

Titolo del progetto:

Filiera MaisTrac: dal seme alla farina

Relazione finale

INDICE

1. Presentazione del progetto	3
2. Sintesi delle attività svolte	4
3. Risultati conseguiti	5
3.1 Sottoprogetto 1 – <i>Realizzare e coordinare una F. O. C. per la realizzazione di una filiera sostenibile di produzione di farine di vecchie varietà di mais piemontesi.</i>	5
3.1.1 Risultati ottenuti	5
3.1.1.1 Attività 1.1- <i>Coinvolgimento e coordinamento delle aziende nella Filiera di produzione e trasformazione</i>	5
3.1.1.2 Attività 1.2- <i>Costituzione e coordinamento dell'Associazione Temporanea di Scopo (ATS)</i>	6
3.1.1.3 Attività 1.3- <i>Stesura di un disciplinare per la certificazione della filiera di produzione di antichi mais</i>	7
3.2 Sottoprogetto 2 – <i>Organizzare filiere per la produzione di farina di mais tradizionali piemontesi dal seme al trasformato, tramite disciplinare di produzione e caratterizzazione genetica</i>	8
3.2.1 Risultati ottenuti	8
3.2.1.1 Attività 2.1- <i>Monitoraggio del progetto e coordinamento delle attività</i>	15
3.2.1.2 Attività 2.2- <i>Pianificazione colturale e reperimento del seme necessario in relazione alle superfici e disponibilità individuate nel sottoprogetto 1.1.</i>	15
3.2.1.3 Attività 2.3- <i>Coltivazione di tre ecotipi di mais piemontesi e monitoraggio dei campi sperimentali</i>	16

3.2.1.4 Attività 2.4- <i>Identificazione delle piante caratterizzate dalla maggiore uniformità genetica per la produzione della semente</i>	18
3.2.1.5 Attività 2.5- <i>Coordinamento e monitoraggio del pre e del post raccolta e produzione della semente</i>	18
3.2.1.6 Attività 2.6- <i>Trasformazione e valutazione dei parametri qualitativi delle farine</i>	20
3.2.1.7 Attività 2.7- <i>Produzione, confezionamento, e distribuzione del prodotto</i>	20
3.2.1.8 Attività 2.8- <i>Verifica di gradimento dei consumatori.</i>	20
3.2.1.9 Attività 2.9- <i>Trattamento ed elaborazione dati, predisposizione relazioni e rendicontazione</i>	21
3.3 Sottoprogetto 3 – <i>Messa a punto di un protocollo di analisi molecolare per la tracciabilità degli ecotipi piemontesi di mais</i>	22
3.3.1 Risultati ottenuti	22
3.3.1.1 Attività 3.1- <i>Caratterizzazione molecolare degli ecotipi locali di mais</i>	27
3.3.1.2 Attività 3.2- <i>Sviluppo di marcatori per il rilievo della presenza di ibridi commerciali nelle farine di mais locali</i>	28
3.3.1.3 Attività 3.3- <i>Validazione delle forme alleliche identificate e messa a punto di un protocollo per l'identificazione di possibili contraffazioni</i>	28
4. Ulteriore documentazione e allegati	29
4.1 Allegati Sottoprogetto 1	29
4.1.1 Disciplinare di produzione dell'Associazione Antichi Mais Piemontesi	29
4.2 Allegati Sottoprogetto 2	40
4.2.1 Schede descrittive degli ecotipi coltivati nell'ambito del progetto e schede rilievo dati	40
4.2.2 Protocollo per l'estrazione del DNA da pianta	42
4.2.3 Protocollo AFLP	42
4.2.4 Figure Sottoprogetto 2	45
4.3 Allegati Sottoprogetto 3	48
4.3.1 Protocollo SSR	48
4.3.2 Figure Sottoprogetto 3	49
4.3.3 Protocollo per l'estrazione del DNA da farina	55
5. Milestones e Deliverables	56

1. Presentazione del progetto

Il Progetto "*Filiera MaisTrac: dal seme alla farina*" ha coinvolto Aziende agricole e di trasformazione nell'ambito dell'associazione *Antichi Mais Piemontesi* ed è stato coordinato dal Dipartimento DISAFA dell'Università degli Studi di Torino (settore Genetica Agraria) con la consulenza tecnica AIAB (Associazione Italiana per l'Agricoltura Biologica). L'associazione *Antichi Mais Piemontesi*, nata nel 2004, ha diffuso negli ultimi dieci anni la cultura di una produzione sostenibile del mais tramite la formazione dei propri soci sulle più appropriate tecniche di coltivazione e gestione del post raccolta per l'ottenimento di un prodotto qualitativamente adeguato e tramite l'informazione diretta ai consumatori. Questo ha permesso di aumentare il numero di aziende agricole associate e la superficie coltivata con antiche varietà di mais piemontesi (*Ottofile giallo, Ottofile rosso, Ottofile bianco, Ostenga, Nostrano dell'Isola, Pignoletto giallo e Pignoletto rosso*). Gli aspetti critici della filiera di produzione e le possibili strategie di miglioramento sono stati indagati ed individuati negli anni grazie alla stretta collaborazione dell'Associazione con i tecnici del CRAB (attualmente facenti parte del gruppo tecnico di AIAB) e del DISAFA settore Genetica Agraria. I risultati ottenuti nell'ambito delle ricerche svolte in precedenza hanno fornito informazioni preliminari per la definizione di criteri da adottare per il corretto campionamento di materiali, allo scopo di conservare gli ecotipi 'ex situ', e per l'identificazione delle provenienze, caratterizzate da una sufficiente omogeneità genetica e pertanto da una maggior stabilità dal punto di vista quali-quantitativo, cui destinare priorità in programmi di conservazione del germoplasma 'in situ – on farm'.

A partire da tali presupposti, il presente progetto ha avuto come finalità (i) l'organizzazione di una filiera locale per la produzione di seme da antiche varietà di mais, fornendo la possibilità per gli agricoltori piemontesi di inserirsi in filiere corte cerealicole attualmente non presenti sul nostro territorio, con un beneficio sia di tipo economico (prezzi concordati a livello locale e non a livello sovranazionale) sia di tipo ambientale (minor produzione di gas ad effetto clima alterante legata ai trasporti sulle medie e lunghe distanze); (ii) il miglioramento tecnico produttivo, la coltivazione sostenibile, e la stesura di un disciplinare di produzione che definisca le metodologie da seguire su tutta la filiera, dalla produzione del seme al prodotto trasformato; (iii) la caratterizzazione accurata degli ecotipi allo scopo di disporre di semente di ecotipi tradizionali non reperibili diversamente sul mercato sementiero e migliorate, sotto l'aspetto dell'uniformità genetica, rispetto al materiale di partenza; (iv) la valorizzazione delle farine dal punto di vista qualitativo e la messa a punto di un idoneo protocollo per la loro tracciabilità, per avere la possibilità di identificare possibili contraffazioni nell'ambito dei prodotti alimentari (farine da polenta, prodotti da forno) commercializzati, in modo fraudolento, come prodotti 'locali' o 'tradizionali' derivanti dalla trasformazione della granella di ecotipi di mais piemontesi.

Più in particolare, il progetto *MaisTrac*, si è posto i seguenti obiettivi specifici:

- allestimento di campi finalizzati alla produzione di seme ecotipi locali di mais da polenta ed alla selezione conservativa, attuata anche in forma partecipata
- caratterizzazione genetica degli ecotipi in coltivazione
- miglioramento della tecnica produttiva degli ecotipi locali
- produzione di seme di ecotipi locali di mais caratterizzato da un idoneo livello di uniformità genetica
- miglioramento delle tecniche di essiccazione e conservazione del mais per garantire una qualità elevata
- messa a punto di un protocollo di analisi molecolare per l'identificazione di possibili contraffazioni da ibridi commerciali
- pianificazione di protocollo di analisi molecolare per la tracciabilità degli ecotipi piemontesi di mais

2. Sintesi delle attività svolte

Le attività condotte nell'ambito del progetto *MaisTrac* sono state ripartite in 3 sottoprogetti e, con riferimento agli obiettivi generali del progetto, possono essere così sintetizzate:

Sottoprogetto 1 – Realizzare e coordinare una F. O. C. per la realizzazione di una filiera sostenibile di produzione di farine di vecchie varietà di mais piemontesi:

- Coordinamento dei partner nella filiera di produzione e trasformazione mediante incontri necessari alla costruzione delle relazioni fra i soggetti partecipanti al progetto e, conseguentemente, della filiera di produzione di farine di vecchie varietà di mais;
- istituzione dell'ATS denominata "MaisTrac: dal seme alla farina" fra i partner partecipanti al progetto;
- rielaborazione del disciplinare di produzione dell'associazione *Antichi Mais Piemontesi* e stesura di un nuovo disciplinare per la certificazione della filiera di produzione di antichi mais.

Sottoprogetto 2 – Organizzare filiere per la produzione di farina di mais tradizionali piemontesi dal seme al trasformato, tramite disciplinare di produzione e caratterizzazione genetica:

- monitoraggio e coordinamento delle attività mediante incontri tra i partner prima della semina, prima della raccolta, dopo la molitura e alla chiusura del progetto;
- reperimento del seme degli ecotipi locali, valutazione della sua qualità e pianificazione colturale;
- coltivazione di tre ecotipi di mais piemontesi e monitoraggio dei campi sperimentali;
- selezione in ogni azienda, con un approccio di selezione partecipativa, delle piante che meglio hanno risposto alle caratteristiche pedoclimatiche del luogo;
- caratterizzazione genetica delle piante selezionate e identificazione delle piante contraddistinte dalla maggiore uniformità genetica per la produzione della semente;
- raccolta manuale delle spighe, ottenimento della semente, essiccazione e stoccaggio;
- valutazione dei parametri qualitativi delle farine, analisi delle componenti nutrizionali e analisi della presenza di micotossine;
- trasformazione mediante macinatura integrale del della granella mezzo di macine in pietra.
- produzione, confezionamento e distribuzione del prodotto;
- elaborazione dei dati di caratterizzazione molecolare;
- divulgazione dei risultati ottenuti e verifica del gradimento dei consumatori mediante un incontro conclusivo finale rivolto a consumatori, trasformatori e produttori.

Sottoprogetto 3 – Messa a punto di un protocollo di analisi molecolare per la tracciabilità degli ecotipi piemontesi di mais

- caratterizzazione molecolare degli ecotipi locali di mais coltivati nell'ambito del progetto e confronto con i materiali in conservazione presso la Banca del Germoplasma del DISAFA;
- sviluppo di marcatori per il rilievo della presenza di ibridi commerciali nelle farine di mais locali mediante il confronto tra ecotipi locali e varietà ibride F1 a granella vitrea diffuse sul territorio nazionale;
- validazione delle forme alleliche identificate e messa a punto di un protocollo per l'identificazione di possibili contraffazioni applicabile all'analisi delle farine.

3. Risultati conseguiti

3.1 Sottoprogetto 1 – *Realizzare e coordinare una F. O. C. per la realizzazione di una filiera sostenibile di produzione di farine di vecchie varietà di mais piemontesi.*

3.1.1 Risultati ottenuti

L'associazione produttori *Antichi Mais Piemontesi* ha un disciplinare di produzione che definisce: le caratteristiche delle varietà di mais piemontesi, l'area di produzione, l'origine e le caratteristiche dei trasformati a base di antichi mais, le linee per l'etichettatura ed il confezionamento. La necessità di migliorare la qualità dei prodotti, valorizzare il lavoro dei produttori, tutelare da possibili frodi le produzioni dei soci che si avvalgono del logo identificativo "*Antichi Mais*" hanno indotto ad apportate integrazioni al disciplinare esistente, tenendo conto delle attività svolte nell'ambito del progetto. In particolare le integrazioni hanno riguardato:

- una maggiore precisione nella descrizione degli ecotipi;
- l'inserimento di informazioni più dettagliate nell'Art.4 sulle Modalità di ottenimento del prodotto;
- l'inserimento di informazioni più dettagliate nell'Art.9 sulle Modalità di moltiplicazione e produzione del seme;
- l'inserimento di un articolo sulla tracciabilità tramite analisi genetica per la tutela da eventuali contraffazioni.

Il disciplinare di produzione integrato vuole essere uno strumento utile ai produttori per avere linee guida dettagliate e sperimentate sulle corrette tecniche di coltivazione, essiccazione, conservazione e produzione di seme di varietà locali di mais. E' altresì uno strumento di tutela per i consumatori che possono riconoscere attraverso il logo Antichi mais le caratteristiche intrinseche di qualità degli ecotipi locali, il legame con il territorio di produzione la salvaguardia della biodiversità maidicola piemontese.

Il nuovo disciplinare di produzione è incluso nella presente relazione **punto 4.1.1**

3.1.1.1 Attività 1.1- *Coinvolgimento e coordinamento delle aziende nella Filiera di produzione e trasformazione*

Responsabile: DISAFA – consulenza tecnica AIAB

Partner partecipanti: DISAFA, Az. Agricola Zappino, Az. Agricola Caretto, Mulino di Piova

3.1.1.1.1 Partner DISAFA: Ha coordinato le fasi iniziali del progetto (in un periodo precedente all'approvazione dello stesso) organizzando alcuni incontri necessari alla costruzione delle relazioni fra i soggetti partecipanti al progetto e, conseguentemente, della filiera di produzione di farine di vecchie varietà di mais. Attraverso tali incontri è stato possibile dimensionare le superfici seminabili, valutare le produzioni ottenibili, la capacità di lavoro delle attrezzature di essiccazione e molitura. In tali occasioni è stato inoltre possibile cominciare a definire vari aspetti legati alla logistica, al conferimento, ai prezzi, ai trasporti, ecc...

3.1.1.1.2 Partner Az. Agricola Zappino: Ha partecipato agli incontri preliminari di coinvolgimento e coordinamento mettendo a disposizione l'esperienza pluriennale nella coltivazione e moltiplicazione del seme dell'ecotipo *Ottofile giallo*. Sulla base delle esperienze pregresse e delle richieste che periodicamente pervengono all'Associazione *Antichi Mais*, è stato stabilito che per la produzione di seme di *Ottofile giallo* sarebbe stata sufficiente una superficie di circa 1000 mq, dalla quale raccogliere circa 300 kg di seme. L'essiccatore ad aria calda presente in azienda è stato ritenuto idoneo alla corretta essiccazione della granella destinata alla produzione di farina. E' stato definito che una parte della granella prodotta dall'azienda sarebbe stata consegnata al Mulino di Piova per la

conduzione delle attività previste al punto 2.6. La restante produzione, quella riservata alla trasformazione in farina destinata alla vendita, consegnata e trasformata da un mulino a pietra presente sul territorio in prossimità dell'azienda. I prezzi di vendita della granella sono definiti direttamente tra le parti coinvolte, in prezzo di vendita al dettaglio delle farine è concordato a livello associativo e definito, come prezzo minimo per ogni kg di farina, all'interno del disciplinare dell'Associazione.

3.1.1.1.3 Partner Az. Agricola Caretto: Ha partecipato agli incontri preliminari di coinvolgimento e coordinamento. La superficie aziendale da destinare alla coltivazione in purezza è stata definita in base alla disponibilità di seme con caratteristiche di uniformità adeguata di due ecotipi *Nostrano dell'isola* e *Pignoletto rosso*. Nel caso del *Nostrano* è stato individuato un appezzamento di 3500 mq, mentre per il *Pignoletto rosso* sono stati scelti due appezzamenti per un totale di 1300 mq.

L'essiccatoio ad aria calda presente in azienda è stato ritenuto idoneo all'essiccazione della granella destinata alla produzione di farina ed allo svolgimento delle attività previste nel punto 2.5. L'intera produzione aziendale sarà trasformata dal Mulino di Piova. I prezzi di vendita della granella sono definiti direttamente tra le parti coinvolte, in prezzo di vendita al dettaglio delle farine è concordato a livello associativo e definito, come prezzo minimo per ogni kg di farina, all'interno del disciplinare dell'Associazione.

3.1.1.1.4 Partner Mulino di Piova: Ha partecipato agli incontri preliminari di coinvolgimento e coordinamento. Ha contribuito alla definizione delle superfici dedicabili ad ogni singolo ecotipo per la produzione di seme e di granella in base alla uniformità del seme disponibile ed alle richieste del mercato. Ha fornito indicazioni sulla adeguatezza delle attrezzature aziendali per l'essiccazione e sulle quantità di granella necessarie per la conduzione delle attività previste al punto 2.6. I prezzi di vendita della granella sono definiti direttamente tra le parti coinvolte, in prezzo di vendita al dettaglio delle farine è concordato a livello associativo e definito, come prezzo minimo per ogni kg di farina, all'interno del disciplinare dell'Associazione.

3.1.1.2 Attività 1.2- Costituzione e coordinamento dell'Associazione Temporanea di Scopo (ATS)

Responsabile: DISAFA – consulenza tecnica AIAB

Partner partecipanti: DISAFA, Az. Agricola Zappino, Az. Agricola Caretto, Mulino di Piova

3.1.1.2.1 Partner DISAFA: Ha coordinato l'istituzione dell'ATS denominata "MaisTrac: dal seme alla farina" fra i partner che hanno partecipato al progetto. Ha avviato le pratiche per la definizione dell'atto costitutivo della F. O. C. all'interno del quale sono stati individuati gli impegni e le responsabilità di ogni componente per quanto riguarda lo svolgimento delle attività, le quote di co-partecipazione e le modalità di gestione delle risorse finanziarie, le modalità di pagamento, di rendicontazione delle spese, di acquisizione e di assegnazione dell'aiuto tra i diversi soggetti cooperanti. E' stato quindi istituito un gruppo tecnico, costituito da un rappresentante per ogni partner partecipante, che si è riunito periodicamente al fine di coordinare le attività previste. Gli incontri hanno avuto una cadenza mensile ed hanno coinvolto tutti i partner del progetto ed i tecnici AIAB in qualità di consulenti.

3.1.1.2.2 Partner Az. Agricola Zappino: Ha partecipato agli incontri periodici del gruppo tecnico per il coordinamento delle attività previste per ogni partner della ATS denominata "*MaisTrac: dal seme alla farina*".

3.1.1.2.3 Partner Az. Agricola Caretto: Ha partecipato agli incontri periodici del gruppo tecnico per il coordinamento delle attività previste per ogni partner della ATS denominata "*MaisTrac: dal seme alla farina*".

3.1.1.2.4 Partner Mulino di Piova: Ha partecipato agli incontri periodici del gruppo tecnico per il coordinamento delle attività previste per ogni partner della ATS denominata "*MaisTrac: dal seme alla farina*".

3.1.1.3 Attività 1.3- Stesura di un disciplinare per la certificazione della filiera di produzione di antichi mais

Responsabile: DISAFA – consulenza tecnica AIAB

Partner partecipanti: DISAFA, Az. Agricola Zappino, Az. Agricola Caretto, Mulino di Piova

3.1.1.3.1 Partner DISAFA: Ha convocato e coordinato gli incontri con i partner del progetto necessari alla individuazione delle integrazioni da apportare al nuovo disciplinare di produzione dell'associazione *Antichi Mais Piemontesi*. Nel documento sono state raccolte le indicazioni da seguire per entrare a fare parte della filiera e dell'Associazione, dettagliando tutte le diverse fasi, dalla produzione del seme alla coltivazione in campo, alle modalità di raccolta, essiccazione e stoccaggio. La rielaborazione dell'attuale disciplinare di produzione è stata fatta tenendo conto dei risultati conseguiti dal progetto, in particolare: delle esigenze di miglioramento della tecnica produttiva degli ecotipi locali, di miglioramento delle tecniche di essiccazione e conservazione del mais per garantire una qualità elevata, di messa a punto di idonei protocolli per la produzione di seme caratterizzato da un elevato grado di uniformità. L'assistenza tecnica offerta da parte dell'AIAB nell'ambito del progetto ha fornito le tecniche e le strategie ottimali per la realizzazione di tale obiettivo. In particolare il contributo del partner DISAFA ha riguardato l'integrazione/stesura degli articoli relativi alla tracciabilità genetica degli antichi mais mediante l'analisi del DNA, allo scopo di evidenziare le possibili contraffazioni nell'ambito dei prodotti alimentari commercializzati, in modo fraudolento, come prodotti "locali" o "tradizionali" derivanti dalla trasformazione della granella dei ecotipi di mais piemontesi. Con l'introduzione di tale articolo, resa possibile dai risultati conseguiti nell'ambito del presente progetto, i prodotti degli associati potranno pertanto essere tutelati da eventuali contraffazioni e l'Associazione potrà effettuare controlli campione al fine di verificare l'osservanza dei requisiti dettati dal presente disciplinare, inerenti alla presenza del 100% di farine di antichi mais nei prodotti trasformati.

3.1.1.3.2 Partner Az. Agricola Zappino: Ha partecipato ai numerosi momenti di condivisione necessari alla individuazione delle integrazioni utili a rendere il nuovo disciplinare di produzione uno strumento ad uso dei produttori e a tutela dei consumatori. In particolare il contributo ha riguardato l'integrazione/stesura degli articoli relativi a: miglioramento delle tecniche di coltivazione, individuazione delle tempistiche e delle attrezzature più idonee alla raccolta, individuazione dei caratteri fenologici particolarmente interessanti per selezione conservativa degli ecotipi, utilizzo del logo associativo per la commercializzazione dei prodotti, individuazione di possibili procedure di verifica e tracciabilità dei prodotti "*Antichi Mais*".

3.1.1.3.3 Partner Az. Agricola Caretto: Ha partecipato ai numerosi momenti di condivisione. In particolare il contributo ha riguardato l'integrazione/stesura degli articoli relativi a: individuazione dei caratteri fenologici particolarmente interessanti per selezione conservativa degli ecotipi *Nostrano dell'isola* e *Pignoletto rosso*, individuazione delle tecniche utili per la moltiplicazione e produzione di seme in campo, individuazione delle modalità di gestione del seme, individuazione delle attrezzature aziendali utili alla corretta gestione della granella destinata alla trasformazione.

3.1.1.3.4 Partner Mulino di Piova: Ha partecipato ai numerosi momenti di condivisione. In particolare il contributo ha riguardato l'integrazione/stesura degli articoli relativi a: individuazione delle attrezzature utili alla corretta gestione della granella destinata alla trasformazione all'interno dell'azienda agricola, individuazione delle attrezzature utili alla pulizia della granella destinata alla trasformazione.

3.2 Sottoprogetto 2 – Organizzare filiere per la produzione di farina di mais tradizionali piemontesi dal seme al trasformato, tramite disciplinare di produzione e caratterizzazione genetica

3.2.1 Risultati ottenuti

Nell'ambito del sottoprogetto 2 sono stati posti in coltivazione gli ecotipi *Ottofile giallo*, *Pignoletto rosso* e *Nostrano dell'isola*, utilizzando lotti di seme prodotti nell'annata precedente e conferiti dai produttori all'associazione *Antichi Mais Piemontesi*. L'ecotipo *Nostrano dell'isola* ha sostituito l'ecotipo *Ostenga*, inizialmente previsto in fase di stesura del progetto, a seguito della maggiore disponibilità di seme prodotto nell'annata precedente; tale sostituzione non ha tuttavia comportato nessuna variazione agli obiettivi preposti né ha avuto alcuna incidenza sui risultati ottenuti.

Per ogni azienda partecipante è stata compilata una scheda di rilevazione dei dati (data di semina, precessione colturale, lavorazioni, concimazione, irrigazione, andamento climatico, avversità, contenimento flora spontanea, data di raccolta, produzione, peso 1000 semi, resa). Al **punto 4.2.1** vengono riportate sintetiche schede descrittive per ogni ecotipo coltivato nell'ambito del progetto e le schede di rilevazione dei dati morfologici.

Nel corso dei rilievi periodici sono state individuate, per ogni ecotipo, le piante che meglio hanno risposto alle caratteristiche pedoclimatiche del luogo. Tali piante sono state giudicate idonee alla produzione del seme e sono state sottoposte alla caratterizzazione molecolare. Per le analisi molecolari condotte nell'ambito di questo sottoprogetto sono stati applicati i marcatori AFLP (*amplified fragment length polymorphism*). La tecnica di analisi AFLP è ampiamente utilizzata nelle analisi genetiche in quanto non richiede conoscenze 'a priori' del genoma della specie in studio ed è in grado di evidenziare simultaneamente un ampio numero di differenze a carico del DNA. Tale tecnica, messa a punto da Vos et al. (1995), prevede che il DNA sia tagliato in frammenti utilizzando enzimi di restrizione, i frammenti ottenuti sono successivamente legati agli estremi a brevi sequenze di DNA (adattatori) e poi sottoposti ad una amplificazione PCR (*polymerase chain reaction*) che permette di ottenere un ampio numero di copie di ciascuno dei frammenti. Il prodotto dell'amplificazione è successivamente posto in un campo elettrico su di un supporto solido (gel) ed i frammenti separati in funzione della loro dimensione (tecnica di elettroforesi). La posizione in cui i frammenti sono 'migrati' nel gel è successivamente rilevata con opportuna colorazione. I protocolli utilizzati per l'estrazione del DNA e per l'applicazione della tecnica AFLP sono descritti in modo dettagliato nei punti **4.2.2** e **4.2.3**. Il risultato dell'analisi (vedi **Figura 4.2.4.1**) è una successione di bande (*pattern* elettroforetico) che evidenzia la posizione assunta dai frammenti a seguito di migrazione nel gel: se due individui (piante) hanno la stessa successione di frammenti, in analoga posizione, significa che non sono state rilevate differenze a carico del DNA; viceversa se dal confronto si evidenziano bande in diversa posizione significa che sono presenti differenze ed il numero di tali 'differenze' permette di quantificare quanto due individui (piante) siano geneticamente diversi. Ovviamente è necessario applicare la tecnica ripetutamente (ad esempio utilizzando diversi enzimi di restrizione) allo scopo di poter effettuare una stima attendibile della differenziazione genetica.

La caratterizzazione è stata condotta a partire da 30 piante scelte nell'ambito di ciascun ecotipo in coltivazione (90 piante in totale) e, allo scopo di disporre di materiale di riferimento, sono stati affiancati campioni da 2 lotti di seme di *Pignoletto rosso* (Banchette e Rivara) e due lotti di *Nostrano dell'isola* (Banchette e Quincinetto) di diversa provenienza (30 piante per lotto per un totale di 120 campioni). Tale analisi ha consentito di ottenere un'accurata caratterizzazione delle piante oggetto di studio. Le frequenze alleliche evidenziate per ogni marcatore AFLP informativo sono state utilizzate per l'analisi della diversità genetica tra ed entro ecotipi/lotti di seme e per il calcolo dei parametri statistici di base. Per tutti i campioni in esame sono stati calcolati i seguenti parametri: numero medio

di alleli osservati per locus (n_o), numero effettivo di alleli per locus (n_e) e diversità genetica entro una data popolazione (eterozigosità attesa di Nei, H_e). L'indice di similarità di Jaccard (1908) è stato inoltre calcolato per stimare le similarità genetiche tra coppie di individui.

Ecotipo (provenienza)	NBP	%	n_o	n_e	H_e	J
<i>Ottofile giallo</i> (Zappino)	42	56.0	1.56	1.37	0.122	0.83
<i>Pignoletto rosso</i> (Caretto)	44	58.7	1.59	1.24	0.163	0.76
<i>Pignoletto rosso</i> (Banchette)	32	42.7	1.43	1.22	0.108	0.84
<i>Pignoletto rosso</i> (Rivara)	39	52.0	1.52	1.25	0.159	0.79
<i>Pignoletto rosso</i> (totale)	49	65.3	1.65	1.39	0.157	0.77
<i>Nostrano dell'isola</i> (Caretto)	45	60.0	1.60	1.20	0.167	0.78
<i>Nostrano dell'isola</i> (Banchette)	43	57.3	1.57	1.28	0.152	0.79
<i>Nostrano dell'isola</i> (Quincinetto)	48	64.0	1.64	1.27	0.161	0.77
<i>Nostrano dell'isola</i> (totale)	52	69.3	1.69	1.42	0.162	0.78
Totale ecotipi	75	100.0	2.00	1.66	0.221	0.52
e.s.			0.027	0.026	0.009	0.011

Statistiche ottenute a seguito di analisi AFLP: numero di bande polimorfiche (NBP) percentuale di bande polimorfiche (%); numero medio di alleli osservati (n_o); numero medio di alleli effettivi (n_e); indice di diversità genetica di Nei (H_e); indice di similarità genetica media di Jaccard (J).

L'analisi dei parametri di diversità genetica descritti nella Tabella precedente evidenzia come le accessioni di *Nostrano dell'isola* presentino in media una più elevata percentuale di bande polimorfiche, parametro che ha influenzato la stima del numero medio di alleli osservati. Tuttavia i valori più elevati relativi al numero di alleli effettivi sono stati evidenziati per *Ottofile giallo*. I valori dell'indice di diversità genetica (H_e) sono risultati maggiori per *Nostrano dell'isola*, evidenziando una certa similarità tra le sue diverse provenienze, mentre nell'ambito del *Pignoletto rosso* esiste una maggiore variabilità tra le provenienze. Il maggior grado di uniformità genetica entro ciascuna accessione (indice di Jaccard) è stato rilevato per *Ottofile giallo* e per una delle accessioni di *Pignoletto rosso* (Banchette) utilizzata come materiale di riferimento. Nel complesso i genotipi di *Pignoletto rosso* e *Nostrano dell'isola* coltivati nell'ambito del progetto (provenienze Caretto) hanno evidenziato una elevata diversità genetica ed un grado di uniformità paragonabile o minore rispetto ai campioni di riferimento.

La valutazione della matrice di similarità ha permesso di condurre le analisi di raggruppamento, inizialmente attraverso la costituzione di un dendrogramma UPGMA di similarità genetica riportanti le relazioni filogenetiche tra le linee selezionate, e successivamente mediante analisi PCO (*principal coordinate analysis*) basata sulla matrice triangolare delle stime di similarità genetica e ricavando graficamente le prime due coordinate sulla base dei vettori estratti (*Eigen vectors*). Tutti i calcoli sono stati eseguiti utilizzando il software NTSYS versione 2.02 (Rohlf 1993).

Il dendrogramma UPGMA (**Figura 4.2.4.2**) evidenzia la presenza di 3 sottogruppi (o cluster), uno specifico per ogni tipologia in analisi. Nell'ambito del cluster A (*Ottofile giallo*) è possibile evidenziare come la tecnica abbia consentito di ottenere uno specifico profilo AFLP per ciascuna pianta analizzata; nell'ambito dei cluster B e C si evidenzia invece la formazione di sottogruppi che nel caso dell'ecotipo *Pignoletto rosso* tendono a coincidere con il lotto di provenienza, mentre nell'ambito del *Nostrano dell'isola* è stato evidenziato un maggiore mescolamento tra i campioni di diversa provenienza. Tale aspetto è maggiormente evidente dall'analisi del grafico PCO complessivo (**Figura 4.2.4.3a**) che ha consentito di ottenere informazioni relative alla struttura delle popolazioni analizzate. Il grafico PCO evidenzia come la prima coordinata sia in grado di separare le accessioni in tre cluster principali: il primo raggruppa le diverse provenienze di *Pignoletto rosso*, il secondo l'ecotipo *Ottofile giallo* ed il terzo raggruppa le provenienze di *Nostrano dell'isola*. Nell'ambito del cluster comprendente *Nostrano dell'isola*, i genotipi di diversa provenienza risultano

completamente sovrapposti, indice di elevata similarità tra le provenienze, e caratterizzati da un certo livello di dispersione (dovuti ai bassi valori degli indici medi di Jaccard). Viceversa un maggior grado di differenziazione sembra caratterizzare le provenienze appartenenti all'ecotipo *Pignoletto rosso*, che risultano maggiormente disperse e separate tra di loro. Tale andamento è ancora più evidente nei grafici PCO ottenuti singolarmente per ciascuna delle due tipologie (**Figure 4.2.4.3b, 4.2.4.3c**).

I parametri statistici relativi alla diversità genetica di Nei (Nei, 1973) sono stati calcolati per ogni combinazione di primer, relativamente a tutti i dati complessivamente raccolti, al fine di valutare la quota di variabilità genetica dovuta a differenze tra gli ecotipi e tra provenienze entro ecotipo (indice di fissazione o G_{ST}). Nella tabella successiva sono riportati i valori relativi agli indici statistici di Nei, valutati per i marcatori AFLP, i quali rivelano che la maggior parte della variabilità AFLP è ascrivibile a differenze entro gli ecotipi, piuttosto che a differenze tra di essi. Tuttavia il valore di G_{ST} pari a 0,335 calcolato per tutte le accessioni indica che ben il 33.5% della variabilità risulta ascrivibile a differenze tra gli ecotipi, evidenziandone la netta separazione. Nell'ambito dell'ecotipo *Nostrano dell'isola* tale indice raggiunge valori troppo bassi (2.5%) per evidenziare una significativa separazione tra le provenienze, che possono così considerarsi caratterizzate dalle stesse frequenze alleliche. Nell'ambito del *Pignoletto rosso* invece il valore prossimo al 10% evidenzia una parziale strutturazione della tipologia, a suggerire come le diverse provenienze siano caratterizzate da frequenze alleliche peculiari e possano essersi originate a seguito di criteri selettivi specifici e distinguibili.

	CP	NPB	H_T	H_S	G_{ST}
Pignoletto Rosso	<i>EcoRI+AAT / Msel+CAT</i>	14	0.134	0.144	0.075
	<i>EcoRI+AAT / Msel+CAC</i>	12	0.131	0.144	0.099
	<i>EcoRI+AGA / Msel+CAT</i>	11	0.157	0.174	0.108
	<i>EcoRI+ATA / Msel+CAC</i>	12	0.144	0.16	0.111
	totale	49	0.143	0.157	0.098
Nostrano dell'isola	<i>EcoRI+AAT / Msel+CAT</i>	17	0.160	0.165	0.031
	<i>EcoRI+AAT / Msel+CAC</i>	12	0.144	0.147	0.021
	<i>EcoRI+AGA / Msel+CAT</i>	13	0.155	0.160	0.032
	<i>EcoRI+ATA / Msel+CAC</i>	10	0.166	0.169	0.018
	totale	52	0.158	0.162	0.025
Ecotipi totali	<i>EcoRI+AAT / Msel+CAT</i>	22	0.15	0.21	0.400
	<i>EcoRI+AAT / Msel+CAC</i>	18	0.142	0.19	0.338
	<i>EcoRI+AGA / Msel+CAT</i>	19	0.16	0.21	0.313
	<i>EcoRI+ATA / Msel+CAC</i>	16	0.132	0.17	0.288
	totale	75	0.147	0.221	0.335

Statistiche di Nei. CP: combinazione di primer AFLP; H_S : indice di Diversità Genetica Parziale; H_T : indice di Diversità Genetica Totale; G_{ST} : Grado di Differenziazione Genetica.

Per avvalorare tale ipotesi, i software AFLP-SURV e PHYLIP package (Felsenstein 1993) sono stati utilizzati per calcolare la similarità genetica di Nei (Nei, 1978) tra le accessioni in analisi. Nella tabella a seguito viene riportata la matrice di similarità/dissimilarità genetica tra coppie di accessioni evidenziate mediante marcatori AFLP. Come atteso i più alti valori degli indici di similarità genetica (ed i minori valori di dissimilarità) sono stati rilevati tra le provenienze appartenenti agli stessi ecotipi; tuttavia le provenienze apparenti all'ecotipo *Pignoletto rosso* evidenziano tra loro una maggiore distanza (e una minore similarità) rispetto alle provenienze entro la tipologia *Nostrano dell'isola*, a conferma del diverso grado di strutturazione evidenziato in precedenza. Tale matrice è stata in seguito utilizzata per la costruzione di un dendrogramma mediante il metodo neighbour-joining tree (NJ) ad evidenziare le relazioni filogenetiche esistenti tra gli ecotipi (**Figura 4.2.4.4**); la maggiore differenziazione tra le provenienze della tipologia *Pignoletto rosso* viene evidenziata dalla

maggior lunghezza delle branche che separano le accessioni nel dendrogramma rispetto alla provenienze di *Nostrano dell'isola*

	Ottofile giallo (Zappino)	Pignoletto rosso (Caretto)	Pignoletto rosso (Banchette)	Pignoletto rosso (Rivara)	Nostrano dell'isola (Caretto)	Nostrano dell'isola (Banchette)	Nostrano dell'isola (Quincinetto)
<i>Ottofile giallo (Zappino)</i>	\	0.211	0.302	0.288	0.185	0.207	0.212
<i>Pignoletto rosso (Caretto)</i>	0.789	\	0.868	0.888	0.215	0.226	0.214
<i>Pignoletto rosso (Banchette)</i>	0.698	0.132	\	0.871	0.215	0.187	0.176
<i>Pignoletto rosso (Rivara)</i>	0.712	0.112	0.129	\	0.176	0.187	0.176
<i>Nostrano dell'isola (Caretto)</i>	0.815	0.680	0.785	0.824	\	0.965	0.949
<i>Nostrano dell'isola (Banchette)</i>	0.793	0.670	0.774	0.813	0.035	\	0.935
<i>Nostrano dell'isola (Quincinetto)</i>	0.788	0.681	0.786	0.824	0.051	0.065	\

Matrici ottenute mediante l'analisi AFLP, relative agli indici di similarità [al di sopra della diagonale] e dissimilarità [al di sotto della diagonale] genetica calcolati tra coppie di accessioni.

Infine tutti i marcatori AFLP sono stati classificati sulla base della relativa frequenza e contenuto informativo; in questo modo è stato possibile valutare, entro ogni popolazione, il grado di "ricchezza allelica", quantificabile in base al numero di (i) bande polimorfiche, definite come frammenti in grado di evidenziare due distinte forme alleliche (presenza/assenza del frammento); (ii) alleli "locali", definiti come bande con frequenza >0,05 ma presenti in modo limitato ad una o due accessioni; (iii) alleli unici o esclusivi, definiti come bande limitate ad una singola accessione.

Ecotipo	N° bande polimorfiche	N° alleli locali	N° alleli esclusivi
<i>Ottofile giallo (Zappino)</i>	42	5	11
<i>Pignoletto rosso (Caretto)</i>	44	7	3
<i>Pignoletto rosso (Banchette)</i>	32	5	2
<i>Pignoletto rosso (Rivara)</i>	39	4	1
<i>Nostrano dell'isola (Caretto)</i>	45	2	1
<i>Nostrano dell'isola (Banchette)</i>	43	1	2
<i>Nostrano dell'isola (Quincinetto)</i>	48	2	2

Numero e caratteristiche degli alleli AFLP maggiormente informativi entro ciascuna accessione analizzata

I risultati ottenuti hanno fornito rilevanti informazioni per la definizione di criteri da adottare: sia per un corretto campionamento di materiali, allo scopo di conservare gli ecotipi 'ex situ' entro banche del germoplasma, sia per identificare provenienze, entro alcuni ecotipi analizzati, a cui destinare priorità in programmi di conservazione del germoplasma 'in situ – on farm'. Inoltre, la quantificazione della variabilità genetica e l'ottenimento dei *fingerprinting* molecolari nei materiali analizzati ha fornito utili indicazioni per la loro potenziale valorizzazione come prodotti IGP o DOP. Nella scelta delle provenienze più idonee ai fini della valorizzazione commerciale dei materiali in studio occorre tenere presente che, per ottenere un marchio di qualità, è necessario che una varietà locale presenti una certa uniformità e stabilità dal punto di vista quali-quantitativo. La caratterizzazione molecolare ha fornito una stima del livello di uniformità presente all'interno di ciascun ecotipo analizzato, ed ha permesso di identificare le provenienze che, oltre ad essere rappresentative dell'ecotipo di appartenenza, siano sufficientemente omogenee dal punto di vista genetico in modo tale da richiedere minori interventi di selezione. L'analisi complessiva dei dati

molecolari AFLP ha consentito pertanto di identificare sottoinsiemi di genotipi caratterizzati dal maggiore livello di uniformità genetica e, pertanto, potenzialmente idonei alla costituzione di nuclei di seme caratterizzati da un elevato grado di uniformità genetica. In particolare, nell'ambito dell'ecotipo *Nostrano dell'isola*, le piante coltivate nell'ambito del progetto possono considerarsi rappresentative del pool genico dell'ecotipo, caratterizzate da una elevata "ricchezza allelica", e pertanto in grado di fornire semente idonea per la semina dell'annata successiva. Un ragionamento analogo si può fare per la tipologia *Ottofile giallo* sulla base dei risultati ottenuti nell'ambito della caratterizzazione condotta entro il sottoprogetto 3. Per quanto riguarda invece l'ecotipo *Pignoletto rosso*, la differenziazione genetica evidenziata rispetto alle accessioni di riferimento ed il minore livello di uniformità hanno evidenziato la necessità di prevedere il campionamento di seme da diverse provenienze allo scopo di attuare una adeguata strategia di conservazione dell'ecotipo.

Il disciplinare di produzione dell'Associazione antichi mais prevede che la macinatura della granella avvenga per mezzo di macine in pietra. La macinatura integrale del chicco, prerogativa del mulino a pietra, permette di mantenere inalterate alcuni principi nutritivi nella farina, contribuendo ad aumentare il valore intrinseco delle varietà tradizionali. Nell'ambito del progetto sono quindi state messe a confronto le tre varietà *Ottofile giallo*, *Nostrano dell'isola* e *Pignoletto rosso* macinate a pietra con una farina macinata a cilindri, è stata poi inserita una ulteriore analisi su una farina commerciale precotta. L'analisi nutrizionale è stata eseguita presso il Laboratorio BioQualità di Guarene. Per individuare quali principi nutrizionali cercare sono state prese in considerazione le indicazioni contenute nel Reg. 1169/2011 che definisce le regole per fornire le corrette informazioni alimentari sulle etichette dei prodotti trasformati (benchè per la farina di mais "l'etichetta nutrizionale" non sia obbligatoria). E' stato ritenuto non necessario effettuare l'analisi sulla presenza di vitamine in quanto termolabili (non si trovano quindi dopo cottura).

Nella tabella a seguito riportata sono indicati i valori riscontrati sui cinque campioni analizzati per ognuno dei principi nutrizionali cercati.

	<i>Ottofile giallo</i>	<i>Pignoletto rosso</i>	<i>Nostrano dell'isola</i>	Ibrido macinato a cilindri	Precotta
Proteine (g/100 g)	9,44	9,33	9,1	8,74	6,66
Lipidi(g/100 g)	4,75	4,86	4,93	2,62	2,84
Grassi saturi totali (g/100 g)	0,85	0,90	0,92	0,48	0,54
Monoinsaturi totali (g/100 g)	1,34	1,35	1,37	0,73	0,79
Polinsaturi totali (g/100 g)	2,56	2,61	2,64	1,41	1,51
Grassi trans (g/100 g)	0	0	0	0	0
Colesterolo (mg/100 g)	0	0	0	0	0
Carboidrati(g/100 g)	61,82	62,10	63,04	67,81	73,70
Amido(g/100 g)	51,02	50,52	51,28	55,17	63,96
Zuccheri solubili(g/100 g)	3,54	3,37	3,42	2,55	1,25
Ceneri(g/100 g)	1,12	1,2	1,11	0,78	0,55
Fibra tot(g/100 g)	12,02	11,77	10,87	6,30	2,75
Fibra solubile(g/100 g)	2,49	2,12	2,17	1,14	0,61
Fibra insolubile(g/100 g)	9,53	9,65	8,7	5,16	2,14
Valore energetico kcal	352	353	355	342	353
Sodio(g/100 g)	33	25	31	5	8
Sale(g/100 g)	0,0083	0,0063	0,0078	0,0013	0,002
Potassio (mg/100 g)	281	294	281	132	95

Ferro (mg/100 g)	3,2	2,8	2,2	1,8	0,9
Magnesio (mg/100 g)	189	197	112	18	11
Calcio (mg/100 g)	16	13	12	2	3
Zinco (mg/100 g)	2,1	2,3	2	0,4	0,5
Rame (mg/100 g)	0,29	0,34	0,23	0,142	0,120
Selenio (mg/100 g)	0,022	0,016	0,014	0,008	0,003
Fosforo (mg/100 g)	269	274	245	99	77
Steroli vegetali nella frazione oleica (mg/100 g)	869	877	842	1470	620
Steroli vegetali sul totale (mg/100 g)	41,3	42,6	41,5	38,5	17,6

I risultati delle analisi nutrizionali condotte nell'ambito del progetto evidenziano un maggiore apporto proteico delle varietà locali e un minor apporto di carboidrati ma un maggiore apporto di zuccheri semplici che li rende più appetibili e digeribili. Evidente il contenuto di fibre, solubili ed insolubili, decisamente maggiore nelle farine macinate a pietra. Per quanto riguarda i macroelementi, sodio, potassio, magnesio, calcio e fosforo, le varietà tradizionali macinate a pietra contengono quantità molto maggiori rispetto al macinato a cilindri e alla farina precotta. Anche la quantità di oligoelementi ferro, rame e zinco, è più elevata nelle varietà tradizionali macinate a pietra rispetto a quella trovata nelle due farine "convenzionali". Nel caso degli steroli vegetali il dato più elevato si trova nella farina macinata a cilindri. In generale le tre varietà locali macinate a pietra hanno fornito dati confrontabili tra loro per tutti i principi nutrizionali analizzati, la farina macinata a cilindri ha dato valori dei macro e microelementi intermedi ma più vicini a quelli riscontrati nella farina precotta che si è discostata molto dalle farine macinate a pietra. Schede informative sui principi nutrizionali rilevati nel progetto sono state presentate in occasione dell'incontro conclusivo.

Un punto critico della filiera di produzione del mais è il contenuto di micotossine nei prodotti trasformati. L'attuale legislazione, infatti, prevede che il mais ad uso alimentare (ma anche quello animale) debba stare al di sotto di limiti definiti che variano tra granella e farina.

LIMITI PREVISTI SU GRANELLA E FARINA DI MAIS DESTINATE
ALL'ALIMENTAZIONE UMANA

<p>Fumonisine B1+ B2 < 2000 µg/kg su farina Fumonisine B1+ B2 < 4000 µg/kg su granella Aflatossine B1+B2+G1+G2 < 4 µg/kg su farina Aflatossine B1+B2+G1+G2 < 10 µg/kg su granella</p>
--

La presenza di tossine di funghi ascrivibili ai generi *Fusarium* ed *Aspergillus* (principali responsabili della presenza di micotossine su mais) sembra essere maggiore nelle parti esterne del chicco. Sono state quindi confrontati campioni di granella e di farine che tenessero conto delle diverse tipologie di macinazione e di pulitura della granella. La macinatura integrale del chicco, quindi anche delle parti corticali, può essere uno dei motivi per cui nelle farine si ritrovano valori di micotossine più alti. Allo scopo di individuare tecniche di lavorazione che aiutino i produttori ad avere produzioni con presenza di micotossine al di sotto dei limiti di legge, sono stati confrontati alcuni campioni di farina e granella delle tre varietà coltivate nell'ambito del progetto. Le analisi sulla presenza di micotossine sono in parte state fatte grazie ad un contributo del Laboratorio Chimico della Camera di Commercio di Torino, una parte sono invece state fatte presso il Mulino di Piova tramite la strumentazione in uso presso il Mulino stesso. Sei campioni sono stati analizzati sia presso

il Laboratorio della Camera di Commercio sia presso il Mulino. Per i nove campioni analizzati presso il Laboratorio sono presenti anche i risultati sulla presenza di aflatossine i sei campioni analizzati presso il mulino hanno risultati solo per la presenza di fumonisine.

TIPOLOGIA CAMPIONE	Aflatossine (B1+B2+G1+G2) (µg)	Fumonisine (B1+B2) (µg)	Fumonisine (B1+B2) (µg)
	Laboratorio Chimico Camera di Commercio	Laboratorio Chimico Camera di Commercio	Mulino di Piova
Granella sporca	< 1	1842	2135
Granella dopo pulitura	< 1	1816	2128
Macinata a pietra	< 1	1488	1560
Macinata a cilindri	< 1	1590	1577
Fumetto	< 1	2629	> 7000
Macinata a pietra	> 4	2062	1346
Zappino 1	< 1	5485	
Zappino 2	< 1	4219	
Zappino 3	< 1	1619	

I risultati delle analisi sulla presenza di fumonisine, sopra riportati in tabella, indicano un abbassamento del tenore di B1+B2 con l'aumentata pulizia della granella. Anche la macinatura sembra influenzare la quantità di fumonisine presenti, maggiori nella macinatura a cilindri. I risultati delle analisi effettuate in due laboratori differenti sono diverse ma confermano la tendenza del valore di fumonisine a variare con la pulizia e la diversa macinatura. Quando il campione di partenza era già molto selezionato, grazie all'operazione di pulizia manuale sulle spighe (per eliminare semi rotti e ammuffiti) e in seguito con vibrovaglio con tarara (per eliminare polvere e residui vegetali), la differenza tra macinatura a cilindri e macinatura a pietra tende a diminuire. Questo dato sembra indicare che ad incidere sulla presenza di micotossine nella farina intervenga maggiormente la qualità della pulizia della granella e meno il tipo di macinatura.

L'andamento climatico del 2014 non ha causato stress alla vegetazione nei momenti critici di formazione della granella (possibile causa della produzione elevata di micotossine da parte di *Fusarium*) ed anche il danno provocato da piralide, possibile responsabile indiretto della presenza di micotossine sul prodotto finito, non è stato particolarmente elevato. La selezione effettuata in azienda per la eliminazione delle spighe rovinate o ammuffite, non adatte alla trasformazione, ha permesso di far pervenire al trasformatore una granella "visivamente" di buona qualità (da qui è stato prelevato il campione "granella sporca"). Tramite la pulitura con vibrovaglio con tarara, normalmente utilizzato dal mulino per la pulizia di tutta la granella in entrata, è stato possibile ottenere una granella (da cui prelevare il secondo campione "granella dopo pulitura") ulteriormente pulito dai chicchi spezzati, farina, polvere, residui vegetali. Nonostante il soddisfacente grado di pulitura e di sanità della granella i livelli di micotossine non si sono mantenuti in tutti i campioni analizzati al di sotto del limite previsto. I tre campioni Castino 1, 2 e 3 differenziano per la pulitura della granella: granella appena raccolta e non pulita (1), granella derivante da pulizia/selezione delle spighe (2), granella pulita con pulitrice manuale (3). I risultati sembrano confermare la necessità di effettuare una pulizia accurata della granella in entrata nell'impianto di trasformazione prima della macinatura.

La possibilità di utilizzare una selezionatrice ottica potrebbe limitare la presenza di aflatossine ma non garantisce l'eliminazione di semi contaminati da fumonisine in quanto non "visti" dalla selezionatrice. Per migliorare la qualità del prodotto potrebbe essere utile dotare l'impianto di trasformazione di una spazzolatrice in grado di effettuare una pulizia accurata delle parti corticali del chicco, più a rischio per la presenza di fumonisine.

3.2.1.1 Attività 2.1- *Monitoraggio del progetto e coordinamento delle attività*

Responsabile: DISAFA, consulenza tecnica AIAB

Partner partecipanti: DISAFA, Az. Agricola Zappino, Az. Agricola Caretto, Mulino di Piova

3.2.1.1.1 Partner DISAFA: con la consulenza dei tecnici AIAB si è occupato del coordinamento delle attività e del monitoraggio in itinere per verificare lo stato di avanzamento dei lavori. A questo scopo sono stati effettuati appositi incontri con i partner nelle fasi determinati, quali:

- 1- prima della semine per la definizione della pianificazione colturale;
- 2- prima della raccolta per la definizione delle modalità logistiche ed operative di trebbiatura, essiccazione, e molitura
- 3- dopo la molitura per definire ed analizzare le criticità emerse nella filiera
- 4- alla chiusura del progetto, per la predisposizione delle presentazioni per l'incontro finale rivolto a consumatori, trasformatori e produttori, per la predisposizione della documentazione finalizzata alla rendicontazione economico-finanziaria del progetto, e per la predisposizione della relazione tecnico-scientifica delle attività condotte.

Tali incontri sono stati, inoltre, occasione per creare e rafforzare i legami necessari al consolidamento della filiera.

Il giorno 26 settembre 2015 è stata effettuata la visita in situ per l'attuazione delle procedure di controllo da parte dei funzionari della Regione Piemonte – Ufficio Agricoltura – Settore Servizi alle imprese – presso l'azienda Caretto ed il Mulino di Piova; mediante il seguente link è possibile accedere ad un galleria fotografica della visita: <https://plus.google.com/u/0/photos/115337563565743254192/albums/6070075704847722961?authkey=CPG-zdHHoZ6OMw>

3.2.1.1.2 Partner Az. Agricola Zappino: Ha partecipato agli incontri di monitoraggio del progetto, in particolare: prima della semine per la definizione della pianificazione colturale; prima della raccolta per la definizione delle modalità operative di raccolta, essiccazione, e molitura; dopo la molitura per definire ed analizzare eventuali criticità emerse nella filiera; alla chiusura del progetto.

3.2.1.1.3 Partner Az. Agricola Caretto: Ha partecipato agli incontri di monitoraggio del progetto, in particolare: prima della semine per la definizione della pianificazione colturale; prima della raccolta per la definizione delle modalità operative di raccolta, essiccazione, e molitura; dopo la molitura per definire ed analizzare eventuali criticità emerse nella filiera; alla chiusura del progetto.

3.2.1.1.4 Partner Mulino di Piova: Ha partecipato agli incontri di monitoraggio del progetto, in particolare: prima della semine per la definizione della pianificazione colturale; prima della raccolta per la definizione delle modalità operative di raccolta, essiccazione, e molitura; dopo la molitura per definire ed analizzare eventuali criticità emerse nella filiera; alla chiusura del progetto.

3.2.1.2 Attività 2.2- *Pianificazione colturale e reperimento del seme necessario in relazione alle superfici e disponibilità individuate nel sottoprogetto 1.1.*

Responsabile: Az. Agricola Zappino, Az. Agricola Caretto, consulenza tecnica AIAB

Partner partecipanti: DISAFA, Az. Agricola Zappino, Az. Agricola Caretto, Mulino di Piova

3.2.1.2.1 Partner DISAFA: Presso i laboratori del DISAFA Genetica Agraria sono state condotte le analisi delle sementi disponibili in base alle normative ISTAT, per la valutazione della purezza, della germinabilità e della vitalità; uno stock di ciascun lotto di semente è stato messo in conservazione presso la Banca del Germoplasma.

3.2.1.2.2 Partner Az. Agricola Zappino: La varietà *Ottofile giallo* coltivata dall'azienda nell'annata agraria 2013 è stata ritenuta sufficientemente omogenea e quindi adatta per essere utilizzata per l'allestimento del campo di produzione seme. Benché l'intera superficie aziendale, per le caratteristiche di isolamento da altre coltivazioni di mais, possa essere

considerata utile alla la raccolta di seme, è stato ritenuto utile alla buona riuscita della prova, preparare un nuovo appezzamento più vicino alla strada e meno esposto al rischio di danno da selvatici

3.2.1.2.3 Partner Az. Agricola Caretto: La scarsa disponibilità di seme dell'ecotipo *Ostenga* con caratteristiche di uniformità adeguate ha comportato la sua sostituzione con l'ecotipo *Nostrano dell'isola*, già coltivato e riprodotto dall'azienda, del quale era disponibile una sufficiente quantità di seme con caratteristiche di uniformità maggiori. Il seme di *Pignoletto rosso* è stato scelto in parte tra quello a disposizione all'interno dell'associazione *Antichi Mais* e derivante da una coltivazione in purezza effettuata nel 2013 sul territorio canavesano, in parte tra quello disponibile in azienda e derivante dalla coltivazione dell'anno precedente. Per la coltivazione del *Pignoletto* è stato individuato un appezzamento di circa 1300 mq, per il *Nostrano* è stato un appezzamento di 3500 mq.

3.2.1.2.4 Partner Mulino di Piova: Ha partecipato agli incontri di programmazione delle semine e di valutazione della uniformità della semente per l'allestimento dei campi.

3.2.1.3 Attività 2.3- Coltivazione di tre ecotipi di mais piemontesi e monitoraggio dei campi sperimentali

Responsabile: Az. Agricola Zappino, Az. Agricola Caretto, consulenza tecnica AIAB

Partner partecipanti: DISAFA, Az. Agricola Zappino, Az. Agricola Caretto,

3.2.1.3.1 Partner DISAFA: con la consulenza dei tecnici AIAB, ha effettuato rilievi periodici per supportare l'azienda nella gestione agronomica e delle avversità, individuando in ogni singolo caso, le più appropriate tecniche di intervento. Nel corso dei rilievi sono state individuate in ogni azienda e con un approccio di selezione partecipativa, che ha coinvolto non solo i produttori ma anche i tecnici, le piante che meglio hanno risposto alle caratteristiche pedoclimatiche del luogo. Le valutazioni per scegliere le piante sono state fatte congiuntamente con tutti i partner al fine di mettere in evidenza le differenze e le uniformità di giudizio di tutti i partecipanti. In particolare è stato effettuato il campionamento di:

- 30 piante nell'ambito dell'ecotipo *Ottofile giallo* in coltivazione presso l'azienda Zappino per la successiva caratterizzazione molecolare

- 30 piante nell'ambito di ciascuno degli ecotipi *Pignoletto rosso* e *Nostrano dell'isola* in coltivazione presso l'azienda Caretto per la successiva caratterizzazione molecolare

3.2.1.3.2 Partner Az. Agricola Zappino: L'ecotipo *Ottofile giallo* è stato seminato il 9 maggio su una superficie complessiva di circa 2 ettari, suddivisa in più appezzamenti di piccole dimensioni situati nel territorio di Castino. L'ubicazione degli appezzamenti, in un contesto boschivo e di coltivazione di nocciole, permette la realizzazione di campi di produzione seme in purezza, data l'assenza di altre coltivazioni di mais. Uno degli appezzamenti adibiti alla semina è stato preparato appositamente rompendo un prato. Questo ha dato la possibilità di avere in un unico corpo una superficie maggiore e posizionata vicino alla strada in posizione un po' meno esposta al rischio di danno da selvatici. Tutti gli appezzamenti sono comunque stati protetti con recinzione elettrificata. Il terreno è stato preparato con una aratura superficiale seguita da una fresatura per l'interramento del concime. Alla semina è seguita una rullatura e, nel mese di giugno, un diserbo di post emergenza. L'andamento climatico ha favorito un buono sviluppo della coltura senza necessità di interventi di irrigazione (peraltro non possibili). Lo sviluppo della flora spontanea è stato limitato e non ha influito negativamente sullo sviluppo del mais. I sopralluoghi periodici non hanno evidenziato una presenza significativa di insetti e funghi patogeni, in particolare *Diabrotica virginifera*, *Ostrinia nubilalis* e *Ustilago maidis*, pertanto non è stato eseguito nessun trattamento. Per quanto riguarda *Ustilago maidis* ogni qualvolta era individuato un sintomo sulla vegetazione, la pianta è stata allontanata dal campo (pratica normalmente utilizzata in azienda). La produzione è stata soddisfacente, circa 80 q. Nel

corso dei sopralluoghi effettuati nel mese di agosto sono state individuate le piante che meglio rispondevano alle caratteristiche fenotipiche della varietà *Ottofile giallo*. L'azienda riproduce in azienda seme di *Ottofile* da moltissimi anni, ha pertanto ottenuto una buona uniformità del seme ed una buona "pratica" di selezione. Nell'ambito del progetto la selezione è stata fatta con un approccio di selezione partecipata che ha coinvolto non solo i produttori ma anche i tecnici. Le valutazioni per scegliere le piante sono state fatte congiuntamente con tutti i partner al fine di mettere in evidenza le differenze e le uniformità di giudizio di tutti i partecipanti. Le osservazioni principali su cui basare la scelta delle piante hanno riguardato: l'altezza dell'inserzione della spiga sul culmo, la presenza di otto file e la colorazione giallo-arancio della granella, l'assenza di malattie, la solidità dello stocco, l'apertura delle foglie. Le piante individuate, e segnate con nastro, sono state oggetto dell'analisi genetica e sono state in seguito raccolte a parte.

3.2.1.3.3 Partner Az. Agricola Caretto: La localizzazione degli appezzamenti adibiti alla produzione di seme delle varietà *Pignoletto rosso* e *Nostrano dell'isola* è stata scelta in base alla necessità di mantenere le condizioni di "isolamento" necessarie alla produzione di seme, in un contesto maidicolo come quello della pianura canavesana. In particolare per il *Pignoletto* è stato individuato un piccolo appezzamento situato in zona viticola, lontano da altre coltivazioni di mais. Nel caso del *Nostrano dell'isola* la semina è stata eseguita su un appezzamento di circa 3500 mq in questo caso le dimensioni del campo coltivato erano tali da permettere di effettuare una raccolta del seme sulle file centrali dell'appezzamento ed ottenere una granella con buone caratteristiche di uniformità. Per ulteriore sicurezza la semina è avvenuta a distanza temporale dalle altre coltivazioni di mais per non fare coincidere i momenti di fioritura (le varietà locali hanno un ciclo più lungo rispetto agli ibridi, ritardare la semina di una settimana/ dieci giorni è sufficiente a garantire una non concomitanza di fioritura). La semina, per entrambe le varietà, è stata effettuata il 17 aprile, dopo un letamazione ed aratura per la preparazione del terreno. L'andamento climatico ha favorito un buono sviluppo della coltura senza necessità di interventi di irrigazione. Lo sviluppo della flora spontanea è stato elevato ma, grazie alla elevata disponibilità di acqua piovana, non ha influito negativamente sullo sviluppo del mais. Le piogge prolungate hanno anche influenzato la dinamica di sviluppo delle popolazioni di insetti fitofagi. In particolare nel caso di *Ostrinia nubilalis* i sopralluoghi periodici hanno evidenziato una presenza significativa della seconda generazione a partire dalla metà di agosto. Le ovature sono state individuate in misura consistente sulle setole, all'apice delle spighe, in gran parte danneggiate dall'attività di *Diabrotica virginiifera*, le cui forme adulte hanno provocato numerose rosure sulle setole. Questo non ha compromesso l'impollinazione del mais ma ha forse favorito la deposizione delle ovature da parte di *O. nubilalis* sull'apice delle spighe. La difficoltà nell'individuare tempestivamente le ovature (sulle setole sono più difficilmente visibili) ha ritardato l'individuazione del momento in cui sarebbe stato necessario intervenire. L'azienda ha comunque deciso di non effettuare il trattamento per mancanza di disponibilità del contoterzista in tempi brevi. Nel mese di agosto sono state individuate le piante che meglio rispondevano alle caratteristiche fenotipiche della varietà *Pignoletto rosso* e *Nostrano dell'isola*. La selezione è stata fatta in maniera partecipata coinvolgendo produttori e tecnici al fine di condividere i criteri utilizzati. Come nel caso dell'*Ottofile* si è posta maggiore attenzione all'altezza dell'inserzione della spiga sul culmo, l'assenza di malattie, la solidità dello stocco, l'apertura delle foglie. Inoltre, nel caso del *Pignoletto rosso* si è posta attenzione alla forma ad uncino della granella e la colorazione rossa, nel caso del *Nostrano* anche alle dimensioni della spiga che, attualmente, non è un carattere uniforme.

3.2.1.4 Attività 2.4- Identificazione delle piante caratterizzate dalla maggiore uniformità genetica per la produzione della semente

Responsabile: DISAFA

Partner partecipanti: DISAFA

3.2.1.4.1 Partner DISAFA: le attività inerenti la caratterizzazione molecolare, ampiamente descritte al punto precedente (3.2.1) possono essere così sintetizzate:

- Raccolta e collezione di campioni di riferimento nell'ambito delle tipologie *Pignoletto rosso* e *Nostrano dell'isola* e ottenimento di 30 piante da ciascuna accessione mediante germinazione dei semi in capsule Petri, su dischi di carta bibula inumiditi (120 piante in totale)

- Estrazione del DNA a partire da 30 piante nell'ambito di ciascun ecotipo in coltivazione (90 piante in totale), e 120 piante nell'ambito dei campioni di riferimento (210 estrazioni in totale).

- Applicazione della tecnica AFLP: screening di 8 combinazioni di primer AFLP a partire da un campione di 12 piante (4 per ecotipo) e scelta delle 4 combinazioni maggiormente informative

- Applicazione della tecnica AFLP: amplificazione delle 4 combinazioni scelse sul totale delle 210 piante in analisi

- Separazione elettroforetica su gel di poliacrilamide e visualizzazione dei prodotti di amplificazione

3.2.1.5 Attività 2.5- Coordinamento e monitoraggio del pre e del post raccolta e produzione della semente

Responsabile: DISAFA – consulenza tecnica AIAB

Partner partecipanti: DISAFA, Az. Agricola Zappino, Az. Agricola Caretto, Mulino di Piova

3.2.1.5.1 Partner DISAFA: Con la consulenza tecnica AIAB ha coordinato le attività in pre e post-raccolta delle spighe dalle piante individuate, per ogni ecotipo, come quelle rispondenti alle caratteristiche tipiche. Con l'avvicinarsi della trebbiatura è stato organizzato un sopralluogo in ogni azienda partecipante alla filiera per individuare eventuali punti critici legati allo stoccaggio. Sono state inoltre monitorate le fasi di essiccazione e stoccaggio al fine di valutare temperature, tempi, quantità di seme idonee per la corretta essiccazione della granella. Un campione di granella per ogni ecotipo è stato predisposto per l'analisi per l'individuazione del tenore di micotossine (fumonisine) mentre tutto il resto della granella raccolta è stata conferita al trasformatore.

3.2.1.5.2 Partner Az. Agricola Caretto: In prossimità della raccolta ha illustrato i macchinari presenti in azienda e le pratiche aziendali di raccolta, essiccazione e stoccaggio allo scopo di individuare eventuali punti critici sui quali intervenire per migliorare il processo di produzione. In collaborazione con gli altri partner sono quindi state definite le lavorazioni e le specifiche di ogni intervento, con le tempistiche più adeguate, per contenere ed abbassare il tenore di micotossine nel prodotto finale destinato all'alimentazione e per garantire una buona qualità della semente. La raccolta è avvenuta interamente a mano. Le spighe destinate a produrre farina e quelle da seme sono state raccolte in giorni separati. Nel caso del *Nostrano dell'isola* le spighe destinate alla produzione di seme sono state raccolte sulle file centrali dell'appezzamento per limitare il rischio di contaminazione da polline estraneo. In ogni caso è stata posta la massima attenzione affinché ogni tipologia seguisse le lavorazioni predisposte con massima tempestività. In particolare, sono state predisposte cassette forate e cartellate per lo stoccaggio separato di: spighe da cui era stato prelevato il materiale per l'analisi genetica, spighe destinate alla produzione di seme, spighe destinate alla produzione di granella da macinare. Le spighe destinate a seme sono state private delle brattee, riposte in cassette agricole alimentari, impilate su bancali suddivise per tipologie e stoccate in luogo riparato e ventilato per qualche giorno. Le spighe

destinate alla produzione di granella sono state avviate immediatamente alla sfogliatura, sgranatura ed essiccazione mediante essiccatoio statico ad aria calda a circa 60°C per 24/36 ore per portare l'umidità della granella da 22% a 12%. Per garantire una uniforme asciugatura di tutta la massa, la granella è stata disposta su uno strato di pochi centimetri. Le spighe "da seme" sono poi state oggetto di una seconda selezione al fine di individuare quelle che meglio rispondessero alle caratteristiche fenotipiche delle varietà. Nel corso di un momento condiviso tra tutti i partner ognuno ha condiviso con gli altri le caratteristiche del proprio fenotipo di riferimento e, in seguito ad un confronto, sono state selezionate le spighe destinate alla risemina per l'anno successivo. I due ecotipi *Pignoletto rosso* e *Nostrano dell'isola* seminati dall'azienda hanno dato una produzione con grado di uniformità abbastanza buono. Sono comunque state eliminate le spighe che non rispondessero, secondo giudizio complessivo delle persone coinvolte, al fenotipo caratteristico delle varietà. Le spighe porta seme sono quindi state sgranate a mano separando la granella derivante dalla parte centrale del tutolo (destinata a seme) e quella derivante dalle estremità della spiga (destinata alla macinatura). La granella derivante dalla parte centrale è stata essiccata con le medesime modalità sopra riportate, ma ad una temperatura di 40°C per non compromettere la germinabilità del seme. È stata poi mantenuta in congelatore a -18°C per 48 ore al fine di eliminare uova e parassiti e garantirne la conservabilità. La parte di granella destinata alla trasformazione è stata stoccata in attesa della macinatura. Alcuni campioni di farina sono stati sottoposti ad analisi sul contenuto di micotossine.

3.2.1.5.3 Partner Az. Agricola Zappino: In prossimità della raccolta ha illustrato i macchinari e le pratiche consolidate di raccolta, essiccazione e stoccaggio in uso presso l'azienda. In collaborazione con tutti i partner sono state analizzate le procedure ed individuati i punti critici su cui intervenire al fine di migliorare la qualità del prodotto finale. Raccolta. Le spighe destinate alla produzione di seme sono state raccolte manualmente dalle piante individuate nel corso dei rilievi/sopralluoghi, il resto della produzione è stato raccolto con trebbiatrice. Per garantire un'adeguata separazione delle spighe da seme da quelle da granella lo stoccaggio è avvenuto utilizzando cassette forate impilate in luogo riparato. Le spighe destinate a seme sono state private delle brattee e nuovamente poste in cassette stoccate in luogo coperto e ventilato. Le spighe destinate alla produzione di granella sono state avviate immediatamente alla sfogliatura, sgranatura ed essiccazione mediante essiccatoio aziendale statico ad aria calda a circa 60°C per 24/36 ore per portare l'umidità della granella da 22% a 12%. L'ecotipo *Ottofile giallo* ha dato una produzione con un elevato grado di uniformità, ma, come nel caso del *Pignoletto* e del *Nostrano*, le spighe "da seme" sono state comunque oggetto di una seconda selezione al fine di individuare quelle che meglio rispondessero alle caratteristiche fenotipiche della varietà. Nel corso di un momento condiviso tra tutti i partner, sono state eliminate le spighe che non rispondessero, secondo giudizio complessivo delle persone coinvolte nella selezione partecipata, al fenotipo caratteristico. Le spighe porta seme così selezionate sono quindi state sgranate a mano separando la granella derivante dalla parte centrale del tutolo (destinata a seme) e quella derivante dalle estremità della spiga (destinata alla macinatura). La granella derivante dalla parte centrale è stata essiccata ad una temperatura di 40°C. La parte di granella destinata alla trasformazione è stata stoccata in azienda in attesa della macinatura. Alcuni campioni di farina sono stati sottoposti ad analisi sul contenuto di micotossine.

3.2.1.5.4 Partner Mulino di Piova: Ha partecipato ai momenti di selezione partecipata delle varietà presso le aziende che hanno coltivato i tre ecotipi. In fase di pre raccolta ha esaminato i macchinari utilizzati per la raccolta, per essiccazione e per lo stoccaggio della granella nelle due aziende partner. Individuati i punti critici sono state specificate, per ogni azienda, le possibili procedure e le tempistiche più adatte per un miglioramento del processo produttivo, in particolare per il contenimento e abbassamento del tenore di micotossine nel prodotto trasformato.

3.2.1.6 Attività 2.6- *Trasformazione e valutazione dei parametri qualitativi delle farine*

Responsabile: Mulino di Piova

Partner partecipanti: DISAFA, Az. Agricola Zappino, Az. Agricola Caretto, Mulino di Piova

3.2.1.6.1 Partner DISAFA: Ha coordinato le attività relative alla preparazione ed alla distribuzione dei campioni da sottoporre alle analisi di laboratorio.

3.2.1.6.2 Partner Az. Agricola Zappino: Ha fornito i campioni di farina di *Ottofile giallo* per l'analisi delle componenti nutrizionali e sulla presenza di micotossine.

3.2.1.6.3 Partner Az. Agricola Caretto: Ha fornito i campioni di farina di *Pignoletto rosso* e *Nostrano dell'isola* per l'analisi delle componenti nutrizionali e sulla presenza di micotossine.

3.2.1.6.4 Partner Mulino di Piova: La granella consegnata al mulino è stata sottoposta a pulizia mediante vibrovaglio con tarara al fine di eliminare i grani spezzati, i residui vegetali ed altre componenti che possono influire sulla qualità del prodotto finale. La granella pulita è poi stata macinata con macine a pietra. Le farine vendute come "*Antichi Mais*" sono macinate esclusivamente a pietra, ma, al fine di effettuare un confronto sulla possibile incidenza della diversa granulometria sul tenore di micotossine, una parte della granella è stata macinata con mulino a cilindri. Ha effettuato l'analisi di 7 campioni di farina e due di granella utilizzando l'attrezzatura in uso presso il mulino di rilevazione del tenore di fumonisine.

3.2.1.7 Attività 2.7- *Produzione, confezionamento, e distribuzione del prodotto*

Responsabile: Mulino di Piova

Partner partecipanti: DISAFA, Az. Agricola Zappino, Az. Agricola Caretto, Mulino di Piova

3.2.1.7.1 Partner DISAFA: Ha coordinato le attività dei partner in relazione alla produzione, confezionamento, e distribuzione del prodotto.

3.2.1.7.2 Partner Az. Agricola Zappino: La granella prodotta è stata consegnata al trasformatore per la macinatura a pietra. L'azienda distribuisce la farina direttamente a piccoli negozi del territorio, durante mercati periodici, a Gruppi di Acquisto Solidale.

3.2.1.7.3 Partner Az. Agricola Caretto: La granella prodotta è stata consegnata al trasformatore per la macinatura a pietra. L'azienda vende direttamente il prodotto presso il punto vendita aziendale e distribuisce a piccoli negozi del territorio.

3.2.1.7.4 Partner Mulino di Piova: Ha realizzato la macinatura delle granelle ed il confezionamento delle farine una parte delle quali è venduta presso il punto vendita aziendale.

3.2.1.8 Attività 2.8- *Verifica di gradimento dei consumatori.*

Responsabile: Az. Agricola Zappino, Az. Agricola Caretto

Partner partecipanti: DISAFA, Az. Agricola Zappino, Az. Agricola Caretto, Mulino di Piova

3.2.1.8.1 Partner DISAFA: ha coordinato le attività relative all'organizzazione di un incontro conclusivo di divulgazione, rivolto a consumatori, trasformatori e produttori, presso il Museo *Nòssi Ràisa* di San Giorgio Canavese (TO). Nell'ambito di tale incontro è stato distribuito materiale informativo e sono stati descritti gli obiettivi e alcuni risultati ottenuti nell'ambito del presente progetto. E' stata inoltre predisposta una degustazione di prodotti ottenuti con le farine prodotte nell'ambito del progetto e verificato il gradimento dei consumatori mediante una scheda di degustazione atta a raccogliere le impressioni dei partecipanti sulla qualità delle farine di ecotipi locali macinati a pietra. Nell'ambito di tale incontro, il partner DISAFA in collaborazione con i tecnici AIAB si è occupato di descrivere il progetto di recupero e valorizzazione degli antichi mais da polenta e di esporre le attività svolte nell'ambito del progetto inerenti la caratterizzazione molecolare e lo sviluppo di un protocollo di tracciabilità genetica degli antichi mais. Mediante il seguente link è possibile accedere ad un galleria fotografica dell'incontro:

<https://plus.google.com/u/0/photos/115337563565743254192/albums/6109439746978301169>

3.2.1.8.2 Partner Az. Agricola Zappino: ha contribuito all'organizzazione di un incontro rivolto a consumatori, trasformatori e produttori. In particolare si è occupato della divulgazione dell'evento, della presentazione delle attività della Associazione antichi mais e delle attività svolte nell'ambito del progetto.

3.2.1.8.3 Partner Az. Agricola Caretto: ha contribuito all'organizzazione di un incontro rivolto a consumatori, trasformatori e produttori. In particolare si è occupato dell'organizzazione del momento degustativo, della stesura di una scheda di degustazione per raccogliere le impressioni dei partecipanti sulla qualità delle farine di ecotipi locali macinati a pietra. Ha presentato le attività svolte nell'ambito del progetto.

3.2.1.8.4 Partner Mulino di Piova: Ha contribuito all'organizzazione di un incontro rivolto a consumatori, trasformatori e produttori nel corso del quale ha illustrato le attività svolte nell'ambito del progetto e le potenzialità della macinatura a pietra per la valorizzazione delle farine.

3.2.1.9 Attività 2.9- *Trattamento ed elaborazione dati, predisposizione relazioni e rendicontazione*

Responsabile: DISAFA, consulenza AIAB

Partner partecipanti: DISAFA

3.2.1.9.1 Partner DISAFA: Le attività inerenti l'elaborazione dei dati e la predisposizione delle relazioni finali sono state condotte con la consulenza dei tecnici AIAB secondo il seguente schema di attività:

- Acquisizione dei dati relativi alla caratterizzazione molecolare su supporto informatico e loro elaborazione mediante software NTSYS versione 2.02. Valutazione dei parametri di diversità genetica ed uniformità. Valutazione della matrice di similarità, analisi di raggruppamento mediante costituzione di un dendrogramma UPGMA di similarità genetica e mediante analisi PCO (principal coordinate analysis). Valutazione della strutturazione degli ecotipi e calcolo degli indici di fissazione. Utilizzo dei software AFLP-SURV e PHYLIP package per calcolare la similarità genetica tra accessioni e costruzione di un dendrogramma di similarità mediante il metodo neighbour-joining tree (NJ). Classificazione dei marcatori AFLP in base al numero di bande polimorfiche, alleli "locali" ed alleli unici o esclusivi.
- Predisposizione delle presentazioni per l'incontro finale rivolto a consumatori, trasformatori e produttori.
- Predisposizione della documentazione finalizzata alla rendicontazione economico-finanziaria del progetto.
- Predisposizione della relazione tecnico-scientifica delle attività condotte.

3.3 Sottoprogetto 3 – *Messa a punto di un protocollo di analisi molecolare per la tracciabilità degli ecotipi piemontesi di mais*

3.3.1 Risultati ottenuti

La messa a punto di un protocollo di analisi molecolare per la tracciabilità degli ecotipi piemontesi di mais ha previsto l'impiego dei marcatori microsatelliti (SSR = *simple sequence repeats*). Nell'informazione genetica di ciascun individuo (pianta) esistono moltissime sequenze definite microsatellite, costituite cioè da brevi tratti di DNA ripetuti in successione (a tandem). Il numero di tali ripetizioni è estremamente variabile da un individuo all'altro, pertanto, a seguito di una analisi di più microsatelliti è possibile ottenere l'impronta digitale (*fingerprinting*) molecolare di un individuo (pianta), cioè una sua inequivocabile identificazione. L'affidabilità di tale tecnica è tale da essere quella di norma utilizzata anche per le analisi forensi. La tecnica di analisi microsatellite richiede che il DNA sia sottoposto ad una amplificazione PCR utilizzando delle brevi sequenze di DNA che delimitano la zona in cui il microsatellite è localizzato (*primer*) e, sulla base della dimensione del frammento amplificato, di stabilire se il numero di ripetizioni nel DNA di due individui (piante) è uguale o diverso. L'applicazione della tecnica SSR implica che si conosca la sequenza delle zone fiancheggianti il microsatellite, allo scopo di poter utilizzare i primer appropriati. Tale conoscenza richiede che porzioni del DNA della specie oggetto di studio siano state sequenziate, il che ovviamente è un lavoro lungo ed oneroso. Fortunatamente in letteratura è disponibile un ampio numero di marcatori SSR specifici per *Zea mays* (Barcaccia et al. 2003; Wang et al. 2010) ed è pertanto possibile applicare la tecnica con costi relativamente contenuti. Il protocollo SSR utilizzato è descritto dettagliatamente al **punto 4.3.1**.

Nella prima fase del sottoprogetto 3 sono stati caratterizzati gli ecotipi coltivati nell'ambito del sottoprogetto 2 unitamente agli ecotipi precedentemente identificati nell'ambito del programma di recupero e valorizzazione di antiche varietà di mais da polenta piemontesi. Gli ecotipi caratterizzati e le rispettive provenienze sono a seguito elencate.

Ecotipo	Provenienza
<i>Nostrano dell'isola</i>	<i>Az. Caretto Banchette Quincinetto</i>
<i>Ostenga</i>	<i>Canavese</i>
<i>Ottofile bianco</i>	<i>Albese</i>
<i>Ottofile giallo</i>	<i>Az. Zappino Casalese Cuneese</i>
<i>Ottofile rosso</i>	<i>Albese</i>
<i>Pignoletto giallo</i>	<i>Albese La Morra Torinese</i>
<i>Pignoletto rosso</i>	<i>Banchette Az. Caretto Rivara</i>

I semi provenienti da ciascuna accessione sono stati messi a germinare in capsule Petri, su dischi di carta bibula inumiditi e per ogni accessione sono stati prelevati campioni di foglie da otto piante diverse; l'estrazione del DNA è stata condotta secondo il protocollo riportato al **punto 4.2.2** e i campioni così ottenuti sono stati analizzati separatamente. A seguito di uno screening preliminare su un numero limitato di campioni, a partire dai 12 SSR testati, quattro marcatori (p-phi03, p-dupssr1, p-dupssr7 e p-dupssr10) hanno evidenziato il più alto livello di polimorfismo e sono stati applicati per la genotipizzazione dei materiali in studio.

Un esempio di separazione elettroforetica ottenuta a seguito di applicazione della tecnica SSR su tutti gli ecotipi in analisi è riportato in **Figura 4.3.2.1**. L'analisi delle forme alleliche evidenziate ha consentito di stimare il livello di variabilità genetica nell'ambito di ciascun ecotipo, e definire le relazioni filogenetiche tra i materiali in studio. L'indice di similarità di Nei-Li (Nei e Li 1979) è stato calcolato in tutte le possibili combinazioni per stimare la similarità genetica (GS) tra coppie di accessioni ed i software NEIGHBOUR e CONSENSE entro il pacchetto PHYLIP (Felsenstein 1993) sono stati impiegati per costruire un dendrogramma mediante analisi neighbour-joining NJ (**Figura 4.3.2.2**). Il dendrogramma delle relazioni filogenetiche tra ecotipi evidenzia una maggiore similarità genetica degli ecotipi *Ostenga* e *Nostrano dell'isola* con il gruppo degli ecotipi *Pignoletto*, mentre gli *Ottofile* tendono a formare un cluster nettamente separato. Per gli ecotipi *Ottofile*, inoltre, i marcatori SSR evidenziano una maggiore differenziazione dell'accessione *Ottofile bianco*, mentre nell'ambito delle provenienze di *Ottofile giallo* (che comprendono la provenienza coltivata dall'azienda Zappino nell'ambito del presente progetto di ricerca) non è evidenziabile una differenziazione significativa. L'informazione ottenuta in questa fase della ricerca nell'ambito dell'ecotipo *Ottofile giallo* consente pertanto di considerare le piante coltivate nell'ambito del progetto come rappresentative del pool genico dell'ecotipo, e pertanto in grado di fornire semente idonea per la semina dell'annata successiva. Nell'ambito di uno stesso ecotipo è stato possibile evidenziare un significativo livello di differenziazione solo per la provenienza 'albese' di *Pignoletto giallo* e la provenienza 'banchette' di *Pignoletto rosso* (a conferma di quanto riportato in precedenza per i marcatori AFLP). I campioni di DNA estratti per ciascun ecotipo sono stati riuniti e mescolati in un unico 'bulk', allo scopo di avere un campione rappresentativo dell'ecotipo e ottenere una impronta digitale molecolare (*fingerprinting* molecolare) specifica per ciascun ecotipo identificato, utile per la seconda da fase della ricerca.

I bulk di DNA (due per ciascuna accessione), ottenuti e caratterizzati a livello molecolare nella prima attività, sono stati confrontati tra di loro e con campioni di DNA ottenuti a partire da un set di varietà commerciali ampiamente rappresentative degli ibridi F1 di mais a granella vitrea attualmente in coltivazione sul nostro territorio, ed elencate nella tabella successiva. Nell'ambito dell'ecotipo *Pignoletto rosso* sono state inoltre analizzate separatamente 30 piante per ciascuna delle tre provenienze utilizzate e descritte per il sottoprogetto 2 (per un totale di 90 piante)

DENOMINAZIONE COMMERCIALE DELL'IBRIDO F1	AZIENDA PRODUTTRICE
Gritz Arzano	Maisadour Semence
Belgrano Aadrano LG 3321 Lolita	Limagrain
Marano 0501 Sisred Astico	SIS
Jiulian	Ersa Friuli
Lucia PR36Y03 N43	Pioneer
DKC6677 DKC6309	Delkalb
ISH301v	IVS
Alabastro Kermess	KVS Italia
Corniola	Apsov Sementi
Redel	Rank Venturoli
Roano	Sivam

Il confronto dei profili molecolari ha consentito di identificare un set di alleli esclusivi per gli ecotipi di mais piemontesi e, soprattutto, di identificare un set di alleli discriminanti ed identificativi nell'ambito degli ibridi commerciali. La strategia di analisi ha previsto la valutazione delle forme alleliche normalmente presenti negli ecotipi piemontesi di mais e la ricerca di forme alleliche esclusive per i mais ibridi, utili per l'identificazione delle possibili contraffazioni nelle farine. Il potenziale discriminatorio per ogni locus SSR è stato valutato con l'analisi di ogni singola corsa elettroforetica. Le separazioni elettroforetiche mediante sequenziatore (un esempio è riportato nella **Figura 4.3.2.3**) sono state effettuate per ogni marcatore a partire dagli amplificati dei 90 campioni di *Pignoletto rosso*, dei BULK (due per ciascuna delle accessioni appartenenti agli ecotipi piemontesi), unitamente alle 21 varietà ibride utilizzate per il confronto (le analisi sugli ibridi sono state eseguite in doppio, ottenendo DNA a partire da due piante per ogni ibrido). I gel ottenuti hanno consentito di evidenziare le forme alleliche caratteristiche per l'ecotipo *Pignoletto rosso*, ed in generale per gli ecotipi piemontesi, e le forme alleliche presenti in modo esclusivo nelle varietà F1, e pertanto discriminanti per i materiali ibridi commerciali.

Tra i dodici loci SSR saggiati, sette marcatori (p-phi031, p-dupssr7, p-dupssr10, N03, N22, N42 e N60) hanno permesso di evidenziare alleli esclusivi negli ibridi F1 commerciali e sono stati quindi presi in considerazione per le successive valutazioni. Ogni genotipo appartenente all'ecotipo *Pignoletto rosso* ha fornito un profilo molecolare dato dalla somma delle varianti alleliche ottenute dall'amplificazione dei 7 loci SSR impiegati. L'analisi complessiva dei profili molecolari dei campioni ha permesso pertanto di determinare il pool allelico caratteristico per l'ecotipo in analisi. L'analisi dei BULK di DNA provenienti dai restanti ecotipi piemontesi ha evidenziato la presenza di un elevato numero di alleli in comune con il *Pignoletto rosso* oltre che alcune forme alleliche esclusive, utili per definire un pool allelico più ampio ed indicativo delle varianti alleliche complessivamente presenti nell'ambito degli ecotipi di mais piemontesi.

Per quanto riguarda le varietà ibride, l'uso dei 7 loci SSR ha permesso l'individuazione di alcune varianti alleliche esclusive in grado di caratterizzare determinati ibridi e consentire la loro discriminazione dal *Pignoletto rosso* e dagli altri ecotipi locali di mais. La valutazione delle forme alleliche esclusive per gli ibridi F1 è stata eseguita valutando ogni singolo microsatellite, in quanto ognuno dei sette ha permesso di discriminare un certo numero di ibridi. In **Figura 4.3.2.4** vengono riportate porzioni di gel elettroforetico riferite a tutti gli ibridi analizzati per alcuni dei marcatori SSR informativi, nelle quali viene evidenziata la presenza delle forme alleliche esclusive. Per gli stessi marcatori SSR vengono a seguito riportate le tabelle contenenti tutte le varianti alleliche riscontrate allo scopo di mettere in risalto le forme alleliche esclusive per gli ibridi F1.

Nel complesso, sulla totalità dei 21 ibridi F1 analizzati, 18 hanno evidenziato la presenza di forme alleliche esclusive, ed alcuni di questi hanno evidenziato tali polimorfismi a seguito dell'amplificazione di più loci microsatellite, come nel caso del *Marano* per i loci SSR p-dipssr10 e N60, del *Lucia* per i loci SSR p-dupssr7 e N22, del N43 per i loci SSR p-dupssr10 e N22 ed infine nel caso del *Kermess* per i loci SSR p-dupssr7 e N60. Non risultano invece caratterizzati da alleli esclusivi per i marcatori utilizzati gli ibridi *Jiulian* (Ersa Friuli), *Corniola* (Apsov Sementi) e *Roano* (Sivam).

Bp p-dupssr7	
	PIGNOLETTO ROSSOBANCHETTE
	PIGNOLETTO ROSSO CARETTO
	PIGNOLETTO ROSSO RIVARA
	NOSTRANO DELL'ISOLA
	OSTENGA DEL CANAVESE
	OTTOFILE BIANCO ALBA
	OTTOFILE GIALLO CASALE
	OTTOFILE GIALLO CUNEO
	OTTOFILE ROSSO ALBA
	PIGNOLETTO GIALLO ALBA
	PIGNOLETTO GIALLO LA MORRA
	PIGNOLETTO GIALLO TORINO
	GRUIZ
	ARZANO
	BELGRANO
	AADRANO
	LG3321
	MARANO 0501
	SISRED
	ASTICO
	JULIAN
	LUCIA
	PR36Y03
	DKC6677
	ISH301V
	ALABASTRO
	REDEL
	ROANO
	CORNIOLA
	LOLITA
	N43
	DKC6309
	KERMESS
120	
131	
143	
148	
153	
158	
165	
173	
175	

Bp p-dupssr10	
	PIGNOLETTO ROSSO BANCHETTE
	PIGNOLETTO ROSSO CARETTO
	PIGNOLETTO ROSSO RIVARA
	NOSTRANO DELL'ISOLA
	OSTENGA DEL CANAVESE
	OTTOFILE BIANCO ALBA
	OTTOFILE GIALLO CASALE
	OTTOFILE GIALLO CUNEO
	OTTOFILE ROSSO ALBA
	PIGNOLETTO GIALLO ALBA
	PIGNOLETTO GIALLO LA MORRA
	PIGNOLETTO GIALLO TORINO
	GRUIZ
	ARZANO
	BELGRANO
	AADRANO
	LG3321
	MARANO 0501
	SISRED
	ASTICO
	JULIAN
	LUCIA
	PR36Y03
	DKC6677
	ISH301V
	ALABASTRO
	REDEL
	ROANO
	CORNIOLA
	LOLITA
	N43
	DKC6309
	KERMESS
145	
150	
158	
175	
180	
186	
190	
196	
200	
215	
220	
240	

Variante alleliche dei marcatori p-dupssr7 e p-dupssr10, in giallo vengono indicate le forme alleliche esclusive per gli ibridi F1

Bp SSR N22	PIGNOLETTO ROSSO BANCHETTE	PIGNOLETTO ROSSO CARETTO	PIGNOLETTO ROSSO RIVARA	NOSTRANO DELL'ISOLA "	OSTENGA DEL CANAVESE '	OTTOFILE BIANCO ALBA'	OTTOFILE GIALLO CASALE '	OTTOFILE GIALLO CUNEO '	OTTOFILE ROSSO ALBA "	PIGNOLETTO GIALLO ALBA "	PIGNOLETTO GIALLO LA MORRA '	PIGNOLETTO GIALLO TORINO "	GRITZ	ARZANO	BELGRANO	AADRANO	LG3321	MARANO 0501	SISRED	ASTICO	JULIAN	LUCIA	PR36Y03	DKC6677	ISH301v	ALABASTRO	REDEL	ROANO	CORNIOLA	LOLITA	N43	DKC6309	KERMESS			
185																																				
188																																				
195																																				
200																																				
208																																				
212																																				
225																																				
230																																				
244																																				
250																																				
255																																				
265																																				
275																																				
285																																				

Bp SSR N60	PIGNOLETTO ROSSOBANCHETTE	PIGNOLETTO ROSSO CARETTO	PIGNOLETTO ROSSO RIVARA	NOSTRANO DELL'ISOLA "	OSTENGA DEL CANAVESE "	OTTOFILE BIANCO "	OTTOFILE GIALLO CASALE '	OTTOFILE GIALLO CUNEO "	OTTOFILE ROSSO ALBA "	PIGNOLETTO GIALLO ALBA '	PIGNOLETTO GIALLO LA MORRA '	PIGNOLETTO GIALLO TORINO "	GRITZ	ARZANO	BELGRANO	AADRANO	LG3321	MARANO 0501	SISRED	ASTICO	JULIAN	LUCIA	PR36Y03	DKC6677	ISH301v	ALABASTRO	REDEL	ROANO	CORNIOLA	LOLITA	N43	DKC6309	KERMESS				
195																																					
225																																					
258																																					
270																																					
290																																					
295																																					
300																																					
315																																					
330																																					
350																																					
360																																					

Variante alleliche dei marcatori N22 e N60, in giallo vengono indicate le forme alleliche esclusive per gli ibridi F1

La fase conclusiva del sottoprogetto 3 ha previsto la validazione e l'ottimizzazione del rilievo nell'ambito di farine pure e farine potenzialmente ottenute da ibridi. A questo scopo, i marcatori precedentemente identificati sono stati amplificati a partire da DNA estratto dalle farine prodotte nell'ambito del sottoprogetto 2 (di sicura provenienza da ecotipi di mais piemontesi), e da altre farine commerciali potenzialmente derivanti dalla trasformazione di granella ibrida. Nel dettaglio sono state utilizzate tre farine sicuramente composte con il 100% della varietà *Pignoletto rosso* e tre potenzialmente composte da sfarinati ibridi (**Figura 4.3.2.5**). Il DNA estratto dai 6 campioni di farine, mediante il protocollo riportato al **punto 4.3.3** è stato utilizzato per l'amplificazione mediante i 7 SSR polimorfici precedentemente identificati e separati elettroforeticamente mediante sequenziatore. Al fine di verificare la loro composizione allelica, per ogni microsatellite utilizzato, per la separazione elettroforetica sono stati affiancati i campioni di DNA che, nella fase precedente della ricerca, hanno evidenziato le forme alleliche esclusive, in grado di discriminare pertanto gli ibridi in questione. A titolo di esempio, in **Figura 4.3.2.6** sono riportate le separazioni elettroforetiche ottenute per farine e campioni di riferimento, con le relative forme alleliche discriminanti per alcuni marcatori SSR. Nei tre esempi riportati è possibile evidenziare la presenza di forme alleliche esclusive per alcune varietà ibride nell'ambito delle farine di potenziale derivazione ibrida, mentre nessuna di tali forme alleliche è stata evidenziata nell'ambito delle farine composte al 100% da *Pignoletto rosso*.

In conclusione l'identificazione di alleli esclusivi per 18 ibridi commerciali sui 21 analizzato, può quindi consentire di ottenere una loro univoca discriminazione rispetto all'ecotipo *Pignoletto rosso* (sicuramente una delle realtà più apprezzate nell'ambito degli ecotipi locali) e, in più in generale, rispetto agli ecotipi piemontesi di mais da polenta. I risultati ottenuti dalle prove di laboratorio, sono stati confermati e validati con l'analisi condotte direttamente su alcune farine da polenta la cui commercializzazione non è stata basata sulla tipicità del prodotto, nell'ambito delle quali è stata sempre individuata la presenza di marcatori specifici per alcuni degli ibridi analizzati in questo lavoro.

Inoltre, in seguito all'analisi delle separazioni elettroforetiche, per ogni microsatellite amplificato è stato possibile individuare alcune forme alleliche esclusive ed univoche per l'ecotipo *Pignoletto rosso*. Queste forme alleliche sono state evidenziate a seguito dell'amplificazione del DNA estratto da piante singole ottenute nell'ambito delle tre diverse provenienze dell'ecotipo in analisi. Alcuni esempi sono stati riportati in **Figura 4.3.2.7**. Tali alleli specifici per la varietà *Pignoletto rosso* rappresentano un primo contributo alla possibile definizione di un set, ben più ampio, di alleli specifici, necessari per la messa a punto di un protocollo per la tracciabilità molecolare dell'ecotipo nella filiera agroalimentare.

3.3.1.1 Attività 3.1- Caratterizzazione molecolare degli ecotipi locali di mais

Responsabile: DISAFA

Partner partecipanti: DISAFA

3.3.1.1.1 Partner DISAFA:

- Ottenimento delle piante da ciascuna accessione in studio mediante germinazione dei semi in capsule Petri, su dischi di carta bibula inumiditi
- Estrazione del DNA a partire da 8 piante nell'ambito di ciascuna accessione
- Screening preliminare dei 12 marcatori SSR testati su un campione per ecotipo
- Analisi del livello di polimorfismo e selezione di 4 SSR per la caratterizzazione molecolare complessiva degli ecotipi
- Amplificazione dei 4 SSR (p-phi03, p-dupssr1, p-dupssr7 e p-dupssr10) sul totale delle piante analizzate (8 piante per 15 accessioni = 120 piante in totale)
- Separazione elettroforetica su gel di poliaccrilamide e visualizzazione dei prodotti di amplificazione

- Analisi dei dati mediante software NEIGHBOUR e CONSENSE entro il pacchetto PHYLIP e costruzione del dedrogramma NJ

3.3.1.2 Attività 3.2- Sviluppo di marcatori per il rilievo della presenza di ibridi commerciali nelle farine di mais locali

Responsabile: DISAFA

Partner partecipanti: DISAFA

3.3.1.2.1 Partner DISAFA:

- Raccolta e collezione di 21 ibridi commerciali e ottenimento delle piante da ciascun ibrido in studio mediante germinazione dei semi in capsule Petri, su dischi di carta bibula inumiditi
- Estrazione del DNA a partire da 2 piante nell'ambito di ciascun ibrido
- Mescolamento dei campioni di DNA estratti per ciascun ecotipo entro 'bulk', allo scopo di avere un campione rappresentativo dell'ecotipo (2 bulk per accessione = 30 bulk)
- Amplificazione di 12 SSR sul totale dei campioni in analisi (90 piante della tipologia *Pignoletto rosso*, 30 bulk, 42 campioni di DNA da ibrido = 162 campioni in totale)
- Separazione elettroforetica su gel di poliacrilamide e visualizzazione dei prodotti di amplificazione
- Analisi dei dati, confronto dei profili molecolari ed identificazione degli alleli esclusivi e discriminanti nell'ambito degli ibridi commerciali.
- Identificazione di un set di alleli esclusivi per la tipologia *Pignoletto rosso*

3.3.1.3 Attività 3.3- Validazione delle forme alleliche identificate e messa a punto di un protocollo per l'identificazione di possibili contraffazioni

Responsabile: DISAFA

Partner partecipanti: DISAFA

3.3.1.3.1 Partner DISAFA:

- Ottenimento di 6 campioni di farina, prodotti nell'ambito del sottoprogetto 2 (di sicura provenienza da ecotipi di mais piemontesi), e altre farine commerciali potenzialmente derivanti dalla trasformazione di granella ibrida.
- Estrazione del DNA a partire dalle farine e valutazione della sua qualità.
- Amplificazione dei 7 SSR in grado di evidenziare alleli esclusivi sui campioni di farina e sugli ibridi di riferimento (varietà per le quali sono stati evidenziati gli alleli esclusivi)
- Separazione elettroforetica su gel di poliacrilamide e visualizzazione dei prodotti di amplificazione
- Analisi dei dati, confronto dei profili molecolari ed identificazione degli alleli esclusivi e discriminanti nell'ambito delle farine commerciali.

4. Ulteriore documentazione e allegati

4.1 Allegati Sottoprogetto 1

4.1.1 Disciplinare di produzione *dell'associazione Antichi Mais Piemontesi* e relativi allegati

DISCIPLINARE DI PRODUZIONE DELL'ASSOCIAZIONE ANTICHI MAIS PIEMONTESE

Premessa (Origine del prodotto)

Il mais è, in Italia fin dai primi anni del '900, il secondo prodotto dopo il frumento. Per lo più coltivato a fini zootecnici, trova impiego per l'alimentazione umana in prevalenza nelle regioni del settentrione. Nel "*Dizionario geografico, storico, statistico, commerciale dello Stato Sabauda*" (Casalis, 1838) è possibile risalire a tutti i comuni sul cui territorio era coltivato il mais e individuare tre grandi aree in cui si concentrava il massimo della produzione. Queste erano: il Canavese, la bassa Val di Susa e la pianura compresa fra Torino e Pinerolo.

Le testimonianze raccolte confermano che in passato erano presenti sul territorio numerose varietà locali originatesi da differenti condizioni pedoclimatiche e modalità di coltura. Con l'avvento delle varietà ibride negli anni '50, più produttive e redditizie, gli ecotipi locali sono andati incontro ad un rapido declino. Alcuni sono addirittura andati persi, ne rimane solo una citazione bibliografica, altri sono stati conservati, attraverso la risemina aziendale, da alcuni agricoltori legati alle tradizioni familiari. In provincia di Torino se ne contano a tutt'oggi 7 ben distinguibili: i Pignoletti giallo e rosso del Canavese, l'Ostenga del Canavese, il Nostrano dell'Isola, gli ottofile bianco, giallo e rosso dell'Albese.

Le varietà piemontesi sono state iscritte nel Registro Nazionale delle Varietà da Conservazione.

Art. 1

(Denominazione del prodotto)

La denominazione "Farine di antichi mais" (Ottofile bianco, Ottofile giallo, Ottofile rosso, Pignoletto giallo, Pignoletto rosso, Ostenga, Nostrano dell'Isola) è riservata alle farine ricavate dagli ecotipi PIEMONTESE

¹ Casalis G. - *Dizionario geografico, storico, statistico, commerciale dello Stato Sabauda* – Torino 1838 – 1845

rispondenti alle condizioni ed ai requisiti stabiliti nel presente disciplinare di produzione.

Art. 2

(Descrizione del prodotto)

L'indicazione "Farine di antichi mais" designa esclusivamente le farine degli ecotipi di mais locali (Pignoletto giallo, Pignoletto rosso, Ostenga, Nostrano dell'Isola e Ottofile giallo, bianco, rosso) prodotti nell'area di cui all'art. 3 e rispondenti alle caratteristiche proprie e distintive di ciascun ecotipo :

- Pignoletto rosso: spiga cilindro-conica, n° di ranghi variabile, granella rostrata, color rosso arancio, vitrea, tutolo bianco;
- Pignoletto giallo: spiga cilindro-conica, n° di ranghi variabile, granella rostrata, color giallo- arancio, vitrea, tutolo bianco;
- Ostenga: spiga cilindrica di otto ranghi, granella grossa, color bianco perlaceo, tutolo bianco, coltivato principalmente nel Canavese;
- Nostrano dell'Isola: spiga conica, n° di ranghi variabile, granella color giallo, tutolo bianco;
- Ottofile: spiga cilindrica di otto ranghi, tutolo bianco, granella grossa di colore variabile dal bianco, al giallo, al rosso

Si tratta di mais tardivi, caratterizzati da una discreta resa alla macinazione e da un sapore particolarmente intenso.

Art. 3

(Area di produzione)

L'area di produzione delle "Farine di antichi mais" comprende tutti i Comuni della REGIONE PIEMONTE per quanto concerne la produzione della materia prima, ossia della granella. I Produttori vengono distinti in:

- soci ordinari della provincia di Torino
- Soci ordinari delle altre province Piemontesi
- Soci straordinari o onorari

con diritti e doveri distinti come dall'Art. 6 dello statuto, dal presente disciplinare all' Art. 6 ed altri.

Art.4

(Metodo di ottenimento del prodotto)

Scelta delle varietà adatte

Gli ottofile si adattano meglio alla coltivazione in zone collinari con terreni mediamente pesanti. La coltivazione su terreni poco fertili in zona montana è più consigliata per i pignoletti, il nostrano dell'isola e l'ostenga.

In annate mediamente piovose queste varietà non necessitano di interventi irrigui. Possono essere necessarie irrigazioni di soccorso nel caso di decorsi stagionali siccitosi; in particolare, durante la fioritura e in fase di riempimento carioidi, il perdurare di condizioni di siccità può favorire l'insorgere di funghi produttori di micotossine.

Periodo di semina. La semina va effettuata tra marzo e maggio. E' consigliabile seminare il prima possibile, appena la temperatura del terreno e l'accessibilità al campo lo permettono (il mais ha bisogno di una temperatura minima di 12 °C per germinare).

Densità di semina. La distanza di semina sulla fila può variare dai 20 ai 30 cm, tra le file 75-100 cm. E' stato verificato che ad un investimento superiore non corrisponde un incremento di produzione ed anzi queste piante necessitano delle giuste distanze per irrobustire lo stocco e non andare incontro a fenomeni di allettamento.

Cure colturali. In annate particolarmente asciutte è possibile effettuare irrigazioni di soccorso.

E' consigliata la pratica del sovescio da inserire in rotazione per migliorare le caratteristiche chimiche e fisiche del terreno, migliorare le condizioni fitosanitarie contribuire al contenimento di *Ustilago maidis*, *Agriotes* spp, *Diabrotica virginifera virginifera*.

Avversità. *Ustilago maidis*, agente del Carbone, si manifesta in modo evidente con annata calda e asciutta. Normalmente i danni causati dal

Carbone sono limitati, eliminare le parti infette quando compaiono, portarle fuori dal campo e distruggerle.

Raccolta. Raccogliere al raggiungimento della maturazione fisiologica, con una umidità della granella intorno al 22%, e destinarla nel minor tempo possibile all'essiccazione. Preferire la raccolta manuale per ridurre al minimo il numero di chicchi rotti e ammuffiti. Quando la raccolta manuale non è realizzabile usare trebbie pulite e ben tarate per limitare i rischi di rotture.

Essiccazione, pulizia della granella e conservazione. Portare l'umidità della granella a 12% nel minor tempo possibile. Sono consigliati essiccatori ad aria calda, la temperatura non deve superare i 60°C.

Ridurre il numero di grani spezzati o ammuffiti, farina, polvere e residui vegetali per migliorare la qualità del prodotto e aumentarne la conservabilità. A tale scopo è consigliabile utilizzare una pulitrice meccanica o ottica prima della macinatura.

I prodotti a base di “antichi mais” possono derivare:

- Da mais coltivati con metodi convenzionali.
- Da mais coltivati secondo le norme dell'Agricoltura Biologica stabilite dal regolamento CEE 834/07, 889/08 e s.m. oppure secondo le norme di produzione stabilite dai disciplinari regionali per l'applicazione del regolamento CE 1257/99.

Linee guida più dettagliate per la coltivazione di varietà locali di mais sono contenute nel regolamento interno dell'Associazione.

Art. 5

(Legame con l'ambiente)

I produttori degli ecotipi di mais di cui all'art.2 e le particelle catastali su cui avviene la coltivazione, saranno iscritti in appositi elenchi gestiti dall'associazione che si costituirà con un regolamento. Lo stesso avverrà per i mulini trasformatori di tali mais. L'associazione definirà le modalità di iscrizione nei suddetti elenchi e dei controlli di rispondenza al presente disciplinare (vedi Art. controlli e tracciabilità)

Art. 6

(Confezionamento, etichettatura e commercializzazione.)

Le “Farine di antichi mais” dovranno derivare da macinazione integrale con mulino a pietra di granelle prodotte da coltivatori associati.

E’ prevista anche la produzione di fumetto, dove sia possibile prevedere una setacciatura/separazione o una macinazione più fine.

I prodotti derivati da antichi mais dovranno essere commercializzati in confezioni sulle quali sarà apposto il logo “ANTICHI MAIS” con a seguire la specificazione dell’ecotipo in purezza o degli ecotipi presenti nella miscela della farina e la composizione percentuale degli stessi, oltre agli estremi previsti dalle normative vigenti in materia di identificazione del prodotto.

I Soci ordinari della provincia di Torino sono autorizzati all’uso del logo identificativo specifico ed univoco della “Farina di antichi mais piemontesi” di cui al successivo art 10.

Accanto a tale logo dovrà essere presente il logo del “Paniere dei prodotti tipici della provincia di Torino”.

I Soci ordinari delle altre province Piemontesi sono autorizzati all’utilizzo del solo logo identificativo specifico ed univoco della “Farina di antichi mais piemontesi” di cui al successivo art 10.

Tali loghi dovranno essere apposti sulle confezioni previste dal presente Disciplinare.

È consentito l’uso di indicazioni che facciano riferimento a marchi privati e nomi aziendali o località dai quali effettivamente provengano le antiche varietà di mais, purché non abbiano significato laudativo.

I prodotti potranno essere certificati come prodotto di agricoltura biologica o venduti come “prodotto a basso impatto ambientale” in base al metodo di produzione adottato.

Le farine di antichi mais verranno in genere commercializzate ad un prezzo superiore a quello delle normali farine in quanto, a fronte di una minor resa degli ecotipi locali, i prodotti ottenuti si contraddistinguono per le elevate caratteristiche organolettiche e nutrizionali.

Art. 7 (Origine dei trasformati)

I prodotti trasformati devono derivare da mais antichi: Pignoletto giallo, Pignoletto rosso, Ostenga, Nostrano dell'Isola e Ottofile giallo, bianco, rosso.

Le farine di mais utilizzate nei trasformati dovranno derivare da mail coltivati solo da produttori associati Piemontesi con le limitazioni territoriali descritte all'articolo 10 bis dello statuto, e all'art 6 del presente regolamento in particolare: possono essere etichettate con il logo "Paniere dei prodotti tipici della provincia di Torino" a fianco del logo dell'associazione Antichi Mais (vedi art. 10) solo le farine e i trasformati che provengono da materia prima di soci ordinari della provincia di Torino definiti dall'articolo 6 dello statuto; le farine e i trasformati che provengano da materia prima di Soci ordinari delle altre province Piemontesi saranno etichettate con il solo logo dell'associazione Antichi Mais.

Art. 8 (caratteristiche dei trasformati)

Possono essere etichettati con i loghi di cui al articolo 6 e 7 del disciplinare, esclusivamente i seguenti prodotti trasformati secondo le seguenti specifiche:

- Farina per polenta
- Ingredienti: 100% farine di antichi mais
- In etichetta vanno specificate le varietà presenti nella farina.

- Farina per pasticceria
- Ingredienti: 100% farine di antichi mais
- In etichetta vanno specificate le varietà presenti nella farina.

- Polenta
- Ingredienti: 100% farine di antichi mais, acqua, sale;

- Paste di Meliga:

Ingredienti ammessi : farina di mais antichi macinata a pietra, farina di grano;

Alle farine vanno aggiunti solo: zucchero, uova, burro;

Ingredienti facoltativi: latte, agenti lievitanti, scorza di limone, vanillina;

Ingredienti vietati: conservanti, margarina, oli idrogenati, altri aromi, altre farine o fecole.

N.B.: la parte di farina di mais deve contenere solo varietà antiche integrali macinate a pietra nel rapporto non inferiore al 75% di mais 25% grano 00, fino al 100% di mais antichi.

- Miasse:

Ingredienti: esclusivamente 100% farine di antichi mais e acqua.

Sono vietati altri ingredienti per l'impasto o grassi e oli per la cottura.

Le Miasse vanno cotte con i tradizionali strumenti:

Brandèr: ferro su cui si appoggia la piastra di cottura;

Fer dij Miasse: piastra rettangolare utilizzata per la cottura;

Paletta dij Miasse: lunga paletta, dall'estremità arrotondata che serve per stendere la pastella sulla piastra;

- Pane di mais :

Ingredienti: la parte di farina di mais deve contenere solo varietà antiche integrali macinate a pietra nel rapporto non inferiore al 50% di mais 50% grano 00, fino al 100% di mais antichi.

I trasformatori dovranno associarsi all'Associazione produttori antichi mais" e potranno utilizzare sulle confezioni la dicitura "prodotto con Farine di antichi mais" ed il logo dell'Associazione.

Art. 9

(Produzione e moltiplicazione del seme)

Sarà istituita la figura di "agricoltore custode", cui affidare il compito di riprodurre in purezza il seme di ciascuna varietà, secondo gli standard.

Isolamento

Il mais è una pianta ad impollinazione incrociata per mantenere le caratteristiche tipiche della varietà tradizionale (locale) è necessario seminare ad una distanza sufficiente a ridurre le probabilità di incrocio con altri mais. La presenza di pendii o venti può influire molto sulla diffusione del polline, come anche la presenza di zone boschive o avvallamenti.

Pratiche di isolamento utilizzabili:

Isolamento nello spazio:

→ distanziare di almeno 500 m due varietà di mais

→ servirsi di barriere naturali (bosco, muretti, ..)

Isolamento nel tempo:

Anticipare (o posticipare) la semina per non fare coincidere i periodi di fioritura delle due varietà

Isolamento meccanico:

Isolare le infiorescenze femminili e fare impollinazione manuale (praticata in particolare a scopo di ricerca, di difficile attuazione in un campo coltivato perché questa pratica necessita di molto tempo).

Dimensione dell'appezzamento destinato alla produzione di seme

Per mantenere una buona variabilità genetica è necessario allestire campi di produzione seme di almeno 500 mq. E' consigliabile scambiare seme ogni tre-quattro anni con un altro produttore che coltivi la stessa varietà.

Raccolta

Effettuare raccolta manuale.

Selezione delle spighe

Di tutte le spighe raccolte scegliere quelle con i caratteri distintivi della varietà: colore e forma del seme, dimensione della spiga, numero di file, ecc . Dalle spighe selezionate prelevare i semi presenti sulla parte centrale della spiga, più grandi e meglio impollinati, per destinarli alla semina dell'anno successivo.

Conservazione del seme

Essiccare i semi con essiccatore ad aria calda con temperatura inferiore ai 40°C per non danneggiare la germinabilità.

Per piccole quantità di seme è consigliata la congelazione per 48 ore per uccidere eventuali uova di parassiti presenti, meglio se precedentemente la granella è stata messa sotto vuoto. I semi ben essiccati si conservano in luogo asciutto e fresco per 4/5 anni mantenendo una buona germinabilità

Linee guida più dettagliate per la produzione e moltiplicazione di seme di varietà locali di mais sono contenute nel regolamento interno dell'Associazione.

Art. 10 (Logo)



Il logo dell'associazione viene descritto all'articolo 4 dello Statuto.

Art. 11 (Sanzioni)

Il mancato rispetto dello statuto, del regolamento e del disciplinare comporta la decadenza da socio e il divieto di utilizzare il marchio e il logo dell'associazione. Comporta la decadenza da socio anche il giudizio negativo del consiglio sulla qualità del prodotto commercializzato dal singolo socio. La decadenza da socio è sancita dal consiglio e posta in

approvazione dell'assemblea, non comporta la restituzione delle quote associative versate dal socio o altre spese da esso sostenute.

Art 12

(tracciabilità e controlli)

La disponibilità di un protocollo per la caratterizzazione e la tracciabilità genetica degli antichi mais, basato sull'analisi del DNA e l'applicazione della tecnica SSR (simple sequence repeats – microsatelliti), consente di discriminare le farine ottenute da antichi mais dalle farine derivanti dai principali ibridi di mais a granella vitrea coltivati sul territorio nazionale. E' pertanto possibile evidenziare l'eventuale presenza di farina di derivazione da granella ibrida e identificare possibili contraffazioni nell'ambito dei prodotti alimentari (farine da polenta, prodotti da forno) commercializzati, in modo fraudolento, come prodotti 'locali' o 'tradizionali' derivanti dalla trasformazione della granella di ecotipi di mais piemontesi.

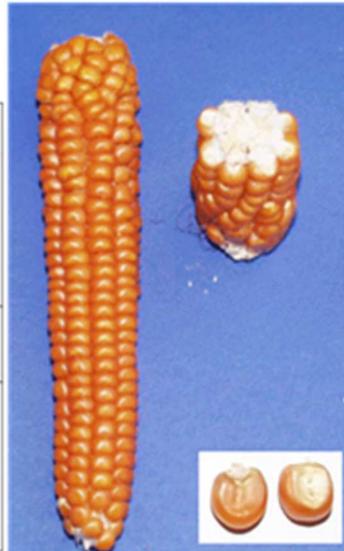
I prodotti degli associati possono pertanto essere tutelati da eventuali contraffazioni e l'associazione potrà effettuare controlli campione al fine di verificare l'osservanza dei requisiti dettati dal presente disciplinare, inerenti alla presenza del 100% di farine di antichi mais nei prodotti trasformati.

4.2 Allegati Sottoprogetto 2

4.2.1 Schede descrittive degli ecotipi coltivati nell'ambito del progetto e schede rilievo dati

Ottofile giallo

PIANTA	<i>Vigoria</i>	precoce
	<i>Proterandria</i>	buona
	<i>Inserzione spiga</i>	medio-alta
	<i>Robustezza stocco</i>	robusto
	<i>Tenuta radici</i>	buona
	<i>Taglia</i>	alta
	<i>Canopy</i>	media
	<i>Coltivabilità</i>	media
SPIGA	<i>Forma</i>	cilindrica
	<i>Numero ranghi</i>	otto
	<i>Colore del tutolo</i>	bianco
GRANELLA	<i>Tipo</i>	vitreo
	<i>Colore</i>	giallo
	<i>Peso 1000 semi</i>	228
	<i>Peso enolitrico</i>	71,82 kg/hl
	<i>Umidità alla raccolta</i>	17,8
	<i>Produzione</i>	42,9 q/ha



SCHEDA RILIEVO DATI

AZIENDA Cascina delle Grazie di Matteo Zappino

Varieta'	Ottofile giallo
Superficie	2,63 ha
Data semina	9 maggio
Isolamento	Distanza maggiore di 500 m da altri mais
Lavorazioni	Aratura, concimazione, fresatura, semina, rullatura, diserbo in post emergenza
Densità	25 cm sulla fila, 80 tra le file
Andamento climatico	Piogge abbondanti e temperature basse
Infestanti	Poco presenti, non causano competizione
Irrigazione	no
Coltura precedente	Prato/mais
Avversità	Poche ovature di <i>O.nubilalis</i> trovate in fase di formazione cariossidi, pochi adulti di <i>Diabrotica</i> , qualche sintomo di <i>U. maidis</i> allontanato dal campo
Presenza muffe	Non rilevate
Data raccolta	Dal 23 ottobre al 13 novembre

Pignoletto rosso

PIANTA	<i>Vigoria</i>	tardiva
	<i>Proterandria</i>	buona
	<i>Inserzione spiga</i>	medio-alta
	<i>Robustezza stocco</i>	robusto
	<i>Tenuta radici</i>	stabile
	<i>Taglia</i>	medio-alta
SPIGA	<i>Canopy</i>	media
	<i>Coltivabilità</i>	media
	<i>Forma</i>	cilindro-conica
GRANELLA	<i>Numero ranghi</i>	variabile
	<i>Colore del tutolo</i>	bianco o rosso
	<i>Tipo</i>	vitreo, rostrata
	<i>Colore</i>	rosso-aranciata
	<i>Peso 1000 semi</i>	171
	<i>Peso ettolitrico</i>	73,24 kg/hl
	<i>Umidità alla raccolta</i>	21
	<i>Produzione</i>	24 q/ha



Nostrano dell'Isola

PIANTA	<i>Vigoria</i>	tardiva
	<i>Proterandria</i>	buona
	<i>Inserzione spiga</i>	media
	<i>Robustezza stocco</i>	media
	<i>Tenuta radici</i>	stabile
	<i>Taglia</i>	media
SPIGA	<i>Canopy</i>	media
	<i>Coltivabilità</i>	media
	<i>Forma</i>	conica
GRANELLA	<i>Numero ranghi</i>	variabile
	<i>Colore del tutolo</i>	bianco
	<i>Tipo</i>	vitreo
	<i>Colore</i>	giallo
	<i>Peso 1000 semi</i>	169,5
	<i>Peso ettolitrico</i>	73,9 kg/hl
	<i>Umidità alla raccolta</i>	13
	<i>Produzione</i>	2,6 q/ha



SCHEDA RILIEVO DATI DI CAMPO

AZIENDA Cascina Caretto di Loris Caretto

Varieta'	Pignoletto rosso	Nostrano dell'isola
Superficie	1300 mq	3500 mq
Data semina	17 aprile	17 aprile
Isolamento	Distanza maggiore di 500 m da altri mais	Dimensione del campo sufficiente + semina posticipata
Densità	25 cm sulla fila, 80 tra le file	25 cm sulla fila, 80 tra le file
Lavorazioni	Aratura, letamazione, fresatura, semina	Aratura, letamazione, fresatura, semina
Andamento climatico	Piogge abbondanti e temperature basse	Piogge abbondanti e temperature basse
Infestanti	Poco presenti, non causano competizione	Poco presenti, non causano competizione
Irrigazione	no	no
Coltura precedente	vite	grano
Avversità	Rilevate numerose ovature di <i>O.nubilalis</i> sulla sommità delle spighe in fase di formazione cariossidi. Numerosi adulti di <i>Diabrotica</i> sulle sete in fase di ingrossamento cariossidi	Poche ovature di <i>o.nubilalis</i> trovate in fase di formazione cariossidi
Presenza muffe	Non rilevate	Non rilevate
Data raccolta	Dal 20 al 27 settembre	Dal 20 al 27 settembre
NOTE	In fase di maturazione cerosa significativa presenza di corvi hanno in parte danneggiato la parte apicale delle spighe	

4.2.2 Protocollo per l'estrazione del DNA da pianta

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata secondo il protocollo 'Doyle and Doyle' (1990) con alcune modifiche a seguito riportate. Un piccola quantità (0,3 gr) di tessuto fresco è stato macerata in azoto liquido e trasferita in 800 µl di tampone di lisi in provetta (2% CTAB, 0.1 M Tris-HCl pH 9.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH8.0, 0.2% β-mercaptoetanol). Sono stati aggiunti 400 µl di una miscela di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1 v:v:v) per la denaturazione delle proteine. Dopo 10 minuti di agitazione è seguita una fase di centrifugazione a 14 krpm per 10 minuti temperatura ambiente ed il surnatante è stato trasferito in una nuova provetta. Gli acidi nucleici sono stati precipitati mediante l'aggiunta di 42 µl di acetato di ammonio e 800 µl di isopropanolo seguita da 5 minuti di centrifugazione a 10 Krpm, T amb. Il pellet precipitato è stato sottoposto ad un breve lavaggio in 1 ml di etanolo 70% e risospeso in 800 µl di tampone TE (10 mM Tris- HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). L'RNA presente nella soluzione è stato degradato mediante azione enzimatica di 1 µg di Ribonucleasi A (da pancreas bovino, Sigma), 30 minuti a 37 °C. Per eliminare eventuali contaminanti sono stati ripetuti i passaggi di purificazione. Sono stati aggiunti 250 µl di una miscela di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1 v:v:v). Dopo 10 minuti di agitazione è seguita una fase di centrifugazione a 14 krpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante è stato trasferito in una nuova provetta e il DNA è stato precipitato mediante l'aggiunta di 40 µl di acetato di sodio e 800 µl di etanolo assoluto seguita da 5 minuti di centrifugazione a 10 Krpm a temperatura ambiente. Il pellet precipitato è stato sottoposto ad un breve lavaggio in 1 ml di etanolo 70% e risospeso in 50 µl di tampone TE. Il DNA estratto è stato quantificato e calibrato ad una concentrazione di 100 ng/µl mediante fluorimetro (Hoefer DyNA Quant 200) e mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio allo 0,8% utilizzando dei campioni genomici standard a quantità nota come riferimento.

4.2.3 Protocollo AFLP

L'analisi AFLP è stata condotta seguendo il protocollo originale di Vos et al. (1995), successivamente modificato allo scopo di ottimizzare la visualizzazione dei profili elettroforetici mediante l'utilizzo del sequenziatore LICOR.

Il protocollo si è articolato nelle seguenti fasi :

- 1) Restrizione e Ligazione del DNA
- 2) Preamplificazione
- 3) Amplificazione
- 4) Elettroforesi su gel di poliacrilammide
- 5) Visualizzazione dei prodotti di amplificazione

1) RESTRIZIONE E LIGAZIONE

Un volume pari a 2 µl di ciascun campione, alla concentrazione di DNA pari a 100 ng/µl, è stato posto in incubazione a 37°C per 3 h in un volume finale di 20 µl costituito da tampone per restrizione 1X NEBuffer2 (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol), 10X BSA, 5 U di MseI e 5 U di EcoRI (New England BioLabs).

Successivamente sono stati aggiunti al prodotto di restrizione i reagenti necessari per la ligazione in un volume finale di 40 µl: 5 pmoli di adattatore EcoRI, 50 pmoli di adattatore MseI, 10X T4 DNA Ligase Reaction Buffer, 2 U T4 DNA-ligasi (New England BioLabs). Ciascun campione è stato posto in incubazione 16 h , 16°C. Gli adattatori sono stati preparati partendo da concentrazioni degli stock di 100 µM dei singoli primer (forward e reverse) nel seguente modo:

- Adattatore EcoRI: 5 µl di stock AdaEcoRI+ e 5 µl di stock AdaEcoRI- in 190 µl di TE 0.1X, 5 minuti a 65°C.
- Adattatore Msel: 50 µl di stock AdaMsel+ e 50 µl di stock AdaMsel- in 100 µl di TE 0,1X, 5 minuti a 65°C.

La sequenza degli adattatori utilizzati è indicata in Tabella (in grassetto sono indicate le sequenze complementari ai siti di restrizione):

Adattatore <i>EcoRI</i>	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
Adattatore <i>Msel</i>	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
	3'-TACTCAGGACTCAT-5'

Sequenza degli adattatori impiegati nella ligazione.

Un'aliquota del DNA ristretto/ligato è stato diluito 1/10 in TE 0,1 X per essere utilizzato nella fase successiva di preamplificazione.

2) PREAMPLIFICAZIONE

Nella reazione di preamplificazione sono stati utilizzati primer caratterizzati dalla presenza di un solo nucleotide selettivo (primer EcoRI+A in combinazione con primer Msel+C). 5 µl di DNA ristretto/ligato diluito sono stati amplificati in un volume finale di 20 µl contenenti 5X Colorless GoTaq Flexi Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 50 ng/µl primer forward, 50 ng/µl primer reverse e 1 U di GoTaq DNA Polymerase (Promega). Le sequenze dei due primer utilizzati sono illustrate di seguito (in grassetto le basi selettive):

Adattatore <i>EcoRI</i> +A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
Adattatore <i>Msel</i> +C	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'

Sequenza dei primer utilizzati per la preamplificazione.

Per le reazioni di preamplificazione si è utilizzato il seguente profilo termico:

1 min a 94° C (denaturazione iniziale)	25 cicli
30 s a 94° C (denaturazione)	
30 s a 55°C (appaiamento)	
1 min a 72°C (estensione)	
10 min. a 72° C (estensione finale)	

Protocollo termico impiegato per le reazioni di preamplificazione.

I campioni preamplificati sono stati poi controllati su gel di agarosio al 2% al fine di individuare uno smear di frammenti di peso molecolare compreso tra 100 e 1000 bp e successivamente diluiti 1/20 – 1/40 in TE 0,1X.

3) AMPLIFICAZIONE SELETTIVA

Il DNA preamplificato (5 µl) è stato utilizzato nella reazione di amplificazione. In questa fase sono state utilizzate quantità di reagenti identiche a quelle impiegate nella preamplificazione e primer dotati di 3 basi selettive. È stata effettuata una analisi preliminare utilizzando 8 combinazioni di primer riportate in Tabella:

<i>EcoRI+AAT / Msel+CAT</i>
<i>EcoRI+AAT / Msel+CTC</i>
<i>EcoRI+AAT / Msel+CAC</i>
<i>EcoRI+AGA / Msel+CAT</i>
<i>EcoRI+ACA / Msel+CAT</i>
<i>EcoRI+AGG / Msel+CAT</i>
<i>EcoRI+ATA / Msel+CAT</i>
<i>EcoRI+ATA / Msel+CAC</i>

Elenco delle otto combinazioni di primer AFLP utilizzate in fase di screening.

Per le reazioni di amplificazione selettiva su tutti i campioni si sono impiegate le quattro combinazioni più informative (indicate in grassetto in Tabella) ed è stato utilizzato il seguente profilo termico:

1 min a 94° C (denaturazione iniziale)	
30 s a 94° C (denaturazione) da 65° C a 56.6° C (-0.7° C ogni ciclo) per 30 s (appaiamento) 1 min a 72° C (estensione)	13 cicli
30 s a 94° C (denaturazione) 30 s a 56° C (appaiamento) 1 min a 72° C (estensione)	23 cicli
10 min. a 72° C (estensione finale)	

4) ELETTROFORESI

La corsa elettroforetica è stata condotta in un sistema verticale dotato di lastre di vetro delle dimensioni di 38x50 cm e spaziatori inseriti tra i due vetri dello spessore di 0,2 mm. Per il gel di poliacrilammide denaturante al 6% si sono miscelati 105 ml di urea 7 M + 15 ml acrilammide 40%. La corsa è avvenuta in tampone TBE 1X. Prima del caricamento dei campioni è stata effettuata una fase di precorsa a 80 W fino al raggiungimento della temperatura di 47° C. I prodotti di amplificazione sono stati diluiti con un *loading buffer* (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.01% blu di bromofenolo, 0.01 % di xilene cianolo), denaturati a 105° C per 5 minuti e posti immediatamente in ghiaccio per impedire il riappaiamento dei filamenti di DNA. 3,5 µl di ciascun campione sono stati caricati in pozzetti ottenuti mediante l'impiego di un pettine a denti di squalo. L'elettroforesi è stata condotta a 15 W per 5 min. e proseguita poi a 110 W per 2,5 h circa. Al termine i gel sono stati fissati in una soluzione di acido acetico al 10% per 30 min.

5) VISUALIZZAZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE

Per la visualizzazione degli amplificati si è utilizzata la tecnica di colorazione con nitrato d'argento (*silver staining*) secondo il protocollo, descritto da Bassam *et al.* (1991), che sfrutta la precipitazione degli ioni Ag²⁺ precedentemente legati ai frammenti di DNA, a seguito della riduzione in ambiente alcalino. Dopo il fissaggio in acido acetico i gel sono stati lavati in

acqua ultrapura (due risciacqui di 5 min. ciascuno) e trasferiti in soluzione impregnante costituita da 1 g/L di $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2$ e da formaldeide 0,056%, per 30 min. Dopo un brevissimo risciacquo in acqua ultrapura (massimo 10 sec.) effettuato allo scopo di rimuovere l'eccesso di argento dalla superficie, le lastre sono state poste in una soluzione di sviluppo (30 g/L Na_2CO_3 , 0,056% formaldeide e 400 $\mu\text{g/L}$ tiosolfato di sodio). All'apparire delle prime bande, le lastre sono state trasferite in soluzione di sviluppo fresca fino al momento del fissaggio effettuato mediante l'aggiunta di acido acetico al 10%. Dopo un breve risciacquo in acqua ultrapura i gel sono stati essiccati sulla lastra. Le immagini sono state acquisite per mezzo di uno scanner ed i pattern elettroforetici analizzati mediante Gel Documentation System (Quantity One Programme, BioRad).

4.2.4 Figure Sottoprogetto 2

Figura 4.2.4.1: Profilo AFLP ottenuto con la combinazione di primer EcoRI+AGA / MseI+CAT, a partire da piante campionate nell'ambito degli ecotipi *Pignoletto rosso* e *Nostrano dell'isola* (provenienze "Azienda Caretto" e "Banchette")

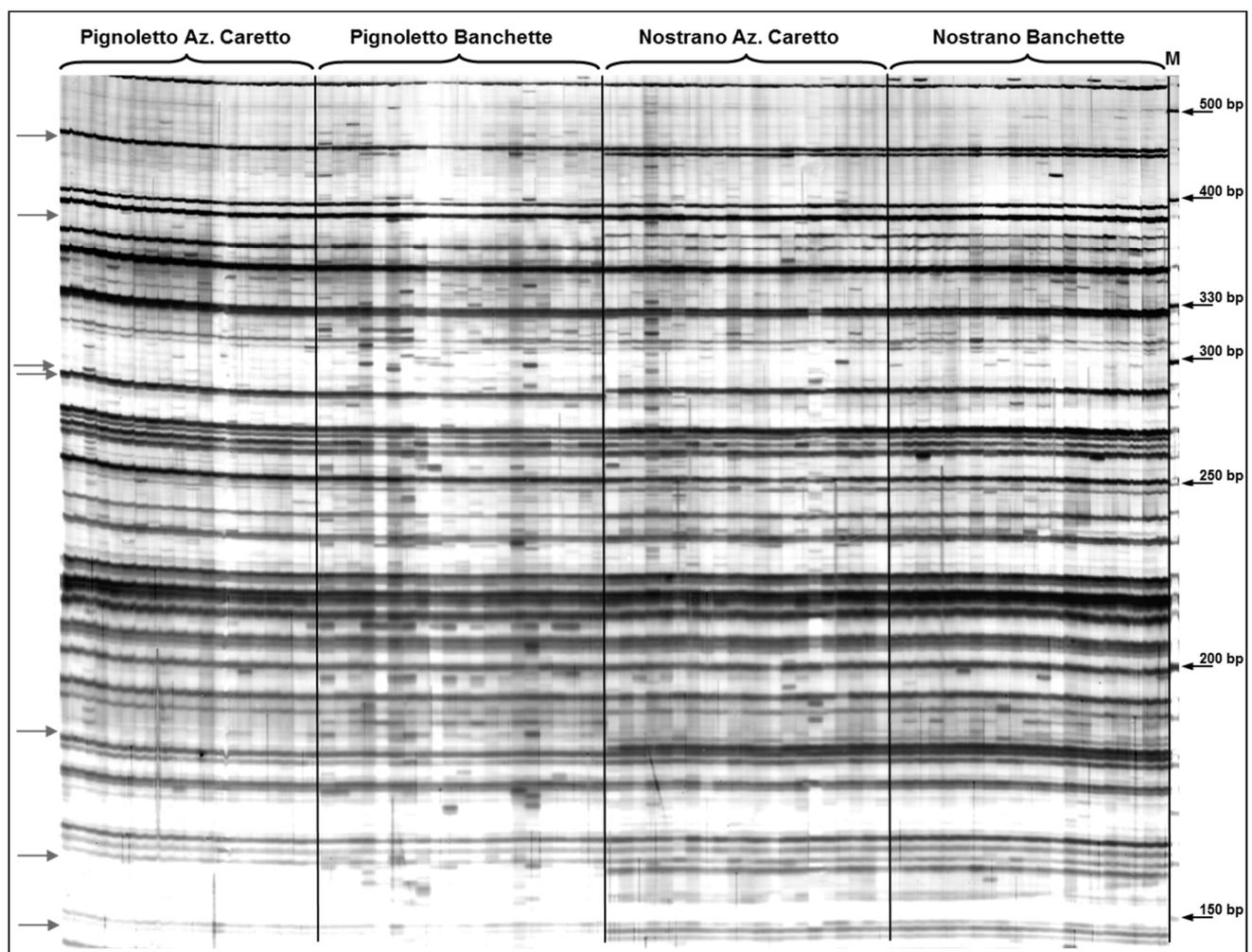


Figura 4.2.4.2: Dendrogramma UPGMA riportante le relazioni filogenetiche tra 210 campioni di mais, appartenenti a tre ecotipi, ottenuto mediante analisi dei dati molecolari AFLP

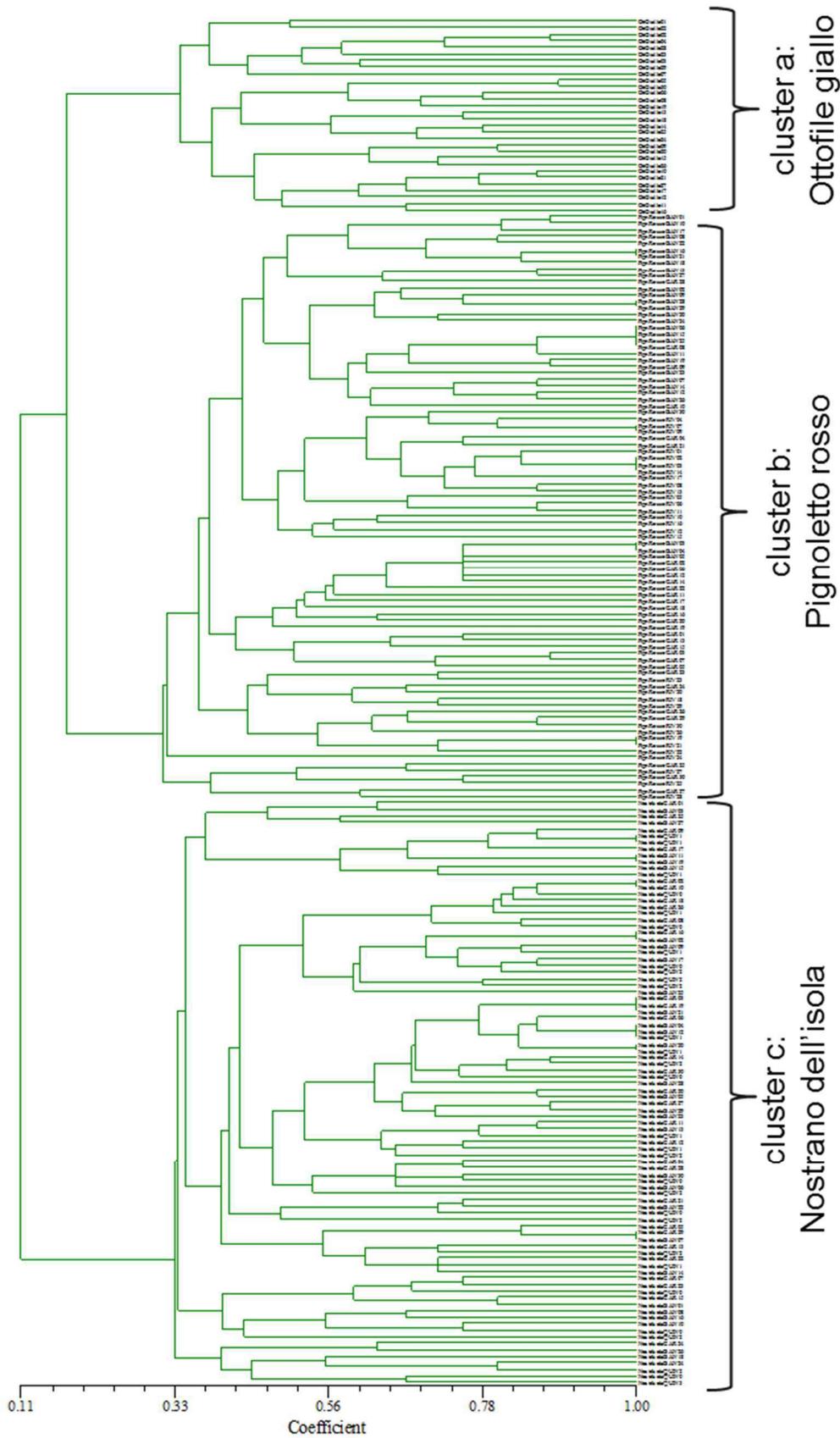
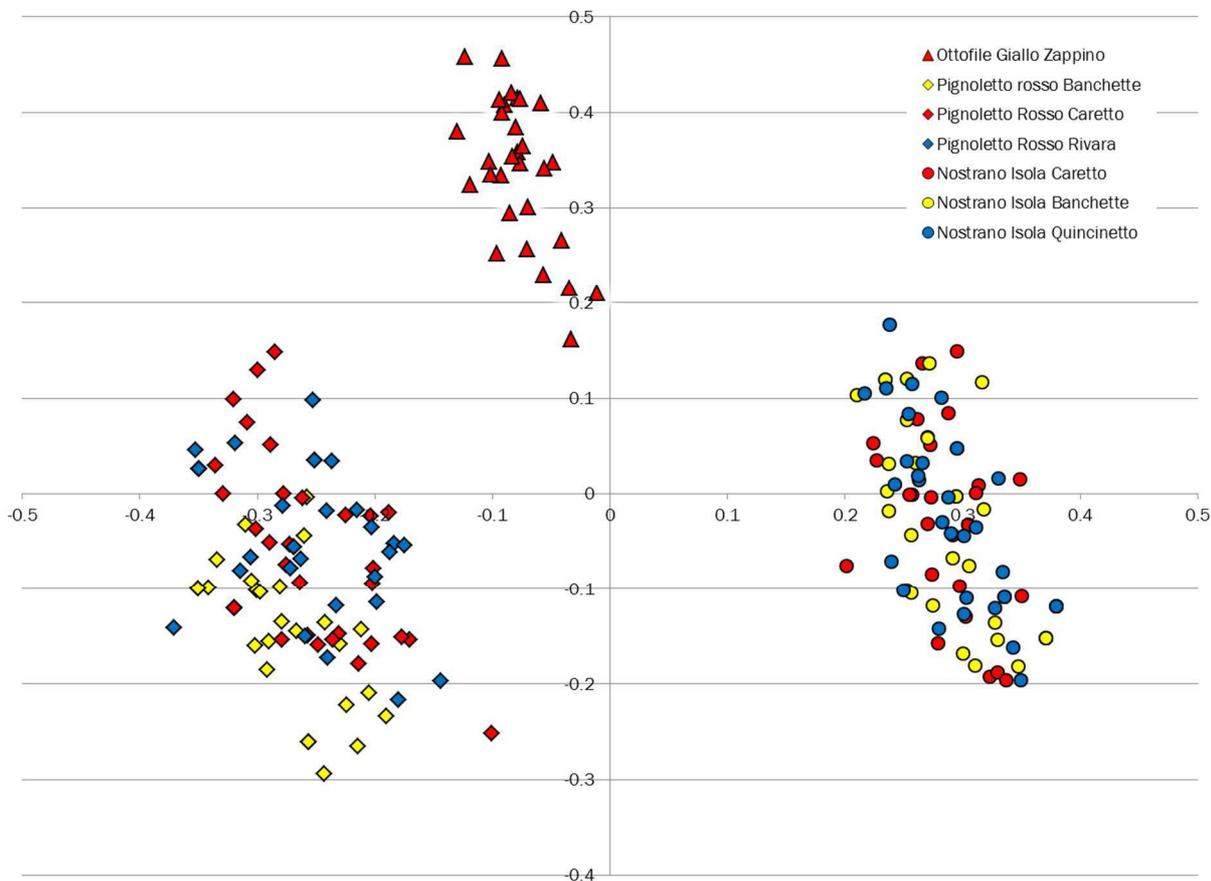
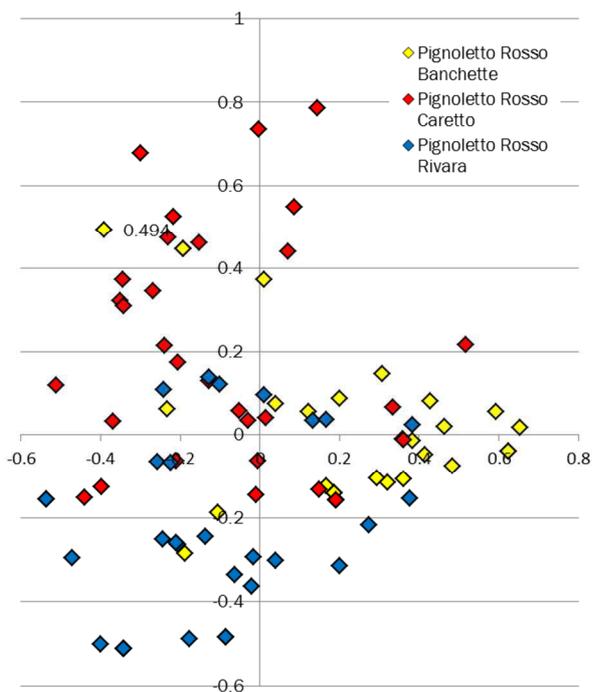


Figura 4.2.4.3: Grafici relativi alle analisi PCO condotte per i dati di caratterizzazione molecolare AFLP; a) analisi condotta sull'intero set di campioni; b) analisi specifica per le provenienze di *Pignoletto rosso*; c) analisi specifica per le provenienze di *Nostrano dell'isola*.

a)



b)



c)

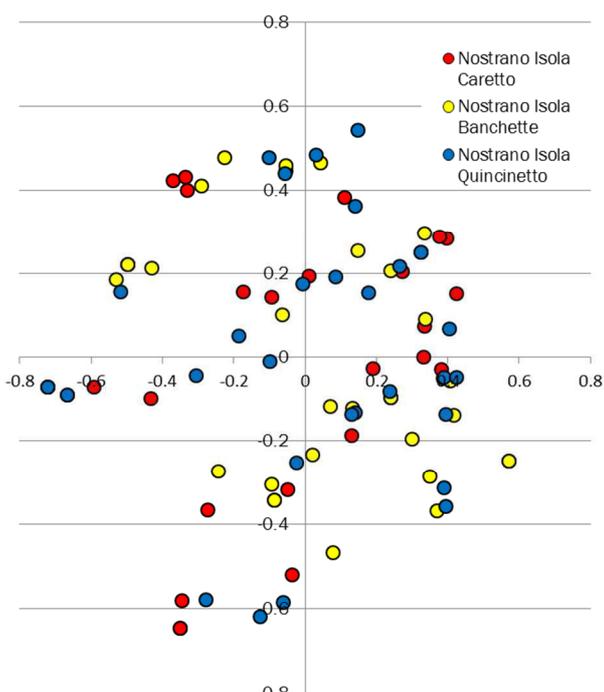
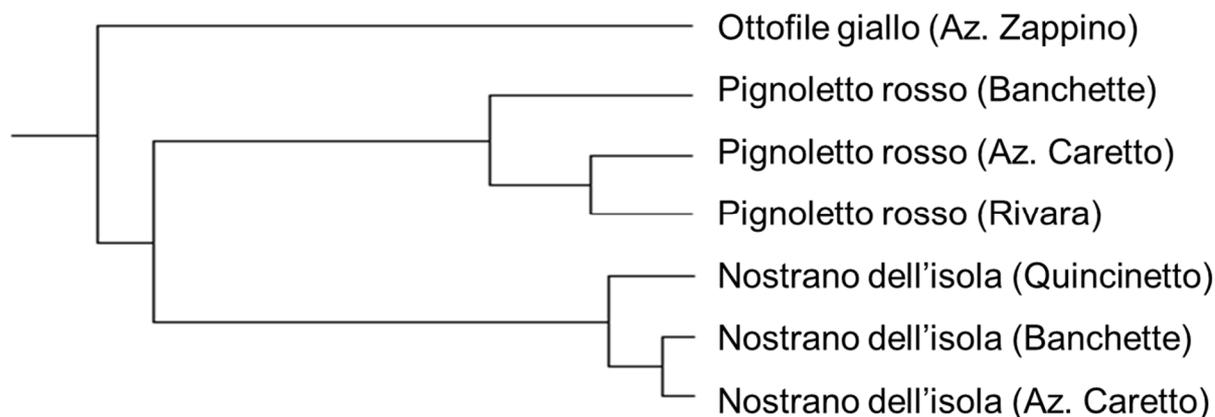


Figura 4.2.4.4: Dendrogramma relativo alla strutturazione degli ecotipi in studio mediante applicazione di marcatori AFLP



4.3 Allegati Sottoprogetto 3

4.3.1 Protocollo SSR

In letteratura è disponibile un ampio numero di marcatori SSR specifici per *Zea mays* e, sulla base del livello di polimorfismo intraspecifico riportato (Barcaccia et al. 2003, Wang et al. 2010), ne sono stati identificati 12 da impiegare nella genotipizzazione degli ecotipi in studio e per lo sviluppo di marcatori per il rilievo della presenza di ibridi nelle farine di mais locali, riportati nella tabella sottostante.

	PRIMERS		SEQUENZA (5' - 3')
Barcaccia et al. 2003	p-phi031	forward	GCAACAGGTTACTGAGCTGACG
		reverse	CCAGCGTGCGTTCCAGTAGTT
	p-dupssr1	forward	TGTTCTCAACAACCACCG
		reverse	CGTTTAGCGATATCATTTC
	p-dupssr7	forward	GAAGCTTAATCTGGAATCTGG
		reverse	TGTTGCTTCCTTGTAATAATCT
	p-dupssr10	forward	AGAAAATGGTGAGGCAGG
		reverse	TATGAAATCTGCATCTAGAGAAATTG
Wang et al. 2010	N03	forward	TTACACAACGCAACACGAGGC
		reverse	GCTATAGGCCGTAGCTTGGTAGACAC
	N11	forward	TCTCAGCTCCTGCTTATTGCTTTCG
		reverse	GATGGATGGAGCATGAGCTTGC
	N22	forward	CCCGACACCTGAGTTGACCTG
		reverse	CTGGAGGGTGAAACAAGAGCAATG
	N24	forward	TGATAGGTAGTTAGCATATCCCTGGTATCG
		reverse	GAGCATAGAAAAAGTTGAGGTTAATATGGAGC
	N42	forward	CTCGAAACGGTGGTACAGTGCG
		reverse	AGCAGCTTTTACCCCTGATTTTCG
	N44	forward	GACACTTGACGGTCTCGCTTAT
		reverse	ATCCCAAGCACCACGGTCAAG
N56	forward	GGCTCACGTCCGTATCCAAACC	
	reverse	TCAGTTCAGGTCCGTCCGTCAG	
N60	forward	TCTCCATCATCATGTACGAGAAATCATG	
	reverse	CGTCGAACTCATCCAGCAGATG	

Caratteristiche dei 12 microsatelliti utilizzati.

L'analisi SSR è stata condotta in modo da ottimizzare la visualizzazione dei profili elettroforetici mediante l'utilizzo del sequenziatore LICOR. Il protocollo si è articolato nelle seguenti fasi :

- 1) Amplificazione
- 2) Elettroforesi su gel di poliacrilammide
- 3) Visualizzazione dei prodotti di amplificazione

1) AMPLIFICAZIONE:

Le reazioni di amplificazione SSR sono state condotte in un volume finale di 20 µl, utilizzando 10 pmol sia del primer *forward* che del primer *reverse*, in presenza di 25 ng di DNA genomico, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 1 U di Taq Polimerasi (Fermentas) e del corrispettivo Buffer Ammonio. Per l'amplificazione è stato utilizzato il protocollo *touchdown* descritto a seguito:

5 min a 94° C (denaturazione iniziale)	
30 s a 94° C (denaturazione) da 60°C a 55°C (-0.5°C ogni ciclo) per 30 s (appaiamento) 1 min a 72°C (estensione)	11 cicli
30 s a 94° C (denaturazione) 30 s a 55°C (appaiamento) 1 min a 72°C (estensione)	24 cicli

2-3) ELETTROFORESI E VISUALIZZAZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE:

La corsa elettroforetica è stata condotta utilizzando un gel di poliacrilammide denaturante al 6% (Sigma) in un apparato verticale dotato di lastre di vetro delle dimensioni di 38x25 cm e spaziatori inseriti tra i due vetri dello spessore di 0,2 mm. La corsa e la visualizzazione degli amplificati sono state svolte secondo le metodologie descritte per i marcatori AFLP.

4.3.2 Figure Sottoprogetto 3

Figura 4.3.2.1: Esempio di gel SSR ottenuto per la caratterizzazione molecolare degli ecotipi locali di mais

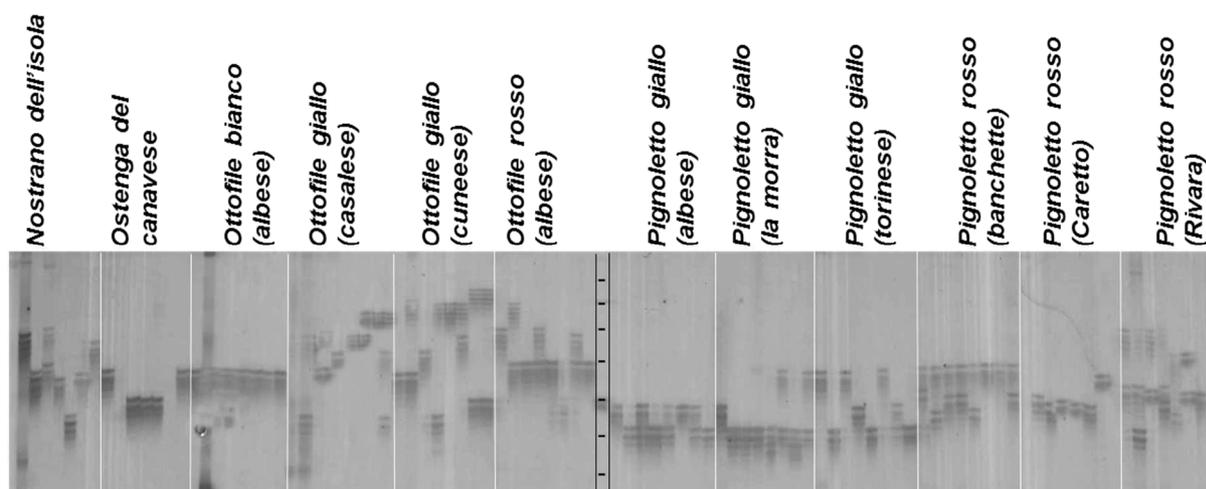


Figura 4.3.2.2: Dendrogramma relativo alla caratterizzazione molecolare degli ecotipi locali di mais mediante applicazione di marcatori SSR

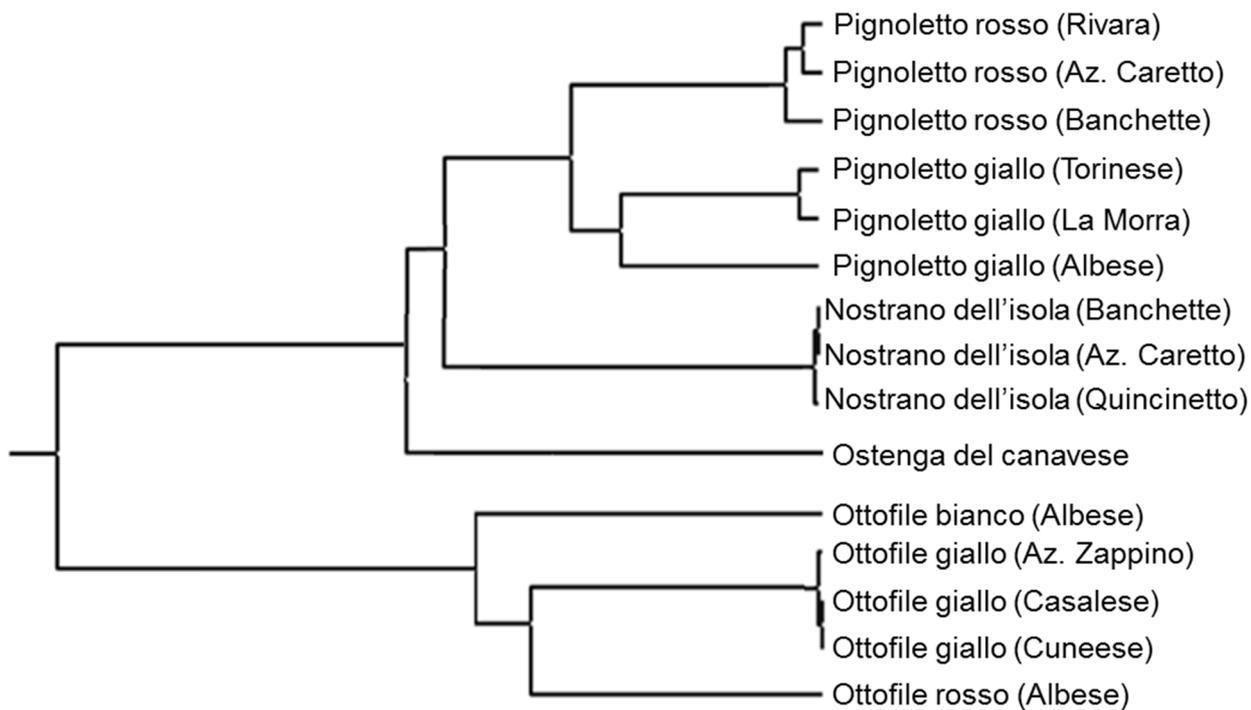


Figura 4.3.2.3: Esempio di profilo molecolare SSR ottenuto per lo sviluppo di marcatori specifici per la tracciabilità degli ecotipi locali di mais

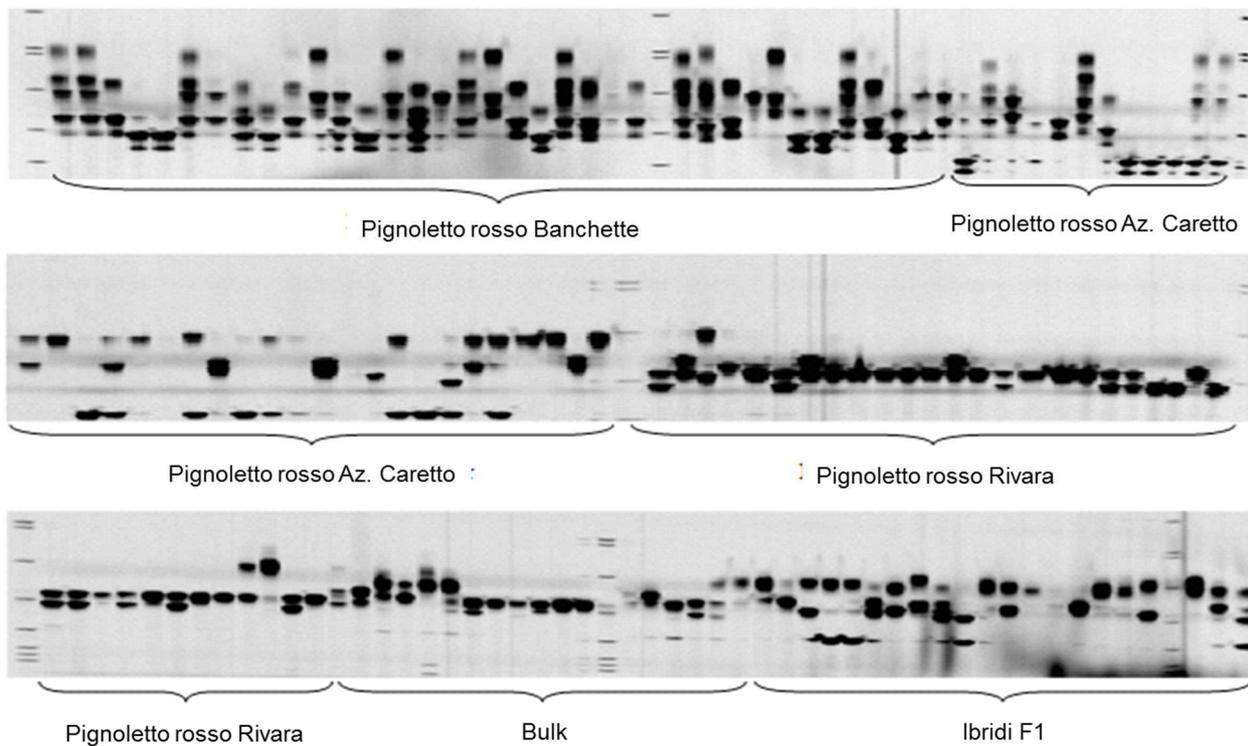


Figura 4.3.2.4: Esempi di profili molecolari SSR ottenuti da 4 marcatori SSR applicati agli ibridi commerciali. Le forme alleliche esclusive identificate sono state evidenziate ed il loro peso molecolare riportato sulla destra di ciascun gel. a) marcatore p-dupssr7; b) marcatore p-dupssr10; c) marcatore N22; d) marcatore N60

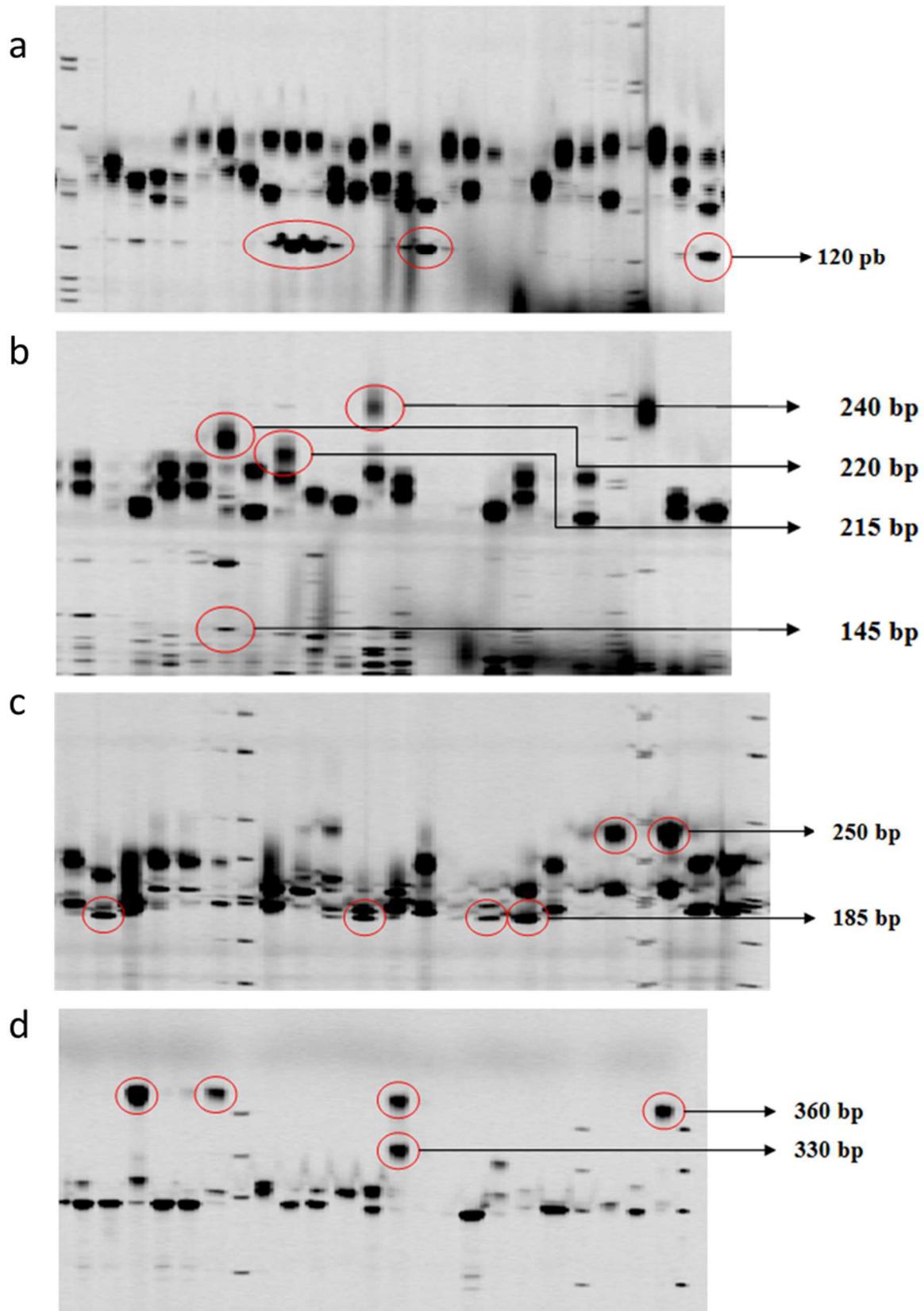


Figura 4.3.2.5: Farine utilizzate per la validazione del protocollo di tracciabilità. a) farine prodotte nell'ambito del progetto e di sicura derivazione da ecotipi locali (pignoletto 100%); b) farine commerciali potenzialmente derivanti da mais ibridi.



Figura 4.3.2.6: Validazione delle forme alleliche esclusive per le varietà ibride sul DNA amplificato a partire da farine 100% *Pignoletto rosso* e farine di possibile origine ibrida. Le frecce indicano la presenza di alleli esclusivi per varietà ibride nell'ambito delle farine commerciali potenzialmente ottenuta da granello ibrida.

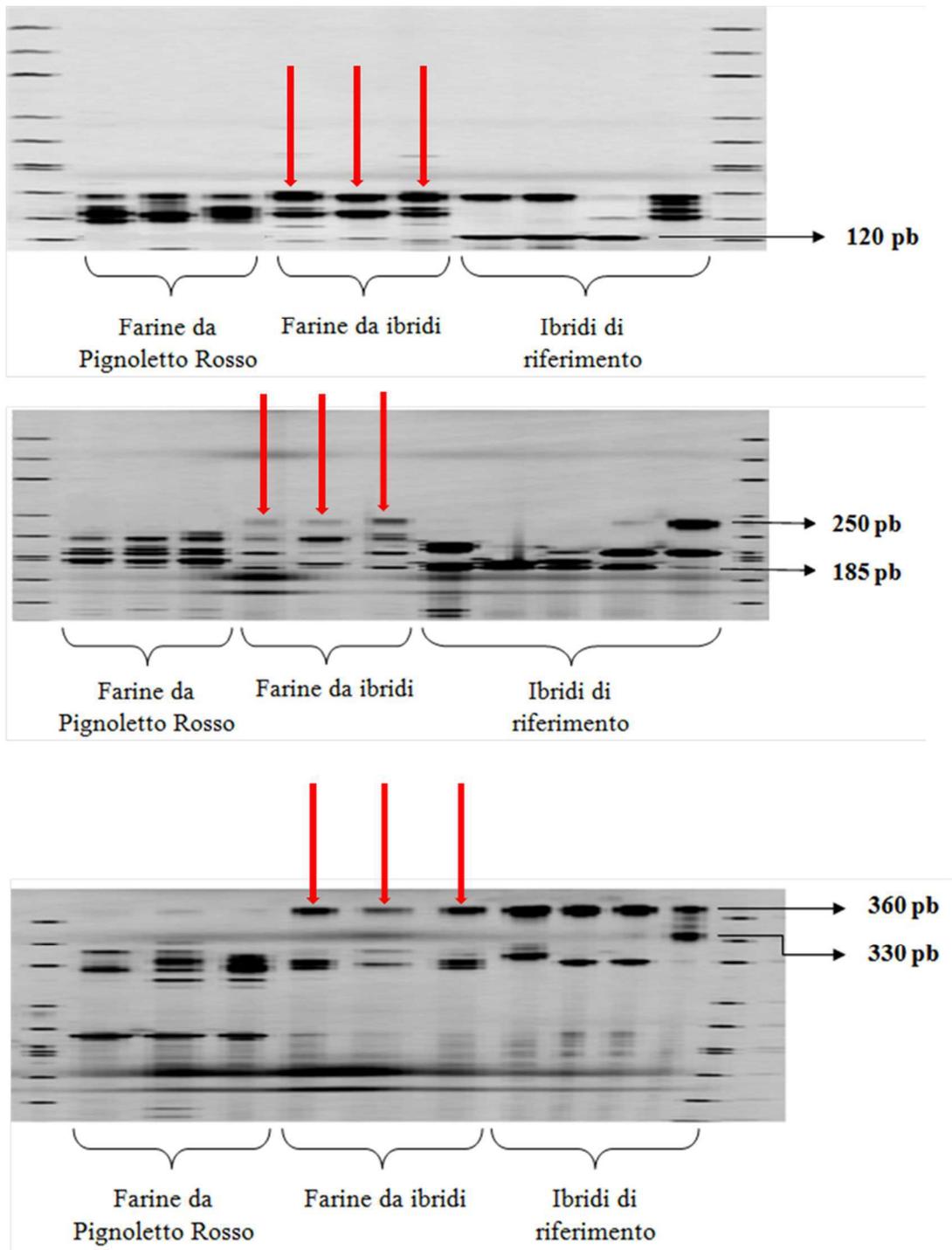
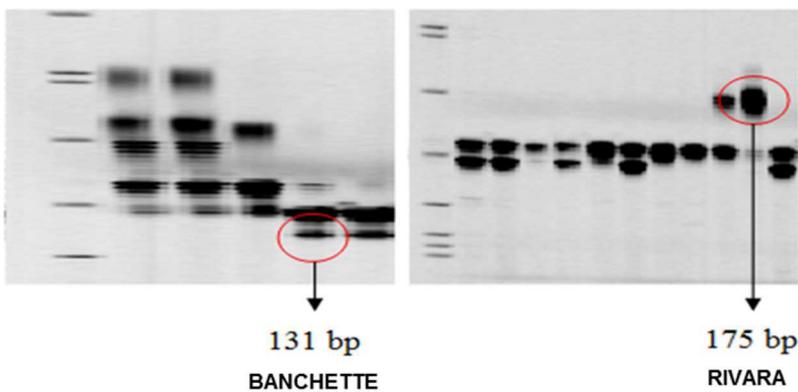
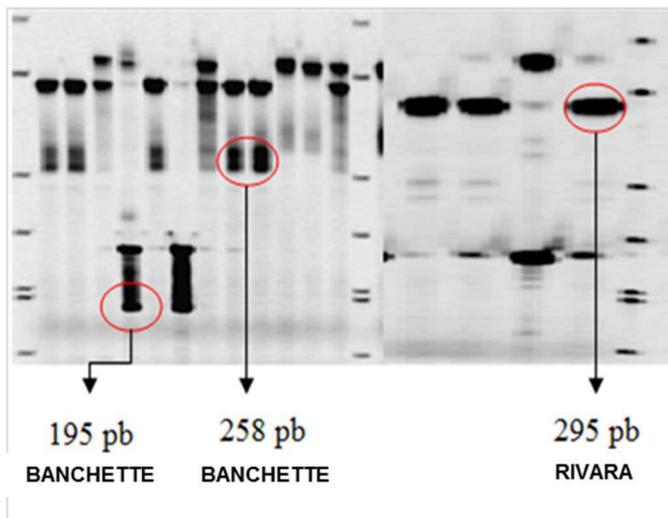
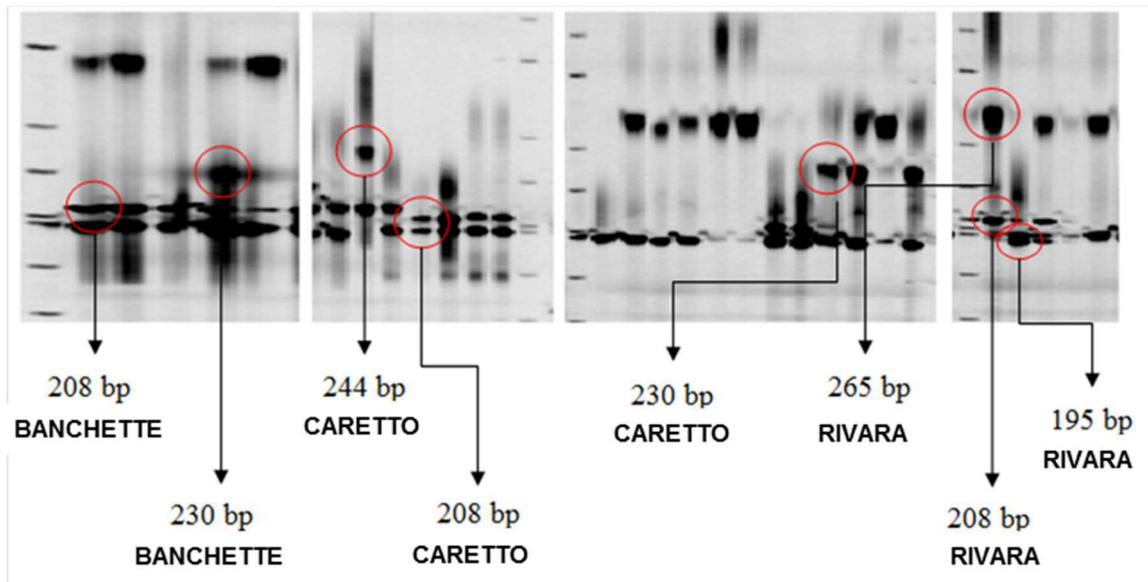


Figura 4.3.2.7: Esempi di profili molecolari SSR che hanno consentito di individuare forme alleliche esclusive ed univoche per l'ecotipo *Pignoletto rosso*. Per le bande esclusive identificate è stato riportato il peso molecolare e la provenienza della pianta che ne ha consentito l'identificazione



4.3.3 Protocollo per l'estrazione del DNA da farina

Pesati 200 mg di farina, il campione viene trasferito in una eppendorf in cui sono stati aggiunti 550 µl di buffer di lisi CF a 65°C il tutto mescolato per 15 secondi. Successivamente sono stati aggiunti 10 µl di Proteasi K e nuovamente mescolato ed incubato per 30 minuti a 65 °C. Successivamente è stata eseguita una centrifugazione a 11000 g/min per 10 minuti. Dopo l'incubazione a 65°C il campione è stato trattato con 10 µl RNase (20 mg/ml) per 30 minuti.

Il surnatante è stato trasferito in una nuova eppendorf, dove sono stati aggiunti un volume di binding buffer C4 e un volume di etanolo (il volume è in riferimento al quantitativo di surnatante prelevato); il tutto è stato vortexato per 30 secondi.

Sono stati prelevati 700 µl di soluzione contenente il DNA ed introdotti in una colonnina; il tutto è stato centrifugato a 11000 g/min per un minuto. In questa fase il DNA resta legato al supporto di silice della colonnina. L'operazione è stata ripetuta per tutta la soluzione a disposizione.

Sono previste 3 fasi successive di lavaggio:

1. Prima fase, con l'aggiunta di 400 µl di CQW e successiva centrifuga a 11000 g/min per un minuto.
2. Seconda fase, con l'aggiunta di 700 µl di C5 e successiva centrifuga a 11000 g/min per un minuto.
3. Terza fase con l'aggiunta di 200 µl di C5 seguita da centrifugazione per due minuti a 11000 g/min.

La fase di eluizione è stata eseguita con l'aggiunta di 100 µl di buffer per eluizione, previa incubazione a 20°C per 5 minuti seguita da una centrifugazione a 11000 g/min per un minuto.

Quantificazione e calibrazione sono state eseguite mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio allo 0,8% utilizzando dei campioni genomici standard a quantità nota come riferimento.

5. Milestones e Deliverables

Le milestones relative al periodo in esame sono sintetizzati nella seguente tabella:

Sottopr./ Attività	Milestone nr.	Titolo	Data prevista	Data effettiva	Note
1/1.1	1	Riunione organizzativa per l'allestimento e la conduzione dei campi di mais	Marzo 2015	Marzo 2015	Ritardi dovuti all'approvazione del Progetto avvenuta nel luglio 2015
	2	Sottoscrizione della convenzione: ratifica degli impegni assunti nel progetto, definizione rapporti tra i diversi partner	Maggio 2015	Agosto 2015	
1/1.2	3	Costituzione della FOC	Luglio 2015	Settembre 2015	
1/1.3	4	Stesura del disciplinare di produzione.	Dicembre 2015	Dicembre 2015	
2/2.1	5	Riunione di programmazione delle attività: calendarizzazione delle pratiche colturali e delle prove analitiche	Marzo 2015	Marzo 2015	
2/2.2	6	Reperimento seme per l'allestimento dei campi	Aprile 2015	Aprile 2015	
2/2.3	7	Individuazione delle piante maggiormente adattabili alle condizioni pedoclimatiche ed alle tecniche di coltivazione, destinate a produrre seme	Agosto 2015	Agosto 2015	
2/2.4	8	Caratterizzazione molecolare per la costituzione di nuclei di seme con elevata uniformità genetica	Settembre 2015	Settembre 2015	
2/2.5	9	Raccolta della semente e analisi delle criticità legate alla raccolta e alla conservazione	Ottobre 2015	Ottobre 2015	
2/2.6	10	Valutazione dei parametri qualitativi delle farine	Novembre 2015	Novembre 2015	
2/2.7	11	Confezionamento e valorizzazione dei prodotti	Dicembre 2015	Dicembre 2015	
2/2.8	12	Verifica di gradimento dei consumatori	Dicembre 2015	Dicembre 2015	
2/2.9	13	Valutazione dei risultati analitici e presentazione dei risultati conseguiti all'intero gruppo di lavoro, valutazione complessiva dello stato di attuazione	Dicembre 2015	Dicembre 2015	
3/3.1	14	Valutazione della variabilità genetica tra ed entro gli ecotipi in analisi	Luglio 2015	Luglio 2015	
3/3.2	15	Identificazione di alleli esclusivi per gli ecotipi di mais piemontesi e di alleli discriminanti ed nell'ambito degli ibridi commerciali.	Ottobre 2015	Ottobre 2015	
3/3.3	16	Messa a punto di un protocollo l'identificazione di possibili contraffazioni e per la tracciabilità delle farine di mais da ecotipi piemontesi	Dicembre 2015	Dicembre 2015	

I deliverables relativi al periodo in esame sono sintetizzati nella seguente tabella:

Sottopr./Attività	Deliverable nr.	Titolo	Partner	Data prevista	Data effettiva	Note
1/1.3	1	Disciplinari per la produzione degli ecotipi piemontesi di mais da polenta	DISAFA Az. Zappino Az. Caretto Mulino di Piova	Dicembre 2015	Dicembre 2015	
2/2.2-2.5	2	Produzione della granella per l'industria di trasformazione	Az. Zappino Az. Caretto	Ottobre 2015	Ottobre 2015	
	3	Produzione di semente uniforme per la prosecuzione della filiera negli anni successivi	DISAFA Az. Zappino Az. Caretto	Ottobre 2015	Ottobre 2015	
2/2.6	4	Scheda informativa sui prodotti trasformati, con la definizione dei parametri nutraceutici rilevati nel progetto	DISAFA Az. Zappino Az. Caretto Mulino di Piova	Dicembre 2015	Dicembre 2015	Le caratteristiche nutrizionali, descritte al punto 3.2.1, sono state presentate in occasione dell'incontro conclusivo
2/2.7	5	Produzione, confezionamento e distribuzione della farina di mais prodotta a partire dagli ecotipi selezionati	Mulino di Piova Az. Zappino Az. Caretto	Dicembre 2015	Dicembre 2015	
2/2.9	6	Materiale informativo per la presentazione dei risultati finali del progetto	DISAFA Az. Zappino Az. Caretto Mulino di Piova	Dicembre 2015	Dicembre 2015	I principali risultati ottenuti nell'ambito del Progetto sono stati presentati in occasione dell'incontro conclusivo
	7	Relazione finale del progetto	DISAFA	Dicembre 2015	Dicembre 2015	
3/3.1	8	<i>Fingerprinting</i> molecolare degli ecotipi	DISAFA	Luglio 2015	Luglio 2015	
3/3.2	9	Set di alleli discriminati ed esclusivi per i materiali in analisi	DISAFA	Ottobre 2015	Ottobre 2015	
3/3.3	10	Protocollo per la tracciabilità delle farine di mais da ecotipi piemontesi e per l'identificazione di possibili contraffazioni	DISAFA	Dicembre 2015	Dicembre 2015	

Luogo e data: **Torino 30.01.2015**

firma del legale rappresentante

firma del referente del progetto
