447549)	463467 ABC (121062)	239467 B (302469)	938667 C (563512)
San Vito	208000 BC (85969)	305067 BC (35967)	176533 C (305469)	1444800 C (1168158)

LETRAS IGUALES SIGNIFICA QUE NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE ACCESIONES

Como es de esperar, la presencia de un mayor número de frutos se asocia a una mayor producción de flores femeninas. De ahí que la figura muestra que son las accesiones Tempate 23, México y San Vito, las que presentan la mayor cantidad de frutos/planta/periodo. La accesión San Vito produce una gran cantidad de inflorescencias (Figura 1) y flores femeninas (Figura 2), pero estas no son tan viables como Tempate 23, que es la accesión que presenta la mayor productividad de frutos (Figura 3).

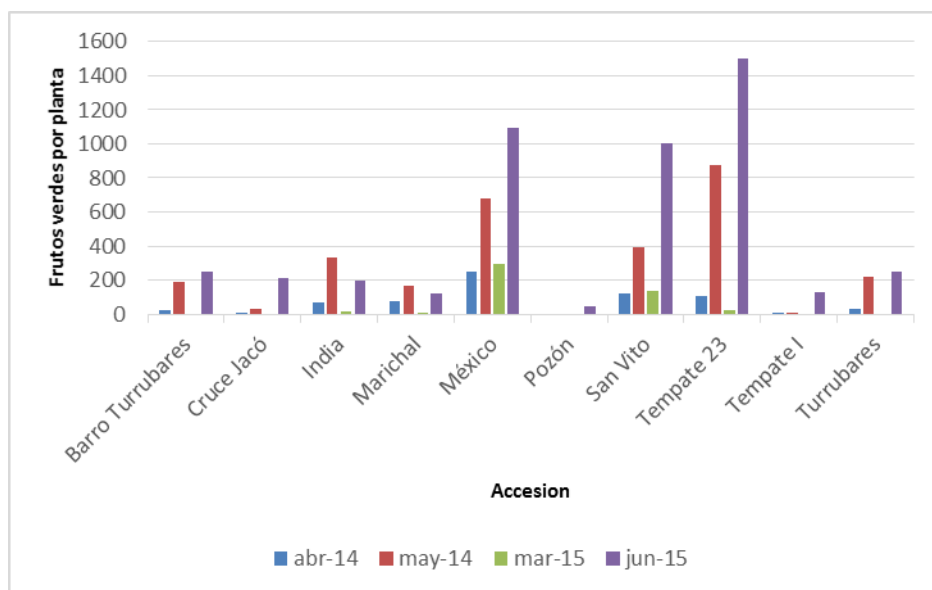


Figura 3. Producción de frutos verdes por planta en las accesiones en diferentes periodos.

El comportamiento de producción de inflorescencia, flores femeninas y frutos verdes se mantienen similar en los diferentes periodos de medición. Como es de esperar, la presencia de un mayor número de flores femeninas se encuentra asociada a la producción de frutos. Las diferencias entre accesiones no son tan evidentes en 2014, como en junio de 2015, donde Tempate 23 y México superan a las otras accesiones, en los demás periodos las diferencias no son tan marcadas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis no paramétrico de Kruskal Wallis, del número de frutos promedio por planta por hectárea.

Accesión	abr-14	set-14	mar-15	jun-15
Pozón	0 A (0)	0 A (0)	0 A (0)	74667 A (85541)
Barro Turrubares	37333 A (48985)	298133 ABC (77596)	0 A (0)	400533 B (81354)
Cruce Jacó	12267 A (21246)	44800 AB (77596)	0 A (0)	335467 B (220721)
Marichal	113600 ABC (191245)	537067 BC (420323)	30933 AB (41733)	312533 B (370241)
India	117333 ABC (113186)	262400 ABC (340901)	2667 AB (2444)	193600 B (219544)
México	402667 C (112960)	1085867 C (511643)	475200 B (563956)	1748267 C (859963)
San Vito	197333 BC (199547)	634133 C (149447)	218667 B (371821)	1601600 B (148997)
Tempate 23	167467 BC (18750)	1394667 C (735454)	36267 AB (47902)	2404800 C (67596)
Tempate I	3200 A (5543)	17600 AB (30484)	0 A (0)	206933 B (657569)
Turrubares	54933 ABC (43358)	352533 ABC (269068)	0 A (0)	396267 B (57362)

En la figura 4 se muestra el índice de Productividad de la planta (IPP), que relaciona la producción de inflorescencias máximas, con la cantidad de flores y la producción de frutos. Los resultados muestran que el IPP no superan el 60 %, lo cual nos indica que se dan problemas en la producción, se presentan grandes producciones de inflorescencias pero estas pueden ser en su mayoría flores masculinas y por otra parte las flores femeninas producidas pueden no ser tan viables o se producen pérdidas por factores climáticos y falta de polinización.

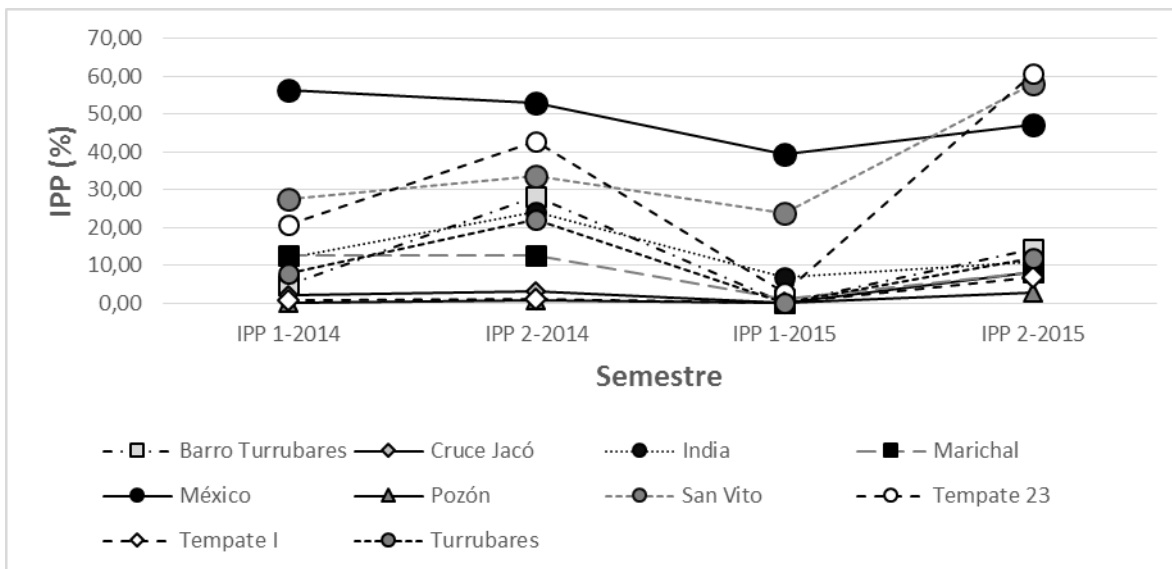


Figura 4. Producción de frutos verdes por planta en las accesiones en diferentes periodos.

En estudios realizados para evaluar el éxito reproductivo comparando plantas polinizadas natural con las polinizadas artificialmente (Galletto et al, 2002), tampoco se han obtenido diferencias significativas.

El éxito reproductivo se puede medir por la obtención de semillas a partir de flores sometidas a diferentes tratamientos de polinización (Navarro et al), en este estudio el éxito se midió comparando la producción de flores versus la producción de frutos. Montaldo (2000), encontró que la eficiencia reproductiva media varió entre especies y la interacción especie por año no resultó significativa.

Según el análisis de la fenología, la producción de inflorescencias inicia durante los meses de febrero y marzo, encontrándose que la mayor producción se da en el mes de abril, que coincide con los periodos de mayor radiación solar (MJ/m^2), lo cual está acorde con lo expuesto por Lindner (2011) y Aker (2015). Asimismo la precipitación inicia en el mes de marzo lo que puede contribuir a propiciar un aumento en la productividad de las plantas tanto en inflorescencias como en flores femeninas encontrándose un pico de producción como se observa en las figuras 1 y 2. Sin embargo, esta respuesta como en otros cultivos está asociada a la fertilidad de los suelos y a su condición genética (Lindner, sf). Estas condiciones y su relación con la productividad han sido

estudiadas ampliamente en café (*Coffea arabica*) (Ramírez, et al, 2010), donde se reporta que durante el período de aparición de botones florales y crecimiento de ramas (más o menos dos meses antes de la antesis floral), predominan las condiciones de tiempo seco, buena radiación, altas temperaturas y grandes oscilaciones diarias, y durante el período de antesis, predomina el tiempo variable, y las temperaturas mínimas nocturnas bajan hasta sus mínimos absolutos, sin embargo en *Jatropha curcas* (tempate) en las condiciones de siembra en la Estación Experimental Fabio Baudrit tanto la apertura de las flores con la antesis coinciden con los periodos de mayor radiación y precipitación, pero no se puede afirmar cual factor tiene una mayor influencia sobre esta respuesta.

Se realizó un análisis de correlación de las variables producción de inflorescencias con respecto a la temperatura °C, radiación solar (Mj/m²) y precipitación, el cuadro 4, muestra que los valores de correlación son inversos y que solo se obtiene valores superiores a una correlación mayor a 0,40 entre la producción de inflorescencias con respecto a la radiación solar y la precipitación.

Cuadro 4. Correlación obtenida entre las variables climáticas (radiación solar, precipitación y temperatura), con la producción de inflorescencias.

2014	INFLORESCENCIA/HA	TEMPERATURA	RADIACIÓN	PRECIPITACIÓN
INFLORESCENCIA/HA	1,00			
TEMPERATURA	0,24	1,00		
RADIACIÓN	0,48	1,00	1,00	
PRECIPITACIÓN	(0,44)	(0,73)	(0,73)	1,00
2015	INFLORESCENCIA/HA	TEMPERATURA	RADIACIÓN	PRECIPITACIÓN
INFLORESCENCIA/HA	1,00			
TEMPERATURA	0,28	1,00		
RADIACIÓN	0,55	(0,30)	1,00	
PRECIPITACIÓN	(0,49)	(0,99)	0,42	1,00

Se realizó un análisis de correlación de las variables producción de flores femeninas con respecto a la temperatura °C, radiación solar (Mj/m²) y precipitación, el cuadro 5, muestra que los valores de correlación son inversos y que solo se obtiene valores superiores a una correlación mayor a 0,40 entre la producción de flores femeninas con respecto a la radiación solar.

Cuadro 5. Correlación obtenida entre las variables climáticas (radiación solar, precipitación y temperatura), con la producción de inflorescencias.

2014	FEMENINAS/HA	TEMPERATURA	RADIACIÓN	PRECIPITACIÓN
FEMENINAS/HA	1,00			
TEMPERATURA	(0,05)	1,00		
RADIACIÓN	(0,50)	1,00	1,00	
PRECIPITACIÓN	(0,20)	(0,73)	(0,73)	1,00
2015	FEMENINAS/HA	TEMPERATURA	RADIACIÓN	PRECIPITACIÓN
FEMENINAS/HA	1,00			
TEMPERATURA	0,26	1,00		
RADIACIÓN	(0,45)	(0,30)	1,00	
PRECIPITACIÓN	(0,31)	(0,99)	0,42	1,00

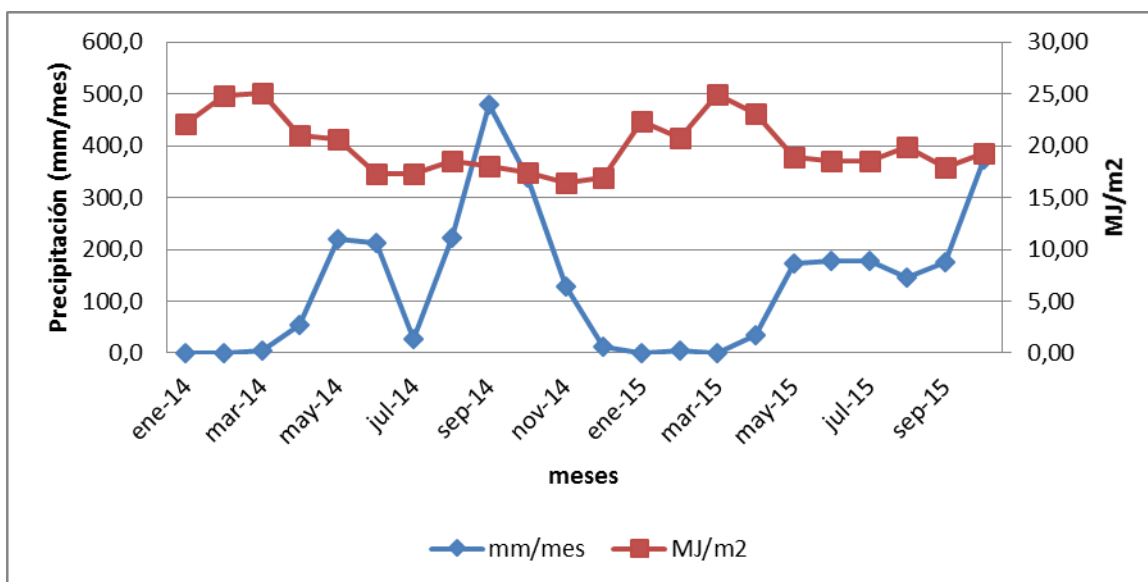


Figura 5. Precipitación media mensual (mm/mes) y radiación promedio (MJ/m²) de la estación meteorológica del IMN, ubicada en Estación Experimental Fabio Baudrit,.

En estudios realizados en diferentes cultivos se ha visto que para lograr una buena floración y cuajado de frutos, además de los factores climáticos se encuentran otros factores como el control nutricional del cultivo. Se ha visto que el boro es un microelemento importante ya que intervienen en diferentes procesos como son, floración, mejora del tamaño, la fertilidad y la germinación de los granos de polen, crecimiento de los tubos polínicos, aumento del nivel de néctar haciendo las flores más atractivas para las abejas, efecto positivo en el proceso de formación de semillas, y aumento en la calidad de los frutos. De tal forma que aplicaciones de boro junto con molibdeno en los días previos al inicio de la floración ayuda a mejorar la cosecha (Hortocampo, 2012). Por otro lado, dosis bajas de nitrógeno y otros factores nutricionales favorecen la floración (Castro *et al* 2011).

Se ha determinado que la intensidad y la duración de la luz, junto con las variaciones estacionales y fluctuaciones diarias de la temperatura, influyen en la regulación del ciclo de desarrollo de la planta, así como otros factores ambientales y genéticos (Castro *et al*, 2011).

El desarrollo desde la etapa de botón floral hasta la madurez del fruto lleva aproximadamente tres meses (Noor *et al*, 2012) La baja cosecha de frutos se debe a la poca cantidad de flores femeninas por inflorescencia, ya que en promedio se han encontrado que van desde 0-10 femeninas masculinas (Noor *et al*, 2012; Loaiza *et al*, 2012).

BIBLIOGRAFÍA

Arnáez, E.; Moreira, I.; Arias, D.; Hernández, J, Castillo, M.; Herrera, F.; Ureña, A.; Barboza, N.; Lutz, G.; Hernández, E. 2014. Generación de información técnico-científica para el desarrollo del cultivo de *Jatropha curcas* (Tempate) en Costa Rica para su uso como fuente de energía alternativa y mitigación del cambio climático. Informe final de proyecto de investigación con recursos del fondo del Sistema 2011-2013 FEES-CONARE, SAN JOSÉ COSTA RICA. 92.

Bang-Zhen Pan • Zeng-Fu Xu, 2011. Benzyladenine Treatment Significantly Increases the Seed Yield of the Biofuel Plant *Jatropha curcas*. *J Plant Growth Regul* 30:166–174

Castro, I.; Loef, M.; Bartetzko, L.; Searle, I.; Coupland, G.; Stitt, M.; Osuna, D. 2011. Independently of light, gibberellin and autonomous pathways. *Planta*: 233:539–552

De Viana, M. L., Morandini, M. N., Giamminola, E. M., & Diaz, R. (2011). Conservación *ex situ*: un banco de germoplasma de especies nativas. *Lhawet*, 1, 35-41.

Fumero, Y., Moreno, MS., Corsano, G., Montagna, JM. 2016. A multiproduct batch plant design model incorporating production planning and scheduling decisions under a multiperiod scenario. *Applied Mathematical Modelling* 40: 3498–351. DOI 10.1016/j.apm.2015.09.046

Galetto, L.; Fioni, A. Calviño, A. 2002. Éxito reproductivo y calidad de los frutos en poblaciones del extremo sur de la distribución de *Ipomoea purpurea* (Convolvulaceae). *Darwiniana* 40(1-4): 25-32

Hortocampo 2012. El Boro: clave para una buena floración. Hortocampo soluciones para el mundo agrícola. Consultado 03/03/2016. El boro clave Hortocampo.htm

Lindner, R. 2011. Influencia del sol y de la sombra sobre el crecimiento y desarrollo en poblaciones de *Dactylis glomerata* L. PASTOS. 376-382.

Loaiza, J; Arnáez, E; Moreira, I; Herrera, F; Ureña, A; Hernández, J. 2012. Guía técnica para el establecimiento y producción de *Jatropha curcas* (tempate) en Costa Rica. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 90 p.

McCormack, ML., Gaine, KP., Pastore, M., Eissenstant, DM. 2015. Early season root production in relation to leaf production among six diverse temperate tree species. Plant Soil 389:121-129. DOI 10.1007/s11104-014-2347-7

Montaldo, N. 2000. Éxito reproductivo de plantas ornitócoras en un relicto de selva subtropical en Argentina. Revista Chilena de Historia Natural. 73(3): 511-524

Navarro, L.; Rosas, C.; Ayensa, G. 2000. Recompensas florales y éxito reproductivo. Portugaliae Acta Biol. 19: 121-126

Noor Camellia, N. A., Thohirah, L. A.*, and Abdullah, N. A. P. 2012. Floral Biology, Flowering Behaviour and Fruit Set Development of *Jatropha curcas* L. in Malaysia. J. Trop. Agric. Sci. 35 (4): 739 - 748 (2012)

Ramírez, V.; Arcila, J.; Jaramillo, A.; Rendón, J.; Cuesta, G.; Meza, H.; Mejía, C.; Montoya, D.; Mejía, J.; Torres, J.; Sánchez, P.; Baute, J.; Peña, A. 2010. Floración del café en Colombia y su relación con la disponibilidad hídrica, térmica y de Brillo Solar. CENICAFE. Sp

Wu, Sh. 2011. The extraordinary Collapse of *Jatropha* as a Global Biofuel. Environmental Science and Technology. [Dx.doi.org/10.1021/es201943v](https://doi.org/10.1021/es201943v)

Se agradece al PhD. Charles Aker como coordinador general del proyecto, por su apoyo técnico y gestiones para la búsqueda de financiamiento externo, en la propuesta presentada por Costa Rica, México, Nicaragua, Colombia y Brasil, cuyo nombre es: "Regulation of the flowering of *Jatropha curcas* to improve the sustainability of biofuel feedstock production by farmers in Latin America and the Caribbean" aprobado por LAC-Brasil.

También expresamos nuestro agradecimiento al PhD. Werner Rodríguez, Director de la Estación Experimental Fabio Baudrit y al Ingeniero Jesús Hernández (Convenio MAG-UCR), por su apoyo técnico y en la logística de los ensayos.

Anexo 5

Uso de podas en el manejo agrícola de *Jatropha curcas* (tempate) sobre la expresión floral de la planta, en Costa Rica.

Ileana Moreira²; imoreira@itcr.ac.cr
Elizabeth Arnaez²; earnaez@itcr.ac.cr
Marvin Castillo¹; mcastillo@itcr.ac.cr
Elemer Briceño Elizondo¹; ebriceno@itcr.ac.cr
Dagoberto Arias Aguilar¹; darias@itcr.ac.cr

1: Forest Engineering School, Instituto Tecnológico de Costa Rica

2: Biology School, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Address: 800m South of "Basílica de Los Ángeles", Cartago, Costa Rica

PO box: 159-7050 Cartago, Costa Rica; Phone: +506-25509146.

RESUMEN

La especie *Jatropha curcas* (tempate) es típica de la zona mesoamericana, su centro de origen se ha establecido en México. Ha sido domesticada para uso cercas vivas y por su valor medicinal según el conocimiento tradicional. En la actualidad que se cataloga como una especie de alto valor para la producción de aceites que pueden tener uso en biocombustibles o como diluyente de pinturas. En Costa Rica desde el año 2005 se han iniciado estudios para lograr una domesticación favorable para la utilización de esta especie en cultivos agroenergéticos en alternancia con algún cultivo agroalimentario. Sin embargo, los procesos de manejo del cultivo aún son incipientes y se debe profundizar en este tema para lograr una cosecha de mayor valor económico. En la Estación Fabio Baudrit se estableció una plantación proveniente de semilla de la variedad Comayagua y se estableció un ensayo de bloques al azar a los que se le dio un seguimiento estricto en longitud para aplicar una primera poda a los 40 cm y posteriormente un seguimiento a las ramas hasta que inicie la floración y la cosecha. La producción de frutos verdes se comportó de manera similar a la producción de inflorescencias y flores femeninas. Las plantas podadas no mostraron una diferencia significativa de producción de frutos en el primer año, pero en el segundo año, superan a las plantas no podadas.

Palabras claves: Podas, expresión floral, *Jatropha curcas*, tempate

INTRODUCCIÓN

Los cultivos para biocombustibles consideran un amplio espectro de especies, que presentan sus diferencias en cuanto a productividad, calidad del aceite, adaptación al cambio climático y la oferta de otros servicios ecosistémicos, por ejemplo la capacidad para el aumento y

mantenimiento del secuestro de carbono (C) fijado en la biomasa y en el suelo. Las proyecciones para Costa Rica anticipan que ante un escenario creciente de demanda energética, las fuentes tradicionales de energías limpias del país no podrán crecer más a partir del 2032. Por lo que se deben estimular los estudios de especies como la *Jatropha curcas* (tempate) que por ser una especie de origen mesoamericano tiene un gran potencial en este campo además de que la calidad de su aceite la hace ser una especie promisoría en este campo.

En Costa Rica el Programa Nacional de Biocombustibles tiene como objetivo desarrollar una industria de biocombustibles que contribuya a la seguridad y eficiencia energética, la mitigación al cambio climático, la reactivación del sector agrícola y el desarrollo socioeconómico tanto local como nacional (Programa Nacional de Biocombustibles, 2008). Dentro de su plan de acción cuenta con una propuesta de modelo de sostenibilidad ambiental que permita el desarrollo de diferentes fuentes agrícolas para la producción de biocombustibles y biomasa. De ahí que dentro del Programa Nacional de Biocombustibles (2008) se cuenta con una propuesta de áreas potenciales de siembra para algunos de los cultivos bioenergéticos seleccionados, según tipo de suelo, altitud y otros, así como lineamientos para la vinculación con la empresa, industrialización, comercialización y mercadeo.

Durante los últimos 6 años, un grupo de investigadores interdisciplinarios de las universidades estatales del país han venido realizando estudios sistemáticos sobre el cultivo de *Jatropha curcas* (Tempate) (Loaiza *et al*, 2012) para su uso comercial como fuente de aceite para producir biodiesel.

Los estudios sobre la domesticación de tempate se han realizado con la colaboración de empresarios y agricultores se ha incursionado en la siembra de *Jatropha*, la cual es utilizada como cerca viva, o en pequeñas plantaciones para la obtención de semillas. Una de las limitantes más significativas a nivel mundial es la carencia de variedades mejoradas de alto rendimiento y la falta de sincronía floral y la irregularidad en la producción de frutos.

A nivel mundial existe mucho interés en el tempate (*Jatropha curcas*) como plantas oleaginosas por su uso como fuente de energía (Jongschaap *et al*. 2007, Chikara *et al*. 2013, Montes *et al*. 2013, Martin y Montes 2014; Programa Nacional de Biocombustibles, 2008), ya que las buenas características del aceite se pueden aprovechar para la producción de biodiesel. El aceite también se usa como base para la fabricación de jabón. Los residuos del prensado de las semillas es un buen fertilizante y también se puede utilizar para la producción de biogás (FACT 2010). Esta especie oleaginosa, se caracteriza por su resistencia a la sequía, es de rápido crecimiento, la propagación es fácil y el ciclo de vida es corto (Jongschaap *et al*. 2007; Kumar y Singh 2014; Loaiza *et al* 2012; MAG, 1991). Su productividad depende de factores propios de la planta tales como la distribución de la materia seca, la proporción de flores femeninas/masculinas, el tamaño y peso de la semilla, el contenido de aceite en la semillas, la calidad del aceite, la toxicidad, la inducción floral y la sincronía floral. Algunos otros factores se ven afectados por el sitio de siembra tales como la cantidad de ramas, la cantidad de flores, la cantidad de frutos y la cantidad de semillas (Chikara *et al*. 2013). Estos factores están fuertemente influenciados por los efectos ambientales y genéticos, los sitios adecuados para la siembra y las técnicas de manejo agronómico apropiadas para el cultivo (Martin y Montes 2014). En lo que respecta al efecto genético, los ensayos de procedencias y los estudios con marcadores moleculares han demostrado baja variabilidad genética (FACT 2010, Chikara *et al*. 2013 Montes Osorio *et al*. 2014; Yi *et al*. 2014). El estudio

tiene como fin establecer un método de podas que le asegure al productor un cultivo de *Jatropha curcas* (tempate) potencialmente rentable.

El objetivo del trabajo fue analizar la influencia del uso de podas en el manejo agrícola en *Jatropha curcas* sobre la expresión floral.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se estableció en la Estación Experimental Fabio Baudrit, en la Garita de Alajuela, Costa Rica situada a 800 msnm, en octubre del año 2013. El suelo fue preparado con maquinaria agrícola (arado, rastreado y alomillado). Se sembraron 80 semillas de la accesión Comayagua de manera directa y a una distancia de 4 metros entre hileras y 4 metros entre plantas. Se mantuvo el riego dos veces a la semana hasta enero del 2014 y a partir de febrero de ese mismo año una vez por semana hasta la finalización del experimento. Se sustituyeron las plantas muertas por otras de la misma edad que se encontraban en el invernadero. Se sembraron plantas de tempate alrededor de todo en ensayo para eliminar el efecto de borde. En las primeras etapas se aplicó una deshierba en forma manual, pero cuando las plantas tuvieron una altura de 40 cm se procede a usar motoguaraña.

En febrero del 2014 se estableció un diseño experimental bifactorial con bloques completos al azar y 4 repeticiones, distinguiendo cada bloque con su debida identificación. Tratamiento 1 y 2 corresponde a plantas que fueron podadas y 3 y 4 no podadas (Fig. 1). A partir de ese momento se midió la altura en todas las plantas, se podó el bloque correspondiente cuando la planta alcanzó una altura de 40 cm y lo mismo cuando las ramas producto de esta poda alcanzaron los 50 cm. A partir de esta última poda se esperó que se diera la floración y fructificación para realizar así la primera poda de formación dejando la planta con un tamaño máximo de 1.30 m (Fig. 2). Se llevó el conteo de inflorescencias, número de flores femeninas, frutos verdes y maduros, de los frutos cosechados se contó el número de semillas y se midió el peso fresco y seco de las mismas.

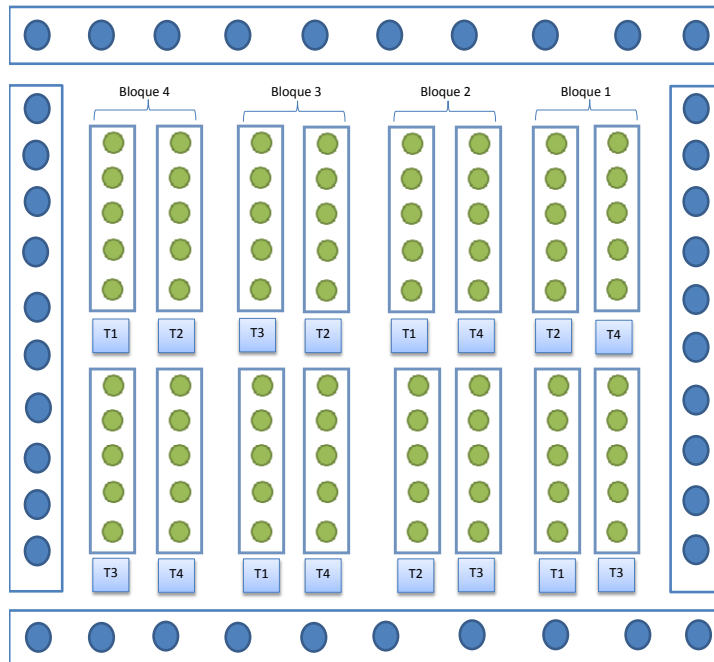


Figura 1: Mapa del diseño de ^{Calle} distribución del ensayo de podas en *Jatropha curcas*.



Figura 2. Plantas en la segunda poda a 1,3 m de altura.

Se utilizaron los datos de las fechas con mayor productividad de frutos verdes, inflorescencias y flores femeninas tanto del primer como segundo semestre del 2014 y 2015; los resultados obtenidos de los cuatro tratamientos se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) siguiendo un diseño experimental de bloques al azar en el cual se valoraron si existían diferencias entre bloques (para descartar significancias en los resultados por esta variable) y diferencias entre tratamientos; en caso encontrar diferencias se realizó la prueba de Tukey a una significancia de 0,05; en cuanto al crecimiento se realizó para cada fecha nuevamente una ANOVA para definir diferenciaciones en tratamientos en cuanto crecimiento. Las pruebas se realizaron con el programa STATISTICA 9.0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tasa de crecimiento de las plantas fue de 1 cm por semana en las primeras etapas, la floración se produjo 7 meses después de la siembra, realizada en noviembre de 2013.

No hubo diferencias significativas del crecimiento de las plantas de tempate en el tiempo, pero no se evaluó el crecimiento en el año 2015, ya que al realizar la poda se produce una pérdida en el crecimiento, y estas plantas deben iniciar su crecimiento a partir del punto de poda (Fig. 3).

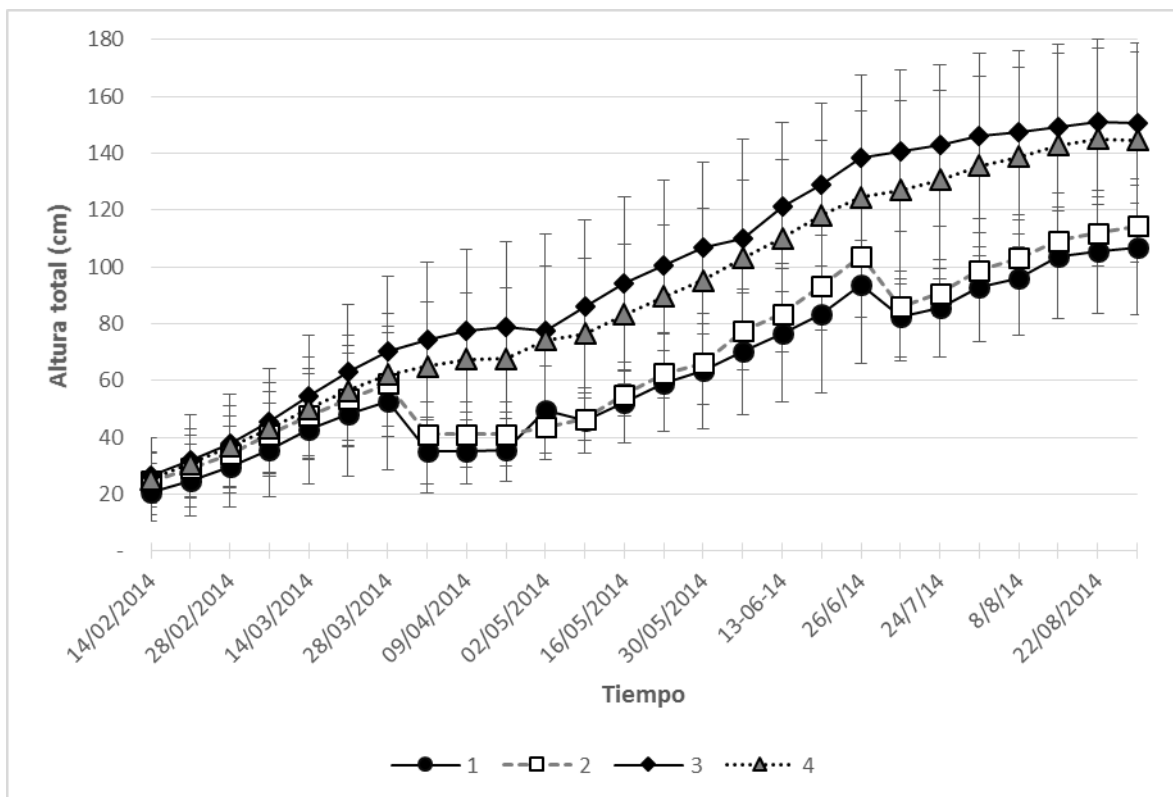


Figura 3. Crecimiento vegetativo promedio en altura de plantas de tempate, 2014

A continuación se muestra en la figura 4, el número de inflorescencias promedio por planta según tratamiento, donde se observa que durante las dos primeras cosechas los tratamiento 1 y 2 no se observaron inflorescencias, ya que al podar las plantas se sometía la planta a stress y la misma concentraba su crecimiento en ramas y hojas, no en la producción de inflorescencias.

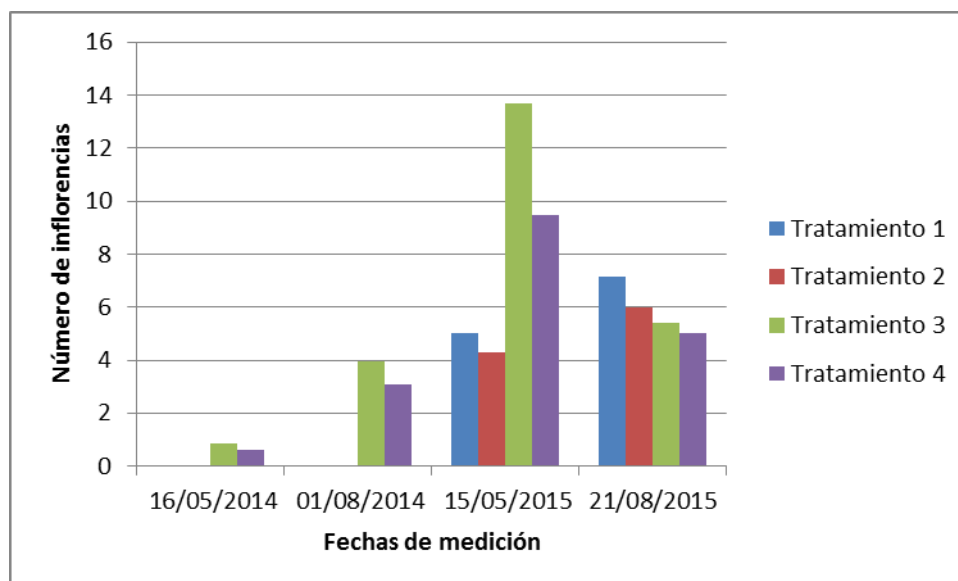


Figura 4. Número de inflorescencias promedio, según tratamiento en el ensayo de podas.

De lo observado se puede indicar que la producción de inflorescencias en mayo del 2015 fue superior a la reportada en agosto de ese mismo año, pero los tratamientos 1 y 2 lograron aumentar su productividad.

A continuación se muestra el análisis de varianza realizado para las fechas donde se presentaron los valores máximos de producción de inflorescencias (Cuadro 1).

Cuadro 1. Análisis de varianza para la producción de inflorescencias por hectárea en el ensayo de podas en *Jatropha curcas*.

TRATAMIENTO	16/05/2014	01/08/2014	15/05/2015	21/08/2015
1	0 A (0)	0 A (0)	8000 A (1973)	11413 A (1327)
2	0 A (0)	0 A (0)	6827 A (1794)	9600 A (5431)
3	1387 B (465)	6293 B (960)	21867 A (5490)	8640 A (4049)
4	960 B (325)	4907 B (959)	15147 A (5435)	8000 A (4401)

*Tratamientos 1 y 2 en la dos primeras fechas fueron podadas por lo que no tienen datos de producción.
LETRAS IGUALES SIGNIFICA QUE NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE TRATAMIENTOS

Las plantas podadas producen pocos frutos en la primera cosecha sin embargo las plantas de los tratamientos 3 y 4 que no fueron podadas producen más flores femeninas y más frutos ya que no se interrumpe su crecimiento. (Fig.5).

En análisis de los datos muestran que hubo diferencias significativas en la producción de inflorescencias únicamente en los dos primeros periodos de floración entre tratamientos, no así entre bloques (Cuadro 2). Se evidencia que las plantas no podadas en las primeras etapas de crecimiento producen una mayor cantidad de inflorescencias por hectárea, pero que conforme la planta va creciendo esta diferencia deja de ser evidente. Lo cual puede deberse a que las plantas

tienen los nutrientes necesarios acumulados por el proceso de fotosíntesis que proporcionan el vigor de las primeras hojas, se determinó que un promedio de 27 hojas por rama son suficientes para soportar la aparición de los primeros brotes florales.

La figura 5, muestra el promedio de flores femeninas producidas por planta, en la misma se muestra que en las plantas podadas no presentan flores femeninas en el primer año de crecimiento, pero va en aumento y superan a las plantas no podadas en el segundo año.

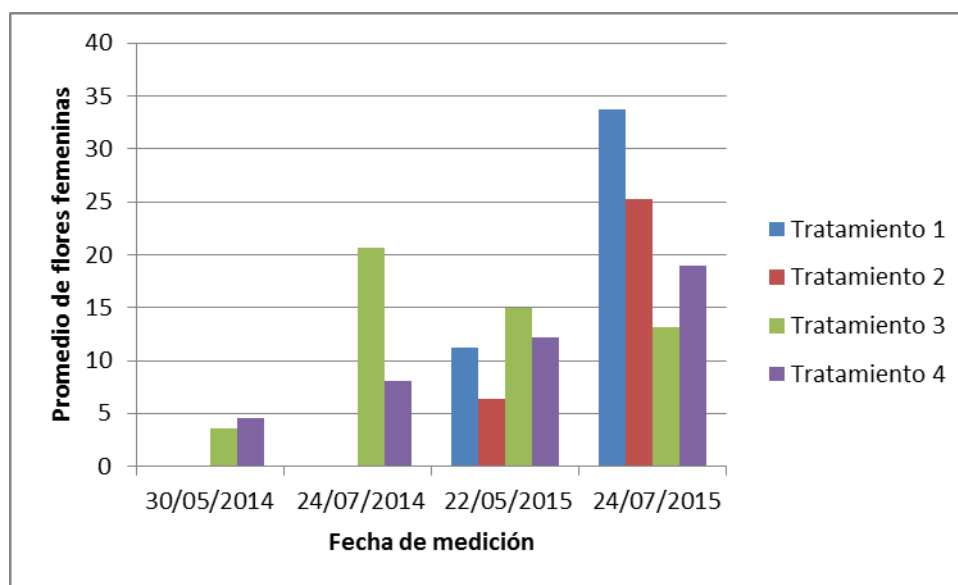


Figura 5. Número de flores femeninas promedio, según tratamiento en el ensayo de podas.

El comportamiento de las plantas y su respuesta al tratamiento varía en la aparición de flores femeninas en el tiempo, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en las dos primeras y última fecha de floración y no así en la tercera (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de varianza para la producción de flores femeninas por hectárea en el ensayo de podas en *Jatropha curcas*.

TRATAMIENTO	30/05/2014	24/07/2014	22/05/2015	24/07/2015
1	0 A (0)	0 A (0)	18027 A (15381)	53973 A (14432)
2	0 A (0)	0 A (0)	10133 A (11535)	40427 A (12192)
3	5653 B (1771)	32960 B (4848)	24000 A (14971)	21013 B (19775)
4	7253 B (6285)	12907 B (7203)	19520 A (13918)	30293 B (15497)

LETRAS IGUALES SIGNIFICA QUE NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE TRATAMIENTOS

La producción de frutos verdes se comporta similar a la producción de inflorescencias y flores, donde en el primer año, las plantas podadas no muestran una gran producción de frutos, pero en el segundo año, superan a las plantas no podadas (Fig. 6).

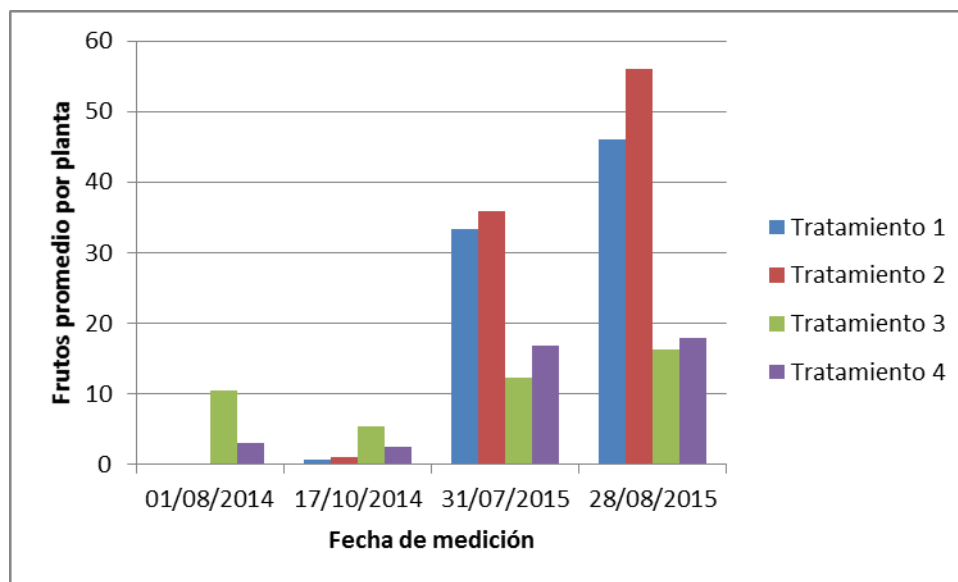


Figura 6. Número de frutos verdes promedio, según tratamiento en el ensayo de podas.

En cuanto a la producción de frutos se muestran diferencias significativas entre tratamientos y no entre bloques (Cuadro 3), y las diferencias varían a lo largo del tiempo ya que la respuesta de las plantas podadas se empieza a observar en el segundo año de crecimiento.

Cuadro 3. Análisis de varianza para la producción de flores femeninas por hectárea en el ensayo de podas en *Jatropha curcas*.

TRATAMIENTO	01/08/2014	17/10/2014	31/07/2015	28/08/2015
1	213 A (106)	1173 A (1056)	53333 B (3331)	73600 B (10560)
2	0 A (0)	1706 A (1100)	57493 B (2544)	89706 B (9874)
3	16640 B (2533)	8533 B (2410)	19627 A (5049)	26027 A (4018)
4	4800 A (1056)	4053 AB (1489)	26880 A (7410)	28693 A (4104)

LETRAS IGUALES SIGNIFICA QUE NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE TRATAMIENTOS

A continuación se muestra los valores de precipitación promedio mensual (mm/mes) y la radiación promedio (MJ/m²), obtenidos de la estación meteorológica ubicada en la Estación Experimental Fabio Baudrit del Instituto Meteorológico Nacional (IMN), como se observa los valores de mayor radiación se dan durante los meses de febrero, marzo, mientras que para el año 2015, estos valores se obtienen en los meses de marzo, abril. Para la precipitación se observa una disminución en el mes de julio 2014 y enero marzo del 2015. Se presenta un pico en el mes de setiembre de 2014 (Fig.7)

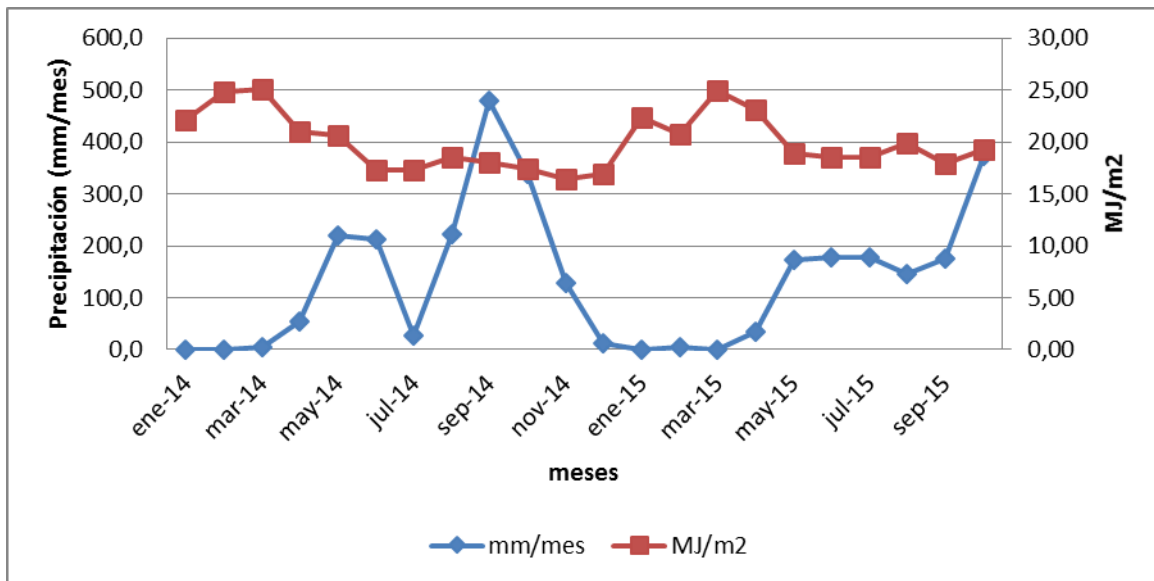


Figura 7. Precipitación media mensual (mm/mes) y radiación promedio (MJ/m²) de la estación meteorológica del IMN, ubicada en Estación Experimental Fabio Baudrit.

BIBLIOGRAFÍA

- Chikara, J; Prakash, A; Mastan, S; Ghosh, A. . 2013. *Jatropha*, Challenges for a New Energy Crop. *Jatropha*, Challenges for a New Energy Crop. New York, USA, Springer Science+Business Media, v.2, p.119-133.
- FACT. . 2010. *The Jatropha Handbook: from cultivation to application*. Eindhoven, The Netherlands, FACT Foundation, p.172.
- King, AJ; Montes, LR; Clarke, JG; Affleck, J; Li, Y; Witsenboer, H; van der Vossen, E; van der Linde, P; Tripathi, Y; Tavares, E; Shukla, P; Rajasekaran, T; van Loo, EN; Graham, I a. . 2013. Linkage mapping in the oilseed crop *jatropha curcas* L. reveals a locus controlling the biosynthesis of phorbol esters which cause seed toxicity. *Plant Biotechnology Journal* 11: 986-996.
- Kumar, S; Singh, S. . 2014. Variability assessment of seed traits in *Jatropha curcas* L. for improvement of oil yield. *International Journal of Genetics and Molecular Biology* 6(January): 8-15.
- Loaiza, J; Arnáez, E; Moreira, E; Herrera, F; Ureña, A; J, H. . 2012. *Guía técnica para el establecimiento y producción de Jatropha curcas (tempate) en Costa Rica*. Cartago, Costa Rica, Editorial Tecnológica de Costa Rica, p.92. .

Martin, M; Montes, JM. . 2014. Quantitative genetic parameters of agronomic and quality traits in a global germplasm collection reveal excellent breeding perspectives for *Jatropha curcas* L. *GCB Bioenergy* 2014.

Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) 1991. Aspectos Técnicos sobre Cuarenta y Cinco Cultivos Agrícolas de Costa Rica. Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica.

Montes, JM; Technow, F; Bohlinger, B; Becker, K. . 2013. Seed quality diversity, trait associations and grouping of accessions in *Jatropha curcas* L. *Industrial Crops and Products* 51: 178-185.

Montes Osorio, LR; Torres Salvador, AF; Jongschaap, REE; Azurdía Perez, CA; Berduo Sandoval, JE; Trindade, LM; Visser, RGF; van Loo, EN. . 2014. High level of molecular and phenotypic biodiversity in *Jatropha curcas* from Central America compared to Africa, Asia and South America. *BMC plant biology* 14(1): 77.

Programa Nacional de Biocombustibles. 2008. PROGRAMA NACIONAL DE BIOCOMBUSTIBLES. República de Costa Rica. Ministerio del Ambiente y Energía. Ministerio de Agricultura y Ganadería.

Se agradece al PhD. Charles Aker como coordinador general del proyecto, por su apoyo técnico y gestiones para la búsqueda de financiamiento externo, en la propuesta presentada por Costa Rica, México, Nicaragua, Colombia y Brasil, cuyo nombre es: "Regulation of the flowering of *Jatropha curcas* to improve the sustainability of biofuel feedstock production by farmers in Latin America and the Caribbean" aprobado por LAC-Brasil.

También expresamos nuestro agradecimiento al PhD. Werner Rodríguez, Director de la Estación Experimental Fabio Baudrit y al Ingeniero Jesús Hernández (Convenio MAG-UCR), por su apoyo técnico y en la logística de los ensayos.