



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI SCIENZE AGRARIE E ALIMENTARI

**Corso di Laurea Magistrale in Scienze
Agroambientali**

**IL MAIS DELLE FIORINE: CARATTERIZZAZIONE
MOLECOLARE E ISCRIZIONE AL REGISTRO DELLE
VARIETA' DA CONSERVAZIONE**

Relatore: Prof. Roberto PILU
Correlatori: Dott. Luca GIUPPONI
Dott.sa Elena CASSANI
Dott. Andrea MESSA

Tesi di Laurea di:
Luca CASARICO
Matr. Nr. 904466

Anno accademico 2018/2019

*Alle nuove generazioni,
a Davide e Aurora.*

Sommario

1. RIASSUNTO	5
2. INTRODUZIONE	7
2.1. Storia e origine del mais.....	8
2.2. Il mais in Italia	12
2.3. Descrizione e classificazione.....	22
2.4. Il miglioramento genetico.....	32
2.5. L'Associazione Grani Asta del Serio e il VA 33	35
3. MATERIALI E METODI.....	39
3.1. Il materiale vegetale.....	39
3.2. I campi sperimentali	40
3.3. Rilievi agronomici	42
3.4. Attività di breeding	49
3.5. Analisi genetiche	51
4. RISULTATI	57
4.1. Allestimento campi.....	57
4.2. Caratteristiche fenotipiche del mais delle Fiorine	63
4.3. Analisi genetica.....	78
4.4. Iscrizione al registro varietale.....	84
5. DISCUSSIONE DEI RISULTATI	86
6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	91
7. RINGRAZIAMENTI	96
8. ALLEGATI.....	97
8.1. Allegato I - scheda descrittiva morfologica.....	97
8.2. Allegato II - domanda di iscrizione.....	106
8.3. Allegato III - documenti storici	110

1. RIASSUNTO

Lo studio e la conservazione della diversità genetica del mais sono fondamentali per il mantenimento di un certo livello di biodiversità che altrimenti andrebbe persa con lo sviluppo di un'agricoltura troppo intensiva ed incentrata su poche varietà. Da quando l'uomo ha iniziato a selezionare ibridi sempre più produttivi, infatti, le varietà locali sono state via via soppiantate ed il potenziale genetico della specie è andato calando, andando a minare i programmi di miglioramento e tutela del territorio e determinando una potenziale perdita di variabilità intraspecifica. Dagli anni '50 del secolo scorso è iniziata in Italia una campagna per il mantenimento ed il recupero dei mais antichi da parte della Stazione Sperimentale per la Maiscoltura di Bergamo, sotto la guida del Ministero dell'Agricoltura. Questo lavoro di conservazione, oltre che al mantenimento del genoma, è utile anche alle economie locali, che possono valorizzare i prodotti locali con un prodotto qualitativamente superiore e unico, poiché legato ad un determinato territorio.

In questo lavoro viene studiato il mais "delle Fiorine" o VA33, coltivato nei comuni di Clusone e limitrofi, in Val Seriana Superiore, con lo scopo di avere la sua caratterizzazione genetica; inoltre, è giunta la richiesta dalle amministrazioni locali di iniziare le procedure per l'iscrizione di questo mais al registro delle varietà da conservazione.

Il VA33 è stato coltivato nel campo sperimentale di Landriano, presso l'azienda di Facoltà, e in 5 campi nei comuni di Clusone, Piario, Villa d'Ogna, Oltressenda Alta (contrada Bricconi) e Cerete. Le principali attività in campo sono state relative alla misurazione dei parametri morfologici atti alla compilazione della scheda descrittiva morfologica, necessaria per l'iscrizione del VA33 al registro delle varietà da conservazione e all'ibridazione del mais e alla successiva raccolta delle spighe e di campioni di foglie per le analisi in laboratorio. Qui è stato analizzato il genoma del mais mediante l'utilizzo di otto marcatori molecolari. I dati sono stati poi confrontati con quelli di altre sei popolazioni di mais quali Spinato di Gandino, Ottofile, Spinato nero di Esine, Millo Corvo, Chiavenna e Ottofile rosso e a quelli delle linee B73 e Mo17

e dell'ibrido B73/Mo17 mediante il software GenALEx v 6.2. Inoltre, sono stati raccolti i dati relativi a lunghezza, diametro e peso del tutolo, peso della spiga, numero di semi per spiga e peso dei 100 semi, in modo tale da poter operare un confronto statistico grazie all'utilizzo del software SPSS.

I risultati mostrano una sostanziale omogeneità dei parametri morfologici, con la presenza di differenze statisticamente significative solamente nell'altezza della pianta, dell'inserzione della spiga e del peso dei 100 semi per alcuni campi, imputabili a fattori ambientali. Dal grafico relativo alla distanza genetica di Nei, il VA 33 risulta essere molto vicino geneticamente alle popolazioni Chiavenna e Spinato di Gandino; questo risultato potrebbe essere determinato da contaminazioni dovute alla vicinanza tra gli areali di coltivazione dei tre mais o da un progenitore comune.

Sono necessarie altre ricerche per capire se il mais delle Fiorine possiede caratteri potenzialmente utili al miglioramento genetico di linee commerciali. Sicuramente la tutela e la valorizzazione di questa popolazione è positiva sia per far conoscere un prodotto unico nel suo genere, sia per la conservazione della biodiversità del mais.

2. INTRODUZIONE

Mais (*Zea mays* L.), frumento (*Triticum aestivum* L.) e riso (*Oryza sativa* L.) forniscono circa i due terzi dell'energia nelle diete umane e rappresentano le basi dell'alimentazione a livello mondiale (Cassman, 1999). In Tabella 2.1 vengono riportati i dati FAO relativi alle produzioni e alle superfici dei tre cereali sopra citati per gli anni 1961 e 2017; si osserva da subito come l'interesse all'incremento nella resa abbia portato ad un aumento del 453% nella produzione di mais, del 247% nella produzione di frumento e del 257% per quanto riguarda il riso. Da sempre, infatti, l'uomo ha selezionato le piante coltivate, inizialmente dal punto di vista fenotipico (scegliendo le piante con frutti di maggiore pezzatura o con caratteristiche organolettiche migliori) e successivamente dal punto di vista genotipico. Questi incrementi così spinti sono dovuti infatti ad una forte selezione genetica da parte dell'uomo, che ha portato nella storia recente allo sviluppo di ibridi commerciali sempre più produttivi, ma con una potenziale perdita di patrimonio genetico. È quindi necessario studiare e mantenere delle varietà tradizionali che si sono tramandate nel corso degli anni in specifiche zone, adattandosi a particolari territori e diventando parte integrante delle diete e delle tradizioni culinarie locali. Considerando le superfici, invece, si nota un generale incremento di area dedicata a queste colture, con un particolare aumento del mais e del riso.

Tabella 2.1 Dati FAO 1961 - 2017 ("FAOSTAT," 2019)

Coltura	Produzione (mln.ton.1961)	Produzione (mln.ton.2017)	Superficie (mln.ha1961)	Superficie (mln.ha2017)
Mais	205.02	1134.74	105.59	197.18
Frumento	222.35	771.71	204.20	218.54
Riso	215.64	769.65	115.36	167.24

Spostando l'attenzione al mais, esso ha rappresentato e rappresenta tutt'ora la base alimentare in numerose culture del Centro e Sud America e, più "recentemente" del Nord Italia; oltre agli usi alimentari umani, questo

cereale è maggiormente utilizzato per l'alimentazione animale, sotto forma di granella, farine o trinciato.

2.1. Storia e origine del mais

Si ritiene che il mais (*Zea Mays* L.) trovi le sue origini nel Messico centrale, all'incirca tra i 7000 e i 10000 anni fa; le prove del suo utilizzo come pianta per scopi alimentari risalgono a circa 9000 anni fa (Ranum et al., 2014). Dal punto di vista biologico, alcuni autori concordano nel far risalire il mais dal *Teosinte* (Doebley, 1990; Doebley et al., 1995; Yang et al., 2019), una specie selvatica del genere *Zea*, endemica del Messico, che si incrocia facilmente con il mais, con la produzione di ibridi fertili (Figura 2.1); altri studiosi ritengono invece che le moderne specie provengano dall'ibridazione di *Zea diploperennis* e una specie di *Tripsacum* (Eubanks, 2001). L'evoluzione dal *Teosinte* al mais non è ancora del tutto chiara e ci sono varie ipotesi sull'evoluzione di questa specie che includono: una progressiva evoluzione nella quale, per un lungo periodo, si sono accumulate mutazioni (Doebley, 1990), un'improvvisa mutazione che ha portato i fiori maschili a divenire femminili (Iltis, 1983), una rapida selezione operata dall'uomo di due mutanti di *Teosinte* (Galinat, 1992) e la selezione casuale da parte degli esseri umani di mutanti che si sono evoluti in natura (MacNeish and Eubanks, 2000).

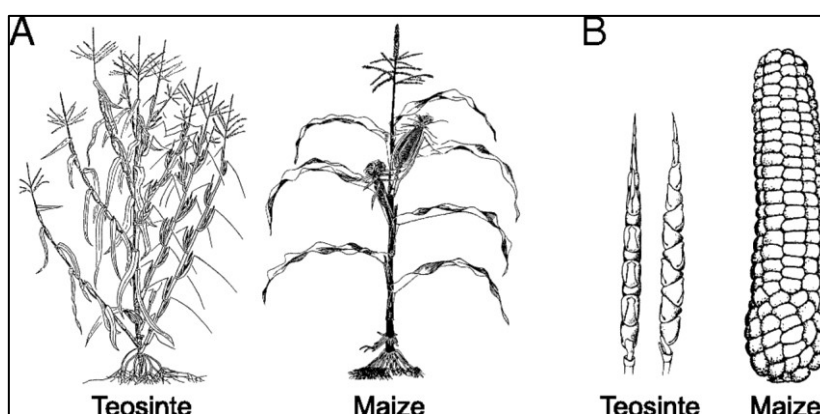


Figura 2.1 *Teosinte e mais* (Yang et al., 2019)

I nativi Americani, scegliendo nel corso dei secoli le piante con una migliore attitudine al sostentamento dei fabbisogni umani, hanno reso il mais una fonte di cibo migliore. Gli indigeni del centro America hanno poi diffuso il cereale nelle zone dell'America Latina, dei Caraibi, degli Stati Uniti e del

Canada, mentre gli esploratori europei hanno contribuito all'esportazione del mais nel vecchio continente e in Asia (Brown et al., 1985; Vollbrecht and Sigmon, 2005).

La tecnica colturale allora utilizzata era quella del cosiddetto "*Slash and burn*", ossia "*Taglia e brucia*" (Piperno et al., 2007), mediante la quale un'area veniva coltivata per qualche anno, per poi essere abbandonata per svariati anni. Il mais così raccolto veniva generalmente lavorato con pietre per ridurlo a farina (MacNeish, 1987) e successivamente impastato e cotto sul fuoco (Ranere et al., 2009).

Quando l'agricoltura passò da itinerante a stanziale, gli antichi agricoltori iniziarono a modellare il territorio per favorire l'irrigazione (Zizumbo-Villarreal et al., 2012) e svilupparono tecniche colturali note come consociazioni. La più diffusa, nota come *milpa* (Figura 2.2), prevedeva l'unione del mais con i fagioli (*Phaseolus spp.*) e le zucche (*Cucurbita spp.*), in modo da fornire alla popolazione una dieta equilibrata e completa; vi erano inoltre altri vantaggi di tipo agronomico che gli indigeni hanno favorito grazie alla selezione fatta verso tutte le specie: grazie all'architettura del mais, il fagiolo si poteva arrampicare sul suo fusto (Jaenicke-Després et al., 2003); grazie all'azione della zucca, la crescita degli infestanti era ridotta e, grazie alla produzione di *cucurbitacine*, gli insetti erano attratti ed intossicati (Chen et al., 2005).

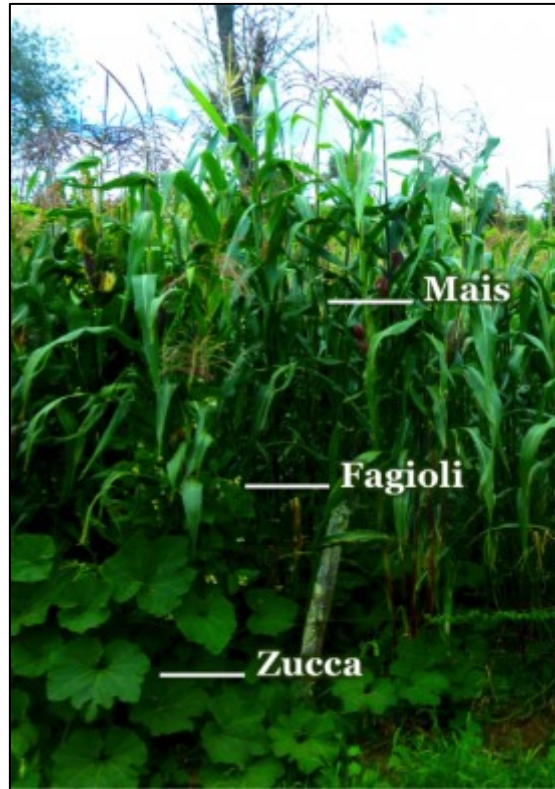


Figura 2.2 Consociazione "Milpa" ("Milpa Maya | la Plumeria," 2015)

L'importanza del mais all'interno della cultura Maya lo ha portato ad essere inserito nella loro tradizione sacra che fa risalire l'origine dell'uomo stesso da questo cereale; inoltre è presente una divinità che rappresenta il mais, a cui venivano offerte libagioni. Dopo la scoperta dell'America il mais venne introdotto in Europa, ma la sua diffusione ebbe una spinta significativa solo dopo il 1500. Nel 1493 si hanno infatti le prime notizie in Italia da parte di Pietro Martire d'Angher che scrive così al Cardinale Ascanio Sforza fratello del duca di Milano Ludovico il Moro: "Fanno pane con poca differenza di un certo grano farinoso, simile a quello che tengono in quantità gli Insubri ed i Granadini spagnoli. La pannocchia e lunga più di un palmo, tende a formare una punta ed ha la grossezza di un braccio. I grani sono mirabilmente disposti per natura: per forma e dimensioni assomigliano al cece. Immaturi sono bianchi: quando maturano divengono molto neri; macinati sono più bianchi della neve. A questo tipo di grano danno nome di mais" (Brandolini and Brandolini, 2009). Le prime varietà importate in Europa però, essendo adattate al clima centro americano, non facevano in tempo ad entrare in

produzione a causa dell'arrivo del freddo. Fu solamente con l'arrivo delle prime varietà dal nord America che la diffusione del mais esplose in Spagna e Italia, e poi nel resto d'Europa e in Nord Africa.

Agli inizi del 1600 si attesta la coltivazione del mais nell'entroterra del Golfo di Biscaglia in Spagna, dove il mais viene chiamato "*mijo de Indias*" (Bilbao and Pinedo, 1977). In Francia si incontrano tracce di impianto del mais nel Béarn, in Navarra, in Guyenne e in Linguadoca, cioè dove presumibilmente ci sono condizioni più favorevoli per l'insediamento della pianta americana, che esige temperature estive relativamente elevate e abbondante umidità dei suoli (Stoianovich, 1951). In Germania, la diffusione del mais non si ebbe fino agli inizi del 1800, quando, in seguito ad una grave carestia di patate, gli agricoltori testarono la coltivazione del cereale. Fino ad allora, infatti, la maturazione della granella era ritenuta impossibile a quelle latitudini, ma lo sviluppo di varietà sempre più adattate alle latitudini ed al clima continentale smentirono gli scettici contadini. L'interesse umano verso il potenziale produttivo di questa pianta ha portato su di essa una forte pressione selettiva, che la ha portata a divenire il cereale più redditizio.

2.2. Il mais in Italia

Come detto in precedenza le prime testimonianze del mais nella cultura italiana si hanno nell'ultimo decennio del 1400. Con l'introduzione delle varietà di tipo *Everta* ed *Indurata*, che si sono evolute in climi simili a quelli delle nostre latitudini e che meglio resistevano al lungo viaggio dalle Americhe all'Europa, la diffusione e l'adattamento del mais alle nuove aree ecologiche lo portarono a sostituire molte delle colture tradizionali locali. Si ricorda che il mais copre per il 15% i fabbisogni di proteine e per il 20% quelli di calorie nella dieta umana, col il suo apporto calorico di 365 Kcal/100g (Puglisi et al., 2018).

Nel corso del 1600 e 1700 si ha dunque l'inizio dell'infiltrazione del mais nella tradizione agricola e culinaria italiana, come riportato nei testi di Luigi Messedaglia, medico e politico italiano che studiò la diffusione del mais in Italia. Da questi studi emerge come il cereale si sia largamente diffuso in pianura padana già sul finire del XVI secolo, soprattutto in aree umide, ma che la diffusione al di sotto del Po non avvenne prima del XVIII secolo (Cazzola, 1991). In Italia, le prime testimonianze scritte dell'arrivo del cereale sono del 1551 nella repubblica di Venezia, dove un esemplare compare nell'erbario di Ulisse Aldrovanni, mentre le prove della coltivazione in quella zona si hanno dalla silloge di Giovanni Battista Ramusio "*Delle Navigazioni et Viaggi*" del 1554 di seguito riportata "La mirabile et famosa semenza detta mahiz ne l'Indie occidentali, della quale si nutrisce metà del mondo, i Portoghesi la chiamano miglio zaburro, del qual n'è venuto già in Italia di colore bianco et rosso, et sopra il Polesene de Rhoigo et Villa bona seminano i campi intieri de ambedui i colori" (Ramusio, 1554). L'areale di coltivazione iniziale era quindi quello umido e caldo delle campagne venete, dove veniva coltivato nei possedimenti Padovani e Rodigini (Fassina, 1952). Nel corso di questi anni il mais rimase una coltura da orto, anche perché esente da tasse (Stoianovich, 1966) e fu solo nell'ultimo decennio del XVI secolo che si diffuse a causa di una carestia molto prolungata. Il mais così espatriò nelle campagne Trevigiane e Ferraresi e nei primi anni del 1600 si hanno numerosi atti notarili che testimoniano la compravendita del

“*Formentone*” (Cazzola, 1991). Il mais, inoltre, rappresentava un ottimo sostituto del sorgo (allora chiamato melica), in quanto entrambe le coltivazioni erano adatte ai terreni umidi della bassa pianura padana in cui non si sarebbe potuto coltivare niente altro, ma il sorgo era usato per l'alimentazione degli animali da cortile e solo in caso di carestia per quella umana. Il mais, invece, costituiva un ottima base per preparare pane e polenta e quindi era maggiormente accettato dai contadini (Innocenzo Malvasia, 1871).

La farina di mais era utilizzata nel nord Italia in sostituzione del miglio come ingrediente base per la polenta, alimento ricco di calorie e cibo antichissimo tra le popolazioni europee. Gli antichi latini, prima di apprendere l'arte della panificazione, facevano largo ricorso a polenta (*puls*) di farro, di miglio e di altri cereali. Tuttavia, secondo il dottor. Messedaglia che studiava l'epidemia di pellagra durante le carestie, a causa della cottura in acqua bollente, la farina di mais perde la niacina ($C_6H_5NO_2$), fattore antipellagroso. Studi più recenti hanno invece provato che la pellagra non è stata causata solamente da un uso “improprio” del mais, ma piuttosto da una forte carenza di vitamine (Bertolotti, 2009). Inoltre, è bene ricordare che la farina di mais, al pari di quella di miglio e di sorgo, da origine ad un pane di cattiva qualità, ed è dunque necessario addizionala di farina di frumento o di segale. L'uso più idoneo per i contadini era dunque quello di cuocere la polenta in acqua o latte e aggiungervi burro o formaggi per avere un alimento quasi completo (Cazzola, 1991).

Nel XIX secolo la polenta di granoturco era cibo quotidiano per milioni di italiani. Secondo i dati raccolti dalla Società italiana di antropologia ed etnologia nel 1872-78, nelle regioni Piemonte, Lombardia, Veneto, Emilia, Marche ed Umbria il 100 % dei comuni faceva uso notevole di polenta o di pane di granoturco (Sorcinelli, 1983).

Dagli anni '50, con l'introduzione di ibridi dagli USA (*Dent Corn*) unitamente all'ammodernamento del comparto irriguo e meccanico, la coltivazione di mais a livello italiano e globale cambiò completamente, provocando la perdita di numerose varietà locali, le cui proprietà organolettiche uniche non

potevano competere con gli elevatissimi tassi produttivi degli ibridi, necessari per soddisfare le crescenti esigenze di nutrimento, soprattutto per il comparto zootecnico. Dal 1954 cominciò quindi un programma di classificazione e acquisizione delle varietà italiane locali di tipo *Indentata* ed *Indurata* da parte della Stazione Sperimentale per la Maiscoltura di Bergamo, sotto la guida del Ministero dell'Agricoltura, con il fine di classificare e conservare queste tipologie di mais (Brandolini and Brandolini, 2009). Queste varietà sono attualmente coltivate *ex-situ* presso il CRA (Consiglio per la Ricerca in Agricoltura) all'università di Bergamo e sono disponibili per attività di miglioramento genetico.

In Tabella 2.2 vengono mostrati i dati produttivi del mais in Italia:

Tabella 2.2 Superfici coltivate a mais e produzione delle varie regioni italiane (ISTAT, 2018)

Regione	Superficie (ha)	Produzione totale (q)	Produzione raccolta (q)
Piemonte	134.812	13.684.970	13.684.970
Valle d'Aosta	19	1.425	1.400
Lombardia	138.642	17.080.029	17.080.029
Liguria	115	5.550	5.550
Trentino-Alto Adige	305	15.325	15.325
Veneto	136.955	14.558.694	13.685.180
Friuli-Venezia Giulia	50.406	5.717.229	5.642.370
Emilia-Romagna	57.170	5.879.240	5.879.240
Toscana	11.463	956.897	947.867
Umbria	12.000	1.070.000	
Marche	5.394	370.057	367.404
Lazio	13.240	1.322.900	1.282.500
Abruzzo	7.681	634.296	610.296
Molise	1.500	70.000	
Campania	13.888	1.031.490	1.023.250
Puglia	840	66.800	36.720
Basilicata	825	38.792	38.759

Calabria	4.259	197.240	191.340
Sicilia	188	14.500	13.500
Sardegna	1.504	115.653	115.653
ITALIA	591.206	62.831.087	61.790.353

Si osservi come il 72% della raccolta provenga da tre regioni: Lombardia, Piemonte e Veneto. In media, la produttività del mais in Italia è di 10.6 t/ha, con un prezzo che oscilla attorno ai 180€/t.

Come si può osservare dall'Figura 2.3 l'andamento dell'area coltivata a mais ha subito un declino costante dal 2004 ad oggi, mentre la resa in termini di t/ha è rimasta pressoché stabile (considerando sempre il periodo dal 2004), seppur in leggero aumento, segno che il miglioramento genetico è giunto ormai ai limiti per quanto riguarda la coltivazione nel nostro paese.

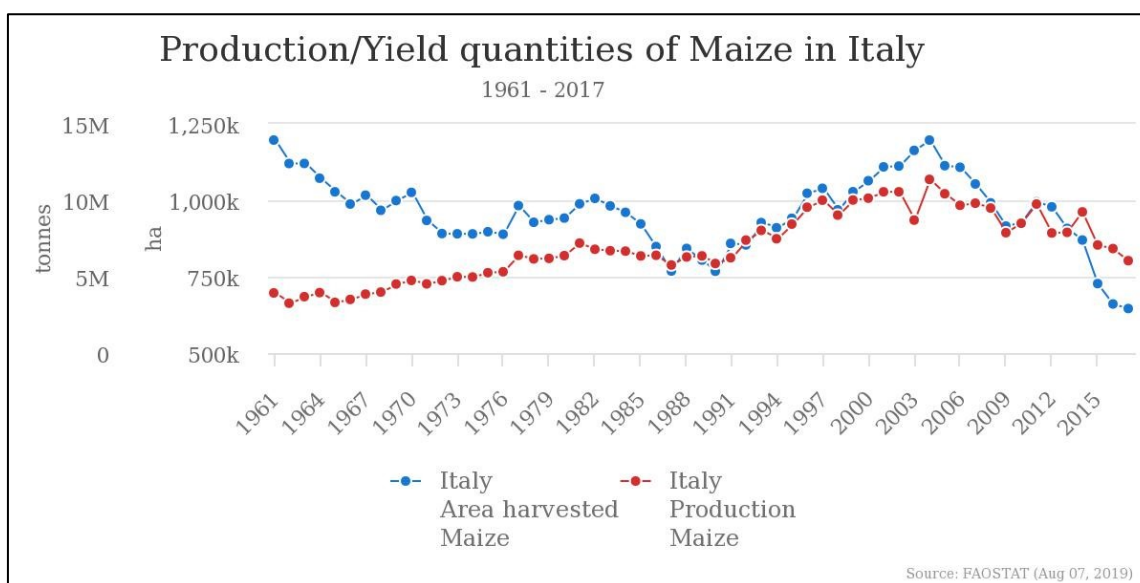


Figura 2.3 Produzione e superfici coltivate a mais in Italia dal 1961 al 2017 (“FAOSTAT,” 2019).

L'utilizzo del mais per l'alimentazione umana è molto diversificato: i chicchi lessati o grigliati possono essere consumati tal quali, ancora attaccati al tutolo, oppure in insalata (*Zea mays sub. Saccharata*); un altro utilizzo classico è quello di rendere i semi di mais dei fiocchi (*corn flakes*), altrimenti, nel caso di *Zea mays sub. Everta* il cereale viene sfruttato per la produzione di pop-corn; dal germe del seme si ottiene l'olio di mais, ottimo per condire

le insalate, mentre dal resto del seme è possibile estrarre l'amido, utilizzato per la produzione di dolci (*Zea mays sub. Ceratina* o *waxy corn*). Il cereale è anche sfruttato dall'industria degli alcolici, con la produzione di birre e superalcolici come il Bourbon. L'uso che è più comunemente noto per l'alimentazione umana è quello sotto forma di farina: nelle culture latine si producono *Tortillas*, *Tamales* e *Atole*, mentre nella cultura italiana è sfruttata per la produzione di polenta (farina *Bramata* o *Fioretto*) o di dolci (farina *Fumetto*).

Per quanto riguarda l'alimentazione animale, invece, il mais viene sfruttato per la produzione di insilati che possono includere il trinciaggio dell'intera pianta a maturazione cerosa o il trinciaggio della granella e dei tutoli o della sola granella allo stadio latteo-ceroso per la produzione di pastoni; infine, la granella tal quale o ridotta in farina viene prodotta da aggiungere alle diete di avicoli, bovini, suini, caprini ed equini. Se la pianta non viene trinciata nella sua interezza, lo stocco può essere sfruttato come base per la lettiera.

Un ultimo utilizzo del mais riguarda la produzione di biogas e biocombustibili: mediante la fermentazione del mais trinciato, infatti, è possibile ottenere etanolo e metano che possono essere bruciati per la produzione di energia elettrica oppure utilizzati come combustibili biologici.

L'aumento odierno della domanda di prodotti provenienti da colture "antiche", unitamente all'indiscusso beneficio genetico della coltivazione di più tipologie di mais ha quindi consentito lo sviluppo di aziende basate sulla produzione di varietà tradizionali, ampliando la ricerca sulle effettive proprietà nutrizionali di questi cereali e garantendo lo sviluppo di economie locali in territori in via di abbandono.

La commercializzazione di prodotti ottenuti da varietà antiche sia di mais che di altre specie, è subordinata all'iscrizione del registro varietale secondo quanto stabilito dal Decreto Ministeriale 13136 del 11/03/2019 "Modalità operative inerenti la procedura informatica per l'iscrizione di varietà vegetali nei Registri nazionali di specie agrarie ed ortive e per la richiesta di autorizzazione alla commercializzazione di sementi di varietà in corso d'iscrizione" che stabilisce la procedura operativa informatizzata finalizzata

all'iscrizione delle varietà vegetali di specie agrarie nei Registri nazionali e la commercializzazione di sementi di varietà in corso di iscrizione ("Mipaaf," 2019). Questo decreto risponde al decreto legislativo del 30 dicembre 2010 numero 267, con il quale è stata recepita la direttiva 2009/145/CE.

La domanda d'iscrizione deve contenere le seguenti informazioni:

- a) Tipo di registro e specie botanica a cui appartiene la varietà di cui si intende chiedere l'iscrizione;
- b) Denominazione della varietà ai sensi del Regolamento n.2009/637/CE;
- c) Dichiarazione circa la presentazione per la stessa varietà di una domanda per l'iscrizione al Registro di un altro Stato membro dell'Unione Europea
- d) Indicazione del costitutore, dell'avente causa, del rappresentante designato e del responsabile della conservazione in purezza;
- e) Azienda dove la varietà viene mantenuta in purezza;
- f) Metodo applicato per la selezione conservatrice della varietà;
- g) Azienda dove vengono effettuate le prove varietali;
- h) Metodo di ottenimento della varietà e origine della stessa;
- i) Indicazione di attributi previsti nei Questionari tecnici (Allegato I) di ciascuna specie;
- j) Indicazione dell'epoca di semina idonea all'effettuazione delle prove.

Inoltre, la domanda deve essere corredata dai seguenti documenti:

- a) Designazione di un rappresentante con sede legale in Italia;
- b) Documentazione attestante i diritti acquisiti sulla varietà;
- c) Autorizzazione all'uso di linee parentali, nel caso di ibridi e associazioni varietali;
- d) Autocertificazione, ai sensi dell'articolo 46 del D.P.R 28 dicembre 2000, n. 445, in ordine al pagamento dell'imposta di bollo dovuta;
- e) Riproduzioni fotografiche della pianta e parti di pianta che servano all'identificazione della varietà ed ogni altra informazione e documentazione ritenuta utile al fine dell'esame della domanda, con particolare riferimento alla scheda descrittiva della varietà, sono raccomandate, ma non obbligatorie.

L'importanza di mantenere il patrimonio genetico non solo maidicolo, ma di tutte le specie viventi è stato anche riconosciuto a livello internazionale con la Convenzione sulla diversità biologica firmata dai 193 Stati membri delle Nazioni Unite nella conferenza sull'ambiente e lo sviluppo tenutasi a Rio de Janeiro nel 1992. Con questa conferenza, infatti, sono stati posti gli obiettivi di avere una buona conservazione della diversità biologica in generale, di utilizzare in modo sostenibile le componenti biologiche e di avere un'equa divisione dei benefici dell'utilizzo delle risorse genetiche derivate da tale conservazione, oltre che di trasferire le conoscenze e le tecnologie necessarie a questo mantenimento. In questo modo è possibile mantenere e perpetrare la diversità genetica che ha consentito a numerose specie vegetali di adattarsi ai vari climi e di non giungere ad un deterioramento genetico che porterebbe sicuramente a crisi e carestie. Per questo motivo sono state create anche delle "banche" di germoplasmi che hanno la funzione di mantenere e conservare il materiale genetico.

A livello italiano la tutela e la valorizzazione di prodotti unici e legati al territorio è stata introdotta mediante diversi tipi di riconoscimenti: dalla denominazione "DOP" o Denominazione di Origine Protetta, che viene concessa ai prodotti agroalimentari le cui caratteristiche di qualità dipendono del tutto o in parte dall'ambiente geografico in cui sono prodotti, all'"IGP" o Indicazione Geografica Protetta che viene attribuita ai prodotti agricoli e alimentari che posseggono qualità o caratteristiche determinate dall'origine geografica e di cui almeno una delle fasi produttive deve avvenire in un'area geografica determinata. Queste certificazioni legano fortemente un determinato prodotto alla realtà territoriale in cui sono generati, dove i fattori climatici, ambientali e umani (tecniche agronomiche, meccanizzazione, metodi tramandati di generazione in generazione) permettono di avere un bene unico nel suo genere. Al giorno d'oggi la cultura del "mangiar sano" è sempre più diffusa e questo ha permesso l'espandersi del mercato verso le varietà antiche di molte specie di frutta, verdura e cereali, permettendone quindi il loro recupero e la loro conservazione.

In particolar modo, per il mais, le varietà “antiche” sono utilizzate per lo più per la produzione di polenta. Questo alimento viene consumato prevalentemente nel nord Italia, ma anche in paesi come Svizzera, Austria, Croazia, Argentina e altri paesi dell’Est Europa e del Sud America (Zeppa et al., 2012). Questo piatto viene cucinato in paioli di rame, aggiungendo all’acqua bollente, addizionata di sale, la farina di mais, in quantità variabile dai 200 ai 300 grammi per litro. La miscela va quindi tenuta in movimento per circa un’ora e, una volta cotta, viene servita tal quale o con l’aggiunta di burro, formaggi nel caso in cui si parli di polenta tradizionale, tipica della Bergamasca, “*uncia*”, tipica del lago di Como o taragna, tipica della Valtellina. Solitamente la polenta dei nostri giorni è un piatto di accompagnamento ai piatti di carne, come brasati e spezzatini, ma nella cultura contadina del secolo scorso era un piatto unico e povero, talvolta accompagnato da salumi o formaggi, che forniva l’energia per lavorare nei campi. Si ricorda infatti che la farina di mais contiene l’80% di amido, il 10-15% di proteine e il 5% di lipidi (Panzeri et al., 2011), il che consentiva di soddisfare il bisogno calorico dei lavoratori, ma non rappresentava un alimento completo.

Il nome deriva dal latino “*puls*” o “*pulentum*”, che sta ad indicare un piatto tipico dell’antica Roma, preparato con farina di varie tipologie di cereali o castagne; esso costituiva la base dell’alimentazione per numerosi soldati, che potevano tranquillamente conservare le farine nei lunghi viaggi per poi cucinarle con la sola aggiunta di acqua (Zeppa et al., 2012).

Ad oggi la polenta viene preparata quasi esclusivamente con farina di mais, talvolta addizionata di farina di grano saraceno; le varietà di mais più utilizzate sono quelle a grana vitrea o semi vitrea, ma con la riscoperta di varietà tradizionali, la gamma di farine di polenta si sta sempre più ampliando, aggiungendo mais a grana colorata o bianca, con sapori e gusti sempre più diversificati e che vanno incontro alle esigenze di una popolazione sempre più disomogenea (Brandolini and Brandolini, 2009).



Figura 2.4 Preparazione della polenta nel tipico paiolo in rame

Nello specifico, dagli studi di Brandolini, in Italia si possono suddividere le numerose popolazioni di mais in nove complessi differiscono per spiga e granella:

- a) Ottofile: sono diffusi su tutto il territorio nazionale e si caratterizzano per la loro capacità di adattarsi alle varie zone climatiche avendo una lunghezza del ciclo vegetativo variabile (dal precoce al tardivo). Agli ottofile classici sono associati anche mais vitrei o semi vitrei a 10-12 file, che si sono ibridati per contaminazione.
- b) Conici: diffusi nelle zone pianeggianti e collinari non irrigue del centro-nord Italia. Si distinguono per la forma conica o sub-conica della spiga, con cariossidi di grandezza media ed isodiametriche. La caratteristica che permette a questa categoria di resistere alla siccità risiede nel tutolo, che ha un ricco e soffice parenchima, che accumula molta acqua e consente il mantenimento della turgidità degli stigmi fiorali e lo sviluppo della cariosside.
- c) Cilindrici tardivi del Sud: situati nelle pianure del Meridione, queste varietà hanno la cariosside bianca o arancione, con un tutolo cilindrico o sub-cilindrico e un ciclo medio-lungo.

- d) Cilindrici medi del Sud: localizzati nel centro-sud Italia, hanno spighe lunghe e ciclo medio-lungo.
- e) Nani precoci: presenti nelle aree montuose del centro-nord Italia e della costa Tirrenica, presentano una spiccata precocità e una dimensione della spiga e della pianta molto ridotte, che consentono alla popolazione di resistere a climi dove il ciclo vegetativo deve essere breve e dove le disponibilità di acqua sono molto variabili.
- f) Microsperma: diffusi nelle zone prealpine, sono piante precoci e contraddistinti da una cariosside vitrea e da un colore arancione. Questa varietà è richiesta per la preparazione di farine molto colorate.
- g) Insubri o Padani: diffusi nelle medesime zone, sono il risultato dell'adattamento al clima dei colli Euganei; sono divisi in due gruppi: uno con una spiga sub-conica, con granella profonda e semi-vitrea e uno con granella vitrea arancione ed isodiametrica.
- h) Perla: localizzati in Veneto ed in Campania, sono contraddistinti da una spiga molto bianca, color perla, da cui il nome.
- i) Dentati Bianchi: a differenza dei precedenti, sono a fattura farinosa e si suddividono in rostrati (con le cariossidi appuntite) e caragua, che invece presentano una dentatura profonda.

2.3. Descrizione e classificazione

Il mais appartiene alla famiglia delle *Poacee*, è una pianta a ciclo primaverile-estivo di tipo annuale, monoica e caratterizzata da un unico stelo che può arrivare ai 4 metri di altezza. Il ciclo di questa pianta è di tipo C4 e perciò sfrutta molto bene l'energia solare e l'acqua a disposizione. All'interno della specie *Zea mays* L. esistono moltissime cultivar e ibridi differenti, con la conseguenza di avere una variabilità enorme sia nell'adattamento ai vari climi, sia nelle produzioni e nella morfologia.

L'apparato radicale è fascicolato e si sviluppa dai 40 ai 150 cm di profondità a seconda delle condizioni climatiche e del tipo di terreno; inizialmente la pianta da origine alle radici seminali, originate dal seme, che svolgono la loro funzione in maniera prevalente fino alla quinta o sesta foglia e poi smettono di crescere. Quando la pianta termina l'emergenza, a partire dalla corona posta alla base del culmo (a circa 2-3 cm di profondità) si originano le radici avventizie, che rappresenteranno il vero e proprio apparato radicale della pianta. Nelle fasi finali della crescita si possono poi generare delle radici di tipo aereo, che vengono emesse dai primi nodi basali epigei; esse hanno una funzione strutturale di ancoraggio della pianta al terreno (Figura 2.5).

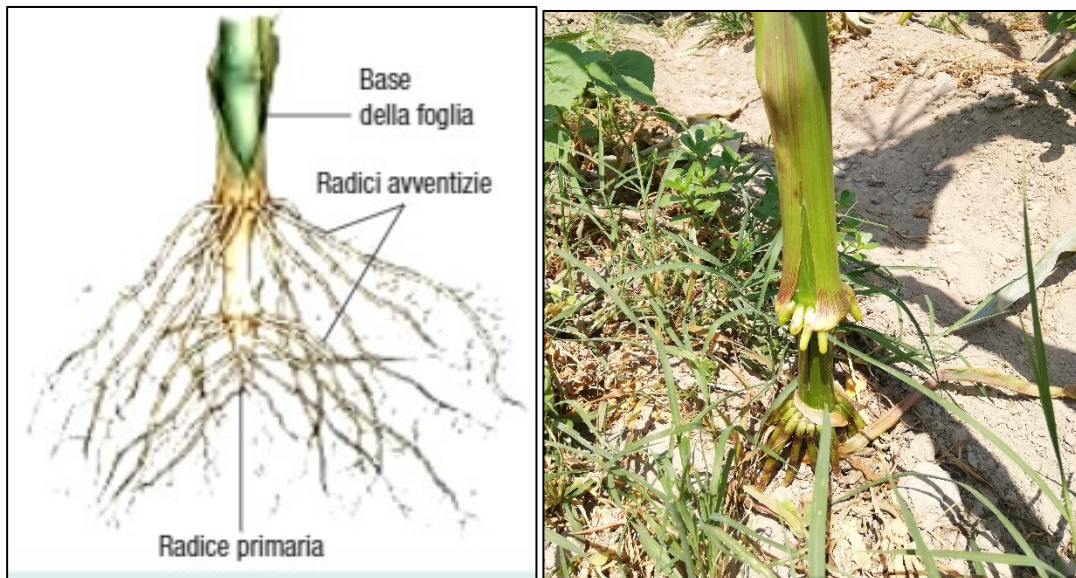


Figura 2.5 Apparato radicale

Il culmo (o stocco) può arrivare ad un'altezza di 4 metri, come detto in precedenza, con un diametro a maturazione di 2-4 cm. Esso è composto da

12-24 nodi ed altrettanti internodi, con lunghezza variabile. Molto spesso l'altezza della pianta è legata alla lunghezza del ciclo vegetativo e quindi all'adattamento all'ambiente.

A partire dai nodi si sviluppano le foglie, disposte in maniera alternata e di forma allungata, la cui lunghezza varia dai 30 ai 150 cm. Le nervature sono parallele, in numero variabile da 8 a 10, con quella centrale più spessa. Come tipico delle *Poacee*, le foglie sono costituite da una lamina con forma lanceolata ed un portamento variabile, una guaina che avvolge l'internodo nella sua quasi totalità ed una ligula, che blocca l'entrata di acqua o parassiti nello spazio tra la guaina e lo stocco.

La superficie di area fogliare che insiste su una superficie di terreno pari a 1 m², detta LAI, può arrivare fino ad un valore di 5, andando a rappresentare un'ottima copertura per il suolo (Figura 2.6).



Figura 2.6 Apparato fogliare del mais

Le infiorescenze maschili e femminili sono posizionate sullo stesso individuo, ma in posizioni diverse (fiori diclini). L'infiorescenza femminile, detta erroneamente pannocchia, è una spiga ascellare, posta tra il quinto ed il settimo internodo al di sotto dell'infiorescenza maschile; essa è costituita da un asse centrale detto "tutolo", con una lunghezza che varia tra i 15 ed i 30

cm in media, a seconda della varietà di mais, con una colorazione bianca o rossastra in base all'assenza o alla presenza di pigmenti. Sul tutolo si inseriscono le spighette sessili che presentano un fiore fertile e uno non fertile; queste spighette sono disposte in ranghi in quantità variabile da 8 a 24 nelle varietà tradizionale e da 14 a 20 nei moderni ibridi. La spiga si inserisce sullo stocco con un peduncolo, costituito da 8-10 nodi, da cui partono le foglie modificate in brattee che proteggono la spiga e la racchiudono completamente. I fiori femminili hanno un ovario monospermico, con stili molto sottili e filiformi, che fuoriescono dalle brattee in modo scalare nel corso di una settimana circa all'apice della spiga. Questi stili vengono anche chiamati "sete" o "barbe" (Figura 2.7).



Figura 2.7 Infiorescenza femminile

L'infiorescenza maschile, detta anche pennacchio, è in realtà la vera pannocchia; essa è posta all'apice del culmo ed è costituita da più spighe che portano delle spighette in coppia ad ogni nodo; una di esse è sessile, mentre l'altra è pedunculata. Ogni spighetta porta un fiore fertile ed uno spesso abortito. Ogni pianta arriva a produrre fino a 20 milioni di granuli pollinici (Figura 2.8).



Figura 2.8 Infiorescenza maschile

L'impollinazione è mediata dal vento ed è quasi completamente incrociata a causa della fioritura anticipata del fiore maschile rispetto all'emissione delle setole (proterandria).

Il frutto è una cariosside costituita da un embrione, un endosperma composto prevalentemente da amido e degli involucri protettivi detti pericarpo e perisperma.

Il ciclo vitale varia dai 90 ai 150 giorni dalla semina alla raccolta.

Il ciclo biologico del mais è suddiviso in una fase detta sporofitica ($2n$) ed una detta gametofitica (n). Nella prima fase si ha l'attività vegetativa della pianta; essa inizia quindi con la germinazione, che avviene nel giro di 2-3 settimane dalla semina, in base alle condizioni climatiche. La rottura del pericarpo e la conseguente emissione della radichetta e della piumetta avvengono infatti quando le temperature medie si aggirano attorno ai 10°C . Temperature al di sotto dei 10°C o al di sopra dei 45°C , infatti, rallentano o fermano completamente la crescita della pianta ("Caratteristiche del mais," 2019).

A seguito di questa fase si ha l'emergenza, che è garantita dall'allungamento del mesocotile che si protrae verso l'alto per 2-3 cm.

Dopo l'emergenza si genera la corona, dalla quale avranno origine le radici avventizie che garantiranno l'indipendenza della pianta dalle riserve del seme. Questo avviene alla fase di quinta-sesta foglia.

A partire dall'emissione delle radici avventizie, la pianta inizierà ad emettere nuove foglie, fino ad arrivare ad un'altezza di 40-60 cm e a circa 8-10 foglie. A partire da questo momento inizia la fase di levata, in cui avviene l'allungamento degli internodi e la formazione finale delle infiorescenze maschili e femminili.

Da questo punto in avanti ha inizio la fase gametofitica, in cui la pianta smette di accrescersi e inizia la produzione di granuli pollinici e sacchi embrionali.

Il granulo pollinico maturo comprende tre nuclei aploidi (uno vegetativo e due generativi o spermi), mentre il sacco embrionale ne contiene otto: tre di questi sono posizionati ad un polo del sacco e rappresentano la cellula uovo e i due sinergidi; due nuclei sono posti al centro (detti nuclei polari) e i restanti tre al polo opposto (antipodali).

Durante la fecondazione si ha la fusione di uno dei nuclei generativi con la cellula uovo per formare lo zigote da cui si originerà l'embrione diploide ($2n$), mentre l'altro nucleo generativo si unirà ai due nuclei polari per dare origine all'endosperma ($3n$). per questo motivo si parla di doppia fecondazione, tipica delle Angiosperme (Figura 2.9).



Figura 2.9 Doppia fecondazione

Terminata la fecondazione, la cariosside si ingrossa e in circa tre settimane dalla fecondazione raggiunge le dimensioni finali. A questo stadio ci si trova a

maturazione lattea, in quanto l'endosperma si presenta sotto forma di un liquido lattiginoso, composto da amido. La sua sintesi inizia dal saccarosio, che viene trasportato per via floematica al seme; qui viene scisso in monosaccaridi, in modo da poter passare il doppio stato cellulare ed essere poi riconvertito in saccarosio e amido. Dopo altre 3-4 settimane si ha la maturazione cerosa, dove la pianta inizia a perdere acqua e la granella inizia ad acquisire una maggior resistenza. Passate altre 3 settimane si ha quindi la maturazione fisiologica, in cui la cariosside termina l'accumulo delle sostanze di riserva e ha un contenuto idrico del 30-35% (Figura 2.10).

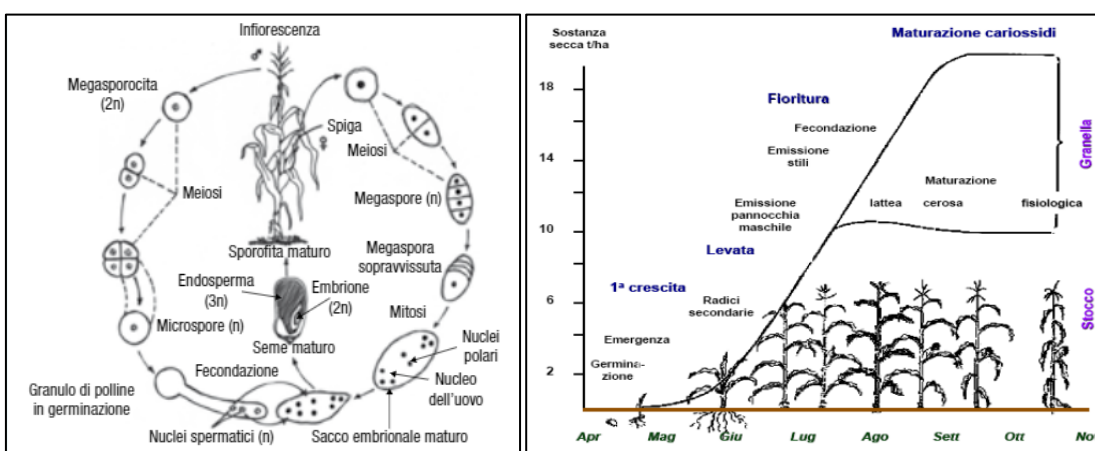


Figura 2.10 Ciclo biologico del mais

La cariosside che si ottiene è quindi un frutto secco ed indeiscente che si inserisce sul tutolo mediante l'ausilio di un pedicello (Agostini, 2007). Al momento della maturazione, i tessuti vascolari che portano le sostanze di riserva al frutto sono interrotti da un doppio strato di cellule basali, uno di origine endospermica e l'altro di origine materna. Al raggiungimento della maturità, il secondo strato necrotizza, formando il cosiddetto "punto nero" alla base della cariosside, che ne indica la maturità fisiologica.

La cariosside è quindi costituita da un embrione, dall'endosperma e dall'aleurone, come i semi di tutti i cereali. Il primo componente si suddivide a sua volta in:

- a) Una piumetta, protetta dal coleoptile, con gli abbozzi delle prime 4 o 5 foglie;
- b) Una radichetta, protetta anch'essa dalla coleorizza;
- c) Uno scutello, rivestimento ricco di grassi.

L'endosperma, invece, rappresenta la riserva di energia per l'embrione, ed è quindi composto prevalentemente da amidi (circa il 70-75%), suddivisi a loro volta in amilosio, che compone il 21% degli amidi totali, ed amilopectina, che copre il restante 79% (Wilson et al., 2004). Tale riserva è racchiusa da una membrana composta da cellule vitali detta aleurone; essa, in presenza di acqua, produce gli enzimi necessari alla degradazione dell'amido per la successiva germinazione.

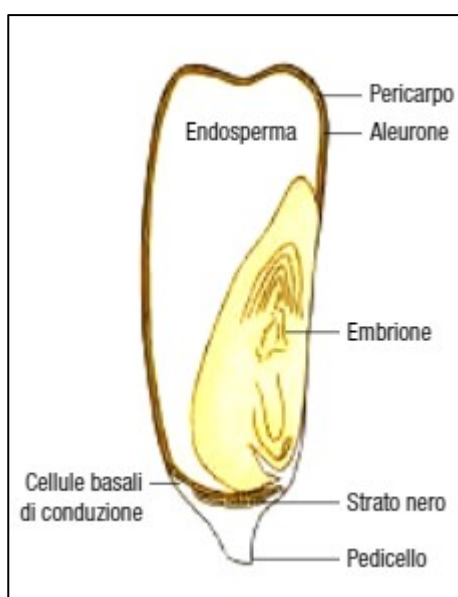


Figura 2.11 Cariosside del mais

Esistono varie tipologie di endosperma, che hanno permesso la suddivisione del mais in sette categorie:

1. *Zea mays ssp. Indentata*, noto come mais dentato o “*dent corn*”. La fattura dell'endosperma di questa tipologia di mais è di tipo farinoso nella parte inferiore del chicco, mentre rimane vitrea alla sommità del chicco. Questo mais è in generale quello più coltivato in Italia e nel mondo, vista l'elevatissima capacità produttiva e la sua attitudine a prestarsi molto bene come base dell'alimentazione zootecnica. La peculiarità di questo mais, da cui prende il nome, sta nella granella, che presenta un concavità all'apice delle cariossidi, dovuta alla perdita di umidità, che la fa assomigliare ad un dente molare. In generale, le cariossidi sono di colore giallo o bianco.

2. *Zea mays ssp. Indurata*, o mais vitreo o “*flint corn*”. La caratteristica che dà il nome a questo mais è lo strato di amido molto duro che riveste l’endosperma farinoso. Le rese sono generalmente inferiori rispetto al mais dentato, ma la granella è sfruttata nell’alimentazione umana per la produzione di piatti tipici precedentemente citati o nella nutrizione avicola. I semi possono presentarsi di vari colori, come giallo, bianco, rosso e persino nero.
3. *Zea mays ssp. Everta* o popcorn. In questa categoria vengono raggruppati tipi primitivi, con spighe piccole e numerose. La particolarità di questo mais è nella particolare struttura amilacea delle cariossidi completamente vitree, che sono generalmente piccole e di forma sferica e che, se sottoposte ad una fonte di calore adeguata, scoppiano, dando origine all’alimento più consumato nei cinema.
4. *Zea mays ssp. Amylacea* o mais farinosi da amido. Questa tipologia di mais viene sfruttata per la produzione di amido per la successiva preparazione di dolci, in quanto delle mutazioni hanno fatto prevalere la sintesi di amilosio rispetto all’amilopectina.
5. *Zea mays ssp. Saccharata*, anche noto come mais dolce o “*sweet corn*”. Esso viene raccolto a maturazione latteata o latteo-cerosa, in quanto presenta una maturazione nota come “*sugary*”, che previene la conversione degli zuccheri in amido. In questo modo i chicchi sono più zuccherini e teneri e sono molto adatti alla preparazione di insalate. I chicchi sono in genere bianchi o, più spesso, gialli.
6. *Zea mays ssp. Ceratina*, mais ceroso o “*waxy*”. Presentano la mutazione recessiva “*waxy*”, che induce la formazione di amido composto esclusivamente da amilopectina e per questo molto apprezzato dall’industria dell’amido
7. *Zea mays ssp. Tunicata* o mais vestito (“*pod corn*”), di scarso interesse economico. Presenta le glume che ricoprono le cariossidi (Brandolini, 1970; “Mais o Granoturco *Zea mays* L. - Cereali - Coltivazioni erbacee,” n.d.).

Oltre all'amido, la seconda componente principale della cariosside è rappresentata dalle proteine, che ne costituiscono circa il 10-15%. Queste sostanze sono localizzate principalmente nell'endosperma e nel germoglio e sono sintetizzate a partire dagli amminoacidi, il cui rappresentante principale è la glutamina o acido glutamico, seguito da leucina e prolina. Le proteine presenti nella granella sono essenzialmente di due tipologie: le zeine, che costituiscono circa il 60% delle proteine totali, sono di tipo idrofobico e tendono a formare granuli durante la loro sintesi. Questa famiglia di proteine presenta polipeptidi simili tra di loro sia per quanto riguarda il peso molecolare, sia per quanto riguarda la sequenza amminoacidica. Tuttavia, le zeine hanno un scarso valore biologico, in quanto povere in lisina e triptofano. L'altro gruppo di proteine è invece rappresentato dalle gluteine, che sono il 20-30% delle proteine totali e sono per lo più accumulate nel citoplasma. La loro composizione è molto variabile e per questo hanno un valore biologico medio. In generale, le proteine, sono sfruttate come fonte di azoto per lo sviluppo della plantula nei primi stadi (Anderson and Lamsal, 2011).

Il terzo componente per quantità è rappresentato dai lipidi, che sono sotto forma di olii e costituiscono circa il 4% del totale delle sostanze di riserva. La loro composizione è prevalentemente formata da acidi grassi insaturi, come l'acido linoleico ed oleico. La moderna selezione varietale ha portato alla creazione di ibridi che arrivano ad avere un contenuto oleico molto elevato, con un peso sul totale che arriva fino al 20%.

Dal punto di vista esterno il mais, oltre che dalla forma della cariosside, si caratterizza anche dal colore della granella; esistono infatti varietà bianche, gialle, arancioni, rosse o nere, a seconda dei pigmenti presenti nella granella. I carotenoidi, infatti, colorano i semi di giallo o arancione, mentre antocianine e flobafeni conferiscono tonalità rosse, blu, viola o nere, con un potere antiossidante benefico per la salute umana (Cassani et al., 2017; Lago et al., 2015; Rodríguez et al., 2013). La prima categoria di antiossidanti comprende una classe di isoprenoidi di tipo C30, liposolubili, che sono presenti in tutti gli organismi che effettuano la fotosintesi (Bramley et al.,

1993). Essi, infatti, hanno una funzione di tipo protettivo verso le clorofille: attraverso la foto ossidazione riducono i danni da stress ossidativo fotochimico. Le principali rappresentanti di questa categoria sono la luteina e la zeaxantina (Anderson and Robertson, 1960). Le antocianine, hanno sempre un ruolo di protezione e possono accumularsi nel pericarpo o nello strato aleuronico che ricopre il pericarpo (Dooner et al., 1991). La loro presenza è di assoluto beneficio per l'uomo, in quanto hanno la potenzialità di ridurre il colesterolo LDL (Castilla et al., 2008; Tsuda, 2012), di contrastare l'obesità, il diabete (Peng et al., 2011; Seymour et al., 2009; Titta et al., 2010; Tsuda, 2012) e di ridurre l'incidenza di malattie vascolari (Rissanen et al., 2003; Tsuda, 2012) e neuronali (Goyarzu et al., 2004; Lau et al., 2007; Tsuda, 2012). La regolazione della sintesi delle antocianine è regolata da due famiglie multigenetiche: la prima è la famiglia *b1/r1*, che fa parte della classe di fattori trascrizionali bHLH (*basic helix-loop-helix*), mentre la seconda è formata da *c1/pl1/p1*, che invece appartiene alla classe di fattori MYB (Chandler et al., 1989; Pilu et al., 2003).

Per quanto riguarda i flobafeni, il loro accumulo è regolato dal fattore *R2R3-myb Pericarp color1 (P1)* (Grotewold et al., 2000); qui diversi alleli di tipo *p1* danno colore al pericarpo ed alle glume.

L'assenza di pigmenti, tipica del mais bianco, è dovuta alla presenza di un gene recessivo, denominato "*yellow*", che causa l'assenza di carotenoidi (e quindi di provitamina A). A causa di questa assenza, il mais bianco, spesso utilizzato nelle diete umane, è responsabile di numerose carenze nutrizionali per milioni di persone. Questa carenza vitaminica, infatti, può portare ad una scarsa mobilitazione del ferro, che porta quindi all'anemia, oltre che a ritardi nella crescita, immunodeficienza e aumento della suscettibilità alle malattie infettive (Wurtzel et al., 2012).

Infine, va citata la presenza di acido fitico, che ha un'azione chelante verso i metalli e che quindi provoca l'escrezione di micronutrienti fondamentali negli animali monogastrici, che vanno quindi reintegrati nella dieta, andando a rappresentare un costo aggiuntivo sia in termini di alimentazione, sia in termini ambientali.

2.4. Il miglioramento genetico

Il dibattito sulla genetica del mais comincia già dal suo progenitore: il teosinte. Queste due piante, infatti, presentano diversità morfologiche nella forma adulta così grandi, che hanno portato i primi tassonomi a credere che il teosinte fosse più legato al riso che al mais. Grazie a ricerche più recenti, si è scoperto che non solo le due specie hanno lo stesso numero di cromosomi, ma condividono anche la stessa morfologia cromosomica. Inoltre, gli ibridi F1 tra mais e alcune forme di teosinte sono perfettamente fertili, presentando una normale meiosi (Doebley, 2004).

Il mais è una pianta che ha subito e sta tuttora subendo un processo di miglioramento genetico, che lo ha portato da una semplice specie selvatica ad uno dei cereali più coltivati e produttivi al mondo. Questa selezione ha portato il mais ad essere quasi completamente dipendente dall'uomo per la sua diffusione. Dalla sua domesticazione, il mais ha subito un programma di selezione intensivo, che lo ha portato all'adattamento a zone in cui prima non era possibile la sua coltivazione (tipicamente i climi temperati) e questo è avvenuto grazie alla sua grande variabilità genetica (Hufford et al., 2012). Proprio per questa elevata capacità di adattamento a diversi ambienti, la valutazione delle potenzialità produttive è fatta attraverso lo studio dell'interazione genotipo-ambiente e le prove condotte sugli ibridi vengono fatte in campi sperimentali, dove si tiene conto dei fattori climatici (come radiazione solare e temperatura), ambientali (come caratteristiche pedologiche, disponibilità di acqua e fertilità) e biotici (come presenza di patogeni o parassiti). Tutto ciò non sarebbe accaduto se l'uomo non avesse avuto particolari accorgimenti nel selezionare ed incrociare le varietà prima e migliorarle geneticamente dopo.

I primi casi di miglioramento genetico, basati sulle osservazioni fenotipiche, si ebbero già con la domesticazione del mais, in cui i primi agricoltori selezionavano le piante con caratteristiche che soddisfacessero i bisogni di cibo. In questa fase è stata migliorata l'architettura della pianta, andando a selezionare gli individui meno accostati ed è iniziato il processo di selezione delle infiorescenze e dei semi, preferendo gli individui che depositassero una

quantità maggiore di amido nella granella (Buckler et al., 2001). Successivamente l'uomo ha provveduto a migliorare la resa della coltura, oltre che le "abitudini" della pianta e le sue caratteristiche biochimiche (Wright et al., 2005). In tempi più recenti, parlando di miglioramento genetico in senso stretto, ci si è concentrati sull'aumento di produzione di granella; tuttavia questo carattere è difficilmente ereditabile e solo con l'ausilio di personale specializzato e ingenti finanziamenti è possibile giungere a buoni risultati. Un secondo aspetto su cui ci si è soffermati recentemente è quindi il miglioramento delle componenti produttive, come la lunghezza della spiga, il numero di ranghi, la grandezza del seme ed il suo peso specifico. Questi caratteri sono più stabili e più facilmente ereditabili, ma spesso in conflitto fra di loro. (Bennetzen and Hake, 2009).

I più recenti programmi di miglioramento genetico si sono concentrati sulla resistenza del mais verso l'attacco di patogeni e parassiti. Ad oggi sono disponibili ibridi con resistenza a *Phytophthora*, *Helminthosporium*, *Ustilago maydis*, *Fusarium* e *Pantoea stewartii*. Inoltre, con l'avvento della meccanizzazione negli anni '50, la selezione di ibridi con una maggiore resistenza meccanica dello stocco e delle radici alle vibrazioni, ha portato alla nascita di linee come la B73, avente un apparato radicale molto robusto.

Un ulteriore passo per il miglioramento delle produzioni è stato realizzato grazie all'attenzione verso l'apparato fotosintetico, e dello stato di salute della pianta in generale, grazie all'introduzione di ibridi "stay green" (Crosbie, 1982). Un apparato fogliare efficiente e sano, infatti, fornisce alla pianta il fabbisogno di carboidrati necessario sia allo sviluppo dello stocco, sia dell'apparato radicale, oltre che ad un aumento dell'accumulo di amido nella granella. Grazie all'aumento del LAI e alla selezione di piante con foglie a portamento eretto ha garantito una migliore efficienza nello sfruttare la luce, oltre che all'aumento di numero di piante per metro quadrato.

Un ulteriore carattere che è stato preferito è la resistenza al freddo, che permette di effettuare semine anticipate e quindi fioriture anticipate, evitando in questo modo gli eventuali attacchi della piralide.

L'individuo di mais ideale dovrebbe avere (Mock and Pearce, 1975):

- a) Fotoindifferenza (adattamento ad ogni latitudine)
- b) Efficienza fotosintetica massimizzata (più risorse per la pianta) e foglie rigide e verticali sopra la spiga (meno ombreggiamento)
- c) Coincidenza tra fioritura femminile e maschile (impollinazione ottimizzata)
- d) Pennacchio ridotto (meno energia persa, meno ombreggiamento)
- e) Singola spiga (facilità nella raccolta e miglioramento della resa)
- f) Lenta senescenza fogliare e tempo di riempimento della cariosside lungo
- g) Alta efficienza nell'accumulare amido
- h) Buona tolleranza al freddo delle plantule (possibilità di semina anticipata)
- i) Culmo con ricca quantità e qualità di carboidrati (trinciato di migliore qualità)
- j) Elevata attività della nitrato-reduttasi in condizioni di alta densità.

I programmi di miglioramento genetico puntano all'ottimizzazione di alcuni di questi fattori in funzione dell'obiettivo aziendale.

Il problema delle piante selezionate è legato alla perdita di diversità genetica rispetto all'individuo progenitore che potrebbero portare a pericolose conseguenze, come l'insorgenza di malattie o la suscettibilità massiva all'attacco dei patogeni, che porterebbero a gravi e ingenti perdite economiche e di disponibilità di cibo.

2.5. L'Associazione Grani Asta del Serio e il VA 33

Il presente lavoro è stato svolto su richiesta ed in collaborazione con l'Associazione culturale no-profit "Grani Asta del Serio", gestita dal dottor Andrea Messa. Lo scopo dell'associazione è quello di valorizzare e tutelare i cereali minori in montagna, studiandone la storia locale in modo da poter diffondere una cultura delle colture che si sta ormai perdendo.

L'associazione si occupa di tutta la filiera produttiva dei cereali che coltiva, dalla semina alla raccolta, dallo stoccaggio alla molitura, fino ad arrivare all'uso alimentare.

L'articolo 3 dello statuto dell'associazione stabilisce i seguenti scopi:

- a) recuperare la storia e la cultura delle coltivazioni cerealicole dei grani tipici delle zone di alta collina e montagna;
- b) promuovere il recupero delle essenze autoctone e/o simil-autoctone presenti e in coltivazione sul territorio, storicamente provate;
- c) sollecitare il recupero dei coltivi abbandonati con la conseguente trasformazione dei grani ottenuti in prodotti da forno per consumo locale a reale km 0;
- d) valorizzare l'intera filiera dei grani storici dal campo al consumo, attraverso attività di ricerca e recupero di documentate produzioni tipiche locali;
- e) compiere attività di studio e di ricerca applicativa nell'impiego delle nuove tecnologie in continuità con la metodologia produttiva un tempo in uso sul territorio;
- f) preparare, organizzare e partecipare a eventi, seminari di studio e manifestazioni, anche all'estero, in materia di protezione, riqualificazione ambientale e biodiversità attraverso il recupero dei coltivi;
- g) promuovere e sviluppare le attività attraverso la pubblicazione e/o distribuzione di informative specializzate, di manuali, nonché del materiale e della documentazione tecnica prodotta a beneficio degli associati e di tutti gli interessati;

- h) stipulare convenzioni con enti pubblici o privati per la gestione di corsi e seminari ed anche, eventualmente, garantire la prestazione di servizi rientranti nell'ambito dei propri scopi istituzionali.

Dai comunicati stampa del 20/03/2015 e dell'11/05/2016 si riporta come “L’associazione è stata fondata nel 2013, in ottica di EXPO Milano 2015 a Nasolino in Oltressenda Alta e alla Valzella di Ardesio. La collaborazione con le rispettive Amministrazioni Comunali diventa essenziale laddove queste riescono a mettere a disposizione dei singoli Plessi Scolastici, solitamente nei pressi delle scuole, piccoli campi dove possono essere avviate piccole coltivazioni a scopo didattico, direttamente dagli alunni. L’Associazione predilige “il fare” al “dire o apparire” e svolge la propria attività educativa affiancandosi con competenza e con “le mani nella terra” al corpo docente che collabora, in linea con l’antica saggezza del “non clamor sed labor”. È sembrato che comunque potesse essere significativo rendere disponibili le due esperienze specifiche di Piario e Villa d’Ogna, dove oggi sono pienamente operativi due siti di cerealicoltura didattica a disposizione e d operati dalle rispettive Scuole Primarie. A Piario, in località Candrietti, dal 2015 il primo campo scuola è stato strutturato per la coltivazione di frumento e segale in rotazione successiva a grano saraceno e una varietà di granoturco giallo vitreo VA 33 locale delle Fiorine di Clusone.”

È dunque da questo momento che l’interesse per il mais delle Fiorine è salito, fino ad arrivare alla richiesta da parte delle amministrazioni comunali di iscriverlo al registro delle varietà da conservazione, obiettivo inserito all’interno di questo lavoro.

Il mais preso in studio è stato catalogato per la prima volta da Aureliano Brandolini nel 1954, allora ricercatore presso l’istituto sperimentale per la maiscoltura a Bergamo (oggi denominato CReA). Brandolini lo classificò con il numero di accessione 33, da qui il nome “VA33”. Il nome “delle Fiorine” deriva dall’areale di coltivazione di questo mais, che, tipicamente, si trovava in località “Fiorine”, nel comune di Clusone.

Di seguito è riportata la scheda tecnica che descrive le principali caratteristiche del mais “delle Fiorine” (Figura 2.12).

Locale Fiorine - Clusone (BG)	
<i>Località di prelievo</i>	Fiorine - Clusone (BG)
<i>Anno di prelievo</i>	1954
<i>Numero accessione varietà</i>	VA33
PIANTA	
Altezza pianta cm	163
Altezza inserzione spiga cm	80
CICLO SEMINA	
Fioritura maschile (GDD base 10°C)	658
Fioritura femminile (GDD base 10°C)	688
SPIGA	
Lunghezza cm	16
Diametro spiga mm	48
Diametro tutolo mm	29
Forma	cilindro conica
Numeri dei ranghi	16
Colore del tutolo	bianco
GRANELLA	
Tipo	semivitreo
Colore della corona	arancio
Peso 1000 semi g	270
Peso ettolitrico Kg/hl	79,0
Peso specifico g/cc	1,27
Volume 100 semi cc	21
Resa alla macinazione %	55,4
OSSERVAZIONI	
Zona di coltivazione agro di Clusone; ciclo di maturità medio intorno ai 130 giorni.	



Figura 2.12 Scheda descrittiva VA33

I valori dell'altezza della pianta e di inserzione della spiga sono stati ricalcolati sulla base dei nuovi coltivi e sono riportati nel capitolo "Caratteristiche fenotipiche del mais delle Fiorine".

Il mais è stato recuperato dopo oltre cinquanta anni dalla sua catalogazione dall'associazione "Grani dell'Asta del Serio", che, in collaborazione con il CReA di Bergamo, ha ridato vita a questa varietà nel 2015. L'utilizzo principale delle sementi derivate dal mais delle Fiorine è la produzione di polenta, ma è anche indicata per la panatura di pesce, carne e verdure.

Il reinserimento di questa varietà di mais è supportato tutt'oggi dall'amministrazione comunale di Clusone (BG), che ha richiesto l'inserimento di questo mais all'interni del registro delle varietà da conservazione.

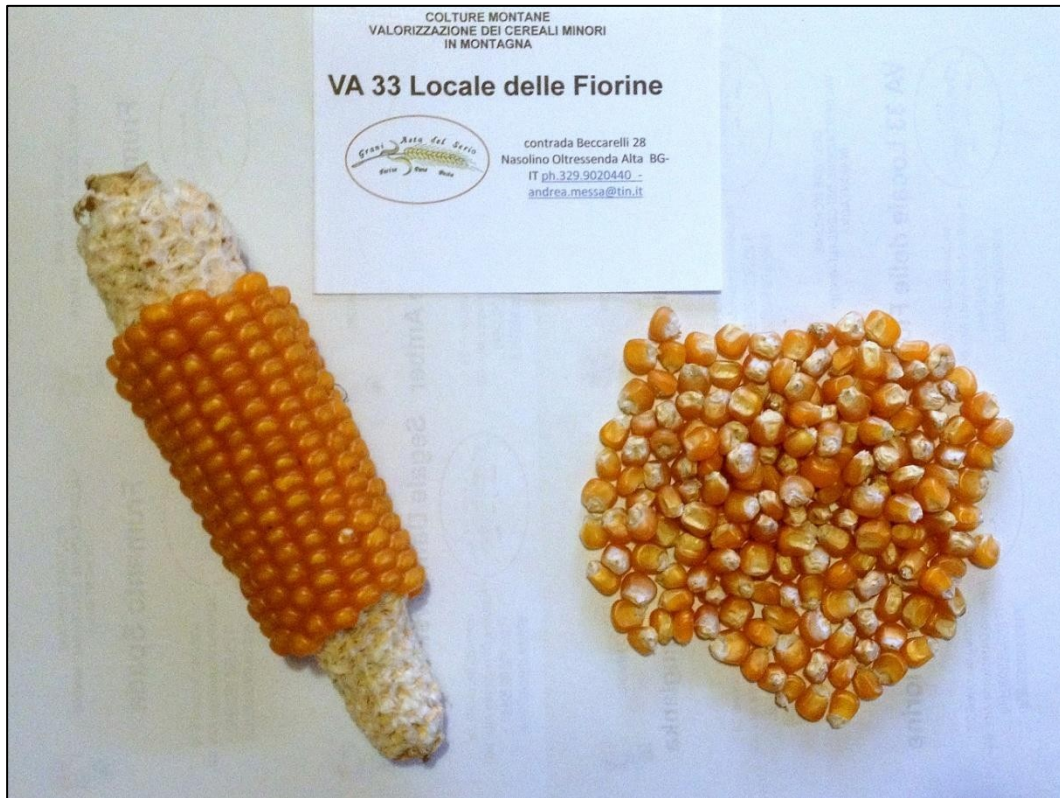


Figura 2.13 Spiga del VA33

In Figura 2.13 viene mostrata una spiga di mais delle Fiorine; in particolare si nota il criterio di selezione del seme: la testa e la coda della spiga vengono destinati alla molitura, mentre il corpo con i chicchi “migliori” viene sgranato a mano per evitare di rovinare il seme. Dopo la sgranatura i semi vengono sottoposti a varie operazioni, quali ventilazione, vagliatura, calibratura, pesatura, calcolo dell’umidità relativa, prove di germinabilità e conciaura.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Il materiale vegetale

Il materiale vegetale preso in analisi è stato fornito dall'Associazione Grani Asta del Serio, il cui presidente, il Dottor. Andrea Messa, è anche l'agricoltore custode del mais "VA33". Nel corso del 2015, Messa, in collaborazione con il CReA di Bergamo, ha recuperato la semente del mais delle Fiorine, riportandola nelle zone di coltivazione storiche.

Le altre popolazioni di mais prese in considerazione per i confronti genetici sono invece: Spinato di Gandino, Ottofile, Spinato Nero di Esine, Chiavenna, Millo Corvo, B73, Mo17, l'ibrido B73/Mo17 e Ottofile Rosso. I dati dei primi quattro mais provengono dalla banca dati del CRA-MAC (unità di ricerca per la maiscoltura di Bergamo); il Millo Corvo è stato reperito dall'Associazione ProSpecieRara; le linee B73, Mo17 e l'ibrido B73/Mo17 sono state coltivate ed analizzate dall'Università degli Studi di Milano, mentre i dati dell'Ottofile Rosso derivano da uno studio precedente.

3.2. I campi sperimentali

Sono state coltivate due file di mais delle Fiorine nel campo sperimentale, visibile in Figura 4.1, all'interno dell'azienda di facoltà a Landriano (PV), mentre sono stati presi in considerazione cinque degli otto campi coltivati a Clusone e nei comuni limitrofi. Nello specifico le due file a Landriano sono quelle nominate "RS5733" e "RS5574", con una lunghezza di 40 metri per fila.

I coltivi nelle zone della provincia di Bergamo sono i seguenti:

- 1) Campo "Fiorine" (Figura 4.2), denominato "FIO" localizzato nel comune di Clusone, in località Fiorine, dove, presumibilmente, ha avuto origine la selezione primaria ed il nome del mais. Il campo si trova nella proprietà di un'azienda locale, ad un'altitudine di 581 m s.l.m. e la georeferenziazione è la seguente:

Latitudine N: 45° 53' 10'' Longitudine E: 9° 55' 32''

Inclinazione 2°

Esposizione 118°

- 2) Campo "Piario" (Figura 4.3), siglato come "PIA" e situato nell'omonimo comune. Il campo si trova all'interno di un piccolo campo di proprietà di Andrea Messa, recintato su tre lati con un muro in calcestruzzo e sul quarto con una rete in filo di ferro. I dati per la sua localizzazione sono:

Altitudine 555 m s.l.m.

Latitudine N: 45° 53' 53'' Longitudine E: 9° 55' 51''

Inclinazione 5°

Esposizione 280°

- 3) Campo "Villa d'Ogna" o "OGN" (Figura 4.4), anch'esso localizzato nell'omonimo comune su di un terreno adiacente al municipio. Il campo viene usato come Demo-Coltivo per la vicina scuola dell'infanzia, per far approcciare i bambini del luogo alle attività agricole.

Altitudine 530 m s.l.m.

Latitudine N: 45° 54' 27'' Longitudine E: 9° 55' 45''

Inclinazione 2°

Esposizione 240°

4) Campo “Bricconi” (Figura 4.5), denominato “BRI” situato nell’omonima contrada del comune di Oltressenda Alta, in un terreno di Messa, posto nelle vicinanze di un’azienda zootecnica di nuova generazione. È il campo più elevato di quelli coltivati a VA33 e, infatti, si trova ad un’altitudine di 941 m s.l.m. Le altre caratteristiche del sito sono:

Latitudine N: 45° 55’ 13’’ Longitudine E: 9° 56’ 54’’

Inclinazione 14°

Esposizione 216°

5) Campo “Cerete”, anche detto “CER” posto nelle campagne di Cerete basso. Questo è il campo seminato più tardi; la data di semina è stata infatti il 21 giugno 2019. Il campo è di proprietà di un agricoltore locale.

Altitudine 470 m s.l.m.

Latitudine N: 45° 51’ 45’’ Longitudine E: 9° 59’ 12’’

Inclinazione 4°

Esposizione 28°

I dati relativi ad altitudine, latitudine, longitudine, inclinazione ed esposizione sono stati ottenuti mediante applicazione per smartphone GPS.

3.3. Rilievi agronomici

Al fine di iscrivere il mais “delle Fiorine” al Catalogo delle “varietà da conservazione”, è necessaria la compilazione della scheda descrittiva morfologica (Allegato I - scheda descrittiva morfologica), riportata in modo sintetico in Tabella 3.1, che verrà poi inviata agli uffici competenti di Regione Lombardia, i quali provvederanno ad inoltrare la richiesta al Ministero delle politiche agricole, alimentari e forestali e del turismo. Per poter compilare la scheda sono stati effettuati i rilievi agronomici del caso, riportati in Tabella 3.1.

Oltre alla scheda morfologica, è necessaria la compilazione della domanda di iscrizione (Allegato II - domanda di iscrizione) e di una relazione tecnica, oltre che a testimonianze e documenti storico-culturali utili a dimostrare il legame tra la coltivazione di questo mais e la cultura locale (Allegato III - documenti storici).

Tabella 3.1 Scheda descrittiva morfologica in sintesi

(GIBA) Carattere	Livello di espressione del carattere
(1) Prima foglia: pigmentazione antocianica della guaina	Assente o molto leggera Lieve Media Forte Molto forte
(2) Prima foglia: forma dell'apice	Appuntita Appuntita-rotonda Rotonda Rotonda-a spatola A spatola
(3) Fogliame: intensità del colore verde	Chiara Media Scura
(4) Foglia: angolo di apertura tra le foglie ed il culmo	Molto piccolo, $\pm 5^\circ$ Piccolo, $\pm 25^\circ$

	Medio, $\pm 50^\circ$ Grande, $\pm 75^\circ$ Molto grande, $>90^\circ$
(5) Foglia: curvatura delle foglie	Dritte o molto lievemente ricurve Leggermente ricurve Ricurve Fortemente ricurve Molto fortemente ricurve
(6) Pennacchio: epoca di fioritura	Molto precoce (FAO 100) Da molto precoce a precoce (FAO 200) Precoce (FAO 300) Ma precoce a medio (FAO 400) Medio (FAO 500) Da medio a tardivo (FAO 600) Tardivo (FAO 700) Da tardivo a molto tardivo (FAO 800) Molto tardivo (FAO 900)
(7) Pennacchio: colorazione antocianica alla base delle glume	Assente o molto lieve Lieve Media Forte Molto forte
(8) Pennacchio: colorazione antocianica delle glume (esclusa la base)	Assente o molto lieve Lieve Media Forte Molto forte
(9) Pennacchio: colorazione antocianica delle antere	Assente o molto lieve Lieve Media Forte

	Molto forte
(10) Pennacchio: angolo tra l'asse centrale e le ramificazioni laterali	Molto piccolo, $\pm 5^\circ$ Piccolo, $\pm 25^\circ$ Medio, $\pm 50^\circ$ Grande, $\pm 75^\circ$ Molto grande, $>90^\circ$
(11) Pennacchio: portamento delle ramificazioni laterali	Diritte o molto lievemente ricurve Leggermente ricurve Ricurve Fortemente ricurve Molto fortemente ricurve
(12) Pennacchio: numero di ramificazioni primarie	Assenti o molto poche, 0-3 Poche, 4-6 Medie, 7-10 Molte, 11-15 Molto elevate, >16
(13) Spiga: epoca di comparsa delle setole	Molto precoce (FAO 100) Da molto precoce a precoce (FAO 200) Precoce (FAO 300) Ma precoce a medio (FAO 400) Medio (FAO 500) Da medio a tardivo (FAO 600) Tardivo (FAO 700) Da tardivo a molto tardivo (FAO 800) Molto tardivo (FAO 900)
(14) Spiga: colorazione antocianica delle setole	Assente o molto debole Debole Media Forte Molto forte
(15) Culmo: pigmentazione	Assente o molto lieve

antocianica delle radici avventizie	Lieve Media Forte Molto forte
(16) Pennacchio: densità delle spighe	Lasche Medie Dense
(17) Foglia: pigmentazione antocianica della guaina	Assente o molto lieve Lieve Media Forte Molto forte
(18) Culmo: colorazione antocianica degli internodi	Assente o molto debole Debole Media Forte Molto forte
(19) Pennacchio: lunghezza dell'asse centrale dall'apice alle ramificazioni inferiori	Molto corto, <20 cm Corto, 20-30 cm Medio, 31-40 cm Lungo, 41-50 cm Molto lungo, >50 cm
(20) Pennacchio: lunghezza dell'asse centrale dall'apice alle ramificazioni superiori	Molto corto, <10 cm Corto, 10-20 cm Medio, 21-30 cm Lungo, 31-40 cm Molto lungo, >40 cm
(21) Pennacchio: lunghezza delle ramificazioni laterali	Molto corto, <18 cm Corto, 18-21 cm Medio, 22-24 cm Lungo, 25-27 cm

	Molto lungo, >28 cm
(23) Pianta: lunghezza (pennacchio incluso)	Molto corta Corta Media Lunga Molto lunga
(24) Pianta: rapporto altezza dell'inserzione della spiga più alta/lunghezza pianta	Molto piccolo, <40% Piccolo, 40-45% Medio, 46-50% Grande, 51-55% Molto grande, >55%
(25) Foglia: larghezza del lembo (foglia spiga superiore)	Molto stretta, <9 cm Stretta, 9-10 cm Media, 11-12 cm Larga, 12-13 cm Molto larga, >13 cm
(26) Spiga: lunghezza del peduncolo	Molto corto Corto, come ½ internodo Medio, come internodo Lungo, più lungo dell'internodo Molto lungo
(27) Spiga: lunghezza	Molto corta, <15 cm Corta, 15-28 cm Media, 19-21 cm Lunga, 22-24 cm Molto lunga, >24 cm
(28) Spiga: diametro (a metà lunghezza)	Molto sottile, <35 mm Sottile, 35-40 mm Medio, 41-45 mm Grosso, 46-50 mm Molto grosso, >50 mm

(29) Spiga: forma	Conica Cilindrico-conica Cilindrica
(30) Spiga: numero di file di grani	Molti pochi, 8-10 Pochi, 10-12 Medi, 14-16 Molti, 18 Moltissimi, >20
(35) Spiga: tipo di cariosside	Vitreo Semi vitreo Intermedio Semi dentato Dentato Dolce Pop Ceroso Farinoso
(37) Spiga: colore della corona della cariosside	Bianco Bianco-giallastro Giallo Giallo-arancio Arancio Rosso-arancio Rosso Rosso scuro Brunastro Blu-nero
(40) spiga: colorazione antocianica delle glume del tutolo	Assente o molto lieve Lieve Media Forte Molto forte

La descrizione dei caratteri indicati nella prima colonna tra parentesi è raccomandata dal Gruppo di lavoro Biodiversità Agricola. Per la corretta compilazione sono anche riportate le varietà di riferimento per il confronto e lo stadio di sviluppo in cui effettuare i rilievi.

Oltre a questa scheda sono stati anche presi i dati relativi all'altezza totale della pianta, presa dalla base all'apice delle ramificazioni superiori dell'infiorescenza maschile, all'altezza di inserzione della spiga più alta, al peso della granella per unità di spiga, al peso dei cento semi e alle dimensioni di lunghezza e diametro del tutolo privo di semi. Nello specifico, in data 11/07/2019 sono state prese le misure di altezza totale e altezza della spiga per il campo di Landriano, mentre per quanto riguarda le misure prese nei campi di Clusone e comuni limitrofi, sono state prese in corrispondenza dei giorni in cui sono state completate le fecondazioni, e quindi il 26/07/2019 sono state prese le misure delle 50 piante del campo "FIO" e 35 del campo "PIA"; il 05/08/2019 le rimanenti 15 misure sul campo "PIA", 50 misure del campo "OGN" e 50 misure del campo "BRI"; il 12/08/2019 sono state fatte le ultime 50 misure sulle piante del campo "CER". Tutte queste misure sono state prese con l'ausilio di un metro srotolabile. Per quanto riguarda i dati relativi alla spiga, le misure sono state fatte in data 21/10/2019, a seguito della raccolta, avvenuta il 24/09/2019 e dell'essiccazione della granella, che è stata fatta in facoltà con l'ausilio di un ventilatore e di un riscaldatore d'aria, in quanto l'essiccatoio di Landriano è risultato non funzionante. Nello specifico i dati sul peso della spiga, del tutolo e della granella sono stati presi con l'uso di una bilancia con risoluzione di 1 g; i dati relativi alla lunghezza del tutolo ed al suo diametro sono stati presi con un calibro e il numero di semi per spiga è stato acquisito grazie ad una macchina contasemi.

I dati sono stati poi analizzati con l'ausilio del software statistico SPSS, con il quale è stata verificata l'applicabilità del test relativo al calcolo dell'ANOVA, e del test post-hoc di Tukey, al fine di osservare le differenze tra i campi.

3.4. Attività di breeding

Le attività di impollinazione, fondamentali per mantenere il seme puro, nel caso in cui vi siano altre coltivazioni di mais nelle vicinanze dei campi sperimentali, sono state svolte nelle prime due settimane di luglio per quanto riguarda le coltivazioni a Landriano; i campi nel territorio bergamasco sono stati invece impollinati in date differenti: il 26 luglio 2019 sono state effettuate 50 autofecondazioni per il campo “FIO” e 35 per il campo “PIA”, nonostante le piante fossero allettate per la tempesta; il 5 agosto 2019 il campo “PIA” è stato completato, con 15 ulteriori impollinazioni, così come il campo “OGN” e il campo “BRI”, con 50 coperture ciascuno; l’ultimo campo fecondato è stato quello in località Cerete, in data 12 agosto 2019.

In totale sono state eseguite 250 autofecondazioni, in modo tale da poter osservare la variabilità all’interno della popolazione di mais e da mantenere il seme in purezza. I semi così ottenuti, infatti, saranno quelli coltivati nel corso della stagione produttiva 2020, dai quali emergeranno eventuali impurezze genetiche a livello fenotipico, che potranno essere scartate.

Nello specifico, l’attività pratica richiede la preventiva copertura dell’infiorescenza femminile con appositi sacchetti in carta, trattati con sostanze idrorepellenti, prima dell’emissione delle setole, in modo tale da prevenire l’impollinazione libera, come si può notare in Figura 3.1.



Figura 3.1 Particolare della copertura dell’infiorescenza femminile

La copertura in pieno campo è stata fatta la settimana prima dell'impollinazione per tutti i cinque campi sperimentali, mentre a Landriano è stata eseguita man mano che le spighe erano in fase di maturazione. Una volta che la spiga ha emesso le sete, si procede con la raccolta del polline che, nel caso dei campi di Clusone e limitrofi, è stata fatta prendendolo dalla stessa pianta che poi sarà il portaseme (autofecondazione), mentre a Landriano sono state effettuate sia autofecondazioni, sia fecondazioni di tipo "sib", ovvero sia il polline di una seconda pianta è stato raccolto e posto sulle sete del portaseme, sia di tipo "sib-pool" e quindi con la raccolta del polline da più piante della stessa varietà e codice e con il successivo posizionamento sulle sete di una o più piante "sorelle".

Terminata questa fase, la fecondazione è in atto e si procede con la copertura della spiga, già coperta dall'isolatore femminile, con un secondo sacchetto in carta trattata, che viene affrancato alla pianta con due punti di punzonatrice da ufficio e su cui viene posto il codice di identificazione della pianta, il tipo di fecondazione e la data di fecondazione (Figura 3.2).



Figura 3.2 Particolare dell'isolatore maschile

3.5. Analisi genetiche

Al fine di eseguire l'analisi genetica, sono stati anzitutto raccolti 20 campioni di materiale vegetale, provenienti dal campo di Landriano. 10 campioni sono stati prelevati dalla fila "R5733" e altrettanti dalla fila "R5574". La porzione di pianta prelevata corrisponde alla parte distale di una foglia. Gli individui da cui è stata prelevato il materiale sono stati marcati mediante numerazione (da 1 a 10 per la fila "R5733" e da 11 a 20 per la fila "R5574") con pennarello indelebile sul fusto. I campioni sono quindi stati avvolti in carta stagnola su cui è stato riportato il codice della fila di mais ed il numero marcato sulla pianta e posti in ghiaccio per il trasporto. Una volta in laboratorio, tutti i campioni sono stati stoccati in freezer per le successive analisi.

I campioni di tessuto vegetale sono stati poi scongelati il giorno delle analisi e selezionati in modo tale da poter operare un confronto statistico. Sono stati scelti i campioni dal numero 1 al numero 8 per il codice "R5733" e dall'11 al 18 per "R5574".

Per ottenere un'estrazione omogenea di DNA sono state prelevate 4 porzioni del diametro di 9mm da ogni campione, in modo tale da ottenere circa 20-40 mg di tessuto, che sono state poi riposte in eppendorf da 1.5 mL siglate con codice del mais e numero di campione.

Il protocollo seguito per l'estrazione è il seguente:

1. Posizionare 20-40 mg di tessuto in eppendorf da 1.5 mL. Aggiungere 300 mL di buffer di estrazione ("FOWLER"), composto da NaCl 2M, Tris-HCl 200 mM a pH 8.0, EDTA 70 mM a pH 8.0, metabisolfito di sodio 20mM e 100 μ L di SLS 5%.
2. Triturare la soluzione mediante l'utilizzo di un pestello in plastica per circa 1'.
3. Incubare a 60°C in un bagnetto di acqua o eventualmente in stufa per un tempo variabile da un minimo di 30' ad un massimo di 180'.
4. Centrifugare le soluzioni per 15' a 13000 giri/minuto a temperatura ambiente (o a 4°C) e trasferire 150 μ L di surnatante in tubi siglati da 0.7 mL, evitando di smuovere il pellet solido.

5. Aggiungere 150 μL di ammonio acetato, 300 μL di isopropanolo e agitare delicatamente capovolgendo la provetta.
6. Centrifugare a 13000 RPM per 15' a temperatura ambiente.
7. Eliminare il surnatante ed asciugare all'aria per 15'.
8. Aggiungere ad ogni campione 30 μL di TE e 1 μL di RNAsi.
9. Incubare a 37°C per 15'.
10. Stoccare i campioni siglati ("DNA Luca Casarico 2019") a -20°C.

I campioni così ottenuti sono stati poi scongelati per effettuare le amplificazioni di DNA con 8 marcatori molecolari. È stato quindi preparato un mix di reazione per ogni marcatore, con un volume finale tale da poter coprire tutti i campioni più un controllo negativo, per un volume finale di 425 μL (25 μL per campione). La miscela comprende (le quantità indicate sono per campione):

- Buffer 5x, (5 μL);
- MgCl_2 (2.5 μL);
- Primer (0.5 μL + 0.5 μL): sono gli 8 primer forward e 8 primer reverse delle sequenze prese in considerazione;
- Mix di nucleotidi o dNTP (0.5 μL);
- TAQ polimerasi (0.125 μL);
- Acqua MilliQ.

Il mix di reazione è stato aliquotato nei singoli tubini da PCR, per un volume finale di 23.5 μL , a cui sono stati aggiunti 1.5 μL di DNA.

I primer utilizzati sono riportati di seguito:

1. **p-phi323152 - CCG (SSR) 10.05**

SSR noto anche con i nomi p-phi323152 e phi323152

Sequenza ripetuta: CCG

Primers:

- I. phi323152 forward, left end: TCAGGGAGCTCACCTACTACGG
- II. phi323152 reverse, right end: CACGACTGCACCGATTAGC

Temperatura di melting del primer forward: 70°C

Temperatura di melting del primer reverse: 60°C

Temperatura di melting media: 65°C

2. **p-ZAG105 (SSR) 5.02**

SSR noto anche con i nomi ZAG105, bnlgl105, bngl105, p-bnlgl105 e p-bngl105

Primers:

I. ZAG105 forward, left end: GACCGCCCGGGACTGTAAGT

II. ZAG105 reverse, right end: AGAAAGAAGGTGACGCGCTTTTC

Temperatura di melting del primer forward: 66 °C

Temperatura di melting del primer reverse: 68 °C

Temperatura di melting media: 67 °C

3. **p-nc009 - AG (SSR) 6.04**

SSR noto anche con i nomi p-nc009 e nc009

Sequenza ripetuta: AG

Primers:

I. nc009 forward, left end: CGAAAGTCGATCGAGAGACC

II. nc009 reverse, right end: CCTCTCTTCACCCCTTCCTT

Temperatura di melting del primer forward: 62 °C

Temperatura di melting del primer reverse: 62 °C

Temperatura di melting media: 62 °C

4. **p-bnlgl1028 - (AG)12 (SSR) 10.06**

SSR noto anche con i nomi p-bnlgl1028, bnlgl1028, bmc1028, A4423C08 e A4423C09

Sequenza ripetuta: AG (12 volte)

Primers:

I. bnlgl1028 forward, left end: AGAAACGAACACAGCAGCT

II. bnlgl1028 reverse, right end: TGCATAGACAAAACCGACGT

Temperatura di melting del primer forward: 56 °C

Temperatura di melting del primer reverse: 58 °C

Temperatura di melting media: 57 °C

5. **p-umc1185 - (GC)8 (SSR) 2.03**

SSR noto anche con i nomi p-umc1185 e umc1185

Sequenza ripetuta: GC (8 volte)

Primers:

I. umc1185 forward, left end: AGTAAAAGAGGCAAGGACTACGGC

II. umc1185 reverse, right end: GCGGCGATATATACGAGGTTGT

Temperatura di melting del primer forward: 63.2°C

Temperatura di melting del primer reverse: 62.3°C

Temperatura di melting media: 62.7°C

6. **p-bnl594 (SSR) 10.06**

SSR noto anche con i nomi p-bnl594, p-bngl594, bnl594, bngl594 e ZAG594

Primers:

I. bnl594 forward, left end: CGACGCGCTTTGCGAGTACCAGTACACA

II. bnl594 reverse, right end: CTGCGTGCGTCCAGCCTCCACT

Temperatura di melting del primer forward: 88°C

Temperatura di melting del primer reverse: 74°C

Temperatura di melting media: 70°C

7. **p-phi095 - AG (SSR) 1.03**

SSR noto anche con i nomi p-phi095 e phi095

Sequenza ripetuta: AG

Primers:

I. phi095 forward, left end: CCGATCGGCTTTATCACTGTTTAGC

II. phi095 reverse, right end: ATGCACCATTCTAGCACTATAGCAACACT

Temperatura di melting del primer forward: 74°C

Temperatura di melting del primer reverse: 82°C

Temperatura di melting media: 70°C

8. **p-umc1506 - (ACA)4 (SSR) 10.05**

SSR noto anche con i nomi p-umc1506 e umc1506

Sequenza ripetuta: ACA (4 volte)

Primers:

I. umc1506 forward, left end: AAAAGAAACATGTTTCAGTCGAGCG

II. umc1506 reverse, right end: ATAAAGGTTGGCAAACGTAGCCT

Temperatura di melting del primer forward: 63.9°C

Temperatura di melting del primer reverse: 63.2°C

Temperatura di melting media: 63.5°C

I tubini da PCR sono stati quindi posti nei termociclatori presenti nel laboratorio, che possono essere programmati manualmente. La prima fase dei ogni ciclo prevede il raggiungimento ed il mantenimento di una temperatura di 94°C per un tempo di 2', in modo tale da denaturare la doppia elica di DNA. Il secondo passo (che sarà poi il primo per i cicli successivi) mantiene la temperatura a 94°C per 1'. Si ha quindi la fase di melting, che prevede temperature diverse per ogni primer; le temperature impostate sono quelle medie, indicate nella descrizione dei microsatelliti; il tempo di mantenimento è ancora di 1'. Il quarto stadio è necessario per l'azione della TAQ polimerasi e si svolge in 1' a 72°C. Le fasi dalla seconda alla quarta vengono poi ripetute 35 volte, in modo da ottenere un quantitativo di repliche delle porzioni di DNA cercate sufficiente per essere visibile nel gel di agarosio. L'ultimo stadio dell'amplificazione prevede il mantenimento dei 72°C per 5'; questa è la cosiddetta fase di "proof reading" o "correzione degli errori", in cui vengono corretti gli eventuali errori di trascrizione. Questa fase è relativamente breve in quanto non è necessario che il DNA sia perfettamente corretto, poiché non sono in atto attività di clonaggio o sequenziamento.

Gli amplificati sono stati stoccati a -20°C per la successiva corsa elettroforetica. Per questa ultima fase sono stati preparati 4 gel di agarosio al 4%, composti da 4g di agarosio e 100 mL di TBE 1x, già addizionato di etidio bromuro (25 µL/L) ciascuno. I gel sono stati costruiti in modo tale a contenere 2 file ciascuno, con 16 pozzetti per fila. Lo schema di caricamento è riportato di seguito (Tabella 3.2):

Tabella 3.2 Schema di caricamento per elettroforesi

M	1	2	3	4	5	7	8	11	12	13	14	15	16	17	18
---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----

Il primo pozzetto è occupato dal marcatore (M - 100 bp), che è stato messo in quantità di 5 µL in modo da conoscere il numero di basi corrispondente alla banda, mentre nei pozzetti dei campioni sono stati inseriti 20 µL di templat. Dopo il caricamento, i campioni sono stati fatti correre per 15' a 100V e per 45' a 80V e sono stati osservati con una lampada ad ultravioletto. Siccome alcune bande non erano perfettamente separate, tutti i gel sono stati

riposizionati nei bagnetti elettroforetici per ulteriori 45' a 80V, in modo tale da far completare la corsa a tutte le bande. Di ogni gel sono state quindi prese le fotografie all'ultravioletto per le successive analisi.

La caratterizzazione della popolazione di mais "VA33" delle "Fiorine" è stata quindi effettuata grazie al confronto con altre 6 varietà di mais e tre linee produttive, di seguito riportate: Spinato Nero di Esine, Millo Corvo, Chiavenna, Spianto di Gandino, Ottofile e Ottofile Rosso per quanto riguarda le varietà locali e B73, Mo17 e l'ibrido B73/Mo17 per quanto riguarda le linee produttive.

Lo studio della diversità genetica è stato fatto mediante l'utilizzo del software GenAEx (Genetic Analysis in Excel) v. 6.2, a seguito della realizzazione di una tabella Excel che tiene conto delle osservazioni fatte dall'analisi delle immagini delle PCR. Il software utilizza queste matrici di dati e calcola la distanza genetica in base a diversi parametri qui riportati:

- Numero di loci (o marcatori) analizzati (in questo caso sono stati 8);
- Numero di individui analizzati (in questo caso 105);
- Numero di popolazioni analizzate (sono le 10 popolazioni di mais);
- Numero di piante (o individui) per ogni singola popolazione;
- Dati relativi agli alleli per ogni singolo individuo e popolazione, derivati dall'analisi delle PCR.

Il programma restituisce un output relativo alla distanza genetica di Nei (NeiP), alla frequenza allelica (AGL) e un grafico che rappresenta graficamente la distanza genetica delle popolazioni di mais.

4. RISULTATI

4.1. Allestimento campi

Il campo di Landriano, con riferimento specifico alle due file dove è stato coltivato il mais delle Fiorine ha avuto la seguente “storia”: la germinazione non è stata ottimale e sono presenti circa 100 piante, considerando entrambe le file. Inoltre, a causa della rottura dell’impianto di irrigazione e della sua mancata riparazione, è stato necessario bagnare manualmente il campo adoperando una manichetta da pompieri, visibile in Figura 4.1, e una pompa che pescava acqua direttamente dal canale. Ovviamente l’efficienza di questa metodologia è inferiore rispetto ad un impianto classico e tutte le piante di mais hanno sofferto l’annata siccitosa. Infine, a seguito di una forte tromba d’aria avvenuta a fine agosto, il campo è stato fortemente danneggiato, compromettendone in parte la raccolta. Quest’ultima ha infatti restituito una sola spiga per la fila R5574 e 10 spighe per la fila R5733, un quantitativo comunque sufficiente per effettuare delle analisi statistiche sui parametri agronomici citati nel capitolo 3.3.



Figura 4.1 Campo sperimentale di Landriano

I campi sperimentali a Clusone hanno avuto le seguenti conduzioni:

Campo Fiorine: la semina è avvenuta il 23 maggio 2019, con l’ausilio di una seminatrice meccanica che è risultata contaminata con semi di un altro mais; il grado di contaminazione è stimato al 2% e per questo motivo il campo è sotto stretta osservazione ed i dati e le sementi di questo campo in particolare potrebbero essere scartati. Fortunatamente il mais “alieno” ha avuto una fioritura anticipata rispetto al resto del campo ed è stato facile eliminare le infiorescenze maschili prima dell’emissione delle setole del VA 33.

Il campo ha seguito la classica conduzione riservata al mais e ha ricevuto anche un intervento di diserbo selettivo. Ciò nonostante le malerbe sono riuscite a germinare e la raccolta è risultata difficoltosa a causa della massiccia presenza di *Chenopodium album*, che ha raggiunto il mais in altezza; Inoltre, un forte temporale in data 26 luglio 2019 ha allettato molte piante, rendendo difficoltose le attività sperimentali di fecondazione.



Figura 4.2 Campo sperimentale "FIO"

Campo Piario: la semina è stata eseguita con seminatrice manuale il 29 maggio 2019 e anche in questo caso sono state seguite tutte le pratiche agronomiche dedicate alla coltivazione del mais, ma manualmente, data la piccolezza del campo. Il temporale del 26 luglio ha allettato molte piante, che si sono successivamente rialzate non senza riportare alcuni danni, soprattutto all'apparato maschile. Essendo recintato e all'interno di un contesto abitativo, non si hanno avuti problemi di animali selvatici; inoltre, grazie alla lontananza con tutti i campi di mais limitrofi, posti al di fuori del centro urbano, il mais non ha subito contaminazioni esterne e le autofecondazioni sono state eseguite con l'obiettivo di andare a verificare l'effettiva purezza del seme ed eliminare a livello fenotipico le eventuali contaminazioni.



Figura 4.3 Campo sperimentale "PIA"

Campo Villa d'Ogna: la semina è stata il primo di giugno 2019; questa parcella non ha subito danni dalle tempeste, in quanto situata in un'area riparata dai venti dominanti e protetta da filati alberati e da case su ogni lato. Il campo fa parte di un'area recintata dedicata all'istruzione dei bambini con lezioni all'aperto di agricoltura tradizionale impartite dall'associazione Grani Asta del Serio, in collaborazione con la scuola dell'infanzia. Adiacente a questo campo è stata avviata una coltivazione sperimentale di patate locali, seminate nella paglia.



Figura 4.4 Campo sperimentale "OGN"

Campo Bricconi: il campo è stato seminato il 2 giugno 2019 ed è stato recintato con rete in nylon simile a quella utilizzata per le pecore, senza elettrificazione, per proteggere il raccolto dagli ungulati che avrebbero potuto razzarlo. La parcella si trova infatti in una zona di alpeggio, con numerosi boschi nelle vicinanze e con evidenti tracce di cinghiali e cervi. Il sistema di difesa ha funzionato egregiamente. Alla data della raccolta, nonostante fossero passati 50 giorni dalla fecondazione, il mais di questa località è risultato il più tardivo in quanto a fase di maturazione; questo potrebbe essere dovuto al fatto che, trovandosi in ambiente montano, la pianta necessita più tempo per raggiungere la maturazione, a causa delle condizioni climatiche più stringenti.



Figura 4.5 Campo sperimentale "BRI"

Campo Cerete: la semina è avvenuta il 21 giugno 2019 e anche questa parcella non ha subito danni da tempesta, grazie proprio alla semina tardiva; inoltre, in questo modo, è stato possibile eliminare la maggior parte delle malerbe e il mais ha presto raggiunto lo stadio di sviluppo degli altri coltivi. Le operazioni di fecondazione sono state svolte sulle file rivolte a sud, che risultavano essere le più sviluppate e questo ha garantito la loro “sopravvivenza” a seguito di un massiccio attacco da parte di cinghiali e cervi che, incuranti del filo elettrificato, hanno invaso e distrutto quasi completamente il campo, risparmiando proprio le prime file scelte. Il mais è stato quindi raccolto allo scadere dei 40 giorni necessari al germoplasma perché si formi e sia fecondo per evitare ulteriori danni e perdita di semente preziosa.



Figura 4.6 Campo sperimentale "CER"

La raccolta del mais è stata eseguita il 24 Settembre 2019, 43 giorni dopo l'impollinazione del campo di Cerete Basso, l'ultimo ad essere stato seminato e fecondato; in questo modo, tutte le spighe raccolte posseggono semi fertili e puri, che potranno essere utilizzati come semente l'anno successivo (Figura 4.7).

4.2. Caratteristiche fenotipiche del mais delle Fiorine

La particolarità del mais VA33 risiede nella spiga, di forma conica e piccola (Figura 4.7), con disposizione dei semi su 16 ranghi. Il colore della corona risulta essere arancione, la granella è di tipo vitreo, con tutolo bianco e la farina che ne deriva è di ottima qualità per la produzione di polenta.

Tra le spighe raccolte nei campi della Val Seriana sono stati trovati degli “intrusi” che sono stati immediatamente scartati, in quanto non presentavano le tipiche caratteristiche del “VA33”.



Figura 4.7 Il mais alla raccolta

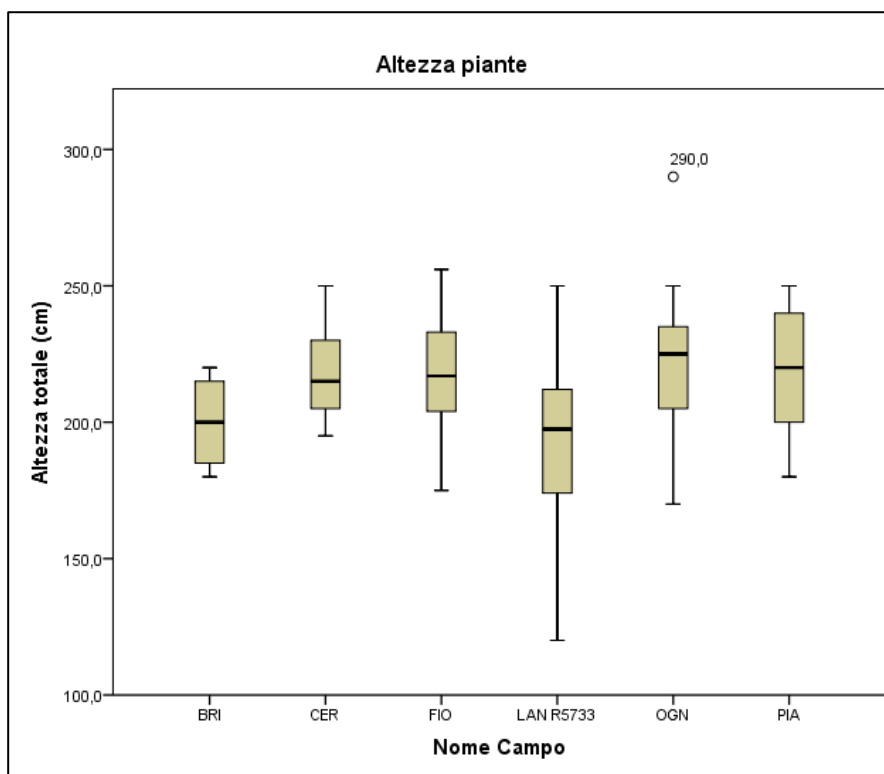
Tabella 4.1 Media e deviazione standard dei parametri agronomici rilevati

	LAN R5733	FIO	PIA	OGN	BRI	CER
Altezza pianta (cm)	193,3 ± 30,7	216,3 ± 18,9	218,58 ± 21,2	220,8 ± 21,1	200,6 ± 13,6	218,34 ± 15,8
Altezza spiga (cm)	83,5 ± 17,3	87,28 ± 13,2	99,8 ± 15,7	98,74 ± 75	85,7 ± 8,4	95,76 ± 10,7
Lunghezza tutolo (cm)	11,75 ± 1,4	13,56 ± 2,4	11,9 ± 2,6	10,2 ± 2,2	11,58 ± 1,7	11,22 ± 0,8
Diametro tutolo (cm)	2,74 ± 0,3	2,96 ± 0,08	2,98 ± 0,1	2,76 ± 0,28	2,8 ± 0,15	2,7 ± 0,1
Peso spiga (g)	87,2 ± 25	135,6 ± 31	139 ± 40,7	104,2 ± 29,3	124,4 ± 33	107,4 ± 12
Peso tutolo (g)	17,2 ± 9,1	22 ± 7,3	30,4 ± 9,4	19,2 ± 6,5	22,8 ± 5,6	20,6 ± 4
Numero di semi per spiga	327 ± 87	432 ± 100	365 ± 116	272 ± 56	373 ± 57	370 ± 94
Peso 100 semi (g)	21,7 ± 5,2	26,5 ± 2,8	29,9 ± 2,3	31,2 ± 5,2	26,9 ± 3,8	24 ± 4

La caratterizzazione fenotipica della popolazione di mais delle Fiorine è avvenuta in pieno campo ed in laboratorio, con la rilevazione dei seguenti dati: altezza delle piante, altezza della prima spiga, lunghezza e diametro della spiga, diametro e colore del tutolo, forma della spiga, numero di ranghi, tipologia e colore della granella e peso dei semi. In Tabella 4.1 sono riportati alcuni dati sopra citati, mentre i restanti sono presenti nella scheda descrittiva morfologica.

Si osserva subito che la scheda in Figura 2.12 riporta dei valori molto dissimili per quanto riguarda l'altezza della pianta e della spiga, che risultano essere di circa 40 cm maggiori per quanto riguarda l'altezza della pianta e di 5-10 cm maggiore per l'altezza della spiga. Analizzando gli altri parametri, il diametri del tutolo, misurato a metà lunghezza, risulta essere in linea con i rilievi fatti precedentemente, e anche per quanto riguarda il peso del seme, si ha una variabilità accettabile, come verrà mostrato in seguito dai test statistici. Infine, per quanto riguarda il numero di semi per spiga, si ha una grande variabilità, dovuta al fatto che le spighe variano da 8,1 cm a 15,4 cm in termini di lunghezza e questo incide sulla quantità di semi presenti sul tutolo.

Tabella 4.2 Box-plot altezza piante



Per quanto riguarda l'altezza delle piante, si osserva come la più grande variabilità tra le osservazioni si trovi nel campo di Landriano; il software SPSS restituisce infatti i dati come box-plot, dove la linea in mezzo al rettangolo colorato rappresenta la mediana dei dati, i due estremi del rettangolo sono il primo ed il terzo quartile, mentre i "baffi" rappresentano il minimo ed il massimo dei dati, senza considerare i valori "outlier". I dati relativi ai campi "CER", "FIO", "OGN" e "PIA", sembrano avere la mediana delle misurazioni in linea tra di loro, mentre i campi "BRI" e "LAN R5733" sono inferiori. Dalla Tabella 4.3 si osserva infatti come il test di Tukey suddivida le popolazioni di mais in due sottoinsiemi distinti, raggruppando i campi di Landriano e della contrada Bricconi e dividendoli dagli altri campi. L'unico dato considerato come "outlier" è presente nel campo di Villa d'Ogna. Il software suddivide gli outlier in due categorie: i dati rappresentati con un cerchi sono quelli che hanno un valore compreso tra una volta e mezza e tre volte la distanza interquartile, mentre considera "outlier estremi" i dati che superano di tre volte la distanza interquartile.

Il minimo e il massimo dei due sottoinsiemi sono: 120 cm e 250 cm per il sottoinsieme Landriano-Bricconi e 170 cm e 290 cm per il sottogruppo contenente gli altri quattro campi.

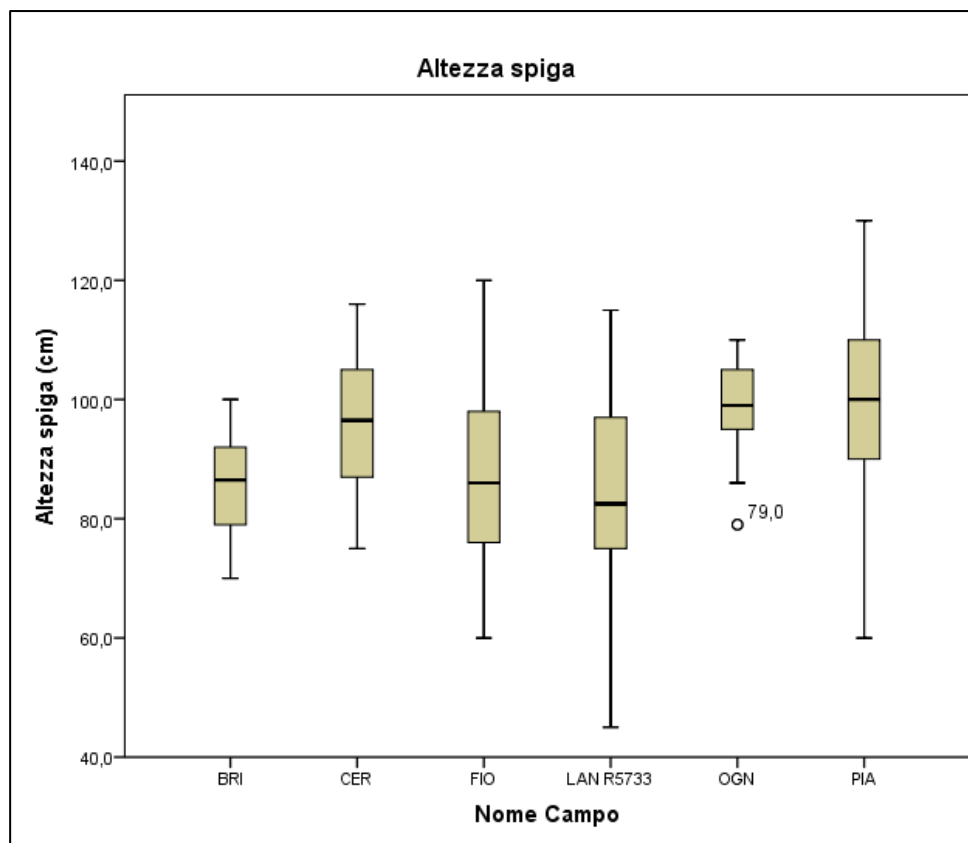
Tabella 4.3 Test statistici altezza piante

Altezza totale			
Tukey HSD ^{a,b,c}			
Nome Campo	N	Subset	
		1	2
LAN R5733	18	193,333	
BRI	50	200,600	
FIO	50		216,300
CER	50		218,340
PIA	50		218,580
OGN	50		220,800
Sig.		,572	,912

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 377,740.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 38,571.
b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
c. Alpha = ,05.

Andando ad osservare l'altezza delle spighe, si ritrova la situazione precedente, ovvero il software rileva la maggiore variabilità all'interno del campo di Landriano e, in generale, in tutti i campi i baffi sono maggiori come lunghezza; tuttavia, in questo caso, il campo delle Fiorine sembra avere una mediana in linea con i campi di Landriano e dei Bricconi.

Tabella 4.4 Box-plot altezza spiga



Osservando il test di Tukey si nota infatti come i campi vengano suddivisi in due gruppi distinti, riunendo i campi di Cerete Basso, Villa d'Ogna e Piario. L'unico dato outlier è presente ancora nel campo "OGN" e, pur essendo al livello dei primi quartili dei campi aventi la mediana dell'altezza della spiga più bassa, è considerato diverso dal software. I valori minimi e massimi, in questo caso, sono stati: 45 cm e 120 cm per il primo sottogruppo e 60 cm e 130 cm per il secondo.

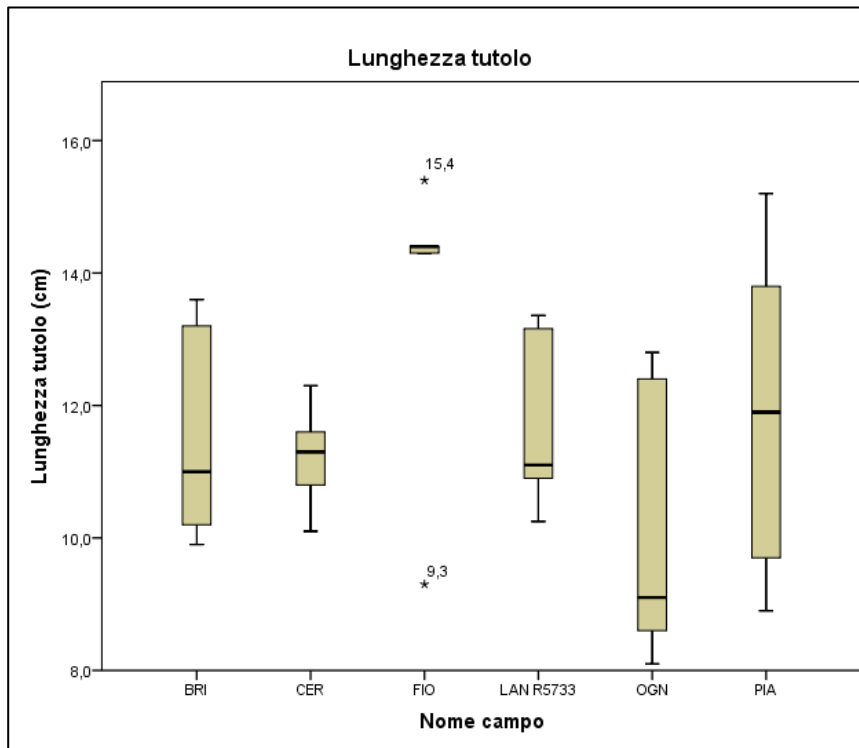
Tabella 4.5 Test statistici altezza spiga

Altezza spiga			
Tukey HSD ^{a,b,c}			
Nome Campo	N	Subset	
		1	2
LAN R5733	18	83,500	
BRI	50	85,700	
FIO	50	87,280	
CER	50		95,760
OGN	50		98,740
PIA	50		99,800
Sig.		,740	,682

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 Based on observed means.
 The error term is Mean Square(Error) = 145,045.
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 38,571.
 b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.
 c. Alpha = ,05.

Analizzando la lunghezza del tutolo, molto ha influito la scelta delle spighe. Andando a sceglierle in modo casuale, infatti, il grafico a scatola e baffi risulta essere di scarso aiuto nell'identificare le differenze tra le varie popolazioni.

Tabella 4.6 Box-plot Lunghezza tutolo



Osservando invece i test statistici si capisce chiaramente come non vi sia alcuna differenza statisticamente significativa tra le misurazioni fatte sui diversi tutoli, che, pur avendo un'elevata variabilità (si va dagli 8,1cm ai 15,4 cm tra tutti i campioni presi in analisi) sono considerati nello stesso sottoinsieme.

Tabella 4.7 Test statistici lunghezza tutolo

Lunghezza tutolo (cm)		
Tukey HSD ^{a,b}		
Nome campo	N	Subset
		1
OGN	5	10,2000
CER	5	11,2200
BRI	5	11,5800
LAN R5733	5	11,7540
PIA	5	11,9000
FIO	5	13,5600
Sig.		,116

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 3,921.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.
b. Alpha = ,05.

Se si osserva la Tabella 4.8 sembrerebbe di notare una considerevole variabilità, che suddividerebbe i campioni in due sottoinsiemi: uno contenente i campi di Piario e delle Fiorine ed uno contenente i restanti campi; ciò nonostante, dai test statistici si evince come queste considerazioni preliminari siano erronee, in quanto non viene rilevata alcuna differenza statistica significativa tra i vari campioni analizzati. I valori massimi e minimi sono 2.2 cm e 3.2 cm; quest'ultimo dato, tuttavia dovrebbe essere scartato, in quanto outlier. In questo caso, infatti, si ritrovano 4 valori outlier, due dei quali, uno nel campo di Landriano, uno nel campo di Piario, considerati dal software come outlier "medi" e i restanti due, entrambi rilevati nel campo di Villa d'Ogna, considerati come outlier "estremi" e quindi scartabili.

Tabella 4.8 Box-plot diametro del tutolo

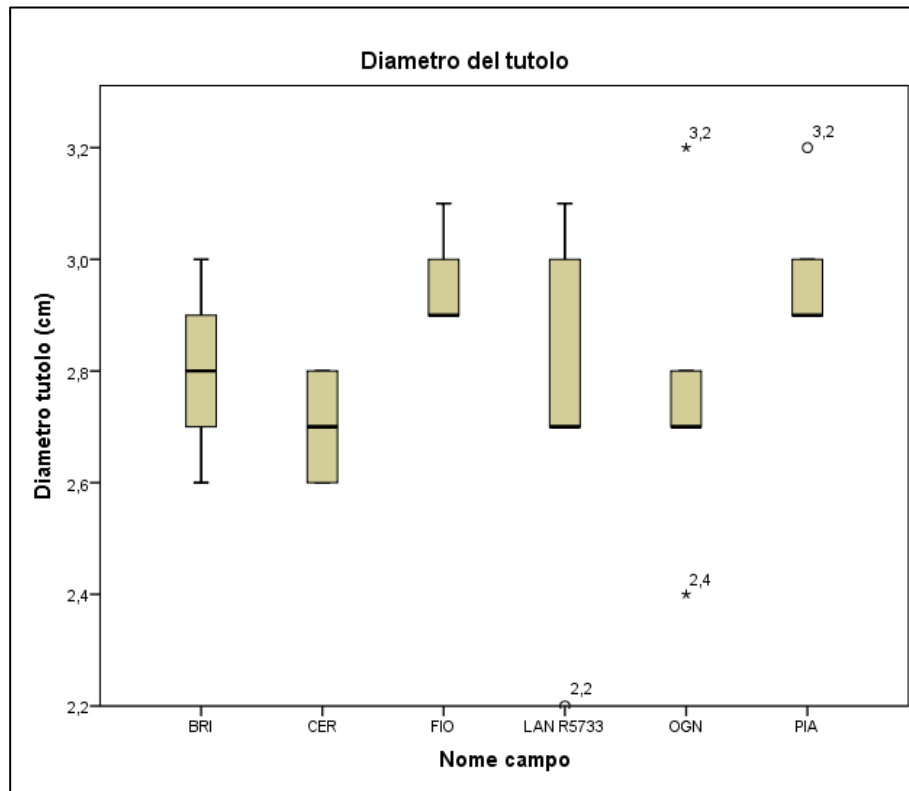


Tabella 4.9 Test statistici diametro del tutolo

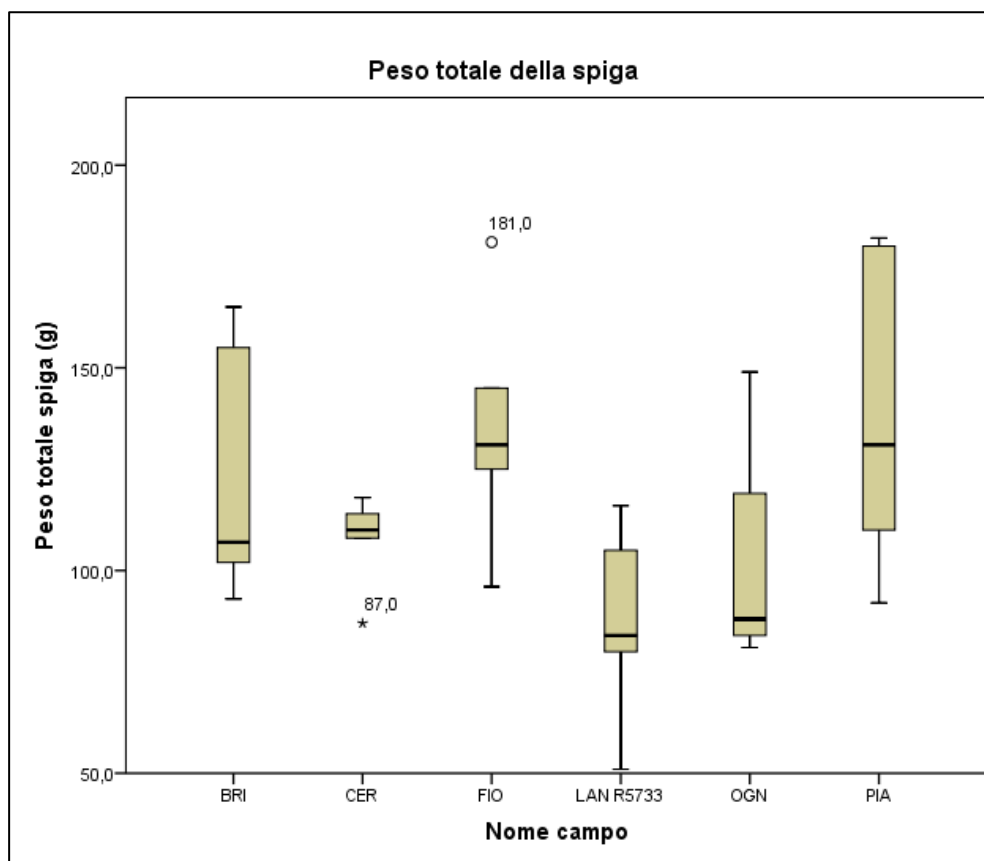
Diametro tutolo (cm)		
Tukey HSD ^{a,b}		
Nome campo	N	Subset
		1
CER	5	2,700
LAN R5733	5	2,740
OGN	5	2,760
BRI	5	2,800
FIO	5	2,960
PIA	5	2,980
Sig.		,319

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = ,044.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.
b. Alpha = ,05.

Studiando il peso della spiga, che varia tra i 51 g ed i 182 g, il fattore che maggiormente influisce è certamente il peso ed il numero di semi. Questo dato va infatti considerato assieme ai dati relativi al peso del tutolo ed al peso e numero dei semi, che potrebbero far variare di molto i dati relativi al peso della spiga “bulk”.

Tabella 4.10 Box-plot peso della spiga



Dai test statistici sul peso della spiga, non risultano esserci particolari differenze statistiche tra le popolazioni, nonostante l’elevata variabilità dei dati. Solamente due valori sono considerati outlier, nonostante rientrino nel range del sottoinsieme omogeneo.

Tabella 4.11 Test statistici peso della spiga

Peso totale spiga (g)		
Tukey HSD ^{a,b}		
Nome campo	N	Subset
		1
LAN R5733	5	87,200
OGN	5	104,200
CER	5	107,400
BRI	5	124,400
FIO	5	135,600
PIA	5	139,000
Sig.		,103

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 891,800.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.
b. Alpha = ,05.

Osservando i dati relativi al peso del tutolo, si ritrova un ampio range di peso che va da 11 g a 44 g. i tutoli più leggeri sembrano provenire dal campo di Landriano, mentre si ritrova una sostanziale omogeneità nei campi dei comuni della val Seriana. L'unica eccezione è il campo di Piario, che spazia dai 19 g ai 44 g.

Analizzando i test statistici in Tabella 4.13, il software restituisce un risultato che racchiude tutti i campi sotto un'unica categoria, seppur con un'alfa di 0.08 e quindi al limite dell'accettabilità. Molto probabilmente è proprio il campo di Piario che "abbassa" la significatività di così tanto.

Tabella 4.12 Box-plot peso del tutolo

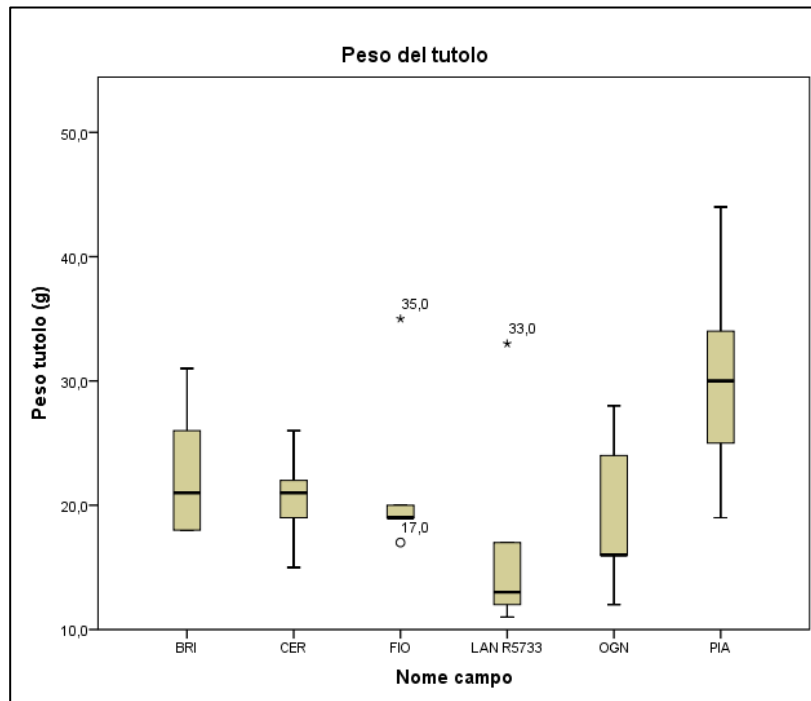


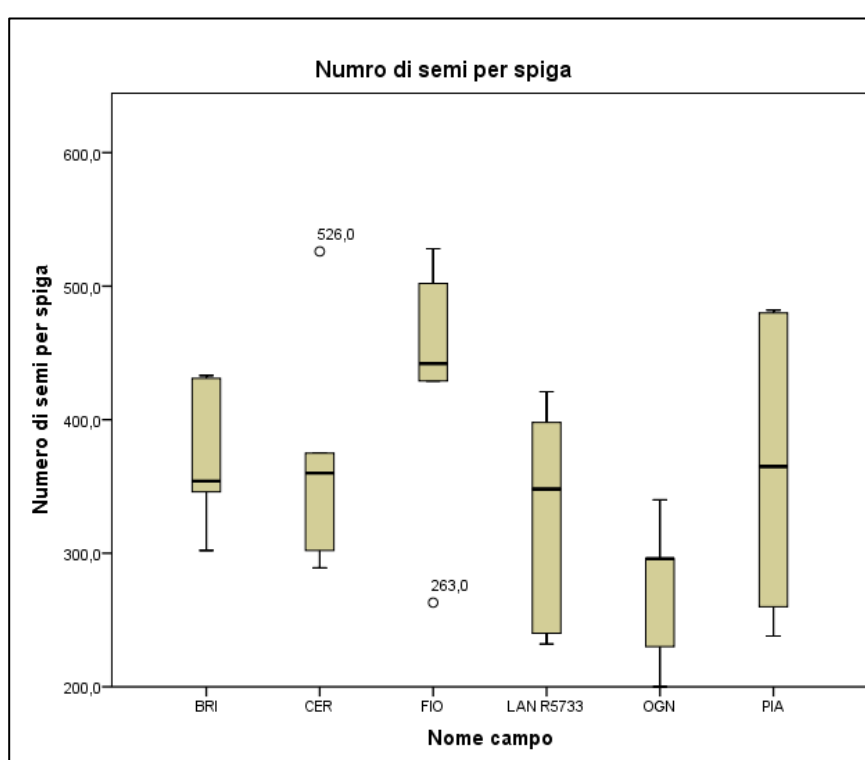
Tabella 4.13 Test statistici peso del tutolo

Peso tutolo (g)		
Tukey HSD ^{a,b}		
Nome campo	N	Subset
		1
LAN R5733	5	17,200
OGN	5	19,200
CER	5	20,600
FIO	5	22,000
BRI	5	22,800
PIA	5	30,400
Sig.		,080

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 52,950.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.
b. Alpha = ,05.

Per quanto riguarda il numero di semi per spiga, esso dipende molto dal parametro relativo alla lunghezza della spiga. Avendo 16 ranghi, infatti, il diametro del tutolo non dovrebbe essere un parametro che incide su questo valore. Andando il grafico a box-plot, si nota una generale tendenza che si aggira attorno ai 370 semi per spiga in media. Solo i campi delle Fiorine e di Villa d'Ogna hanno le medie che si discostano dalla tendenza generale, il primo in positivo ed il secondo in negativo. Il range di variabilità va da un minimo di 200 semi per spiga ad un massimo di 528 semi per spiga.

Tabella 4.14 Box-plot numero di semi per spiga



Nonostante siano state selezionate casualmente spighe di lunghezza molto variabile, anche i test statistici sul numero di semi per spiga risultano concordare nel non suddividere i cinque campi in set disomogenei. Anche in questo caso, come nel precedente, abbiamo una significatività bassa, legata forse al fatto che i dati dei campi “OGN” e “FIO” sono abbastanza dissimili rispetto agli altri quattro campi.

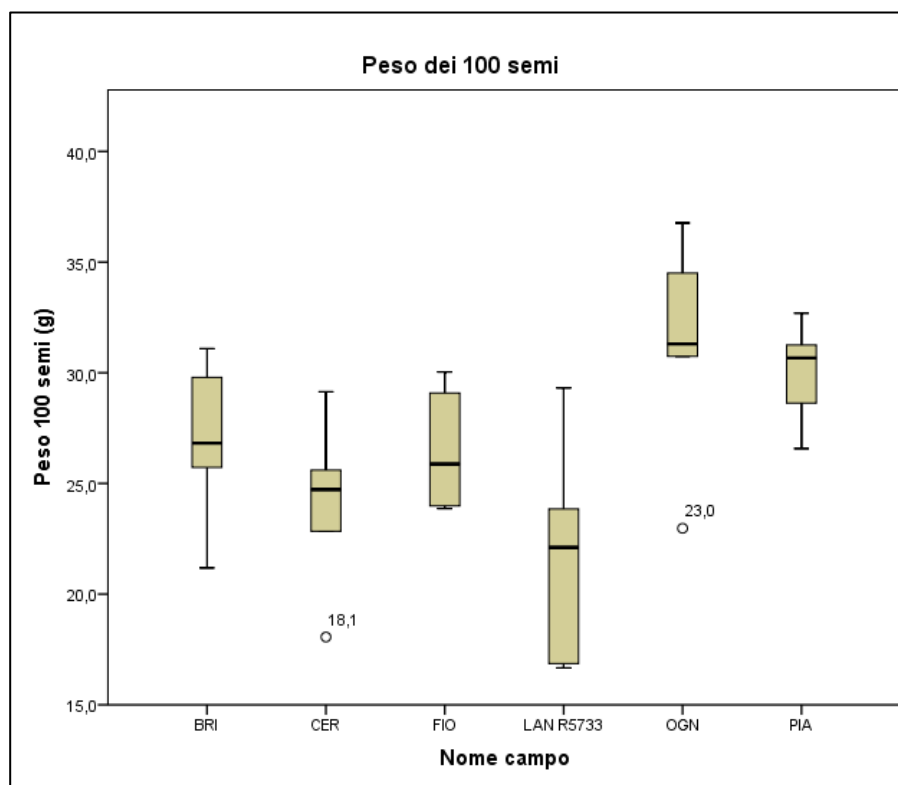
Tabella 4.15 Test statistici numero di semi per spiga

Numero di semi per spiga		
Tukey HSD ^{a,b}		
Nome campo	N	Subset
		1
OGN	5	272,400
LAN R5733	5	327,800
PIA	5	365,000
CER	5	370,400
BRI	5	373,200
FIO	5	432,800
Sig.		,082

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 7884,283.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.
b. Alpha = ,05.

Infine, l'ultimo parametro agronomico analizzato è stato il peso dei 100 semi. In questo caso il range di variabilità va da 16,6 g a 36,6 g. Da una prima osservazione del grafico a scatola e baffi, si nota come ci sia una netta distinzione tra il campo "LANR5733" ed il campo "OGN", mentre il campo di Piario "abbraccia" tutti i campi con il suo range. I campi dei Bricconi, di Cerete e delle Fiorine, invece, sembrano non avere particolari differenze tra di essi.

Tabella 4.16 Box-plot peso 100 semi



Dai test di Tukey si osserva come il campo di Landriano sia differente dai campi di Piario e di Villa d’Ogna, mentre i campi “FIO”, “CER” e “BRI” fanno parte sia del sottoinsieme 1 che del sottoinsieme 2.

Tabella 4.17 Test statistici peso 100 semi

Peso 100 semi (g)			
Tukey HSD ^{a,b}			
Nome campo	N	Subset	
		1	2
LAN R5733	5	21,761	
CER	5	24,072	24,072
FIO	5	26,568	26,568
BRI	5	26,923	26,923
PIA	5		29,964
OGN	5		31,257
Sig.		,376	,097

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 Based on observed means.
 The error term is Mean Square(Error) = 16,788.
 a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.
 b. Alpha = ,05.

4.3. Analisi genetica

Per l'analisi genetica è stato estratto il DNA dei 15 campioni di mais presi in campo, che è stato poi amplificato con i diversi marcatori molecolari descritti in precedenza, ossia umc1185, umc1506, zag105, phi323152, bnlg1028, nc009, bnlg594, phi095. I dati relativi al mais delle Fiorine sono stati poi confrontati con quelli derivanti da studi precedenti. All'interno della matrice di confronto troviamo infatti le popolazioni Spinato di Gandino, Ottofile, Spinato nero di Esine, Millo Corvo, Chiavenna e Ottofile rosso, oltre che alle linee B73, Mo17 e all'ibrido B73/Mo17.

Dopo la corsa elettroforetica sono state rilevate le bande polimorfiche di ogni marcatore molecolare e di ogni campione e sono stati attribuiti numeri differenti in base all'allele presente. I numeri nel caso del mais delle Fiorine sono 1-1,2-2 o 3-3, nel caso di banda monomorfica, 1-2, 1-3, o 2-3 nel caso di banda polimorfica. Non sono quindi espressi gli alleli 4, 5 e 6 dei marcatori in cui questi sono presenti.

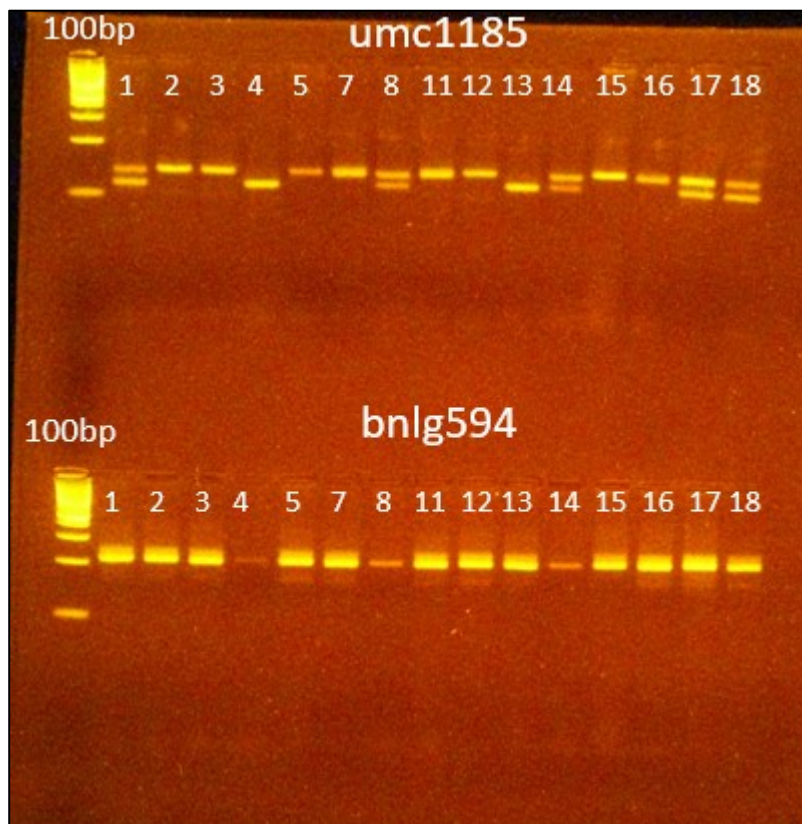


Figura 4.8 Corsa elettroforetica su gel di agarosio

A seguito dell'attribuzione dei numeri alle bande della corsa elettroforetica, è stata creata la matrice di dati analizzabile dal software GenAlEx.

Il primo risultato che il software restituisce è relativo alla frequenza dei vari alleli, espressa come percentuale dell'allele presente in ogni popolazione di mais presa in considerazione (Tabella 4.18).

Come si può osservare dalla tabella, la percentuale di loci polimorfici varia da popolazione a popolazione: si ha infatti il 75% di marcatori in cui sono espressi due o più alleli nello Spinato di Gandino nel Millo Corvo e nella popolazione Chiavenna, il 12,5% nell'Ottofile, il 62,5% nel mais di Esine, l'87,5% nell'Ottofile Rosso, lo 0% nelle linee B73 e Mo17 e il 25% nell'ibrido B73/Mo17. Per quanto riguarda il mais delle Fiorine, si ha una percentuale di loci polimorfici pari al 75%, in cui gli unici loci monomorfici sono bnlg549 e phi095, come nel caso dei mais Chiavenna, e Spinato di Gandino (Tabella 4.19). nella tabella precedentemente citata sono presenti anche i calcoli relativi alla diversità allelica, che esprime il numero medio di alleli per locus. Il valore di questo parametro per il mais delle Fiorine si attesta a 2, rispecchiando ancora una volta il mais Chiavenna. Osservando gli alleli monomorfici, si nota che quelli del mais delle Fiorine corrispondono agli alleli monomorfici del mais Chiavenna; a entrambe le popolazioni è stato attribuito infatti il valore 1 all'allele rilevato successivamente alla corsa elettroforetica.

Il software restituisce poi un grafico, visibile in Figura 4.9, relativo all'analisi PCA (Principal Coordinates Analysis). In questo grafico vengono rappresentati tutti gli individui presi in considerazione su di un grafico cartesiano. GenAlEx calcola quindi le coordinate x e y in base ai parametri di ogni singolo allele. Si osserva come la popolazione del mais delle Fiorine sia molto vicina geneticamente alla popolazione Chiavenna e si sovrappone parzialmente al Millo Corvo e allo Spinato di Gandino. Totalmente isolati, invece, i due Ottofile. Indicati mediante tre frecce si notano le linee produttive B73 e Mo17 e, perfettamente a metà strada tra i due, l'ibrido B73/Mo17.

Tabella 4.18 Frequenze alleliche per gli 8 marcatori molecolari. G=Spinato di Gandino, O=Ottofile, E=Esine, MC=Millo Corvo, C=Chiavenna, OR=Ottofile Rosso, FI=Fiorine

Locus	Allele	G	O	E	MC	C	OR	FI	B73	Mo17	B73/Mo17
umc1185	N	9	15	10	13	15	15	15	1	1	1
	1	0,889	1,000	1,000	0,269	0,867	0,500	0,700	1,000	0,000	0,500
	2	0,111	0,000	0,000	0,731	0,133	0,333	0,300	0,000	1,000	0,500
	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000
umc1506	N	12	15	12	14	15	15	15	1	1	1
	1	0,458	1,000	0,375	0,286	0,633	0,500	0,467	0,000	0,000	0,000
	2	0,333	0,000	0,333	0,571	0,367	0,133	0,400	1,000	0,000	0,500
	3	0,083	0,000	0,000	0,036	0,000	0,000	0,133	0,000	0,000	0,000
	4	0,125	0,000	0,292	0,107	0,000	0,233	0,000	0,000	1,000	0,500
	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000
	6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000
zag105	N	9	10	7	12	15	15	14	1	1	1
	1	1,000	1,000	0,357	0,750	0,667	0,567	0,607	1,000	1,000	1,000
	2	0,000	0,000	0,643	0,083	0,333	0,067	0,321	0,000	0,000	0,000
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,367	0,071	0,000	0,000	0,000
	4	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
phi323152	N	11	14	10	13	15	15	15	1	1	1
	1	0,455	0,536	0,000	1,000	0,200	0,000	0,633	0,000	0,000	0,000
	2	0,000	0,464	0,200	0,000	0,000	0,333	0,367	0,000	1,000	0,500
	3	0,500	0,000	0,700	0,000	0,567	0,667	0,000	1,000	0,000	0,500
	4	0,045	0,000	0,100	0,000	0,233	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
bnlg1028	N	12	14	14	14	13	15	14	1	1	1
	1	0,292	1,000	0,321	0,929	0,500	0,200	0,357	1,000	1,000	1,000
	2	0,708	0,000	0,679	0,071	0,500	0,500	0,643	0,000	0,000	0,000
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,000	0,000	0,000	0,000
	4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200	0,000	0,000	0,000	0,000
	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000
nc009	N	11	15	13	15	14	15	15	1	1	1
	1	0,364	1,000	0,231	0,267	0,429	0,333	0,833	0,000	1,000	0,500
	2	0,636	0,000	0,731	0,600	0,536	0,233	0,167	1,000	0,000	0,500
	3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,133	0,000	0,000	0,000	0,000
	4	0,000	0,000	0,038	0,133	0,036	0,300	0,000	0,000	0,000	0,000
bnlg594	N	9	15	12	13	15	15	15	1	1	1
	1	0,778	0,000	0,000	0,885	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,500
	2	0,111	1,000	0,000	0,115	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,500
	4	0,111	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
phi095	N	13	15	12	12	15	15	15	1	1	1
	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,133	1,000	1,000	1,000	1,000
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,867	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabella 4.19 Percentuale di loci polimorfici e diversità allelica nelle varie popolazioni. G=Spinato di Gandino, O=Ottofile, E=Esine, MC=Millo Corvo, C=Chiavenna, OR=Ottofile Rosso, FI=Fiorine

	% Loci polimorfici	Diversità allelica
G	75.0	2.25
O	12.5	1.13
E	62.5	2.0
MC	75	2.25
C	75	2.0
OR	87.5	3.13
FI	75.0	2.0
B73	0.0	1.0
Mo17	0.0	1.0
B73/Mo17	25.0	1.38

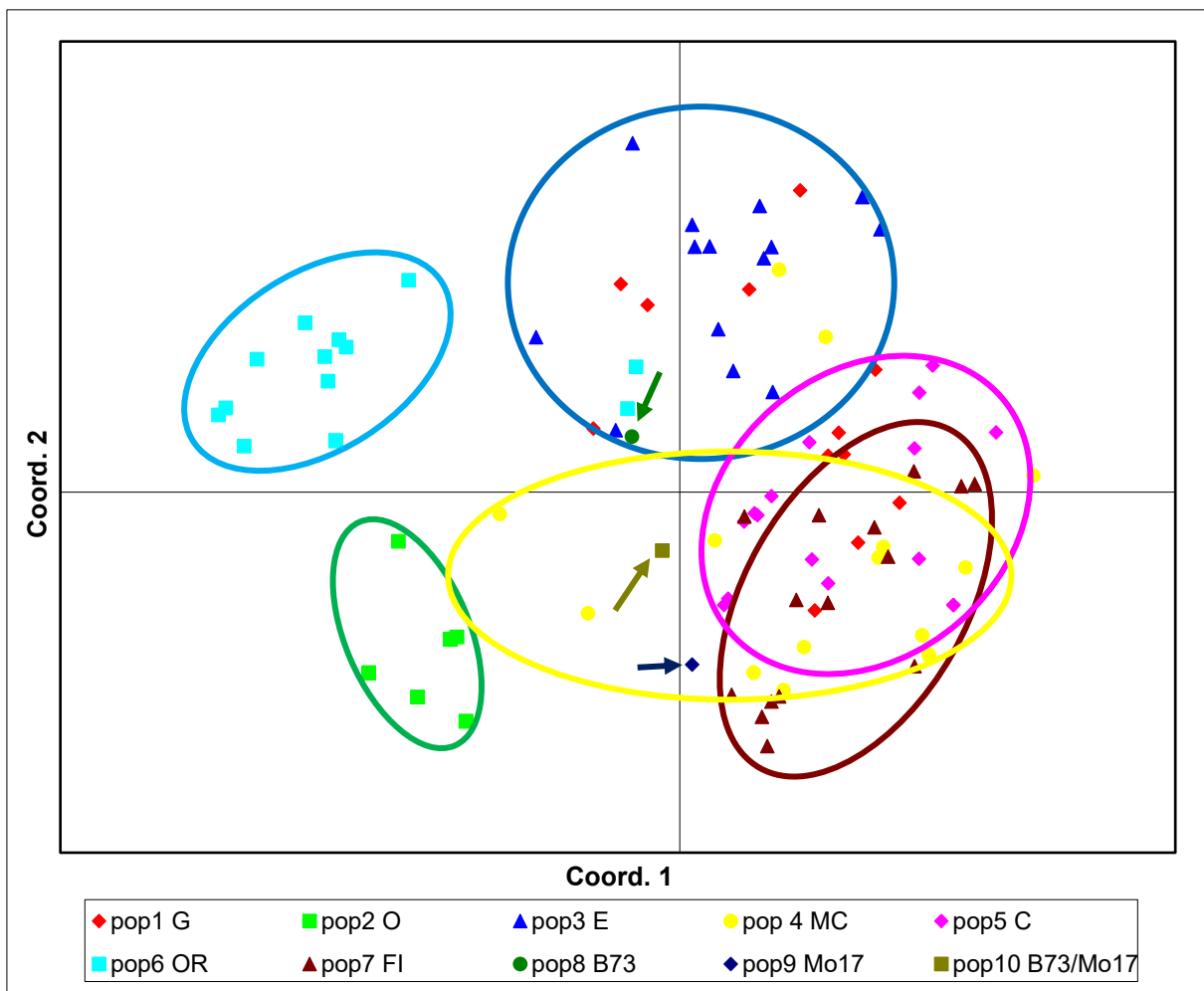


Figura 4.9 Analisi PCA delle popolazioni di mais studiate derivata dalla matrice della distanza genetica. G=Spinato di Gandino, O=Ottofile, E=Esine, MC=Millo Corvo, C=Chiavenna, OR=Ottofile Rosso, FI=Fiorine

A seguito dell'analisi PCA, è stata calcolata la distanza genetica di Nei, visibile in Tabella 4.20. grazie a questa analisi è possibile osservare le distanze che intercorrono tra le varie popolazioni di mais. I valori inferiori si riscontrano con i mais Spianto di Gandino e Chiavenna, con valori di 0,116 e 0,131 rispettivamente, mentre quelli maggiori con Ottofile Rosso, la linea B73 ed Esine, con valori di distanza di 0,789, 0,696 e 0,473 rispettivamente.

Tabella 4.20 Distanza genetica di Nei. G=Spinato di Gandino, O=Ottofile, E=Esine, MC=Millo Corvo, C=Chiavenna, OR=Ottofile Rosso, FI=Fiorine

Nei Genetic Distance	pop1 G	pop2 O	pop3 E	pop 4 MC	pop5 C	pop6 OR	pop7 FI	pop8 B73	pop9 Mo17	pop10 B73/Mo17
pop1 G	0,000									
pop2 O	0,375	0,000								
pop3 E	0,274	0,649	0,000							
pop 4 MC	0,239	0,458	0,713	0,000						
pop5 C	0,054	0,401	0,279	0,250	0,000					
pop6 OR	0,587	0,494	0,701	0,997	0,668	0,000				
pop7 FI	0,131	0,339	0,473	0,204	0,116	0,798	0,000			
pop8 B73	0,319	0,438	0,407	0,470	0,364	0,513	0,696	0,000		
pop9 Mo17	0,579	0,551	1,023	0,372	0,553	0,989	0,373	0,981	0,000	
pop10 B73/Mo17	0,253	0,306	0,481	0,233	0,266	0,536	0,334	0,187	0,187	0,000

4.4. Iscrizione al registro varietale

Regione Lombardia, con il decreto 11 ottobre 2013, n. 9167 (Burl del 15/10/2013, n. 42 serie ordinaria), ha approvato la procedura per la presentazione e l'istruttoria delle domande di iscrizione delle varietà da conservazione. Grazie a questa procedura, enti pubblici, istituzioni scientifiche, organizzazioni, associazioni, singoli cittadini e aziende agricole possono iscrivere le varietà da loro conservate e coltivate all'apposita sezione del registro nazionale. Il settore sementiero è invece disciplinato a livello nazionale dalla legge n. 1096 del 25 novembre 1971, successivamente modificata dal decreto legislativo n.212/2003 di recepimento di regolamenti e direttive comunitarie in materia. Questa normativa stabilisce che le sementi di varietà agrarie e orticole possano essere commercializzate previa iscrizione delle varietà stesse nei registri nazionali.

Le condizioni per l'iscrizione, accertate con prove di campo e di laboratorio sono stabilità, differenziabilità e uniformità (DUS).

Il primo passo è stato quindi quello di redigere la scheda descrittiva morfologica, presente nell'Allegato I - scheda descrittiva morfologica. In questa scheda rientrano tutti i rilievi morfometrici effettuati sul mais delle Fiorine.

Ai sensi dei D.Lgs. n. 149/2009 e del D.Lgs n. 267/2010, rispettivamente per le specie agrarie ed ortive, la varietà da conservazione per cui si richiede l'iscrizione al Registro deve possedere i seguenti requisiti:

- a) essere varietà di specie di piante agrarie o ortive di ecotipi e varietà naturalmente adattate alle condizioni locali e regionali, tradizionalmente coltivate e minacciate da erosione genetica;
- b) presentare un interesse per la conservazione delle risorse fitogenetiche;
- c) non deve figurare nel catalogo comune delle varietà di specie di piante agrarie e ortive oppure è stata cancellata dal medesimo catalogo comune nel corso degli ultimi due anni o da almeno due anni a partire dalla scadenza del periodo previsto dall'articolo 17-bis, quinto comma, del decreto del Presidente della Repubblica 8 ottobre 1973, n. 1065;

- d) non deve essere protetta da una privativa comunitaria per ritrovati vegetali prevista dai regolamenti (CE) n. 2100/94 o da una privativa nazionale per ritrovati vegetali ai sensi del d.lgs. 10 febbraio 2005, n. 30, o sia stata presentata una domanda di protezione ai sensi di tali normative;

Le condizioni essenziali per l'ammissione, ovverosia distinguibilità, stabilità ed uniformità (DUS) sono invece così descritte:

ai fini della distinguibilità e della stabilità, alle varietà si applicano almeno i caratteri previsti da:

- i questionari tecnici associati ai protocolli d'esame dell'Ufficio comunitario delle varietà vegetali (UCVV), elencati nell'allegato I della direttiva 2003/90/CE, per le specie agrarie, e nell'allegato I della direttiva 2003/91/CE, per le specie orticole,
- i questionari tecnici delle linee guida dell'Unione internazionale per la protezione delle novità vegetali (UPOV), elencate nell'allegato II della direttiva 2003/90/CE, per le specie agrarie,
- l'allegato II della direttiva 2003/91/CE, per le specie orticole;

Per la valutazione del livello di omogeneità o uniformità, per la quale si applicano le direttive 2003/90/CE per le specie agrarie e la 2003/91/CE per quelle ortive, se è stabilito sulla base delle piante fuori tipo, si applica un livello di popolazione standard del dieci per cento e una probabilità di accettazione del novanta per cento.

Nei capitoli Allegato II - domanda di iscrizione e Allegato III - documenti storici sono presenti i documenti relativi al mais delle Fiorine.

5. DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Il mais rappresenta il cereale più coltivato al mondo dopo il riso, con una produzione di circa 1134,74 milioni di tonnellate nel 2017, su di una superficie complessiva di 197.18 milioni di ettari. In Italia, la produzione di questo cereale si estende su 591.206 ettari, con una produzione di 62 mila tonnellate.

La grande diversità genetica presente in questa coltura le ha permesso di raggiungere l'impressionante resa di 34 tonnellate per ettaro con l'ibrido "Pioneer P1197 AM" in Virginia (USA). Tuttavia, la crescente richiesta di questo cereale da parte del mercato, soprattutto per il comparto zootecnico ed energetico, ha causato l'aumento della coltivazione di poche specie di ibridi molto produttivi, provocato la diminuzione delle superfici coltivate con mais "tradizionali", legati al territorio in cui venivano storicamente coltivati e adattatisi a particolari condizioni microclimatiche. Questo ha causato e sta causando una pericolosa erosione genetica, che sta privando il mais della biodiversità che ha accumulato nel corso di secoli di storia ed evoluzione.

In questo contesto si inseriscono le moderne associazioni di tutela del territorio e delle "varietà antiche", che mirano a conservare e far conoscere alla popolazione i prodotti legati alla tradizione locale, andando così a svolgere una doppia azione di diffusione della conoscenza e di conservazione del patrimonio genetico. Le varietà tradizionali, infatti, spesso posseggono caratteristiche organolettiche, qualitative ed economiche molto interessanti, che permettono loro di entrare in nicchie economiche ed ecologiche sostenibili. La commercializzazione di queste colture è normata dalla legge e richiede il loro inserimento nel registro delle varietà di specie agrarie e orticole da conservazione.

A questo scopo si inserisce il progetto legato a questa tesi che, oltre a fornire i dati per la completa caratterizzazione morfologica, ha anche permesso l'inserimento del mais locale "VA 33" delle Fiorine all'interno di un contesto genetico più ampio. Questo mais veniva coltivato storicamente nelle campagne dell'alta Val Seriana, nei comuni di Clusone (in particolare in località "Fiorine", da cui prende il nome) e limitrofi ed è stato recuperato

grazie al lavoro del CReA di Bergamo, che ne ha conservato il germoplasma, e dell'Associazione Grani Asta del Serio che lo ha riportato nell'areale di coltivazione tradizionale.

Sono stati scelti cinque campi sperimentali presenti in Val Seriana in modo da osservare dal punto di vista statistico le eventuali differenze nei coltivi e confrontare i risultati con quelli del campo sperimentale di Landriano.

L'andamento climatico dell'anno 2019 ha influito molto sulle coltivazioni sia di Landriano, dove la mancanza di precipitazioni, unitamente all'impianto irriguo di fortuna e la successiva tromba d'aria hanno seriamente compromesso la crescita e la raccolta del mais, sia nei campi della valle, dove le forti precipitazioni e le intrusioni di selvaggina hanno reso difficoltose le operazioni in campo.

Analizzando il mais dal punto di vista fenotipico si nota una prima particolare differenza tra le altezze delle piante nei vari coltivi: i campi di Landriano e della contrada Bricconi, infatti, presentano differenze significative rispetto a tutti gli altri campi; i dati del test di Tukey suddividono le popolazioni di questi due campi in un sottoinsieme omogeneo, con valori medi di altezza pari a 193 cm e 200 cm, contro i 216 cm, 218 cm, 218 cm e 220 cm del secondo sottoinsieme. I fattori che probabilmente hanno influito su questo fatto sono stati la siccità nel primo caso e l'altitudine nel secondo. Il campi di Landriano hanno infatti ricevuto ben poca acqua e, di conseguenza, le piante di mais hanno subito uno stress che le ha portate ad indirizzare le proprie risorse alla produzione di polline e semi più che di biomassa vegetativa. Osservando i dati relativi al peso della spiga, alla lunghezza del tutolo ed al numero dei semi per spiga non si notano differenze significative tra le varie popolazioni prese in esame, denotando una sostanziale indifferenza agli stress ambientali per quanto riguarda questi parametri. Se si analizza il peso di 100 semi, tuttavia, si ritrova una differenza significativa tra il campo di Landriano e i restanti campi; questo potrebbe essere una conseguenza della scarsità idrica che, seppur garantendo la formazione di spighe "standard", ha causato la formazione di semi più leggeri che, probabilmente, hanno accumulato meno sostanze di riserva al loro interno, in quanto non sono state prodotte in

quantità ottimali dalla pianta. Il campo “BRI”, invece, è raggruppato assieme al campo di Landriano per i parametri di altezza della pianta ed altezza della spiga poiché esso si trova ad un altitudine di 941 metri sul livello del mare; a questa altitudine le temperature sono inferiori rispetto a quelle di pianura e di fondovalle e il ciclo vegetativo giornaliero ed annuale è inferiore. Per questo motivo la pianta riduce le energie dedicate alla distensione cellulare, a favore di un più “rapido” sviluppo dei gameti. Analizzando le altre caratteristiche fenotipiche del campo dei Bricconi non si notano particolari differenze statistiche dagli altri coltivi; l’unica nota è da porre sulla consistenza della granella al momento della raccolta che, pur essendo passati 50 giorni dal momento della fecondazione, si presentava ancora allo stadio latteo, quando tutti gli altri campi, compreso quello fecondato per ultimo del comune di Cerete Basso, erano in fase cerosa o latteo-cerosa. Anche questo potrebbe essere attribuito all’altitudine alla quale è stato coltivato il mais, che, a causa dell’accorciamento delle giornate e del rapido abbassamento delle temperature ad una tale altitudine, ha provocato un rallentamento nel metabolismo del mais.

Per quanto riguarda le caratteristiche fenotipiche di lunghezza, diametro e peso del tutolo, peso della spiga e numero di semi per spiga, non sembrano esserci differenze significative tra i vari campi, segno che la popolazione di mais è stata mantenuta in relativa purezza. Nel caso in cui dovessero esserci contaminazioni, con questo lavoro sono state effettuate 250 autofecondazioni, grazie alle quali sono state ottenute altrettante spighe, da cui si otterrà la semente per la coltivazione dell’anno successivo. Il mais sarà poi conservato con fecondazioni di tipo sib-pool in modo da scartare gli individui che presenteranno caratteristiche non in linea con quelle del mais delle Fiorine.

L’ultima grandezza misurata è stata il peso dei 100 semi che, come detto in precedenza, è risultato essere statisticamente differente per il campo di Landriano. Anche i campi di Piario e Villa d’Ogna sono categorizzati come sottoinsieme differente, con un peso di 29,9 g e 31,2 g rispettivamente. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che il primo campo è sito su di un

campo dedicato in precedenza a orto e quindi con caratteristiche del terreno favorevoli dal punto di vista nutrizionale. Il secondo campo è sito in un democoltivo dedicato all'insegnamento delle pratiche colturali agli alunni della vicina scuola primaria e anche questo campo potrebbe possedere caratteristiche tessiturali e composizione di sostanza organica e di minerali tali da aver favorito un maggiore accumulo di nutrienti nella granella. Il campo dei Bricconi, pur essendo situato su di un terreno votato a pascolo e limitrofo al bosco, è risultato all'interno di entrambi i sottoinsiemi generati dal test di Tukey, segno che probabilmente le caratteristiche climatologiche hanno influito maggiormente rispetto a quelle del suolo. Il campo delle Fiorine è inserito in un contesto agricolo stabile, in cui il terreno è coltivato già da parecchi anni e quindi è verosimilmente il peso a cui tenderanno tutti i campi se verranno coltivati stabilmente, con una conduzione agronomica omogenea.

Il secondo obiettivo di questa tesi è stato quello di caratterizzare dal punto di vista genetico la popolazione del VA 33. I risultati dell'analisi sono stati poi confrontati con le popolazioni di mais Spinato di Gandino, Ottofile, Spinato nero di Esine, Millo Corvo, Chiavenna e Ottofile rosso, oltre che con le linee B73, Mo17 e con l'ibrido B73/Mo17.

Osservando l'analisi PCA, ottenuta mediante il software GenALEx, si nota una particolare sovrapposizione tra il mais in oggetto di studio e il mais Chiavenna, oltre che piccole sovrapposizioni con il Millo Corvo e la popolazione di Gandino. Questa "vicinanza" genetica è delineata anche dalla Tabella 4.20 che descrive la distanza genetica di Nei, che mostra una differenza di 0,116 e 0,131 tra il mais delle Fiorine e le popolazioni Chiavenna e Gandino rispettivamente, mentre con il Millo Corvo, la distanza è maggiore e pari a 0,204. Il fatto che il VA 33 sia così simile allo spianto di Gandino non dovrebbe stupire, in quanto il comune di Gandino si trova a pochi chilometri da Clusone e probabilmente, in passato, si sono avuti scambi tra agricoltori che hanno causato contaminazioni e incroci tra le due popolazioni. Ciò nonostante, dal punto di vista fenotipico, i due mais sono profondamente diversi: quello di Gandino possiede infatti una spiga di forma cilindrica, di

lunghezza pari a 18 cm, un numero di ranghi pari a 14, un colore rossastro del tutolo e l'altezza della pianta arriva a ben 320 cm; il mais delle Fiorine ha invece una spiga conica, lunga meno di 15 cm, con 16 ranghi, tutolo bianco e altezza della pianta di 220 cm circa. Per quanto riguarda il mais di Chiavenna, esso presenta un'altezza della pianta simile al VA 33, oltre che una lunghezza e peso del seme praticamente identici. Le uniche differenze stanno nel numero dei ranghi, che varia dai 10 ai 12, e nel colore del tutolo, che risulta essere rossastro, oltre che alla forma della spiga, cilindrica.

Il fatto che queste tre popolazioni di mais siano così simili è da imputare alla relativa vicinanza tra gli areali di coltivazione storica: Clusone e Gandino sono siti nella stessa valle, mentre non si esclude la possibilità di commerci tra gli abitanti della Val Seriana e della Valtellina e Valchiavenna; inoltre è anche possibile che le tre popolazioni di mais abbiano avuto un progenitore comune nel corso della loro differenziazione.

Vista la particolare unicità di questo mais, non sarebbe cosa sbagliata inserirlo in un programma di tutela e valorizzazione, già adottati per molte popolazioni di mais locali, in modo da conservarne il pool genetico e allo stesso tempo andare a garantire uno slancio economico per le realtà locali, come già sta avvenendo grazie all'associazione "Asta del Serio". Infine, grazie alla caratterizzazione genetica e a future ricerche, il mais delle Fiorine potrebbe rientrare anche in programmi di miglioramento genetico di linee commerciali, andando a massimizzare il beneficio della conservazione di questo mais.

6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Agostini, S., 2007. Il mais: botanica, storia e arte, alimentazione, paesaggio, coltivazione, ricerca, utilizzazione, mondo e mercato, Coltura & cultura. Bologna : Bayer crops science ;, Milano; Art servizi editoriali.
- Anderson, I.C., Robertson, D.S., 1960. Role of Carotenoids in Protecting Chlorophyll From Photodestruction 12. *Plant Physiol* 35, 531-534.
- Anderson, T.J., Lamsal, B.P., 2011. REVIEW: Zein Extraction from Corn, Corn Products, and Coproducts and Modifications for Various Applications: A Review. *Cereal Chemistry* 88, 159-173. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-06-10-0091>
- Bennetzen, J.L., Hake, S.C., 2009. *Handbook of Maize: Genetics and Genomics*. Springer Science & Business Media.
- Bertolotti, C., 2009. La Pellagra, Bibliografia degli studi dal 1776 al 2005.
- Bilbao, L.M.B., Pinedo, E.F.D., 1977. LA PRODUCCION AGRICOLA EN EL PAIS VASCO (1537-1850) 112.
- Bramley, P.M., Bird, C.R., Schuch, W., 1993. Carotenoid biosynthesis and manipulation, in: Grierson, D. (Ed.), *Biosynthesis and Manipulation of Plant Products*, Plant Biotechnology Series. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 139-177. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2142-2_4
- Brandolini, A., 1970. Razze europee di mais. *Maydica*.
- Brandolini, A., Brandolini, A., 2009. MAIZE INTRODUCTION, EVOLUTION AND DIFFUSION IN ITALY 11.
- Brown, W.L., Darrah, L.L., Creech, R.G., Schertz, K.F., 1985. Origin, Adaptation, and Types of Corn 6.
- Buckler, E.S., Thornsberry, J.M., Kresovich, S., 2001. Molecular Diversity, Structure and Domestication of Grasses. *Genetics Research* 77, 213-218. <https://doi.org/10.1017/S0016672301005158>
- Caratteristiche del mais, 2019. . Assomais. URL <http://www.assomais.it/caratteristiche-del-mais/> (accessed 8.21.19).
- Cassani, E., Puglisi, D., Cantaluppi, E., Landoni, M., Giupponi, L., Giorgi, A., Pilu, R., 2017. Genetic studies regarding the control of seed pigmentation of an ancient European pointed maize (*Zea mays* L.) rich in phlobaphenes: the “Nero Spinoso” from the Camonica valley. *Genetic Resources and Crop Evolution* 64, 761-773. <https://doi.org/10.1007/s10722-016-0399-7>
- Cassman, K.G., 1999. Ecological intensification of cereal production systems: Yield potential, soil quality, and precision agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 5952-5959. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.5952>
- Castilla, P., Dávalos, A., Teruel, J.L., Cerrato, F., Fernández-Lucas, M., Merino, J.L., Sánchez-Martín, C.C., Ortuño, J., Lasunción, M.A., 2008. Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients. *Am J Clin Nutr* 87, 1053-1061. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.4.1053>
- Cazzola, F., 1991. L'introduzione del mais in Italia e la sua utilizzazione alimentare (sec. XVI-XVIII) 19.

- Chandler, V.L., Radicella, J.P., Robbins, T.P., Chen, J., Turks, D., 1989. Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of B utilizing R genomic sequences. *The Plant Cell* 1, 1175-1183. <https://doi.org/10.1105/tpc.1.12.1175>
- Chen, J.C., Chiu, M.H., Nie, R.L., Cordell, G.A., Qiu, S.X., 2005. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep.* 22, 386-399. <https://doi.org/10.1039/B418841C>
- Crosbie, T.M., 1982. Changes in physiological traits associated with long-term breeding efforts to improve grain yield of maize. Proceedings of the ... annual corn and sorghum industry research conference - American Seed Trade Association, Corn and Sorghum Division, Corn and Sorghum Research Conference (USA).
- Doebley, J., 2004. The Genetics of Maize Evolution. *Annual Review of Genetics* 38, 37-59. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092425>
- Doebley, J., 1990. Molecular Evidence and the Evolution of Maize. *Economic Botany* 44, 6-27. <https://doi.org/10.1007/BF02860472>
- Doebley, J., Stec, A., Gustus, C., 1995. Teosinte Branched1 and the Origin of Maize: Evidence for Epistasis and the Evolution of Dominance. *Genetics* 141, 333-346.
- Dooner, H.K., Robbins, T.P., Jorgensen, R.A., 1991. Genetic and Developmental Control of Anthocyanin Biosynthesis. *Annual Review of Genetics* 25, 173-199. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.25.120191.001133>
- Eubanks, M.W., 2001. Feature article. *Econ Bot* 55, 492-514. <https://doi.org/10.1007/BF02871713>
- FAOSTAT [WWW Document], 2019. URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (accessed 7.25.19).
- Fassina, M., 1952. L'introduzione della coltura del mais nelle campagne venete.
- Galinat, W.C., 1992. Corn, Columbus, and Culture. *Perspectives in Biology and Medicine* 36, 1-12. <https://doi.org/10.1353/pbm.1993.0000>
- Goyarzu, P., Malin, D.H., Lau, F.C., Tagliatela, G., Moon, W.D., Jennings, R., Moy, E., Moy, D., Lippold, S., Shukitt-Hale, B., Joseph, J.A., 2004. Blueberry Supplemented Diet: Effects on Object Recognition Memory and Nuclear Factor-kappa B Levels in Aged Rats. *Nutritional Neuroscience* 7, 75-83. <https://doi.org/10.1080/10284150410001710410>
- Grotewold, E., Sainz, M.B., Tagliani, L., Hernandez, J.M., Bowen, B., Chandler, V.L., 2000. Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. *PNAS* 97, 13579-13584. <https://doi.org/10.1073/pnas.250379897>
- Hufford, M.B., Xu, X., van Heerwaarden, J., Pyhäjärvi, T., Chia, J.-M., Cartwright, R.A., Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Guill, K.E., Kaeppler, S.M., Lai, J., Morrell, P.L., Shannon, L.M., Song, C., Springer, N.M., Swanson-Wagner, R.A., Tiffin, P., Wang, J., Zhang, G., Doebley, J., McMullen, M.D., Ware, D., Buckler, E.S., Yang, S., Ross-Ibarra, J.,

2012. Comparative population genomics of maize domestication and improvement. *Nature Genetics* 44, 808-811. <https://doi.org/10.1038/ng.2309>
- Iltis, H.H., 1983. From Teosinte to Maize: The Catastrophic Sexual Transmutation 222, 9.
- Innocenzo Malvasia, 1871. Istruzione di agricoltura dettata da monsignore Innocenzo Malvasia pel fattore delle sue terre a Panzano di Castel Franco nel bolognese scritto inedito pubblicato da Antonio ed Ercole Malvasia. Tipografia degli agrofili italiani.
- ISTAT, 2018. Tavola C02: Superficie (ettari) e produzione (quintali): riso, mais, sorgo, altri cereali. Dettaglio per regione - Anno 2018 - [WWW Document]. URL <http://agri.istat.it/jsp/dawinci.jsp?q=plC020000010000012000&an=2018&ig=1&ct=244&id=15A|18A|25A> (accessed 8.7.19).
- Jaenicke-Després, V., Buckler, E.S., Smith, B.D., Gilbert, M.T.P., Cooper, A., Doebley, J., Pääbo, S., 2003. Early allelic selection in maize as revealed by ancient DNA. *Science* 302, 1206-1208. <https://doi.org/10.1126/science.1089056>
- Lago, C., Landoni, M., Cassani, E., Cantaluppi, E., Doria, E., Nielsen, E., Giorgi, A., Pilu, R., 2015. Study and Characterization of an Ancient European Flint White Maize Rich in Anthocyanins: Millo Corvo from Galicia. *PLOS ONE* 10, e0126521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126521>
- Lau, F.C., Bielinski, D.F., Joseph, J.A., 2007. Inhibitory effects of blueberry extract on the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-activated BV2 microglia. *Journal of Neuroscience Research* 85, 1010-1017. <https://doi.org/10.1002/jnr.21205>
- MacNeish, R.S., 1987. Review of Guila Naquitz: Archaic Foraging and Early Agriculture in Oaxaca, Mexico. *American Antiquity* 52, 652-653. <https://doi.org/10.2307/281614>
- MacNeish, R.S., Eubanks, M.W., 2000. Comparative Analysis of the Río Balsas and Tehuacán Models for the Origin of Maize. *Latin American Antiquity* 11, 3-20. <https://doi.org/10.2307/1571668>
- Mais o Granoturco Zea mays L. - Cereali - Coltivazioni erbacee [WWW Document], n.d. URL <http://www.agraria.org/coltivazionierbacee/mais.htm> (accessed 8.21.19).
- Milpa Maya | la Plumeria [WWW Document], 2015. URL <https://la-plumeria.com/2015/06/02/milpa-maya/> (accessed 8.22.19).
- Mipaaft [WWW Document], 2019. URL <https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/13836> (accessed 8.10.19).
- Mock, J.J., Pearce, R.B., 1975. An ideotype of maize. *Euphytica* 24, 613-623. <https://doi.org/10.1007/BF00132898>
- Panzeri, D., Cesari, V., Toschi, I., Pilu, R., 2011. Seed Calorific Value in Different Maize Genotypes. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* 33, 1700-1705. <https://doi.org/10.1080/15567030903452118>

- Peng, C.-H., Liu, L.-K., Chuang, C.-M., Chyau, C.-C., Huang, C.-N., Wang, C.-J., 2011. Mulberry Water Extracts Possess an Anti-obesity Effect and Ability To Inhibit Hepatic Lipogenesis and Promote Lipolysis. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2663-2671. <https://doi.org/10.1021/jf1043508>
- Pilu, R., Piazza, P., Petroni, K., Ronchi, A., Martin, C., Tonelli, C., 2003. *pl-bol3*, a complex allele of the anthocyanin regulatory *pl1* locus that arose in a naturally occurring maize population. *The Plant Journal* 36, 510-521. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01898.x>
- Piperno, D.R., Moreno, J.E., Iriarte, J., Holst, I., Lachniet, M., Jones, J.G., Ranere, A.J., Castanzo, R., 2007. Late Pleistocene and Holocene environmental history of the Iguala Valley, Central Balsas Watershed of Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 11874-11881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703442104>
- Puglisi, D., Landoni, M., Cassani, E., Toschi, I., Lucchini, G., Cesari, V., Borlini, G., Pilu, R., 2018. Traditional farmers' varieties: a valuable source of genetic variability for biofortification programs 10.
- Ramusio, G.B., 1554. Primo volume e terza edizione delle Navigazioni et viaggi, raccolto gia da M. Gio. Battista Ramusio... nel quale si contengono la descrizione dell'Africa et del paese del Prete Janni, con varii viaggi della città di Lisbona et del Mar Rosso insino a Calicut et all'isole Molucche... et la navigation 878.
- Ranere, A.J., Piperno, D.R., Holst, I., Dickau, R., Iriarte, J., 2009. The cultural and chronological context of early Holocene maize and squash domestication in the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5014-5018. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812590106>
- Ranum, P., Peña-Rosas, J.P., Garcia-Casal, M.N., 2014. Global maize production, utilization, and consumption: Maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1312, 105-112. <https://doi.org/10.1111/nyas.12396>
- Rissanen, T.H., Voutilainen, S., Virtanen, J.K., Venho, B., Vanharanta, M., Mursu, J., Salonen, J.T., 2003. Low Intake of Fruits, Berries and Vegetables Is Associated with Excess Mortality in Men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor (KIHD) Study. *J Nutr* 133, 199-204. <https://doi.org/10.1093/jn/133.1.199>
- Rodríguez, V.M., Soengas, P., Landa, A., Ordás, A., Revilla, P., 2013. Effects of selection for color intensity on antioxidant capacity in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* 193, 339-345. <https://doi.org/10.1007/s10681-013-0924-0>
- Seymour, E. m., Lewis, S.K., Urcuyo-Llanes, D.E., Tanone, I.I., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., Bolling, S.F., 2009. Regular Tart Cherry Intake Alters Abdominal Adiposity, Adipose Gene Transcription, and Inflammation in Obesity-Prone Rats Fed a High Fat Diet. *Journal of Medicinal Food* 12, 935-942. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0270>
- Sorcinelli, P., 1983. Note sull'alimentazione nell'italia giolittiana.
- Stoianovich, T., 1966. Le maïs dans les Balkans. *Annales* 21, 1026-1040. <https://doi.org/10.3406/ahess.1966.421451>

- Stoianovich, T., 1951. Le maïs: Plantes et nourritures. *Annales. Histoire, Sciences Sociales* 6, 190-193. <https://doi.org/10.3406/ahess.1951.1943>
- Titta, L., Trinei, M., Stendardo, M., Berniakovich, I., Petroni, K., Tonelli, C., Riso, P., Porrini, M., Minucci, S., Pelicci, P.G., Rapisarda, P., Recupero, G.R., Giorgio, M., 2010. Blood orange juice inhibits fat accumulation in mice. *International Journal of Obesity* 34, 578-588. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.266>
- Tsuda, T., 2012. Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular Nutrition & Food Research* 56, 159-170. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100526>
- Vollbrecht, E., Sigmon, B., 2005. Amazing grass: developmental genetics of maize domestication. *Biochemical Society Transactions* 33, 5.
- Wilson, L.M., Whitt, S.R., Ibáñez, A.M., Rocheford, T.R., Goodman, M.M., Buckler, E.S., 2004. Dissection of Maize Kernel Composition and Starch Production by Candidate Gene Association. *Plant Cell* 16, 2719-2733. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025700>
- Wright, S.I., Bi, I.V., Schroeder, S.G., Yamasaki, M., Doebley, J.F., McMullen, M.D., Gaut, B.S., 2005. The Effects of Artificial Selection on the Maize Genome. *Science* 308, 1310-1314. <https://doi.org/10.1126/science.1107891>
- Wurtzel, E.T., Wurtzel, E.T., eCuttriss, A., eCuttriss, A., eVallabhaneni, R., eVallabhaneni, R., 2012. Maize provitamin A carotenoids, current resources and future metabolic engineering challenges. *Frontiers in Plant Science* 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00029>
- Yang, C.J., Samayoa, L.F., Bradbury, P.J., Olukolu, B.A., Xue, W., York, A.M., Tuholski, M.R., Wang, W., Daskalska, L.L., Neumeyer, M.A., Sanchez-Gonzalez, J. de J., Romay, M.C., Glaubitz, J.C., Sun, Q., Buckler, E.S., Holland, J.B., Doebley, J.F., 2019. The genetic architecture of teosinte catalyzed and constrained maize domestication. *PNAS* 116, 5643-5652. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820997116>
- Zeppa, G., Bertolino, M., Rolle, L., 2012. Quantitative descriptive analysis of Italian polenta produced with different corn cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92, 412-417. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4593>
- Zizumbo-Villarreal, D., Flores-Silva, A., Colunga-García Marín, P., 2012. The Archaic Diet in Mesoamerica: Incentive for Milpa Development and Species Domestication. *Econ Bot* 66, 328-343. <https://doi.org/10.1007/s12231-012-9212-5>

7. RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il professor Pilu, il “maestro”, che mi ha dato l’opportunità di seguire questo lavoro, stimolando il mio interesse e la mia passione; un grazie va anche ai suoi collaboratori che mi hanno insegnato in poco tempo a destreggiarmi nella genetica.

Un ringraziamento speciale va alla mia famiglia che mi ha sempre sostenuto, ed incoraggiato a proseguire nella magistrale e non mi abbandona mai.

Grazie a te, Silvia, che spesso e volentieri mi hai risollevato dai momenti peggiori e che sempre mi dai la forza e la motivazione giusta per dare il meglio.

Grazie ai miei amici di sempre, sui quali posso sempre contare per staccare un momento da tutto il resto con una bella partita a Magic o un’avventura a D&D.

Grazie anche ai miei compagni di corso, grazie ai quali questi due anni sono passati in spensieratezza e “sobrietà”.

Ringrazio infine il professor Giupponi, che mi ha dato l’aggancio per iniziare questo lavoro e il dottor Messa, che mi ha seguito con la sua saggezza.

8. ALLEGATI

8.1. Allegato I - scheda descrittiva morfologica

Rif. CPVO TP/2/3

51- MAIS (*Zea mays* L.)

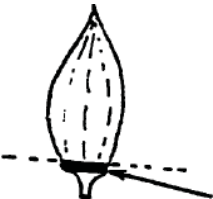

Scheda descrittiva morfologica


La descrizione dei caratteri indicati nella prima colonna con GIBA è raccomandata dal Gruppo di lavoro Biodiversità Agricola. La descrizione dei caratteri n. 6, 15, 21.1, 21.2, 29, 32 indicati nella seconda colonna con asterisco (*) è obbligatoria ai fini dell'iscrizione al Catalogo delle "varietà da conservazione".


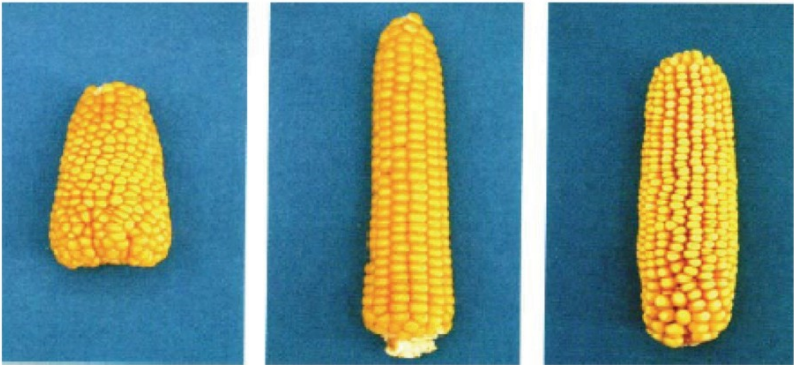
N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	Stadi (tab.)	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE	VARIETA' DI RIFERIMENTO	
1	1	14	Prima foglia: pigmentazione antocianica della guaina	1	assente o molto leggera	0674, Jubilee (SC)
				<input checked="" type="checkbox"/>	lieve	M017, Puma (SC)
				5	media	F252, Gyöngymazsola (SC)
				7	forte	F244
				9	molto forte	
2	2	14	Prima foglia: forma dell' apice	<input checked="" type="checkbox"/>	appuntita	
				2	appuntita-rotonda	0674
				3	rotonda	Empire (SC), F816
				4	Rotonda-a spatola	F259, Merkur (SC)
				5	A spatola	EP1
3	3	51-59	Fogliame: intensità del colore verde	1	chiara	W182E
				<input checked="" type="checkbox"/>	media	W117, Empire (SC)
				3	scura	GSS 3287 (SC), W401
4	4f5 (a)	65-69	Foglia: angolo di apertura tra le foglie e il culmo	1	molto piccolo, $\pm 5^\circ$	
				3	piccolo, $\pm 25^\circ$	A188
				<input checked="" type="checkbox"/>	medio, $\pm 50^\circ$	F66, GH2547 (SC)
				7	grande, $\pm 75^\circ$	F186, Spirit (SC)
				9	molto grande, $> 90^\circ$	


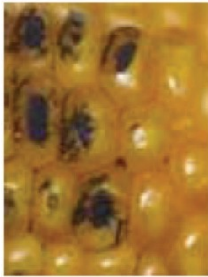

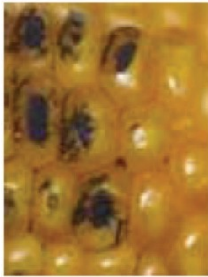

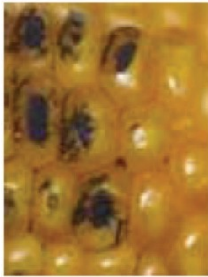



N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	Stadi (tab.)	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE	VARIETA' DI RIFERIMENTO	
5	5f6 (a)	65-69	Foglia: curvatura delle foglie	1	diritte o molto lievemente ricurve	WD36
				3	leggermente ricurve	A654, Bonus (SC)
				X	ricurve	W117, Jubilee (SC)
				7	fortemente ricurve	W79A
				9	molto fortemente ricurve	
6 GIBA	6/8 (*)(b)		Pennacchio: epoca di fioritura	1	Molto precoce (FAO 100)	
				X	da molto precoce e precoce (FAO 200)	KW1069, Spirit (SC)
				3	Precoce (FAO 300)	F257, Champ (SC)
				4	Da precoce a medio (FAO 400)	F259, Centurion (SC)
				5	Medio (FAO 500)	F522, Zenith (SC)
				6	Da medio a tardivo (FAO 600)	A632
				7	Tardivo (FAO 700)	B73
				8	Da tardivo a molto tardivo (FAO 800)	AM1513
				9	Molto tardivo (FAO 900)	
La fioritura maschile va presa il 50% delle piante ha le antere visibili nel terzo medio dell'asse principale.						
7 GIBA	7/9 (*)(b)	65-69	Pennacchio: colorazione antocianica alla base delle glume	1	assente o molto lieve	W117, Royalty (SC)
				X	lieve	F66, Boston (SC)
				5	media	F107
				7	forte	EP1
				9	molto forte	
8	8f10 (b)	65-69	Pennacchio: colorazione antocianica delle glume (esclusa la base)	1	assente o molto lieve	F259, Empire (SC)
				X	lieve	F2, Royalty (SC)
				5	media	WD36, Centurion (SC)
				7	forte	W79A
				9	molto forte	
L'osservazione viene fatta visibili nel terzo medio dell'asse principale.						
9	9f11 (b)		Pennacchio: colorazione antocianica delle antere	1	assente o molto lieve	A&%, Empire (SC)
				X	lieve	F2, Royalty (SC)
				5	media	W182E, Centurion (SC)
				7	forte	
				9	molto forte	


N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	Stadi (tab.)	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE	VARIETA' DI RIFERIMENTO	
10 GIBA	10f12 (c)	65-69	Pennacchio: angolo tra l'asse centrale e le ramificazioni laterali	1	molto piccolo, $\pm 5^\circ$	
				3	piccolo, $\pm 25^\circ$	F492
				5	medio, $\pm 50^\circ$	EP1, Mv. Aranyos (SC)
				X	grande, $\pm 75^\circ$	F186, Bonus (SC)
				9	molto grande, $> 90^\circ$	
11 GIBA	11f13 (c)	69	Pennacchio: portamento delle ramificazioni laterali	1	diritte o molto lievemente ricurve	F257, El Toro(SC)
				3	leggermente ricurve	F816, Empire (SC)
				X	ricurve	W182E, Bonus (SC)
				7	fortemente ricurve	F66
				9	molto fortemente ricurve	
12 GIBA	12f14	65-75	Pennacchio: numero di ramificazioni primarie	1	assente o molto poche, 0-3	F7
				3	poche, 4-6	F252, Mv. Aranyos (SC)
				5	medie, 7-10	F244, Kokanee (SC)
				X	molte, 11-15	A188, Zenith (SC)
				9	molto elevate, > 16	Suregold (SC)
13	13f15		Spiga: epoca di comparsa delle sete	1	Molto precoce (FAO 100)	Mv. Aranyos (SC)
				X	da molto precoce e precoce (FAO 200)	KW1069, Spirit (SC)
				3	Precoce (FAO 300)	F257, Champ (SC)
				4	Da precoce a medio (FAO 400)	F259, Royalty (SC)
				5	Medio (FAO 500)	F522, Bonus (SC)
				6	Da medio a tardivo (FAO 600)	A632
				7	Tardivo (FAO 700)	B73
				8	Da tardivo a molto tardivo (FAO 800)	AM1513
				9	Molto tardivo (FAO 900)	
14 GIBA	14/16 (*)	65	Spiga: colorazione antocianica delle sete	1	assente o molto debole	F7, F195, Bonus (SC)
				X	debole	F257, El Toro (SC)
				5	media	F244, Gyöngymazsola (SC)
				7	forte	W401
				9	molto forte	

N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	Stadi (tab.)	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE	VARIETA' DI RIFERIMENTO	
15	15f17	61-79	Culmo: pigmentazione antocianica delle radici avventizie	1	assente o molto lieve	F16, Jubilee (SC)
				<input checked="" type="checkbox"/>	lieve	W117, Puma (SC)
				5	media	WD36, El Toro (Sc)
				7	forte	EP1
				9	molto forte	
						
16	16f18 (c)	61-71	Pennacchio: densità delle spiglette	3	lasche	F16
				<input checked="" type="checkbox"/>	medie	EP1, Royalty (SC)
				7	dense	F259, Empire (SC)
17	17f19	71-75	Foglia: pigmentazione antocianica della guaina	<input checked="" type="checkbox"/>	assente o molto lieve	W401, Jubilee (SC)
				3	lieve	F107
				5	media	F257
				7	forte	EP1
				9	molto forte	
18	18f20	71-75	Culmo: colorazione antocianica degli internodi	<input checked="" type="checkbox"/>	assente o molto debole	F259, Jubilee (SC)
				3	debole	F816
				5	media	W79A
				7	forte	F257
				9	molto forte	
19	19f21	71-75	Pennacchio: lunghezza dell'asse centrale dall'apice alle ramificazioni inferiori	1	molto corto, < 20 cm	
				3	corto, 20-30 cm	EP1
				<input checked="" type="checkbox"/>	medio, 31-40 cm	F244, Bonus (SC)
				7	lungo, 41-50 cm	F492, Empire (SC)
				9	molto lungo, > 50 cm	
 <p>Lunghezza dell'asse centrale dall'apice alle ramificazioni basali.</p>						

N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	Stadi (tab.)	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE	VARIETA' DI RIFERIMENTO	
20 GIBA	20f22	71-75	Pennacchio: lunghezza dell'asse centrale dall'apice alle ramificazioni superiori	1	molto corto, < 10 cm	
				3	corto, 10-20 cm	EP1
				X	medio, 21-30 cm	W182E
				7	lungo, 31-40 cm	F492
				9	molto lungo, > 40 cm	
 <p>Lunghezza dell'asse centrale dall'apice alle ramificazioni superiori.</p>						
21	21f23 (c)	71-75	Pennacchio: lunghezza delle ramificazioni laterali	1	molto corto, < 18 cm	
				X	corto, 18-21 cm	EP1
				5	medio, 22-24 cm	A632
				7	lungo, 25-27 cm	F492
				9	molto lungo, > 28 cm	
22 GIBA	22.1/24.1 (*)	75-85	<u>SOLO LINEE ENDOGAME E VARIETA' CON TIPO DI GRANO DOLCE O POP</u> Pianta: lunghezza (pennacchio incluso)	1	molto corta	F7
				3	corta	W117, Spirit (SC)
				5	media	F244, Puma (SC)
				7	lunga	WD36, Royalty (SC)
				9	molto lunga	Enterprice (SC)
23 GIBA	22.2/24.2 (*)	75-85	<u>SOLO IBRIDI E VARIETA' AD IMPOLLINAZIONE LIBERA, ESCLUSO VARIETA' CON TIPO DI GRANO DOLCE O POP</u> Pianta: lunghezza (pennacchio incluso)	1	molto corta	
				3	corta	PR39D23
				X	media	PR37Y12
				7	lunga	DKC5166
				9	molto lunga	
24	23f25 (a)	75-85	Pianta: rapporto altezza dell'inserzione della spiga più alta / lunghezza pianta	1	molto piccolo, < 40%	Gyöngymazsola (SC)
				X	piccolo, 40-45%	F816, Spirit (SC)
				5	medio, 46-50%	F252, Royalty (SC)
				7	grande, 51-55%	F481
				9	molto grande, > 55%	
25	24f26	75-85	Foglia: larghezza del lembo (foglia spiga superiore)	1	molto stretta, < 9 cm	
				X	stretta, 9-10 cm	F16, Champ (SC)
				5	media, 11-12 cm	F244, Empire (SC)
				7	larga, 12-13 cm	F481, Centurion (SC)
				9	molto larga, > 13 cm	

N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	Stadi (tab.)	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE	VARIETA' DI RIFERIMENTO	
26	25f27	75-85	Spiga: lunghezza del peduncolo	1	molto corto	
				<input checked="" type="checkbox"/>	corto, come ½ internodo	F259, Centurion (SC)
				5	medio, come internodo	A654, Jubilee (SC)
				7	lungo, più lungo dell'internodo	F107
				9	molto lungo	
27 GIBA	26f28	92-93	Spiga: lunghezza	<input checked="" type="checkbox"/>	molto corta, < 15 cm	
				3	corta, 15-18 cm	F2
				5	media, 19-21 cm	A654, Spirit (SC)
				7	lunga, 22-24 cm	F107
				9	molto lunga, > 24 cm	
						
28	27f29	92-93	Spiga: diametro (a metà lunghezza)	1	molto sottile, < 35 mm	
				3	sottile, 35-40 mm	F7
				<input checked="" type="checkbox"/>	medio, 41-45 mm	W117
				7	grosso, 46-50 mm	F481, Centurion (SC)
				9	molto grosso, > 50 mm	Empire (SC)
29	28f30	92-93	Spiga: forma	<input checked="" type="checkbox"/>	conica	F16, Wombat (SC)
				5	cilindrico-conica	F816, Centurion (SC)
				7	cilindrica	F66, GH2547 (SC)
						
30	29f31	92-93	Spiga: numero file di grani	1	molto pochi, 8-10	
				3	pochi, 10-12	F257
				<input checked="" type="checkbox"/>	medi, 14-16	F16, Dessert 73 (SC)
				7	molti, 18	B73, Bonus (SC)
				9	moltissimi, > 20	

N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	Stadi (tab.)	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE	VARIETA' DI RIFERIMENTO																														
			<table border="1"> <tr> <td>1</td> <td>flint</td> <td>mostly hard endosperm, round grain, thick layer of hard endosperm on crown, larger grains than pop</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>flint-like</td> <td>mostly hard endosperm, round grain, intermediate layer of hard endosperm on crown</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>intermediate</td> <td>thin layer of hard endosperm on crown, crown slightly indented</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>dent-like</td> <td>mostly soft endosperm, crown moderately indented, medium layer of hard endosperm on dorsal side of grain,</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>dent</td> <td>mostly soft endosperm covering also exterior part of crown, thin layer of hard endosperm only on dorsal side of grain, grain strongly indented on crown</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>sweet</td> <td>glassy endosperm with very low or no starch content, wrinkled grain</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>pop</td> <td>nearly completely hard endosperm, rice-type (pointed grain) or pearl type (rounded grain), very thick layer of hard endosperm on crown, smaller grains than flint</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>waxy</td> <td> <p>approximately 100 % amylopectine, waxy appearance of grain, pink coloration of endosperm in iodine staining test (blue black coloration of other types of grain).</p> <p><u>Iodine staining test</u></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>waxy</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>non waxy</p> </div> </div> </td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>flour</td> <td>completely soft endosperm, grain round or slightly indented on crown</td> </tr> </table>	1	flint	mostly hard endosperm, round grain, thick layer of hard endosperm on crown, larger grains than pop	2	flint-like	mostly hard endosperm, round grain, intermediate layer of hard endosperm on crown	3	intermediate	thin layer of hard endosperm on crown, crown slightly indented	4	dent-like	mostly soft endosperm, crown moderately indented, medium layer of hard endosperm on dorsal side of grain,	5	dent	mostly soft endosperm covering also exterior part of crown, thin layer of hard endosperm only on dorsal side of grain, grain strongly indented on crown	6	sweet	glassy endosperm with very low or no starch content, wrinkled grain	7	pop	nearly completely hard endosperm, rice-type (pointed grain) or pearl type (rounded grain), very thick layer of hard endosperm on crown, smaller grains than flint	8	waxy	<p>approximately 100 % amylopectine, waxy appearance of grain, pink coloration of endosperm in iodine staining test (blue black coloration of other types of grain).</p> <p><u>Iodine staining test</u></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>waxy</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>non waxy</p> </div> </div>	9	flour	completely soft endosperm, grain round or slightly indented on crown					
1	flint	mostly hard endosperm, round grain, thick layer of hard endosperm on crown, larger grains than pop																																	
2	flint-like	mostly hard endosperm, round grain, intermediate layer of hard endosperm on crown																																	
3	intermediate	thin layer of hard endosperm on crown, crown slightly indented																																	
4	dent-like	mostly soft endosperm, crown moderately indented, medium layer of hard endosperm on dorsal side of grain,																																	
5	dent	mostly soft endosperm covering also exterior part of crown, thin layer of hard endosperm only on dorsal side of grain, grain strongly indented on crown																																	
6	sweet	glassy endosperm with very low or no starch content, wrinkled grain																																	
7	pop	nearly completely hard endosperm, rice-type (pointed grain) or pearl type (rounded grain), very thick layer of hard endosperm on crown, smaller grains than flint																																	
8	waxy	<p>approximately 100 % amylopectine, waxy appearance of grain, pink coloration of endosperm in iodine staining test (blue black coloration of other types of grain).</p> <p><u>Iodine staining test</u></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>waxy</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>non waxy</p> </div> </div>																																	
9	flour	completely soft endosperm, grain round or slightly indented on crown																																	
36 GIBA	35f37 (d) (e)	92-93	<p><u>Solo varietà con granella di tipo dolce</u></p> <p>Spiga: restringimento della parte superiore della cariosside</p>	<table border="1"> <tr> <td>1</td> <td>debole</td> <td>Zarja (SC)</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>medio</td> <td>Merkur(SC)</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>forte</td> <td>Dessert 73 (SC)</td> </tr> </table>	1	debole	Zarja (SC)	3	medio	Merkur(SC)	5	forte	Dessert 73 (SC)																						
1	debole	Zarja (SC)																																	
3	medio	Merkur(SC)																																	
5	forte	Dessert 73 (SC)																																	
			<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>1</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>3</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>5</p> </div> </div>																																
37 GIBA	36f38 (d) (e)	92-93	Spiga: colore della corona della cariosside	<table border="1"> <tr> <td>1</td> <td>bianco</td> <td>A188, Purple white (SC), Snowbelle (SC)</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>bianco-giallastro</td> <td></td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>giallo</td> <td>F259</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>giallo-arancio</td> <td>F2, Gyöngymazsola (SC)</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>arancio</td> <td>F257, GH2547 (SC)</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>rosso-arancio</td> <td>Dynasty (SC)</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>rosso</td> <td></td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>rosso scuro</td> <td></td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>brunastro</td> <td>Zenith (SC)</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>blu-nero</td> <td>Miheukchal</td> </tr> </table>	1	bianco	A188, Purple white (SC), Snowbelle (SC)	2	bianco-giallastro		3	giallo	F259	4	giallo-arancio	F2, Gyöngymazsola (SC)	X	arancio	F257, GH2547 (SC)	6	rosso-arancio	Dynasty (SC)	7	rosso		8	rosso scuro		9	brunastro	Zenith (SC)	10	blu-nero	Miheukchal	
1	bianco	A188, Purple white (SC), Snowbelle (SC)																																	
2	bianco-giallastro																																		
3	giallo	F259																																	
4	giallo-arancio	F2, Gyöngymazsola (SC)																																	
X	arancio	F257, GH2547 (SC)																																	
6	rosso-arancio	Dynasty (SC)																																	
7	rosso																																		
8	rosso scuro																																		
9	brunastro	Zenith (SC)																																	
10	blu-nero	Miheukchal																																	

N° GIBA	N° CPVO/ UPOV	Stadi (tab.)	CARATTERE	LIVELLO D'ESPRESSIONE DEL CARATTERE	VARIETA' DI RIFERIMENTO	
38 GIBA	37/39 (*)	92-93	<i>Solo varietà con granella di tipo dolce</i> Spiga: colore del dorso della cariosside	1	bianco	F481
				2	bianco-giallastro	A188
				3	giallo	
				4	giallo-arancio	F66
				5	arancio	EP1
				6	rosso-arancio	
				7	rosso	
				8	rosso scuro	
				9	brunastro	
				10	blu-nero	
39	38f40	93	<i>Solo varietà con granella di tipo pop:</i> Forma della granella scoppie'tata	1	a farfalla	Robust 97461
				2	intermedia	
				3	globosa	Robust 90252
						
40 GIBA	39/41 (*)	93	Spiga: colorazione antocianica delle glume del tutolo	X	assente o molto lieve	F2, F257
				3	lieve	F252
				5	media	W117
				7	forte	A632
				9	molto forte	
<p>1 STADIO: 2 foglie distese</p> <p>14 STADIO: 4 foglie distese</p> <p>51 STADIO: infiorescenza appena visibile</p> <p>59 STADIO: emergenza dell' infiorescenza completa</p> <p>61 STADIO: Inizio fioritura maschile</p> <p>65 STADIO: metà fioritura maschile – inizio apparizione delle sete</p> <p>69 STADIO: completa fioritura maschile</p> <p>71 STADIO: metà fioritura femminile – inizio maturazione lattea</p> <p>75 STADIO: maturazione lattea</p> <p>79 STADIO: raggiungimento della taglia finale delle cariossidi</p> <p>85 STADIO: maturazione cerosa</p> <p>92 STADIO: alla maturazione fisiologica</p> <p>93 STADIO dopo la maturazione fisiologica; spighe "asciutte" con cariossidi che si staccano agevolmente dal tutolo</p> <p>(a) osservazioni da effettuare appena la di sopra della spiga più alta</p> <p>(b) osservazioni da effettuare nel terzo mediano della ramificazione principale del pennacchio</p> <p>(c) osservazioni da effettuare sulla seconda ramificazione a partire dalla base del pennacchio</p> <p>(d) osservazioni da effettuare nel terzo mediano della spiga più alta, a completo sviluppo</p> <p>(e) carattere che può essere influenzato da impollinazione incrociata. Nell varietà sweet corn e popcorn, l'impollinazione incrociata andrebbe evitata</p>						

8.2. Allegato II - domanda di iscrizione

DOMANDA DI ISCRIZIONE ALLA SEZIONE
VARIETA' DA CONSERVAZIONE
DEL REGISTRO NAZIONALE DELLE VARIETA'
DI SPECIE AGRARIE E ORTICOLE

D.M. 17 dicembre 2010 "Disposizioni applicative del D.lgs 149/2009 circa le modalità per
L'ammissione al Registro Nazionale delle varietà da conservazione di specie agrarie".

Decreto n 9167 dell'11/10/2013

Dati del richiedente:

Il sottoscritto _____
Ente di appartenenza (se presente) _____
Ruolo ricoperto (se presente) _____
Indirizzo _____
Telefono e fax _____
e-mail _____

Dati relativi alla varietà da conservazione:

Denominazione botanica:
Famiglia (in latino) _____
Genere (in latino) _____
Specie (in latino) _____
Denominazione comune o nome locale della specie _____
Denominazione comune o nome locale della varietà _____
Eventuali sinonimi _____

La varietà di cui sopra figura nel catalogo comune delle varietà di specie di piante agrarie e ortive oppure è stata cancellata dal medesimo catalogo comune nel corso degli ultimi due anni o da almeno due anni a partire dalla scadenza del periodo previsto dall'articolo 17-bis, quinto comma, del decreto del Presidente della Repubblica 8 ottobre 1973, n. 1065?

SI' NO (contrassegnare l'opzione interessata)

La varietà di cui sopra è protetta da una privativa comunitaria per ritrovati vegetali prevista dai regolamenti (CE) n. 2100/94 e n. 94/2010 o da una privativa nazionale per ritrovati vegetali o è stata presentata una domanda in tal senso?

RIFERIMENTO A BREVETTO NAZIONALE?

SI' NO (contrassegnare l'opzione interessata)

Dati del responsabile del mantenimento della varietà:

Cognome e Nome _____
Ente di appartenenza (se presente) _____
Ruolo ricoperto (se presente) _____
Indirizzo _____
Telefono e fax _____
e-mail _____

Azienda/e dove viene effettuato il mantenimento:

Azienda _____
Indirizzo _____
Telefono e fax _____
e-mail _____
titolare dell'azienda _____

Dati del/i soggetto/i (es. ditta sementiera, ente di ricerca) interessato/i al mantenimento o alla valorizzazione della varietà (facoltativo):

Soggetto interessato _____
Indirizzo _____
Telefono e fax _____
e-mail _____

Dati della banca del germoplasma (se presente):

Banca del germoplasma _____
Referente _____
Indirizzo _____
Telefono e fax _____
e-mail _____

Sviluppare una relazione tecnica articolata nei seguenti punti:

- a. Spiegare come la varietà possa essere definita varietà tradizionalmente coltivata, minacciata da erosione genetica, ed ecotipo, naturalmente adattato alle condizioni locali.
- b. Spiegare come la varietà presenti un interesse per la conservazione delle risorse fitogenetiche.
- c. Descrivere la varietà sulla base di valutazioni ufficiali, non ufficiali o conoscenze acquisite con l'esperienza pratica durante la coltivazione, la riproduzione e l'impiego.
- d. Relativamente alla distinguibilità ed alla stabilità descrivere almeno i caratteri presenti nei:
 - Questionari tecnici associati ai protocolli d'esame dell'Ufficio comunitario delle varietà vegetali (UCVV), elencati, nell'allegato I della direttiva 2003/90/CR, per le specie agrarie in questione, e nell'allegato I della direttiva 2003/91/CE, per le specie ortive in questione, (reperibili sul sito www.cpvo.eu.int) oppure;
 - Questionari tecnici delle linee guida dell'Unione internazionale per la protezione delle novità vegetali (UPOV), elencate nell'allegato II della direttiva 2003/90/CE, per le specie agrarie, e nell'allegato OO della direttiva 2003/91/CE, per le specie ortive (reperibili sul sito www.upov.int).
- e. Fornire elementi relativamente al livello di omogeneità (per il quale si applicano le direttive 2003/90/CE per le specie agrarie e la 2003/91/CE per quelle ortive). Si rammenta che si applica un livello di accettazione delle piante fuori tipo del 10 per cento.
- f. Indicare la zona di origine della varietà, come definita all'art.8 del decreto legislativo n. 149/2009 per le specie agrarie e all'art. 8 del decreto legislativo n. 267/2010 per le specie ortive. Indicare il territorio comunale e provinciale. Specificare, se del caso, in quale altro Stato membro dell'Unione europea, oltre che sul territorio nazionale, è situata la zona d'origine.
- g. Fornire ed allegare notizie documentate di carattere storico e culturale volte a dimostrare il legame tradizionale tra la coltivazione della varietà da conservazione e l'ambito locale individuato.
- h. Indicare la zona/e di produzione delle sementi, come definite dall'art. 11 del decreto legislativo n. 149/2009 per le specie agrarie e all'art. 13 del D.lgs. n. 267/2010 per le specie ortive. Indicare il territorio comunale e provinciale.
- i. Indicare la superficie della zona di origine sulla quale viene effettuata la produzione delle sementi e superficie di coltivazione sulla quale si intende realizzare la produzione (nel rispetto delle restrizioni quantitative stabilite dall'allegato I del D.lgs. n. 267/2010).
- j. Specificare il quantitativo di sementi annualmente prodotte nella zona/e di origine.
- k. Indicare la zonale di commercializzazione delle sementi, come definite dall'art. 14 del decreto legislativo n. 267/2010 per le specie orticole. Indicare il territorio comunale e provinciale.

- l. Descrivere le pratiche colturali normalmente adottate, con particolare riferimento agli investimenti unitari di sementi.
- m. Illustrare i criteri adottati per il mantenimento della varietà in purezza.

Nella redazione della relazione tecnica si invita a far riferimento alle "Linee guida nazionali per la conservazione in situ, on farm ed ex situ, della biodiversità vegetale, animale e microbica di interesse agrario" adottate con Decreto del Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e forestali del 6 luglio 2012, e in particolare alle linee guida per la biodiversità vegetale. Il testo delle linee guida è disponibile sul sito www.reterurale.it e sul sito www.agricoltura.regione.lombardia.it.

Dichiarazione del richiedente

Il sottoscritto, in qualità di legale rappresentante, titolare o richiedente incaricato, in nome e per conto della Ditta di cui sopra,

a) Chiede

Di iscrivere _____ (nome comune e nome locale della varietà) alla sezione delle varietà da conservazione del Registro nazionale delle varietà agrarie ed ortive.

b) Dichiaro:

- Che tutti gli stati, qualità personali, dati ed informazioni dichiarati nella presente domanda e nei relativi allegati sono veritieri e documentabili e che gli stessi sono resi a titolo di dichiarazione sostitutiva di certificazione e dell'atto di notorietà ai sensi degli articoli 38, 46 e 47 del D.P.R. del 28/12/2000 n. 445 (Testo Unico delle disposizioni legislative e regolamentari in materia di documentazione amministrativa);
- Di essere consapevole delle sanzioni penali, previste dall'articolo 76 del DPR 445/2000 in caso di rilascio di dichiarazioni mendaci, di formazione di atti falsi od uso degli stessi, nonché dell'esibizione di un atto contenente dati non più rispondenti a verità;
- Di essere consapevole della decadenza dai benefici prevista dall'articolo 75 del DPR 445/2000 qualora in conseguenza del controllo di cui all'articolo 71 del medesimo DPR emergesse la non veridicità del contenuto della dichiarazione;
- Di impegnarsi a fornire, nel rispetto delle vigenti norme di legge, ogni informazione ritenuta necessaria dalla Regione per il corretto ed efficace svolgimento delle attività istituzionali;
- Di essere informato che, ai sensi dell'art. 13 del D.lgs. 30/6/2003, n. 196, il trattamento dei dati personali forniti in questa sede o acquisiti a tal fine dalla Regione Lombardia - Direzione Generale Agricoltura è finalizzato unicamente all'espletamento delle attività istituzionali connesse al presente procedimento relativo al rilascio di un parere relativamente all'iscrizione della varietà nella sezione varietà da conservazione del Registro nazionale delle varietà di specie agrarie e ortive ed avverrà a cura dei dipendenti incaricati del trattamento dei dati presso _____ con l'utilizzo di procedure anche informatizzate, idonee a garantirne la sicurezza e la riservatezza, nei modi e nei limiti necessari agli adempimenti relativi all'esecuzione delle predette attività, anche in caso di eventuale comunicazione a terzi. Il conferimento di tali dati è indispensabile per l'espletamento del procedimento amministrativo in oggetto e la loro mancata indicazione preclude il suo avvio;
- Di essere informato che gli sono riconosciuti i diritti di cui all'articolo 7 del D.lgs. 196/2003, in particolare il diritto di accedere ai propri dati personali, di chiederne la rettifica, l'aggiornamento e la cancellazione, se incompleti, erronei, o raccolti in violazione di legge, nonché di opporsi al loro trattamento per motivi legittimi rivolgendo le richieste a;

c) Si impegna

- A comunicare tempestivamente eventuali variazioni a quanto dichiarato nella domanda e nei documenti allegati e in particolare in relazione al possesso dei requisiti richiesti;
- Ad integrare la presente domanda nonché a fornire ogni altra eventuale documentazione necessaria, secondo quanto verrà disposto dalla normativa nazionale e regionale concernente le varietà da conservazione;

d) Allega al presente modello di domanda:

- Relazione tecnica;
- Copia dei documenti reperiti di carattere storico e culturale volte a dimostrare il legame tradizionale tra la coltivazione della varietà da conservazione e l'ambito locale individuato;

- Eventuali altri documenti ritenuti utili a fornire elementi di valutazione sulla varietà da conservazione (facoltativo).

Luogo e data _____

Timbro e firma _____

Firma (per esteso e leggibile) del richiedente/legale rappresentante (ai sensi dell'art. 38 del DPR 445/2000 apporre la firma in presenza del funzionario incaricato della ricezione della domanda, oppure allegare fotocopia fronte/retro leggibile non autenticata di un documento di identità in corso di validità del richiedente/legale rappresentante).

8.3. Allegato III - documenti storici

Andrea Messa contrada Beccarelli 28 Nasolino
Oltressenda Alta BG-IT
ph. 339.3000490 - andrea.messa@tin.it



OGGETTO VA 33 MAIS LOCALE FIORINE

DATA 14-10-2019

*TESTIMONIANZA RACCOLTA
ANDREA SPADA (ASA classe 1934)

INTERVISTA
ATA + ASA
(in Fiume Bottecchia }
{ Clusone 2015 }

Clusonese e contadino molto stimato (classe 1934) era considerato "quello che più ne sapeva in quanto franturco", in particolare su chi "una melfa gialla, con chicco arrotondato, tutulo bianco, che dava una farina molto buona, quasi dolce, ottima per una polenta con la giusta consistenza, diversa da quelle derivate da pannocchie di "quarantino" molto più piccole e che a volte non giungevano a maturazione".

- ACCOMPAGNATE
- 1) omaggiatogli della farina VA 33 Mais Fiori per polenta:
"Ho ritrovato il fu della nostra polenta"
 - 2) nel 2015 e 2016 ha coltivato nel suo orto frumento, sega e orzo di cui ATA ha fornito i semi
 - 3) non ha mai voluto provare a seminare in questi anni il VA 33

Mostrate quattro pannocchie: due di Mais locale Fiorine e due di quarantino molto simile, ha riconosciuto le più grandi come quello da loro coltivato. I loro coltivi erano su in "Sèndà", così come verso Clusone e "oltre la Sèndà" verso Piano e Ville e Ogna. Coltivazione cessate nel 1958 circa, per abbandono coltivi sia di mais che di cereali ibridi.

OPINIONI
Molto preciso nella descrizione della Varietà (colore pannocchie, colore del tutulo all'epoca delle piante, periodo di semina, etc., luoghi di coltivazione)



OGGETTO VA 33- MAIS LOCALE FIORINE

DATA 3.10.2019

"TESTIMONIANZA RACCOLTA
ALESSANDRO BALDUZZI (ABI classe 1932)

PARTICIPANTI
AMA + MCO*
+ ABI

Il COORDINATORE/AGRICOLTORE sino al 2010 ABI (classe 1932) ha sempre coltivato mais in nelle terzane delle "Bàstera", vicino al Seminano Clusone. Mostreteghi quattro tipi di pannocchie diverse tra loro ha subito riconosciuto il "mais delle Fiorine" come quello da loro sempre coltivato nei loro seminativi. Tra loro contadini si scambiavano i semi in modi di tenerlo in purezza. L'ultimo anno di coltivazione fu nel 1957 in un coltivo giù vicino alla strada verso le Conche Verdi. le pannocchie sgranate le portavano a macinare a Lerete, dopo avute lasciate ad essiccare appese dalle raccolte sino alla prima neve (verso fine di novembre). In casa usavano solo "fanne di Fiorine", e vendevano circa 25-30 q. di grano ogni anno ad un commerciante di Poivette.

NON/PATE

TESTIMONIANZA RACCOLTA NELLA DEDICATO-COLTIVO DI ABF/CFP - OPERATORE AGRICO VIA BARBARIGO - CLUSONE NEL SETT. 2015

MCO - MATTEO COLOMBO Professore presso ABF/CFP - Clusone Coordinatore corso Operatore Agricolo presente all'incontro

OPINIONI

Testimonianza molto attendibile sulle varietà coltivate. Si confonde un po' sulle date ed i luoghi.



OGGETTO V433-MILLO LOCALE FIORINE

DATA 3-10-2019

"TESTIMONIANZA RACCOLTA
BORTOLO ROTA (BRA CLASSE 1942)"

MATERIALI

ATA + BRA

NOTE

Nato nel 1942 a Clusone, contadino
in aiuto del Padre G.A. (classe 1908) che
conduceva prati e coltivi nell'Aghier
della Piana di Clusone. Ai coltivi
di: Prati Cumini, La Fopà, Sotto Cossio
coltivavano questo tipo di mais
giallo, chisso rotondo e semidureo
che chiamavano "la Melga di Fiorine"
(il "mais delle Fiorine"). Il primo
ricordo di raccolta risale a lui
bambino di 6-8 anni (1948-1950)
che scartocciavano sotto al portico.
Aneddoto: nel 1958 erano a raccogliere
alle "Fopà" quando suonarono
a feste le campane, il Padre invitò
tutti ad andare in parrocchia per
il "Te Deum" di ringraziamento:
era stato eletto S. Giovanni XXIII papa.
Ultima coltivazione nel 1961, quando
il Padre smesse attività di contadino
e lui (il BRA) emigrò in CH per
lavoro

ACQUA/ACQ

1) Molto pesante e con
una carica di
nostalgia notevole

2) ancora alla data
lo coltiva, ma con
un seme in autopsi
durione che si è
fortemente ibridato

OPINIONI

una testimonianza
molto attendibile
con ricordi di
fatti, luoghi, tempi
e persone molto
precisi.



OGGETTO VA 33 LOCALE DELLE FIORINE

DATA 19.10.2019

"TESTIMONIANZA RACCOLTA

LUIGI FERRI (LFI classe 1970) e
ALESSANDRO FERRI (AFI classe 1936)

Famiglia di contadini/pagucoltori
da sempre residenti e coltivatori dei

"PRATI MINI" alle Fiorine di Clusone,

LFI (classe 1970) ricorda bene che
ancora nel 1977 lui e le sorelle

accompagnavano il Padre AFI (classe 1913)

nelle raccolte, scartocciature a mano,

segnature con segnatrice meccanica

del granoturco, riconosciuto esattamente

nelle varietà VA 33 MAIS LOCALE FIORINE

mostrato in Fiere e Clusone.

Il seme era ricavato dalle migliori

pannocchie che il Padre sceglieva e

metteva ad essiccare sul loggiato, non

esponendolo al sole per non "bruciare"

il germe, sgranandolo scartavano

le "teste" e le "code" per tenere come

seme (che vendevano anche ad altri

contadini), solo la parte migliore.

Andavano poi a mainero i grani

per farne farine al Mulino di

Pante Norsa.

PARTICIPANTI (1) (2)

ATA + LFI + AFI

(raccolta in occasione
di Fiera di Clusone 2019)

AZIONI

1) Luigi Ferri (classe 1970)
figlio di Alessandro F.

2) Alessandro Ferri
(classe 1936) nato al
Fiorine di Clusone
e tuttora in vita

3) testimonianza da
espandere in
quanto presenza di
Padre e Figli con
ricordi chiari, precisi
e circostanziati.

OPPORTUNITA'
una testimonianza
direttamente dai
prati delle Fiorine
dove nel 1952
AURELIANO BRADOLINI
prelevò le spighe di
MAIS LOCALE FIORINE
per poi eccitarne la
varietà nel 1954
VA 33 LOCALE FIORINE