

# **Caratterizzazione genetica di sette varietà tradizionali di mais dell'Emilia Romagna**

Stagnati L.<sup>1</sup>, Soffritti G.<sup>1</sup>, Martino M.<sup>1</sup>, Corradi M.L.<sup>1</sup>, Borrelli V.M.G.<sup>1</sup>, Tabaglio V.<sup>1</sup>, Lanubile A.<sup>1,2</sup>, Canestrone R.<sup>3</sup>, Rossi G.<sup>4</sup>, Marocco A.<sup>1,2</sup>, Busconi M.<sup>1,2</sup>.



Il progetto RI.COL.MA (RICupero, Caratterizzazione, COLtivazione del Mais Antico) è finanziato dal PSR 2014-2020 della regione Emilia-Romagna. Obiettivo generale di RI.COL.MA è censire, recuperare, conservare e caratterizzare dal punto di vista morfologico, genetico, agronomico e tecnologico le varietà di mais tradizionali presenti in Emilia Romagna, abbandonate da tempo dalle grandi colture e che rappresentano fonti di variabilità genetica per caratteristiche qualitative della granella e per l'adattamento all'ambiente. Le informazioni ottenute saranno rese disponibili attraverso attività di disseminazione e formazione che permetteranno alle aziende che intendono utilizzare le varietà tradizionali di mais di sviluppare nuove filiere produttive e, nello stesso tempo, di conservare il patrimonio storico e culturale alla base della biodiversità maidicola. Il progetto vede coinvolte l'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, l'Università degli Studi di Pavia, il Centro Ricerche Produzioni Vegetali, e 8 aziende agricole emiliano-romagnole.

Il germoplasma maidicolo italiano è estremamente ricco e diversificato e costituito da 565 diverse accessioni campionate durante gli anni '50 a cui se ne aggiungono molte altre recuperate più recentemente.

Questa immensa collezione varietale è stata classificata sulla base dei caratteri morfologici della spiga e della granella in 9 complessi razziali denominati:

**Ottofile e derivati**, presente sia nella Pianura Padana occidentale sia nelle vallate Appenniniche del versante Ligure; **Cilindrici Medi del Sud** diffusi lungo le vallate adriatiche; **Cilindrici tardivi**, caratterizzati da granella bianca e diffusi nelle aree più fertili del meridione; **Conici** a ciclo breve, di ridotta taglia, adatti alla coltivazione in condizione pluviale non irrigua a siccità prolungata o alte vallate alpine di Veneto e Trentino; I, appartenenti al complesso razziale degli **Insubri**, dei peneplani Padani della riva sinistra del Po ospitano agroecotipi di ciclo medio-tardivo e taglia medio-alta; **Microsperma**, a spiga subcilindrica diffusi nelle zone pedoalpine; con granella vitrea arancione; mais vitrei bianchi tipo **Perla** e quello dei **Dentati** che si sono originati nel corso dei secoli in Veneto e in Friuli; **mais da scoppio o pop-corn** che hanno sempre avuto una diffusione e coltivazione strettamente ortiva.

La nascita della biologia molecolare, durante gli anni '80, con i suoi recenti sviluppi, abbattimento dei costi di analisi ed esponenziale aumento delle informazioni ricavabili da ogni singola analisi, hanno reso superata la classificazione basata solamente su caratteri morfologici. Negli ultimi anni si è assistito a una vera e propria riorganizzazione di tutta la sistematica vegetale con diverse modifiche all'attribuzione di specie e famiglie.

Nell'ambito del progetto RICOLMA si sta procedendo all'analisi della variabilità presente nelle diverse accessioni di mais tradizionali. La conoscenza della variabilità genetica all'interno della collezione ha molteplici obiettivi:

- Individuare rapporti di affinità tra accessioni diverse
- Stabilire il grado di eterozigosità e la struttura genetica di una certa popolazione al fine di individuare le migliori strategie di mantenimento in purezza
- Ottenere un profilo molecolare da utilizzare per l'iscrizione ai registri di conservazione varietale e da utilizzare per la tracciabilità delle produzioni agroalimentari

La variabilità genetica delle popolazioni in esame è stata analizzata mediante l'utilizzo di marcatori molecolari denominati SSR (sequenze ripetute semplici o microsatelliti). Si tratta di regioni di DNA costituite dalla ripetizione di  $n$  volte di un motivo di base di lunghezza compresa tra 1 e 6 pb.

Si tratta di marcatori molecolari presenti in tutti gli organismi viventi (compreso l'uomo); si stima che, nel mais siano presenti, in media, 150 regioni SSR ogni milione di nucleotidi del DNA.

Gli SSR sono comunemente utilizzati nei test di paternità, nella tracciabilità delle produzioni agro alimentari, nello studio della variabilità genetica all'interno delle popolazioni e nell'attribuzione varietale.

È importante sottolineare che, contrariamente a molte varietà moderne in coltivazione che sono monogenotipiche, in quanto costituite da individui tutti geneticamente identici tra di loro, le varietà tradizionali sono poligenotipiche, costituendosi, di fatto, come popolazioni, cioè come gruppi di individui caratterizzati da un fenotipo più o meno definito ma tutti differenti, tra di loro, a livello del DNA. Di conseguenza, per caratterizzare geneticamente le varietà locali di mais, e definire le relazioni con le altre varietà, non è sufficiente caratterizzare un singolo individuo ma si rende necessaria l'analisi di alcune decine di piante. In questo modo è possibile avere un'idea della variabilità presente all'interno della varietà e ottenere un profilo genetico medio della varietà. A partire da queste indicazioni si può procedere con lo studio delle relazioni tra varietà.

### **Fase sperimentale**

La fase sperimentale ha riguardato: 1) la raccolta, durante il primo anno di progetto, delle porzioni di foglia da ciascuna pianta coltivata per tutte le varietà di mais del progetto RICOLMA; sono stati raccolti 1867 campioni. Da queste porzioni di foglia è stato estratto il DNA da utilizzare per le analisi genetiche con i marcatori SSR. 2) l'analisi del DNA, similmente a quanto fatto nelle analisi forensi, mediante allestimento di reazioni di PCR (Reazione a Catena della Polimerasi). Questa reazione rende semplice l'analisi del DNA anche in presenza di concentrazioni di DNA estremamente ridotte.

3) l'analisi dei prodotti della reazione di PCR, la rilevazione dei risultati e la loro elaborazione statistica per ottenere il profilo genetico dei singoli individui e la definizione delle relazioni esistenti tra i singoli individui all'interno delle varietà e tra le diverse varietà in esame.

### **Principali risultati**

#### **Albero filogenetico**

Le analisi molecolari sono state eseguite su tutte le varietà elencate in Tabella 1. Al momento attuale i rilievi sono ancora in corso e si presentano, a titolo esemplificativo i risultati ottenuti analizzando 7 diverse accessioni: Va222, Va223, Va224, Va225, Va226, EMR03, EMR04.

I risultati delle reazioni di PCR sono stati utilizzati per ottenere una matrice di distanza genetica tra i diversi individui esaminati e dipingere il quadro delle relazioni di parentela esistenti all'interno delle varietà e tra le differenti varietà e per evidenziare possibili rapporti di affinità e discendenza tra le

diverse accessioni. Uno dei modi per rappresentare le relazioni genetiche esistenti tra individui è attraverso l'ottenimento di un albero filogenetico, cioè di un diagramma che mette in evidenza le relazioni di parentela tra i gruppi di organismi in esame. Nell'albero ottenuto per il mais, le varietà, e tutti gli individui che ne appartengono, sono rappresentate con colori differenti: verde (EMR04, mais "Rosso di Rasora"), rosso (EMR03, mais "Cinquantino rosso"), viola (Va222, mais "Ferragostano"), nero (Va223, mais "Piacentino o nostrano"), blu (Va224, mais "Nostrano"), giallo (Va225, mais "Nano precoce") e rosa (Va226, mais "Agostano").

Da un primo esame dell'albero (Figura 1) è possibile notare che:

- La varietà EMR03 (Mais Cinquantino Rosso) tende a raggrupparsi piuttosto bene, rimane qualche individuo "isolato" che va a posizionarsi tra individui di varietà diverse. Il grosso gruppo di EMR03 è suddiviso in 4 cluster principali inframmezzati da qualche individuo di varietà differenti. Questa situazione è indice di un buon isolamento riproduttivo, rispetto alle altre varietà in esame, che ne ha mantenuto l'identità genetica.
- Gli individui appartenenti alla varietà EMR04 (Mais "Rosso di Rasora") sono quelli che si staccano maggiormente da tutto il resto della collezione analizzata. Si vede chiaramente un grosso gruppo (in verde), praticamente senza soluzioni di continuità, se non per l'inserimento di 5 individui di EMR03 mentre 4 individui EMR04 si trovano collocati in EMR03. È interessante notare come il cluster EMR04 insista su una ramificazione indipendente presente nell'albero filogenetico e non abbia interconnessioni con le altre accessioni analizzate. La particolarità ed unicità di questa accessione era già stata ipotizzata in quanto non presenta i caratteri morfologici "tipici" delle varietà tradizionali come la granella gialla, le foglie inserite con angolo ampio sul fusto e pennacchio espanso e voluminoso. Inoltre, non esistono materiali simili, o comunque a granella rossa nel germoplasma emiliano-romagnolo campionato nel 1954. Le informazioni storiche su questa accessione sono piuttosto frammentarie e legate a ricordi personali. La letteratura maidicola di inizio secolo riporta la presenza massiva di germoplasma a cariossidi bianca, gialla, giallo-aranciata o rosso-aranciata (Zapparoli, 1930) mentre nella Collezione Sernagiotto è citato un mais a cariossidi nera che si coltiva in Friuli, in provincia di Brescia e in altre zone; la polenta che se ne ottiene è poco attraente ma di buone caratteristiche organolettiche (Tabaglio & Marocco, 2012). Ancora più che per la varietà "Cinquantino rosso", questi risultati supportano l'isolamento riproduttivo della varietà che ne ha mantenute particolarmente stabili le caratteristiche.
- La situazione appare decisamente più "confusa" per le accessioni Va222-Va226. Ad un primo esame dell'albero le Va sembrano mischiarsi abbastanza casualmente. Ad un esame più attento si notano, invece, dei gruppi principali che si possono far corrispondere con le Va

esaminate. È comunque da sottolineare la notevole presenza di individui o gruppi in individui, che vanno a inserirsi all'interno di cluster di altre varietà. La situazione descritta, con una marcata circoscrizione delle varietà EMR e una più labile definizione di cluster corrispondenti a una determinata Va, potrebbe essere spiegata da:

- Flusso genico dovuto all'origine storica del materiale. Al momento del campionamento delle Va, 1954, il mais era decisamente più coltivato anche nelle zone collinari o montane da cui diverse di queste varietà derivano. È possibile ipotizzare che esistesse un continuo rimescolamento del corredo cromosomico tra materiali coltivati nelle vicinanze che, per qualsivoglia motivo, non siano poi stati campionati. Parimenti si avrebbe la circoscrizione marcata di EMR03 ed EMR04 per isolamento riproduttivo. Da circa 50-60 anni, nelle zone di origine delle varietà, la maiscoltura è pressoché assente impedendo rimescolamento degli alleli e portando a fissare i caratteri più utili in una particolare zona.

- Interscambio di materiale tra agricoltori. Fino al secondo dopoguerra l'industria sementiera era pressoché inesistente e solo i Consorzi Agrari disponevano di sementi di varietà migliorate. La maggior parte delle coltivazioni veniva effettuata con seme autoprodotta, spesso in maniera erronea (Zapparoli, 1930), dai singoli agricoltori. Era anche diffusa la pratica del "Fare San Martino" dove la famiglia contadina era costretta al trasloco alla fine dell'annata agraria (11 di novembre) per trasferirsi presso un altro podere. Questa pratica era diffusa nella Pianura Padana e nelle aree limitrofe. Non è da escludere che qualche famiglia portasse con sé della semente delle colture che era solita praticare e potrebbe aiutare a spiegare l'origine del nome "Piacentino" assegnato alla Va223 rinvenuta a Salsomaggiore (PR) a pochi chilometri dal confine con Piacenza. Questa ipotesi potrebbe spiegare la notevole dispersione di Va223 all'interno delle altre varietà della Provincia di Parma. In mais, una simile diffusione del germoplasma è riportata nella seconda metà dell'800 ad opera della famiglia Reid. Dal germoplasma familiare (Gordon Hopkins) incrociato (più o meno involontariamente) con Little Yellow originò la famosa varietà Reid Yellow Dent da cui derivò la popolazione Iowa Stiff Stalk Synthetic perno fondamentale della maiscoltura mondiale delle zone temperate (Troyer, 2000).

- Casi di omonimia (stesso nome per genotipi differenti). Le varietà locali, in quanto tali, sono caratterizzate da un nome proprio che le rende riconoscibili in una determinata area. Spesso si parla di varietà "Nostrane" o "Locale" ad indicare l'appartenenza ad un determinato areale ed applicando lo stesso termine anche per varietà di origine diversa. Tra le varietà della collezione questa dicitura appare per almeno otto varietà. Per le varietà di cui si dispone dei marcatori SSR si parla di "nostrano" sia per Va223 che Va224. Nell'albero filogenetico le due

accessioni sono abbastanza ben separate, anche se alcuni individui si inseriscono reciprocamente, lasciando supporre una possibile omonimia. La presenza di designazioni come “Nostrano” o “Locale” attribuita a materiali diversi è presente anche nel germoplasma maidicolo lombardo (Bertolini et al., 2002).

- Inadeguata conservazione. La situazione che si è verificata con le Va potrebbe anche essere dovuta a una contaminazione accidentale delle accessioni con polline estraneo. La lunga conservazione del seme presso le banche del germoplasma richiede un periodico rinnovo della semente in appositi campi di mantenimento. Vista la natura allogama del mais e l'impossibilità spaziale di isolare le varietà in campi diversi si procede con impollinazioni controllate mediante imbustamento delle spighe e successiva impollinazione manuale. Gli operatori sono generalmente esperti e riescono ad operare senza inquinare le spighe su cui operano ma, vista la lunga conservazione e vista l'abbondanza di polline prodotto da una pianta di mais e anche la difficoltà operativa richiesta, non è possibile escludere anche la contaminazione accidentale.

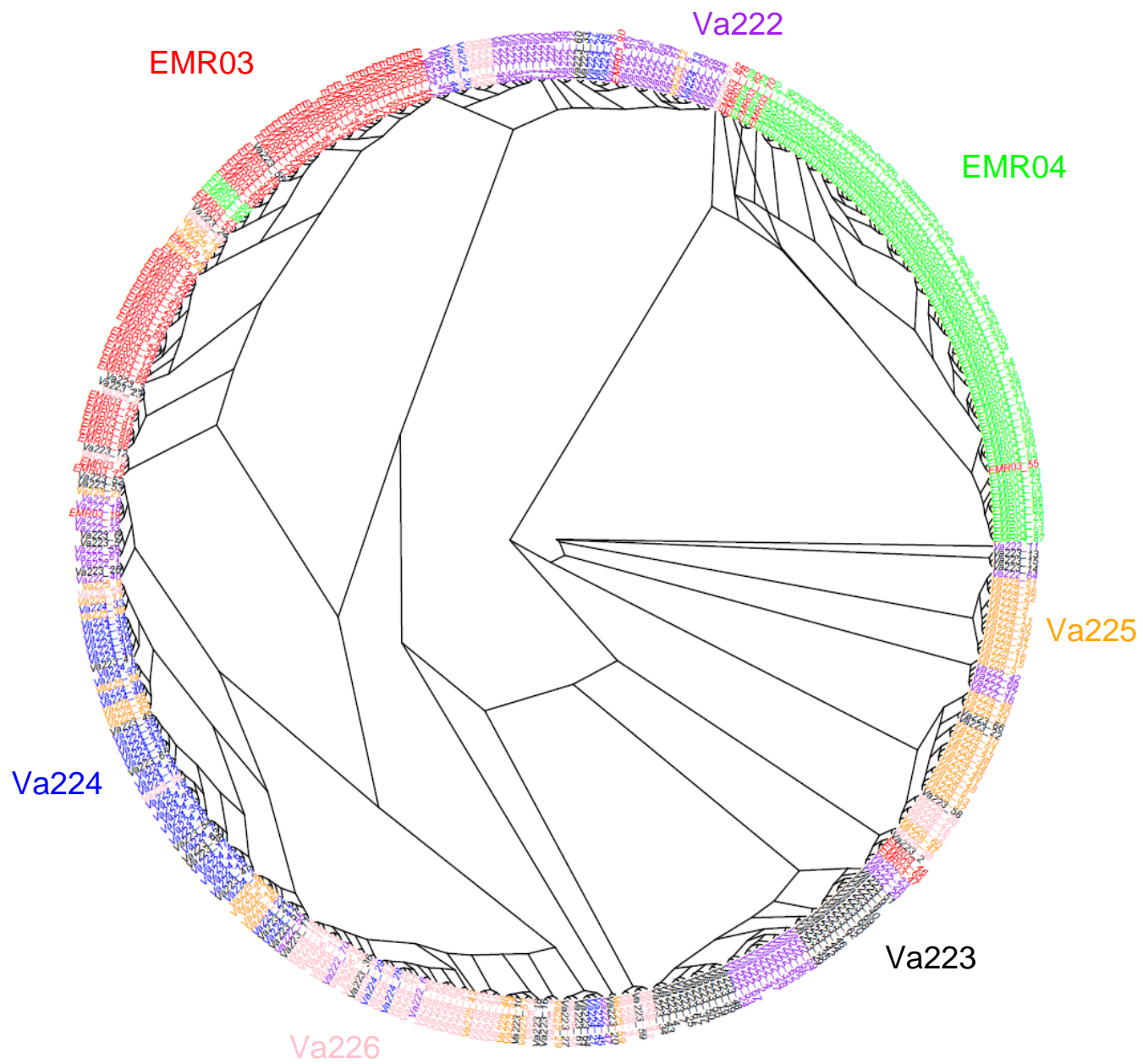


Figura 1. Albero filogenetico.



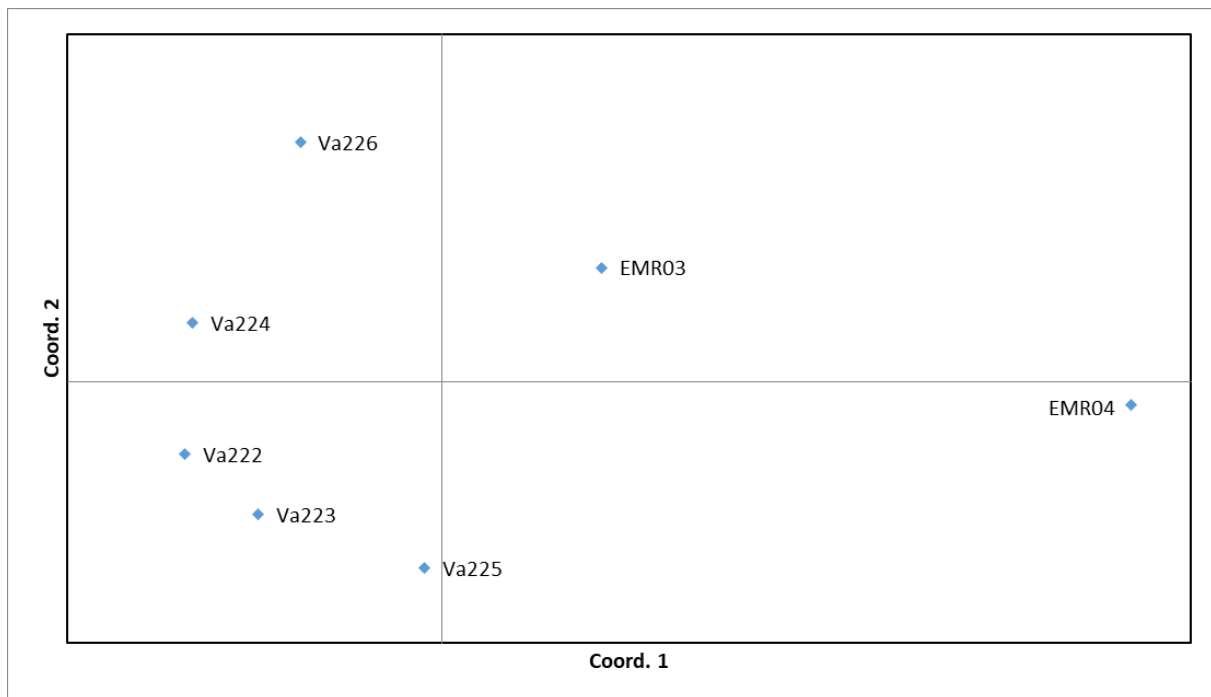


Figura 2. Analisi delle Coordinate Principali (PCoA).

I dati genetici ottenuti sono stati ulteriormente analizzati per ottenere una rappresentazione PCoA.

L'Analisi delle Coordinate Principali (PCoA) è una tecnica di analisi statistica multivariata che permette di identificare e tracciare i modelli principali, in questo caso la distribuzione delle varietà, all'interno di un dataset multivariato, i dati raccolti con le analisi del DNA, rappresentandoli in uno spazio con bi o tridimensionale.

In questo caso l'Analisi delle Coordinate Principali, è stata condotta a partire da una matrice di distanza genetica media tra le popolazioni (Figura 2) dove si può notare come ci sia una netta separazione tra le Va e gli EMR.

La varietà EMR04 è quella più distante dalle altre. Anche l'albero filogenetico rivelava che questa varietà è un unicum anche per la sua particolare morfologia che la rende unica nel panorama emiliano-romagnolo; inoltre essendo coltivata a Rasora (BO) è geograficamente ben isolata e quindi meno soggetta ad incroci con altre varietà. EMR03 si trova in una posizione intermedia, sia geograficamente (RE) che geneticamente e morfologicamente; si pensa quindi che funga da "transizione" anche per la presenza di caratteri morfologici più "vecchi" e spighe di colore compatibile con i gusti preponderanti della metà del 1900.

Le varietà originarie della provincia di Parma (Va222, Va223, Va224) sono abbastanza raggruppate, anche se possiamo notare come la Va222, nonostante si trovi geograficamente ben distaccata dalle Va223 e Va224, geneticamente si trova in una posizione intermedia tra le due.

Le varietà campionate nella provincia di Piacenza (Va225 e Va226) presentano una situazione particolare, in quanto nonostante siano geograficamente molto ravvicinate, presentano una distanza



genetica molto elevata. Anche nell'albero filogenetico queste varietà sono piuttosto distanti. La maggior parte degli individui Va225 formano un gruppo che si separa precocemente dagli altri cluster ed immediatamente dopo alla separazione del Mais di Rasora.

Nonostante si tratti di dati parziali, la PCoA ottenuta presenta delle caratteristiche molto interessanti come l'orientamento secondo un'asse geografico che segue idealmente lo sviluppo della regione, con l'inversione Piacenza-Parma. Questa situazione merita di essere approfondita inserendo altre varietà, geograficamente più distanziate, da quelle finora caratterizzate.

## Bibliografia

- Bertolini M., Verderio A., Motto M., Berardo N., BRUNA E., & BALDUINI C. Mais in Lombardia: varietà tradizionali. Quaderni della ricerca. Milano, Bergamo: Regione Lombardia, Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Sezione di Bergamo (2002).
- Tabaglio V., & Marocco A. La Collezione Sernagiotto-Raccolta di semi di piante agrarie e infeste (pp. 1-280). Università Cattolica del Sacro Cuore (2012).
- Troyer, A.F.. (2000). Temperate Corn — Background, Behavior, and Breeding. 393-466. 10.1201/9781420038569.ch14.
- Zapparoli T.V. 1930. Il Granoturco. Biblioteca Agricola "Paravia", G.B. Paravia & C., Torino.

<b>Codice</b>	<b>Varietà</b>	<b>Origine</b>	<b>Piante analizzate</b>
EMR10	Mais di Scavolino	Rimini	79
EMR06	Mais da Scoppio	Ravenna	74
Va211	Dente di Cavallo Nostrano	Forlì-Cesena	70
Va212	Ottofile	Forlì-Cesena	73
Va213	Cinquantino	Forlì-Cesena	68
Va214	Locale Rocca di S. Casciano	Forlì-Cesena	70
Va215	Giallo Nostrano	Forlì-Cesena	70
Va216	Giallo Comune	Forlì-Cesena	70
Va217	Spinato	Forlì-Cesena	70
Va218	Nostrano	Forlì-Cesena	70
EMR07	Mais di S. Sofia	Forlì-Cesena	62
EMR04	Rosso di Rasora	Bologna	93
Va219	Nostrano Locale	Modena	70
Va220	Cinquantino Bianco	Modena	68
EMR01	Tagliolino	Reggio Emilia	70
EMR03	Cinquantino Rosso	Reggio Emilia	90
Va221	Turco	Parma	70
Va222	Ferragostano	Parma	70
Va223	Piacentino o Nostrano	Parma	70
Va224	Nostrano	Parma	52

Va225	Nano Precoce	Piacenza	62
Va226	Agostano	Piacenza	62
Va227	Agostano 16 ranghi	Piacenza	59
Va228	Ottofile	Piacenza	61
Va229	Piacentino	Piacenza	66
Va230	Nostrano	Piacenza	63
Va231	Nostrano Ottofile	Piacenza	65