



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Dottorato di Ricerca in
Scienze Agrarie e Ambientali

CICLO XXVI

COORDINATORE Prof. Stefano Mancuso

Jatropha curcas L.: caratterizzazione e
miglioramento genetico finalizzato alla coltivazione
in Madagascar

Settore Scientifico Disciplinare / AGR02

Dottorando

Dott.ssa Valenzi Elena

Tutore

Dott. Palchetti Enrico

Anni 2011/2013

“Gli alberi proiettavano sull’erba scura strisce d’ombra
e in quest’ora aranciata della sera
gli eucalipti sembravano fluttuare sul terreno
come mongolfiere ancorate agli ormeggi.”

Bruce Chatwin *Le vie dei canti*

Alla mia famiglia

Negli ultimi anni *Jatropha curcas* L. è riuscita ad attrarre molto interesse come coltura tropicale per fini bioenergetici dando il via a numerosi investimenti e ad una rapida espansione delle aree dedicate alla sua coltivazione. Nonostante la pianta sia stata introdotta in molti Paesi di Asia, Africa e America latina, varietà migliorate con tratti desiderabili per specifiche condizioni di crescita non sono disponibili ed ancora oggi sappiamo molto poco sulle proprietà genetiche di questa specie. La soluzione più indicata per ovviare a queste problematiche, che rendono la coltivazione di *Jatropha* un'attività non molto sicura in termini produttivi, è la creazione di semente selezionata appositamente per l'area di progetto, avvalendosi sia del materiale locale (germoplasma locale), sia del germoplasma di altra provenienza geografica.

Con questa ricerca è stato possibile dare il via ad un programma di miglioramento genetico di *J. curcas* specifico per il Madagascar. Cuore del progetto è lo studio e la caratterizzazione del germoplasma di *J. curcas*, sia proveniente dalla zona di interesse, sia relativo a diverse provenienze worldwide, disponibili grazie alla collezione presente presso la Facoltà di Agraria di Firenze. La caratterizzazione è stata condotta sotto più profili: genetico, morfologico e produttivo, in modo da individuare i genotipi migliori per il lavoro di selezione. Per realizzare questo obiettivo è stato raccolto e collezionato germoplasma di *J. curcas* in diverse aree del Madagascar, quindi sottoposto ad analisi di variabilità genetica. In seguito campi sperimentali di breeding sono stati realizzati sia utilizzando talee (piante madri) e semi (fam. Half Sib) del materiale locale, sia utilizzando piante della collezione worldwide.

Dai dati ottenuti da questi tre anni di sperimentazione, è stato quindi possibile ricavare gli strumenti per poter effettuare una selezione del materiale genetico tale da:

- Sviluppare una congrua ed efficace selezione del materiale più promettente: si è difatti proceduto ad una moltiplicazione clonale degli individui che hanno presentato le migliori caratteristiche sia della pianta madre che della famiglia Half Sib ottenuta, quando possibile.
- Individuare il North Carolina II come mating design più adatto per combinare gli individui definiti migliori dalle analisi e stimare la loro attitudine combinatoria generale e specifica.
- Utilizzare, nella costituzione di nuove varietà (Open Pollinated Varieties) di *J. curcas* anche materiale derivante dalla collezione worldwide per introdurre o aumentare la frequenza di alleli utili non presenti nel germoplasma malgascio.

Attualmente presso l'azienda sperimentale di Satrokala (Madagascar) vengono svolte le attività di breeding basate sui risultati della presente caratterizzazione; più precisamente:

- incroci programmati secondo il Modello North Carolina II sulle piante madri più promettenti;
- incroci diallelici sugli individui più rappresentativi delle migliori famiglie Half Sib (impiegati come femmine) e miscugli di polline delle piante di altre famiglie Half Sib selezionate (impiegati come maschi);
- incroci diallelici sugli individui selezionati della collezione worldwide;
- impianto di appezzamenti sperimentali atti a valutare le progenie delle piante della collezione worldwide che hanno prodotto nel corso dello scorso anno;
- impianto di appezzamenti realizzati con cloni (talee) di piante selezionate della collezione e delle piante madri.

In recent years, *Jatropha curcas* L. has attracted much interest as a tropical energy crop for bioenergy purposes, thereby giving way to a lot of investment and a rapid expansion of areas devoted to cultivation. Although the plant has been introduced into many countries in Asia, Africa and Latin America, improved varieties with desirable traits for specific growing conditions are not yet available. Moreover, very little is known about the genetic properties of this species. The best solution to overcome these problems, which also renders the cultivation of *Jatropha* unsafe in terms of production, is the production of seeds, specially selected for the project area, making use of both the local material (local germplasm) and germplasm from other geographical origins .

With the present research, it was possible to initiate a program of genetic improvement of *J. curcas* specific for Madagascar. Central to the project, is the study and characterization *J. curcas* germplasm, both from the area of interest and that derived from different origins worldwide, made available by the collection at the Faculty of Agriculture of Florence. The characterization was conducted under the following profiles: genetic, morphological and productive. The objective was to identify the best genotypes for the selection work. To achieve this goal, *J. curcas* germplasm was collected in various areas of Madagascar and then subjected to genetic variability analyses. Thereafter, experimental breeding fields were generated from the use of cuttings (mother plants) and seeds (Fam. Half Sib), both from the local material, and from the use of plants belonging to the global collection.

From the data obtained from the three years of experimentation, it was then possible to derive the tools to make a selection of the genetic material that has permitted the following:

- the development of a fair and effective selection of the most promising material: currently a clonal multiplication is underway of the individuals that showed the best features, both from the mother plant and from the Half Sib family obtained, whenever possible.
- the identification of the North Carolina II mating design as the most suitable in combining the best individuals as characterized by the analyses, and to estimate their general and specific combining ability.
- the creation of new *J. curcas* varieties (open pollinated Varieties) using material from the global collection to introduce or increase the frequency of alleles not present in the Madagascar germplasm.

Currently at the experimental farm in Satrokala (Madagascar), breeding activities are being conducted based on the results of this characterization, namely:

- crosses programmed, based on the North Carolina Model II system, on the most promising parent plants;
- diallelic crossings on the individuals most representative of the best Half Sib families (used as females) and mixtures of pollen from plants of Half Sib selected families (used as males) ;
- diallelic crossings on selected individuals from the global collection;
- formation of experimental plots to assess the progeny of the plants in the global collection which were productive in the previous year;
- formation of plant plots made with clones (cuttings) of selected plants from the collection and mother plants.

Cap. 1 - INTRODUZIONE	1
1.1 I BIOCARBURANTI	1
1.2 IL BIODIESEL	5
1.2.1 La tecnica di produzione del biodiesel	6
1.2.2 Normativa Comunitaria e prospettive	10
1.3 JATROPHA CURCAS L.	13
1.3.1 Classificazione, origine e diffusione	13
1.3.2 Caratteristiche botaniche	15
1.3.3 Caratteristiche ecologiche	17
1.3.4 Propagazione e caratteristiche agronomiche	18
1.3.5 Raccolta	21
1.3.6 Avversità	22
1.3.7 Estrazione dell'olio dai semi	23
1.3.8 Composizione in acidi grassi e caratteristiche dell'olio di <i>Jatropha curcas</i>	24
1.4 MIGLIORAMENTO GENETICO E TECNICHE DI BREEDING PER JATROPHA CURCAS L.	26
1.4.1 Breeding di <i>Jatropha curcas</i> L.: stato dell'arte e problematiche	26
1.4.2 Miglioramento genetico per popolazioni	28
1.4.3 Risorse genetiche disponibili per velocizzare le tecniche di breeding	29
1.4.3.1 Marcatori molecolari e miglioramento genetico: evoluzione ed applicazione	30
1.4.3.2 Marcatori SSR (Simple Sequence Repeat)	32
1.5 DESCRIZIONE DELL'AREA DI PROGETTO	34
1.5.1 Inquadramento geografico e morfologico	34
1.5.2 Clima	34
1.5.3 Economia	36
1.5.4 L'altopiano di Ihorombé	37
1.6 IL PROGETTO DELLA TOZZI GREEN S.R.L.	40
1.7 SCOPO DELLA TESI	41
Cap. 2 - MATERIALI E METODI	42
2.1. COLLEZIONE DI J. CURCAS WORLDWIDE E ALLESTIMENTO CAMPO SPERIMENTALE (CLZ)	42
2.2 COLLEZIONE DEL GERMOPLASMA MALGASCIO E ALLESTIMENTO CAMPI SPERIMENTALI	44
2.2.1 Procedura per l'individuazione del sito di prelievo PM	46
2.2.2 Classificazione GPS e attribuzione del codice di identificazione pianta	47
2.2.3 Procedura di campionamento	48
2.3 ALLESTIMENTO DEI CAMPI SPERIMENTALI DI GERMOPLASMA MALGASCIO	49
2.3.1 Campo di mantenimento dei cloni delle PM	49
2.3.2 Campo di valutazione della progenie Half Sib	50
2.4 RACCOLTA DATI NEI CAMPI SPERIMENTALI	52

2.5 SCHEMI DI MIGLIORAMENTO GENETICO	54
2.5.1 Stima della varianza additiva tra progenie HSib	56
2.5.2 Produzione e breeding delle piante madri (Generazione Ramet)	56
2.5.3 Costruzione delle griglie di valutazione	56
2.5.4 Produzione di Open Pollination Varieties (OPV)	58
2.6 PRODUZIONE DI IBRIDI INTER-SPECIFICI (Hybrid Creation - HC)	59
2.7 CARATTERIZZAZIONE GENETICA DEL GERMOPLASMA DI <i>JATROPHA CURCAS</i> PROVENIENTE DAL MADAGASCAR	61
2.7.1 Germinazione dei semi e preparazione dei tessuti per l'estrazione del DNA	61
2.7.2 Estrazione e quantificazione del DNA genomico	61
2.7.3 Amplificazione PCR delle zone SSR	62
2.7.3.1 Reazione a catena della polimerasi (PCR)	62
2.7.3.2 Componenti della reazione di amplificazione	63
2.7.3.3 Reazione di amplificazione dei campioni in esame	64
2.7.4 Separazione e dimensionamento dei frammenti amplificati	65
2.7.4.1 Elettroforesi su gel di agarosio	66
2.7.4.2 Elettroforesi su gel capillare	67
2.7.4.3 Elettroforesi su gel di agarosio dei campioni in esame	68
2.8 CARATTERIZZAZIONE DELL'OLIO DI <i>JATROPHA CURCAS</i> PROVENIENTE DAL MADAGASCAR	70
Cap. 3 - RISULTATI E DISCUSSIONI	71
3.1 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEL GERMOPLASMA MALGASCIO DI <i>J. CURCAS</i>	71
3.2 CARATTERIZZAZIONE DELLE PIANTE DELLA COLLEZIONE WORLDWIDE – CLZ	72
3.2.1. Dati morfologici relativi alla sperimentazione sulle piante della Collezione – CLZ	72
3.2.1.1 Correzione dei dati per posizione spaziale e analisi statistica	72
3.2.2 Discussione dei dati produttivi relativi alle piante della Collezione - CLZ	79
3.2.3 Analisi delle componenti principali dei dati riguardanti le piante della Collezione - CLZ	81
3.4 CARATTERIZZAZIONE DEL GERMOPLASMA MALGASCIO	86
3.4.1 Dati relativi alla sperimentazione sulle piante madri - PM	86
3.4.1.1 Discussione dei dati morfologici relativi alle piante madri	86
3.4.1.2 Discussione dei dati produttivi relativi alle piante madri	91
3.4.2 Dati relativi alla sperimentazione sulle piante Half Sib – HSib	93
3.4.2.1 Analisi statistica dei dati provenienti dai campi sperimentali Half Sib	93
3.4.2.2 Analisi delle correlazioni semplici entro famiglie Half Sib	96
3.4.2.3 Discussione dei dati morfologici relativi agli Half Sib	97
3.5 DISCUSSIONE DEI DATI GENETICI, MORFOLOGICI E PRODUTTIVI	105
Cap. 4 – CONCLUSIONI	108
BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA	111

Cap. 1 - INTRODUZIONE

1.1 I BIOCARBURANTI

In un'epoca di aumento vertiginoso del prezzo del petrolio e di crescenti preoccupazioni per i cambiamenti climatici, i biocarburanti stanno ricevendo sempre più attenzione da parte di tutti i governi, a livello mondiale, come promettente alternativa ai combustibili fossili. Numerosi studi hanno dimostrato che le emissioni prodotte dalla combustione del petrolio e dai suoi derivati hanno seri effetti sia sull'ambiente sia sulla salute umana (Liquat *et al.* 2012, Mofijur *et al.* 2013) tuttavia è previsto che, se non saranno prese serie misure, le emissioni di gas serra potranno aumentare fino al 39% entro il 2030 (Mofijur *et al.* 2013).

E' ben noto che nell'economia moderna, l'energia ha un ruolo principale nel progresso di tutti i settori, tra cui l'agricoltura, i trasporti, le telecomunicazioni e l'industria e secondo l'International Energy Agency (IEA), nel 2030 il consumo energetico sarà incrementato del 53%.

Oggi il consumo energetico proviene in gran parte da combustibili fossili, il cui utilizzo rappresenta l'87% del consumo totale, di questi, il greggio, il carbone e il gas naturale risultano essere utilizzati rispettivamente per il 33,06%, 30,34% ed il 23,67%. Questa larga diffusione è principalmente dovuta a caratteristiche di queste sostanze quali la loro disponibilità, adattabilità e l'alta efficienza di combustione (Agarwal et Rajamanoharan 2009). D'altro canto, invece, l'energia nucleare, idroelettrica e da fonti rinnovabili è utilizzata in minima parte rappresentando rispettivamente il 4,88%, il 6,44% e l'1,58% del consumo totale (British Petroleum 2012).

Infine, osservando l'andamento del consumo di carburanti, si nota che esso è cresciuto da 6630 milioni di tonnellate di olio equivalente (Mtoe) nel 1980 a quasi il doppio, 12.2746 Mtoe nel 2011 (British Petroleum 2012), come riportato in Tab. 1.

Fonte	1980		2010		2011	
	Mtoe	%	Mtoe	%	Mtoe	%
Petrolio	2979,8	44,9	4031,9	33,66	4059,1	33,06
Gas naturale	1296,8	27,3	2843,1	23,73	2905,6	23,67
Carbone	1807,9	19,6	3532	29,48	3724,3	30,34
Nucleare	161	2,4	626,3	5,22	599,3	4,88
Energia idroelettrica	384,3	5,8	778,9	6,5	791,5	6,44
Rinnovabili	-	-	165,5	1,38	194,8	1,58
Totale	6629,8		11977,8		12274,6	

Tab. 1 - Consumo di energia a livello globale nel 1980, 2010, 2011 (Mofijur *et al.* 2013)

In accordo con l'Energy Policy Act del 1992 (EPACT, US), il gas naturale, il biodiesel, l'etanolo, l'elettricità ed il metano sono le principali fonti alternative che potranno ridurre il riscaldamento globale, il consumo di combustibili fossili e le emissioni di gas di scarico

(Liquat *et al.* 2010). L'interesse nei biocarburanti è stato determinato da numerosi fattori; iniziando con la prima crisi petrolifera degli anni '70, si è poi accresciuto negli ultimi anni a causa non solo dell'aumento del prezzo del greggio, ma anche per situazioni di crisi geopolitiche e per la riduzione nella fornitura da parte dei Paesi dell'Est di fonti alternative come il gas. Altro aspetto, di carattere ambientale, che ha fortemente inciso sull'uso di fonti energetiche rinnovabili, è stato l'utilizzo indiscriminato dei combustibili fossili. Questo fenomeno è ormai appurato essere tra le principali cause delle piogge acide che stanno provocando danni a migliaia di ettari di foreste boreali (Ritter 2012) inoltre, e non meno gravemente, esso contribuisce ad accentuare in modo sostanziale l'effetto serra, causato dall'aumento della concentrazione di anidride carbonica nell'atmosfera.

Nel corso degli ultimi anni i biocarburanti hanno dunque ricevuto l'attenzione mondiale come risorsa energetica alternativa atta ad arginare il problema della sicurezza energetica: il cambiamento climatico e lo sviluppo di carburanti alternativi che siano rispettosi dell'ambiente, tecnicamente fattibili e localmente fruibili, è diventato obiettivo principale dell'agenda globale (Jia *et al.* 2005).

Per comprendere al meglio il contesto in cui questo lavoro si inserisce, precisiamo la definizione di "biocarburante" e lo stato dell'arte di tali risorse energetiche. Con "biocarburanti" infatti, si designano tutti quei carburanti provenienti dalle biomasse, ovvero da fonti energetiche rinnovabili, distinguendosi così dai carburanti tradizionali che provengono invece da combustibili fossili. Si tratta di una risorsa rinnovabile in quanto, nel corso del processo di produzione e combustione non viene incrementato l'ammontare di CO₂ presente nell'ambiente. L'utilizzo dei biocarburanti accelera semplicemente il ritorno in atmosfera della CO₂ "fissata" dalle piante, con emissioni che rientrano nel normale ciclo del carbonio. In altre parole, a differenza di benzina e diesel, i biocarburanti sono risorse rinnovabili, e teoricamente a emissioni zero, dal momento che i gas serra, emessi quando vengono bruciati, possono essere compensati da quelli assorbiti durante la fase di crescita delle colture dedicate.

L'attenzione crescente nei biocarburanti si è tradotta in un incremento della produzione e del consumo degli stessi (Fig. 1): dall'inizio del secolo, fino al 2011, la produzione mondiale di etanolo è aumentata da 17 a 86,1 miliardi di litri, mentre quella di biodiesel da 0,8 a 21,4 miliardi di litri (REN21 2012).

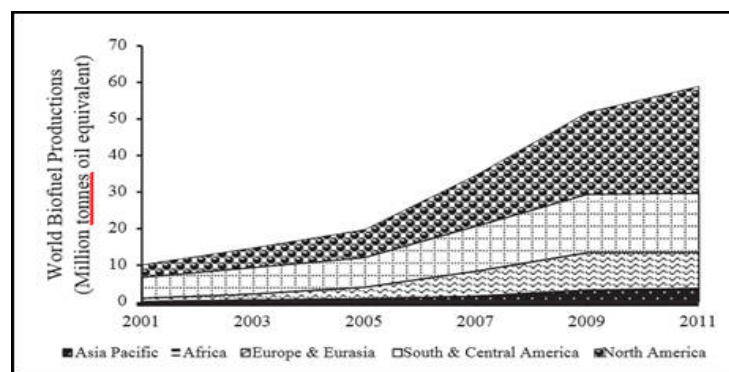


Fig. 1 - Produzione mondiale di biocarburanti in Mtoe (Kumar *et al.* 2013)

Ad oggi i biocombustibili sono sostanze che derivano dalla lavorazione di alcune piante o semi particolari e si dividono principalmente in due tipi:

1 - oleosi, da cui si ricava in prima battuta olio vegetale che può essere sottoposto alla tecnica della transesterificazione per diventare ancora più fluido e creare il biodiesel, utilizzato nei motori a ciclo Diesel;

2 - alcoli che derivano dalla fermentazione di prodotti agricoli ricchi di zuccheri per la creazione del bioetanolo e che possono essere utilizzati nei motori a ciclo Otto.

Il bioetanolo è un alcool (etanolo o alcool etilico) ottenuto mediante un processo di fermentazione di diversi prodotti agricoli ricchi di carboidrati e zuccheri quali i cereali (mais, sorgo, frumento, orzo), le colture zuccherine (bietola e canna da zucchero), frutta, patate e vinacce.

Ma in che modo questa risorsa energetica, che nel corso degli ultimi anni ha sempre più riscontrato l'interesse dell'opinione pubblica, può essere effettivamente una risorsa economica ed ambientale? Spesso infatti il termine "biocarburante" è stato associato al concetto di sostenibilità ambientale, tuttavia, poiché la produzione dei biocombustibili rientra nella logica di mercato, e quindi della massimizzazione del reddito, non sono rari i casi di sfruttamento del terreno per la coltivazione di colture dedicate: a causa di ripetute concimazioni chimiche, di tecniche colturali che dovrebbero essere ormai superate, come la monocoltura, o per l'uso eccessivo di pesticidi e diserbanti, il suolo è impoverito, privato degli elementi della fertilità ed inquinato con sostanze chimiche di difficile rimozione. Per questo, perché i biocarburanti possano considerarsi una risorsa sostenibile, è necessario che fin dal primo step della filiera e dunque dai campi su cui insistono le colture dedicate, sia posta attenzione alla gestione agronomica che deve approntare tecniche che non depauperino il terreno, e che anzi apportino beneficio e, dove possibile, riqualifichino terreni marginali altrimenti non utilizzati dall'agricoltura. Riguardo a quest'ultimo aspetto, una recente ricerca condotta da un team di studiosi della Michigan State University (Gelfand *et al.* 2013), suggerisce che la coltivazione di colture per la produzione di biocarburanti su terreni marginali potrebbe essere molto più utile di quel che finora si sia pensato. Il loro utilizzo, infatti, eliminerebbe il problema delle colture per la produzione di biocarburanti in competizione con quelle per la domanda alimentare. Secondo Phil Robertson, co-autore dello studio, i risultati suggeriscono che le colture provenienti da terreni marginali "potrebbero dare un importante contributo al fabbisogno energetico per il trasporto, fornendo sostanziali benefici al clima."

In secondo luogo, se vogliamo designare i biocarburanti come risorsa energetica sostenibile, occorre riflettere sui progressi che negli ultimi anni la ricerca e la tecnologia hanno apportato ai processi di trasformazione delle materie prime, favorendo la produzione di biocarburanti da materiali che un tempo venivano scartati dalla filiera di produzione agraria. Il primo grande step è avvenuto col passaggio dai biocarburanti di prima generazione a quelli di seconda, che ha reso possibile risparmiare i prodotti commestibili dell'agricoltura, come il mais e lo zucchero di canna utilizzati per la produzione di etanolo. E' stato invece promosso l'utilizzo della materia prima non alimentare, come i residui colturali, la cui cellulosa può essere fermentata in alcol allo stesso modo dei biocarburanti di prima generazione.

Oggi sono in corso di studio biocarburanti di terza e quarta generazione. I primi provengono da processi di ingegneria genetica applicati non solo a colture dedicate, ma anche a colture di microalghe; mentre, i biocarburanti di quarta generazione si ottengono da batteri e da altri organismi geneticamente modificati.

In questo quadro, in cui ricerca e tecnologia si muovono nella direzione di un sempre più rilevante affinamento delle tecniche produttive per ottenere maggiori rendimenti dai materiali di scarto dell'agricoltura, i biocarburanti possono essere dunque una risorsa energetica realmente sostenibile se l'attenzione al concetto di sostenibilità viene ricordato in ogni fase del processo: dalla coltivazione fino all'utilizzo, quanto più razionale, degli stessi.

In ultima analisi occorre tener presente che oggi l'accesso all'energia rinnovabile a prezzi convenienti è riconosciuto quale sfida fondamentale per la riduzione della povertà e per lo sviluppo rurale dei Paesi del Sud del mondo; nondimeno il dibattito sull'impatto ambientale, sociale ed economico della produzione di biocarburanti resta di grande attualità ed interesse.

1.2 IL BIODIESEL

Il biodiesel è un prodotto naturale utilizzabile come carburante in autotrazione e come combustibile nel riscaldamento, con le caratteristiche indicate rispettivamente nelle norme UNI 10946 ed UNI 10947:

- è rinnovabile, in quanto ottenuto dalla coltivazione di piante oleaginose di ampia diffusione;
- è biodegradabile, cioè se disperso si dissolve nell'arco di pochi giorni, mentre gli scarti dei consueti carburanti permangono a lungo;
- garantisce un rendimento energetico pari a quello dei carburanti e dei combustibili minerali ed un'ottima affidabilità nelle prestazioni dei veicoli e degli impianti di riscaldamento;
- si ottiene dalla spremitura di semi oleaginosi di colza, soia, girasole e dalla reazione di transesterificazione che determina la sostituzione dei componenti alcolici d'origine (glicerolo) con alcool metilico (metanolo).
- può essere anche ottenuto da olii vegetali usati. Questo consente di sottrarre definitivamente gli olii vegetali usati dal circuito dell'alimentazione zootecnica o da utilizzi ancora più pericolosi per la salute umana;
- la sua produzione è del tutto ecologica, poiché non presuppone la generazione di residui, o scarti di lavorazione. La reazione di transesterificazione prevede la generazione di glicerina quale "sottoprodotto" nobile dall'elevato valore aggiunto, della quale sono noti molteplici utilizzi;

In confronto con il gasolio, il biodiesel determina numerosi effetti positivi per l'ambiente:

- non contribuisce all'effetto serra poiché restituisce all'aria solo la quantità di anidride carbonica utilizzata dalle colture dedicate, durante la loro crescita;
- riduce le emissioni di monossido di carbonio (-35%) e di idrocarburi incombusti (-20%) emessi nell'atmosfera;
- non contenendo zolfo, il biodiesel non produce una sostanza altamente inquinante come il biossido di zolfo e consente maggiore efficienza alle marmitte catalitiche;
- diminuisce, rispetto al gasolio, la fumosità dei gas di scarico emessi dai motori diesel e dagli impianti di riscaldamento (-70%);
- non contiene sostanze pericolosissime per la salute quali gli idrocarburi aromatici (benzene, toluene ed omologhi) o policiclici aromatici;
- giova al motore grazie ad un superiore potere detergente che previene le incrostazioni;
- non presenta pericoli, come l'autocombustione, durante la fase di trasporto e stoccaggio;
- la sua diffusione determina l'attivazione di un circuito che promuove lo sviluppo di produzioni agricole non destinate alla alimentazione (non food), quindi non generatrici di eccedenze.

In uno dei più completi studi sulle fonti energetiche, realizzato da (Sheehan *et al.* 1998) sono emersi molti aspetti vantaggiosi nella valutazione del biodiesel come valida fonte di energia rinnovabile:

- il bilancio energetico nel life-cycle è di sole 0,31 unità di energia fossile per produrre 1 unità di biodiesel;

- le emissioni di CO₂ nel suo ciclo di vita sono particolarmente basse (una riduzione del 78% rispetto al gasolio fossile), suggerendone un utilizzo urbano;
- le emissioni di particolato risultano essere complessivamente il 32% di quelle del gasolio (il particolato sotto ai 10 µm - altamente nocivo - inferiore del 68%);
- il monossido di carbonio è il 35% rispetto al gasolio;
- gli ossidi di zolfo SO_x non superano mai l'8% rispetto al gasolio.

1.2.1 La tecnica di produzione del biodiesel

Di seguito si presentano in modo sintetico e schematico le diverse fasi di produzione del biodiesel ed i sottoprodotti che da questo processo possono derivare (Fig. 3).

a) Fasi preliminari

- Isolamento della materia prima

I semi, prima della lavorazione, devono essere separati dalle impurità (metalli, pietrisco, terra, ecc.) provenienti dalle operazioni di raccolta in campo e trasporto nei sili. L'operazione si rende necessaria per preservare l'integrità dell'impianto ed ottenere una buona qualità del prodotto. Gli elementi metallici sono facilmente eliminabili con elettromagneti; per quelli non metallici, invece, si ricorre a vibrovagli (setacci vibranti stratificati). Il pulitore per semi esegue queste operazioni in un passaggio unico.

- Decorticazione

Viene eliminato lo strato protettivo del seme (pericarpo). Questo non contiene olio e il relativo contenuto proteico è generalmente modesto. La decorticazione consente di diminuire la dimensione delle presse, la relativa abrasione e le quantità di solventi necessarie.

I decorticatori sono essenzialmente di due tipi: a cilindro e a dischi. Il principio su cui operano è simile: una leggera pressione sul seme per l'apertura del pericarpo e relativa separazione dalla mandorla mediante corrente d'aria. La decorticazione non è mai totale, durante il processo tende a raggiungere un compromesso fra eliminazione del pericarpo e perdita di sostanza utile.

b) Fase di estrazione dell'olio

Il processo di estrazione dell'olio è necessario per permettere la separazione tra le sostanze grasse presenti nei semi e la matrice proteica. Il processo estrattivo è relativamente semplice e può essere eseguito con due distinti metodi che possono essere svolti anche in combinazione: estrazione meccanica ed estrazione chimica.

- Macinazione

L'olio è contenuto nelle cellule oleifere di specifici organuli citoplasmatici: i vacuoli. La rottura di queste strutture, mediante schiacciamento per lacerazione o laminazione, determina un incremento della resa.

A livello teorico, più finemente è ridotta la materia vegetale, migliori dovrebbero essere la quantità di olio estratto e la velocità con cui quest'operazione avviene; tuttavia, una farina troppo sottile, porta alla formazione di granuli che ostacolano il drenaggio dell'olio negli elementi metallici in cui avviene l'estrazione stessa.

- Estrazione meccanica

- *Riscaldamento e condizionamento.* Il riscaldamento aumenta la velocità di estrazione dell'olio e rende più efficiente il drenaggio della matrice proteica. Con il condizionamento si ottiene la formazione di un sottile film acquoso sulla superficie del seme; in questo modo si favorisce la diffusione dell'olio dall'interno verso l'esterno e la rottura di vacuoli residui.

Riscaldamento e condizionamento sono ottenuti con specifici dispositivi (cookers) che vengono sovrapposti alle presse.

- *Spremitura.* Può essere totale o parziale. Nel primo caso, l'olio è estratto in un solo passaggio. Questo tipo di operazione permette di estrarre circa la metà dell'olio contenuto nel seme e come sottoprodotto porta alla formazione di pannello. La spremitura totale, ottenuta impiegando presse continue, comporta un assorbimento di circa 45 kWh/t di seme e fornisce un pannello (expeller) con un residuo oleoso minimo del 5-12%. Nella spremitura parziale, inizialmente si estrae una quantità di olio del 20-24%; successivamente il residuo viene trattato chimicamente con un solvente, ottenendo come prodotto finale una farina con un contenuto residuo di olio inferiore al 5%. Dalla spremitura si ottiene come sottoprodotto il pannello estrattivo, un disco di spessore variabile, contenente i gusci e i semi macinati ed estratti.

- *Prima depurazione.* Le impurità più grossolane rimaste nell'olio (frammenti di seme, ecc.) sono rimosse con decantatori, vibrovagli o centrifughe. Le particelle più minute sono invece eliminate con filtropresse.

- Estrazione con solventi

Possono essere utilizzati: esano, benzina solvente, trielina (tricloroetilene) e solfuro di carbonio. In linea generale comunque, un aumento del potere solvente è accompagnato da un peggioramento delle caratteristiche dell'olio. La trielina, ad esempio, consente da un lato, di migliorare il potere estrattivo, dall'altro, a lasciare maggiori residui di composti insolubili in etere.

L'estrazione viene condotta con flussi di solvente applicati sul materiale da estrarre. Il flusso può avvenire:

- per percolazione, facendo attraversare il materiale per gravità dal solvente;
- per immersione, immergendo nel solvente sotto agitazione meccanica la massa da disoleare;
- in controcorrente mista, applicando entrambi i metodi.

c) Fase di transesterificazione

La transesterificazione dell'olio è una reazione chimica, il cui principale risultato è la rottura delle molecole dei trigliceridi, cioè del distacco di acidi grassi da quelle molecole che caratterizzano l'olio e che sono alla base della sua elevata viscosità: i trigliceridi.

Il processo produttivo impiega un reagente alcolico, metanolo o etanolo, per produrre rispettivamente un biodiesel composto da esteri metilici o esteri etilici (Fig. 2). La reazione richiede la presenza di un catalizzatore, idrossido di potassio (KOH - soda caustica). Come sottoprodotto del processo di transesterificazione, si ottiene la glicerina (o glicerolo).

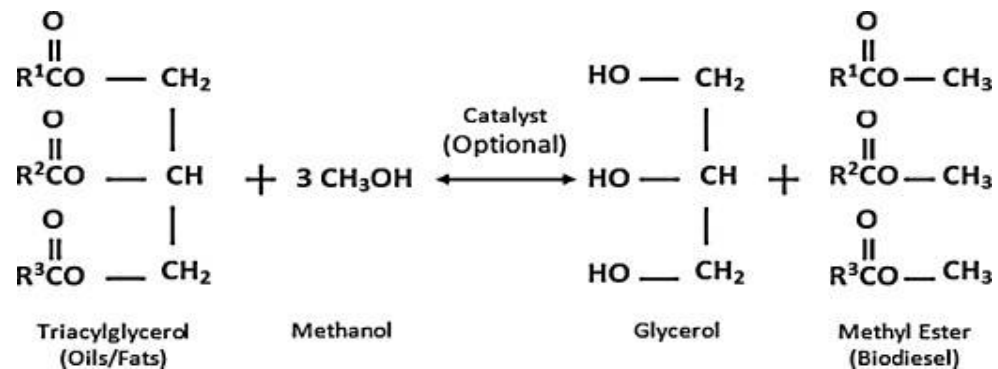


Fig. 2 - Transesterificazione di un trigliceride (Lim et Teong 2010)

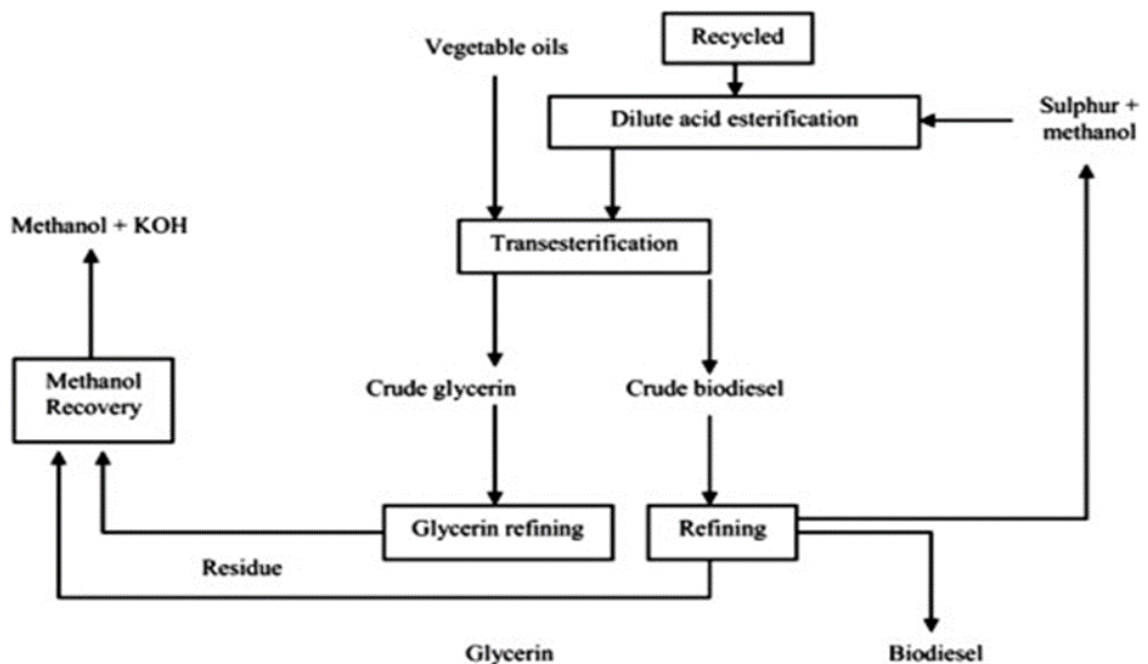


Fig. 3 - Diagramma di flusso della produzione di biodiesel (Mofijur et al. 2013)

d) Sottoprodotti

Gusci e tegumenti

Gusci e tegumenti costituiscono il primo sottoprodotto della lavorazione dei semi.

Dato che i gusci e i tegumenti sono costituiti soprattutto da materiali cellulosici e ligninici essi si prestano a parecchie utilizzazioni: si prestano alla produzione di energia a mezzo di processi fisico-chimici e microbiologici.

Pannello proteico

Essendo ricco di azoto, fosforo e potassio, il pannello estrattivo è un ottimo fertilizzante naturale. È stato utilizzato in Nepal per concimare le coltivazioni di riso; tale applicazione (dieci tonnellate di biomassa fresca per ettaro) ha prodotto un buon incremento di crescita (Sherchan *et al.* 1989).

Miscelato con acqua in appositi contenitori per la bio-digestione, il pannello produce bio-gas da cucina (Karve 2005, Visser et Adriaans 2007).

Recentemente degli studi hanno riportato che il pannello estrattivo lasciato fermentare si dimostri anche un'economica fonte di produzione industriale di enzimi (Mahanta *et al.* 2008).

Glicerina

La glicerina produrrebbe a lungo termine danni nei motori, per questo è importante rimuoverla. Viene allontanata filtrando il biodiesel, dopo il processo di transesterificazione. La resa di glicerina è di 10 Kg per ogni tonnellata di olio.

Per recuperare eventuali rimanenze di sostanza grassa, il residuo derivante dalla filtrazione viene sciolto in acqua al 10-12% e trattato con acido cloridrico. In seguito, attraverso una fase di concentrazione, si ottiene la glicerina grezza. Questa contiene impurità come ceneri (0,5-2%) e materia organica (1-2%), facilmente eliminabili con un procedimento di purificazione con resine a scambio ionico ad alta temperatura (200°C). La glicerina grezza viene poi separata per sedimentazione, trattata con una quantità opportuna di acido cloridrico (o fosforico) per neutralizzare il catalizzatore ed infine distillata per recuperare la frazione di metanolo ancora presente.

La raffinazione della soluzione acquosa a base di glicerina ha a sua volta altri sotto-prodotti: il fosforo, utilizzabile nella preparazione di fertilizzanti, ed una fase oleosa, utilizzabile come combustibile al pari degli oli pesanti.

La glicerina è utilizzata in campo alimentare per la produzione di sciroppi, bibite, prodotti da forno e nella conservazione di frutta e ortaggi.

Nell'industria cosmetica è un'importante materia prima per la produzione di sapone. Inoltre, non manifestando effetti di tossicità e di allergenicità, si ritrova nella formulazione di numerosi prodotti cosmetici (dentifrici, creme, ecc.).

Trova applicazioni in agricoltura, come additivo dei prodotti per la difesa dalle malattie delle piante, e nella zootecnica, come additivo alimentare (la soluzione acquosa è utilizzata come integratore nella dieta del suino).

In ambito farmaceutico, viene sfruttato il suo potere solvente e utilizzata come supporto umido nella produzione di pastiglie. Nei laboratori può servire da terreno di coltura per procedimenti biologici.

Nei processi galvanici è applicata come agente protettore delle superfici metalliche. Nell'industria del tabacco viene utilizzata per preservare il prodotto dall'essiccazione. È fondamentale nella preparazione di alcuni esplosivi contenenti un estere della glicerina: la trinitroglicerina (Pagliaro et Rossi 2008).

1.2.2 Normativa Comunitaria e prospettive

Con la Direttiva del Parlamento Europeo e del Consiglio sulla Promozione delle Energie Rinnovabili (RED) 2009/28/EC, l'U.E. impone ai Paesi Membri, entro il 2020, di coprire il 20% del consumo totale di energia e almeno il 10% del consumo totale comunitario di benzina e gasolio nel settore dei trasporti, con biocombustibili, individuando degli obiettivi per i singoli Stati membri (per l'Italia l'obiettivo è il raggiungimento del 17%). La Direttiva esige che la produzione di biocombustibili, inoltre, sia realizzata senza il "furto" di terreni destinati alle coltivazioni con scopi alimentari o ad elevato grado di biodiversità. Infine si impone una riduzione nelle emissioni di gas serra del 35% rispetto ai combustibili fossili sostituiti e, per le nuove installazioni tali emissioni dovranno essere ridotte al 50% nel 2017 ed al 65% nel 2018. L'obiettivo della Direttiva è quello di arrivare ad un aumento del 64% del consumo di biocarburanti, a fronte di un aumento complessivo del 4,2% di carburanti nel settore dei trasporti, limitando l'aumento dell'uso dei combustibili fossili al 2% (INEA, 2011).

Alla RED si affianca la Direttiva comunitaria 2009/30/CE per quanto riguarda le specifiche relative alla benzina, diesel e gasolio. Si stabilisce che i fornitori debbano indicare le emissioni di gas serra prodotte durante il ciclo di vita dei combustibili, obbligando i produttori stessi a ridurre le emissioni.

Ad oggi la produzione comunitaria di biodiesel (EIA, 2010) è aumentata di circa il 16% rispetto al 2008, raggiungendo una produzione di 9 milioni di tonnellate circa. I principali produttori risultano essere Germania, Francia, Spagna e Italia che insieme superano il 50% della produzione, normalmente ottenuta per il 70% da olio di colza. La produzione di bioetanolo è molto ridotta (3.600 milioni di litri circa) concentrati soprattutto in Francia, Paese da cui proviene un terzo della produzione.

Allo stato attuale dei fatti, il biodiesel rappresenta il biocombustibile più utilizzato all'interno degli Stati Membri della Comunità Europea, rappresentando il 79% complessivo di biocarburanti utilizzati.

La crescita di produzione di biocarburanti, tuttavia, non è stata sufficiente a compensare l'aumento della domanda di energia, tanto da rendere necessario un aumento delle importazioni che ad oggi rappresentano circa il 25% del consumo totale.

L'Italia, con 470.000 tonnellate, è il terzo produttore di biodiesel europeo, basando però la produzione su una forte importazione di materia prima composta principalmente da olio di colza proveniente sia da Paesi europei che extra-europei, olio di palma proveniente da Malesia e Indonesia, olio di girasole e olio di *Jatropha*, quest'ultimo di recente introduzione. Sia le caratteristiche della pianta, in grado di ottenere discrete produzioni anche in terre marginali (evitando di fatto il contrasto terre per cibo-terre per energia), sia le caratteristiche dell'olio che si ottiene, stanno aumentando l'interesse dei produttori di biodiesel per questa specie.

La specializzazione dei Paesi Europei verso la produzione di biodiesel, contrariamente a quanto avviene in Brasile o negli Stati Uniti, comporta la ricerca di nuove aree dove impiantare coltivazioni di oleaginose da destinare alla produzione extra-alimentare. Il rischio maggiore che si corre è quello di sottrarre terreni fertili utilizzabili per colture alimentari o, come nel caso del Girasole, di dirottare parte della produzione verso l'estrazione di olio usato a fini energetici, facendo impennare il prezzo dell'olio ad uso alimentare. Ciò ovviamente rappresenta una limitazione per i Paesi Europei costretti a seguire la Direttiva comunitaria prima citata.

Da questo punto di vista le caratteristiche ecologiche della *Jatropha curcas* L. vanno incontro alle esigenze delle compagnie energetiche, sebbene sia necessaria la ricerca di terreni in aree con clima tropicale o subtropicale. Fermo restando che la pianta produce in maniera ottimale con quantitativi di acqua e nutrienti adeguati, presenta tuttavia una notevole capacità di adattamento a condizioni pedologiche carenti, ovvero in suoli con un basso livello di fertilità, e con livelli di precipitazioni ridotti. In questa situazione si assiste normalmente ad un calo della produzione che tuttavia viene comunque mantenuta salvo casi estremi.

Recentemente sono emerse però critiche all'uso di questa coltivazione per fini energetici da parte di numerose associazioni ambientaliste, come ActionAid e Friend of the Earth tanto per citarne alcune, le quali muovono le loro critiche scagliandosi contro la propaganda effettuata dalle grandi compagnie petrolifere, secondo le quali lo sviluppo delle coltivazioni "energetiche" promuoverebbe indirettamente un miglioramento delle condizioni del reddito degli agricoltori. La posizione delle associazioni ambientaliste è di netto contrasto alla teoria del "miglioramento indiretto", poiché per ottenere produzioni adeguate sono necessari grossi impianti che, inevitabilmente, non possono interessare i piccoli agricoltori, i quali spesso si trovano a vendere i loro terreni, altrimenti destinati alla coltivazione di specie necessarie alla propria sussistenza. Ciò porta a quel conflitto "Terra per cibo – Terra per energia" che già in parte è avvenuto in Brasile e che ha avuto come effetto l'aumento esponenziale delle coltivazioni di canna da zucchero e di palma da olio.

Un'ulteriore critica viene mossa riguardo ad alcune evidenze che stanno emergendo, secondo le quali in varie regioni dell'Africa (Tanzania, Senegal e Swaziland in particolare) la *Jatropha* sarebbe coltivata in aree fertili e ben sviluppate da un punto di vista di infrastrutture, oltretutto usufruendo di impianti di irrigazione. Aree quindi che ben si adatterebbero alla coltivazione di specie con fini alimentari.

Sicuramente è inevitabile che l'esistenza di forzature in questo senso, in un settore che rappresenta per molte compagnie una scommessa economica per il futuro, possano essere

presenti. Ciò però, non può e non deve far distogliere l'attenzione dal fatto che la conoscenza della pianta è pressoché nelle fasi iniziali e il miglioramento delle caratteristiche, mediante selezione genetica, sta iniziando in questi anni. E' dunque necessario approfondire le caratteristiche positive mostrate dalla specie, anche mediante lo studio e la coltivazione della *Jatropha* in differenti aree geografiche.

Altro parametro da tener presente per incentivare la conoscenza di queste specie, è la stessa normativa europea. Attualmente, come visto, la Direttiva RED impone una riduzione delle emissioni dei gas serra del 35% rispetto alle emissioni causate dai combustibili fossili, che salirà al 50% nel 2017.

In questo quadro normativo, biodiesel come quello prodotto dalla colza che consente una riduzione di emissioni del 45%, già dal 2017 potrebbe essere considerato non compatibile, rendendo necessario o lo sviluppo di nuove tecnologie che permettano ulteriori riduzioni di emissioni, o la ricerca di nuove colture che forniscano prodotti con parametri entro i limiti di legge.

1.3 JATROPHA CURCAS L.

1.3.1 Classificazione, origine e diffusione

Jatropha curcas L., in Italia comunemente nota come Jatropha, è una specie appartenente alla famiglia delle Euphorbiaceae, sottofamiglia Crotonoideae, genere *Jatropha*.

Dehgan e Webster (Dehgan et Webster 1979) effettuarono una divisione del genere *Jatropha*, individuando due sottogeneri, sottogenere *Jatropha* e sottogenere *Curcas*, dieci sezioni e dici sottosezioni. Furono inoltre individuate alcune specie endemiche, come *J. mahafalensis* in Madagascar o *J. macrophylla* in Africa centro-orientale.

Si presume che l'areale di origine della specie *J. curcas* vada individuato nella zona del Centro e Sud America, in particolare in Messico, anche se vi sono delle discordanze in merito, tanto che Martin e Mayeaux (Martin et Mayeaux 1984) pensarono di aver individuato l'areale di origine della specie nella Regione Brasiliana del Cearà.

I dati riportati in bibliografia segnalano *Jatropha curcas* come una delle specie più antiche e primitive. Le sue proprietà erano già conosciute dalle popolazioni Maya (Schmook et Serralta-Peraza 1997).

A partire dal XVI secolo, fu introdotta in Asia e Africa dove, in particolare i coloni Portoghesi e Francesi, iniziarono un'intensa opera di coltivazione. I semi prodotti a Capo Verde, Guinea-Bissau, Senegal, Benin e Guinea, venivano esportati verso l'Europa per l'estrazione di olio usato sia come combustibile per l'illuminazione, sia per la produzione di sapone. Dalla metà del secolo scorso l'esportazione dei semi venne fortemente ridotta in seguito alla scoperta dei tensioattivi chimici, che soppiantarono gli oli vegetali nella produzione di saponi (Henning 2009, Heller 1996).

J. curcas è conosciuta con nomi molto diversi a seconda della zona di coltivazione e dell'area linguistica d'influenza:

- Physic Nut, Castor Oil (Aree anglofone)
- Pourghère, Feuilles médecin (Aree francofone);
- Pinol (Aree ispanofone)
- Bagbherenda, Jangliarandi (Indi);
- Tabanani (Senegal)
- Galamaluca (Mozambico)
- Bagani (Costa D'Avorio)
- Makaen, Mmbono (Tanzania)
- Piñon (Aree ispaniche dell'America Latina)
- Pinhao Manso, Mundubi-assu (Aree lusofone)
- Sketnoto (Suriname)
- Pinoncillo (Messico)
- Yu-lu-tzu (Cina)

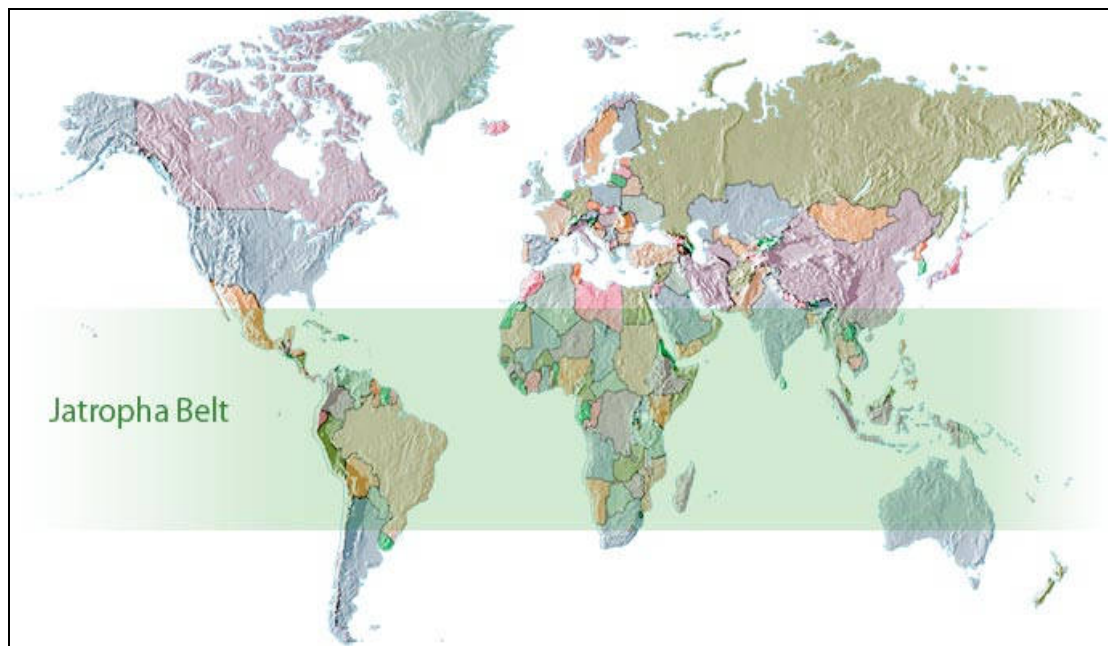


Fig. 4 - Areale di diffusione di *Jatropha curcas* L. (Jongschaap *et al.* 2007)

Attualmente la specie è coltivata in molte regioni della fascia climatica Tropicale e Sub-Tropicale, e l'areale in cui *Jatropha* riesce ad avere un buon sviluppo, denominato "Jatropha belt", è collocato tra 30°N e 35°S (Fig. 4).

Dati del 2008 (Brittaine et Lutaladio, 2010) stimano una superficie mondiale coltivata di 900.000 ha (principalmente in Asia, 760.000 ha, e Africa, 120.000 ha, dove Ghana e Madagascar rappresentano i Paesi in cui si hanno le maggiori estensioni), ma è previsto un importante incremento entro il 2015, con il raggiungimento di una superficie coltivata di circa 12 milioni di ha.

In molte aree viene usata come recinzione per i campi, sia per la facilità di propagazione, sia perché la tossicità della pianta (causata da una tossialbumina chiamata curcina) fa sì che non venga mangiata dal bestiame. In letteratura si riportano citazioni di usi anche in campo alimentare. In Messico sono presenti varietà non tossiche le cui giovani foglie vengono mangiate dopo la bollitura.

L'olio estratto dai semi può essere usato con finalità mediche, in quanto ha spiccate proprietà purgative; è anche usato contro le malattie della pelle e per alleviare il dolore causato dai reumatismi (Heller 1996). L'estratto acquoso dei rami ha rivelato in vitro un'azione positiva contro il virus dell'HIV ed i tumori (Heller 1996, Kaushik et Kumar 2004). Sembra che l'attività antitumorale sia ricollegabile alla curcacyclina-A (Vanden Berg *et al.* 1995).

Infine, già ampiamente detta in precedenza, è l'importanza dell'olio nella produzione di biodiesel, di sapone o per l'uso diretto per l'illuminazione. Il pannello che rimane a seguito dell'estrazione, può essere usato efficacemente come fertilizzante azotato grazie ad un contenuto in Azoto variabile tra il 3,2 e il 3,8% (Heller 1996).

1.3.2 Caratteristiche botaniche

Jatropha curcas L. è un arbusto o piccolo albero tropicale resistente alla siccità, che può raggiungere un'altezza superiore ai 6 metri, variabile secondo le condizioni di crescita. Generalmente le piante coltivate in pieno campo non hanno altezze superiori ai 3 metri, mentre gli esemplari coltivati in vaso non superano i 100-150 cm.

L'architettura della pianta (Foto 1, 2) può variare molto. Si possono avere sia piante con un unico fusto e con poche ramificazioni, sia piante fortemente ramificate già al livello del suolo. Nella seconda immagine (Foto 2) si può vedere come la ramificazione possa iniziare già a livello del suolo. Emerge inoltre la forte condizione di stress della pianta in fotografia. Dove presente, il fusto è eretto, legnoso o semi-legnoso, con una corteccia sottile e di colore bruno chiaro. Dal fusto si originano le branche che sono caratterizzate dalla produzione di foglie in posizione distale. Sia il fusto che le branche contengono un lattice fortemente tossico.



Foto 1, 2 - Pianta di *Jatropha curcas* L. (FACT 2010)

La costituzione dell'apparato radicale dipende dal tipo di propagazione. Infatti, le piante ottenute per propagazione gamica (da seme) sviluppano una radice fittonante centrale molto profonda, con 4 radici secondarie. Le piante ottenute per propagazione vegetativa generalmente non sviluppano la radice fittonante centrale. In ogni caso, l'apparato radicale può raggiungere profondità elevate, conferendo alla pianta una buona resistenza in condizioni di estrema siccità.

Le foglie (Foto 3) sono dotate di un lungo picciolo, di colore verde (da verde scuro a verde pallido), alterne, lobate con 3-7 lobi più o meno accentuati. Le dimensioni variano tra 6 e 15 cm sia in lunghezza che in larghezza. Normalmente in condizioni di forte stress idrico, la pianta perde le foglie, riducendo così la perdita di acqua per traspirazione.

J. curcas è una specie monoica (ovvero porta fiori maschili e femminili sulla stessa pianta) unisessuale, raramente ermafrodita (Dehgan et Wester 1979). I fiori (Foto 4) sono riuniti in un'infiorescenza a racemo che si forma dalle gemme terminali localizzate sulle branche. Tale infiorescenza porta normalmente il fiore femminile, più grande, in posizione terminale, circondato da fiori maschili, posizionati più in basso. Il rapporto tra fiori maschili e femminili è molto elevato e può raggiungere anche un valore di 29:1.

Il numero di fiori maschili è compreso tra 25 e 93, mentre i fiori femminili sono 1-5 ogni racemo (Raju et Ezradanum 2002). Il numero elevato di fiori maschili potrebbe essere un limite nella produzione di semi, tuttavia è stato notato che con l'avanzare dell'età della pianta il rapporto tende a diminuire, aumentando le potenzialità di fruttificazione (Achten *et al.* 2008). L'androceo è costituito da 2 verticilli separati, composti ciascuno da 5 stami, mentre il gineceo è costituito da 3 stili separati, che ai 2/3 circa della loro lunghezza si uniscono a formare lo stigma.

J. curcas è una specie proterandra, il che comporta che l'impollinazione (principalmente entomofila) sia obbligatoriamente incrociata, in quanto i fiori maschili maturano il polline prima che i fiori femminili della stessa pianta siano recettivi. E' stata inoltre dimostrata la capacità di alcuni individui di autoimpollinarsi qualora non siano presenti nelle vicinanze altre piante (Raju et Ezradanum 2002). Questa capacità, attribuirebbe alla specie un forte potere di colonizzazione dell'ambiente qualora si trovi in condizioni pedo-climatiche ottimali. Il frutto (Foto 5) è una capsula triloculare di forma ellissoidale, avente una lunghezza di circa 40 mm. Il colore è verde lucido, ma col progredire della maturazione vira inizialmente al giallo e successivamente al marrone, perdendo la lucidità iniziale. La maturazione è completata circa 90 giorni dopo la fioritura ed ogni infiorescenza produce 5-20 frutti riuniti in grappolo.

Ogni frutto contiene 2-3 semi (Foto 6) di colore nero, ciascuno all'interno di una cella, lunghi 2 cm e spessi 1 cm, che maturano quando il frutto vira dal colore verde al colore giallo; il contenuto in olio di ogni singolo seme è pari al 35% (Brittaine et Litaladio 2010). Saltuariamente sono stati rinvenuti 4 semi, ma il carattere è da considerarsi una mutazione che è stata impiegata in prove di miglioramento genetico.

Il peso dei semi varia tra 0,5 e 0,8 g. Il numero di semi per chilogrammo varia tra 1.000 e 2.000, con una media di 1.333 semi per Kg.

I semi sono costituiti da un tegumento rigido e da parenchima tenero e di colore bianco. Il contenuto in acqua del seme secco è pari al 7%, mentre il contenuto in olio varia dal 32 al 40%. Inoltre i semi sono ricchi di numerose sostanze tossiche come Phorbolesteri, Curcina, inibitori della Tripsina.



Foto 3 - Foglia di *Jatropha curcas* L.



Foto 4 - Fiore femminile e fiore maschile



Foto 5 - Frutti di *Jatropha curcas* L.



Foto 6 - Semi di *Jatropha curcas* L.

1.3.3 Caratteristiche ecologiche

Jatropha curcas L. è una specie succulenta, non invasiva, con limiti di coltivazione che vanno da 30°N a 35°S di latitudine, e da 0 a 500 metri in altitudine, tollerando bene quindi temperature elevate.

È una pianta fotoindifferente, la cui fioritura risulta indipendente dalla latitudine permettendole di fiorire in qualsiasi periodo dell'anno.

Per quanto riguarda le precipitazioni, la specie riesce a tollerare anche condizioni di estrema aridità, nonostante l'optimum di precipitazione per la produzione dei semi sia compreso tra 1.000 e 1.600 mm/anno, con un minimo di 600 mm/anno. Nonostante ciò la pianta riesce a tollerare precipitazioni attorno ai 250-300 mm/anno (Heller 1996) e a tollerare facilmente anche lunghi periodi di siccità, mettendo in atto strategie di adattamento, come ad esempio la perdita delle foglie, che gli permette di ridurre fortemente la traspirazione, concentrando l'acqua nei tessuti restanti. Inoltre le sostanze di riserva prodotte nelle foglie vengono traslocate nei tessuti radicali e nel fusto, il quale mantiene capacità fotosintetica anche durante i periodi di stress (Brittaine et Litaladio 2010). Differentemente, le elevate precipitazioni possono causare l'insorgere di malattie fungine e causare una riduzione della crescita radicale.

Da un punto di vista pedologico richiede, per uno sviluppo ottimale, suoli franchi, franco sabbioso argilloso o franco argilloso, di almeno 45 cm di profondità, ben drenati e con una buona areazione. Tuttavia presenta una buona capacità di adattamento anche a suoli marginali caratterizzati da un basso contenuto in nutrienti. Diverso il discorso per quanto riguarda la crescita in suoli argillosi che dovrebbero essere evitati nel caso in cui si abbiano periodi di piovosità prolungati in quanto la pianta mal tollera condizioni di ristagno idrico. I suoli argillosi possono essere usati nella coltivazione di *Jatropha* nel caso di climi secchi e in assenza di precipitazioni abbondanti.

La *Jatropha* tollera pH che variano tra 6,0 e 8,5, adattandosi però anche a suoli alcalini. Valori di pH più alti o più bassi possono compromettere lo sviluppo della pianta. Prove sperimentali condotte in India hanno inoltre mostrato una buona resistenza anche in condizioni di salinità elevata (FACT 2010).

1.3.4 Propagazione e caratteristiche agronomiche

Esistono essenzialmente due metodi di propagazione: la propagazione gamica e la propagazione vegetativa. Per quanto riguarda i vantaggi dell'uno e dell'altro metodo esistono opinioni discordanti in merito: secondo Heller (Heller 1996) la capacità delle piante ottenute da seme di produrre una radice a fittone che si sviluppa in profondità, è una caratteristica fondamentale per l'adattamento della pianta, mentre in uno studio più recente (Henning 2009) si sostiene che la propagazione vegetativa sia il metodo ottimale per ottenere piante con elevati raccolti, riproducendo le caratteristiche della pianta madre di cui sono cloni. Secondo lo stesso studio, un problema importante sarebbe soprattutto legato alla possibilità limitata di ottenere talee per la propagazione. Pianta generate da talea, ottenute a partire da tagli di 3 cm di diametro, hanno mostrato una capacità di crescita e dei raccolti molto più alti nelle fasi giovanili, rispetto alle piante ottenute da seme (Heller 1996). In definitiva la propagazione vegetativa presenta alcuni indubbi vantaggi:

- l'uniformità genetica del materiale vegetativo ottenuto: il materiale infatti, presenta le stesse caratteristiche della pianta madre;
- le piante presentano una notevole rapidità di adattamento alle condizioni edafiche ed ambientali in cui vengono messe a dimora;
- si riesce ad ottenere dei raccolti elevati molto precocemente rispetto alle piante ottenute da seme.

Nonostante ciò si hanno anche vari svantaggi rispetto alle piante ottenute per propagazione gamica:

- le piante ottenute per propagazione vegetativa, non formano la radice principale a fittone, ciò comporta una maggior difficoltà nel raggiungere gli strati più profondi del suolo per approvvigionarsi di acqua. Inoltre l'assenza del fittone risulta in una minore stabilità della pianta quando esposta al vento, oltre che in una maggior competizione con eventuali colture intercalari;
- si hanno indubbiamente maggiori costi riguardanti la raccolta del materiale e la messa a dimora, se comparati alle colture da seme (Brittaine et Litaladio 2010).

Normalmente il tasso di sopravvivenza tende a crescere in proporzione allo spessore e alla lunghezza della talea. Le talee per il materiale da propagazione, infatti, dovrebbero avere una lunghezza compresa tra 25 e 100 cm, e dovrebbero essere prese nella parte mediana o prossimale delle branche più vecchie, per avere speranza di attecchimento maggiore (Kaushik 2006).

Normalmente la formazione delle radici richiede attorno ai 3 mesi di tempo, pertanto la messa a dimora, che dovrà avvenire a 10-20 cm di profondità in contenitori in Polietilene o in pieno campo, dovrà essere fatta prima dell'inizio della stagione delle piogge così da far corrispondere la radicazione con l'inizio della pioggia stagionale. La propagazione per seme può essere effettuata:

- mediante semina diretta in campo, che rappresenta sicuramente il metodo più conveniente da un punto di vista economico oltre che garantire lo sviluppo ottimale del fittone. Parallelamente si ha una minore probabilità di successo dell'impianto dovuta

alla maggiore esposizione dei semi alle condizioni climatiche avverse nella fase più delicata, quella di germinazione; si ha una scarsa uniformità di crescita, a causa del fatto che i semi si formano per fecondazione incrociata; infine lo scarso contenuto di tossine nella fase iniziale di crescita rende le giovani piante soggette alla predazione di vari animali (FACT 2010);

- mediante semina in vivaio in contenitori in polietilene (Foto 7, 8), che permette di effettuare un maggior controllo dei parametri di crescita e di eventuali malattie, limitando le perdite nelle prime fasi di sviluppo. Il metodo è sicuramente più costoso della semina diretta, e può rappresentare una limitazione per quanto riguarda lo sviluppo della radice a fittone;
- mediante semina in semenzaio, che presenta il vantaggio di non avere limitazioni nello sviluppo del fittone ma allo stesso tempo si possono avere delle perdite all'atto del trapianto in campo (Brittaine et Litaladio, 2010).



Foto 7, 8 - Vivaio di *Jatropha* con semina in contenitori di polietilene. Ombreggiamento artificiale nella prima immagine e realizzato per mezzo di alberi nella seconda. (FACT 2010)

Per la semina in contenitori di polietilene e in semenzaio sarebbe auspicabile un letto composto da sostanza organica, sabbia e terra che dovrebbe essere inumidito prima della semina. I semi dovranno essere presi da frutti allo stadio giallo o allo stadio bruno, per avere la conferma della maturazione del seme, e posizionati a 2-4 cm di profondità. In 15-20 giorni avverrà la germinazione e nel momento in cui le piantine raggiungeranno 30 cm di altezza saranno pronte per il trapianto. La semina diretta in campo invece, dovrà avvenire obbligatoriamente all'inizio della stagione delle piogge così da garantire l'approvvigionamento idrico nelle prime fasi di radicazione. Saranno posizionati 2 semi per stazione ad una profondità di 4-6 cm. La quantità di seme per ettaro è di circa 4 kg/ha. Prima della semina il letto di semina dovrà essere preparato con cura. Si renderanno necessarie, specie in suoli consistenti, un'aratura o una rippatura, che potrà essere effettuata su tutta la superficie (se presenti colture intercalari) o solo sulla fila se la *Jatropha* è l'unica coltura. In ogni caso lo scopo è di garantire l'apertura del suolo così da permettere lo sviluppo ottimale delle radici. Nel caso si effettui un trapianto in buche, queste dovranno avere dimensioni minime di 30 cm di diametro e 45 cm di profondità (FACT 2010).

All'atto della preparazione dovrà essere effettuata una parallela fertilizzazione con concimi tripli N: P: K, in aggiunta ai quali possono essere effettuate concimazioni organiche.

La densità di semina può variare tra 1.100 e 2.500 piante/ha, con la possibilità di ottenere raccolti maggiori nel caso di spaziature più ampie, ma con una complessiva riduzione del raccolto per ettaro (Achten *et al.* 2008).

La distanza tra le singole piante varia a seconda dell'ambiente: ambienti semiaridi richiedono spazi più ampi.

Spaziature da 2x2 m fino a 3x3 m, garantirebbero una crescita soddisfacente, che possono aumentare fino a 4-5 metri tra le file nel caso di meccanizzazione, nel caso vengano effettuate colture intercalari oppure nel caso di coltivazioni in aree marginali (Heller 1996).

Le piantine ottenute per propagazione vegetativa saranno sistemate ad una profondità compresa tra 5 e 25 cm, generalmente circa 3 mesi prima dell'inizio delle piogge.

Per ciò che riguarda le richieste di nutrienti, è universalmente riconosciuto che la *Jatropha* sia una specie in grado di svilupparsi bene anche in condizioni di scarsità di nutrienti, tuttavia per avere produzioni adeguate è necessario fornire quantitativi idonei di acqua e fertilizzanti.

Varie prove di fertilizzazione sono state condotte su, specialmente in India. E' stato dimostrato come si siano avuti raccolti significativamente più alti in due coltivazioni di *Jatropha* a diverse densità, applicando il residuo del seme rimasto dopo l'estrazione, in una quantità di 3 t/ha (Ghosh *et al.* 2007). L'applicazione di 30 kg/ha di azoto e 10 kg/ha di P₂O₅ durante il primo anno e 45 kg/ha di azoto e 20 kg/ha di P₂O₅ porta incrementi significativi nella produzione di semi e di olio, nella regione del Gujarat in India (Patolia *et al.* 2007).

Nei primi anni i nutrienti sono necessari per garantire lo sviluppo della pianta, specialmente in aree marginali. Le esigenze in termini di nutrienti nei primi anni di sviluppo individuandole come nella Tab. 2 (FACT 2010). Tuttavia la scarsità di informazioni in merito, richiede necessariamente ulteriori approfondimenti.

	1	2	3	4	Totale
Fabbisogno annuo	Kg/ha/anno	Kg/ha/anno	Kg/ha/anno	Kg/ha/anno	
N	23	34	69	103	229
P₂O₅	7	11	21	32	71
K₂O	34	50	101	151	336

Tab.2 - Fabbisogno annuale dei principali nutrienti nei primi 4 anni di coltivazione (FACT 2010)

Per quanto riguarda le richieste in termini di acqua non vi sono dati disponibili in letteratura, se non l'optimum, considerato, come visto, tra i 1.000 e i 1.500 mm/anno. Il problema fondamentale è l'elevato costo dell'irrigazione. Normalmente si cerca di sfruttare le precipitazioni al fine di ridurre i costi di coltivazione. Una coltivazione come quella di *Jatropha*, destinata alla produzione di biodiesel, richiede naturalmente un livello di costi di produzione molto bassi e questo è possibile se il livello di antropizzazione della coltivazione è

limitato. Un'altra pratica efficace è la potatura, ma vale il discorso precedentemente fatto per l'irrigazione in termini di costi. Tuttavia è efficace per controllare l'altezza della pianta che, se raggiunge elevate dimensioni, comporta un aumento della difficoltà di raccolta. La prima potatura viene normalmente effettuata ad un anno, quando la pianta ha raggiunto l'altezza di circa 70 cm. Un secondo ciclo di potatura viene effettuato un anno dopo la prima, tagliando le branche secondarie e terziarie ad una lunghezza di circa 2/3.

Una pratica molto importante, specialmente nei primi anni di impianto, è la gestione delle infestanti, che potrebbero competere con le piantine di *Jatropha* per luce, acqua e nutrienti. Infine si ha la possibilità di consociazione con colture annuali, ma solo in terreni caratterizzati da disponibilità idrica e di nutrienti. Nelle aree secche la consociazione non è possibile a causa della competizione che si instaurerebbe tra le specie messe a dimora.

1.3.5 Raccolta

Il raccolto varia molto in funzione di vari parametri. Oltre ai fattori limitanti fondamentali (acqua e nutrienti), la produzione può essere fortemente diminuita da vari patogeni portando ad una variabilità elevata nei quantitativi di semi prodotti. Inoltre se la coltivazione è ottenuta per propagazione gamica si ha una forte variabilità produttiva tra pianta e pianta. Il quantitativo di semi per pianta varia tra 0,2 e 2 kg/anno (Francis 2005) mentre la produzione di semi per ettaro varia molto in funzione delle caratteristiche climatiche dell'area. Con un livello di precipitazioni tra 1.200 e 1.500 mm/anno si possono raggiungere produzioni di 1 t/ha (Euler et Gorris 2004). In India in suoli marginali si sono registrati raccolti variabili tra 0,6 e 1,2 t/ha (Ghosh *et al.* 2007). In alcune aree piovose dell'India si è raggiunto un livello di produttività tra le 3,2 t e le 4.5 t/ha. Nelle aree semiaride il raccolto può raggiungere 2-3 t/ha, considerando però condizioni subottimali di sviluppo della pianta (Heller 1996).

Normalmente la raccolta avviene al viraggio del colore del frutto dal giallo al marrone, e viene effettuata tradizionalmente a mano; essa rappresenta una delle voci di costo maggiori nella coltivazione della pianta, a causa di vari fattori:

- la scalarità di maturazione dei frutti obbliga a numerosi passaggi in campo da parte degli operatori
- la raccolta viene effettuata tradizionalmente a mano raccogliendo sia i semi maturi sulla pianta sia quelli caduti, il che richiede molto tempo per completare le operazioni

Secondo dati riportati da Rijssenbeek (FACT 2010) la raccolta media dei semi secchi al giorno, quando effettuata manualmente, è di circa 50 kg per operatore, individuando inoltre un valore limite di costo del lavoro (4 US\$/die) oltre al quale non è consigliata la coltivazione di *Jatropha*. Attualmente sono in atto prove di meccanizzazione della raccolta, confrontando altri sistemi di raccolta praticati su altre piante, ma il problema fondamentale è legato alla maturazione scalare, che rende difficile un raccolto uniforme, se effettuato a macchina.

1.3.6 Avversità

E' molto diffusa l'idea, riportata in varie pubblicazioni di diversi autori, che *Jatropha* sia una pianta molto resistente alle malattie, tuttavia, nel caso di monoculture di *Jatropha* o comunque di coltivazioni intensive, l'incidenza di malattie che possono causare danni può raggiungere anche livelli importanti.

L'utilizzo di piante ottenute per propagazione vegetativa può incrementare il rischio di percentuali elevate di danno, soprattutto nel caso in cui la pianta madre da cui è stato ottenuto il materiale vegetale sia suscettibile ad una data patologia.

Varie sono comunque le malattie e i patogeni potenzialmente pericolosi riportati nelle differenti pubblicazioni, ma bisogna tener conto che la comparsa di malattie su una pianta richiede alcuni anni per manifestarsi, dopo che questa si è insediata in una data area (Aachen *et al.* 2008). In molti Paesi la coltivazione di *Jatropha* è iniziata solo recentemente, pertanto ogni analisi delle patologie che colpiscono questa pianta non può che essere in continuo aggiornamento.

Nielsen (Nielsen 2007) riporta una classificazione degli insetti più importanti che colpiscono le piante, divisi per continente. In Africa gli insetti del genere *Aphthona* spp. attaccano le foglie e le sue larve, penetrano fino alle radici causando ingenti danni. L'attacco di una specie in particolare, *Aphthona dulitipes* (Foto 9) può comportare un tasso di mortalità della pianta del 100%. Focolai di questo coleottero sono stati rinvenuti sia in Guinea Bissau, che in Mozambico e Malawi. In Centro e Sud America vengono riportati infestazioni importanti da parte di *Pachycoris klugii* Burmeister e *Leptoglossus zonatus* (Grimm et Maes, 1997) sui frutti della *Jatropha*. In Asia sono descritti attacchi di *Scutellera nobilis* (Foto 10), che colpisce i fiori causando cascola, aborto dei frutti e malformazione dei semi.

Calidea dregei, in Guinea Bissau, colpisce i frutti della *Jatropha* provocandone la caduta e creando malformazione ai semi. La lotta, in questo caso, risulta molto difficile anche per la capacità dell'insetto di spostarsi facilmente colonizzando altre Euphorbiaceae come il ricino. In relazione a questa malattia, vengono descritti efficaci trattamenti a base di olio di neem, ma non vi sono approfondimenti in materia (Nielsen 2007).

Un ulteriore insetto dannoso, è il lepidottero *Agrotis ipsilon*, le cui larve attaccano le giovani piante appena emerse dal suolo, erodendo il fusto alla base. Su piccole superfici può essere effettuato un controllo meccanico eliminando le larve catturate. Possono essere usate anche esche tossiche formate da insetticidi misturati a segatura e residui di manioca.

La cavalletta *Oedalus senegalensis* attacca le foglie e le giovani branche provocandone l'appassimento; la sua diffusione è ampia in tutto il continente Africano.

Ferrisia virgata colpisce le foglie e le branche causandone l'essiccazione. In caso di grossa infestazione, possono essere interessati anche i fiori provocando una forte riduzione degli organi riproduttivi (Heller 1996).

Spodoptera litura attacca le foglie lasciando, al termine della sua azione, solo lo scheletro fogliare. Tale insetto può essere controllato grazie alle larve dell'imenottero *Telenomus*

spodoptera, ma viene anche posto l'accento sulla difficoltà di controllare questo insetto a causa del carattere improvviso con cui avvengono gli attacchi (FACT 2010).

Infine *Nezara viridula* (cimice verde) è diffuso in tutto il mondo e colpisce la *Jatropha* al momento della fioritura danneggiando fortemente le capsule fiorali. Il danno causato anche su altre parti della pianta trae origine da una tossina presente nella saliva di tale insetto che causa la morte dei tessuti. Occorre evitare la vicinanza di *Jatropha* con altre piante ospiti (pomodoro, patata, cotone ecc.) e eventualmente intervenire con trattamenti a base di insetticidi (ex. Chlorfluazuron).

Considerando successivamente le malattie più importanti che possono interessare *Jatropha*, FACT (2010) riporta la virosi del Mosaico fogliare (Foto 11). Tale virosi può colpire sia manioca che *Jatropha* ed è per questo motivo che occorre evitare la consociazione tra le due piante. I danni si hanno soprattutto a livello fogliare, dove compaiono aree clorotiche, accartocciamenti e dove la crescita si dimostra stentata.

Tra le malattie fungine, presenti soprattutto nelle zone umide, vale la pena citare *Alternaria ricini*, che attacca le capsule, provocandone l'imbrunimento e la caduta. Il fungo può infestare l'intera pianta causandone la morte.

Cercospora spp. può colpire la coltura causando la comparsa di macchie brune sulla superficie fogliare che rapidamente si diffondono su tutta la loro estensione. La malattia può essere controllata con l'uso di varietà resistenti o con l'uso di fungicidi come il Mancozeb.

Possono inoltre essere presenti marciumi radicali causati dal genere *Fusarium moniliforme* che può attaccare direttamente i semi. Con la crescita della pianta, si verificherà la presenza di foglie di colore verde chiaro che andranno incontro alla caduta, specie nelle branche basali. Anche in questo caso l'uso di seme selezionato e pretrattato, l'uso di varietà resistenti e l'eliminazione di residui vegetali infetti possono rappresentare un'arma di contrasto della malattia. Si possono verificare inoltre Marciumi del colletto causati da *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia batticela*.



Foto 9, 10, 11 - (9) *Aphthona dulitipes*; (10) *Scutellera nobilis*; (11) Virus del mosaico (FACT 2010)

1.3.7 Estrazione dell'olio dai semi

Il primo processo che viene effettuato nell'operazione di estrazione dell'olio dai semi è la decorticazione, ovvero la separazione del seme dal frutto. Questa operazione può essere

fatta sia su frutti maturi (gialli) sia su frutti ormai secchi (marroni), rendendo così più agevole la separazione. La decorticazione viene praticata effettuando una leggera pressione sul frutto, causandone la rottura e favorendo l'uscita del frutto. Il processo di decorticazione può essere manuale, semimeccanizzato e meccanizzato. Normalmente, i frutti vengono essiccati, evitando l'esposizione diretta al sole che pare abbia effetti negativi sulla vitalità del seme, fino al raggiungimento di un'umidità residua del 6-7%. A questo punto potranno essere o condotti alla pressatura o immagazzinati (Brittaine e Lutaladio, 2010).

I semi, preventivamente puliti, vengono avviati al processo di estrazione meccanica. Oggi esistono vari metodi per ottenere l'olio dalla *Jatropha*, la cui scelta è fondamentalmente legata a un compromesso tra costi di produzione e qualità del prodotto che si vuole ottenere.

Il metodo più impiegato consiste nella classica pressatura meccanica. I semi vengono convogliati all'interno di una pressa che lavora tra 50 e 150 bar, la quale separa l'olio dal pannello pressato. La quantità di olio ottenuto con questo metodo di estrazione può raggiungere il 95% del totale. Il processo alternativo si basa sull'utilizzo di solventi chimici, i quali permettono di raggiungere un'efficienza del 99%, ma che richiedono investimenti maggiori.

I parametri qualità e quantità dell'olio sono influenzati da vari fattori:

- umidità: maggiore umidità comporta la presenza di un maggior quantitativo di acidi grassi liberi. L'umidità residua deve essere del 2- 6 %;
- temperatura: può indurre cambiamenti nelle caratteristiche chimiche dell'olio;
- residui del tegumento del seme: un contenuto minore di tegumenti comporta una pressione di esercizio minore e una più efficace estrazione dell'olio. Semi senza tegumento darebbero un olio senza impurità, ma allo stesso tempo formerebbero una pasta che ostacolerebbe le operazioni di pressatura ostruendo l'uscita dell'olio.

Le presse più usate, anche negli ambienti rurali, sono le Bielenberg (Bielenberg ram press) (Fig. 14) che hanno una capacità di 2-3 kg/h e che solitamente hanno soppiantato il metodo tradizionale di estrazione che consiste in una pressatura manuale, una bollitura e una successiva separazione dell'olio. Per impianti di più ampie dimensioni sono utilizzati i cosiddetti "espeller" che possono variare nella capacità di lavoro da 15 kg/h fino a 10 t/h (Brittaine and Lutaladio, 2010).

1.3.8 Composizione in acidi grassi e caratteristiche dell'olio di *Jatropha curcas*

La composizione dei semi di *Jatropha* può essere così descritta:

- Acqua 6-7%
- Proteine 18% ca.
- Lipidi 38%
- Carboidrati 17%
- Fibre 15-16%
- Ceneri 5-6%

La qualità dell'olio che si ricava dai semi di *Jatropha* è influenzata sia da fattori ambientali sia da fattori genetici, quali le dimensioni dei semi, il loro peso e il loro contenuto in olio.

L'olio di *Jatropha* risulta composto, nella componente lipidica, per il 21% da acidi grassi saturi e per il 79% da acidi grassi insaturi; tra questi i più importanti sono l'acido oleico (34-46%) e l'acido linoleico (29-44%) (Berchmans et Hirata 2008). A questo riguardo ricordiamo che gli oli più interessanti per la trasformazione in biodiesel sono quelli ad alto contenuto di acido oleico, C18:1 (acido insaturo, presenza di un doppio legame) e linoleico C18:2 (acido insaturo, presenza di due doppi legami) poiché determinano facilità di combustione e buona stabilità ossidativa. E' inoltre auspicabile un basso contenuto di acidi a lunga catena di atomi di carbonio perché presentano un punto di congelamento troppo elevato.

Il contenuto in acidi grassi liberi (FFA) nell'olio di *Jatropha* è molto basso e ne rappresenta circa 1,17% (Stanford *et al.* 2009). Questo parametro indica la quantità di acidi grassi liberi che possono reagire col catalizzatore (Idrossido di sodio) nel processo di transesterificazione dando luogo alla formazione di saponi che sfuggono alla trasformazione in biodiesel. Normalmente il contenuto in FFA tende ad aumentare col passare del tempo, pertanto oli conservati a lungo avranno un contenuto in FFA maggiore.

L'olio è inoltre caratterizzato da un elevato numero di cetano, un parametro che indica il tempo che intercorre tra l'inizio dell'iniezione di un combustibile e la sua combustione. Più alto sarà il numero di cetano, minore il tempo, minore sarà la quantità di olio presente nella camera di combustione, provocando una diminuzione di pressione nella camera di combustione e, di conseguenza, un funzionamento più efficace del motore.

Il punto di infiammabilità (flash point) rappresenta la temperatura minima alla quale i vapori di un combustibile si accendono in presenza di una fiamma; quindi più il flash point è alto, più è sicuro lo stoccaggio, il trasporto e la manipolazione. In genere, gli oli vegetali manifestano un flash point molto più elevato di quello del gasolio ed anche l'olio di *Jatropha* non fa eccezione.

Altro parametro interessante è rappresentato dal basso contenuto in solfuri dell'olio di *Jatropha* che permette una forte riduzione delle emissioni di SO₂ durante la combustione.

Infine Il potere calorifico, ovvero l'energia liberata da una sostanza durante la sua combustione, risulta inferiore a quello del diesel (Brittaine et Litaladio 2010) (Tab.3).

	Diesel	Olio di <i>Jatropha</i>
Densità kg/l (15/40°C)	0,85	0,92
Temperatura di congelamento (°C)	-14	2
Flash point (°C)	80	110-240
Numero di cetano	47,8	51
Solfuri (%)	1,1	0,13
Potere Calorifico Kcal/kg	10.200	9.470

Tab. 3 - Comparazione tra le caratteristiche del diesel e dell'olio di *Jatropha* (Brittaine et Litaladio 2010)

1.4 MIGLIORAMENTO GENETICO E TECNICHE DI BREEDING PER *JATROPHA CURCAS* L.

1.4.1 Breeding di *Jatropha curcas* L.: stato dell'arte e problematiche

Il breeding può essere definito come l'identificazione, valutazione e selezione di genotipi con caratteristiche utili per il miglioramento della coltura. Nonostante *Jatropha curcas* L. sia stata introdotta in molti Paesi di Asia, Africa e America latina, non sono stati avviati molti programmi di miglioramento genetico per valutare proprio il controllo genetico dei caratteri d'interesse ed ancora oggi sappiamo molto poco sulle proprietà genetiche di questa specie. Varietà migliorate con tratti desiderabili per specifiche condizioni di crescita non sono disponibili e questo rende la coltivazione di *Jatropha* un'attività non molto sicura in termini produttivi (Jongschaap *et al.* 2007).

Quando si voglia attuare un piano di miglioramento, occorre innanzi tutto focalizzare gli obiettivi che si vogliono perseguire; nel caso della coltivazione di *Jatropha* questi obiettivi sono sia un'alta resa di olio ad ettaro possibilmente caratterizzato da ridotta tossicità, sia la composizione in acidi grassi dell'olio idonea alla successiva trasformazione in biodiesel. Tali obiettivi dovrebbero essere raggiunti senza ridurre la naturale resistenza ad agenti patogeni, ma anzi garantendo la protezione dagli eventuali parassiti. Oggi la selezione e la moltiplicazione di germoplasma sono strumenti di primaria importanza per raggiungere gli obiettivi finalizzati al miglioramento della produttività della specie (Chikara *et al.* 2013). Tuttavia, con l'uso di tecniche convenzionali, l'intero processo dall'ibridazione alle cultivar migliorate può protrarsi per decenni. In un recente studio (Achten *et al.* 2010) è stato stimato che, poiché *J. curcas* è una specie semi-wild, potrebbero essere necessari almeno 15 anni di breeding convenzionale prima che sia raggiunto l'addomesticamento della specie. Un alto livello di variabilità genetica è dunque di importanza cruciale per i programmi di breeding (Vollmann et Laimer 2013) poiché potrebbe accorciare le tempistiche grazie all'individuazione dei geni relativi ai caratteri che si vogliano trasferire e controllare con la selezione.

Ad oggi la mancanza di informazioni sul genoma di *Jatropha* rappresenta un fattore limitante per il breeding e rende più difficile sfruttare a pieno il potenziale di questa pianta (King *et al.* 2009). La conoscenza sul grado di variabilità genetica esistente tra le popolazioni naturali all'interno ed all'esterno dell'ormai accettato "centro d'origine" nel Centro e Sud America, permetterebbe una ricerca mirata e lo sviluppo di appropriate strategie di breeding (Achten *et al.* 2010). Metodi tradizionali che utilizzano caratteristiche morfologiche per determinare la diversità genetica o per determinare la vicinanza tra *J. curcas* di diverse provenienze, hanno avuto un limitato successo a causa dell'influenza ambientale su caratteri generalmente molto stabili come il peso di 1.000 semi ed il contenuto proteico ed oleoso degli stessi (Heller 1996). A questo proposito anche un studio di Trabucco *et al.* (2010) mostra come parametri climatici quali la temperatura media annua, la temperatura minima, le precipitazioni annue e quelle stagionali, influiscano significativamente sulle rese annue.

In questo contesto, la selezione di individui promettenti, la collezione del germoplasma e l'ibridazione interspecifica tra specie di *Jatropha* strettamente collegate, sono tecniche necessarie per il miglioramento genetico di questa pianta (Maghuly et Laimer 2013,

Popluechai *et al.* 2009). Nondimeno, la mancanza di variabilità genetica in *J. curcas* ostacola il breeding selettivo (Maghuly *et al.* 2013) che quindi richiede altre strategie per aumentare la diversità genetica attraverso mutazioni chimico/fisiche o con programmi di incrocio inter/intra- specifici (Sudhakar *et al.* 2011).

Il fatto che *Jatropha* si sia adattata ad un ampio range di condizioni edafiche ed ecologiche suggerisce che esista una considerevole varietà genetica da sfruttare (Rao *et al.* 2008). Programmi di breeding convenzionale per il miglioramento genetico di *Jatropha* sono iniziati agli inizi del 2000 in diversi Paesi: India, Cina, Tailandia, Filippine, Messico, Guatemala e Brasile (Carels 2009; Jain *et al.* 2010; Yang *et al.* 2012). Prove di valutazione di *J. curcas*, che includevano 225 linee da Asia, Africa e America Latina, sono state condotte per studiarne il grado di variabilità. Il lavoro ha rivelato una bassa variabilità genetica nelle accessioni Africane e Indiane ed alta variabilità nelle linee provenienti da Guatemala e America Latina (Montes *et al.* 2008). Una precedente ricerca inerente la valutazione di *J. curcas* per variazioni genotipiche e fenotipiche aveva mostrato simili risultati, sottolineando la bassa variabilità genetica di questa specie (Basha et Sujata 2007). Più alti livelli di variabilità sono stati poi trovati nelle accessioni di *Jatropha* provenienti dal Messico rispetto a quelle del continente Sud Americano (Ovando-Medina *et al.* 2013).

Nel corso degli ultimi anni tuttavia, diversi marcatori molecolari sono stati utilizzati per caratterizzare il germoplasma di *Jatropha*, ma gli esiti sono stati discordanti evidenziando talvolta elevata, talvolta scarsa diversità genetica; il che potrebbe essere spiegato dal numero delle accessioni o per le tecniche utilizzate (Sudhakar *et al.* 2011, Ceasar et Ignacimuthu 2011). Nonostante molteplici caratteri siano importanti per la produzione di biodiesel, come la resa in semi, il contenuto in olio, il rapporto fiori femminili/fiori maschili, la sincronizzazione della fioritura e della fruttificazione, il numero delle ramificazioni e la qualità dell'olio, la priorità di molti studi resta la sola resa in olio (Divakara *et al.* 2010, Brittain et Litaladio 2010). Negli anni passati molte ricerche si sono incentrate sulla collezione del germoplasma e sul breeding selettivo. Il breeding convenzionale per il miglioramento genetico di *J. curcas* sta iniziando a dare i suoi frutti per quanto concerne la resa in olio, ma il miglioramento è molto lento. Inoltre, la qualità dell'olio è una peculiarità di difficile miglioramento attraverso l'approccio del breeding convenzionale.

Oggi un consistente numero di istituti di ricerca sono coinvolti in programmi di breeding per questa specie, ma sembra che non ci siano pubblicazioni in letteratura riguardanti i risultati di questi progetti (Yue *et al.* 2013). D'altra parte diverse compagnie commerciali hanno già realizzato e pubblicato on line i loro risultati che sembrano molto promettenti, ma questi dati dovrebbero essere in seguito comprovati da valutazioni attraverso prove di campo su larga scala, effettuate da altri gruppi di ricerca. Risultano quindi necessari ulteriori studi per far luce sui livelli di polimorfismo del DNA all'interno di ecotipi geografici; infatti questi livelli rappresentano importanti elementi per la conservazione genetica e per i programmi di selezione, il cui successo è proprio legato alla disponibilità di variabilità genetica per i tratti desiderati della pianta. Inoltre, a causa del basso numero di geni clonati ed a causa del genoma in gran parte non definito, *J. curcas* è una specie che richiede importanti iniziative di

ricerca, in agronomia ed in biotecnologia, che abbiano l'obiettivo del breeding di nuove varietà geneticamente migliorate (Popluechai *et al.* 2007).

In questo contesto, la tecnica di breeding assistito (Marker-Assisted Selection, MAS), potrebbe essere idonea per accelerare il miglioramento genetico non solo per quanto concerne la resa in olio, ma anche per quei tratti che sono di difficile selezione come la qualità dell'olio e la resistenza a malattie (Guimarães 2007). Con "breeding assistito" si intende l'uso di marcatori molecolari a supporto del miglioramento genetico: l'identificazione di un marcatore molecolare associato ad un gene di interesse da trasferire da una specie all'altra consente di accelerare tale trasferimento in programmi di incrocio. Infatti, invece di selezionare per il carattere di interesse, che spesso si esprime in fase tardiva di sviluppo della pianta, si può selezionare direttamente sul DNA della pianta, in fase precoce di sviluppo.

Per gli scopi del breeding assistito, i marcatori molecolari strettamente legati a caratteri importanti per la ricerca devono essere identificati. I marcatori di DNA devono essere quindi clonati, caratterizzati e mappati per l'intero genoma ai fini di identificare possibili associazioni (Abiola *et al.* 2003, Doerge *et al.* 2002).

Lo sviluppo e l'utilizzo di marcatori molecolari per l'individuazione e lo sfruttamento del polimorfismo del DNA è uno dei più significativi risultati raggiunti nel campo della genetica molecolare che può accelerare il processo di breeding, stabilendo l'impronta molecolare per distinte e divergenti accessioni attraverso l'analisi della diversità.

1.4.2 Miglioramento genetico per popolazioni

La disponibilità e l'impiego di risorse genetiche rappresenta la base di partenza comune a molte strategie di miglioramento genetico e nel caso di *Jatropha curcas* l'importanza di queste risorse è particolarmente accentuata trattandosi di una specie non ancora domesticata e con limitata ricerca scientifica a supporto.

Le risorse genetiche impiegabili sono quindi costituite da due principali tipologie:

- germoplasma locale, che si ipotizza essere adattato alle condizioni ambientali dell'area in cui si intende coltivare;
- germoplasma proveniente da altri ambienti: con particolare predilezione per le aree geografiche di origine della specie, che nel nostro caso è rappresentato dal Centro America (Messico).

Il processo di miglioramento inizia quindi con la raccolta di detto germoplasma e, soprattutto con la sua completa caratterizzazione fenotipica e genetica.

Un obiettivo fondamentale è quello di individuare ampi gradi di variabilità all'interno della specie, variabilità che permetterà di generare materiale migliorato con base genetica più ampia possibile.

Per lo sviluppo di questa fase nel caso di *Jatropha curcas* non è possibile rivolgersi a materiale stabile e caratterizzato in precedenza da altri breeder a causa della recente introduzione della specie nei programmi di miglioramento e l'assenza pressoché totale di dati in questo senso.

Nel breeding classico si procede quindi, successivamente alla caratterizzazione, all'applicazione di metodologie di selezione in funzione della tipologia di materiale migliorato che si intende ottenere.

Per questo scopo si possono perseguire alcune strade diverse quali la selezione massale e l'open pollinated population.

Per giungere alla costituzione di una **popolazione migliorata per selezione massale** si opera effettuando sul germoplasma caratterizzato una selezione di singoli individui con performances particolari. Normalmente si opera questa selezione scegliendo le piante sulla base di parametri produttivi, fenotipici, di resistenza a stress biotici o abiotici, ecc. Gli individui prescelti vengono quindi moltiplicati per clonazione e successivamente testati in coltivazione utilizzando schemi sperimentali a blocchi ripetuti. I possibili problemi legati a questo tipo di selezione è la bassa variabilità di tipo additivo. Inoltre per ampliare la coltivazione su superfici importanti si può ricorrere alla clonazione del materiale, come nel caso di *Jatropha curcas*. Questo permette un'accelerazione nelle tempistiche di produzione del materiale migliorato.

Se l'obiettivo è produrre una **popolazione in equilibrio (open pollinated population)** si opera una selezione di materiale basata sulle medesime caratteristiche fenologiche e genetiche ma in aggiunta si procede a determinare le attitudini combinatorie (specifiche e generica) mediante incroci controllati. Successivamente si impiegano i genotipi selezionati per la realizzazione di schemi di impianto finalizzati alla massimizzazione delle possibilità di incrocio tra questi genotipi (campi a libera impollinazione); si produce così una generazione di semente che rappresenta l'intero pool genico dei parentali selezionati introdotti nello schema di incroci. Tale semente deve poi essere valutata in coltivazione per verificarne le caratteristiche. La combinazione di parentali (se ne provano molte in contemporanea) che risulta caratterizzata dalla presenza di genotipi migliori, verrà replicata su larga scala. I vantaggi sono la grande adattabilità di queste popolazioni dovuta alla presenza di genotipi ricombinanti e la possibilità di riprodurle mediante semente. Per contro questi metodi richiedono, soprattutto per colture poliennali come la *Jatropha*, lunghi tempi di realizzazione.

1.4.3 Risorse genetiche disponibili per velocizzare le tecniche di breeding

La limitata grandezza del genoma di *Jatropha*, il numero di cromosomi, la facile manipolazione vegetativa sono peculiarità favorevoli per l'uso di strumenti biotecnologici ai fini del miglioramento di questa specie.

Risorse genetiche come marcatori molecolari, linkage maps, ESTs a sequenze genomiche rappresentano strumenti potenti per velocizzare il miglioramento genetico sia per la resa che per la qualità dell'olio attraverso breeding assistito (MAS) o selezione genomica (GS).

1.4.3.1 Marcatori molecolari e miglioramento genetico: evoluzione ed applicazione

Conoscere il grado di variabilità genetica all'interno di una specie è necessario sia per la conservazione della biodiversità sia per l'impiego del materiale in programmi di miglioramento.

La quota di variabilità in una popolazione naturale determina la capacità di adattamento ai cambiamenti evolutivi e quanto questi siano in grado di favorirla o di mantenerla costante. Inoltre, da essa dipendono le modalità con cui si originano nuove specie (Russel 1997).

La possibilità di stimare il grado di variabilità genetica all'interno di una specie ha determinato la messa a punto di nuove tecnologie e la scoperta di marcatori sempre più efficienti nel discriminare, all'interno delle popolazioni, forme diverse di uno stesso carattere.

Un marcatore è un locus genico che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in un modo univoco la regione del genoma che lo circonda. Per poter essere utilizzato deve essere polimorfico, ossia presentare almeno due varianti alleliche. I primi marcatori utilizzati sono stati i cosiddetti marcatori morfologici, rappresentati da caratteri qualitativi ben riconoscibili nel fenotipo della pianta, che si sono rivelati utili in molti casi. I marcatori morfologici non sono in grado di dare informazione sul genotipo dell'individuo ignorando così mutazioni, e quindi parte della variabilità, a livello di genoma; per cui attualmente il loro uso è piuttosto limitato e sempre associato a marcatori molecolari.

Questi problemi possono essere superati basando il riconoscimento delle analisi a livello del DNA, mediante l'uso di marcatori molecolari (Roldan-Ruiz *et al.* 2000). Queste tecniche sono più precise e permettono di valutare la conformazione della variabilità genetica presente nelle popolazioni (sia tra che intro) che mediante l'uso di criteri morfologici non è possibile ottenere. Questo dà in primo luogo la possibilità di realizzare studi filogenetici per conoscere l'evoluzione della specie ed in secondo luogo la possibilità di effettuare appropriate identificazioni varietali all'interno della specie stessa.

L'utilizzo di marcatori molecolari ha importanti implicazioni:

- permette di identificare in maniera inequivocabile genotipi diversi di una specie, dando un profilo esclusivo e caratteristico (de Carvalho Moretzsohn *et al.* 2004);
- vengono usati nella richiesta di iscrizione di varietà al Registro Ufficiale (indispensabile per la sua commercializzazione) così come nella protezione brevettuale di materiale selezionato.
- hanno consentito la costruzione di mappe genetiche di varie specie d'interesse agronomico.
- l'uso in programmi di selezione assistita, al fine di selezionare precocemente gli individui con caratteristiche agronomiche di interesse nell'ambito di una popolazione segregante. Questo si è mostrato particolarmente utile nelle specie arboree in cui il carattere d'interesse (ad esempio il contenuto d'olio) si esprime nella pianta adulta, risparmiando tempo, lavoro e costi.

- l'analisi di fingerprinting per studiare e caratterizzare la variabilità genetica all'interno di una popolazione, definendo il grado di similarità tra i diversi genotipi (Pradhan *et al.* 2004).

L'applicazione dei marcatori molecolari non si limita soltanto ai caratteri mendeliani semplici, essendo possibile, mediante l'analisi delle mappe genetiche, trovare marcatori per i caratteri di tipo quantitativo (QTL) (Quantitative Trait Loci), legati all'espressione e al controllo multigenico e influenzati in modo più o meno forte dall'ambiente.

I primi marcatori utilizzati fino agli anni 70-80 sono stati i cosiddetti marcatori biochimici o isoenzimi.

Con questi marcatori proteici è possibile individuare varianti alleliche di loci codificanti per un enzima in cui mutazioni puntiformi hanno provocato la sostituzione di uno o più amminoacidi della catena peptidica, senza comprometterne la funzionalità ma modificandone le caratteristiche fisico-chimiche (peso molecolare e carica). Tali mutazioni possono essere rilevabili mediante la separazione delle proteine per elettroforesi su gel d'amido dei succhi cellulari estratti, in base alla carica e al peso molecolare (zimogramma), individuando una eventuale variabilità non rilevabile a livello morfologico.

Questi marcatori offrono diversi vantaggi quali la loro codominanza, la relativa semplicità della tecnica, i ridotti costi d'analisi e l'elevata riproducibilità dei risultati.

Essi presentano però anche dei limiti costituiti dal fatto che sono soltanto validi per caratteri semplici, controllati da singoli geni, non essendo utili per genomi complessi e la variabilità rilevata è ristretta soltanto alle regioni codificanti. Di conseguenza non sono marcatori neutrali in grado di accumulare tutte le mutazioni avvenute durante l'evoluzione, perché nelle regioni codificanti per le proteine le mutazioni più ricorrenti sono di tipo aberrante e portano all'eliminazione dell'individuo per mezzo della pressione selettiva.

È da ricordare anche che non tutti i tessuti e non tutti gli stadi fisiologici presentano lo stesso profilo enzimatico, per cui l'analisi deve essere effettuata in condizioni molto standardizzate.

I marcatori isoenzimatici sono stati usati con successo in analisi varietali e di fingerprinting.

Questi marcatori prendono in esame il prodotto risultante dalla trascrizione e traduzione delle informazioni contenute nel patrimonio genetico di una pianta.

Negli ultimi anni l'attenzione si è direttamente spostata a livello di DNA cercando, mediante l'uso di marcatori molecolari, di evidenziare il polimorfismo a livello del genoma consentendo di classificare un elevato numero di specie e cultivar. Questi marcatori permettono di eliminare completamente l'influenza ambientale, le variazioni che si possono verificare a livello di trascrizione, gli effetti di dominanza, le interazioni epistatiche e pleiotropiche (Martinez-Zapater et Oliver 1984).

I marcatori molecolari presentano i seguenti vantaggi:

- eliminazione di influenza ambientale (tipo di tessuto, fasi di sviluppo);
- numero illimitato, presentano un elevato polimorfismo e sono in grado di coprire qualsiasi parte del genoma;
- eredità semplice come fattori mendeliani dominanti o codominanti, così da distinguere l'eterozigote dall'omozigote.

Nell'ambito di questi marcatori ci sono quelli che utilizzano metodi di ibridazione (RFLP, VNTR), e quelli che fanno uso della tecnica PCR, illustrata nel capitolo materiali e metodi (RAPD, AFLP, STMS, SCAR, ISSR, SSR, SNP). I primi sono in grado di distinguere mutazioni a livello dell'intero genoma mentre i secondi lo fanno a livello di specifiche sequenze geniche. I polimorfismi del DNA possono anche essere trovati all'esterno delle regioni codificanti di un gene nelle zone chiamate sequenze introniche. Esse vengono utilizzate nel metodo di riconoscimento di polimorfismi genetici denominato TBP (Tubulin Based Polymorphism) anche esso basato sulla tecnica della PCR.

1.4.3.2 Marcatori SSR (Simple Sequence Repeat)

Con l'acronimo SSR vengono indicate sequenze di DNA costituite da brevi frammenti di 1 a 6 pb "motivo" che si ripetono a tandem lungo il genoma (Tautz et Renz 1984); in grado di rilevare un elevato polimorfismo rispetto ad altri marcatori molecolari.

L'origine di tali ripetizioni, secondo Bell (1996), è da attribuirsi ad un processo di mutazioni puntiformi progressive, che si sono verificate durante i processi evolutivi e di adattamento degli organismi viventi.

Mutazioni occasionali della lunghezza delle regioni amplificate sono dovute allo scivolamento dei due filamenti di DNA durante la replicazione (Strand *et al.* 1993) o a mutazioni casuali dovute a un differente crossing-over tra cromatidi fratelli (Valdes 1993).

I polimorfismi si possono evidenziare attraverso una semplice amplificazione con PCR, usando coppie di primer specifici complementari alle regioni fiancheggianti delle sequenze ripetute. Questi primer consentono di amplificare i singoli frammenti microsatelliti che possono differire tra gli individui per il numero di volte che vengono ripetuti lungo il genoma. La stessa unità base (ad es. GA) può essere ripetuta 10-15 volte in una regione di un cromosoma e 15-20 volte nella regione del cromosoma omologa dello stesso individuo. I prodotti di amplificazione, corrispondenti agli alleli marcatori del locus target, vengono separati normalmente in gel di poliacrilamide in quanto permette di evidenziare differenze di lunghezza di poche paia di basi.

Le sequenze di DNA fiancheggianti il microsatellite devono essere conosciute così da poter disegnare la coppia di primer più appropriata per realizzare l'amplificazione dei microsatelliti.

Questi marcatori hanno suscitato un marcato interesse in biologia molecolare in: funghi, procarioti, virus, organelli, plasmidi, eucarioti, genere umano (Wren *et al.* 2000) e specie vegetali (Wang *et al.* 1994).

Gli SSR costituiscono infatti una frazione piuttosto abbondante del DNA non codificante e sono relativamente rari in regioni codificanti proteine; nel primo caso ricorrono soprattutto sequenze di- e tri- nucleotidiche e nel secondo quelle tetranucleotidiche, mentre sequenze di 5-6 pb sono piuttosto rare (Li *et al.* 2002).

Gli SSR sono considerati marcatori ideali per la mappatura genica e per gli studi di popolazione a causa della loro abbondanza (Weber, 1990); dell'alto livello di polimorfismo (Cregan *et al.* 1992, Saghi Maroof *et al.* 1994); dell'elevato grado di dispersione nel genoma

(Wang *et al.* 1994); della facilità di utilizzo e della riproducibilità dei risultati (Li *et al.* 2002); e poiché si tratta di marcatori co-dominanti con un elevato numero di alleli per locus, permettono anche l'identificazione degli eterozigoti. Nelle piante di interesse agrario, è stata stimata la presenza di un locus microsatellite ogni 50 kb di genoma circa; inoltre la ripetizione (AT)_n è risultata la più frequente così come è molto diffusa la ripetizione (TAT)_n (Morgante et Olivieri 1993). Questi marcatori trovano largo impiego nell'attività di identificazione molecolare di specie e cultivar (McGregor *et al.* 2000, Ashkenazi *et al.* 2001). Nel regno vegetale i primi utilizzi dei marcatori SSR è stato realizzato su piante tropicali (Condit et Hubbell 1991), successivamente sono stati testati su soia (Akkaya *et al.* 1992, Morgante et Olivieri 1993) e l'isolamento di microsatelliti e loro applicazioni sono state documentate in altre colture: riso (Wu et Tanksley 1993), mais (Senior et Heun 1993), orzo (Saghai-Maroo *et al.* 1994) e *Arabidopsis thaliana* (Bell et Ecker 1994).

Per quanto riguarda *Jatropha curcas* ad oggi la valutazione e la caratterizzazione di variabilità genetica mediante l'utilizzo di marcatori SSR è molto limitata; il primo studio riportato in bibliografia è stato pubblicato da Sun *et al.* nel 2008, quindi nel 2009 (Basha *et al.* 2009) e, più recentemente, nel 2013 (Maurya *et al.* 2013). I risultati ottenuti concordano con studi precedenti realizzati con altri marcatori nell'individuare una base genetica molto ristretta tra accessioni di diverse provenienze, riscontrando invece una marcata diversità tra i genotipi messicani in termini di contenuto in phorbol ester.

Il problema principale legato a questi marcatori SSR è che, per amplificare ogni locus microsatellite è necessario conoscere le regioni genomiche fiancheggianti ed i primers, sviluppati per una specie, sono difficilmente utilizzabili per specie differenti. Per fare fronte a questa problematica, negli ultimi anni è stata utilizzata la metodologia di isolare cloni microsatelliti da librerie genomiche arricchite. I cloni che risultano positivi allo screening vengono sequenziati, per determinare le regioni fiancheggianti il microsatellite stesso; a questo punto si possono disegnare i primers in grado di amplificare il locus (Zietkiewicz *et al.* 1994).

1.5 DESCRIZIONE DELL'AREA DI PROGETTO

1.5.1 Inquadramento geografico e morfologico

La Tozzi Green S.r.l. si estende in Madagascar per una superficie coltivata complessiva di oltre 3.800 ha ed è localizzata nella porzione centrale-sud dell'isola, a circa 600 Km in direzione sud ovest rispetto alla capitale Antananarivo.

Il Madagascar è uno Stato insulare, posizionato nell'Oceano Indiano a largo delle coste sud-orientali del continente Africano, a lato del Mozambico, Stato dal quale è diviso dal canale omonimo (Canale di Mozambico).

Il Paese è posizionato tra 12° e 25°30' latitudine S e tra 45°15' e 50°30' longitudine E, raggiungendo una lunghezza da nord a sud di 1580 km, ed una larghezza variabile tra 450 e 570 km.

Morfologicamente, il Madagascar è costituito da un altopiano centrale il quale rappresenta il 70% della superficie dell'Isola (*Hautes Terres*), con vette che raggiungono i 2.876 m a nord le quali fungono da barriera protettiva nei confronti delle valli interne, molto fertili, che permettono la coltivazione di varie colture come riso e vaniglia (il Madagascar è il primo produttore mondiale).

L'area settentrionale e l'area orientale dell'isola principale sono coperte prevalentemente dalla foresta, principale risorsa che permette il sostentamento delle popolazioni locali affiancata alla risicoltura, coltivazione dominante in quest'area. La zona centro meridionale, soggetta durante il periodo coloniale francese ad un'intensa opera di deforestazione, è caratterizzata oggi da una scarsa copertura vegetale, dominano infatti savane erbacee e steppe, e da suoli aridi e poco fertili, in cui le coltivazioni principali sono il mais e la manioca. L'altopiano centrale e le regioni declivi verso le pianure agricole occidentali sono caratterizzate da una fertilità decrescente mano a mano che si procede verso sud.

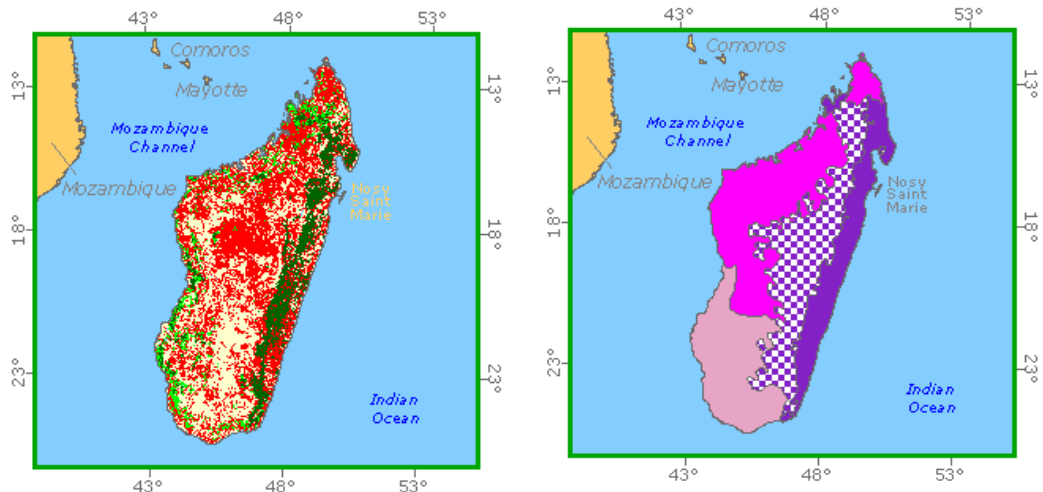
La deforestazione delle aree meridionali ha reso possibile l'instaurarsi di meccanismi erosivi che hanno avviato un rapido processo di desertificazione.

1.5.2 Clima

Da un punto di vista climatico, nel Madagascar si possono riconoscere 5 aree principali:

- la regione nord-occidentale con clima equatoriale, interessata dai monsoni estivi (da dicembre fino ad aprile). Quest'area è inoltre caratterizzata da forti precipitazioni e da una stagione secca più breve. La temperatura media è di 25°C e è presente una discreta escursione termica (15-37°).
- La costa est, esposta ai venti (alisei e cicloni concentrati nel periodo che va da gennaio a marzo) provenienti da sud-est, è caratterizzata anch'essa da un clima equatoriale. L'area è interessata da precipitazioni abbondanti nel periodo che va da novembre ad aprile (2.500-3.000 mm/anno) e da temperature simili alla regione nord, ma meno variabili.
- L'area sud e sud-ovest caratterizzata da un clima tropicale secco o subdesertico. Il sud riceve sporadiche piogge, mentre l'area sudoccidentale ha un aspetto desertico e l'ammontare annuo delle piogge è di appena 350 mm. L'escursione termica è elevata: si può passare da -4° a 40°C.

- La costa occidentale è molto meno piovosa dell'orientale e caratterizzata da savane. La temperatura varia tra 10 e 37°C.
- L'altopiano centrale caratterizzato da un clima tropicale mitigato dall'altitudine, con temperature medie annuali tra 15 e 20°C.



Figg. 5, 6 - 5) Copertura forestale in Madagascar. In verde scuro le Foreste vergini, in verde chiaro le foreste secondarie, in rosso altre zone con differenti coperture vegetali, in grigio vegetazione xerophila (FAO); 6) Principali aree ecologiche in Madagascar (FAO)

In base a questa classificazione climatica, si possono distinguere alcune aree ecologiche principali, come indicato nelle figure 5 e 6. In particolare, nella figura 6, si individua l'area delle foreste pluviali tropicali ad est (colorazione viola scuro); l'area delle foreste umide decidue ad ovest e nord (colorazione fucsia); l'area di savana e steppa a sud e sud-ovest (colorazione rosa); l'area delle *Hautes Terres* centrali (Scacchiera).

La foresta primaria orientale (Fig. 5, colorazione verde scuro) rappresenta dal punto di vista naturalistico, uno dei bacini di biodiversità più importanti al mondo. Si riconoscono al suo interno 4 aree forestali differenti per caratteristiche: le foreste costiere, sviluppatesi su terreni sabbiosi e pianeggianti; le foreste collinari che possono raggiungere gli 800 m, sviluppatesi su terreni argillosi e che hanno permesso anche la coltivazione di alcune specie vegetali tropicali (caffè, banano); le foreste degli altipiani tra gli 800 e i 1.300 metri, presenti solo nelle vallate montane e lungo i corsi d'acqua; i boschi di licheni, disposti tra i 1.300 e i 2.000 metri e caratterizzati da altezze moderate (10 m). Attualmente la foresta primaria è presente solo saltuariamente, a causa dell'intensa opera di deforestazione che ha drasticamente ridotto la sua espansione.

Al di là delle differenti caratteristiche, la foresta orientale detiene uno dei più importanti patrimoni in termini di specie vegetali ed animali. Il prolungato isolamento bio-geografico dell'isola ha permesso infatti lo sviluppo di una flora e di una fauna endemiche, basti pensare alla presenza di specie animali come i lemuri o vegetali come l'*Adansonia grandidieri*, un baobab endemico dell'isola.

1.5.3 Economia

L'economia del Paese è prevalentemente impostata sull'agricoltura, poiché l'insufficienza di risorse energetiche e la scarsità di vie di comunicazione hanno ostacolato lo sviluppo industriale. Importanti però sono i distretti minerari nel sud, dai quali si estrae principalmente Cromo e Grafite.

In agricoltura, a livello nazionale il modello prevalentemente adottato è la monocoltura, praticata sul 77% (1.600.000 ha) delle terre destinate alla produzione agricola, mentre attualmente solo il 19% (330.000 ha) dei terreni è destinato alla consociazione. La provincia di Fianarantsoa, che include la regione di Ihorombè sede del progetto, è caratterizzata da 370.000 ha coltivati con colture pure e da solo 80.000 ha destinati alla consociazione o a colture miste.

La maggior parte delle terre non è soggetta ad alcun tipo di fertilizzazione (1.730.000 ha), la fertilizzazione organica, garantita grazie al letame prodotto dagli allevamenti bovini e caprini, è impiegata su 255.000 ha, mentre la fertilizzazione minerale è impiegata solo su 25.000 ha. Anche in questo caso la provincia di Fianarantsoa non si discosta molto dall'andamento nazionale, infatti 370.000 ha sono coltivati non impiegando nessun tipo di fertilizzazione mentre solo 75.000 ha sono fertilizzati con concimi organici o fertilizzanti minerali.

La risicoltura rappresenta in tutto il Paese, eccezion fatta per la provincia di Toliara, la coltura cerealicola più praticata (l'80% dei terreni destinati a cereali, 1.140.000 ha), seguita dalla coltivazione del mais. Altri cereali sono coltivati in maniera sporadica. La provincia di Fianarantsoa rappresenta il distretto risicolo più importante coi suoi 256.000 ha coltivati. Nonostante la sua notevole diffusione, tuttavia, la risicoltura non rappresenta una coltura da esportazione a causa delle basse produzioni delle varietà locali che si attestano attorno a 2 t/ha.

La coltivazione di leguminose è concentrata principalmente nella provincia della capitale Antananarivo che, coi suoi 43.000 ha sui 150.000 ha totali, rappresenta il distretto produttivo più importante, con i fagioli che rappresentano la coltura più praticata.

Tra le colture tuberose, la manioca rappresenta la coltivazione più diffusa a livello nazionale (388.000 ha), concentrata per lo più nella provincia di Toliara (120.000 ha). La provincia di Fianarantsoa rappresenta il secondo distretto produttivo con 102.000 ha. Tra le altre colture praticate si riporta in ordine: la patata, la patata dolce e l'igname.

Circa 90.000 ha sono destinati alla produzione di colture industriali, come l'arachide (50.000 ha) e la canna da zucchero (40.000 ha), concentrate per lo più nella provincia di Toliara. Minor importanza hanno le coltivazioni di soia, cotone e tabacco.

Infine tra le colture permanenti si riscontrano vaste superfici coltivate a caffè (115.000 ha) soprattutto nella provincia di Fianarantsoa (40.000 ha). A livello mondiale difatti il Madagascar rappresenta uno dei più grandi esportatori di caffè (45.000 t/anno) superato solo dal Brasile, dal Vietnam e dalla Costa d'Avorio. Grande importanza è rivestita anche dalla coltivazione della vaniglia, 63mila ha a livello nazionale, concentrati per la maggior

parte nella provincia di Antsirana; di meno rilievo le coltivazioni di pepe, chiodi di garofano e cacao.

La popolazione impiegata nel settore agricolo rappresenta più della metà dell'intera popolazione del Madagascar. Circa 13,5 milioni di persone infatti sono direttamente impiegate in agricoltura. Di queste il 51,8% è rappresentato da donne, mentre il 48,2% da uomini. L'età media è relativamente bassa: 4 dei circa 6 milioni e mezzo di donne nel settore agricolo hanno età inferiore ai 20 anni, mentre per gli uomini solo 3 dei 6 milioni totali.

Circa l'84% della popolazione agricola ha più di 5 anni.

Le altre attività collegate indirettamente all'agricoltura sono esercitate da meno del 2% della popolazione. Tra queste l'attività commerciale è praticata dall'1,6% della popolazione, l'allevamento dall'1,4% e la pesca dallo 0,9%

1.5.4 L'altopiano di Ihorombé

L'area del progetto è la città di Satrokala, situata nel distretto di Ihosy nella Regione di Ihorombé (Fig. 7). La regione è localizzata nell'area centro meridionale del Madagascar a cavallo tra le *Hautes Terres* centrali e la parte meridionale dell'Isola.

Da un punto di vista morfologico la regione è attraversata da nord a sud da montagne che culminano nel picco di Ivohibé (2.000 metri) a nord est e in una vasta pianura a sud ovest. La regione è caratterizzata da un vasto altopiano con altezze variabili tra 300 e 2.060 m.

Da un punto di vista geologico, come si può anche vedere nella figura 7, sono per lo più suoli generati da rocce ignee o metamorfiche. Solo nell'area occidentale della Regione vi sono depositi di arenarie dovuti fondamentalmente alla forte azione erosiva che ha agito in passato. I suoli sono classificati come suoli ferrallitici. Tale suolo, tipico di aree tropicali e subtropicali, è caratterizzato da un intensa attività di degradazione della sostanza organica e della roccia madre, causata dalle estreme condizioni climatiche.

La vegetazione è prettamente caratterizzata da savana erbacea, la quale domina l'intero altopiano.

Solo nella parte orientale si hanno alcune sparse foreste che confluiscono nella grande foresta primaria costiera.

Da un punto di vista agricolo la Regione di Ihorombé è caratterizzata da un territorio agricolo di 26 mila ha circa, dei quali la quasi totalità viene gestita senza alcun tipo di concimazione o fertilizzazione (24.000 ha), mentre solo una piccola parte viene concimata con concimi organici.

La gran parte del terreno agricolo è occupato da coltivazioni cerealicole: risaie (17.000 ha), principalmente concentrate nella zona occidentale della regione, e campi di mais (970 ha). La produzione regionale di riso si attesta tra i 15 e le 20.000 t, a seconda delle caratteristiche climatiche. La Regione non è peraltro caratterizzata da diversificazione per la gestione delle coltivazioni, per lo più pure (15.500 ha) e solo in piccola parte consociate o miste. Una parte importante del territorio è destinata alla produzione di tuberose o radici, in particolare sono coltivate la manioca (5.000 ha) e la patata dolce (1.000 ha).

Limitata a soli 300 ha è la coltivazione del fagiolo o delle leguminose in generale, similmente avviene per le colture a destinazione industriale come l'arachide che ha una superficie coltivata di 785 ha (Ministère de l'Agriculture, de l'Élevage et de la Pêche, République de Madagascar, 2012). Il clima della Regione di Ihorombé è di tipo sub-arido, con due stagioni ben distinte: una piovosa che va da novembre a marzo-aprile, ed una stagione fredda e secca che va da aprile fino a ottobre.

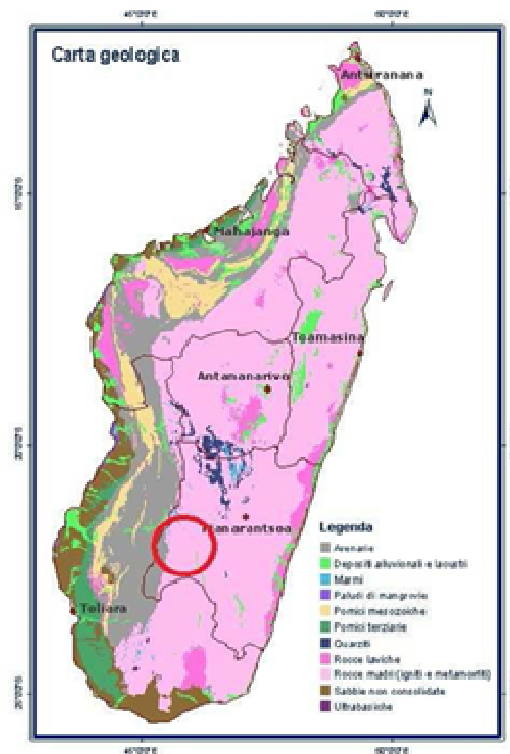


Fig. 7 - Carta geologica, in evidenza la Regione di Ihorombé (Fiori *et al.* 2013)

Le caratteristiche climatiche dell'area di progetto sono state rilevate dalle centraline climatiche disposte in prossimità della cittadina di Satrokala. Il rilevamento dei dati meteorologici è iniziato nel febbraio 2012 ed è durato fino a gennaio 2013.

I dati mancanti per problemi tecnici alla strumentazione, che hanno interessato i mesi di settembre e ottobre, sono stati determinati tramite il confronto con i dati disponibili grazie al rilevamento delle centraline meteo FAO. In particolare, raffrontando i dati delle nostre stazioni con quelli disponibili FAO, ne è stata ricavata una differenza media ed i dati non pervenuti dalle nostre centraline meteo sono stati stimati con appropriate differenze medie. La temperatura più alta si è registrata nel mese di gennaio, quando si sono verificati 34,5°C, mentre la temperatura più bassa è stata registrata nel mese di agosto (3°C). La temperatura media annuale è risultata di 22°C. (Grafico 1).

Come si denota dal grafico 2, le precipitazioni più alte si sono registrate nei mesi di gennaio e aprile 2012, quando sono stati misurati 130 mm di pioggia. I mesi più secchi sono stati settembre, ottobre e novembre quando non si sono verificate precipitazioni. L'umidità atmosferica registrata dalle centraline meteo è stata del 70%.

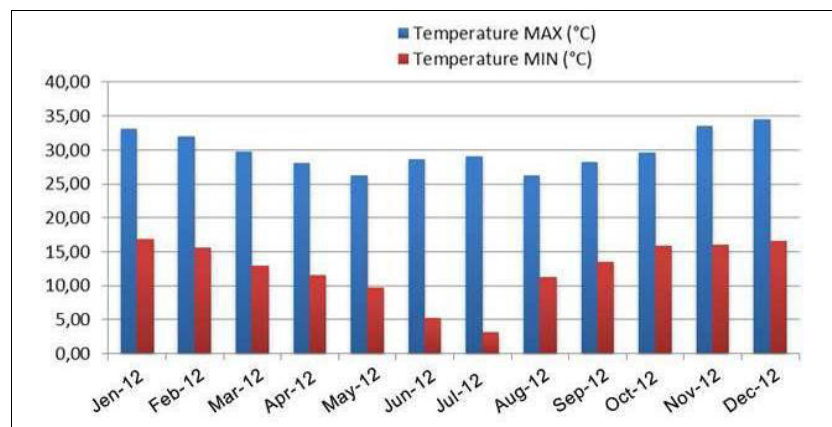


Grafico 1 - Temperature massime e minime mensili nell'anno 2012. Elaborazione dati registrati dalla centralina meteo di Satrokala

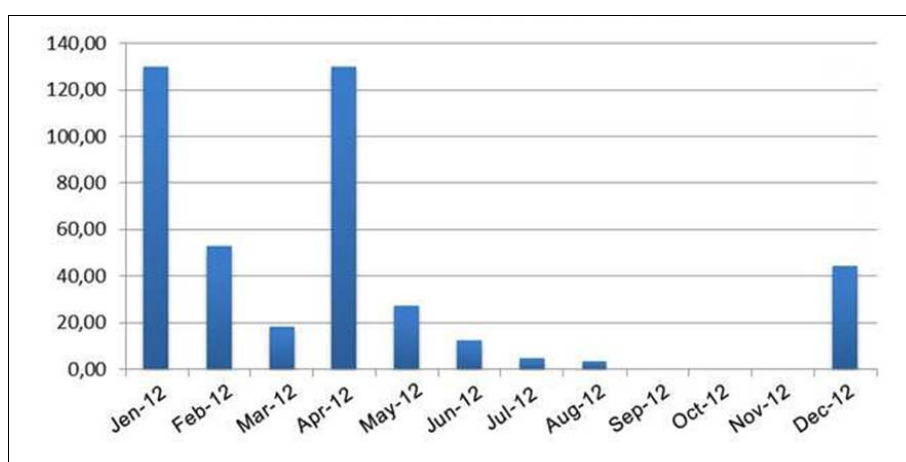


Grafico 2- Precipitazioni mensili (mm). Elaborazione dati registrati dalla centralina meteo di Satrokala

1.6 IL PROGETTO DELLA TOZZI GREEN S.R.L.

Tozzi Green S.r.l. è una società del gruppo Tozzi Holding, subordinata di Tozzi Renewable Energy S.p.a., operante nel settore delle energie rinnovabili con sede a Mezzano di Ravenna. La Società, con la collaborazione del Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente (DISPAA) dell'Università degli Studi di Firenze, è la principale promotrice del progetto che interessa la Regione di Ihorombè, dove sta portando avanti una vasta coltivazione di *Jatropha* per la produzione industriale di biodiesel e biomassa. E' previsto che tale coltivazione raggiungerà la superficie di 100.000 ha mediante l'acquisizione progressiva di terreni, vincolata al rispetto di determinati parametri sociali e ambientali:

- primariamente la realizzazione di strutture sanitarie che possano fornire una prima assistenza agli abitanti del villaggio e dell'area del progetto;
- la realizzazione di un centro veterinario per il supporto zootecnico agli allevatori della zona, e conseguentemente un supporto agronomico grazie ai tecnici presenti, al fine di garantire il miglioramento delle capacità produttive e la sicurezza alimentare;
- creazione di occupazione;
- accesso all'elettricità e all'acqua potabile.

Per di più la scarsa idoneità dei terreni dell'area in oggetto per la coltivazione di colture a fini alimentari eliminerebbe il problema relativo al conflitto esistente tra colture energetiche e colture alimentari.

Il progetto, in cui questo elaborato si inserisce in termini di ricerca, progettazione e supporto in ogni fase operativa, si distingue in 4 differenti attività:

- identificazione delle piante madri, tra le quali dovranno essere scelti individui adatti alla conservazione del materiale genetico mediante la realizzazione di una sorta di banca del germoplasma. Le piante madri, derivanti da ecotipi, devono essere caratterizzate da elevati standard qualitativi e produttivi per quanto riguarda l'olio, avere differenti comportamenti in termini di fioritura oltre che differenze morfologiche.
- realizzazione dell'impianto delle famiglie Half Sib, piante ottenute da semi raccolti dalle piante madri, e loro valutazione genetica e morfologica. Parallelamente dalle piante madri vengono realizzate 20-30 talee che andranno a formare la generazione clonale (Ramet), coltivata in vaso.
- valutazione di *Jatropha mahafalensis* Jum e H. Perrier e di altre specie di *Jatropha* in termini morfologici e genetici, soprattutto al fine di determinarne le potenzialità produttive in olio e per capire se tali specie possano essere incrociate con *Jatropha curcas*.
- realizzazione di varietà migliorate e loro valutazione di parametri agronomici (morfologia, biologia florale ecc.), biochimici (quantità di Phorbolesteri, Curcina ecc.) e genetici.

1.7 SCOPO DELLA TESI

Come già descritto nei paragrafi precedenti, *Jatropha curcas* L. è un'interessante pianta tropicale per fini bioenergetici poiché, oltre ad un olio con caratteristiche qualitative desiderabili per la successiva conversione in biodiesel, riesce a svilupparsi in diverse condizioni ambientali (caratteristiche del suolo, temperatura, umidità, etc.), adattandosi anche in aree marginali, dove non sarebbero possibili coltivazioni alimentari. Queste peculiarità hanno fatto sì che negli ultimi decenni la pianta sia riuscita a catturare l'attenzione di grandi investitori e le piantagioni su larga scala di *Jatropha* sono cresciute enormemente.

Tuttavia, nonostante *Jatropha curcas* L. sia stata introdotta in molti Paesi di Asia, Africa e America latina, ancora oggi si sa molto poco sulle caratteristiche del suo genoma e non sono disponibili varietà migliorate, con tratti desiderabili per specifiche condizioni di crescita e produzione. L'assoluta carenza di varietà certificate o di genotipi selezionati di *Jatropha* rappresenta un fenomeno fortemente limitante proprio quando si voglia sviluppare la coltivazione su larga scala e a questo si aggiunge la conclamata scarsa variabilità genetica della specie stessa. La soluzione più indicata per ovviare a queste problematiche è la creazione di semente selezionata appositamente per l'area di progetto avvalendosi sia del materiale locale (germoplasma locale), sia del germoplasma di altra provenienza geografica. Con questa ricerca è stato quindi possibile dare il via ad un programma di miglioramento genetico di *Jatropha curcas* L. specifico per l'area di interesse, ovvero la Regione di Ihorombé situata nel sud del Madagascar, dove la Tozzi Green opera nel settore della produzione agroalimentare e dei biocarburanti.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è dunque quello di realizzare una preliminare caratterizzazione del germoplasma di *Jatropha*, sia proveniente dalla zona di interesse, sia relativo a diverse provenienze worldwide. La caratterizzazione vuole essere condotta sotto più profili: genetico, morfologico e produttivo, in modo da rendere possibile l'individuazione dei genotipi migliori per questo lavoro di selezione.

Sappiamo inoltre che nell'ambito del miglioramento genetico sono utilizzate numerose tecniche che, se applicate in diverse condizioni e a diversi tipologie di materiale genetico, possono risultare più o meno utili ed efficaci. Con questo lavoro, oltre a selezionare i genotipi ottimali per l'area d'interesse, si vogliono individuare gli strumenti e le linee da seguire per sviluppare il successivo miglioramento genetico su *Jatropha curcas* L.

Cap. 2 - MATERIALI E METODI

Dopo un primo periodo di progettazione ed organizzazione della ricerca, il lavoro pratico ha avuto inizio con la prima missione in Madagascar nel giugno 2011. Durante questa missione è stato possibile collezionare campioni di germoplasma locale di *Jatropha curcas*: essi, insieme alle piante disponibili presso il DISPAA dell'Università di Agraria di Firenze, hanno rappresentato il primo passo per l'avvio del progetto di miglioramento genetico di questa specie, come illustriamo nei seguenti paragrafi.

2.1. COLLEZIONE DI *J. CURCAS* WORLDWIDE E ALLESTIMENTO CAMPO SPERIMENTALE (CLZ)

Un obiettivo di questo lavoro, parallelamente allo sviluppo di una varietà di *Jatropha curcas* basata su germoplasma locale, è quello di avviare una selezione per genotipi superiori (Superior Genotypes) basata anche su germoplasma di *Jatropha curcas* proveniente da molte altre aree del pianeta. A questo scopo è stata utilizzata una vasta collezione di germoplasma presente presso l'Università di Agraria di Firenze (Tab. 4), già caratterizzata sotto il profilo genetico da una precedente tesi di dottorato (Zubieta, 2009), che però non ha ancora avuto caratterizzazione sotto il profilo morfologico e fenotipico se non per i pochi caratteri determinabili nella coltivazione in serra. La stessa collezione rappresenta anche un importante strumento per ampliare la base genetica delle varietà ad impollinazione libera (Open Pollinated Variety, OPV) ed è quindi stata oggetto anche di incroci con il germoplasma locale.

Alcune delle piante di *Jatropha curcas* presenti presso l'Università di Agraria di Firenze sono state raccolte nei luoghi dove questa specie è tradizionalmente presente e altre sono state fornite dalla società Agroils S.r.l., un'azienda italiana che lavora nel settore delle colture energetiche. La collezione è arricchita di continuo con nuove accessioni sia della specie oggetto di studio, sia di specie affini come *Jatropha podagrica* Hook, *Jatropha mahafalensis* Jum e H. Perrier e *Jatropha multifida* Linn. Ciascuna accessione è stata propagata da seme e le piante sono mantenute in vaso. Durante l'inverno esse sono collocate in serra, mentre nel periodo estivo sono trasferite sotto la screen-house allestita presso l'Istituto Tecnico Agrario di Firenze.

Nel dicembre 2011 le piante sono state trasferite in Madagascar, presso l'azienda agricola di proprietà della Tozzi Green a Satrokala, nella forma di astoni capitozzati a radice nuda e sono state immediatamente trapiantate a dimora, secondo lo schema di campo descritto in figura 8 le cui sigle, che indicano le diverse provenienze, sono chiarite in tabella 4.

La possibilità di avere tale materiale a disposizione in loco risulta indispensabile per il lavoro di miglioramento genetico ed anche ai fini del progetto di breeding, per la realizzazione di incroci intraspecifici tra piante di *J. curcas* di diverse provenienze. Allo stesso tempo è possibile generare utile variabilità genetica mediante la creazione di ibridi interspecifici con altre specie del genere *Jatropha*. Dal gennaio 2012 è stato quindi possibile raccogliere dati morfologici su 399 singoli individui (non cloni) appartenenti alle diverse provenienze.

SPECIE	PROVENIENZA	SIGLA	N° PIANTE Firenze	N° PIANTE Satrokala
<i>J. curcas</i>	Alagoinhas (Brasile)	AL	6	3
<i>J. curcas</i>	Arusha	AR	50	34
<i>J. curcas</i>	Brasile	BR	150	103
<i>J. curcas</i>	Capo Verde	CV	2	1
<i>J. curcas</i>	Cina	RC	5	
<i>J. curcas</i>	Congo	CO	10	4
<i>J. curcas</i>	Costa Rica	CR	8	1
<i>J. curcas</i>	Egitto	EG	6	2
<i>J. curcas</i>	Ghana	GH	6	
<i>J. curcas</i>	India	IN	5	1
<i>J. curcas</i>	Mato Grosso	MG	20	9
<i>J. curcas</i>	Messico	MX	10	2
<i>J. curcas</i>	Mozambico	MZ	50	39
<i>J. curcas</i>	Nicaragua	NI	10	5
<i>J. curcas</i>	Norte de Minas Gerais (Brasile)	NM	12	6
<i>J. curcas</i>	Norte Est Minas Gerais (Brasile)	NE	12	8
<i>J. curcas</i>	Paraguay	PA	5	75
<i>J. curcas</i>	Paranà (Brasile)	PR	6	
<i>J. curcas</i>	Senegal	SN	6	
<i>J. curcas</i>	Suriname	SU	165	82
<i>J. curcas</i>	Tailandia	TH	20	2
<i>J. curcas</i>	Tanzania	TZ	120	5
<i>J. mahafalensis</i>	Madagascar		1	
<i>J. podagrica</i>	Giardino Botanico Firenze		2	

Tab. 4 - Collezione di *Jatropha curcas* presso il DISPAA e numero di esemplari trasferiti a Satrokala

1	BR	PA	SU	MZ	AR	PA	MZ	BR	BR	SU	NM	TZ	PA	BR	SU	PA	X	SU	BR	1
2	BR	PA	SU	MZ	AR	PA	MZ	BR	BR	SU	NM	TZ	PA	BR	SU	PA	AL	SU	BR	2
3	BR	PA	SU	MZ	AR	PA	NI	BR	BR	SU	NM	TZ	PA	BR	SU	PA	AL	SU	BR	3
4	BR	PA	SU	BR	AR	PA	NI	BR	BR	SU	NM	TZ	PA	BR	SU	PA	NE	SU	BR	4
5	BR	PA	SU	MZ	AR	IN	NI	BR	BR	SU	NM	X	CR	BR	SU	MX	AL	SU	BR	5
6	BR	PA	SU	MZ	AR	PA	NI	BR	BR	SU	NM	TZ	PA	BR	SU	MX	NE	SU	BR	6
7	BR	PA	SU	MZ	AR	PA	NI	BR	BR	SU	NM	BR	PA	BR	SU	PA	NE	SU	BR	7
8	BR	PA	SU	MZ	AR	PA	PA	BR	BR	SU	NM	BR	PA	BR	SU	EG	NE	SU	TH	8
9	BR	PA	SU	MZ	AR	PA	PA	BR	BR	SU	X	BR	PA	BR	SU	EG	NE	SU	BR	9
10	BR	PA	SU	MZ	AR	PA	PA	BR	BR	SU	X	BR	PA	BR	SU	PA	NE	SU	BR	10
	U	T	S	R	Q	P	O	N	M	L	I	H	G	F	E	D	C	B	A	
11	SU	AR	PA	BR	PA	PA	BR	SU	X	PA	BR	MZ	PA	AR	MZ	MG	BR	BR	SU	11
12	SU	AR	PA	BR	PA	PA	BR	SU	X	PA	X	MZ	PA	AR	MZ	MG	BR	BR	SU	12
13	SU	AR	X	BR	PA	PA	BR	SU	CO	PA	BR	TH	PA	AR	MZ	MG	BR	BR	SU	13
14	SU	AR	PA	BR	PA	PA	BR	SU	CO	PA	BR	TH	PA	AR	MZ	MG	BR	BR	SU	14
15	SU	AR	PA	BR	PA	CV	BR	SU	CO	SU	BR	X	PA	AR	MZ	MG	BR	BR	SU	15
16	SU	AR	PA	BR	PA	PA	BR	SU	CO	SU	BR	X	PA	AR	MZ	MG	BR	BR	SU	16
17	SU	AR	PA	BR	PA	PA	BR	SU	AR	SU	BR	X	PA	AR	MZ	MG	BR	BR	SU	17
18	SU	AR	PA	BR	PA	PA	BR	SU	AR	SU	BR	SU	PA	AR	MZ	MG	BR	BR	SU	18
19	SU	AR	PA	BR	SU	PA	BR	SU	AR	SU	BR	SU	PA	AR	MZ	MG	BR	BR	SU	19
20	X	AR	PA	BR	SU	PA	BR	SU	AR	SU	BR	SU	X	AR	MZ	SU	BR	BR	SU	20
21	MZ	MZ	MZ	MZ	MZ	MZ	MG	MZ	MZ	MZ	X	MZ	MZ	MZ	MZ	MZ	X	X	X	21
	U	T	S	R	Q	P	O	N	M	L	I	H	G	F	E	D	C	B	A	

Fig. 8 - Disposizione delle piante di *Jatropha curcas* collezione CLZ

2.2 COLLEZIONE DEL GERMOPLASMA MALGASCIO E ALLESTIMENTO CAMPI SPERIMENTALI

Il germoplasma malgascio è stato raccolto durante una specifica missione in Madagascar durante la quale sono state individuate, da diverse aree, 45 piante di *Jatropha curcas* scelte sulla base della loro posizione geografica e della fenologia; per ciascuna pianta individuata sul territorio venivano prelevati:

- posizione GPS;
- scheda di descrizione morfologica;
- n° 5 talee di circa 50 cm di lunghezza;
- un numero consistente di semi maturi di cui una piccola parte è stata trasferita presso i laboratori del DISPAA.
- fotografie digitali di pianta intera, foglie (Foto 13 e 14) e frutti

Gli individui selezionati sono le Piante Madri (PM), tecnicamente denominati “ortet” e, come previsto dalla fase progettuale, la loro individuazione ha rappresentato una parte fondante del progetto di miglioramento genetico. Le PM ideali, per definizione, dovrebbero essere piante adulte, in fase riproduttiva, sane, chiaramente individuabili sul territorio poiché devono rimanere a disposizione per tutta la durata del progetto.

Con tutte le PM è stato quindi realizzato un database contenente informazioni, fotografie e in grado di ospitare i dati morfologici ed i rilievi dal momento della raccolta in poi.

Durante la missione sono state recuperate 45 PM dalle principali aree in cui è presente *Jatropha curcas* in Madagascar (Foto 12) e classificate con codice da JC1 a JC45.



Foto 12 - Geo-localizzazione del prelievo di germoplasma durante la missione di giugno 2011

Le piante con codici da JC1 a JC23 sono provenienti dalle aree del Sud del Madagascar mentre quelle da JC24 a JC45 sono di aree del centro-nord con condizioni climatiche molto diverse tra di loro.

Alcune delle PM provengono da gruppi di piante più o meno isolate, individuate in piccoli appezzamenti quali orti familiari, siepi frangivento, ecc. mentre altre sono state localizzate all'interno di vecchie popolazioni naturalizzate, residui di antiche coltivazioni di *Jatropha*, avviate intorno agli anni '60.



Foto 13 - *Jatropha curcas* (JC18_21.06), pianta intera



Foto 14 - *Jatropha curcas* (JC18_21.06), foglie

2.2.1 Procedura per l'individuazione del sito di prelievo PM

Il sito geografico viene individuato inizialmente su mappa per evidenti motivi di logistica e per poter scegliere una popolazione o l'altra in modo da avere la più ampia copertura del territorio possibile.

I siti sono stati quindi scelti sulla base di due principali condizioni: a) le popolazioni sono naturalizzate o b) le popolazioni sono una coltivazione attiva o una popolazione clonata.

Il protocollo per le due condizioni è quindi stato diverso:

- all'interno di popolazioni naturalizzate (Foto 15), come alcune localizzate nel sud dell'isola, sono selezionati alcuni individui e campionati: ogni individuo dovrebbe essere rappresentativo della media della popolazione. Una buona procedura è quella di camminare attraverso l'appezzamento da un lato all'altro. Quando siano presenti più popolazioni nella stessa area geografica è necessario campionarle tutte.
- Per le piante in coltivazione (Foto 16), che si suppone provengano da clonaggi e da semi di origine locale, è preferibile invece campionare pochi soggetti di ciascuna coltivazione e molteplici coltivazioni. Ad esempio se in un'area vi sono più coltivazioni è bene campionare una pianta ogni 2-3 km in linea d'aria.



Foto 15 – Popolazione naturalizzata di *Jatropha curcas* presso il villaggio Milioke

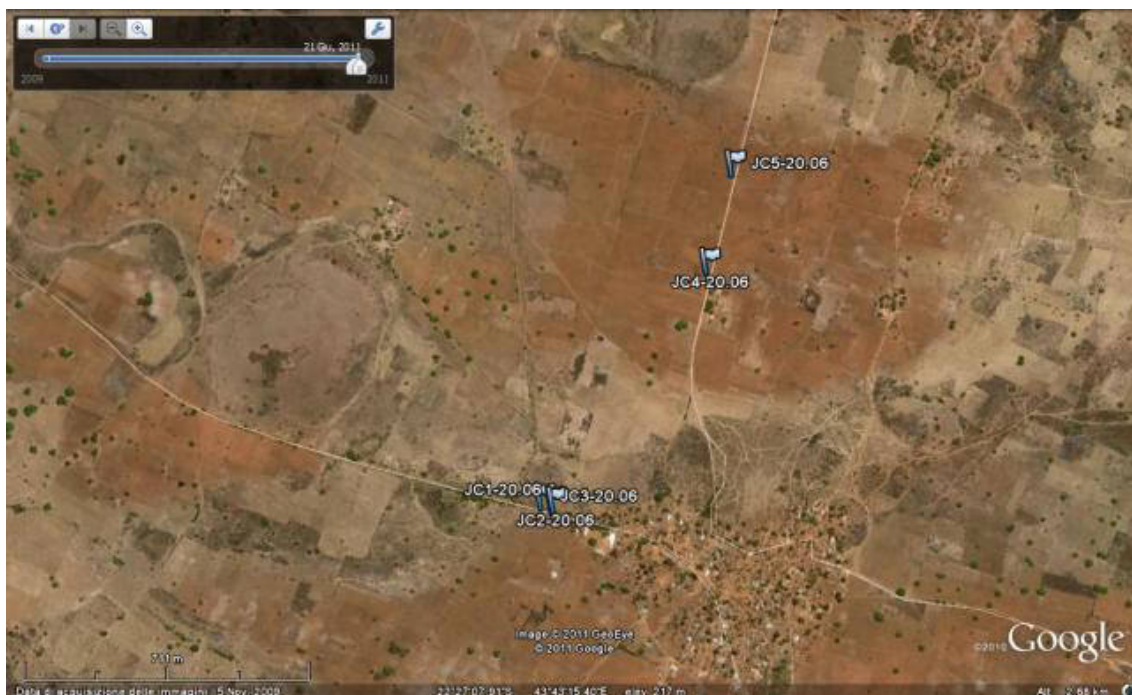


Foto 16 - Popolazione di cloni di *Jatropha* presso i villaggi di Ankililaly e Betsioke

2.2.2 Classificazione GPS e attribuzione del codice di identificazione pianta

Durante la procedura di campionamento era sempre presente un dispositivo GPS GARMIN OREGON 550t acceso, ai fini di avere una traccia GPS sempre attiva.

Per ogni pianta di *Jatropha* ritenuta interessante per gli scopi della ricerca, è stata registrata la posizione GPS, come illustrato nel seguente esempio indicativo:

GPS POSITION

JC1_18.06

22°27'20.87\"S

43°43'17.57\"E

dove:

- JC: è il codice per *Jatropha curcas*; tale codice è JM per *Jatropha mahafalensis*.
- 1: è il numero progressivo (variabile da 1 a 45) assegnato a ciascuna pianta madre.
- 18.06: è la data (18 Giugno), di aiuto nel caso di problemi di attribuzione che potrebbero sorgere a posteriori.

Lo stesso codice viene riportato sul supporto cartaceo e sul software di geo-localizzazione Google Earth. Dopo il campionamento è quindi possibile compilare la scheda dati relativa alla pianta, anche con dati riferiti all'area geografica in cui il campionamento è stato effettuato.

Al termine della raccolta si è potuto procedere alla delimitazione di 4 macro aree di campionamento e quindi di provenienza delle accessioni:

- **area di Tulear**, (accessioni da JC1 a JC6): area prevalentemente arida e calda, caratterizzata da presenza sporadica di piante di *Jatropha curcas* (massiccia invece la presenza di *Jatropha mahafalensis*);
- **area di Milioke**, (accessioni da JC7 a JC23): area prevalentemente arida e calda, caratterizzata da presenza di popolazioni naturalizzate di *Jatropha curcas* provenienti da coltivazioni impiantate negli anni 60 finalizzate alla produzione di sapone, poi abbandonate;
- **area del Centro Nord**, (accessioni da JC24 a JC33): area dal clima più fresco e piovosità media, caratterizzata da presenza di piante impiegate soprattutto per la realizzazione di siepi e barriere;
- **area della Costa Est**, (accessioni da JC34 a JC45): area con piovosità e temperature molto elevate (fino a 2.000 mm/annui), caratterizzata dalla presenza di piante spontanee isolate e di piante ad uso siepe.

2.2.3 Procedura di campionamento

Dopo aver registrato le coordinate GPS è annotata una breve descrizione della pianta su supporto cartaceo e sono prese due foto relative alle foglie della PM d'interesse (Foto 17, 18) se possibile avendo una scala metrica di riferimento, utile per la successiva elaborazione dei dati. Per ogni PM il materiale campionato è rappresentato da:

- **num. 5-6 talee apicali** di lunghezza variabile da 30 a 50 cm ciascuno, per il successivo allestimento del campo sperimentale di cloni di piante madri. Gli apici si dovevano presentare in buona salute e senza foglie. I campioni individuati sono stati memorizzati con lo stesso codice GPS della PM, quindi avvolti in carta assorbente inumidita e legati con parafilm.
- **num. 20-30 semi maturi**, per la creazione delle progeny row. I semi erano raccolti in sacchetti di carta su cui era riportato il codice GPS della PM.
- **num. 5-10 semi maturi**, per le analisi di caratterizzazione genetica effettuate presso il DISPAA.

Tutte le foto sono memorizzate usando l'appropriato codice GPS e appropriate abbreviazioni che ne identifichino il contenuto, in particolare è stato utilizzato:

Pic 1: foto di pianta intera; Pic 2: foto con 3 foglie; Pic 3: foto con una foglia (Foto 17,18).

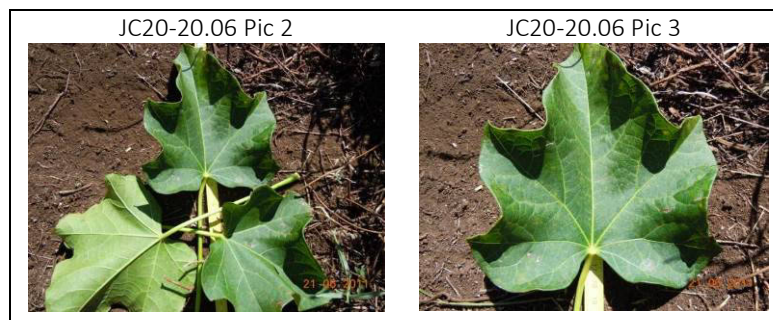


Foto 17,18 - Campionamento pianta madre, materiale fotografico

2.3 ALLESTIMENTO DEI CAMPI SPERIMENTALI DI GERMOPLASMA MALGASCIO

Lo schema di campo organizzato con il germoplasma malgascio ha previsto l'allestimento di due campi sperimentali:

- a) un campo di mantenimento dei cloni delle PM,
- b) un campo di valutazione delle piante provenienti dalla semente raccolta (Progenie Half Sib – Hsib).

2.3.1 Campo di mantenimento dei cloni delle PM

Le talee provenienti dalle PM sono state prima piantate nel vivaio quindi trapiantate nei campi sperimentali seguendo lo schema riportato di seguito (Fig. 9).

Come si può vedere, nello schema di campo sono presenti tre tipologie di piante descritte come:

- **BORDER PLANT:** sono le piante di *Jatropha curcas* distribuite sui bordi del campo sperimentale e provenienti da talee. Queste piante devono avere la stessa età delle piante del campo sperimentale e possono provenire da talee di qualsiasi provenienza, non necessariamente dal Madagascar;
- **PLOT PLANTS:** sono le piante provenienti da talee della collezione del germoplasma; per ogni blocco sono organizzate file di 5 individui e le piante di ciascuna fila provengono dalla stessa PM. Le Plot Plants rappresentano la PROGENY ROW dalle talee, tecnicamente detta RAMET.
- **TEST PLANTS:** sono piante che provengono da talee prelevate da una sola pianta individuata nell'area di coltivazione. Lo scopo di questa tipologia di piante è di permettere una comparazione tra cloni differenti posti in diversi blocchi utilizzando gli opportuni metodi statistici.



Fig. 9 - Schema del campo di mantenimento dei cloni delle PM

2.3.2 Campo di valutazione della progenie Half Sib

Nei mesi di giugno e luglio 2011 i semi provenienti dalle piante madri sono stati seminati in vivaio all'interno di fitocelle; le piantine così ottenute rappresentano le famiglie Half Sib, ciascuna delle quali è costituita da 20 individui che al momento opportuno di sviluppo (circa 3 mesi) sono state poi trapiantate secondo lo schema illustrato in fig. 10.

Il protocollo di trapianto prevedeva l'utilizzo del seguente materiale vegetale:

- **PLOT PLANTS:** piante che provengono dalle semine dei semi delle PM, trapiantate in file di 10 individui, seguendo lo schema della progenie fila (PROGENY ROW). Rappresentano le famiglie HSib.
- **TEST PLANTS:** piante provenienti da semi appositamente raccolti da un'unica pianta individuata nell'area di progetto. Si tratta di una pianta di dimensioni medio-grandi in grado di fornire semente per più anni. Si prevede di realizzare una progeny row di questo germoplasma in ciascun sub-plot allestito possibilmente in posizione centrale, con l'obiettivo di fornire un valido supporto di riferimento per valutare la covarianza tra blocchi diversi.
- **BORDER PLANTS:** Piante poste in posizione laterale nello schema sperimentale per mitigare l'effetto bordo, si tratta di materiale genetico presente in vivaio, non classificato, che al momento del trapianto ha lo stesso stadio di sviluppo delle famiglie HSib.

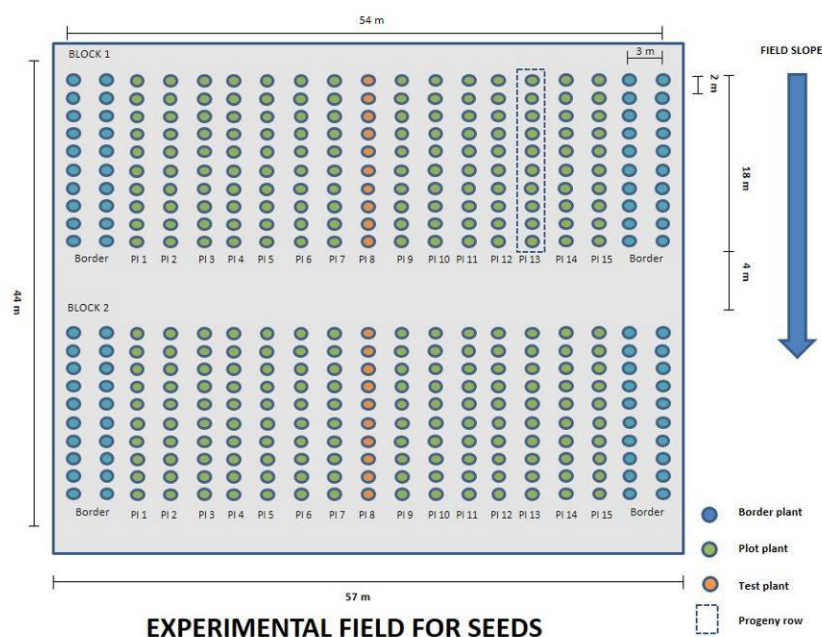


Fig. 10 - Schema del campo di progenie HSib

Nel dicembre del 2011 è stato realizzato il trapianto delle piantine seguendo lo schema illustrato. Tuttavia, a causa dell'elevato numero di accessioni è stato necessario allestire due blocchi separati così come illustrato nelle figure 11 e 12, in cui i numeri identificano le diverse piante madri da cui gli Half Sib provengono. L'unico problema è stato rappresentato dalla accessione JC5 i cui semi non hanno germinato e di cui quindi non è stato possibile avere misurazioni.

La pianta scelta come Tester è stata individuata nel villaggio di Andiolava a circa 25 km dai campi sperimentali, si tratta di un soggetto di grandi dimensioni dell'età apparente di 20-25 anni.

Le piante impiegate come bordo sono state prelevate tra le piante coeve alle famiglie HSib presenti in vivaio.

1	B	B	41	44	11	37		16	39	T	4	20	17	34	22	3	10	B	B	1
2	B	B	41	44	11	37		16	39	T	4	20	17	34	22	3	10	B	B	2
3	B	B	41	44	11	37		16	39	T	4	20	17	34	22	3	10	B	B	3
4	B	B	41	44	11	37		16	39	T	4	20	17	34	22	3	10	B	B	4
5	B	B	41	44	11	37		16	39	T	4	20	17	34	22	3	10	B	B	5
6	B	B	41	44	11	37		16	39	T	4	20	17	34	22	3	10	B	B	6
7	B	B	41	44	11	37		16	39	T	4	20	17	34	22	3	10	B	B	7
8	B	B	41	44	11	37		16	39	T	4	20	17	34	22	3	10	B	B	8
9	B	B	41	44	11	37		16	39	T	4	20	17	34	22	3	10	B	B	9
10	B	B	41	44	11	37		16	39	T	4	20	17	34	22	3	10	B	B	10
	U	T	S	R	Q	P	O	N	M	L	I	H	G	F	E	D	C	B	A	
11	B	B	21	18		15	31	29		T	42	19	25	38	1	26	2	B	B	11
12	B	B	21	18		15	31	29		T	42	19	25	38	1	26	2	B	B	12
13	B	B	21	18		15	31	29		T	42	19	25	38	1	26	2	B	B	13
14	B	B	21	18		15	31	29		T	42	19	25	38	1	26	2	B	B	14
15	B	B	21	18		15	31	29		T	42	19	25	38	1	26	2	B	B	15
16	B	B	21	18		15	31	29		T	42	19	25	38	1	26	2	B	B	16
17	B	B	21	18		15	31	29		T	42	19	25	38	1	26	2	B	B	17
18	B	B	21	18		15	31	29		T	42	19	25	38	1	26	2	B	B	18
19	B	B	21	18		15	31	29		T	42	19	25	38		26	2	B	B	19
20	B	B	21	18		15	31	29		T	42	19	25	38		26	2	B	B	20
	U	T	S	R	Q	P	O	N	M	L	I	H	G	F	E	D	C	B	A	

Fig. 11 - Disposizione famiglie HSib: sub-plot 1

1	B	B	32	33	30	14		27	6	T		36	23	8	12	45		B	B	1
2	B	B	32	33	30	14		27	6	T		36	23	8	12	45		B	B	2
3	B	B	32	33	30	14		27	6	T		36	23	8	12	45		B	B	3
4	B	B	32	33	30	14		27	6	T		36	23	8	12	45		B	B	4
5	B	B	32	33	30	14		27	6	T		36	23	8	12	45		B	B	5
6	B	B	32	33	30	14		27	6	T		36	23	8	12	45		B	B	6
7	B	B	32	33	30	14		27	6	T		36	23	8	12	45		B	B	7
8	B	B	32	33	30	14		27	6	T		36	23	8	12	45		B	B	8
9	B	B	32	33	30	14		27	6	T		36	23	8	12	45		B	B	9
10	B	B	32	33	30	14		27	6	T		36	23	8	12	45	5	B	B	10
	U	T	S	R	Q	P	O	N	M	L	I	H	G	F	E	D	C	B	A	
11	B	B	24	28	40		7			T				9	35	13	43	B	B	11
12	B	B	24	28	40		7			T				9	35	13	43	B	B	12
13	B	B	24	28	40		7			T				9	35	13	43	B	B	13
14	B	B	24	28	40		7			T				9	35	13	43	B	B	14
15	B	B	24	28	40		7			T				9	35	13	43	B	B	15
16	B	B	24	28	40		7			T				9	35	13	43	B	B	16
17	B	B	24	28	40		7			T				9	35	13		B	B	17
18	B	B	24	28	40		7			T				9	35	13		B	B	18
19	B	B	24	28	40		7			T				9	35	13		B	B	19
20	B	B	24	28	40		7			T				9	35	13		B	B	20
	U	T	S	R	Q	P	O	N	M	L	I	H	G	F	E	D	C	B	A	

Fig. 12 - Disposizione famiglie HSib: sub-plot 2

2.4 RACCOLTA DATI NEI CAMPI SPERIMENTALI

Dopo il trapianto e l'allestimento dei campi sperimentali è iniziata un'intensa campagna di raccolta dati, raccolta campioni vegetali e annotazione dati meteo.

I dati relativi alle piante sono sia di tipo vegetativo che riproduttivo. In fig. 13 si può osservare la lista delle variabili inserite nelle schede di raccolta dati predisposte.

I dati sono prelevati con cadenza trimestrale sia sulle famiglie HSib che sulle PM.

Tutti i dati raccolti sono stati successivamente sottoposti ad analisi statistica.

DONNE' VEGETATIF										
ID Chambre	ID Position Pla	ID Plante	Date Prelevement Données	Hauter Plante (cm)	Hauter Branche Coupé (cm)	Canopée (mm)	Diamètre Plante (mm)	n° Branche	Longueur Feuille (mm)	Largeur Feuille (mm)
Longueur Pétiole 1	Longueur Pétiole 2	Longueur Pétiole 3	Couleur du Pétiole	Couleur du Pétiole Special	Intens. Color Verte Feuille	SPAD	Mesure Feuille n° Photo	Note	Photo	
DONNE' REPRODUCTIVE										
ID Chambre	ID Position Pla	ID Plante	Date Prelevement Données	Nombre de floraison (cluster / plante)	Fleur male sélectionnée dans le cluster n°1	Fleur male sélectionnée dans le cluster n°2	Fleur male sélectionnée dans le cluster n°3	Fleur femelle sélectionnée dans le cluster n°1	Fleur femelle sélectionnée dans le cluster n°2	Fleur femelle sélectionnée dans le cluster n°3
Nombre total des fruits par plante	Nombre total des fruits par cluster (selectionné) par plante	Nombre de fruits par cluster n°1	Nombre de fruits par cluster n°2	Nombre de fruits par cluster n°3	Diamètre moyen des fruits par cluster sélectionné (mm)	Diamètre des fruits par cluster 1 (mm)	Diamètre des fruits par cluster 2 (mm)	Diamètre des fruits par cluster 2 (mm)	Longueur moyenne des fruits par cluster sélectionnée (mm)	Longueur moyenne des fruits par cluster 1 (mm)
Longueur moyenne des fruits par cluster 2 (mm)	Longueur moyenne des fruits par cluster 3 (mm)	Couleur des fruits**	Période de la formation des fruits	Saison d'initiation de la fructification	Poids total des fruits par cluster sélectionné	Poids des fruits par cluster 1 (g)	Poids des fruits par cluster 2 (g)	Poids des fruits par cluster 2 (g)	Nombre des graines total par plante	Nombre moyen des grains par cluster sélectionné
Poids des grains par cluster 1	Poids des grains par cluster 2	Poids des grains par cluster 3	Note	Photo						

Fig. 13 - Variabili rilevate sulle famiglie HSib

La procedura di prelevamento dati ha previsto che ad ogni data di rilievo fossero misurati i seguenti parametri dimensional su tutte le piante appartenenti alle tre categorie (PM, HSib e CLZ):

1. altezza della pianta (Hpia): espressa in cm e misurata dal livello del suolo all'apice vegetativo più sviluppato,
2. diametro del fusto (DIAPia): misurazione mediante calibro elettronico espressa in mm del fusto della pianta a 10 cm dal suolo.
3. numero delle ramificazioni (NRAM): numero delle ramificazioni primarie rilevate (se presenti ramificazioni secondarie sono riportate su altra scheda dati)
4. diametro della chioma (CANOPY): misurazione dell'ampiezza della chioma espressa in cm e determinata con metro rigido.

5. lunghezza della foglia (LunFOG): misurazione mediante calibro espressa in mm della distanza tra l'attaccatura del picciolo e l'apice fogliare.
6. larghezza della foglia (LarFOG): misurazione mediante calibro espressa in mm della distanza tra i due apici laterali.
7. SPAD: misurazione del contenuto di clorofilla delle foglie mediante apparecchio SPAD Minolta ed espressa in unità SPAD.
8. lunghezza del picciolo 1: misurazione con calibro della distanza tra inserzione del picciolo sul fusto e attaccatura della lamina fogliare, espressa in mm e misurata su picciolo campionato sui palchi più alti della pianta.
9. lunghezza del picciolo 2: misurazione con calibro della distanza tra inserzione del picciolo sul fusto e attaccatura della lamina fogliare, espressa in mm e misurata su picciolo campionato sui palchi intermedi della pianta.
10. lunghezza del picciolo 3: misurazione con calibro della distanza tra inserzione del picciolo sul fusto e attaccatura della lamina fogliare, espressa in mm e misurata su picciolo campionato sui palchi basali della pianta.
11. numero di cluster per pianta: determinazione del numero di cluster fiorali presenti per pianta.
12. numero di fiori maschili per cluster e per pianta
13. numero di fiori femminili per cluster e per pianta
14. numero di frutti per cluster e per pianta
15. diametro e lunghezza dei frutti
16. colore dei frutti a maturità
17. numero di semi per frutto e per pianta
18. peso dei semi per cluster e per pianta

Inoltre, durante ciascun campionamento vengono rilevati ed annotati alcuni parametri qualitativi quali il colore dei frutti, del picciolo ecc.

I parametri dal n° 11 al n° 18 sono stati rilevati solo sul limitato numero di individui produttivi delle piante madri edella collezione. Per questo motivo non è stato possibile procedere con l'elaborazione dei dati, perché ancora non sufficienti e rappresentativi.

2.5 SCHEMI DI MIGLIORAMENTO GENETICO

I dati necessari per l'analisi della variabilità fenotipica, e quindi per la stima dei parametri utili per la selezione, sono rappresentati da misurazioni eseguite sugli individui appartenenti a quella speciale popolazione artificiale, prodotta secondo un appropriato schema di incroci (*mating design*) ed allevata in accordo a disegni sperimentali di campo che consentono di tenere sotto controllo i fattori ambientali e misurare la variabilità ambientale da essi determinata.

La prima operazione consiste nella produzione di famiglie e nel nostro caso, in riferimento al materiale di origine malgascia, si utilizzano le famiglie Half Sib allevate in progenie fila (o progeny row) e le piante madri (o Ramet) allevate in fila. Il disegno è brevemente riassunto nello schema della fig. 14, i cui task fondamentali sono poi di seguito descritti.

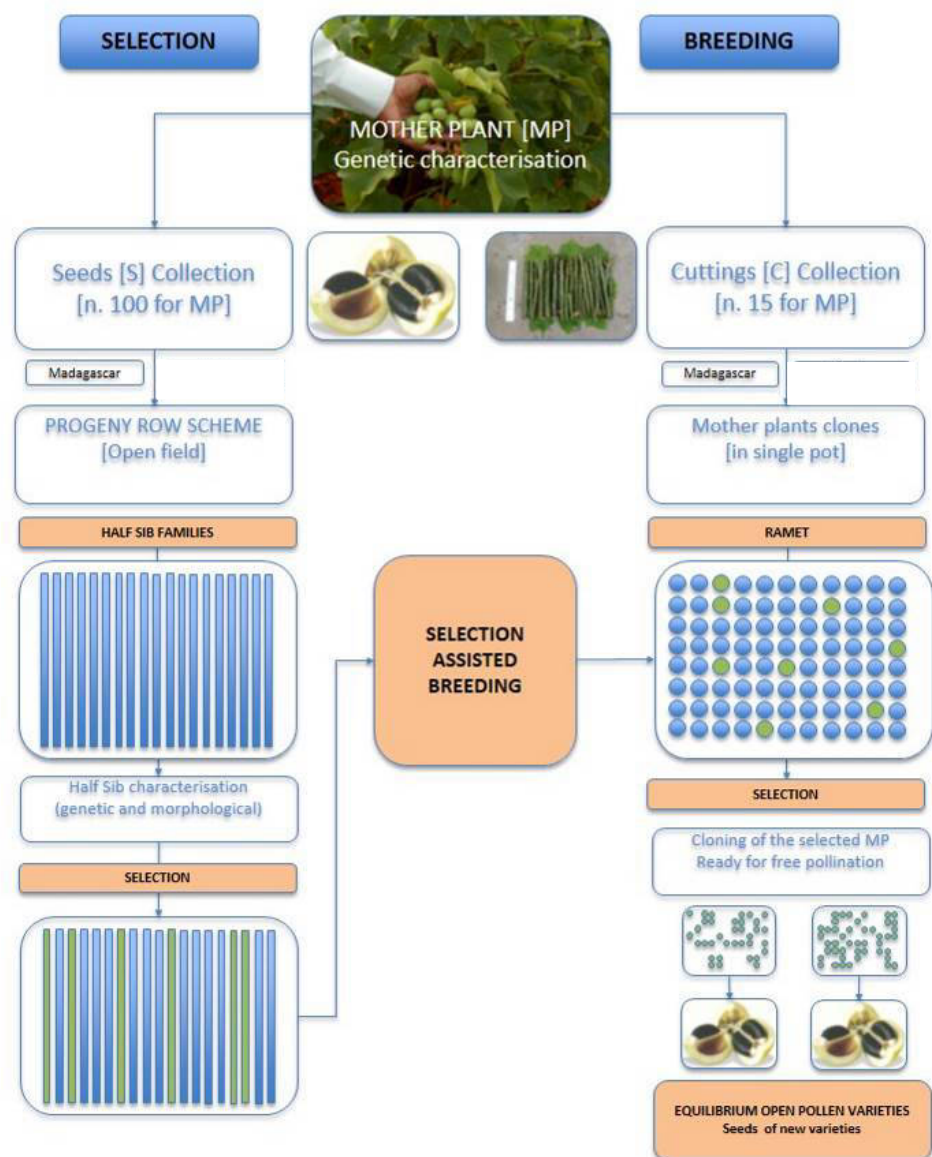


Fig. 14 – Schema di breeding assistito

Sulle famiglie Half Sib e sulle piante madri allevate in pieno campo sono stati effettuati i rilievi fenologici descritti nel paragrafo 2.4 e sulla base dei quali, dopo appropriata analisi statistica, è possibile stimare: le quote di varianza additiva, la varianza fenotipica e l'ereditabilità dei caratteri.

La caratterizzazione permette non solo di effettuare un primo screening e selezione del germoplasma più promettente, ma anche di poter progettare la tipologia di mating design più adatto per valutare le progenie e l'attitudine combinatoria generale.

Tra i mating design che si ipotizza di poter impiegare i principali sono:

- North Caroline Model 2 (NCM2): la progenie è ottenuta incrociando m piante impiegate come maschi e n piante impiegate come portaseme; generalmente si producono diversi *sets* di incroci $m \times n$, utilizzando piante diverse e generando assieme progenie Half Sib e Full Sib.
- Incrocio Diallelico: tutte le combinazioni possibili tra n individui (impiegati come maschio e come femmina). Molto complesso da gestire nella sua versione completa, più semplice nelle versioni parziali.

Un analogo metodo si applica anche alla collezione worldwide (CLZ) per la quale si ipotizza di effettuare incroci controllati tra i migliori individui scelti da ciascuno dei gruppi che saranno identificati in funzione dell'analisi delle componenti principali.

I *mating design* applicati ad entrambe le tipologie di germoplasma (collezione worldwide e materiale malgascio) rappresentano un ulteriore strumento di valutazione che consentirà di inserire i geni della popolazione mondiale nel germoplasma malgascio.

L'obiettivo principale rimane comunque quello di ottenere una popolazione su base di germoplasma malgascio costituita da un pool genico segregante per molti caratteri.

2.5.1 Stima della varianza additiva tra progenie HSib

I dati raccolti durante ciascun anno di sperimentazione sono quindi sottoposti ad elaborazione statistica basata sull'analisi univariata della varianza (ANOVA) ove le famiglie HSib sono considerate fattore ad effetto casuale.

Le componenti attese della varianza per le variabili misurate sono descritte in tabella 5. Negli anni successivi la Fonte di Variazione "Tra Anni" sarà considerata come misura ripetuta (Falconer 1981).

ALTEZZA PIANTA					
Fonti di Variazione	DEVIANZA	G.d.L.	VARIANZA	Componente attesa della varianza	Significatività
TRA FAMIGLIE HSIB	52554,661	43	1222,201	$\sigma^2_{\text{fam}} + \frac{1}{4}\sigma^2_{\text{add}}$	**
Errore	81368,800	370	219,918	σ^2_{errore}	
Totale	133923,461	414			
ALTEZZA PIANTA					
Stima ereditabilità					
σ^2_{fam}	109,659				
Media Armonica	5,143				
σ^2_{add}	438,637				
Varianza fenotipica	658,553				
h^2	0,666				

Tab. 5 – Modello ANOVA dell'analisi della varianza e attesi della varianza (per la variabile Altezza Pianta)

La componente della varianza attesa "tra Famiglie HSib" è legata alla varianza delle Famiglie HSib stesse e rappresenta un quarto (1/4) della varianza genetica additiva.

2.5.2 Produzione e breeding delle piante madri (Generazione Ramet)

Un limitato numero di talee da ciascuna PM è prelevato e allevato in vaso singolo. Queste piante rappresentano la generazione ottenuta per clonaggio delle piante madri (Ramet), coltivata in vaso.

La coltivazione in vaso ha lo scopo di poter allestire, movimentando i vasi secondo opportuni schemi di disposizione spaziale, campi di produzione semente per libera impollinazione (Open Pollinated Variety - OPV) sulla base delle performance delle piante madri, valutate sia mediante la generazione Ramet che mediante le progenie HSib.

2.5.3 Costruzione delle griglie di valutazione

Dopo la caratterizzazione delle PM e la selezione delle progenie delle famiglie HSib, attraverso la stima della varianza genetica additiva sarà possibile costruire per ciascun anno una griglia dinamica di valutazione (Fig. 15). Tale griglia di valutazione (GdV) consentirà di effettuare la selezione assistita delle piante Ramet mediante la caratterizzazione delle PM e delle Famiglie HSib; in essa tutti i parametri misurati sono riportati e stimati in termini di livelli di qualità (dal peggiore al migliore).

GdV saranno impiegate nella strategia di breeding come parentali comuni per il back crossing.

I parametri utilizzati per completare le GdV saranno principalmente legati a:

- **parametri agronomici:**

- morfologici e produttivi
- precocità di fioritura
- resistenza a malattie
- resistenze abiotiche

- **parametri biochimici**

- contenuto di Phorbolesteri
- contenuto e qualità dell'olio

- **parametri genomici**

- markers di variabilità
- markers di tossicità
- markers di fioritura

2.5.4 Produzione di Open Pollination Varieties (OPV)

Una selezione carattere-specifica dei migliori Ramet sarà quindi effettuata sulla base delle GdV e con essi (in vaso o in pieno campo) saranno fisicamente reallizzati degli appezzamenti atti a ottenere e favorire eventi di libera impollinazione. I semi provenienti da queste libere impollinazioni costituiranno le prime obiettivo-specifiche popolazioni migliorate di *Jatropha curcas* (Open Pollination Varieties).

Esse saranno adattate all'ambiente di coltivazione, portatrici dei desiderati caratteri migliorati e le loro performance saranno valutate in pieno campo.

Il secondo anno una ulteriore pressione selettiva sarà fatta sulle famiglie HSib e, come conseguenza, una o più Open Pollinate Varieties migliorate saranno prodotte.

Il terzo anno una più esaustiva valutazione sarà ulteriormente raggiunta e la selezione sui Ramet raggiungerà la massima pressione e specificità (includendo molti parametri produttivi) e consentirà di ottenere OPV di *Jatropha curcas* ancora più performanti.

2.6 PRODUZIONE DI IBRIDI INTER-SPECIFICI (Hybrid Creation - HC)

Un'altra strada percorribile per ampliare la base genetica di *Jatropha curcas* e per generare la variabilità di cui la specie è carente, è quella di creare ibridi interspecifici tra individui appartenenti a specie diverse del genere *curcas*. A tale scopo è stato allestito a Satrokala un appezzamento costituito da file parallele ed alternate di piante appartenenti alle specie:

1. - *Jatropha curcas* L.
2. - *Jatropha mahafalensis* Jum e H. Perrier
3. - *Jatropha multifida* L.
4. - *Jatropha gossypifolia* L.

Sulla base di alcuni precedenti studi sviluppati da alcuni studiosi (Dehgan 1984; Parthiban *et al.* 2009) è stato possibile raccogliere limitate informazioni sulla possibilità di incrocio e sulle eventuali barriere esistenti (Fig. 16).

Nessuna informazione è invece disponibile riguardo la specie *Jatropha mahafalensis*, un endemismo dell'Isola del Madagascar per il quale non esiste alcuna bibliografia.

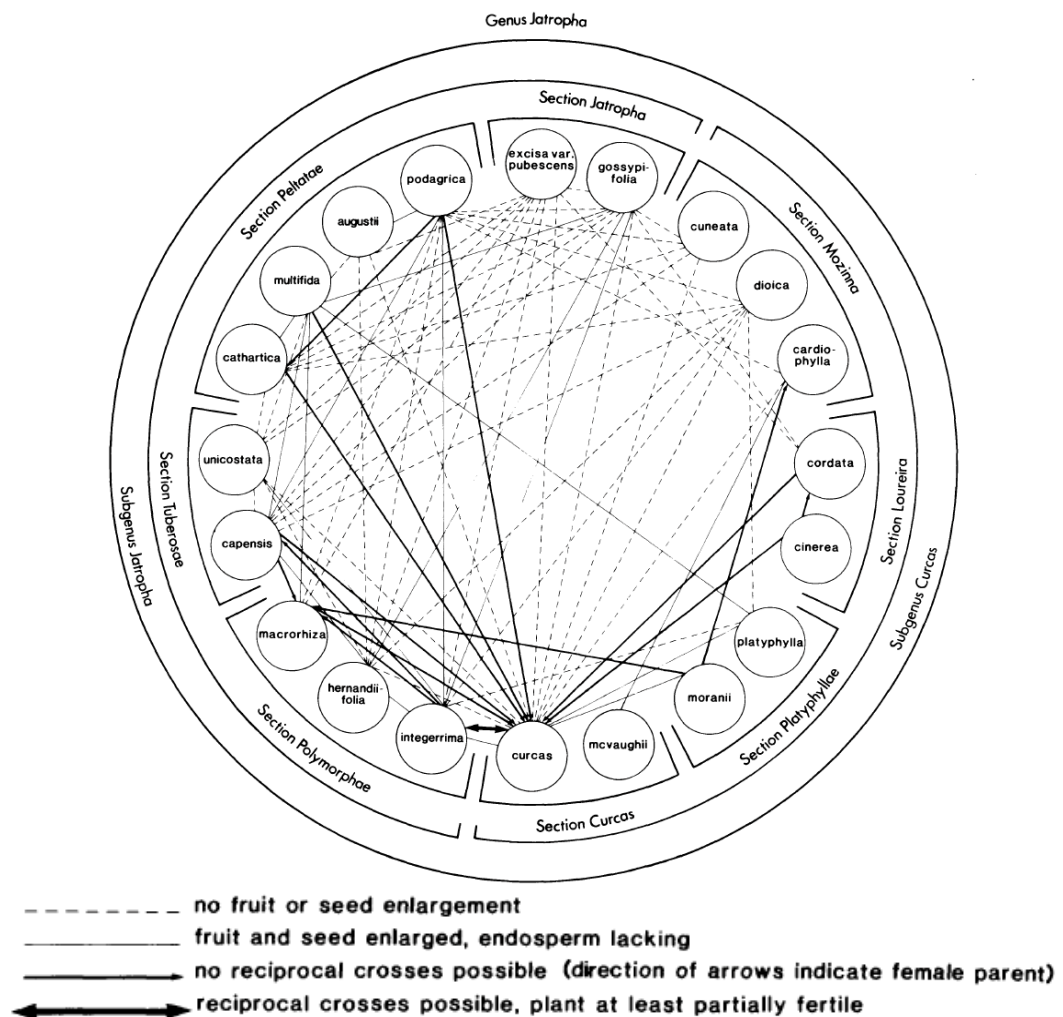


Fig. 16 – Possibilità di incrocio di 20 specie di *Jatropha* (Dehgan 1984)

Durante l'annata agraria 2013, superate alcune barriere tecniche alla realizzazione degli incroci per una forte asincronia di fioritura tra le specie, è stato possibile iniziare la prima campagna di ibridizzazione interspecifica.

La metodologia adottata per realizzare gli incroci è stata messa a punto nel corso del primo anno di sperimentazione con l'obiettivo prioritario di acquisire manualità con le tecniche, che peraltro per *Jatropha curcas* risultano particolarmente complesse a causa della conformazione del fiore, dell'anomalo rapporto tra fiori maschili e femminili e della posizione delle infiorescenze.

Lo schema di ibridizzazione adottato è stato un North Carolina mod 2 che è descritto sommariamente in Fig. 17. In questo schema di incrocio i parentali maschili sono rappresentati sia da *J. curcas* che da *Jatropha mahafalensis* e la progenie generata potrà essere valutata e caratterizzata sia come Half Sib che come Full Sib.

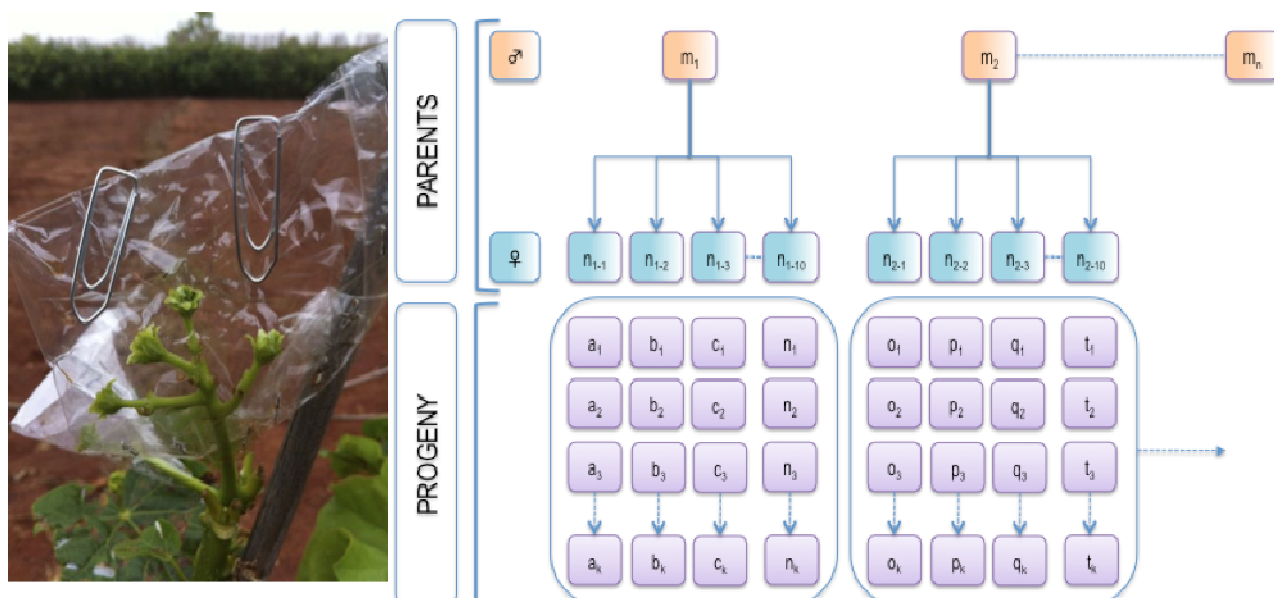


Fig. 17 – Incrocio *Jatropha curcas* x *Jatropha mahafalensis* secondo North Carolina mod 2

2.7 CARATTERIZZAZIONE GENETICA DEL GERMOPLASMA DI *JATROPHA CURCAS* PROVENIENTE DAL MADAGASCAR

La caratterizzazione genetica delle accessioni di *Jatropha curcas* provenienti dal Madagascar, previa estrazione, valutazione e quantificazione del DNA genomico, è stata realizzata mediante l'utilizzo di 9 marcatori molecolari SSR. Tali marcatori sono stati ottenuti da un precedente lavoro di ricerca svolto dal Dipartimento di Scienze Agroalimentari e dell'Ambiente (Zubieta, 2009) che aveva portato al disegno di 15 marcatori SSR partendo da una libreria genomica arricchita in regione microsatelliti e specifica per *Jatropha curcas* L.

Alle analisi con i marcatori SSR sono state inserite accessioni di *J. curcas* proveniente da Costa Rica, ovvero da quella provenienza che nel precedente lavoro aveva mostrato variabilità rispetto ad altre accessioni di *Jatropha curcas* provenienti dal continente africano. Sono stati anche inseriti tre outgroups rappresentati da *Jatropha podagrica*, *Jatropha multifida* e *Jatropha gossypifolia*.

2.7.1 Germinazione dei semi e preparazione dei tessuti per l'estrazione del DNA

I semi, dopo essere stati sterilizzati con Ipoclorito di Sodio al 2,5%, sono posti a un centimetro di profondità in sabbia anch'essa sterilizzata e lasciati in cella climatica a temperatura costante di 26°C per 10 giorni, tempo massimo considerato utile per la germinazione. Le giovani piantine sono state quindi trasferite in vasi con terra e riposte in serra.

Dalle piante disponibili per ciascuna accessione sono state campionate, durante le fasi iniziali di crescita, 2 foglie, immediatamente congelate in azoto liquido e conservate a -80 °C fino al momento della procedura di estrazione del DNA.

2.7.2 Estrazione e quantificazione del DNA genomico

Per l'estrazione del DNA è stata utilizzata una quantità di 0,5-1 g di materiale congelato ed è stata finemente frantumata per mezzo di mortaio in azoto liquido. Macinando i tessuti a basse temperature si bloccano i processi enzimatici che portano alla degradazione del DNA.

L'estrazione del DNA per la caratterizzazione genetica dell'intera collezione è stata effettuata con l'utilizzo di colonnine Invisorb Spin Plant Mini Kit.

Questo sistema di estrazione prevede la lisi cellulare tramite un buffer in presenza di Proteinasi K. I residui dei tessuti cellulari sono rimossi tramite centrifugazione in una colonnina "prefiltration", l'estratto ottenuto contiene tutte le sostanze idrosolubili, DNA e RNA che può essere rimosso con la digestione ad opera dell'RNasi. Il fissaggio del DNA alla membrana della colonnina è selettivo e ad opera di un sistema "binding buffer" che permette il lavaggio e l'allontanamento di tutte le sostanze indesiderate idrosolubili (carboidrati, proteine, ecc.). Il passo finale è l'eluizione dei campioni di DNA in opportuno tampone che sarà pronto per le analisi successive e può essere conservato a -20°C.

Per determinare la qualità e la quantità del DNA estratto abbiamo utilizzato la separazione in gel di agarosio 1% (in presenza di Bromuro d'Etidio 0,001%) caricando 10 µl di DNA per

campione e utilizzando il marker 1 KB Fermentas. Il Bromuro d'Etidio è una molecola che solo quando si intercala tra le basi del DNA emette fluorescenza se stimolato da una sorgente di energia (UV). I campioni sono stati fotografati tramite l'apparecchio Molecular Imager (Gel Doc XR+ Imaging System, Biorad). Anche se questa analisi di routine è operosa, risulta indispensabile per determinare l'integrità del DNA estratto, la presenza di inquinanti (pectine, proteine, ecc.) che ne comprometterebbero l'utilizzo nelle successive fasi di analisi e la quantità relativa del DNA in riferimento allo standard molecolare utilizzato.

Per la stima precisa della quantità estratta di DNA è stato utilizzato il fluorimetro Qbit 2.0.

Il passo successivo è stata la diluizione dei campioni per ottenere la concentrazione di 4 ng/μl, utilizzata per l'amplificazione.

2.7.3 Amplificazione PCR delle zone SSR

2.7.3.1 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La PCR, inventata dal biochimico Kary Mullis verso la metà degli anni '80, è una tecnica che ha rivoluzionato il settore delle biotecnologie offrendo uno strumento potente per poter amplificare in vitro e per via enzimatica, numerose coppie di una o più sequenze specifiche di DNA comprese tra 2 regioni a sequenza nota, in poco tempo, in modo semplice e poco costoso.

La PCR è una tecnica molto sensibile e con un elevato potere risolutivo, perciò necessita l'utilizzo di un incubatore specifico che possa essere programmato per realizzare ripetuti cicli termici, ciascuno con una precisa temperatura e durata, a seconda della sequenza e della combinazione dei primer impiegati. Ogni ciclo di amplificazione è composto da 3 fasi:

1. **Melting:** il DNA genomico a doppia elica viene denaturato ad alte temperature (94-96°C per alcuni minuti) separandosi in due filamenti singoli. Ciascun filamento serve da stampo per la sintesi di uno nuovo (sintesi semiconservativa).

2. **Annealing:** la temperatura diminuisce in modo da permettere ai primer di unirsi alle sequenze complementari dei singoli filamenti di DNA stampo innescando così la reazione. La temperatura di annealing compresa fra i 50 e i 65°C è un parametro variabile (in funzione della lunghezza degli inneschi) e critico nel determinare la specificità della PCR. Essa viene determinata in funzione della sequenza dei primer utilizzati, ottimizzando le condizioni sperimentalmente. La temperatura di annealing dei primer può essere calcolata mediante la formula (Suggs *et al.* 1981):

$$T_d = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$

$$T_m = T_d - 10$$

Dove:

T_d = Temperatura teorica di denaturazione

T_m = Temperatura di annealing

(G+C) = Numero di coppie Guanina e Citosina

(A+T) = Numero di coppie Adenina e Timida.

3. Estensione: in questa fase la temperatura aumenta fino a 72°C che è la temperatura ottimale della Taq DNA-polimerasi per riempire gli spazi vuoti e completare la sintesi dell'intero neofilamento. La polimerizzazione eseguita dall'enzima va in direzione 5' — 3'. Dopo la terza fase, la temperatura sale nuovamente a 94 °C per alcuni secondi per denaturare l'ibrido formato. In questa tappa i filamenti originari e i nuovi filamenti sintetizzati si separano diventando degli ulteriori stampi per dare inizio a un altro ciclo di sintesi. La reazione della PCR presenta un andamento del tipo esponenziale generandosi $N \times 2^n$ quantità di molecole; dove N rappresenta il numero di molecole di partenza e n il numero di cicli della reazione. Normalmente si impostano 30-40 cicli considerando che la curva di sintesi della reazione ha un plateau sopra il quale l'accumulo di prodotti e la degradazione dei reagenti della reazione bloccherebbero il processo.

2.7.3.2 Componenti della reazione di amplificazione

DNA stampo: è un filamento di DNA che contiene la sequenza bersaglio. All'inizio della reazione la molecola a doppia elica di DNA genomico viene denaturata separandosi in due singoli filamenti, ciascuno di questi servirà come stampo per la sintesi di nuove molecole di DNA. La concentrazione di DNA stampo è uno dei fattori critici che può influenzare la qualità dei risultati di amplificazione.

DNA polimerasi: la reazione di PCR è catalizzata dall'enzima Taq DNA-polimerasi, sfruttando la capacità dell'enzima di polimerizzare un filamento di DNA, utilizzando una sequenza di nucleotidi come stampo. Questo enzima termostabile è stato isolato dal batterio termoresistente *Thermus aquaticus*, che vive nelle sorgenti d'acqua termale a una temperatura di 75 °C, ora disponibile in forma sintetizzata. La caratteristica vantaggiosa di questo enzima, aggiunto soltanto all'inizio della reazione, è quella di rimanere attivo per una serie completa di cicli di amplificazione, anche dopo essere sottoposto ad alte temperature (90-95°C). La scoperta della DNA polimerasi ha così permesso di automatizzare il metodo mediante l'utilizzo di apparecchi termostatici ciclici (termociclatori) rendendo più efficace la reazione di amplificazione.

Primers: consistono in brevi sequenze di oligonucleotidi di circa 18-20 bp, sintetizzati artificialmente, complementari alle sequenze fiancheggianti il frammento di DNA da amplificare. Essi servono da innesco fornendo un 3'-OH libero al quale vengono aggiunti nuovi nucleotidi per iniziare la reazione di sintesi.

dNTPs (deossiribonucleosidi 5'-trifosfato): composti dai quattro nucleotidi che vengono aggiunti nella sintesi dei nuovi filamenti.

MgCl: è il cofattore indispensabile per il funzionamento dell'enzima taq polimerasi.

2.7.3.3 Reazione di amplificazione dei campioni in esame

I 9 Marcatori SSR utilizzati per questa ricerca sono stati disegnati da una libreria genomica arricchita in regione microsatelliti e specifica per *Jatropha curcas* (Zubietta 2009). I primer forward disegnati sono stati ordinati con l'aggiunta di una coda di 18 bp nella estremità 5'TGT AAA ACG ACG GCC AGT complementare al primer universale M13(-21) marcato (Markus Schulke Nature Biotechnology, 2000). In questo modo viene utilizzato un unico primer marcato (M13) per tutte le reazioni di genotyping, rendendo possibile un notevole risparmio economico. Per marcatura si intende una molecola legata al primer che emette una determinata fluorescenza quando investita da una sorgente d'energia.

Le marcature utilizzate in questo lavoro, identificate da colori diversi, sono quelle riportate nella seguente figura:

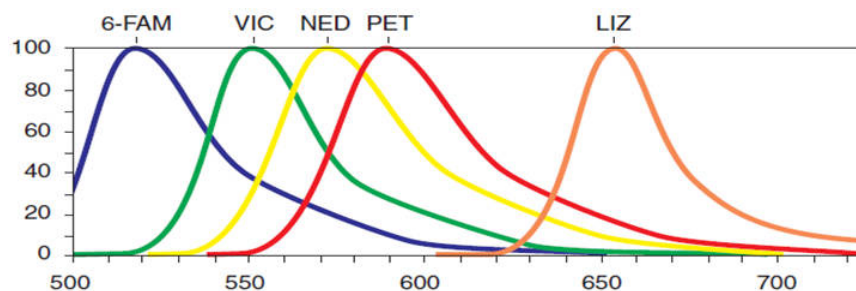


Fig. 18 – Emissione di fluorescenza dei marcatori utilizzati

I primers sono dunque stati ottimizzati aggiustando il protocollo di amplificazione per mettere a punto le temperature di annealing (considerando le temperature melting indicate dalla ditta produttrice) e le concentrazioni di $MgCl_2$ al fine di ottenere prodotti di PCR utilizzabili per il sizing dei frammenti. I primers che hanno prodotto stutter bands eccessive, ovvero errori di amplificazione che rendono il prodotto inutilizzabile per le analisi, sono stati scartati. Da questa messa a punto sono stati scelti i seguenti primers:

PRIMER	FORWARD 5'----->3'	REVERSE 5'----->3'	DIMENSIONE
Jat1	CAAGAGCTCCACAGTAGAAGA	CTACCAACTCTTTCCAGTCC	163
Jat3	AGAAGGAGGAGGTGAGAGAC	GTTCCCATTTGATATCCCATA	176
Jat7	TAACCTTGACACAACACTTG	GGGTCAAACAGGAAACTGTA	137
Jat8	TTTTCAGGATTGAATGCTCT	CGCAATCCCATTTTTATTAT	178
Jat9	ACCAATCGATCCTAGAAAGG	TAAACTCGCCAAGCCATA	119
Jat13	TCTATTGAGTGGTTGCATTG	GCTTTCAATATATCATACGTGGT	145
Jat15	CATTTAGCTTTCTGCCTAA	TTCGTTGCACTTTTGACTAA	191
Jat16	CCAATCAAAAATTCAGCTC	TTTGTCTATCTCACCAACC	143
Jat20	AGAGAAGAAGAGGGCAGAAG	TAGCAACAATGGCAAAAATA	175

Tab. 6 – primers utilizzati per l'amplificazione

La reazione d'amplificazione (Tab. 7) è stata eseguita in un termociclatore modello PCR Express thermal cycler della ditta Celio. Il programma di amplificazione adottato è riportato nella tabella seguente:

CICLO DI AMPLIFICAZIONE:	
1)	5 min Melting 95°C
2)	17 cicli: 24 sec Melting 95°C; 20 sec Annealing 61-52°C (diminuzione della temperatura: 0,5°C per ciclo); 25 sec Extention 72°C
3)	20 cicli: 20 sec Melting 95°C; 20 sec Annealing 52°C; 20 sec Extention 72°C
4)	5 min Extention 72°C

Tab. 7 – Ciclo di amplificazione specifico per i primers selezionati

I campioni sono stati diluiti a 4 ng/μl e amplificati con la Miscela di reazione 2X della Promega, aggiungendo 0,5 mM di MgCl₂ e 5% di DMSO (dimetil suffossido) che aiuta l'apertura del DNA nella fase di denaturazione, la reazione si è svolta in un volume finale di 20μl, come riportato nel protocollo illustrato nella tabella 8.

VOLUME FINALE μl 20				N° di campioni	20	
STOCK	Con. Stock	Con. Finale	Volume		Sample	
mix X	2	1	10		20	200
MgCl ₂ mM	25	0,5	0,4	Mg finale 2 mM	20	8
Primer M13 μM	10	0,2	0,4		20	8
Primer Mod. Fw μM	10	0,07	0,14		20	2,8
Primer Rev μM	10	0,2	0,4		20	8
DMSO	100	5	1		20	20
DNA ng/μl	4	20	5,0	Mix X campione	20	100
sub totale			17,34	15		346,8
H ₂ O			2,66		20	53,2
			Volume totale	20	Master Mix	400
					vol. Tot μl	400

Tab. 8 – Protocollo di preparazione dei campioni per la reazione di PCR

2.7.4 Separazione e dimensionamento dei frammenti amplificati

L'analisi dei marcatori molecolari SSR è basata sulla esatta dimensione dei frammenti ottenuti con la PCR. Tale misura può essere ottenuta attraverso diversi strumenti più o meno precisi in base all'accuratezza necessaria. Possiamo utilizzare gel di agarosio Hight Resolution per discriminare frammenti con differenze di 5-10 bp; gel di acrylamide per frammenti con differenze di 2-7 bp; elettroforesi capillare quando è necessario avere una precisione di analisi di una base. In questo lavoro abbiamo utilizzato due soli sistemi: l'elettroforesi in gel d'agarosio per determinare la qualità e la quantità di frammenti prodotti dalla PCR, il loro corretto dimensionamento è stato ottenuto tramite elettroforesi capillare su sequenziatore ABIprism310.

2.7.4.1 Elettroforesi su gel di agarosio

L'agarosio è un polimero in polvere estratto da alghe marine che, dopo essere sciolto in soluzione e gelificato, forma una matrice con pori di dimensioni variabili a seconda della concentrazione utilizzata. L'elettroforesi su gel di agarosio è un metodo standard che viene utilizzato per la separazione, la quantificazione (qualitativa e quantitativa) e l'identificazione di frammenti di DNA di diverse dimensioni. La distanza di migrazione dei frammenti è in funzione del peso molecolare, della forma (lineare, circolare) e della matrice del gel. Durante lo svolgimento delle analisi, la dimensione dei frammenti dei campioni in esame è stata determinata mediante il confronto con la migrazione, sullo steso gel, di frammenti di DNA di peso molecolare noti ovvero il marker standard.

Esistono diversi tipi di agarosio in base alle diverse applicazioni che permettono di discriminare frammenti corti 50 - 500 bp o molto lunghi fino a 20.000 bp con differente precisione, questa per lo più è regolata secondo la concentrazione di agarosio. I gel d'uso più comune hanno una concentrazione pari a 0,8 - 1,5%.

Per la preparazione dell'agarosio sono state utilizzate soluzioni-buffer in grado di mantenere stabili il pH e la concentrazione ionica, in modo che il DNA possa muoversi uniformemente lungo il gel. TAE e TBE sono le soluzioni tampone comunemente usate per l'elettroforesi. T, ovvero Tris (idrossimetil) amminometano, consente il mantenimento di un valore costante del pH della soluzione; E sta per EDTA, è un chelante di cationi divalenti, come il Mg^{++} , importanti per il funzionamento della maggior parte delle nucleasi; A e B stanno rispettivamente per acido Acetico e acido Borico che danno l'appropriata forza ionica al tampone.

L'elettroforesi avviene all'interno di una cella elettroforetica che contiene la soluzione tampone in contatto con gli elettrodi: il polo negativo (catodo) e il polo positivo (anodo). La molecola di DNA possiede una carica negativa conferitale dai gruppi fosfato e quindi, sottoposta ad un campo elettrico, migrerà verso l'anodo. Generalmente la separazione avviene in un range di 40-100 Volts. Le molecole di agarosio, che costituiscono la matrice del gel, oppongono una certa resistenza al movimento dei frammenti, per cui, quelli più grossi, migrano più lentamente rispetto a quelli più piccoli determinando la separazione fra di loro.

La preparazione del gel di agarosio è stata eseguita osservando il seguente protocollo:

1. pesare la quantità di agarosio corrispondente alla concentrazione desiderata;
2. sciogliere l'agarosio nella soluzione tampone (TBE o TAE) con l'aiuto di un forno a microonde;
3. lasciare raffreddare fino ad una temperatura di circa 50 °C ed aggiungere il bromuro di etidio in modo che la sua concentrazione finale nel gel sia di 0,5 µg/ml;
4. colare la soluzione nell'apposito "lettino" di plastica nel quale sono stati precedentemente inseriti uno o due pettini per la formazione dei pozzetti nel gel, all'interno dei quali saranno caricati i campioni;
5. lasciare solidificare il gel a temperatura ambiente per circa 15-20 minuti.

Dopo l'avvenuta polimerizzazione, il gel è stato posizionato nella cella elettroforetica e ricoperto con la soluzione tampone (TAE o TBE).

La corsa può essere verticale od orizzontale, a ponte tra i due elettrodi, a seconda del tipo di cella elettroforetica usata.

I campioni di DNA, opportunamente preparati con una soluzione di caricamento contenente due coloranti e glicerolo, sono stati poi caricati negli appositi pozzetti creati nel gel. Il glicerolo è un addensante con la specifica funzione di appesantire il DNA acquoso e far sì che, al momento del caricamento nei pozzetti, vada subito a fondo impedendogli di disperdersi nel tampone di corsa; i coloranti servono invece a seguire visivamente la corsa del DNA nel gel. La quantità di campione da caricare dipende dal volume del pozzetto. In ogni gel, un pozzetto è stato sempre caricato con un marcatore standard di peso molecolare noto per consentire il confronto con i frammenti da identificare.

Terminata la corsa, il frammento separato è evidenziabile quando sottoposto a luce UV; esistono diversi strumenti capaci di filtrare la fluorescenza emessa dal frammento e fissarne l'immagine sotto forma digitale.

2.7.4.2 Elettroforesi su gel capillare

Questa tecnologia è applicata su sequenziatori automatici a capillare che uniscono alla semplicità d'uso una notevole precisione e fruibilità dei risultati, si tratta di strumenti costosi e generalmente in service. I sequenziatori sono costituiti da due importanti parti: la prima riguarda la separazione dei frammenti e la sua rilevazione attraverso la fluorescenza dei frammenti stessi, la seconda è il software di analisi.

L'elettroforesi avviene all'interno di un tubo (capillare) stretto, di solito realizzato in silice fusa o teflon, avente diametro interno nel range di 25-75 μm e diametro esterno di 350-400 μm , rivestito da uno strato protettivo di poliamide che lo rende resistente ma anche maneggevole.

Il capillare è riempito di un polimero fluido, mantenuto a temperatura costante di 50-60°C, che permette di ottenere una separazione di frammenti con differenze di 0,5 bp. I polimeri utilizzati sono vari, nello specifico per l'analisi di frammenti sono usati polimeri denaturanti per evitare che conformazioni steriche dei frammenti stessi ne alterino la velocità di separazione.

Il polimero esausto è sostituito dopo ogni analisi grazie alla pressione di opportune pompe. I frammenti, per poter essere rilevati, devono essere marcati con opportune molecole fluorescenti. A questo scopo possono essere utilizzate più molecole insieme, in base alla differente fluorescenza.

I frammenti caricati si separano grazie alla corrente elettrica e migrano lungo il capillare fino ad oltrepassare una finestra di lettura, qui una sorgente d'energia eccita le molecole fluorescenti il cui segnale è successivamente captato da un rilevatore (fotomoltiplicatore o CCD camera) tale segnale è poi registrato dal software e trasformato in un elettroferogramma.

L'applicazione di questa tecnica è principalmente utilizzata per il sequenziamento (sistema Sanger) e per il sizing, ovvero per il dimensionamento dei frammenti. Nello specifico, per il sizing, è necessario aggiungere uno standard al frammento marcato da dimensionare. Questi

standard contengono frammenti di dimensioni note, marcati a loro volta con molecole fluorescenti. Grazie ad essi è possibile dimensionare con precisione il frammento in analisi attraverso la costruzione di una curva standard.

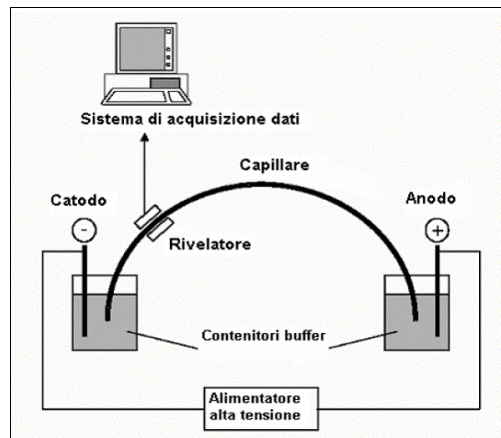


Fig. 19 - Schema della separazione elettroforetica

I diversi prodotti di PCR marcati possono essere corsi simultaneamente e dimensionati in una singola corsa. E' possibile correre fino a 15 marcatori simultaneamente. Nel presente lavoro sono stati fatti correre 5 marcatori simultaneamente. A fronte di un costo più elevato rispetto alle corse in agarosio o in acrylamide, i vantaggi di questa tecnica sono l'accuratezza di analisi, la ripetibilità, la velocità e la possibilità di avere il dato in forma digitale pronto per un'analisi finale. Tale analisi è effettuata Genotyper Software. La matrice prodotta è utilizzata per le successive analisi statistiche.

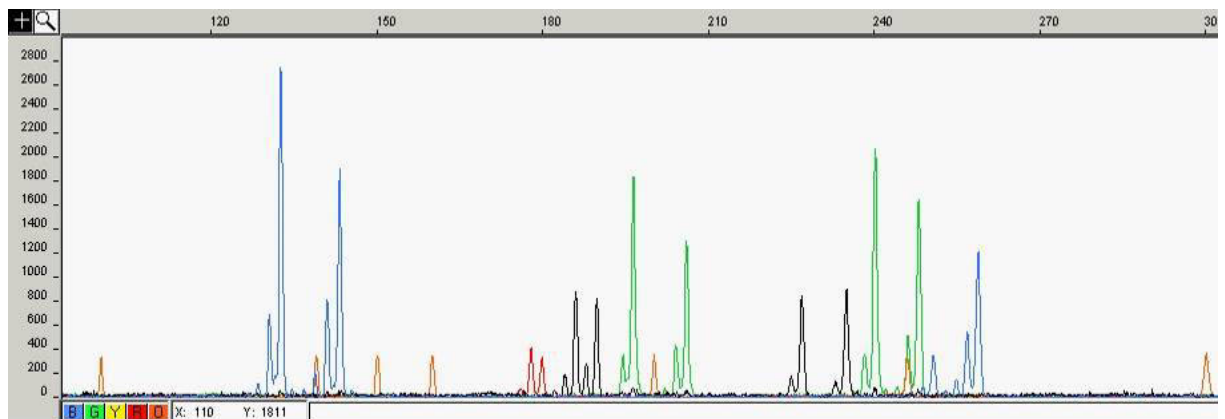


Fig. 20 - Elettroferogramma dei frammenti dimensionati

2.7.4.3 Elettroforesi su gel di agarosio dei campioni in esame

Tampone TBE 5X (1 l di soluzione stock):

- Tris Base 54,00 g
- Acido Borico 27,50 g
- EDTA 0,5 M pH 8 20,00 ml

Il buffer così preparato è stato sciolto in 800 ml d'acqua distillata con l'aiuto di una piastra riscaldata e portato a volume, tale soluzione è quindi conservabile a temperatura ambiente. Infine, la soluzione di lavoro aveva concentrazione finale di 1 X ed è stata ottenuta per diluizione 1:5 della soluzione stock mediante l'aggiunta d'acqua distillata sterile.

Una volta posta la soluzione di lavoro nella cella elettroforetica orizzontale BIO-RAD WIDE MINI SUB GEL DT, è stato aggiunto bromuro d'etidio in proporzione 1:10.000. E' stato quindi possibile caricare i campioni di DNA estratto nei pozzetti, preparati come segue:

Campione DNA: 6 µl

Colorante 6X: 2 µl

- Blu di bromo fenolo 0,25 %
- Xilene cianolo FF 0,25 %
- Glicerolo in acqua 30 %

Acqua distillata: 4 µl

Infine, 3 µl del marcatore standard: Ladder Gene Ruler 100bp sono stati caricati in un pozzetto. I prodotti di PCR sono stati controllati su gel di Agarosio all'1,5%, caricando 5µl di prodotto e successivamente marcato con bromuro di etidio. La corsa elettroforetica è stata effettuata ad un voltaggio costante di 70 V per un tempo di 40 minuti. Al termine dell'elettroforesi il gel d'agarosio è stato sottoposto ad analisi d'immagine previa illuminazione di raggi UV su BIO RAD Gel Doc 2000 (Foto 19).

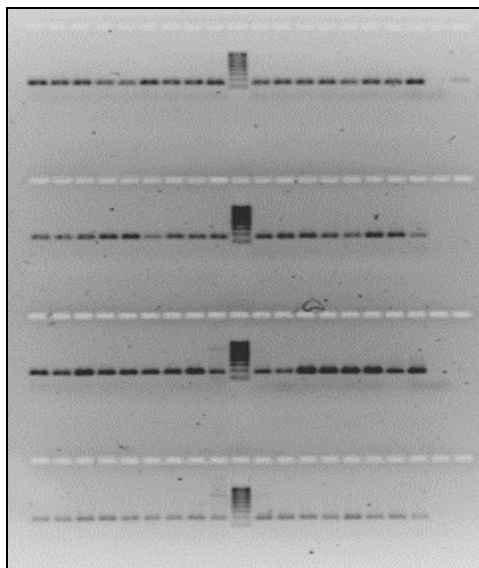


Foto 19 – prodotti di PCR caricati su gel di agarosio all'1,5%

I prodotti di PCR, opportunamente diluiti, sono stati miscelati in base alle diverse fluorescenze delle molecole utilizzate. Successivamente sono stati portati al Centro Interdipartimentale per le Biotecnologie di Interesse Agrario, Chimico, Industriale (CIBIACI) per il sizing su sequenziatore capillare ABIPrism310. Questo ci ha permesso di ottenere la lettura simultanea di 4-5 frammenti microsatelliti e la loro relativa dimensione.

2.8 CARATTERIZZAZIONE DELL'OLIO DI *JATROPHA CURCAS* PROVENIENTE DAL MADAGASCAR

Alcune piante madri hanno prodotto seme per cui è stato possibile valutarne le rese ed effettuare l'analisi della composizione in acidi grassi. Di seguito si riportano i codici delle PM produttive, la loro provenienza ed il protocollo eseguito per l'estrazione e l'analisi del profilo acidico.

5. PM_JC5A provenienza: Tulear
6. PM_JC5B provenienza: Tulear
7. PM_JC14 provenienza: Milioke
8. PM_JC15 provenienza: Milioke
9. PM_JC18 provenienza: Milioke
10. PM_JC20 provenienza: Milioke
11. PM_JC21A provenienza: Milioke
12. PM_JC21B provenienza: Milioke
13. PM_JC21C provenienza: Milioke
14. PM_JC23 provenienza: Milioke
15. PM_JC32 provenienza: Centro-Nord
16. PM_JC35 provenienza: Costa Est
17. PM_JC39 provenienza: Costa Est

I semi sono grossolanamente macinati con un mortaio e posti in stufa a 105°C overnight in essiccazione. Una volta rimossi dalla stufa sono agitati su una piastra termomagnetica (50°C) per circa 1 ora insieme ad esano, in rapporto 1:10.

Passato il tempo, il composto viene filtrato con una pompa a vuoto su filtri 0,7 micron e l'operazione è ripetuta fino a che il campione si presenta trasparente.

L'estratto viene quindi raccolto in un pallone in vetro ed è fatto evaporare tramite Rotavapor della Buchi, ovvero un evaporatore rotante. In seguito l'olio estratto viene pesato per valutarne la resa. Sull'olio è stato successivamente determinato il profilo acidico tramite gascromatografo GC-MS (iso 5508).

I restanti semi triturati sono raccolti, essiccati e pesati per valutare la resa anche di questi.

Cap. 3 - RISULTATI E DISCUSSIONI

3.1 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DEL GERMOPLASMA MALGASCIO DI *J. CURCAS*

I prodotti di amplificazione dei nove marcatori SSR utilizzati sono stati identificati tramite separazione elettroforetica su sequenziatore. Dall'analisi non sono emerse differenze in nessuno dei campioni provenienti dal Madagascar, mentre sono evidenziabili differenze con le accessioni provenienti da Costa Rica per tre dei marcatori utilizzati (Jat1, Jat15, Jat20). I marcatori SSR utilizzati sono stati inoltre in grado di distinguere gli outgroups evidenziando però una bassa variabilità genetica.

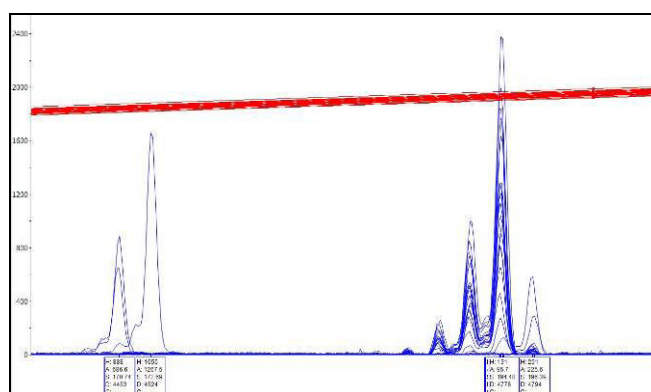


Fig. 21 - Primer Jat20. *J. podagrica*, *J. multifida*: 171 bp; *J. gossypifolia*: 173 bp; *J. curcas* (Madagascar) 194 bp; *J. curcas* (Costa Rica) 196 bp.

Come si nota nella Fig. 21, sono evidenti delle stutter bands che comunque non inficiano la possibilità di analizzare e dimensionare il frammento amplificato. Nella stessa figura è possibile osservare i primi picchi da sinistra che sono gli outgroups (*J. podagrica*, *J. multifida*, *J. gossypifolia*), poi, dopo il concentramento di picchi sovrapposti che rappresentano le piante di *J. curcas* proveniente da Madagascar, si notano 2 picchi relativi alle piante di *Jatropha curcas* proveniente da Costa Rica.

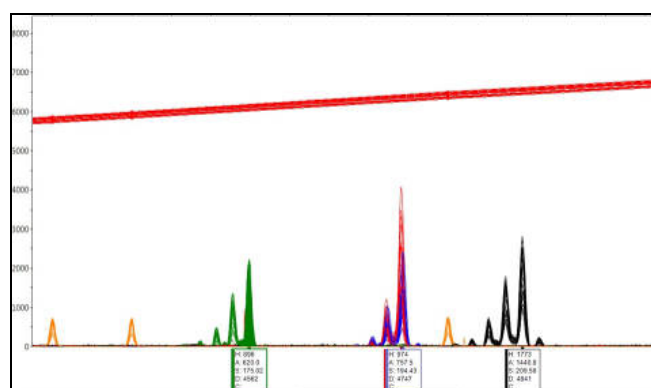


Fig. 22 – Profili elettroforetici di tutte le accessioni malgascie

Sui dati ottenuti non è stata applicata alcuna analisi statistica in quanto se lo scopo del lavoro era verificare variabilità entro le accessioni di *Jatropha curcas* provenienti dal Madagascar, i marcatori SSR utilizzati non sono stati in grado di evidenziarla.

3.2 CARATTERIZZAZIONE DELLE PIANTE DELLA COLLEZIONE WORLDWIDE – CLZ

La collezione è caratterizzata da piante di *Jatropha curcas* provenienti da diversi Paesi, in tab. 9 si ricordano il numero di esemplari per ogni provenienza e la sigla assegnata, in modo da comprendere i grafici successivi.

Provenienza	Sigla	N° piante
Alagoinhas (Brasile)	AL	3
Arusha (Tanzania)	AR	34
Brasile	BR	103
Congo	CO	4
Costa Rica	CR	1
Capo Verde	CV	1
Egitto	EG	2
India	IN	1
Mato Grosso (Brasile)	MG	9
Messico	MX	2
Mozambico	MZ	39
Nicaragua	NI	5
Norte Est de Minas Gerais (Brasile)	NE	6
Norte de Minas Gerais (Brasile)	NM	8
Paraguay	PA	75
Suriname	SU	82
Thailandia	TH	2
Tanzania	TZ	5

Tab. 9 – Pianta della collezione di Satrokala: provenienze e quantità

3.2.1. Dati morfologici relativi alla sperimentazione sulle piante della Collezione – CLZ

Le prime osservazioni effettuate sulla collezione e la successiva campagna di raccolta dati sulle piante hanno mostrato una graduale incidenza della fertilità del terreno sullo sviluppo delle piante, più precisamente le piante disposte sulle file più in basso (contraddistinte dai numeri di identificazione di file più elevati) appaiono più sviluppate di quelle poste in alto (numeri bassi di fila).

Per mitigare questo effetto è stato quindi necessario applicare, sui dati originali prelevati in campo, un fattore di correzione legato alla posizione spaziale occupata dalla pianta nel dispositivo sperimentale.

3.2.1.1 Correzione dei dati per posizione spaziale e analisi statistica

L'analisi spaziale è stata realizzata facendo covariare il valore rilevato con la media delle quattro parcelle contigue; il termine corretto deriva quindi dalla funzione:

$$X \text{ corretto} = X_i - [b_{y/xm^4} * (x_{m^4} - x_m)]$$

dove:

X_i = valore misurato nella parcella i-esima;

r_{xi/xm^4} = regressione x_i/x medio delle 4 parcelle limitrofe;

x_{m^4} = valore medio delle quattro parcelle limitrofe;

x_m = media generale;

Un'ulteriore finalità dell'analisi spaziale dei dati è la riduzione dell'effetto ambientale sui genotipi consentendo di eliminare una quota ulteriore di variabilità legata alle varie provenienze del germoplasma.

Prima di effettuare l'analisi della varianza con l'utilizzo dei dati sottoposti a correzione, si è proceduto ad effettuare un'analisi della varianza comprensiva della stima della covarianza tra la variabile pura e la media delle quattro parcelle limitrofe, considerate come covariata, secondo il modello riportato in tab. 10 (a titolo di esempio si riporta il modello per la variabile Altezza Pianta, Hpia):

Sorgente	Somma dei quadrati Tipo III	df	Media dei quadrati	F	Sig.
HPIACov	134.228,911	1	134.228,911	807,756	0
PROVENIENZA	6.567,656	17	386,333	2,325	0,002
Errore	60.321,566	363	166,175		
Totale	3.958.039	382			
Totale corretto	216.234,683	381			

Tab. 10 – Modello Analisi della Covarianza (Variabile: Hpia)

Qualora la covarianza sia risultata significativa si è proceduto ad elaborare la variabile corretta al posto della variabile pura impiegando il modello riportato di seguito in tab. 11, sempre relativo alla variabile Altezza Pianta Corretta (Altezza Pianta, Hpia*):

Sorgente	Somma dei quadrati Tipo III	df	Media dei quadrati	F	Sig.
PROVEN	19.030,259	17	1119,427	3,077	0
Errore	132.438,913	364	363,843		
Totale	3.881.604	382			
Totale corretto	151469,173	381			

Tab. 11 – Modello della Varianza con variabile corretta (Hpia*)

Per questo motivo tutti i successivi grafici relativi alla collezione, i cui dati sono stati sottoposti a correzione per renderne possibile la comparazione, sono stati contrassegnati da un asterisco (*).

Poiché i risultati complessivi dell'analisi della covarianza (tab. 12) hanno mostrato una forte significatività relativamente alla covarianza per tutte le variabili, si è proceduto ad elaborare

una nuova analisi della varianza utilizzando i dati corretti applicati ad un ANOVA modello fisso, i cui risultati sono riportati in tabella 13.

Fonte di Variazione	G.d.L.	Altezza Pianta	Diametro Chioma	Diametro Fusto	Numero Ramificazioni	Lunghezza Foglia	Larghezza Foglia	Lunghezza Picciolo 1	Lunghezza Picciolo 2	Lunghezza Picciolo 3	SPAD
Covarianza	1	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
PROVENIENZA	16	**	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	**	n.s.	*
Errore	364										
Totale corretto	381										

Tab. 12 – Analisi della Covarianza dei parametri morfologici relativi alla collezione

Fonte di Variazione	G.d.L.	Altezza Pianta	Diametro Chioma	Diametro Fusto	Numero Ramificazioni	Lunghezza Foglia	Larghezza Foglia	Lunghezza Picciolo 1	Lunghezza Picciolo 2	Lunghezza Picciolo 3	SPAD
PROVENIENZA	16	**	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	**	*	n.s.	n.s.
Errore	365										
Totale corretto	381										

Tab. 13 - Analisi della Varianza – ANOVA mod Fisso con dati morfologici della collezione corretti

3.2.1.2 Discussione dei dati morfologici corretti della piante della Collezione - CLZ

Di seguito si riportano i grafici e la discussione degli stessi, relativi ai dati delle piante della collezione. Si ricorda che l'asterisco che caratterizza il titolo di ogni grafico (*) fa riferimento alla correzione spaziale dei dati come descritta nel paragrafo 3.2.1.1.

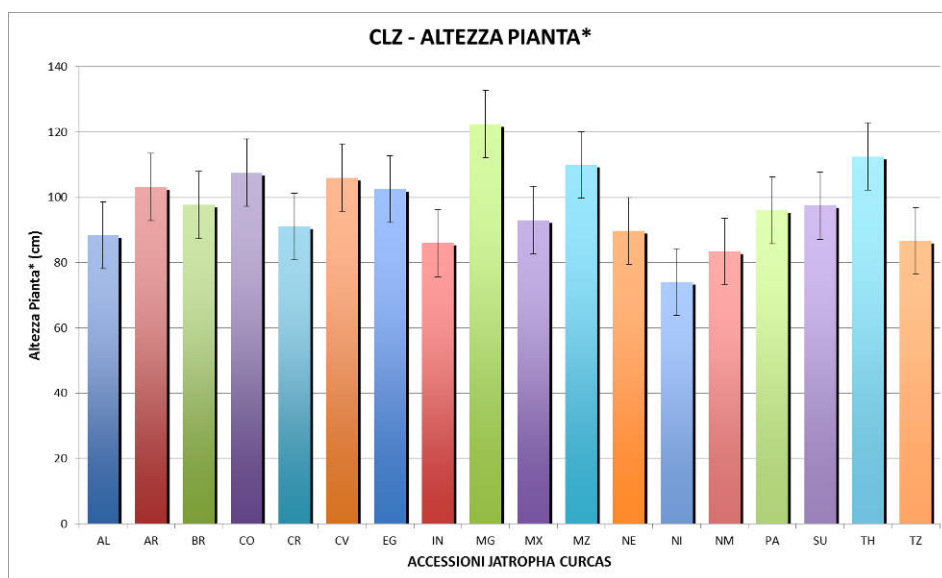


Grafico 3 - Misura dell'altezza delle piante della collezione (cm)

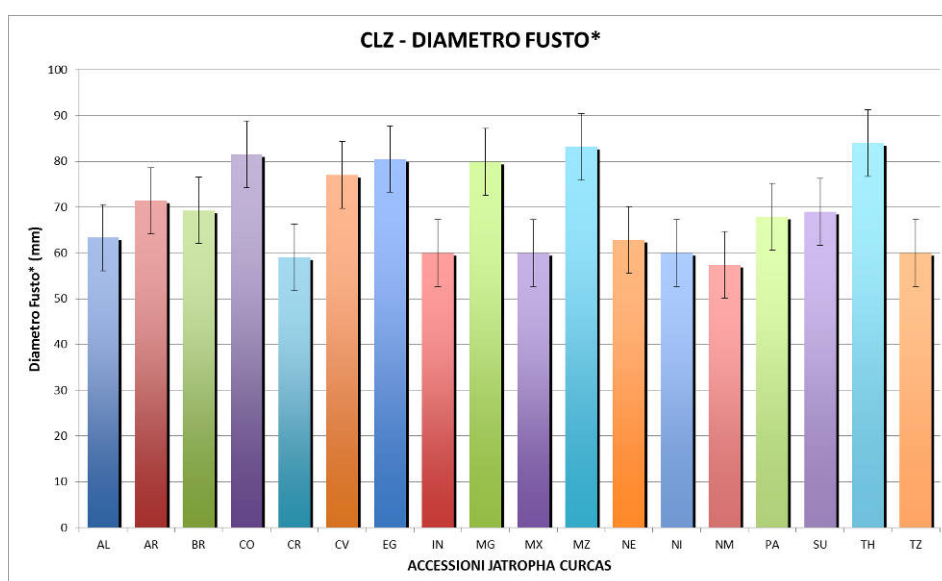


Grafico 4 - Misura del diametro del fusto delle piante della collezione (mm)

L'andamento dei grafici relativi alle misurazioni altezza e diametro (Grafici 3, 4) risulta assimilabile per molte provenienze, infatti si nota che ad altezze di pianta maggiori, corrispondono tendenzialmente diametri maggiori e viceversa. Si nota inoltre che le piante provenienti dal Mato Grosso spiccano per l'elevata altezza, seguite da quelle provenienti da Thailandia, Mozambico e Congo. Le stesse provenienze sono le migliori per quanto riguarda la

dimensione dei diametri, anche se per questo secondo parametro anche le piante di Capo Verde ed Egitto risultano interessanti.

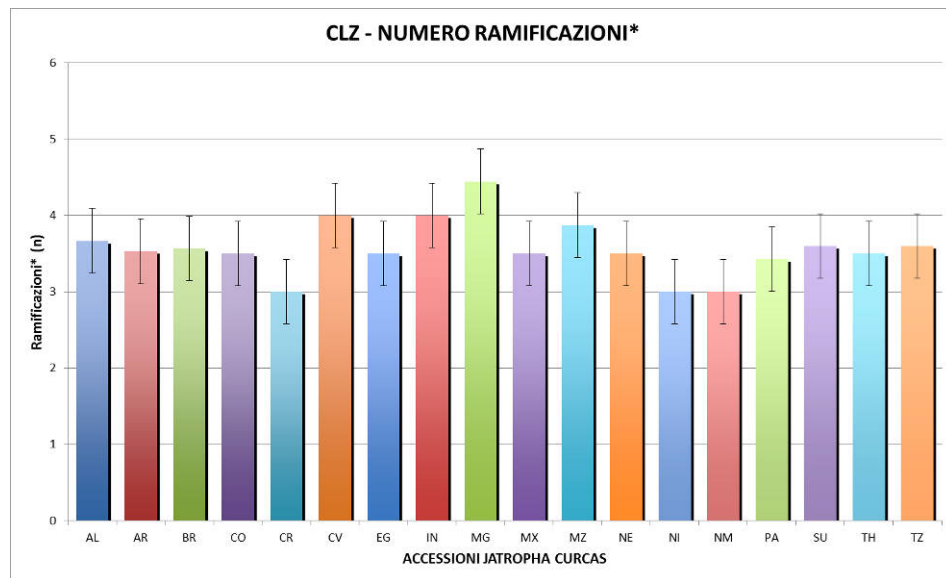


Grafico 5 - Numero di ramificazioni delle piante della collezione

Le ramificazioni oscillano tra valori di 3 e 5 per pianta. Si sottolinea che ancora una volta le piante provenienti dal Mato Grosso sono quelle col valore medio più alto e che anche per questo parametro le provenienze di Capo Verde e Mozambico hanno valori superiori a quelli medi. La provenienza indiana, che non spicca per dimensioni di diametro e fusto risulta avere un buon numero di ramificazioni.

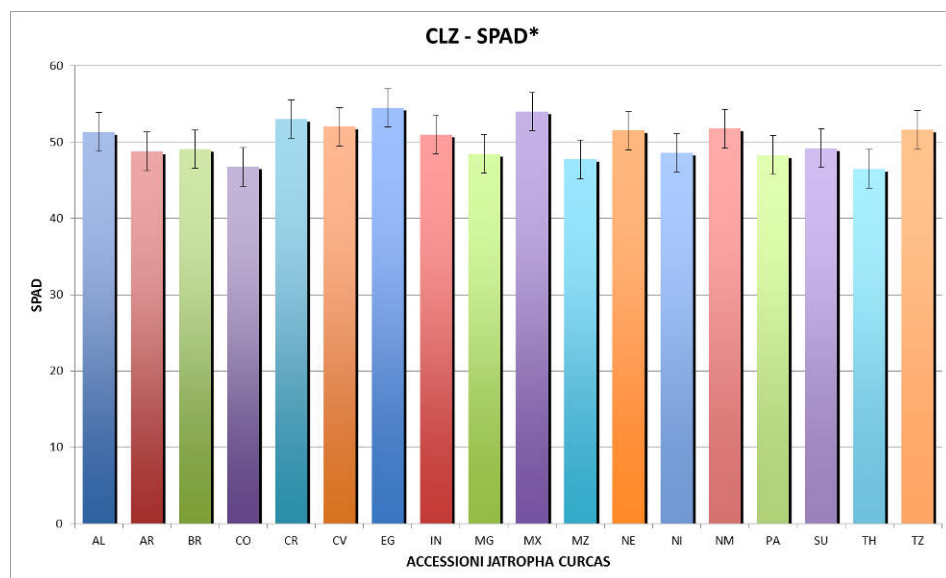


Grafico 6 - Misura dello SPAD delle piante della collezione

Le misure di SPAD si attestano tra valori intorno a 50 e le piante di provenienza da Messico, Egitto e Costa Rica registrano i valori più elevati mentre Congo e Tailandia hanno valori minimi. Per le provenienze Alagoinhas, Capo Verde, India, le due Minas Gerais (Brasile) e Tanzania sono comunque stati registrati valori sopra 50.

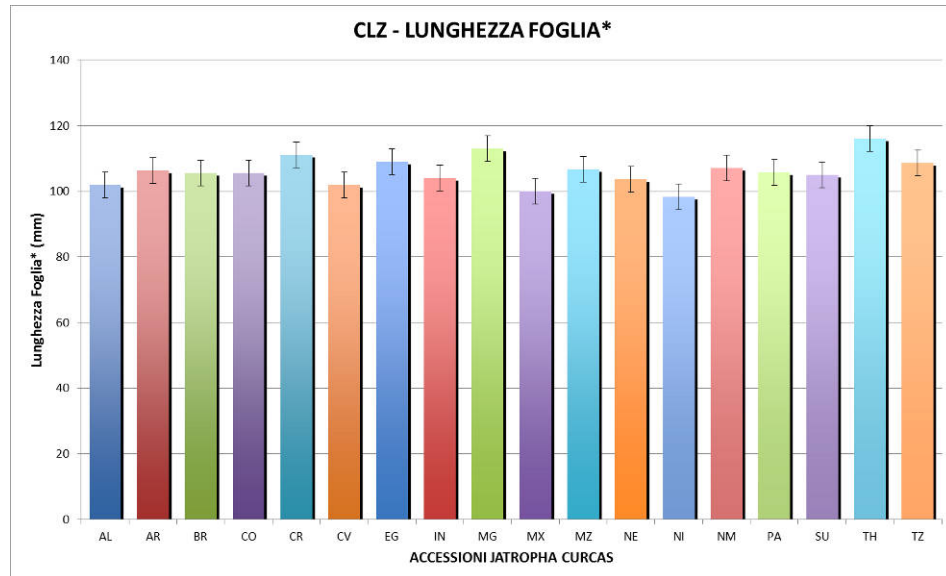


Grafico 7 - Lunghezza delle foglie delle piante della collezione (mm)

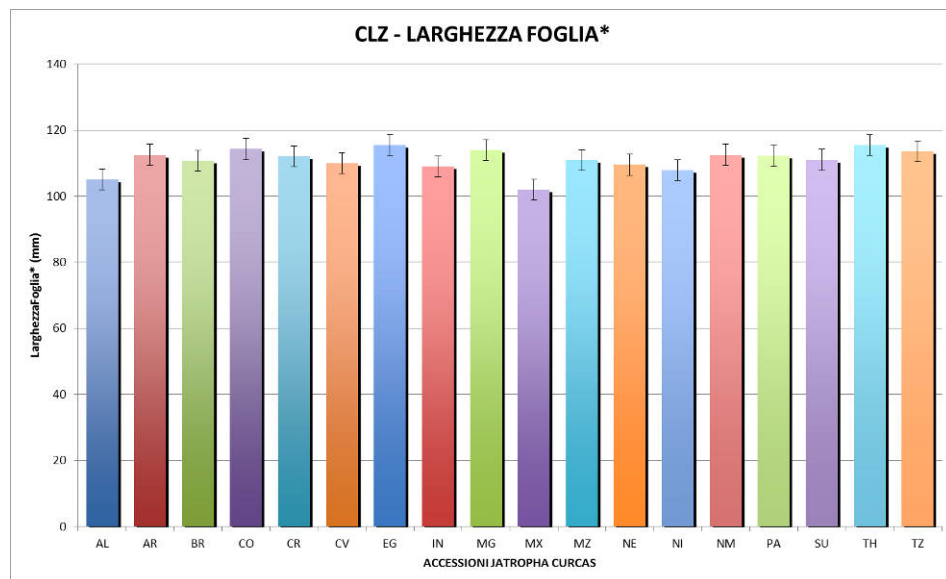


Grafico 8 - Larghezza delle foglie delle piante della collezione (mm)

Per quanto riguarda i dati relativi alle dimensioni delle foglie, lunghezza e larghezza, questi hanno un andamento assimilabile e non presentano grosse variazioni, oscillando tra valori di 100 e 120 mm. Le piante provenienti da Costa Rica, Egitto, Mato Grosso, Tailandia e Tanzania sono quelle che presentano entrambi i parametri con valori più elevati. Le provenienze Messico, Alagoinhas e Nicaragua risultano quelle con le foglie meno sviluppate.

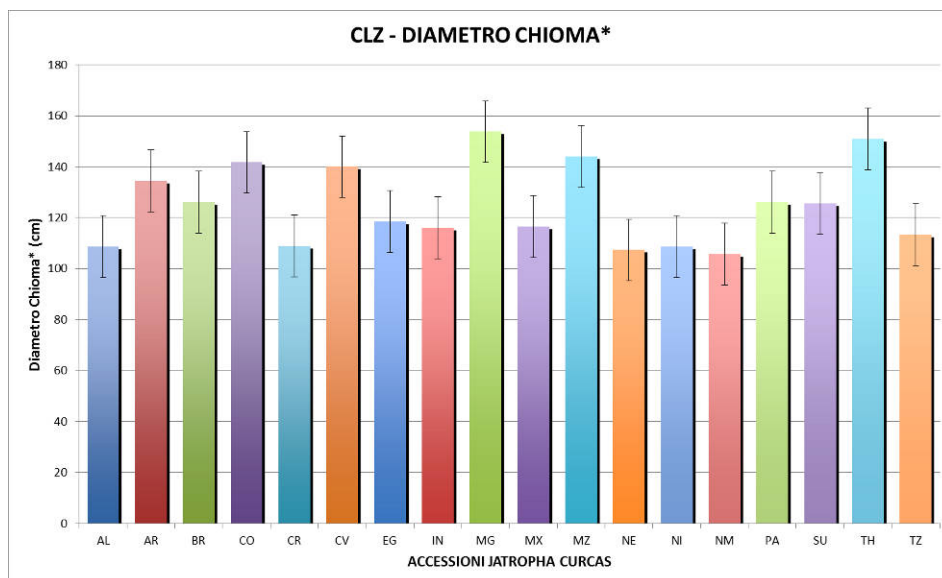


Grafico 9 - Diametro della chioma delle piante della collezione (cm)

Come si evince dal grafico inerente al diametro della chioma, i valori per questo parametro sono molto diversificati, variando in un range tra i 100 e i 160 cm. In questo caso le piante che provengono dal Mato Grosso, dalla Tailandia e dal Mozambico hanno i valori più elevati, seguite dalle provenienze Arusha, Congo e Costa Verde. I diametri minimi sono stati rilevati per le piante provenienti dalle due provenienze dal Minas Gerais, ma anche le provenienze Alaghoinas, Costa Rica e Nicaragua presentano questo valore poco sviluppato.

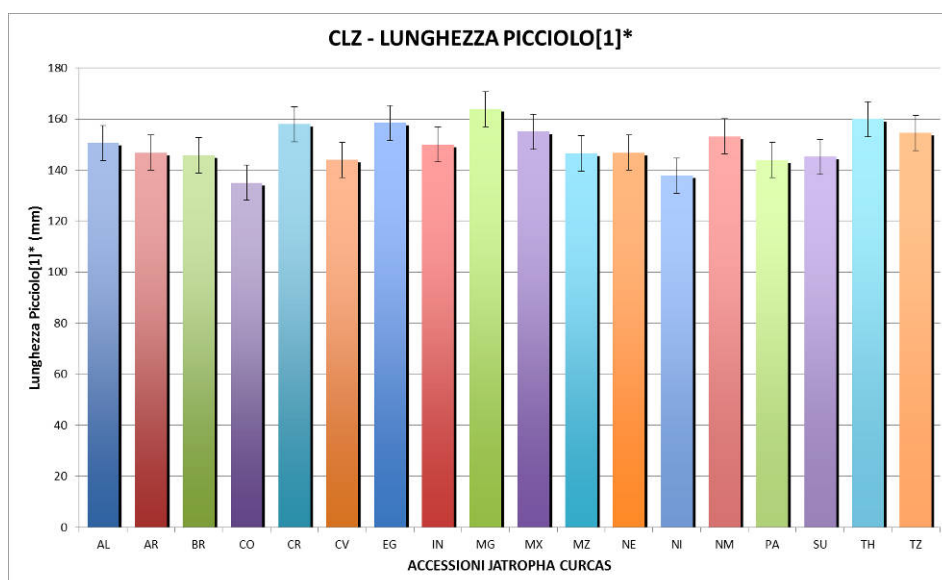


Grafico 10 - Lunghezza del picciolo delle piante della collezione (mm)

La lunghezza del picciolo oscilla tra valori di 125 e 165 mm. Anche in questo caso le piante provenienti dal Mato Grosso registrano valori elevati, seguite da quelle di Tailandia, Costa Rica ed Egitto. Le provenienze Congo e Nicaragua hanno i valori più bassi.

3.2.2 Discussione dei dati produttivi relativi alle piante della Collezione - CLZ

Alcuni individui appartenenti alla collezione, nel corso dell'annata agraria 2012/2013, hanno inaspettatamente prodotto frutti e semi sui quali è stato possibile effettuare misurazioni e rilievi morfologici.

Le piante che hanno prodotto e la loro produttività in termini di peso semi (g) e numero semi per pianta (n) sono riportate in tabella 14.

COLLEZIONE <i>Jatropha curcas</i>			
Codice pianta	PROVENIENZA	Peso semi (g)	N° semi
ARF15	AR	16,3	26
BRB19	BR	11,3	24
BRB20	BR	5,7	14
BRC17	BR	3,2	10
BRC19	BR	28,1	54
BRC20	BR	25,1	44
BRI13	BR	1,9	3
BRR17	BR	1,4	2
MGD17	MG	8,5	15
MGD19	MG	1,8	6
MZE20	MZ	3,4	7
MZE21	MZ	16	22
MZG21	MZ	23,7	46
MZL21	MZ	2,1	6
PAG14	PA	10,3	15
PAG15	PA	2,3	6
SUA17	SU	4,9	11
SUD20	SU	7,5	17
SUN19	SU	1,9	3
	TOTALE	175,4	331

Tab. 14 - Produzione in semi delle piante della collezione

Come si può osservare dalla tabella sopra riportata e dai grafici n. 11 e 12, solo 6 provenienze hanno prodotto: Arusha (AR) con un solo esemplare produttivo, Brasile (BR), Mato Grosso (MG), Mozambico (MZ) e Suriname (SU) e in modo particolare si sono distinti alcuni individui provenienti dal Brasile (BRC19, BRC20) e dal Mozambico (MZG21) sia per numero che per peso di semi prodotti per pianta.

Gli individui produttivi sono quindi oggetto di attente osservazioni e i semi raccolti sono stati utilizzati per moltiplicare i soggetti, parallelamente si è proceduto a moltiplicare gli individui per talea; lo scopo è quello di allestire campi di valutazione sia della progenie sia dei cloni per effettuare una valutazione sulla precocità produttiva dei soggetti.

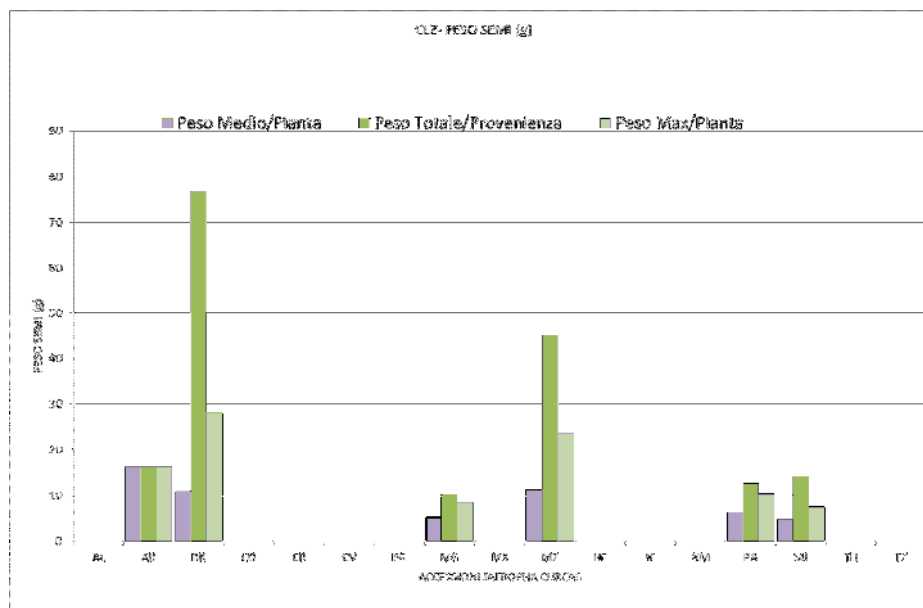


Grafico 11 - Peso dei semi prodotti dalle piante della collezione (g)

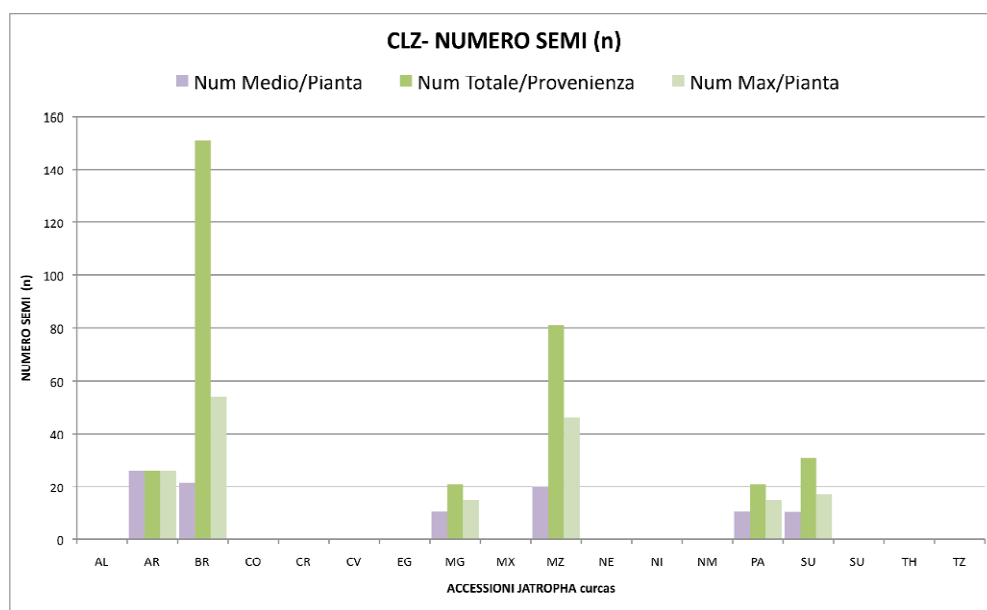


Grafico 12 - Numero dei semi prodotti dalle piante della collezione

3.2.3 Analisi delle componenti principali dei dati riguardanti le piante della Collezione - CLZ

I dati morfologici corretti che interessano le piante della collezione, sono stati successivamente sottoposti ad analisi delle componenti principali utilizzando il software statistico IBM SPSS Statistics 20.0.

Il calcolo degli autovalori ha mostrato che il 67% della varianza totale (Tab. 15) è spiegata dalle prime 4 componenti (autovalori >0,5).

Varianza totale spiegata						
Componente	Autovalori iniziali			Pesi dei fattori non ruotati		
	Totale	% di varianza	% cumulata	Totale	% di varianza	% cumulata
1	3,087	30,868	30,868	3,087	30,868	30,868
2	1,621	16,215	47,082	1,621	16,215	47,082
3	1,024	10,238	57,321	1,024	10,238	57,321
4	1,004	10,038	67,359	1,004	10,038	67,359
5	,863	8,633	75,991	,863	8,633	75,991
6	,646	6,461	82,453	,646	6,461	82,453
7	,544	5,444	87,897	,544	5,444	87,897
8	,502	5,016	92,913	,502	5,016	92,913
9	,363	3,632	96,545			
10	,345	3,455	100,000			

Metodo di estrazione: Analisi componenti principali.

Tab. 15 - PCA: Varianza spiegata per componente

Inoltre la matrice delle componenti principali (Tab. 16) ha consentito di individuare le variabili che pesano maggiormente su ciascuna componente principale, ovvero: sulla PCA1: Lunghezza della Foglia, sulla PCA2: Diametro della Chioma e sulla PCA3: Numero di Ramificazioni.

Matrice di componenti ^a								
	Componente							
	1	2	3	4	5	6	7	8
LUNPET1Corr	.719	-.310	.295	-.141	.226	.145	-.022	-.153
LUNPET2Corr	.698	-.357	-.072	.057	.048	-.293	.264	-.368
LUNPET3Corr	.652	-.342	-.258	.110	-.221	-.318	.138	.389
Hplia Corretto	.632	.522	.042	-.093	-.158	-.225	-.272	.166
LARFOGCorr	.630	-.362	.289	-.229	.303	.226	-.170	.249
LUNPET3Corr	.486	-.236	-.479	.337	-.333	.410	-.280	-.135
CANOPCorr	.571	.622	-.009	-.107	.040	-.155	-.210	-.254
DIAFUSTCorr	.480	.492	.291	-.012	-.361	.345	.434	.082
SPADCorr	.066	.077	.443	.872	.147	-.078	-.066	.035
NRAMCorr	.258	.433	-.520	.150	.616	.139	.193	.116

Metodo estrazione: analisi componenti principali.
a. 8 componenti estratti

Tab. 16 - Peso delle variabili su ciascuna componente principale

In base alle componenti principali è stato quindi possibile calcolare la matrice delle distanze euclidee, sulla base della quale è stata eseguita l'analisi cluster utilizzando l'algoritmo

UPGMA del metodo SAHN (Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested, clustering methods). Il software statistico utilizzato è stato NTSYS 2.2.

Si precisa che dall'analisi PCA, in cui sono stati esclusi gli individui di provenienza Costa Rica (CR) e Capo Verde (CV) perché avevano un solo rappresentante, si è ottenuto un dendrogramma caratterizzato da numerosi clusters e di difficile interpretazione di cui sono riportate solo tre parti, ovvero quelle che hanno suscitato maggiore interesse ai fini della presente ricerca (Figg. 23, 24, 25).

Successivamente per semplificare la comprensione dei risultati si è proceduto a plottare le prime tre componenti principali su grafico 3D utilizzando il software statistico NTSYS 2.2, è stato così possibile avere una migliore interpretazione per le parti del dendrogramma d'associazione d'interesse, alla luce delle caratteristiche di quest'ultimo grafico.

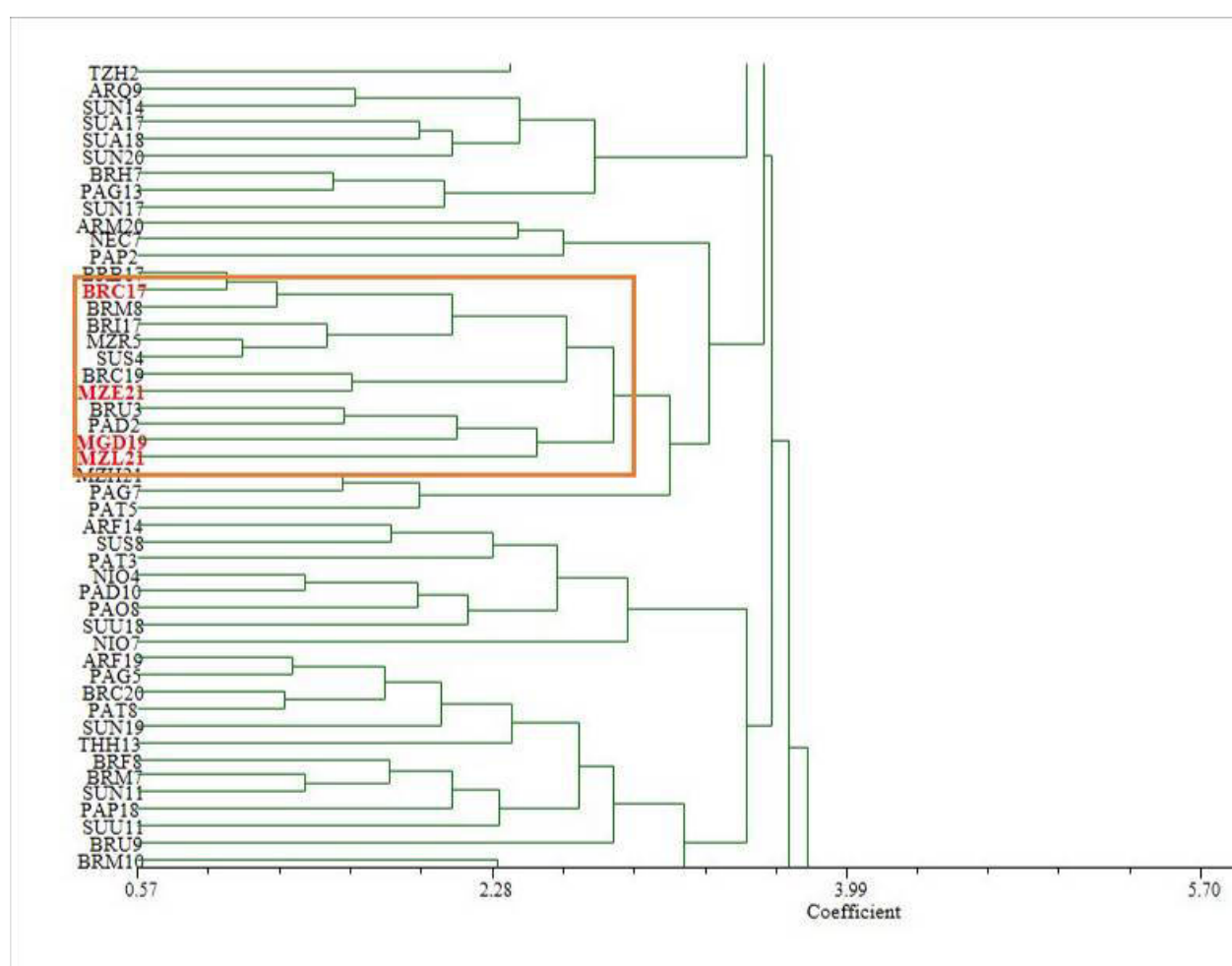


Fig. 23 – Dettaglio del dendrogramma di associazione I

Un primo cluster di interesse è quello evidenziato in figura n. 23 in cui, segnati in rosso, si ritrovano 4 dei 18 individui della collezione che hanno prodotto seme nel corso del 2013, il coefficiente di similarità che caratterizza il cluster è circa 3. Gli altri soggetti produttivi non si raggruppano in nessun altro cluster.

Sarà opportuno seguire nel corso della presente annata agraria lo sviluppo in termini di produzione degli altri individui appartenenti al medesimo cluster.

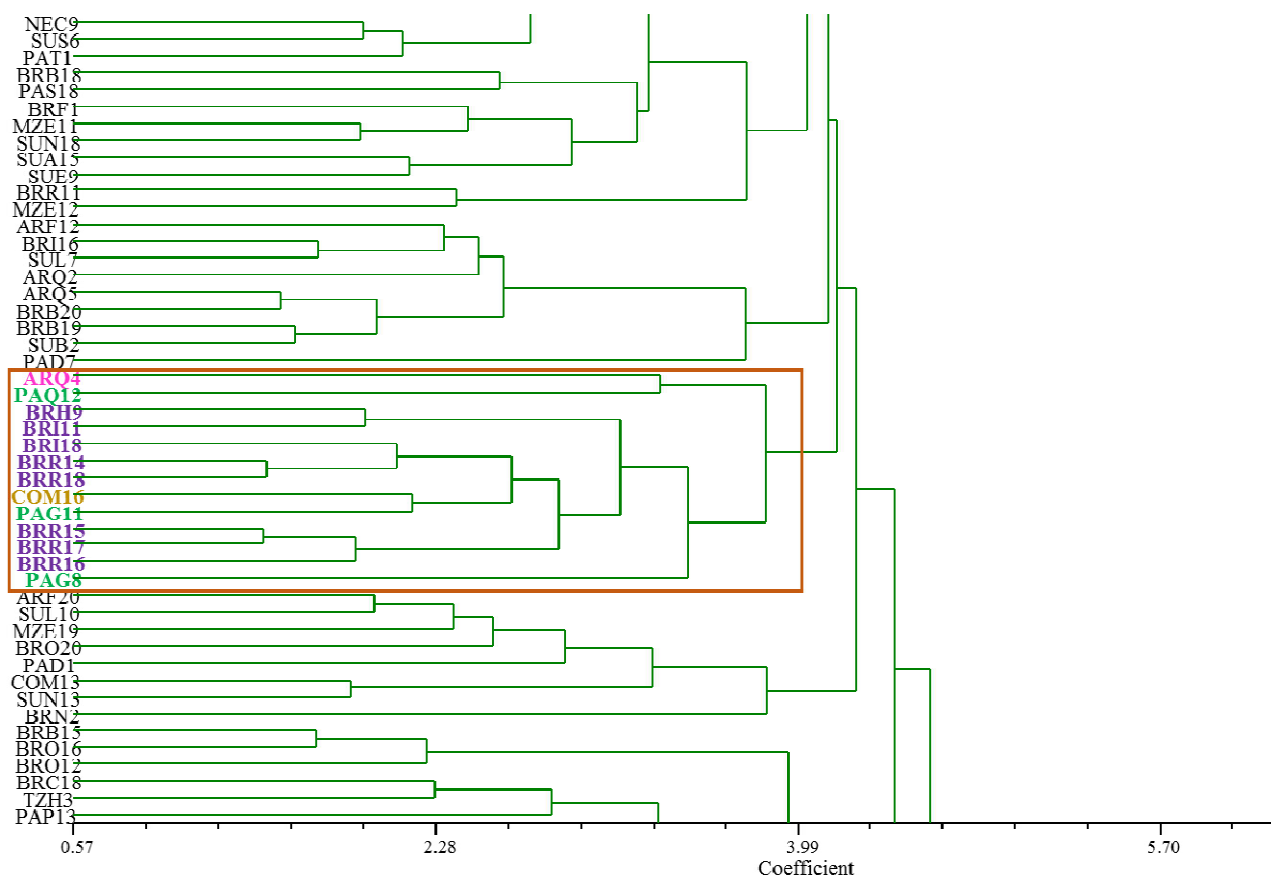


Fig. 24 - Dettaglio del dendrogramma di associazione II

Con coefficiente di similarità maggiore, intorno a 3,99, si individua un altro cluster interessante in cui si ritrovano 8 individui provenienti dal Brasile assieme a 3 individui del Paranà e due soggetti di provenienza Africana: Congo e Arusha (Tanzania), peraltro nel cluster si ritrova anche il soggetto produttivo BRR17.

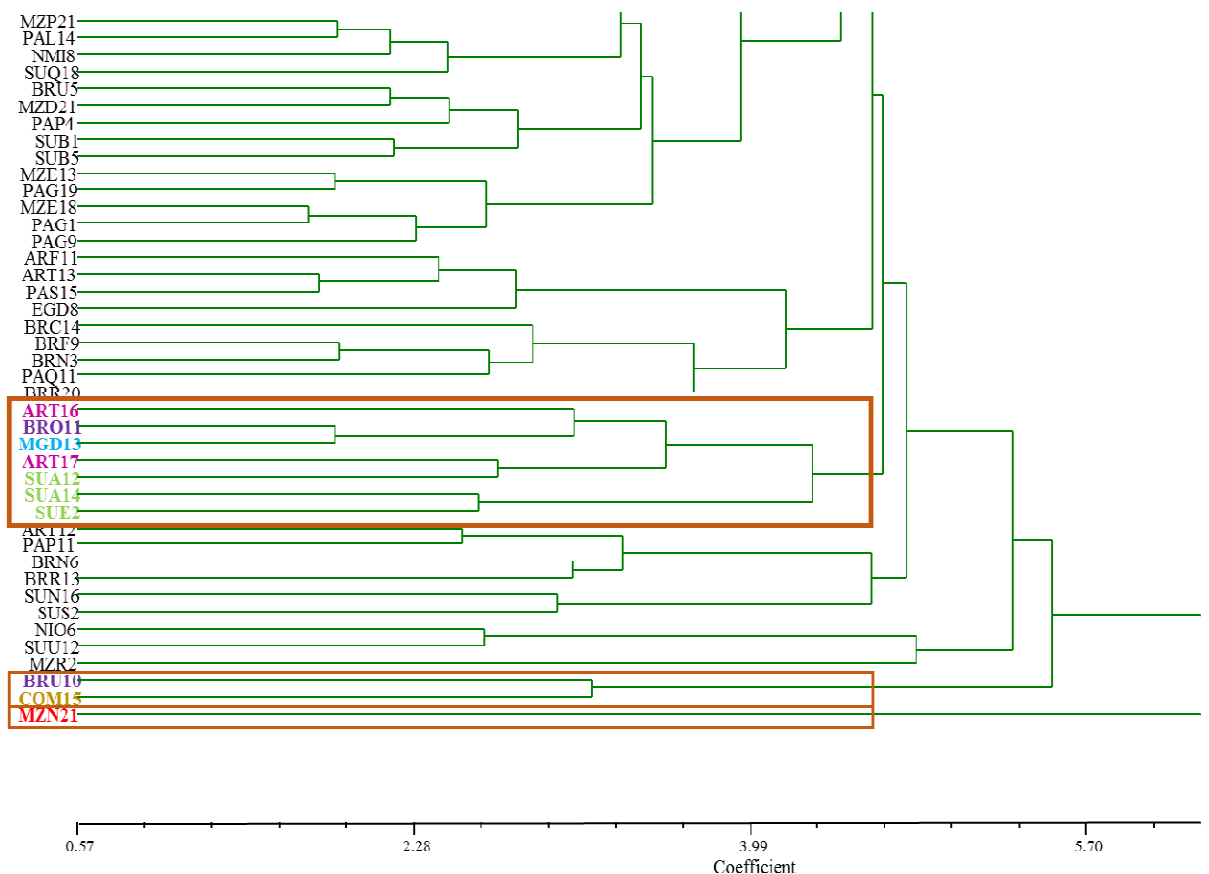


Fig. 25 - Dettaglio del dendrogramma di associazione III

Osservando la parte terminale del dendrogramma (Fig. 25), ove si riscontrano i coefficienti di similarità più elevati, è possibile individuare un cluster costituito da provenienze eterogenee che però si localizzano nel grafico 3D (Fig. 26) in posizione esterna alla maggior parte degli individui; si tratta di ART16, BRO11, MGD13, ART17, SUA12, SUA14 e SUE2.

Inoltre, nella stessa figura, si notano fortemente distinti da tutti gli altri individui i soggetti:

- MZN21, che si distacca fortemente da tutti gli altri
- BRU10 e COM15, che formano uno specifico cluster con coefficiente di similarità >4,50.

Tali individui si possono osservare nel grafico 3D in posizione esterna rispetto alla nube centrale.

3.4 CARATTERIZZAZIONE DEL GERMOPLASMA MALGASCIO

3.4.1 Dati relativi alla sperimentazione sulle piante madri - PM

Le piante madri, chiamate Ramet, sono disposte in uno speciale dispositivo sperimentale e sono state messe a dimora partendo da talee radicate nel settembre 2011.

Nel corso del loro sviluppo, queste piante hanno mostrato la peculiare capacità di fiorire e produrre semi già al primo anno dal trapianto. Tale fenomeno, probabilmente legato alla condizione di induzione fiorale già avvenuta al momento della raccolta delle talee, ha portato alla produzione di semente anche da parte di piante su cui non erano stati effettuati i primi rilievi morfologici; per tale motivo esiste una non completa sovrapposizione tra grafici dei rilievi morfologici e quelli produttivi.

3.4.1.1 Discussione dei dati morfologici relativi alle piante madri

I dati prelevati sulle piante madri sono al momento incompleti a causa della morte di talee al momento del trapianto a dimora e non è quindi stato possibile sviluppare l'analisi statistica su di essi.

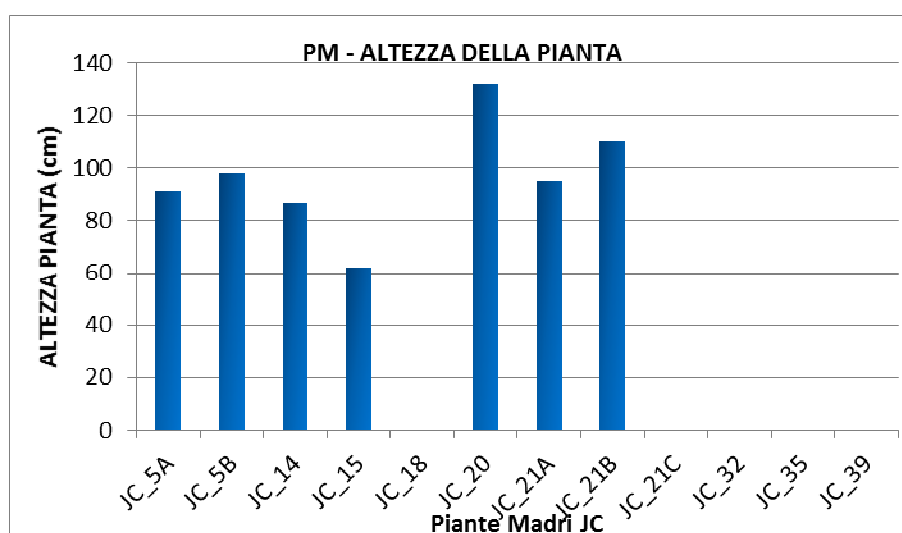


Grafico 13 - Misura dell'altezza delle piante madri (cm)

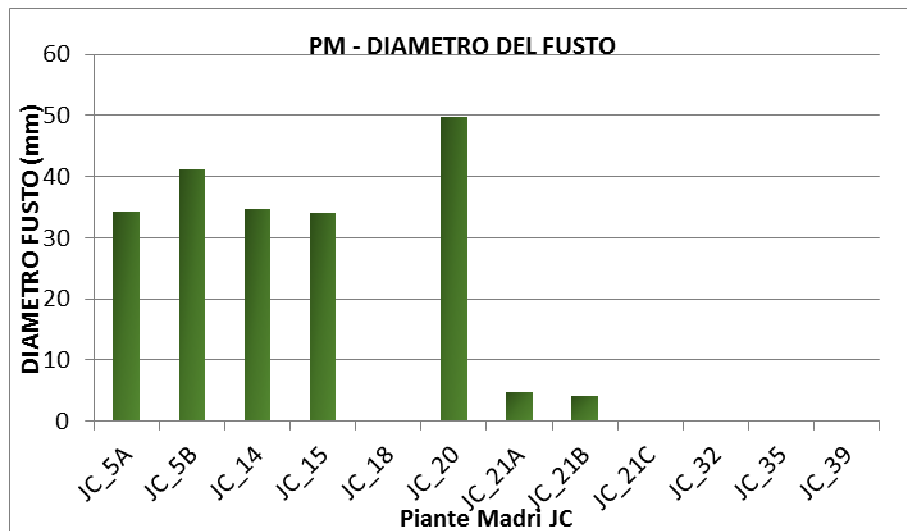


Grafico 13 - Misura del diametro del fusto delle piante madri (cm)

Per quanto riguarda i dati relativi ad altezza e diametro del fusto (Grafico 13 e Grafico 14), questi sono stati rilevati su 7 esemplari di piante madri e si può notare l'elevata variabilità, soprattutto per quanto concerne le misurazioni relative al diametro che per due piante non arrivano a 10 mm (JC21A, JC21B). La JC20 è la pianta con maggiori dimensioni sia di diametro che di altezza.

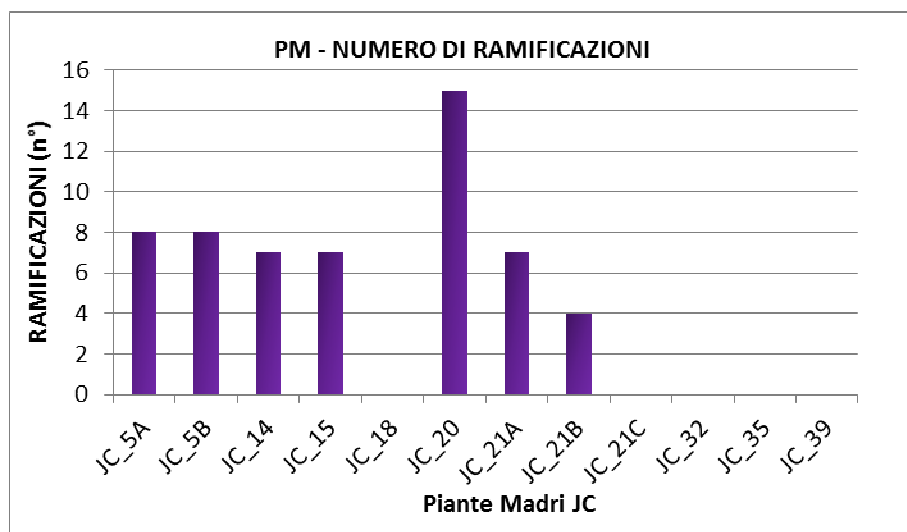


Grafico 15 - Numero di ramificazioni per pianta madre

Come riportato nel grafico 11, il numero delle ramificazioni di tutte le piante madri oscilla tra 4 ed 8. Solo nel caso di JC20 le ramificazioni sono particolarmente abbondanti ed è stato possibile contarne 15.

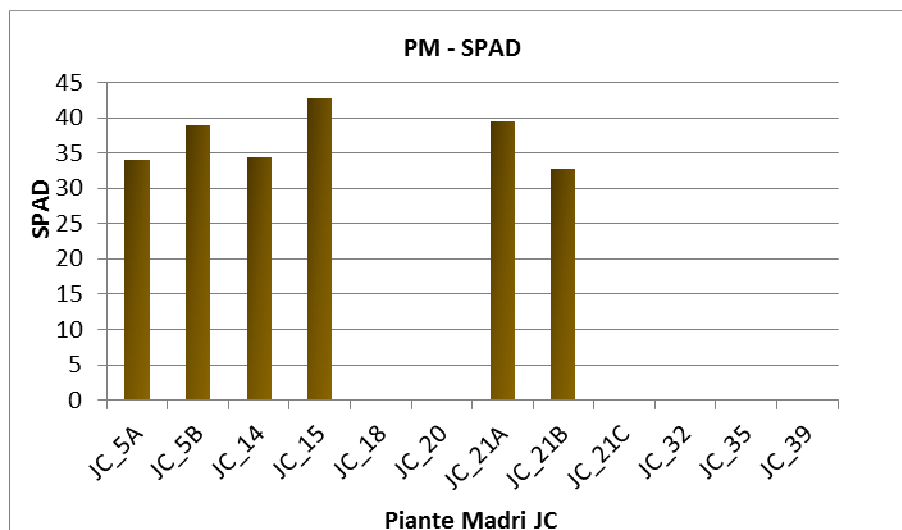


Grafico 16 - Misura dello SPAD delle piante madri

Per quanto riguarda lo SPAD, le piante JC15, JC21A e JC5B hanno i valori più elevati, intorno a 40; mentre per le altre sono stati registrati tutti valori inferiori a 35.

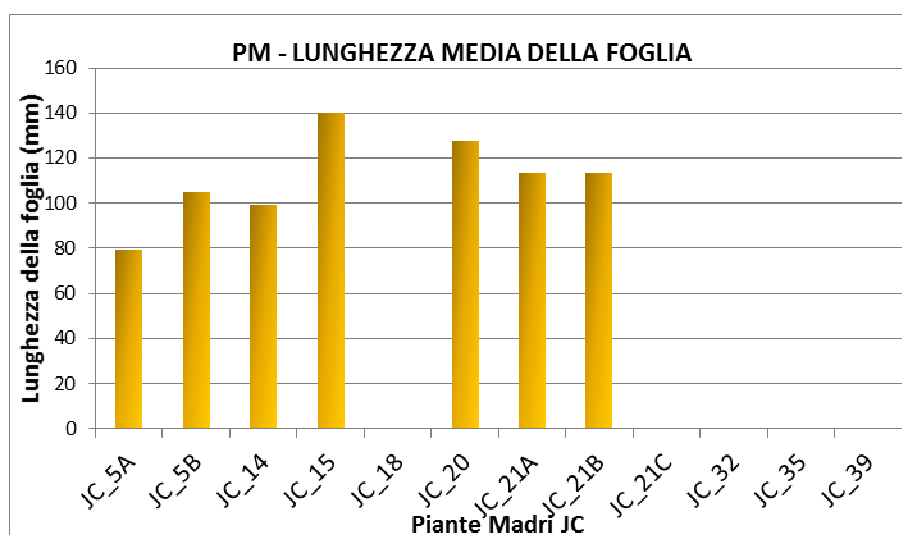


Grafico 17 – Lunghezza media delle foglie delle piante madri (mm)

La lunghezza delle foglie varia dagli 80 ai 140 mm, col minimo rappresentato dalla JC5A: 80 mm ed il massimo corrispondente alla JC15: 140 mm. Il valore medio fra tutte le piante è però intorno ai 100 mm.

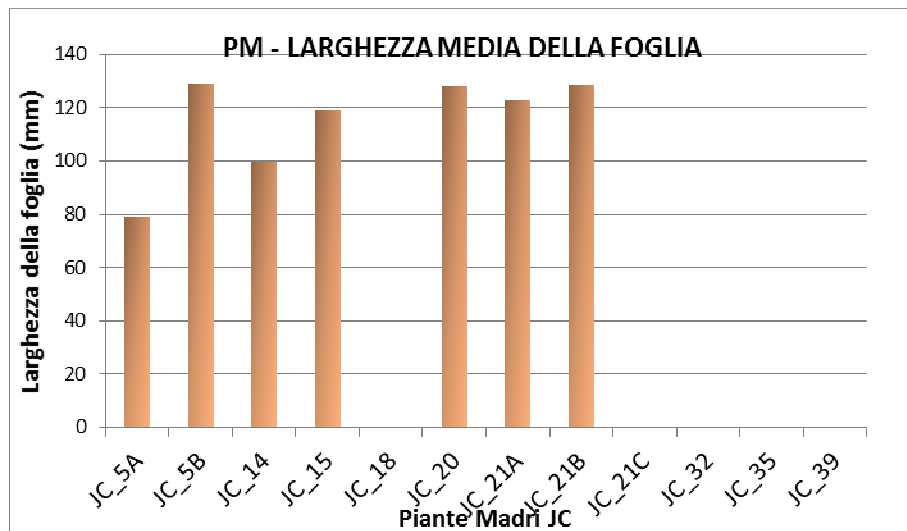


Grafico 18 – Larghezza media delle foglie delle piante madri (mm)

Per quanto concerne la larghezza delle foglie JC5A e JC5B riportano rispettivamente il valore minimo e massimo. Tutte le altre, ad eccezione della JC14, che ha un valore vicino a 100 mm, sono di larghezza introno ai 120 mm.

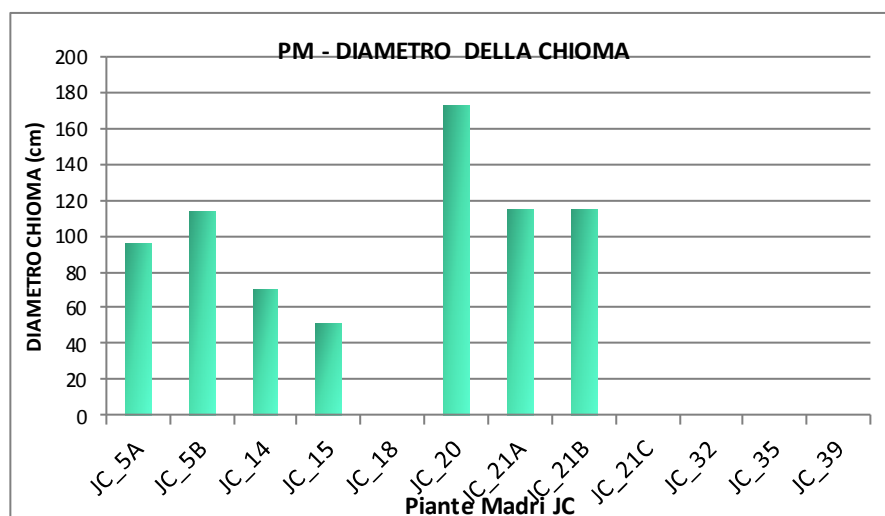


Grafico 19 – Diametro della chioma delle piante madri

Come si vede nel grafico soprariportato il diametro della chioma di JC20 è il maggiore, mentre JC15 ha il diametro minimo fra quelli rilevati. JC5B, JC21A e B sono caratterizzati da misurazioni simili, vicine ai 120 mm.

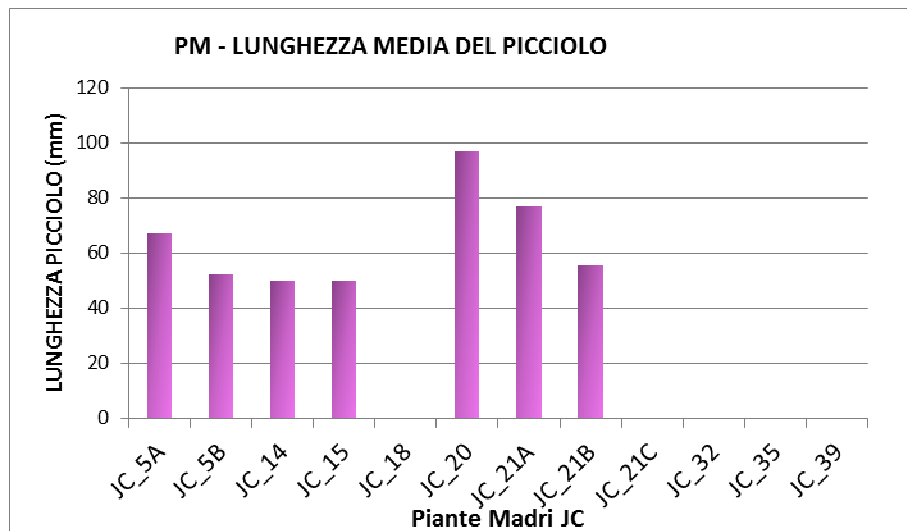


Grafico 20 - Lunghezza media del picciolo delle piante madri (3 misurazioni)

Il picciolo di lunghezza maggiore è quello di JC20, mentre valori minimi sono stati rilevati per JC5B, JC14 e JC15.

3.4.1.2 Discussione dei dati produttivi relativi alle piante madri

Nel corso dell'anno 2012/2013 alcune delle piante madri hanno prodotto seme (Tab. 17) e parte della semente è stata trasferita a Firenze, presso i laboratori DISPAA per realizzare l'estrazione dell'olio e la sua caratterizzazione.

PIANTE MADRI <i>Jatropha curcas</i>		
<i>Codice pianta</i>	<i>Peso semi (g)</i>	<i>N° semi</i>
PM_JC5A	46,8	55
PM_JC5B	22,1	22
PM_JC14	45	67
PM_JC15	56,4	89
PM_JC18	132,3	184
PM_JC20	31,5	59
PM_JC21A	12,9	19
PM_JC21B	67,6	88
PM_JC21C	3,2	6
PM_JC23	1	2
PM_JC32	4,6	9
PM_JC35	0,4	1
PM_JC39	3,6	6
TOT	427,4	607

Tab. 17 - Produzione seme PM 2012/2013

Dall'analisi dei dati disponibili, la produttività in seme risulta molto consistente per alcuni genotipi, soprattutto se comparata alla produttività per pianta riscontrata nella collezione. In modo particolare si distinguono la PM JC18 con più di 130 grammi di seme per pianta e 184 semi prodotti e la PM JC21B con 67 grammi e 88 semi prodotti.

Dall'analisi del contenuto percentuale in olio del seme, riportato nel grafico n. 21, si osserva che il genotipo JC18, molto produttivo in termini di seme, presenta anche uno dei valori percentuali più elevati di resa in olio (39,45%) assieme al genotipo JC21C (39,72%). All'opposto i valori minori si riscontrano per JC5A (24,05%) e JC20 (26,88%).

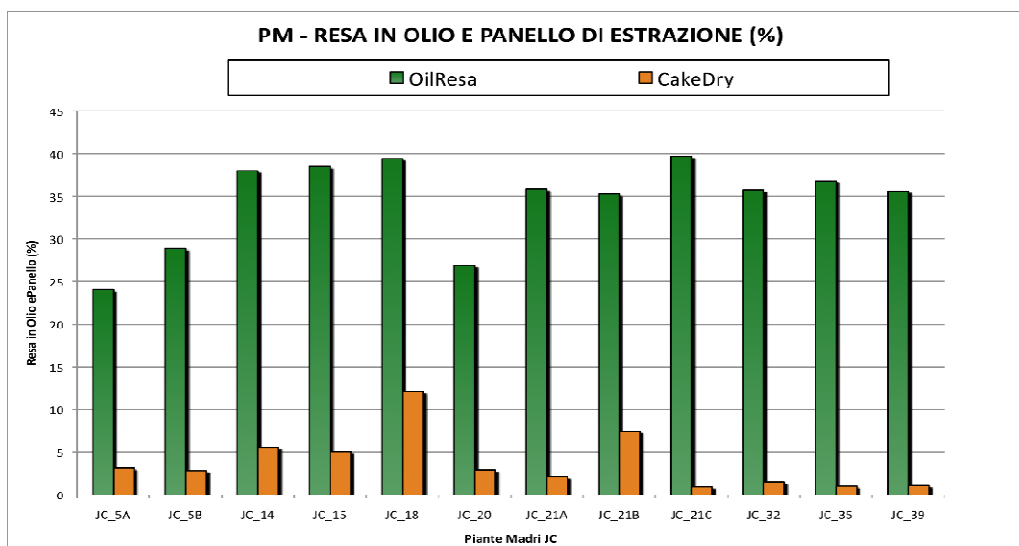


Grafico 21 - Resa in olio e pannello d'estrazione delle piante madri (%)

Le tipologie e le percentuali di acidi grassi che compongono l'olio estratto sono riportate in tabella 18 da cui si evince che le frazioni di acido oleico (C18:1) maggiori si trovano nell'olio estratto dai genotipi JC14 con 42,56%, JC20 con 42,15%, JC18 con 41,72% e JC15 con 41,62%, confermando anche sul lato qualitativo degli oli le buone performance produttive del genotipo JC18.

Tutti questi genotipi, inoltre, insieme agli altri genotipi che hanno mostrato buone rese in olio, ovvero il JC21B ed il JC3, hanno un valore superiore a 1 nel rapporto Ac. Oleico / Ac. Linolenico.

GENOTIPO	% Acido Linoleico (C18:2c)	% Acido Oleico (C18:1c)	% Acido Palmitico (C16:0)	% Acido Stearico (C18:0)	% Acido Palmitoleico (C16:1)	% Acido Linolenico (C18:3n3)	% Acido Arachidico (C20:0)	Altri <1	Oliec/Lino 1
JC_5A	43,56	36,7	13,53	4,54	0,82	0,19	0,16	0,5	0,84
JC_5B	41,56	38,43	13,04	5,04	0,94	0,24	0,18	0,57	0,92
JC_14	36,99	42,56	12,78	6	0,77	0,19	0,2	0,52	1,15
JC_15	37,25	41,62	14,33	4,87	0,97	0,23	0,18	0,54	1,12
JC_18	38,11	41,72	12,74	5,75	0,79	0,18	0,18	0,52	1,09
JC_20	36,65	42,15	13,23	6,1	0,87	0,22	0,19	0,59	1,15
JC_21A	43,27	36,99	12,78	4,92	0,69	0,2	0,17	0,97	0,85
JC_21B	39,11	41,02	12,37	5,83	0,74	0,19	0,19	0,53	1,05
JC_21C	42,7	37,21	13,27	4,88	0,91	0,23	0,18	0,63	0,87
JC_32	35,93	40,3	15,66	5,98	1,15	0,21	0,19	0,66	1,12
JC_39	42,62	36,59	13,57	5,43	0,81	0,26	0,18	0,53	0,86

Tab. 18 - Composizione FFA (Free Fatty Acids) dell'olio estratto dai semi delle piante madri

3.4.2 Dati relativi alla sperimentazione sulle piante Half Sib – HSib

3.4.2.1 Analisi statistica dei dati provenienti dai campi sperimentali Half Sib

I dati morfologici relativi alle famiglie Half Sib sono stati sottoposti ad analisi della varianza univariata (il modello è riportato nelle successive tabelle). In seguito per ciascuna variabile, sulla base dell'atteso della varianza, è stato possibile calcolare:

$[\sigma^2_A]$ che rappresenta 1/4 della Varianza Additiva

La Varianza Additiva $[4 \sigma^2_A]$

La Varianza Fenotipica

L'Ereditabilità.

Nelle tabelle sottostanti sono riportati i valori di detti calcoli per tutte le variabili misurate.

ALTEZZA PIANTA					
Fonti di Variazione	DEVIANZA	G.d.L	VARIANZA	Componente attesa della varianza	Significatività
TRA FAMIGLIE HSIB	52554,661	43	1222,201	$\sigma^2_e + 9,14\sigma^2_A$	**
Errore	81368,800	370	219,916	σ^2_e	
Totale	1503171,000	414			
ALTEZZA PIANTA					
Stima ereditabilità					
σ^2_A	109,659				
Media Armonica	9,140				
$4 \sigma^2_A$	438,637				
Varianza Fenotipica	658,553				
h^2	0,666				

Tab. 19 – Analisi della varianza, attesa della varianza e calcolo dell'ereditabilità dell'Altezza Pianta

DIAMETRO FUSTO					
Fonti di Variazione	DEVIANZA	G.d.L	VARIANZA	Componente attesa della varianza	Significatività
TRA FAMIGLIE HSIB	16962,836	43	394,485	$\sigma^2_e + 9,14\sigma^2_A$	**
Errore	29026,190	370	78,449	σ^2_e	
Totale	658563,000	414			
DIAMETRO FUSTO					
Stima ereditabilità					
σ^2_A	34,577				
Media Armonica	9,140				
$4 \sigma^2_A$	138,309				
Varianza Fenotipica	216,758				
h^2	0,638				

Tab. 20 - Analisi della varianza, attesa della varianza e calcolo dell'ereditabilità del Diametro Fusto

NUMERO RAMIFICAZIONI					
Fonti di Variazione	DEVIANZA	G.d.L	VARIANZA	Componente attesa della varianza	Significatività
TRA FAMIGLIE HSIB	167,811	43	3,903	$\sigma_s^2 + 9,14\sigma_A^2$	**
Errore	349,629	370	0,945	σ_b^2	
Totale	2904,000	414			
NUMERO RAMIFICAZIONI					
Stima ereditabilità					
σ_A^2	0,324				
Media Armonica	9,140				
$4\sigma_A^2$	1,294				
Varianza Fenotipica	2,239				
h^2	0,578				

Tab. 21 - Analisi della varianza, attesa della varianza e calcolo dell'ereditabilità del n° ramificazioni

SPAD					
Fonti di Variazione	DEVIANZA	G.d.L	VARIANZA	Componente attesa della varianza	Significatività
TRA FAMIGLIE HSIB	19658,468	43	457,174	$\sigma_s^2 + 9,14\sigma_A^2$	**
Errore	59402,137	369	160,981	σ_b^2	
Totale	1293542,000	413			
SPAD					
Stima ereditabilità					
σ_A^2	32,479				
Media Armonica	9,119				
$4\sigma_A^2$	129,917				
Varianza Fenotipica	290,899				
h^2	0,447				

Tab. 22 - Analisi della varianza, attesa della varianza e calcolo dell'ereditabilità dello SPAD

LUNGHEZZA FOGLIA					
Fonti di Variazione	DEVIANZA	G.d.L	VARIANZA	Componente attesa della varianza	Significatività
TRA FAMIGLIE HSIB	30649,746	43	712,785	$\sigma_s^2 + 9,14\sigma_A^2$	**
Errore	74355,906	370	200,962	σ_b^2	
Totale	3581556,000	414			
LUNGHEZZA FOGLIA					
Stima ereditabilità					
σ_A^2	55,998				
Media Armonica	9,140				
$4\sigma_A^2$	223,992				
Varianza Fenotipica	424,934				
h^2	0,527				

Tab. 23 - Analisi della varianza, attesa della varianza e calcolo dell'ereditabilità della Lunghezza Foglia

LARGHEZZA FOGLIA					
Fonti di Variazione	DEVIANZA	G.d.L	VARIANZA	Componente attesa della varianza	Significatività
TRA FAMIGLIE HSIB	36686,683	43	853,179	$\sigma_s^2 + 9,14\sigma_A^2$	**
Errore	94624,351	370	255,741	σ_e^2	
Totale	3758648,000	414			
LARGHEZZA FOGLIA					
Stima ereditabilità					
σ_A^2	65,365				
Media Armonica	9,140				
$4\sigma_A^2$	261,460				
Varianza Fenotipica	517,202				
h^2	0,506				

Tab. 24 - Analisi della varianza, attesa della varianza e calcolo dell'ereditabilità della Larghezza Foglia

DIAMETRO CHIOMA					
Fonti di Variazione	DEVIANZA	G.d.L	VARIANZA	Componente attesa della varianza	Significatività
TRA FAMIGLIE HSIB	29025,169	43	675,004	$\sigma_s^2 + 9,14\sigma_A^2$	**
Errore	79625,690	370	215,205	σ_e^2	
Totale	1790854,000	414			
DIAMETRO CHIOMA					
Stima ereditabilità					
σ_A^2	50,306				
Media Armonica	9,140				
$4\sigma_A^2$	201,225				
Varianza Fenotipica	416,430				
h^2	0,483				

Tab. 25 - Analisi della varianza, attesa della varianza e calcolo dell'ereditabilità del Diametro Chioma

LUNGHEZZA PICCIOLO					
Fonti di Variazione	DEVIANZA	G.d.L	VARIANZA	Componente attesa della varianza	Significatività
TRA FAMIGLIE HSIB	66397,250	43	1544,122	$\sigma_s^2 + 9,14\sigma_A^2$	**
Errore	192734,617	370	520,904	σ_e^2	
Totale	6399411,000	414			
DIAMETRO CHIOMA					
Stima ereditabilità					
σ_A^2	111,949				
Media Armonica	9,140				
$4\sigma_A^2$	447,798				
Varianza Fenotipica	968,702				
h^2	0,462				

Tab. 26 - Analisi della varianza, attesa della varianza e calcolo dell'ereditabilità della Lunghezza Picciolo

3.4.2.2 Analisi delle correlazioni semplici entro famiglie Half Sib

I dati morfologici raccolti sulle famiglie HSib sono inoltre stati sottoposti ad analisi statistica delle correlazioni, testate con la Pearson Correlation Analysis mediante il software statistico IBM SPSS Statistics 20.0, i cui risultati sono illustrati in Tabella 27.

	Hpia	Nram	Canop	DiaFust	LuFog	LarFog	LuPet1	LuPet2	LuPet3	SPAD
Hpia	1									
Nram	,374**	1								
Canop	,666**	,592**	1							
DiaFust	,771**	,511**	,681**	1						
LuFog	,412**	n.s.	,476**	,373**	1					
LarFog	,216**	n.s.	,334**	,188**	,744**	1				
LuPet1	,377**	,189**	,494**	,345**	,618**	,477**	1			
LuPet2	,311**	,125*	,393**	,247**	,435**	,392**	,363**	1		
LuPet3	,299**	,158**	,380**	,316**	,378**	,313**	,417**	,349**	1	
SPAD	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	,118*	n.s.	n.s.	1

Tab. 27 - Analisi delle correlazioni dati morfologici Half Sib

Dalla tabella delle correlazioni si osservano alcune particolarità come l'assenza di correlazioni negative e l'assenza di correlazione tra tutti i parametri e lo SPAD.

Tra le correlazioni significative, spiccano per entità: Diametro del fusto e altezza pianta (0,771); Larghezza Foglia con Lunghezza foglia (Grafico 22).

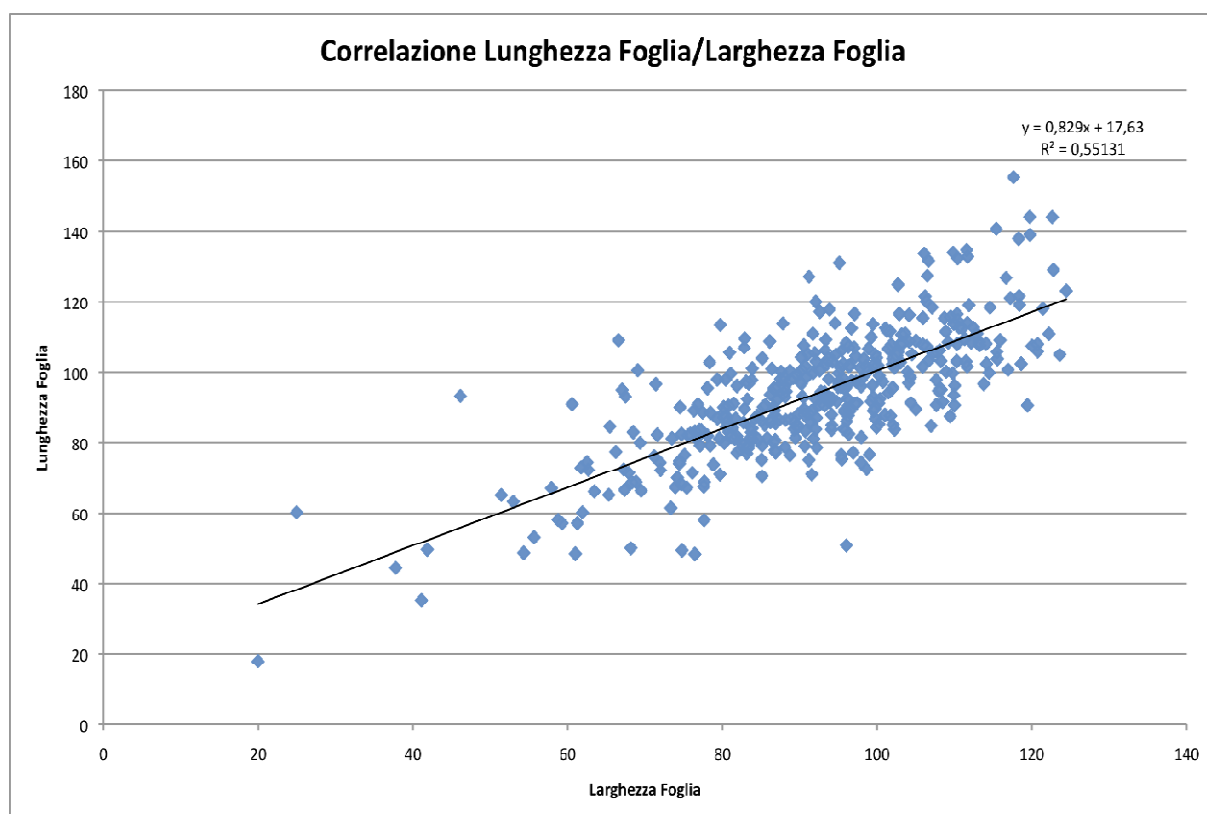


Grafico 22 - Correlazione Lunghezza Foglia/Larghezza Foglia

3.4.2.3 Discussione dei dati morfologici relativi agli Half Sib

Sulle variabili risultate significative per la fonte di variazione “Tra Famiglie” HSib è stata eseguita l’analisi post hoc la cui significatività è stata testata con il test di Tukey che ha consentito di attribuire gli intervalli di confidenza tra le medie, come riportato nei grafici che seguono.

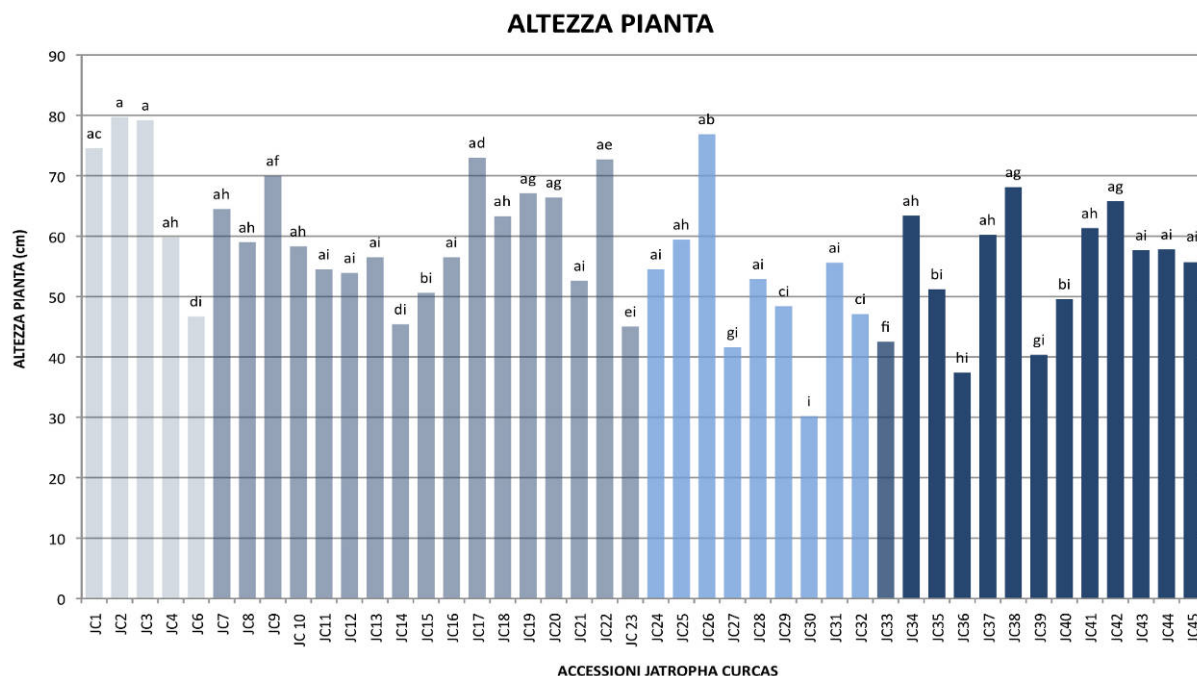


Grafico 23 - Altezza delle piante Half Sib (cm)

La variabile altezza pianta rilevata sulle famiglie Half Sib mostra una forte variabilità tra le famiglie, con valori medi che oscillano da quasi 80 cm (provenienza JC2 e JC3) fino ai 30 cm della JC30. Si distinguono sostanzialmente tre gruppi: un primo gruppo che comprende tutte le accessioni contrassegnate con intervalli di confidenza fino ad ah, ovvero circa fino a 60 cm di altezza, e le altre provenienze con misure inferiori. In modo particolare risultano distinti per il limitato valore del parametro in ordine crescente: JC30, JC37, JC40, JC27, JC14 e JC6. Considerando le macroaree di provenienza delle accessioni si osserva invece che l’area con le piante più alte è quella di Tulear (JC1-JC6) mentre mediamente le piante provenienti dal Centro-Nord (JC24-JC3) e dalla Costa Est (JC34-JC45) sono di taglia inferiore. Perfettamente in media con la media generale sono invece le piante dell’area di Milioke (JC7-JC23).

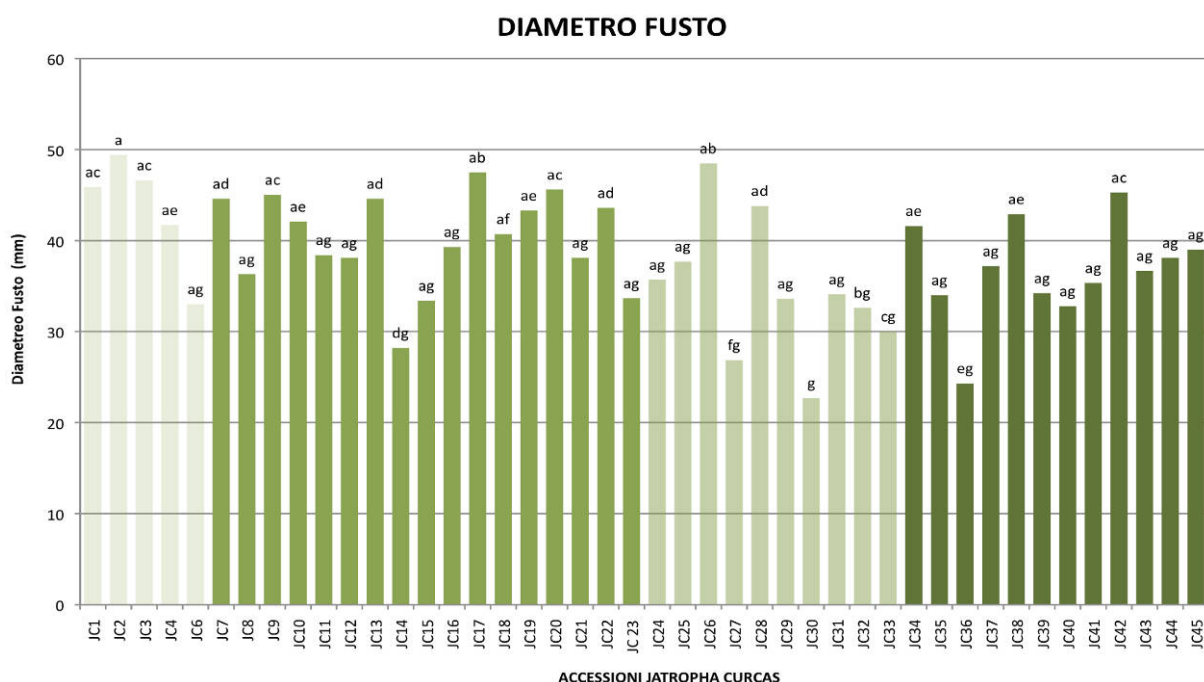


Grafico 24 - Numero ramificazioni delle piante Half Sib

La variabile Diametro Fusto ricalca molto la variabile precedente, difatti ad esempio l'accessione JC2 è quella che mostra i valori più elevati (circa 50 cm) assieme a JC17, JC26. Similmente le accessioni che hanno fatto registrare i valori più bassi sono, in ordine crescente: JC30, JC36, JC27, JC14 e, anche se non statisticamente significativa, l'accessione JC6. In riferimento alle macroaree di provenienza, anche nel caso di questa variabile l'area con la media più elevata è quella di Tulear (JC1-JC6) mentre quelle più basse sono l'area del Centro-Nord (JC24-JC33) e Costa Est (JC34-JC45); si osserva inoltre una forte variabilità all'interno delle accessioni provenienti dalla area di Milioko (JC7-JC23) in cui, si ricorda, si trovavano le popolazioni naturalizzate.

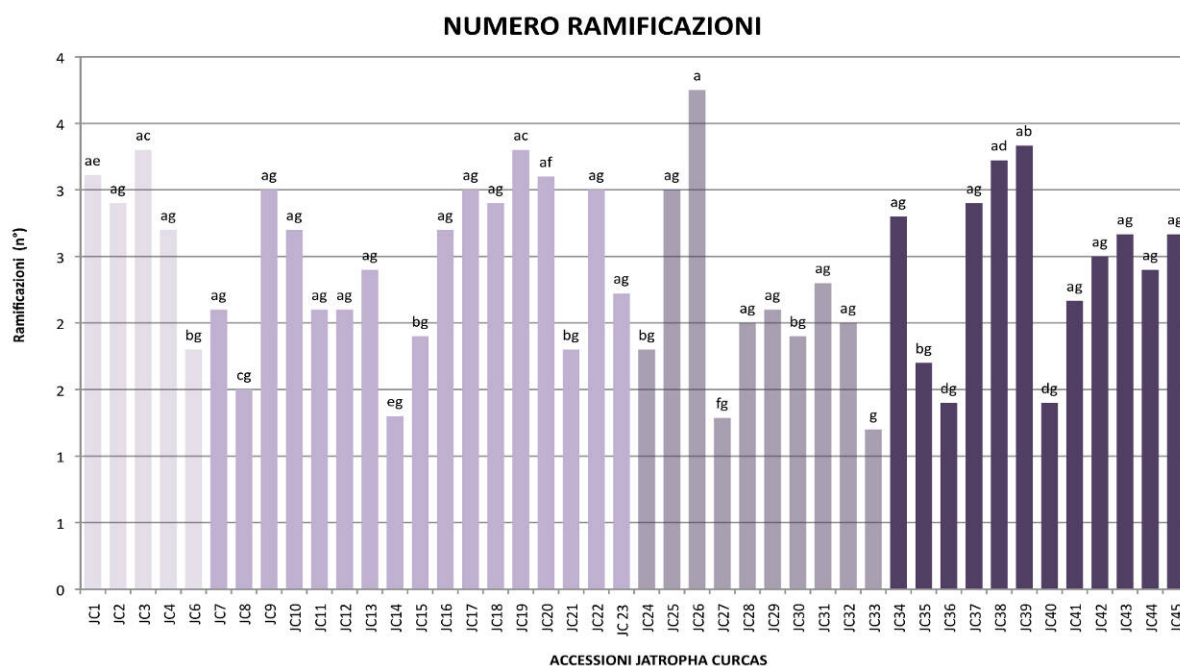


Grafico 25 - Diametro del fusto delle piante Half Sib

Per la variabile Numero delle ramificazioni l'accessione con i valori più elevati è la JC26 (peraltro la stessa accessione mostrava valori elevati anche per le precedenti due variabili) con 4,3 ramificazioni medie per pianta; all'opposto le accessioni con valori minori della variabile risultano essere: JC33, JC27, JC14, JC18, JC36 e JC40. In riferimento alle macroaree di provenienza la variabilità riscontrata si accentua molto rispetto alle variabili precedenti e risulta meno evidente individuare un comportamento uniforme per macroarea.

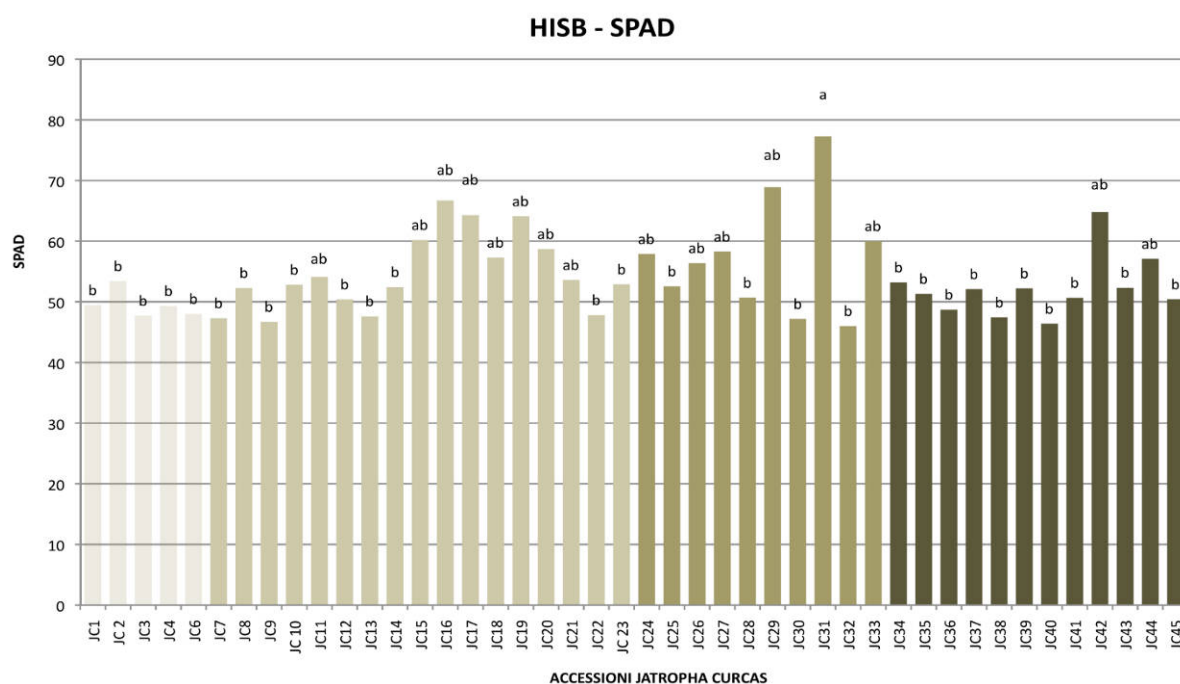


Grafico 26 - Misura dello SPAD per pianta Half Sib

I valori della variabile SPAD si presentano omogenei oscillando intorno al valore 50, ma alcune accessioni si mostrano statisticamente diverse dalle altre, in modo particolare la JC31 con valori superiori a 70; assieme ad essa si ritrovano anche i valori delle accessioni JC29, JC42, JC16, JC19 e JC17. Dall'analisi delle accessioni suddivise per macroaree si intuisce invece una spiccata riduzione dei valori SPAD tra le accessioni della zona di Tulear (JC1-JC6) e dell'area della Costa Est (JC34-JC45); invece i valori medi più elevati, pur essendo presente una forte variabilità, si riscontrano nelle accessioni di provenienza Milioke (JC7-JC23) e Centro Nord (JC24-JC33).

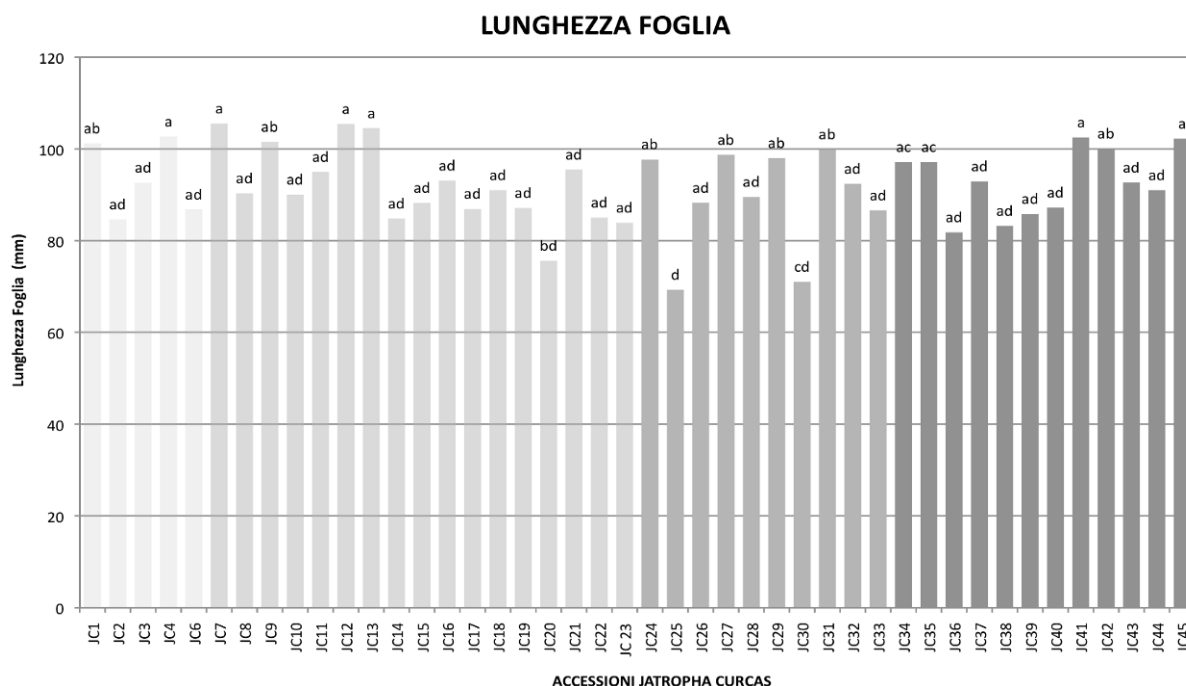


Grafico 27 - Lunghezza delle foglie delle piante Half Sib (mm)

La Lunghezza della foglia è un parametro che oscilla tra poco più di 70 mm a più di 100 mm, si distinguono soprattutto le accessioni JC4, JC7, JC12, JC13, JC41 e JC45 per i maggiori valori registrati e, all'opposto le accessioni JC25, JC30 e JC20 con i valori minori. Riguardo le macroaree di provenienza si osserva un spiccata variabilità soprattutto all'interno del gruppo del Centro Nord (JC24-JC33) mentre per gli altri tre gruppi si hanno oscillazioni nei valori contenute.

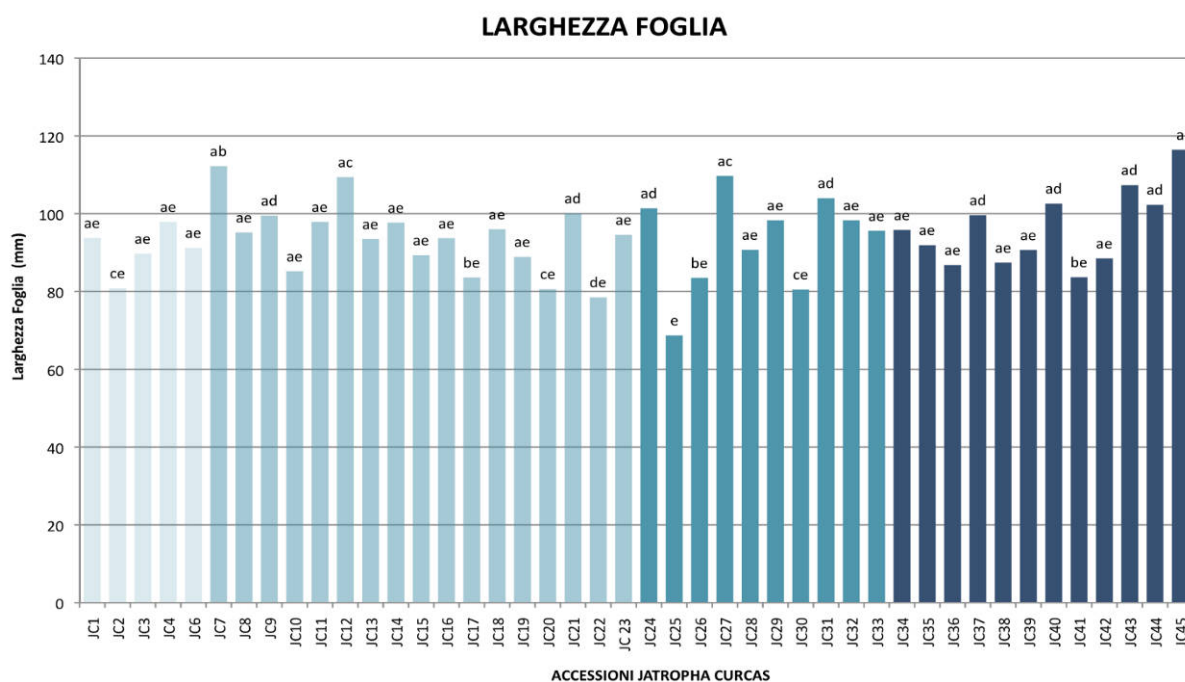


Grafico 28 - Larghezza delle foglie delle piante Half Sib (mm)

I valori del parametro Larghezza delle foglie variano da poco più di 70 cm (JC25) a quasi 120 cm (JC45) e riflettono molto l'andamento riscontrato per la variabile Lunghezza Foglia in cui il valore più elevato si riscontrava per l'accessione JC45 e il più basso per la JC25 assieme a JC22, JC30 e JC2; le differenze tra le altre accessioni appaiono invece statisticamente non significative. Anche in riferimento alle macroaree di provenienza non si distinguono tra di loro comportamenti omogenei.

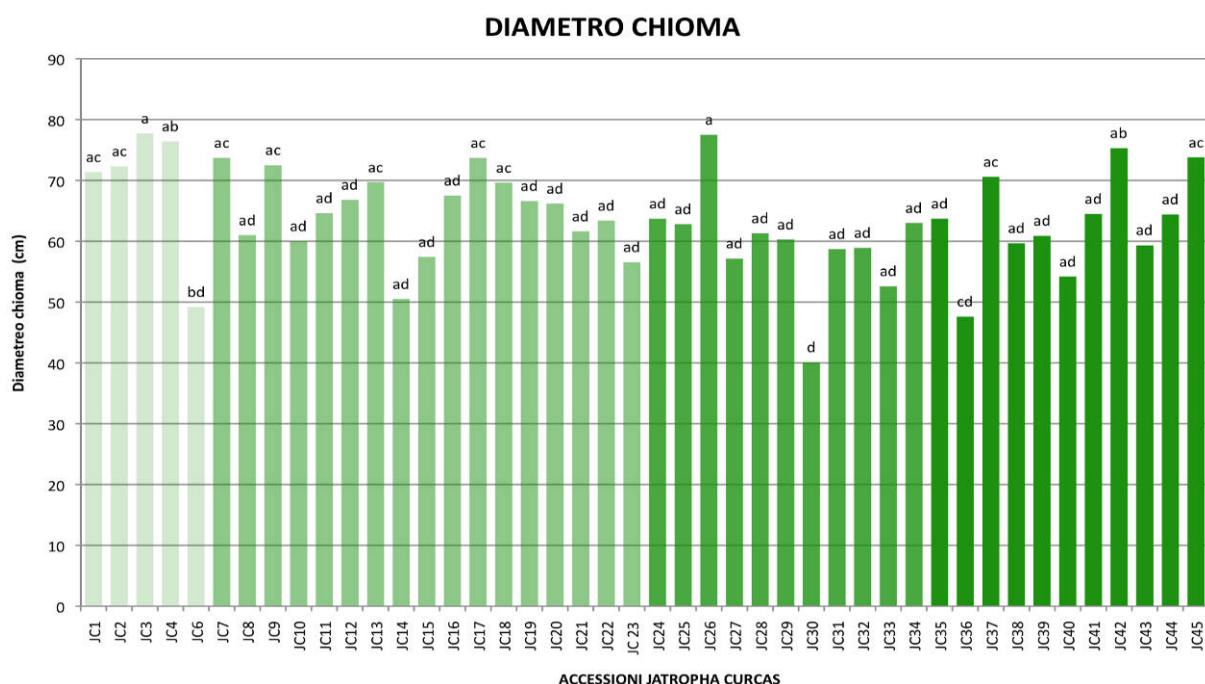


Grafico 29 - Diametro della chioma delle piante Half Sib (cm)

Il Diametro della chioma delle piante misurate varia da un minimo di 40 cm (JC29) ad un massimo di quasi 80 cm (JC2) e nella sua globalità mostra un andamento molto simile a quanto riscontrato dal parametro Diametro del Fusto: difatti in entrambi i casi le accessioni JC30, JC36, JC14 e JC6 mostrano livelli molto bassi di diametro chioma mentre le accessioni con valori più elevati sono la JC3 e soprattutto la JC26. La stessa considerazione può essere fatta in riferimento alle macroaree di provenienza.

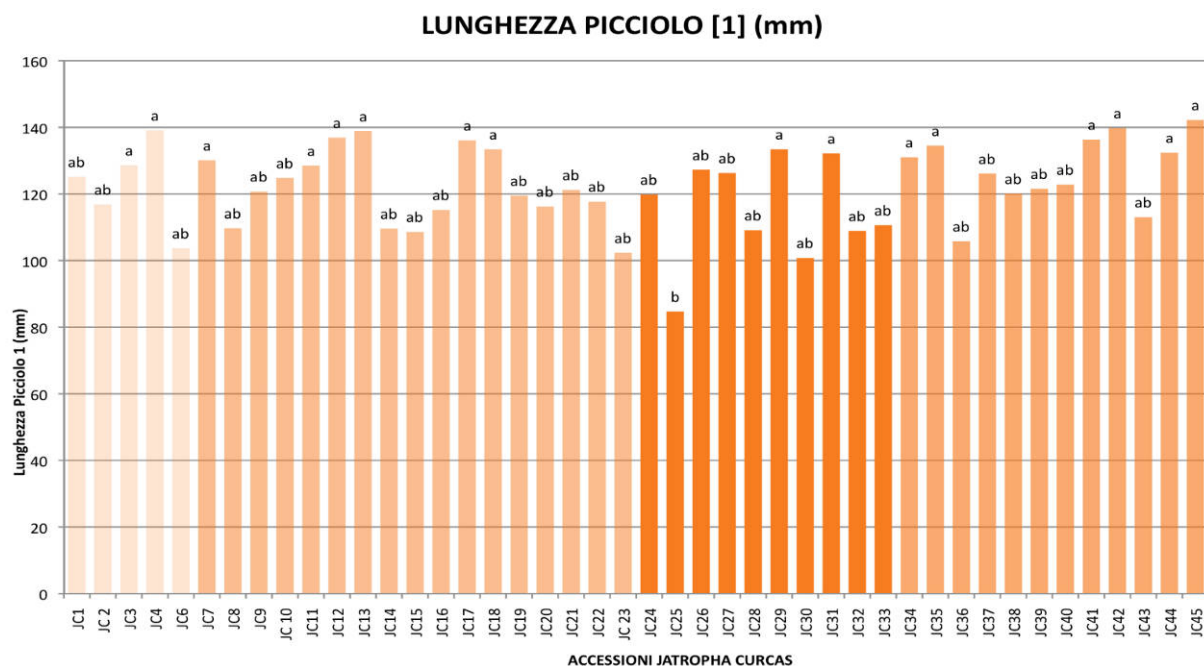


Grafico 30 - Lunghezza del picciolo delle piante Half Sib (mm)

Per il parametro Lunghezza del Picciolo si nota che l'accessione JC25 mostra un valore decisamente inferiore alle altre (82 mm). Nessuna affermazione può essere fatta in relazione alle provenienze da macroaree.

3.5 DISCUSSIONE DEI DATI GENETICI, MORFOLOGICI E PRODUTTIVI

Con questo lavoro di tesi è stato possibile realizzare una preliminare caratterizzazione di germoplasma malgascio e di germoplasma worldwide per il miglioramento di *Jatropha curcas* L. in ambiente malgascio.

Il lavoro realizzato su germoplasma worldwide, reso possibile grazie alla collezione allestita dal 2008 presso la Facoltà di Agraria di Firenze, è stato di carattere morfologico e produttivo, poiché la caratterizzazione genetica era stata già effettuata in una precedente tesi di dottorato (Zubieta, 2009) che aveva evidenziato la scarsa variabilità genetica delle accessioni in esame, distinguendo però quella proveniente dalla Costa Rica.

L'analisi genetica su germoplasma malgascio, realizzata utilizzando alcuni dei marcatori SSR utilizzati nel precedente lavoro, ha evidenziato gli stessi risultati e non è stata trovata alcuna variabilità tra le diverse accessioni malgasce.

Esaminando i dati morfologici e produttivi della collezione, una prima annotazione deve essere registrata riguardo la produttività di alcune provenienze; infatti, nonostante tutte le piante della collezione siano state trasferite nel dicembre 2011 a Satrokala, in forma di astoni capitozzati a radice scossa, alcuni individui, nel corso dell'annata agraria 2012/2013, hanno inaspettatamente prodotto frutti e semi sui quali è stato possibile effettuare misurazioni e rilievi morfologici.

I risultati della collezione rivelano che le piante provenienti da Mato Grosso (Brasile) hanno tutti i parametri morfologici rilevati sopra la media, escluso lo SPAD. Si nota inoltre che alcune piante di questa provenienza hanno prodotto seme risultando quindi interessanti non solo per le peculiarità morfologiche, ma anche per la precocità produttiva.

Altra accessione interessante è rappresentata dalle piante provenienti dal Mozambico, anche in questo caso le piante hanno prodotto seme (peraltro in interessante quantità) e i dati relativi ad altezza pianta, diametro del fusto, numero di ramificazioni e diametro della chioma sono particolarmente sviluppati se paragonati agli altri della collezione.

Alcune piante provenienti da Arusha, Brasile, Paraguay e Suriname, seppure queste accessioni non presentino dati morfologici di rilievo, hanno prodotto seme; in modo particolare è stato possibile notare che alcuni individui provenienti dal Brasile (BRC19, BRC20) e dal Mozambico (MZG21) si sono distinti sia per numero che per peso di semi prodotti, per pianta. Gli individui produttivi sono quindi oggetto di attente osservazioni e i semi raccolti sono stati utilizzati per moltiplicare i soggetti, parallelamente si è proceduto a moltiplicare gli individui per talea. Lo scopo è quello di allestire campi di valutazione sia della progenie sia dei cloni per effettuare una valutazione sulla precocità produttiva dei soggetti.

Le altre provenienze della collezione si sono dimostrate altalenanti per i diversi parametri morfologici ed è stato possibile rilevare che la provenienza indiana si contraddistingue per piante complessivamente poco sviluppate; saranno pertanto tenute particolarmente sotto controllo durante la prossima annata per capire da cosa possano derivare tali differenze di accrescimento.

Per quanto riguarda il germoplasma di provenienza malgascia, è stato possibile rilevare dati produttivi e morfologici delle piante madri, mentre gli Half Sib sono stati caratterizzati sotto il profilo morfologico poiché nessuna pianta ha ancora prodotto seme a causa della giovane età.

Purtroppo, i dati che interessano le piante madri, come scritto nel testo, sono puramente indicativi e su di essi non è stato possibile effettuare elaborazioni statistiche; tuttavia è stato possibile avere un primo screening sullo sviluppo di questi individui.

Le due piante che provengono dall'area di Tulear hanno valori uniformi, in linea con i valori medi, la pianta JC5B si distingue per la larghezza della foglia, ma il valore risulta comunque assimilabile a quello delle piante provenienti da Milioke. Riguardo questa provenienza distinguiamo i primi due dei quattro esemplari (JC14 e JC15), i cui parametri morfologici rilevati risultano intorno alla media per tutte le variabili indagate.

Per le piante JC20, JC21A e B, sempre provenienti dalla stessa area, è stato possibile registrare complessivamente buoni valori morfologici, in particolare notiamo che la JC20 è l'individuo di maggiori dimensioni e che si contraddistingue per i buoni valori di tutti i parametri rilevati, diversamente dalle altre due JC21 che presentano il diametro del fusto e della chioma poco sviluppati. In generale si nota che per entrambe le provenienze tutti parametri indagati restano in un range di valori omogeneo, ad eccezione del caso della già citata JC20.

Sulle piante madri è stato inoltre possibile effettuare una prima indagine qualitativa e quantitativa della produzione di seme.

Le piante con le migliori rese quantitative si confermano provenienti dall'area di Milioke: le JC18 e JC21 hanno le migliori performances, sia per quantità di seme prodotto che per resa in olio, contrariamente alla JC20 che, seppure mostrando buoni parametri morfologici, ha una resa produttiva sotto la media, insieme alle due piante JC5 A e B di Tulear. Una buona resa in olio è registrata anche per i due esemplari provenienti dalla Costa Est (JC35 e JC39) e dal Centro Nord (JC32), tuttavia essi presentano una bassa produzione in seme.

A livello qualitativo si nota un'ottima composizione dell'olio che spicca per contenuto di acido oleico e che conferma la provenienza da Milioke quella con le migliori performances.

Per quanto riguarda i dati morfologici relativi alle piante Half Sib, è possibile notare che i parametri altezza della pianta, diametro del fusto, numero di ramificazioni e diametro della chioma hanno un andamento assimilabile.

La pianta con le dimensioni più elevate è la JC2, seguita dalla JC3 ed anche le altre piante del gruppo proveniente da Tulear hanno dei buoni valori. A seguire, le piante provenienti da Milioke hanno i valori medi più alti. Si sottolinea però che anche la pianta JC26, proveniente dall'area del Centro Nord, presenta le dimensioni maggiori. Nell'ambito dei quattro parametri in esame si segnalano le piante JC6, JC14, JC30, JC36 e JC40 per il poco sviluppo.

Osservando gli altri parametri morfologici si nota che il range di valori entro cui essi variano è più ristretto ed i grafici risultano a colpo d'occhio più omogenei, anche se approfondendo l'analisi, ritroviamo comunque un'accentuata variabilità entro le diverse provenienze. Si nota

che le provenienze da Milioko e Centro Nord hanno i valori medi di SPAD più elevati ed in particolare spiccano gli ecotipi JC16, JC17, JC19, JC29, JC31 e JC42. Gli ecotipi JC30, JC36 e JC40 si confermano poco sviluppati anche per i valori di SPAD.

Per quanto concerne lunghezza e larghezza della foglia, si nota che gli ecotipi JC25 ed ancora una volta JC30, registrano i valori minori. Nel complesso le dimensioni sono molto variabili ma le JC7 e JC12 risultano le più sviluppate per lunghezza e larghezza.

Cap. 4 – CONCLUSIONI

Il lavoro di breeding di *Jatropha curcas* portato avanti in questi tre anni, ha avuto come obiettivo primario la caratterizzazione morfologica, genetica e produttiva di germoplasma malgascio e worldwide per poter avviare un programma di miglioramento genetico di *Jatropha* in ambiente malgascio. Per questo scopo è necessaria la costituzione di una o di diverse popolazioni (Open Pollinated Varieties) di *Jatropha* che pur garantendo una costanza in termini di produttività e qualità del prodotto, devono basarsi sul mantenimento di un'elevata variabilità del pool genetico delle popolazioni; questo per garantire alla popolazione costituita di far fronte a possibili stress, biotici o abiotici, essendo più plastica e quindi più adattabile a diverse condizioni di coltivazione. Per arrivare a questi risultati sono stati valutati ed utilizzati per programmare gli incroci individui che hanno fornito le migliori famiglie provenienti sia dal materiale locale (malgascio) che dalle accessioni della collezione mondiale.

Dall'analisi dei dati morfologici riguardanti le famiglie Half Sib emerge che i caratteri esaminati sono contraddistinti da un'elevata variabilità di tipo genetico additivo e quindi da una considerevole ereditabilità, intorno al 50%. Questo risultato contrasta con quello osservato con i marcatori molecolari SSR.

Queste osservazioni aprono la strada a più ipotesi: da un lato si ipotizza che nel caso di *Jatropha* i marcatori SSR non riescano ad evidenziarne la variabilità genetica perché, durante la divisione riduzionale delle cellule madri del polline e del sacco embrionale (meiosi), non si hanno errori di appaiamento delle regioni ripetute, quindi le mutazioni dovute allo scambio (crossing-over) in regioni appaiate erroneamente, non si verificano. Questo processo, legato all'appaiamento errato e al crossing-over, normalmente produce duplicazioni o delezioni entro regioni microsatelliti, determinando variabilità tra sequenze di DNA analizzate. Se questa è la causa della ridotta o assente variabilità delle regioni SSR osservata in *Jatropha curcas*, si potrebbe ipotizzare che il complesso sinaptonemico che si forma tra cromosomi omologhi durante la meiosi (profase) è molto efficiente, tanto da ridurre o annullare gli errori di appaiamento nelle regioni ripetute del DNA, rendendo non probanti gli studi di filogenesi e di genotipizzazione di questa specie eseguiti con questo tipo di marcatori (SSR).

Altra ipotesi che si potrebbe avanzare, anche se poco probabile vista la complessità del materiale analizzato, è che non esista variabilità genetica tra il materiale analizzato pur avendo diversa origine ambientale e genetica (materiale segregante).

L'elevata variabilità genetica riscontrata mediante le analisi delle famiglie Half Sib, contrasta con questa ultima ipotesi, infatti si osserva un'elevata variabilità tra famiglie Half Sib. Questa variabilità che stima il 25% della variabilità genetica additiva, dimostra come questo materiale, anche se proveniente solo da popolazioni collezionate in Madagascar, sia molto variabile geneticamente.

Un'altra ipotesi che comunque non si può trascurare, è quella relativa all'elevata influenza ambientale sulle famiglie Half Sib, non monitorata dal disegno sperimentale adottato per la

valutazione di queste famiglie. La numerosità e complessità del materiale analizzato, non ha permesso di adottare disegni sperimentali replicati. Anche la ridotta vitalità del seme e delle talee collezionate hanno determinato la non completa replicazione delle parcelle relative alle famiglie analizzate (progenie fila). La mancata stima della varianza ambientale (eventuale difformità del campo sperimentale), potrebbe essere la causa della significatività della varianza tra famiglie; incrementando così la stima viziata della varianza genetica additiva.

Per quanto riguarda la collezione mondiale (worldwide), poiché la provenienza risultava significativa per molti caratteri morfologici analizzati, ci saremmo aspettati che dall'analisi attraverso il dendrogramma di associazione le provenienze si raggruppessero in specifici clusters.

Dalla valutazione della collezione si osserva una varianza significativa tra le accessioni per tutte le variabili analizzate, dimostrando un'elevata variabilità tra le accessioni di diversa origine, anche se la distinzione in gruppi, mediante il test dei confronti multipli (test di Tukey), non produce molti gruppi distinti. L'analisi multivariata ottenuta dalla trasformazione delle variabili originali in componenti principali (PCA), con relativa analisi cluster, non mostra una netta separazione delle diverse provenienze delle accessioni.

Il dendrogramma generato, di difficile interpretazione, evidenzia un cospicuo numero di gruppi (clusters), non associabili alle diverse provenienze. Questo risultato potrebbe essere dovuto al fatto che pur avendo diversa origine, il materiale esaminato, non ha avuto sufficiente tempo per evolvere nei singoli ambienti di provenienza (ecotipo), perché di recente introduzione. La variabilità osservata, quindi, tra ed entro i siti di collezionamento, è proporzionale alla variabilità riscontrabile nel sito di origine (centro primario di diversificazione). Questo potrebbe essere la causa del raggruppamento non riferibile alle zone di provenienza.

Tale risultato rappresenta comunque un importante strumento per l'individuazione degli individui entro ogni cluster, da impiegare in futuri incroci. La classificazione degli individui nei cluster definiti dal dendrogramma, permette di scegliere quelli che, pur avendo le stesse caratteristiche produttive (ancora non rilevate, perché trattasi di piante ancora giovani) appartengono a gruppi distinti, indipendentemente dalla loro origine. Questa strategia di scelta degli individui per formare le nuove varietà (Open Pollinated Varieties), garantirà un'ampia base genetica della popolazione (pool genico), al fine di avere un'elevata plasticità genetica e fenotipica per ottenere produzioni costanti nel tempo.

La mancanza di variabilità per i marcatori molecolari utilizzati, limita la possibilità di ricorrere alla genotipizzazione del materiale analizzato, e quindi alla scelta dei parentali da selezionare e utilizzare per la costituzione delle nuove varietà. Per la valutazione dei parentali, si possono utilizzare solo metodi di valutazione e selezione basati su incroci programmati, senza poter applicare la marker assisted selection (MAS). Tale limitazione si verifica sia per quanto concerne la collezione worldwide sia per le accessioni di provenienza malgascia.

Di forte interesse risultano alcuni individui che si distinguono dagli altri per caratteri non inseriti nell'analisi delle componenti; primariamente la precoce entrata in fruttificazione di una dozzina di essi. Si ricorda infatti che solo alcuni individui della collezione hanno prodotto seme ed i dati non possono essere considerati tanto rappresentativi da inserire la produttività nell'analisi delle componenti principali.

Per quanto concerne la popolazione malgascia, le differenze fenologiche e produttive rilevate su piante madri e su famiglie Half Sib, l'individuazione di variabili utilizzabili per la selezione e le stime dell'ereditabilità degli stessi, consentono di procedere nel lavoro di miglioramento secondo le seguenti tappe:

- scelta del North Carolina Mod. 2 come mating design più appropriato;
- realizzazione degli incroci, costituzione di famiglie Full-SIB e Half Sib;
- valutazione della progenie;
- calcolo della attitudine combinatoria generale e specifica.

Analizzando congiuntamente i dati si può quindi affermare che:

- in Madagascar, gli ambienti in cui *Jatropha curcas* si è diffusa, almeno limitatamente ai genotipi in nostro possesso, sono simili all'ambiente di origine e la pressione selettiva esercitata dall'ambiente è stata quindi molto ridotta.
- la diffusione di *Jatropha curcas* nei siti di collezionamento è avvenuta solo in tempi recenti non consentendo ancora un differenziamento delle sub-popolazioni determinato dalla selezione naturale che agisce in modo specifico nei diversi ambienti.
- la medesima situazione si ritrova anche per il materiale del Madagascar pur mostrando forti differenze fenotipiche tra le accessioni.

Grazie ai risultati ottenuti dal presente lavoro di tesi ad oggi possediamo gli strumenti per poter effettuare una selezione del materiale genetico tale da:

- Sviluppare una congrua ed efficace selezione del materiale più promettente: si è difatti proceduto ad una moltiplicazione clonale degli individui che hanno presentato le migliori caratteristiche sia della pianta madre che della famiglia Half Sib ottenuta, quando possibile.
- Individuare come già riportato il Nord Carolina Mod. 2 come mating design più adatto per combinare gli individui definiti migliori dalle presenti analisi e stimare la loro attitudine combinatoria generale e specifica.
- Utilizzare, nella costituzione delle varietà, anche materiale derivante dalla collezione mondiale (worldwide) per introdurre o aumentare la frequenza di alleli utili non presenti nel germoplasma malgascio.

BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA

- Abiola O., Angel J. M., Avner P., Bachmanov A. A., Belknap J. K., Bennett B. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nature Reviews Genetics* 2003; 4 (11): 911–6
- Achten W. M. J., Nielsen L. R., Aerts R. Towards domestication of *Jatropha curcas*. *Biofuels* 2010; 1:91-107
- Achten W. M. J., Verchot L., Franken Y.J., Mathijs E., Singh V.P., Aerts R., Muys, B. *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass and Bioenergy*, 2008; 32: 1063–1084
- Agarwal A. K., Rajamanoharan K. Experimental investigations of performance and emissions of Karanja oil and its blends in a single cylinder agricultural diesel engine. *Applied Energy* 2009; 86:106–12.
- Akkaya M. S., Bhahwat A. A., Cregan P. B. Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, 1992; 132: 1131-1139
- Ashkenazi V., Chani E., Lavi U., Levy D., Hillel J., Veilleux R. E. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genoma*, 2001; 44: 50-62
- Basha S. D., Francis G., Makkar H. P. S., Becker K., Sujatha M. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. *Plant Science*, 2009; 176:812-823
- Basha S. D., Sujatha M. Inter- and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica* 2007; 156(3):375–86
- Bell C. J., Ecker J. R. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of Arabidopsis. *Genomics*. 1994 Jan 1; 19(1):137-44
- Bell G. I. Evolution of simple sequence repeats. *Computational Chemistry*, 1996; 20: 41-48
- Berchmans H. J., Hirata S. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. *Bioresource Technology* 99 (2008) 1716–1721
- British Petroleum. BP Statistical Review of World Energy. Report June 2012
- Brittaine R., Litaladio N. *Jatropha*: a smallholder bioenergy crop. The Potential for Pro-Poor Development. Roma, Food and Agriculture Organization of the United Nations, vol 8; 2010
- Carels N. *Jatropha curcas*: a review. In: *Advances in botanical research*. Kader JC, Delseny M. editors, vol.50; 2009: p.39–86
- Cesar S. A., Ignacimuthu S. Applications of biotechnology and biochemical engineering for the improvement of *Jatropha* and Biodiesel: A review. *Renew. Sust. Energy Rev.* 2011; 15: 5176–5185

- Chikara J., Prakash A. R., Mastan S. G., Ghosh A. Genetic Improvement in *Jatropha curcas* through selection and breeding. In: Bahadur B., Sujatha M., Carels N. (Eds.), *Jatropha*, Challenges for a new energy crop, vol. 2 New York 2013, pp 119-133
- Condit R., Hubbell S.P. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical genome. *Genome*, 1991; 34: 66-71
- Cregan P. B., Akkaya M. S., Bhagwat A. A., Lavi U., Rongwen J. Length polymorphism of simple sequence repeat (SSR) DNA as molecular markers in plants. In: Gresshoff P.M., *Plant Genome Analysis*, 1992; 47-56, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- de Carvalho Moretzsohn M., Hopkins M. S., Mitchell S. E., Kresovich S., Valls J. F. M., Ferreira M. E. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biology*, ed. Simon Harold, Volume 4, Issue 11, 2004, pages 1-10
- Dehgan B. Phylogenetic Significance of Interspecific Hybridization in *Jatropha* (Euphorbiaceae). Source: *Systematic Botany*, Vol. 9, No. 4 (Oct. - Dec., 1984), pp. 467-478. Published by: American Society of Plant Taxonomists.
- Dehgan B., Webster G. L. Morphology and infrageneric relationship of the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). *University of California Publications in Botany*, 1979; Vol. 74
- Divakara B.N., Upadhyaya H. D., Wani S. P., Gowda C. L. L. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: a review. *Applied Energy* 2010; 87 (3):732-42
- Doerge R. W. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Reviews Genetics* 2002; 3 (1): 43-52
- Euler H., Gorris D. 'Case Study *Jatropha Curcas* India', Global Facilitation Unit for Underutilized Species (GFU), Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH. 2004.
http://www.underutilized-species.org/Documents/PUBLICATIONS/jatropha_curcas_india.pdf
- FACT foundation. The *Jatropha* handbook. From cultivation to application, Eindhoven (Olanda), 2010
- Fiori M., Cossu A., Capece P., Bianco G., Delitala A., Canu S. Assistenza agroclimatica per lo sviluppo della viticoltura in Madagascar. 2013.
<http://www.sar.sardegna.it/pubblicazioni/miscellanea/madagascar/>
- Francis G., Edinger R., Becker, K. A. concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. *Natural Resources Forum* 2005; 29: 12-24.
- Gelfand I., Sahajpal R., Zhang X., Izaurralde R. C., Gross K. L., Robertson P. 2013. "Sustainable Bioenergy Production from Marginal Lands in the US Midwest." *Nature online* January 16, 2013.
<http://msutoday.msu.edu/news/2013/marginal-lands-are-prime-fuel-source-for-alternative-energy/>

Ghosh A., Patolia J. S., Chaudhary D. R., Chikara J., Rao S. N., Kumar D., Boricha G. N., Zala A. Response of *Jatropha curcas* under different spacing to *Jatropha* de-oiled cake. The Netherlands: FACT Foundation, 2007 (available at <http://www.fact-fuels.org>)

Grimm C., Maes J-M. Arthropod fauna associated with *Jatropha curcas* L. in Nicaragua: a synopsis of species, their biology and pest status. In: Guñ bitz GM, Mittelbach M, Trabi M, editors. Biofuels and industrial products from *Jatropha curcas*—Proceedings from the symposium “*Jatropha* 97,” Managua, Nicaragua, February 23–27. Graz, Austria: Dbv- Verlag; 1997. p. 31–9.

Guimarães E P. Marker-assisted selection: current status and future perspectives incrops, livestock, forestry and fish. Rome: Food & Agriculture Org.; 2007

Heller J. Psycic nut, *Jatropha curcas* L. promoting the conservation and uses of underutilized and neglected crop. IPGRI, Gatersleben/International Plant Genetic Resources, Rome, Italy 1996; 66

Hemming C. F., Radcliffe-Smith A. A revision of the Somali species of *Jatropha* (Euphorbiaceae). Kew Bulletin 1987; 42:103-122

Henning R. K. The *Jatropha* System. An integrated approach of rural development, Weissensberg (Germany), 2009

Jain S., Sharma M. Prospects of biodiesel from *Jatropha* in India: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2010; 14(2): 763–71

Jia L. W., Shen M. Q., Wang J., Lin M. Q. Influence of ethanolegasoline blended fuel on emission characteristics from a four-stroke motorcycle engine. Journal of Hazardous Materials 2005; 123:29–34.

Jongschaap R. E. E., Corré W. J., Bindraban P. S., Brandenburg W. A. Claims and facts on *Jatropha curcas* L.: global *Jatropha curcas* evaluation. Breeding and propagation programme, Plant Research International, Wageningen University & Research Centre, Wageningen, the Netherlands; 2007

Karve, A.D., 2005. Compact biogas plant—compact, low-cost digester for biogas from waste starch. Mimeo (URL: <http://www.bioenergylists.org/en/compactbiogas>).

Kaushik N. Quality planting material and seed standards in *Jatropha curcas*, in: Proceedings of the biodiesel conference toward energy independence - Focus of *Jatropha*, Hyderabad, India, 9-10 June, 2006; 179-196

Kaushik N., Kumar S. *Jatropha curcas* L. Silviculture and Uses. Agrobios (India) Jodhpur. 2004; 82

King A. J., He W., Cuevas J. A., Freudenberger M., Ramiamanana D., Graham I.A. Potential of *Jatropha curcas* as source of renewable oil and animal feed. Journal of Experimental Botany, 2009; 60, 2897–2905.

Kumar S., Shrestha P., Abdul Salam P. A review of biofuel policies in the major biofuel producing countries of ASEAN: Production, targets, policy drivers and impacts. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2013; 26:822–836

- Li Y. C., Korol A. B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanism: a review. *Molecular Ecology*, 2002; 11: 2453-2465
- Liaquat A. M., Kalam M. A., Masjuki H. H., Jayed M. H. Potential emissions reduction in road transport sector using biofuel in developing countries. *Atmospheric Environment* 2010; 44:3869–77
- Liaquat A. M., Masjuki H. H., Kalam M. A., Varman M., Hazrat M. A., Shahabuddin M. Application of blend fuels in a diesel engine. *Energy Procedia* 2012; 14:1124–33
- Lim S., Teong L. K. Recent trends, opportunities and challenges of biodiesel in Malaysia: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010; 14:938–954
- Maghuly F., Jankowicz J., Till B., Laimer M., The use of EcoTILLING for the genetic improvement of *Jatropha curcas* L. In: Bahadur, B., Sujatha, M., Carels, N. (Eds), *Jatropha, Challenges for a new energy crop*, vol. 2. Springer, New York 2013; pp. 335–350
- Maghuly F., Laimer M. *Jatropha curcas*, a biofuel crop: Functional genomics for understanding metabolic pathways and genetic improvement. *Biotechnol. J.* 2013; 8: 1172–1182
- Mahanta N., Gupta A., Khare S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. *Bioresour. Technol.* 2008; 99:1729–1735
- Martin G., Mayeux A. Réflexions sur les cultures oléagineuses énergétiques. II. Le Pourghère (*Jatropha curcas* L.): un carburant possible. *Oléagineux* 1984; 39(5):283-287
- Martinez-Zapater J. M., Oliver J. L., (1984). Genetic analysis of isozyme loci in tetraploid potatoes (*Solanum tuberosum* L.) *Genetic*, 108: 669-679
- Maurya R., Gupta A., Singh S. K., Mohan Rai K., Chandrawati, Sawant S. V., Yadav H. K. Microsatellite polymorphism in *Jatropha curcas* L.—A biodiesel plant. *Industrial Crops and Products*. Volume 49, August 2013; Pages 136–142
- McGregor C. E., Lambert C. A., Greyling M. M., Louw J. H., Warnich L. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*, 2000; 113: 135-144
- Ministère de l'Agriculture, de l'Élevage et de la Pêche, République de Madagascar
<http://www.agriculture.gov.mg/>
- Mofijur M., Masjuki H. H., Kalam M. A., Atabani A. E., Shahabuddin M., Palash S. M., Hazrat M. A. Effect of biodiesel from various feedstocks on combustion characteristics, engine durability and materials compatibility: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2013; 28:441–455.
- Mofijur M., Masjuki H. H., Kalam M. A., Atabani A. E. Evaluation of biodiesel blending, engine performance and emissions characteristics of *Jatropha curcas* methyl ester: Malaysian perspective. *Energy* 2013; 55:879-87

Montes L., Azurdia C., Jongschaap R., Van Loo E., Barillas E., Visser R. Global Evaluation of genetic variability in *Jatropha curcas*. Vol. 17:2008

Morgante M., Olivieri A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. In: Plant J., 1993; 3 (1): 175-182

MPOB (Malaysian Palm Oil Board). Overview of the Malaysian Palm Oil Industry 2008. Available from www.mpob.gov.my.

Nielsen F. FNResearch Progress Report No. 1, 2007, Project: "Jatropha oil for local development in Mozambique" Subtitle: "Biofuel for development and Communal Energy Self-Supply" Reporting period: January 2007 – July 2007

Ovando-Medina I., Adriano-Anaya L., Vázquez-Ovando A. Genetic diversity of *Jatropha curcas* in Southern Mexico. In: Bahadur B., Sujatha M., Carels N., (Eds) *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop*, vol. 2. Springer, New York 2013, pp. 219–250

Pagliaro M., Rossi M. The Future of Glycerol – New uses of a versatile raw material, RSC Publishing: Cambridge, 2008

Parthiban K. T., Senthil Kumar R., Thiyagarajan P., Subbulakshmi V., Vennila S., Govinda Rao M. Hybrid progenies in *Jatropha* – a new development. Current Science, Vol. 96, no. 6, 25 march 2009

Patolia, J. S., Ghosh A., Chikara J., Chaudhary D. R., Parmar D. R., Bhuva H. M. "Response of *Jatropha curcas* L. Grown on Wasteland to N and P Fertilization." Paper presented at the FACT Seminar on *Jatropha curcas* L. Agronomy and Genetics, March 26–28 2007; Wageningen. Article No.34.

Popluechai S., Breviario D., Mulpuri S., Makkar H. P. S. Narrow genetic and apparent phenetic diversity in *Jatropha curcas*: Initial success with generating low phorbol esters with interspecific hybrids. Nat. Preced. 2009; 1–44

Popluechai S., Raorane M., Syers K. J., O'Donnell A. G. Research needs to make *Jatropha* a viable alternate oilseed crop. In: Syers, K. J., Wood, D. (Eds), *Proceedings of the International workshop on Feasibility of non-edible oil seed crops for biofuel production*. Mae Fah Luang University, MFLU publication, Chiang Rai, Thailand 2007, pp. 23–38

Pradhan A., Yang G., Plummer J. A. Development of DNA fingerprinting keys for identification of radish cultivars. Australian Journal of Experimental Agriculture, 2004; 44: 95-102

Raju A.J.S., Ezradanum V. Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae), Current Science 2002, 83 (11): 1395-1398

Rao G. R., Korwar G. R., Shanker A.K., Ramakrishna Y. S. Genetic associations, variability and diversity in seed characters, growth, reproductive phenology and yield in *Jatropha curcas* (L.) accessions. Trees 2008; Volume 22, Issue 5: 697-709

REN21. Renewables 2012. Global status report. Paris; 2012.

- Ritter M. E. The Physical Environment: an Introduction to Physical Geography. 2012.
<http://www.earthonlinemedia.com/ebooks/tpe_3e/title_page.html>
- Roldan-Ruiz I., Van Eeuwijk F.A., Gilliland T.J., Dubreuil P., Dillmann C., Lallemand T., De Loose M., Baril C.P. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theor. Appl. Genet.* 2001; 103: 1138-1150
- Russel P.J. Fondamenti di genetica, EdiSES; 1997
- Saghai - Maroof M. A., Biyashev R. B., Yang G. P., Zhang Q., Allard R. W. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations and population dynamics. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 5466-5470
- Schmook B., Serralta-Peraza L. *Jatropha curcas*: Distribution and uses in the Yucatan Peninsula of México. In G. M. Gubitz, M. Trabi (Eds). Symposium "Jatropha 97: Biofuels and Industrial Products from *Jatropha curcas*". Managua, Nicaragua, 23-27 Febbraio 1977, 53-57
- Senior M. L. e Heun M. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of targeted repeats using a CT primer. *Genome*, 1993; 36: 884-889
- Sheehan J., Camobreco V., Duffield J., Graboski M., Shapouri H. "Life Cycle Inventory of Biodiesel and Petroleum Diesel for Use in an Urban Bus," National Renewable Energy Laboratory Final Report, U.S. Department of Energy; May 1998
- Sherchan D. P., Thapa Y. B., Khadka R. J., Tiwari T. P. Effect of green manure on rice production. PAC Occasional Paper-2, Pakhribas Agricultural Centre. Dhankuta, Koshi Zone, Nepal, 1989; p. 12.
- Strand M., Prolla T. A., Liskay R. M., Petes T. D. Destabilisation of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*, 1993; 365: 274-276
- Sudhakar J. T., Eswaran N., Sujatha M. Molecular approaches to improvement of *Jatropha curcas* Linn. as a sustainable energy crop. *Plant Cell Rep.* 2011; 30:1573–1591
- Sun Q.-B., Li L.-F., Li Y., Wu G.-J., Ge X.-J. SSR and AFLP Markers Reveal Low Genetic Diversity in the Biofuel plant *Jatropha curcas* in China. *Crop Science*, 2008, 48:1865-1871
- Tautz D., Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl. Acids Res.*, 1984; 12: 4127-4138
- Trabucco A., Achten W. M. J., Bowe C., Aerts R., Van Orshoven J., Norgrove L., Muys B. Global Mapping of *Jatropha curcas* Yield Based on Response of Fitness to Present and Future Climate. *Global Change Biology Bioenergy*; 2010. Volume 2, Issue 3:139-151
- Valdes A. M., Slatkin R., Freimer N. B. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revised. *Genetics*, 1993; 133: 737-749

Van den Berg A. J., Horsten S. F., Van den Bosch K. J. J., Kroes B. H., Beukelman C. J., Loefflang B. R., Labadie R. P.. Curcacycline A: a novel cyclic octapeptide isolated from the latex of *Jatropha curcas* Linn, *FEBS Lett.* 1995; 358:215–218

Visser J., Adriaans T. Anaerobic digestion of *Jatropha curcas* press cake. Report produced for FACT, Ingenia Consultants & Engineers. Eindhoven; 2007

Vollmann J., Laimer M. Novel and traditional oil crops and their biorefinery potential, In: S.-T. Yang, H.A. El.Enshasy, N. Thongchul (eds.), *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2013, pp. 47-59

Vollmann, J., Laimer, M., Novel and traditional oil crops and their biorefinery potential, In: Yang, S. T., El Enshasy, H. A., Thongchul, N., Lo, Y. M. (Eds), *Bioprocessing Technologies in Integrated Biorefinery for Production of Biofuels, Biochemicals, and Biopolymers from Biomass*. Wiley, Hoboken 2013, pp. 47–59

Wang Z., Weber J. L., Zhong G., Tanksley S. D. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 1994; 88: 1-6

Weber J. L., (1990). Human DANN polymorphism based on length variations in simple sequence repeats. In: Davies K. E. e Tilghman S. M. *Genome analysis vol.1 (genetic and physical mapping*, Cold Spring Harbor Laboratory), Cold Spring Harbor, New York: 159-181

Wren J. D., Forgacs E., Fondon J. W. Phenotypic and evolutionary implications. *American Journal of Human genetics*, 2000; 67: 345-356

Wu K. e Tanksley S. D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.*, 1993; 241: 225-235

Yang C. Y., Fang Z., Li B., Long Y.F. Review and prospects of *Jatropha* biodiesel industry in China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2012; 16 (4):2178–90

Yue G. H., Sun F., Liu P. Status of molecular breeding for improving *Jatropha curcas* and biodiesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2013; 26: 332-343

Zietkiewicz E., Rafalski A., Lauda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994; 20: 176-183

Zubieta C. Studio della variabilità genetica in *Jatropha curcas* L. Dottorato di ricerca in Agrobiotecnologie per le produzioni tropicali; XXII Ciclo. 2009

Ringrazio di cuore...

la Società Tozzi Green srl ed il prof. Vecchio, per il supporto alla ricerca;

il dr. Palchetti per la disponibilità e l'attenzione che mi ha dedicato durante questo percorso ed il prof. Benedettelli per tutto l'aiuto fornito;

i miei angeli custodi, Claudia e Massimo, che in questi anni mi hanno sostenuta, donandomi tempo, pazienza ed affetto;

Adriano, Luisa, Chiara, Marco e Lisetta, cordiali compagni in questa avventura, e Ilaria, un'inaspettata piacevole sorpresa rivelatasi tra biogas ed analisi ICP;

tutto lo staff del Centre for Integrative Legume Research della University of Queensland di Brisbane, il prof. Gresshoff ed il dr. Scott che mi hanno permesso un'esperienza qualificante a livello professionale e umano. E poi, sempre nell'emisfero Sud, un grazie speciale a tutte le meravigliose persone che ho trovato sulla mia strada: alla compagnia di amiche cinesi e coreane, grazie alla mia bella Manulelina e ad Alex, Tim e Daniel insostituibili housemates. Ed infine grazie anche alla colonia di Sansepolcro e dintorni che incanta e conquista ovunque ci sia una tavola da apparecchiare;

ringrazio gli amici dell'Opera La Pira che in questi ultimi mesi ho trascurato, ma che sento immancabilmente parte della mia vita;

un grazie sincero anche alla compagine vicchiese ed alla dinastia Sonni-Bianchini che mi ha accolta a braccia aperte ed i cui pranzi domenicali dalla Maruschina sono una risorsa ineguagliabile di allegria (ed anche di proteine animali);

e poi ancora grazie...

ai forestailer e le forestaieresse che restano uno dei più bei doni della carriera universitaria;

alla mia cara Silvietta che mi mette di buonumore fin dalle 8 del mattino;

alle mie amiche del cuore ed ai pontassievesi storici, a cui sono ancorate le mie radici e che, vicini o lontani, scorrono tutti nelle mie vene come linfa vitale;

alla mia sempre più numerosa famiglia: a babbo, mamma e alla loro infinita pazienza; ai miei fratelli, a Giancarlo e Marcellina, per tutto l'affetto che mi offrono e pure grazie a Ceciotta e e Mati, appena arrivate e già due splendori;

e poi ringrazio Dani, con cui spero di avere ancora molte pagine da scrivere, ma questa è un'altra storia...