UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Scienze Agrarie e Alimentari

Corso di Laurea Magistrale in

Scienze della Produzione e Protezione delle Piante

MIGLIORAMENTO GENETICO DI *LANDRACES* SUDAFRICANE DI MAIS PER CARATTERI AGRONOMICI E NUTRIZIONALI

Relatore: Dott. Salvatore Roberto Pilu

Correlatore: Dott. Abdulkadir A. Egal

Elaborato finale di:

Elia CAMMARATA

Matricola n. **883879**

Anno Accademico 2016-2017

INDICE

1 RIASSUNTO 4

2 INTRODUZIONE 6

2.1 *Food security* nel mondo e in Sudafrica. 6

2.2 Il Mais 8

2.2.1 Classificazione Botanica 8

2.2.2 Morfologia. 9

2.2.3 Importanza economica e indirizzi d'utilizzo 12

2.3 Perchè mais? Sicurezza alimentare e *Zea mays* in Sudafrica. 17

2.3.1 Il mais in Sud Africa: una fonte energetica e nutrizionale. 20

2.3.2 Biofortificazione 21

2.3.3 Principali composti bioattivi nel mais 22

2.3.3.1 I minerali 22

2.3.3.2 Il fosforo 24

2.3.3.3 I flavonoidi 24

2.3.3.4 I terpeni 29

2.3.3.4.1 I carotenoidi 29

2.3.3.4.1.1 Carotenoidi nelle piante: la biosintesi 30

2.3.3.4.1.2 Carotenoidi nel mais: i geni coinvolti nella via biosintetica. 32

2.3.3.4.1.3 Carotenoidi nel mais: il locus *y*1 32

2.3.3.4.1.4 Funzioni biologiche: nelle piante 34

2.3.3.4.1.5 Funzioni biologiche: nell'uomo 34

2.3.4 Landraces 35

3 MATERIALI E METODI 37

3.1 Localizzazione dei campi sperimentali e codici 37

3.2 Lavorazioni preliminari e conduzione agronomica in Italia 39

3.3 Lavorazioni preliminari e conduzione agronomica in Sudafrica. 40

3.4 Attività di conservazione e di *breeding* Italia e in Sudafrica 41

3.5 Raccolta ed Essicazione 42

3.6 Test di complementazione 43

3.7 Analisi quantitativa del contenuto di carotenoidi 44

3.8 Analisi statistica 45

4 RISULTATI..... 46

4.1 Campionamento e ottenimento di landraces di mais bianco 46

4.2 Allestimento del campo sperimentale, test di complementazione e attività di breeding breeding.....48

4.2.1 Allestimento del campi sperimentale..... 48

4.2.2 Test di complementazione..... 52

4.2.3 Analisi qualitativa del contenuto di carotenoidi..... 53

4.3 Analisi statistica: caratteristiche agronomiche..... 54

5 DISCUSSIONE 58

6 BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA 63

7 ALLEGATI 73

RINGRAZIAMENTI 75

1 RIASSUNTO

La sicurezza alimentare esiste quando: "tutte le persone nello stesso tempo hanno la possibilità fisica ed economica di accedere a sufficiente, salubre e nutriente cibo per soddisfare il loro fabbisogno nutrizionale per una vita attiva e sana".

In Sudafrica ancora oggi circa 12 milioni di persone vivono in condizioni d'insicurezza alimentare, spesso causata da carenze di nutrienti essenziali per la salute. Il mais è un'importante coltura alimentare di base in Africa, e il Sudafrica è il primo paese produttore, che nel 2014 ha ottenuto 14 milioni di tonnellate da una superficie coltivata di 2.7 milioni di ettari.

Il mais in Sudafrica rappresenta il 30% dell'apporto giornaliero di calorie e un'importante fonte di proteine soprattutto tra le popolazioni più povere. La preferenza dell'utilizzo a scopo alimentare del mais bianco ha le sue radici in motivazioni di carattere socio-culturale e storico-economiche. Il consumo esclusivo di questo cereale, non opportunamente integrato con altri alimenti, risulta essere causa di malattie come la pellagra e la cecità infantile dovuta alla VAD (Vitamin A deficiency). Il Governo sudafricano considera queste problematiche di rilevanza pubblica da risolvere attraverso specifici programmi di biofortificazione. Il mais, grazie alla sua ampia diffusione, al suo profilo energetico e nutrizionale, è il miglior candidato per strategie di biofortificazione in Sudafrica, volte a ridurre l'insicurezza alimentare. L'utilizzo dell'ampia variabilità genetica di questo cereale, soprattutto ricorrendo alla coltivazione di genotipi locali (*landraces*), si sta rilevando una delle principali strategie per lo sviluppo di programmi di miglioramento genetico in agroecosistemi di piccola scala e a bassi input.

In un'ottica di collaborazione internazionale tra l'Università degli studi di Milano (Italia) e la VAAL University of Technology (Sudafrica), sono stati allestiti campi sperimentali per il miglioramento genetico di *landraces* sudafricane di mais per caratteri agronomici e nutrizionali.

Nell'annata agraria del 2016 sono state seminate in Italia (Az. Agri. Angelo Menozzi): due varietà locali (*Bianco Perla*, *Bianco Vitreo*) e una spagnola (*Millo Corvo*) provenienti dalla banca del germoplasma del CREA (Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria) di Stezzano (BG, Italia) e da quella del dipartimento DISAA dell'Università degli Studi di Milano (MI, Italia); una varietà campionata precedentemente in Sudafrica (Qwa Qwa, Thibela, Phomolong, 28°37’20.81”S, 28°53’58.07”E); cinque *landraces* sudafricane, ottenute dalla National Gene Bank di Pretoria; e un controllo per il test di complementazione ottenuto dal Maize Stock Centre (USA). Sono stati inoltre ottenuti gli ibridi da testare in Sudafrica incrociando la *landrace* sudafricana (denominata "Africa Bianco"), con l'ibrido commerciale "*B73xMo17"* e con la varietà *Millo Corvo*. Lo scopo della ricerca condotta in Italia è stato quello di ottenere informazioni riguardo la base genetica del carattere "cariosside bianca", attraverso il test di complementazione e di costituire il materiale

genetico da testare successivamente all'estero. Gli ibridi ottenuti in Italia, la varietà Millo Corvo e la *landrace* "Africa Bianco" sono stati seminati in Sudafrica, secondo uno schema sperimentale a blocchi randomizzati, con lo scopo di conservare, riprodurre il materiale *in situ* e verificarne le performance agronomiche.

Il risultato del test di complementazione ha confermato che i genotipi considerati nell'analisi sono portatori della medesima mutazione y_1 nel genoma che blocca la via biosintetica dei carotenoidi, ed è quindi possibile concludere che questa alterazione genetica sia stata selezionata per un utilizzo nella diretta alimentazione umana, essendo probabilmente l'unica a non conferire effetti pleiotropici negativi. I dati agronomici ottenuti dal campo sperimentale sudafricano sono stati analizzati statisticamente e i risultati hanno evidenziato che l'ibrido a tre vie mostra maggior vigore, in termini di altezza della pianta, della spiga e del numero di piante giunte a fine ciclo; mentre per quanto riguarda la produzione, la media delle rese mostra come le *landraces* (Millo Corvo e Bianco Africa) abbiano performato meglio rispetto agli ibridi. Ciò è spiegabile se consideriamo la migliore adattabilità, già citata in letteratura, delle *landraces* a condizioni pedoclimatiche variabili, grazie alla loro base genetica molto più ampia. I risultati ottenuti, quindi, confermano l'importanza dell'utilizzo/selezione delle *landraces* autoctone in programmi di miglioramento genetico volti alla biofortificazione. Questo lavoro di miglioramento genetico è da considerarsi il primo *step* di un programma dove, direttamente in Sudafrica, saranno sviluppati ulteriori campi sperimentali e avviati nuovi processi di selezione, con l'obiettivo d'incrementare le performance delle varietà in relazione alle caratteristiche agronomiche e nutrizionali.

Infine, visto che l'insicurezza alimentare non sempre è strettamente associata alla mancanza di cibo, ma relazionata con carenze di nutrienti essenziali per la salute, si è proceduto alla quantificazione dei carotenoidi, che ha evidenziato, come previsto dall'analisi visiva e dal test di complementazione, che tutte le varietà e le *landraces* con fenotipo cariosside bianca hanno un basso contenuto di carotenoidi. Basandosi su questi risultati e collaborando con la VUT University e il Ministero dell'agricoltura e della pesca sudafricano sarà possibile, con un'opportuna campagna di divulgazione, sensibilizzare la popolazione sulla preferenza da dare, per l'alimentazione umana, al mais giallo rispetto al bianco per contrastare la VAD (Vitamin A deficiency). Lo sviluppo di nuove varietà *OPVs (open pollinated varieties)*, migliorate per caratteri agronomici e nutrizionali, contribuirà a contrastare l'insicurezza alimentare in Sudafrica e in altri paesi in via di sviluppo.

2 INTRODUZIONE

1 *Food security* nel mondo e in Sudafrica

La sicurezza alimentare esiste quando: "tutte le persone nello stesso tempo hanno la possibilità fisica ed economica di accedere a sufficiente, salubre e nutriente cibo per soddisfare il loro fabbisogno nutrizionale per una vita attiva e sana" (FAO,2012).

L'insicurezza alimentare, spesso, non è strettamente associata alla mancanza di cibo, ma relazionata con carenze di nutrienti essenziali per la salute o per la difficoltà nell'accesso alle fonti di produzione del cibo. Spesso le situazioni precedentemente citate sussistono in paesi sottosviluppati (PSS) o paesi in via di sviluppo (PVS). La malnutrizione da micronutrienti risulta essere, al giorno d'oggi, come uno dei maggiori problemi che affliggono più della metà della popolazione mondiale, specialmente donne e bambini in età prescolastica nei paesi più poveri (UNSCN, 2004). Nel 1976 Reutlinger e Selowsky hanno pubblicato un'interessante monografia riguardo la correlazione esistente tra malnutrizione e povertà. In questo studio si mostra che un alto indice di crescita economica e incremento delle produzioni alimentari non significa necessariamente un miglioramento nutrizionale in paesi del terzo mondo. Sulla terra il numero di persone stimate che soffrirà di malnutrizione si aggirerà intorno ai 30-40 milioni nel 2050 e la maggior parte di queste sarà in Africa (Spence, 2016). Nonostante ciò la popolazione mondiale è in continuo aumento e le previsioni dicono che raggiungerà circa i 9.1 miliardi nel 2050 (FAO, 2009a). Questo incremento demografico è previsto maggiormente nei PSS e PVS, tra questi l'area dell'Africa Sub-Sahariana è evidenziata tra i principali paesi di questa lista (UN, 2009). In questo contesto l'approvvigionamento alimentare e la sicurezza alimentare, nei contesti caratterizzati da limitata disponibilità di terra coltivabile, risulteranno le necessarie risposte alla crescita demografica.

Il cibo prodotto in Sudafrica e altri paesi africani è aumentato negli ultimi 40 anni (Spence, 2016). Attualmente oltre 12 milioni di sudafricani vivono tuttavia in condizioni di insicurezza alimentare (Spence, 2016). In questo contesto l'incremento demografico e aumento negli ultimi anni dei prezzi del cibo e dei combustibili hanno aggravato questa situazione (Spence, 2016). La malnutrizione, nelle aree rurali principalmente, ha dei seri effetti sui bambini e in generale sulla fascia più giovane della popolazione.

Nel settore agro-zootecnico in Sudafrica, al giorno d'oggi, sussistono inoltre differenze raziali. La maggior parte dell'agricoltura su larga scala è praticata da bianchi mentre su piccola scala da neri. Si stima che il 20% degli "agricoltori bianchi" produca 80% dell'export agroalimentare (Louw, 1990). In Sudafrica si può parlare di un dualismo tra l'agricoltura di piccola scala e quella di larga scala in termini di differenza economica, superfici lavorate e di rese che negli ultimi anni si è sempre più marcata. Ciò ha portato al fatto che le aree rurali, perlopiù abitate da neri, stanno diventando sempre più dipendenti dall'esterno per quanto riguarda l'approvvigionamento alimentare (Louw, 1990). Questa situazione evidenziata da Louw nel 1990 è ad oggi ancora più marcata in

molte zone, prevalentemente nelle regioni con ampie superfici coltivabili, quali *Gauteng, Free State, Mpumalanga e North West*.

Secondo la FAO (2010) il Sudafrica ha un alto grado di erosione e perdita di fertilità dei suoli che influenza la produttività delle colture. Si stima che il 41% dei suoli coltivati sia gravemente degradato (Bai e Dent, 2007) e la siccità, che spesso si somma a questa problematica, sia spesso la causa di una completa perdita delle produzioni (FAO, 2009b) soprattutto nelle aree rurali caratterizzate da un'agricoltura di piccola scala, scarsa di risorse per far fronte a queste fonti di fallanze e spesso situata in aree marginali (Mabhaudhi et al., 2013). Il Sudafrica è uno stato con scarse risorse idriche e un'irregolare pluviometria. Le precipitazioni annuali medie sono meno di 500 mm/anno (IWMI, 1996) che risulta essere molto al di sotto della media mondiale di 860 mm/anno (DWAF, 2002). Solo il 13% del Sudafrica è considerato coltivabile come conseguenza delle scarsa pluviometria e della ridotta qualità dei suoi suoli in molte aree (WEMA, 2016). Nel lungo periodo il cambiamento climatico è atteso avere effetti che porteranno a siccità prolungate e maggiori temperature (FAO, 2010b). La combinazione di questi problemi porterà a maggiori conseguenze in contesti caratterizzati da limitati terreni fertili e disponibilità di acqua per la produzione alimentare (Nkanyiso et. al., 2016) e sarà di forte impatto soprattutto di quelle aree urbane e agricole più povere che saranno a rischio sicurezza alimentare (Thiefrelder et al., 2014).

2.2 Il Mais

2.2.1 Classificazione Botanica

Il mais è una delle più antiche piante coltivate e diffuse al giorno d'oggi in tutto il mondo. Il mais (*Zea mays* L.) appartiene alla famiglia delle *Poaceae* (*Gramineae*), alla sottofamiglia delle *Maydeae*, nella classe delle *Monocotiledoni*.

Il centro d'origine del mais è da localizzare in America Centrale, dove è presente la maggior biodiversità specifica, nella zona dove vivevano le tribù *Arawac* (Ranum et al., 2014).Al genere *Zea* appartengono anche altre specie selvatiche ancestrali, conosciute come teosinte *(Euchlaena mexicana)*, annuali e perenni (*Zea diploperennis*, sottospecie del teosinte), mentre la specie coltivata sembra derivare dalla domesticazione di *Zea parviglumis*, iniziata tra i 7.000 e i 10.000 anni fa nelle valli del Messico.

La parola *Zea* è di origine greca, traducibile come “vita”, mentre il nome della specie *mays* è riconducibile alla parola indiana “marisi”, che significa pane. Quindi la traduzione letterale dal nome scientifico sarebbe: "pane della vita". I nativi latinoamericani utilizzavano mettere in ammollo la spiga di mais in una soluzione di idrossido di calcio, successivamente veniva macinata così da ottenere una pasta, chiamata *masa*, dalla quale ha origine la *tortilla*. Questo processo aveva principalmente due benefici: trasformare la dura cariosside in un cibo più digeribile e rendere disponibile la maggior parte della niacina, che altresì sarebbe stata difficilmente assimilabile dall'organismo (Caballero et al., 2000). In Europa, Nord America e Africa, dove non si attuava questo preliminare passaggio, la pellagra fu una malattia largamente diffusa (Ranum et al., 2014).

2.2.2 Morfologia

La pianta del mais presenta molte caratteristiche comuni alle altre *Poaceae*, come il fusto (culmo), distinto in nodi e internodi di lunghezza crescente, una singola foglia in prossimità di ciascun nodo, distribuite in due file opposte e distiche, ciascuna con una lamina espansa e una guaina che avvolge il fusto (Neuffer et al., 1997).

Fig. 2.1 Illustrazione botanico-morfologica della specie *Zea mays L.*

Il sistema radicale è di tipo fascicolato e comprende radici seminali, derivate dal seme, e radici avventizie, originate dai nodi dello stelo a 2-3 cm sotto terra. Circa 80% dell'apparato radicale si sviluppa nei primi 35 cm, mentre le radici più profonde possono arrivare fino a 2,5 m di profondità nei terreni sciolti. Le radici avventizie ipogee si sviluppano nei primi 4-5 nodi localizzati appena sotto il colletto, mentre quelle epigee sono emesse dai primi 2-3 nodi basali, esterni al terreno, dopo che la pianta ha emesso la decima foglia. Queste ultime hanno la principale funzione di ancoraggio, ma sono in grado anche di assorbire acqua e nutrienti. I nodi basali hanno anche la tendenza, più o meno marcata a seconda della varietà e delle condizioni pedoclimatiche, a formare ramificazioni o culmi di accestimento.

Il fusto, chiamato anche stocco, misura in media dai 2 ai 3 metri di lunghezza. Tuttavia, varietà molto precoci in Canada possono essere alte anche 90 cm e alcuni mais *Everta* da scoppio raggiungono i 30-50 cm, mentre nelle regioni Subtropicali le piante possono arrivare a 6-7 metri di altezza (Angelini et. al., 2007). Il culmo ha un diametro di 3-4 cm e possiede da 8 a 21 internodi, con una media stimata di 14. Nella parte basale sono ravvicinati e corti, si allungano e diventano più sottili man mano che si procede verso l'apice della pianta. Lo stocco, coperto dalla guaina fogliare, non partecipa alla fotosintesi, ad eccezione del tessuto che compone l'ultimo internodo.

La lunghezza della foglia è compresa tra 30 e 150 cm, mentre la larghezza può raggiungere i 15 cm. Le foglie sono disposte alternate sui due lati dello stocco, una per ciascun nodo. In media, le varietà precoci hanno 8 foglie, mentre le tardive 24. Ciascuna foglia si compone di guaina, che abbraccia quasi completamente l'internodo che sovrasta il nodo di nascita, la lamina, lanceolata con nervature longitudinali e parallele, la ligula, espansione laminare di una membrana incolore che fascia lo stocco. L'area fogliare media è stimata a 500 cm^2 a singola foglia. In media, una pianta ha un'apertura fogliare di 1 m^2 (Angelini et. al, 2007).

La pianta di *Zea mays* è monoica dicline, ovvero è composta da fiori maschili e femminili separati sullo stesso individuo. Porta fiori riuniti in spighette che rappresentano l'infiorescenza. L'infiorescenza maschile è una pannocchia terminale comunemente nota come pennacchio, che si presenta compatto o ramificato e si trova nella parte terminale del culmo. L'infiorescenza femminile è una spiga ascellare, solitamente posta al 6-7° nodo sotto il pennacchio, costituita da spighette femminili. Si genera da una gemma ascellare, e ha internodi ravvicinati e foglie modificate in bratte che avvolgono completamente la spiga, formando il cosiddetto cartoccio, avente funzione protettiva. Ciascuna spighetta porta un solo fiore fertile sormontato da un lungo stilo, chiamato seta, che emerge dalle brattee per catturare il polline e permettere la germinazione del polline. Le spighette sono inserite in un rachide, chiamato tutolo, in numero pari, disposte in ranghi, in numero da 4 a 30. La lunghezza della spiga varia da meno di 0,1 a 42 cm, il diametro medio varia tra 3 e 5 cm, per contenere dai 200 ai 1.000 semi. Il peso medio di 1.000 semi varia tra 200 e 1.200 grammi. Il numero di spighe per individuo è potenzialmente elevato, ma normalmente si completa un solo spadice, il più vicino al pennacchio, che prende il sopravvento sulle altre (Angelini et. al, 2007).

Il mais è una specie proterandra, ossia la fioritura inizia con la deiscenza del polline dei fiori maschili del pennacchio, seguita dopo 2-3 giorni dall'emissione degli stigmi nelle infiorescenze femminili. L'emissione dei pennacchi è scalare e si protrae per più giorni. Nelle spighe, gli stili (detti anche sete o barbe) spuntano dalle brattee non contemporaneamente, ma scalarmente nel corso di una settimana, dapprima quelli dei fiori di base ed ultimi quelli dell'apice. Il mais è considerata una specie allogama e si stima che solo 1% dei fiori si autofeconda. Il ciclo vitale del mais ha una durata di 90-150 giorni, la velocità con cui vengono compiute le fasi fenologiche dipende dal genotipo e dalle condizioni agropedoclimatiche (Angelini et. al, 2007).

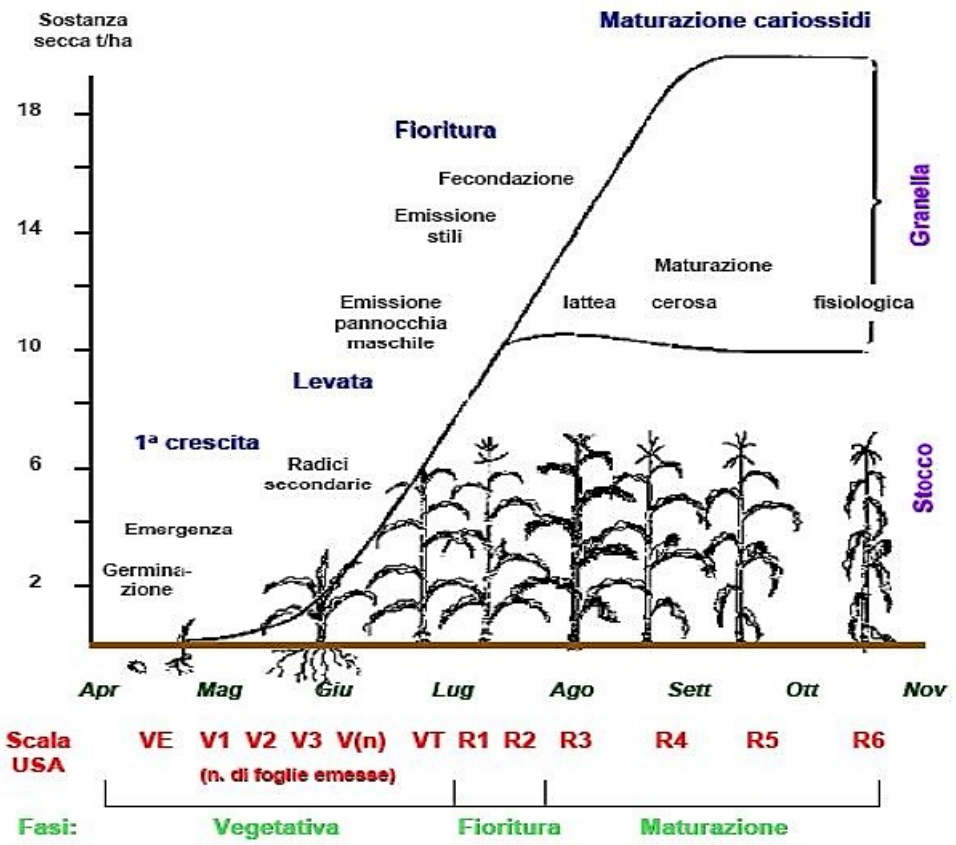


Fig. 2.2 Schema del ciclo biologico del mais nei climi temperati e determinismo della resa in granella. Nella scala USA l'abbreviazione VE indica lo stadio di emergenza, V1 quello di prima foglia, V2 quello di seconda foglia, V3 quello di terza foglia, V(n) quello rispettivamente al n° di foglie (cambia in base all'ibrido o alla varietà considerata). Vt indica la comparsa delle infiorescenze, R1 la comparsa delle sete, R2 la formazione delle cariossidi, R3 lo stadio di "maturazione lattea", R4 lo stadio di "maturazione cerosa", R5 la formazione del dente nella cariosside, mentre R6 la "maturazione fisiologica" (www. acutis.it).

La cariosside è un frutto secco indeiscente, inserito sul tutolo attraverso un corto pedicello. All'interno della cariosside è presente il seme (10% del peso secco a maturazione), composto dall'embrione, dall'endosperma e dall'aleurone. Il 70-75% del peso finale del seme è costituito dall'amido, polisaccaride di riserva. Le proteine costituiscono il 10%, i grassi insaturi il 4%, gli zuccheri il 2% e le ceneri l'1%. La restante parte è occupata dall'acqua. Nella cariosside non c'è presenza di due amminoacidi essenziali, la lisina (Lys) e il triptofano (Trp), che abbassano il valore biologico all'alimento. Le cariossidi a maturazione assumono una colorazione che può variare dal bianco al nero e ciò è determinato dalla produzione di due pigmenti, i carotenoidi, rappresentati dal β-carotene e dalle xantofille, che caratterizzano la colorazione gialla, e le antocianine, responsabili della colorazione blu e rossa. Rispetto al mais chiaro, le varietà ricche di antocianine hanno alcuni vantaggi nutrizionali legati al maggior numero di proteine e di minerali e alla funzione antiossidante (Crispin et. al., 2006).

2.2.3 Importanza economica e indirizzi d'utilizzo

Mais, frumento e riso sono i cereali più coltivati al mondo e sono considerati le principali *commodities* agricole, dette anche '*soft commodities*'. Con il termine *commodities* ci si riferisce solitamente alle materie facilmente stoccabili e conservabili nel tempo adatte ad un'ampia commercializzazione (WaFS, 2012). Questi tre cereali sono di particolare rilevanza nei confronti dell'alimentazione dell'uomo, della superficie coltivata e della quantità prodotta; e assumono quindi un valore strategico nel bilancio economico delle nazioni produttrici e importatrici.

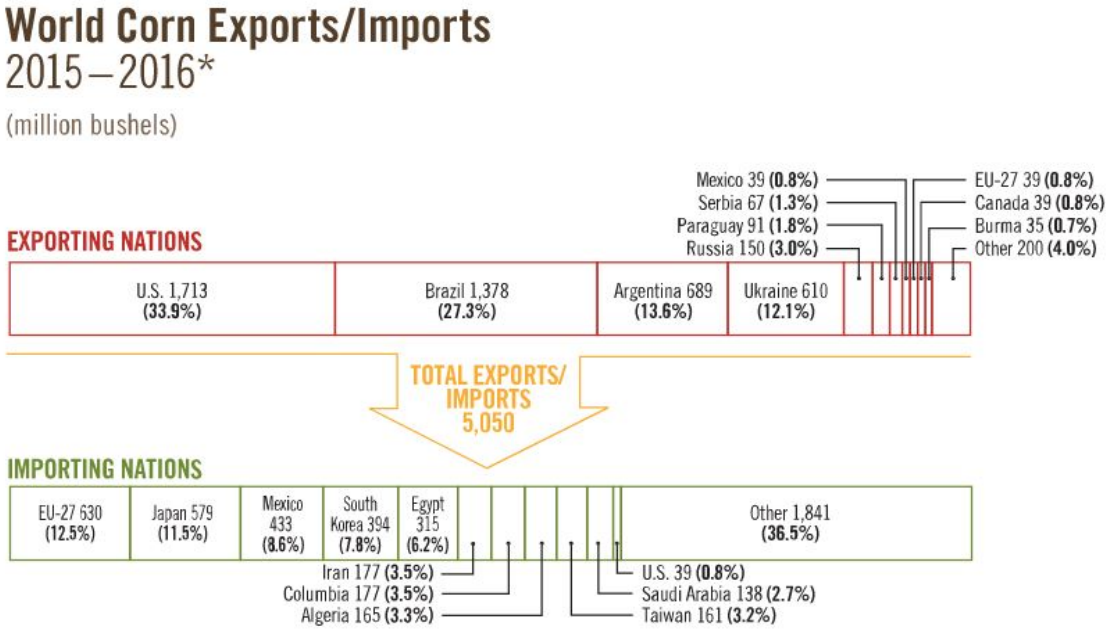


Fig. 2.3 Nazioni importatrici e esportatrici e relative percentuali di prodotto scambiato sul totale espresso in bushels. Un *bushels* corrisponde a 25,4 kg di mais (USDA, 2016)

Come si può vedere nella fig.2.3, nel periodo 2015/2016 gli scambi di mais a livello globale hanno raggiunto 128 milioni di tonnellate (USDA, 2016) pari circa il 14% della produzione totale, valore circa doppio rispetto a quello di carne e latticini (FAOSTAT, 2014).

Il riso è il cereale più mangiato dalla popolazione umana, il frumento occupa la superficie più grande per la coltivazione mentre il mais è l'alimento più prodotto al mondo (FAOSTAT, 2012).

Nel 2014, la produzione mondiale di mais è arrivata a 1.037 milioni di tonnellate su una superficie di 184 milioni di ha (FAOSTAT, 2014), ma le rese tra i diversi paesi produttori rimangono molto diversificate, come evidenziato in tab.2.1 (Ranum et al., 2014). Dal 1962 c'è stato un incremento del 40% della produzione mondiale di questo cereale, accompagnata da un aumento della superficie coltivata del 12% (FAOSTAT, 2014).

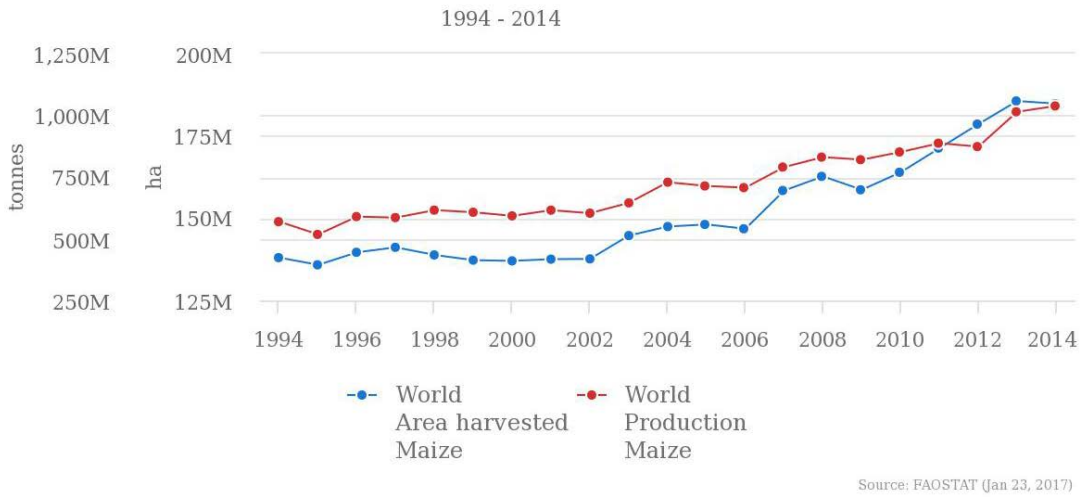


Fig. 2.4 Produzioni di mais nel mondo (in tonnellate) e relativa superficie coltivata (in ha) nell'arco temporale 1994-2014 (FAOSTAT, 2014).

Country	Maize production in 2011 (million MT/year)
United States of America	274
China	208
Brazil	71
Mexico	22
Argentina	21
India	21
Ukraine	21
Indonesia	19
France	16
Canada	12
South Africa	12

Tab. 2.1 Produzioni di mais nei diversi paesi (FAOSTAT, 2012).

Il 31% del totale è stato prodotto dagli Stati Uniti seguiti dalla Cina (24%)e dal Brasile (8%) (Ranum et al., 2014), l'Italia si posiziona 5° produttrice europea di mais, con una produzione corrispondente al 2% della mondiale.

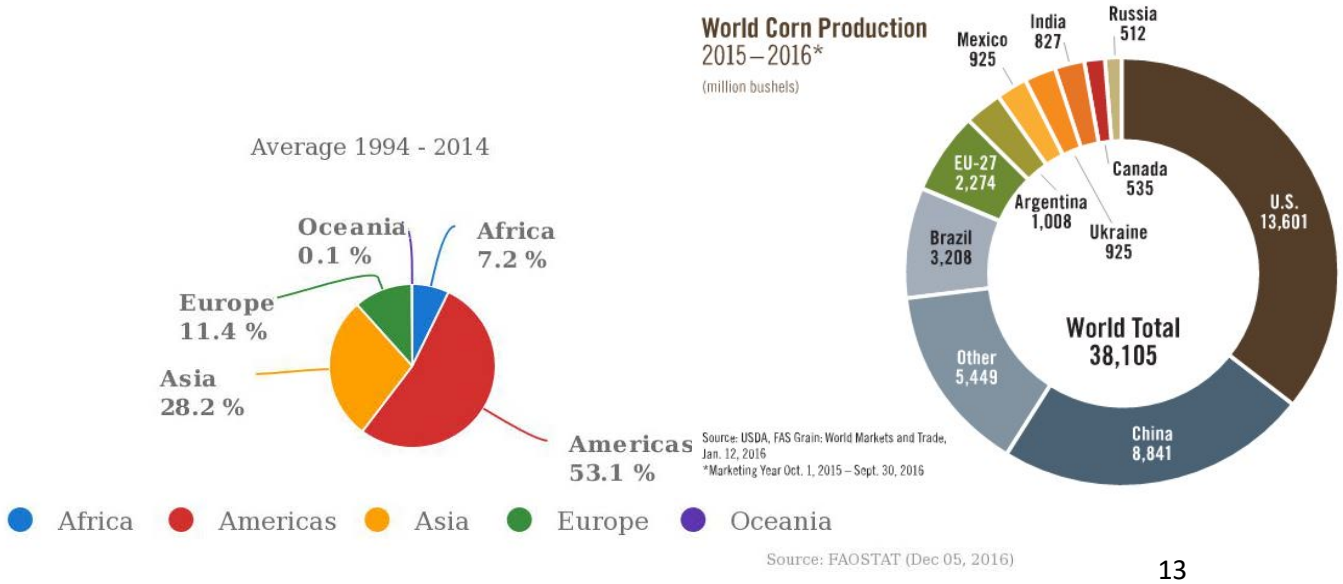


Fig. 2.5 Produzione mondiale di mais ripartita, a sinistra nei diversi continenti ed espressa in percentuale sul totale (FAOSTAT, 2014), a destra tra i principali paesi produttori ed espressa in milioni di *bushels* (USDA, 2016). Un *bushels* corrisponde a 25,4 kg di mais (USDA, 2016).

Questo incremento di produzioni e superfici è sostenuto principalmente da un aumento dell'utilizzo del mais:

- Nell'ambito mangimistico, grazie allo sviluppo di paesi emergenti come Cina, Brasile e India che accompagnano alla crescita demografica una domanda crescente di carne e latticini.
- Nell'ambito energetico

Alla base della grande diffusione del mais abbiamo due aspetti principali: la grande adattabilità alle condizioni ambientali e la versatilità degli impieghi, requisito unico tra le principali colture mondiali. Inoltre è facilmente stoccato, conservato e la maggior parte delle cultivar e varietà si prestano alla meccanizzazione, dalla semina alla raccolta. Rispetto al frumento e al riso il mais è utilizzato soprattutto in ambito mangimistico per gli allevamenti zootecnici e solo circa il 15% della produzione totale entra nella filiera alimentare umana (Awika, 2011).

Tra i principali impieghi del mais troviamo:

- Mangimistico: Il settore zootecnico assorbe i due terzi dell'offerta e il mais copre il 47% del mangime complessivo fornito a ruminanti e suini (Pilu et al., 2012).

- Alimentare: E' il secondo indirizzo di utilizzo. Come si può vedere nella tab.2.2 i maggiori consumi pro-capite li abbiamo nei paesi definiti sottosviluppati (PSS) e in via di sviluppo (PVS).Nei PSS, infatti, i prodotti trasformati sono consumati in media il 54% in meno che nei paesi sviluppati, poiché la popolazione non ha il potenziale d'acquisto per comprare le proteine animali o i prodotti lavorati (Tessari, 2012).Il mais è conosciuto per la sua attitudine multi prodotto che consente di utilizzarlo come frutto crudo (si pensi al mais dolce consumato alla maturazione lattea), cotto non lavorato o trasformato in farina per realizzare, secondo ricette tradizionali, i più svariati piatti.

WHO region	Country	Maize consumption (g/person/day)
African region	Lesotho	328
	Malawi	293
	Zambia	243
	Zimbabwe	241
	South Africa	222
	Kenya	171
	Togo	160
	Swaziland	152
	Tanzania	128
	Namibia	127
	Benin	119
	Mozambique	116
	Burkina Faso	107
	Ethiopia	94
	Angola	81
	Botswana	78
	Cameroon	75
	Cape Verde	72
	Central African Republic	71
	Mali	70
	Seychelles	69
	Senegal	62
	Nigeria	60
	Ghana	53
	Uganda	52
Region of the Americas	Mexico	267
	Guatemala	187
	Honduras	169
	El Salvador	157
	Nicaragua	148
	Venezuela	135
	Paraguay	121
	Colombia	92
	Bolivia	86
	Cuba	66
	Uruguay	63
	Belize	61
	Brazil	55
	Panama	53
	Haiti	50
Southeast Asia region	Timor-Leste	190
	Nepal	98
	Korea, DPR	93
	Morocco	84
	Indonesia	79
European region	Bosnia and Herzegovina	181
	Romania	85
	Slovenia	75
	Israel	64
	Macedonia	59
	Kyrgyzstan	58
Eastern Mediterranean region	Egypt	127

Tab. 2.2 Consumo nazionale pro-capite giornaliero di mais (g/persona/giorno) (FAOSTAT,2012, stima del triennio 2007-2009).

Come si può vedere dalla tabella 2.2, la popolazione africana, in particolar modo quella della fascia sub sahariana e dell'Africa meridionale, consuma circa il 30% del mais prodotto per scopi alimentari nel mondo (FAOSTAT, 2012).

- Energetico: Al terzo posto si colloca la trasformazione industriale “non alimentare” e per uso energetico. L'utilizzo di mais per questo scopo ha causato importanti conseguenze sui prezzi mondiali del cibo negli ultimi 10 anni (Awika, 2011). Gli U.S.A. hanno, registrato degli ultimi anni, un aumento progressivo dell'utilizzo del mais per questo scopo (vedi fig. 2.6) e di

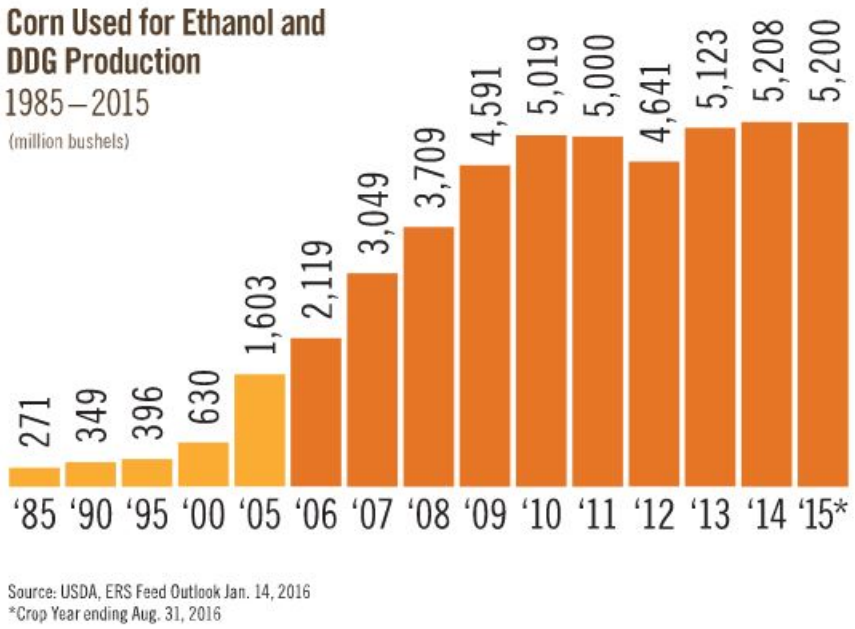


Fig. 2.6 Utilizzo del mais per la produzione di etanolo dal 1985 al 2015 in U.S.A. Un *bushels* corrisponde a 25,4 kg di mais (USDA, 2015).

conseguenza i prezzi unitari sono aumentati, non solo negli Stati Uniti. La domanda di mais a scopo energetico, secondo Awika (2011), porterà ad un aumento dell'insicurezza alimentare nei paesi poveri dove il mais rappresenta la base dell'alimentazione.

2.3 Perché mais? Sicurezza alimentare e *Zea mays* in Sudafrica

Il mais è un importante coltura alimentare di base in Africa, e il Sudafrica è il primo paese produttore, che nel 2014 ha realizzato una produzione di 14 milioni di tonnellate, su una superficie di 2.7 milioni di ettari (FAOSTAT, 2014).

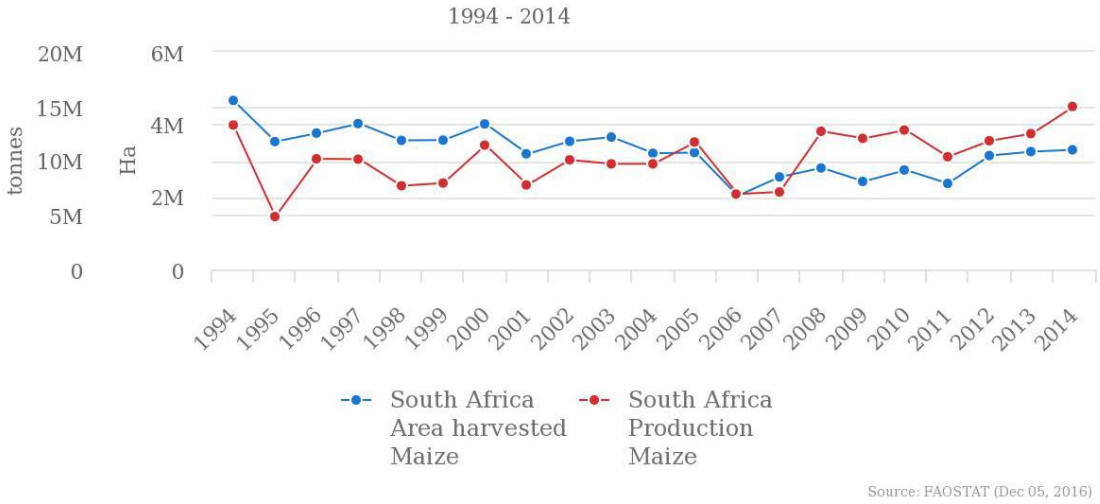


Fig. 2.7 Produzioni di mais in Sudafrica e relativa superficie coltivata nell'arco temporale 1994-2014 (FAOSTAT, 2014).

Il suo consumo nei tempi, tra le culture e le religioni è sempre stato elevato rendendolo il cereale più coltivato in Sudafrica (Baloyi et al. 2012). Oltre il 70% della popolazione sud africana dipende da questo cereale (WEMA, 2016) che riveste un'importanza notevole soprattutto nella dieta della popolazione nera. E' ampiamente seminato dagli agricoltori di piccola scala, per i quali è la principale fonte di sostentamento ordinario. E' prodotto principalmente nella provincie del North West, Free State e Mpumalanga, le altre provincie sono comunque produttrici, ma con quantitativi sensibilmente minori (Baloyi et al. 2012). Come già accennato c'è una netta distinzione tra agricoltura di piccola e di larga scala, anche per quanto riguarda questo cereale. La prima è perlopiù di sussistenza e non avanzata a confronto con le grandi aziende cerealicole (Baloyi et al. 2012). Le ragioni principali di questa arretratezza stanno, secondo Baloyi et al. (2012), in: l'assenza di un'agricoltura meccanizzata a supporto degli agricoltori di piccola scala, un'inadeguata o totale assenza di infrastrutture che facilitino i trasporti in alcune aree, assenza di un'efficace comunicazione per il trasferimento delle conoscenze al fine di migliorare la gestione dell'azienda agricola. Le rese ottenute dagli agricoltori di larga scala e dagli agricoltori di piccola scala sono rispettivamente di 5.0 t/ha e 1.0 t/ha e i principali input che fanno la differenza sono: l'irrigazione, gli agrofarmaci, i fertilizzanti (WEMA, 2016) e la meccanizzazione (Baloyi et al. 2012). Solo circa il 20% delle coltivazioni di mais in Sudafrica sono irrigue (WEMA, 2016), perché come già detto l'acqua è una risorsa limitata.

Un interessante studio, realizzato da Peter e Philip (2003) dal titolo: "*The potencial impacts of climate change on maize producion in Africa and Latin America in 2055*"ci mostra una riduzione di circa 4,6 milioni di tonnellate all'anno nel 2025 che crescerà a circa 11,6 milioni di tonnellate per anno nel 2055, equivalente a circa 2 miliardi di dollari per anno, considerando il prezzo del mais nel periodo della pubblicazione. Questa analisi è stata condotta utilizzando il modello di previsione CERES-Maize (Ritchie et al. 1998). L'impatto del cambiamento climatico sull'agricoltura di piccola scala, però, viene definito dagli autori della pubblicazione 'modesto'. Questo perché una riduzione della produzione di circa il 10% nel 2055 in Africa e Latino America è sicuramente grave, ma potrebbe essere compensata dalla coltivazione in futuro di nuove popolazioni e ibridi più produttivi, generati dal miglioramento genetico, e un'adozione di maggiore tecnologia, come già accadde nel 1950 quando le rese dei cereali aumentarono consistentemente (Pardey e Beintema, 2001).

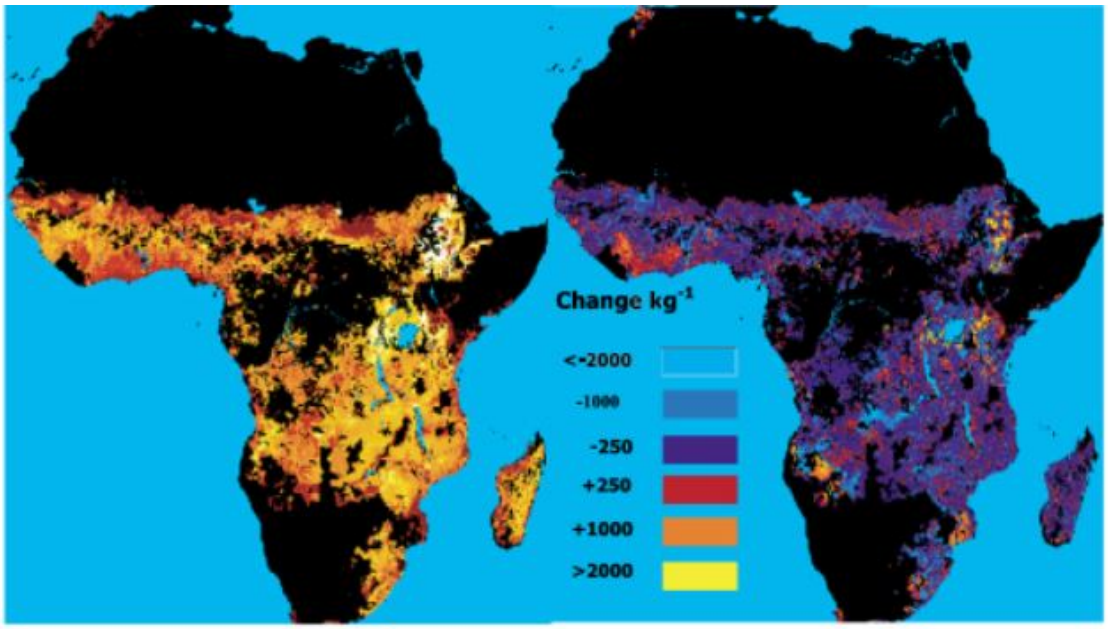


Fig. 2.8 Simulazione della produzione di mais in Africa nel 2055 (immagine del continente a dx) confrontate con le attuali (Peter e Philip, 2003).

Country	FAO area, 2000 (ha)	FAO yield, 2000 (kg/ha)	Simulated yield (kg/ha), baseline	Simulated yield (kg/ha), 2055	Production change, base line to 2055, t	Probability of yield <200 kg/ha, baseline	Probability of yield <200 kg/ha, 2055
Angola	672,941	636	1283	1049	−157,468	0.15	0.19
Benin	600,000	1105	1184	977	−124,200	0.09	0.11
Botswana	83,258	112	990	794	−16,319	0.12	0.16
Burkina Faso	280,000	1513	916	809	−43,960	0.04	0.06
Burundi	115,000	1082	2083	1761	−37,030	0.07	0.01
Cameroon	350,000	2429	1167	932	−82,250	0.08	0.14
Central Afr Rep	90,000	1189	1319	1135	−16,560	0.13	0.14
Chad	98,529	880	1127	914	−20,987	0.06	0.07
DR Congo	1,481,852	799	1548	1185	−537,912	0.04	0.06
Congo	3000	667	1500	1294	−618	0.11	0.28
Côte d'Ivoire	700,000	816	1091	1109	12,600	0.04	0.06
Egypt	843,029	7680	0	0	0	—	—
Equatorial Guinea	0	0	1500	1059	0	0.67	0.40
Eritrea	28,000	429	1308	1067	−6748	0.08	0.09
Ethiopia	1,450,000	1793	1842	1779	−91,350	0.07	0.03
Gabon	16,000	1625	1300	1147	−2448	0.12	0.22
Gambia	15,000	1487	1160	940	−3300	0.01	0.03
Ghana	700,000	1449	979	835	−100,800	0.07	0.13
Guinea	86,900	1036	1375	1228	−12,774	0.05	0.21
Guinea-Bissau	27,000	963	1306	1126	−4860	0.07	0.07
Kenya	1,500,000	1800	1154	1094	−90,000	0.21	0.18
Lesotho	112,000	911	934	1179	27,440	0.28	0.19
Liberia	0	0	1272	1253	0	0.02	0.05
Madagascar	183,580	817	1299	1092	−38,001	0.06	0.09
Malawi	1,350,000	1704	1541	1366	−236,250	0.02	0.02
Mali	140,000	1591	1053	740	−43,820	0.06	0.08
Mauritania	13,000	846	591	583	−104	0.07	0.00
Morocco	237,500	400	317	550	55,338	0.63	0.39
Mozambique	1,084,153	940	1227	997	−249,355	0.14	0.11
Namibia	38,600	1277	811	654	−6060	0.53	0.56
Niger	6000	1333	649	539	−660	0.08	0.12
Nigeria	3,999,000	1400	1046	858	−751,812	0.06	0.11
Rwanda	75,000	840	2188	2039	−11,175	0.22	0.10
Senegal	100,000	910	1013	849	−16,400	0.06	0.08
Sierra Leone	9588	929	1444	1243	−1927	0.01	0.05
Somalia	250,000	840	566	577	2750	0.32	0.22
South Africa	3,500,000	2029	1310	1061	−871,500	0.11	0.18
Sudan	76,000	697	1125	932	−14,668	0.06	0.08
Swaziland	54,757	1544	1318	887	−23,600	0.04	0.19
Tanzania	3,010,591	847	1458	1246	−638,245	0.06	0.04
Togo	450,000	1097	1138	889	−103,050	0.05	0.10
Uganda	629,000	1742	1855	1592	−165,427	0.04	0.04
Zambia	750,000	1680	1535	1303	−174,000	0.02	0.05
Zimbabwe	1,300,000	1248	1546	1289	−334,100	0.04	0.07

Fig. 2.9 Calcolo (FAO, 2002) e simulazione (Peter e Philip, 2003) delle differenze delle rese e delle produzioni di mais in Africa nel 2055 per sistemi agricoli di piccola scala.

La crescita della resa in alcune aree dovrebbe consentire un aumento della ricchezza di quelle zone rurali. Tuttavia nelle aree dove è previsto un calo della resa di circa 1 tonnellata a ettaro o più sarà da aspettarsi, probabilmente, una completa disgregazione del tessuto rurale (Peter e Philip, 2003).

Da ricordare che, nel contesto del cambiamento climatico, il mais è solo un componente della dieta di base, ed essendo una pianta C4 è abbastanza tollerante alle alte temperature; mentre per il fagiolo (*Phaseolus vulgaris L.*), la principale fonte per apporto proteico in gran parte dell'Africa, ha un *optimum* termico è intorno ai 21 °C (Laing et al., 1984) e risentirà maggiormente del surriscaldamento atteso.

2.3.1 Il mais in Sudafrica: una fonte energetica e nutrizionale

La coltivazione del mais è diffusa in tutto il mondo dove le temperature lo consentono. In 16 stati africani su 22 totali il mais rappresenta la principale fonte di energia nella dieta (Dowswell et al., 1996; Nuss and Tanumihardjo, 2011). La coltivazione del mais in Africa è da far risalire al XVI secolo e in Sudafrica fu introdotto dai portoghesi nel 1655 (Saunders, 1930). La coltivazione di questo cereale si diffuse rapidamente e rimpiazzò, in molte aree, cotone e tabacco perché richiedeva minori investimenti di capitali, e miglio e sorgo perché garantiva maggiore produttività a parità di condizioni climatiche e e agronomiche (Smale e Jayne, 2003).

Nella cucina locale africana l'importanza del mais è paragonabile a quella del riso in Asia, è utilizzato per preparare bevande e pietanze tradizionali (Gouse et al., 2006; Nusse Tanumihardjo, 2011).In Sudafrica la Pap (polenta di mais bianco, vedi figura 3.4) è il cibo di base per buona parte della popolazione (Oldewage-Theron et al., 2005).

Fig. 2.10 Piatto tradizionale Sud Africano chiamato "Pap" realizzato cuocendo la farina di mais, il più delle volte bianco.

Il mais rappresenta il 30% dell'apporto giornaliero di energia e un'importante fonte di proteine (Doria et al., 2015). Sembrerebbe che la preferenza attuale, dell'utilizzo in Sudafrica del mais bianco, derivi dall'influenza che ebbe il mercato cerealicolo britannico a partire dal 1920 (Smale e Jayne, 2003). Il commercio favoriva il mais con consistenza più morbida (*soft dent-type*) perché era più facile lavorarlo e meno dannoso per i mulini (*roller mills*) (Smale e Jayne, 2003). Inoltre era usanza da parte dei coloni britannici usare razioni di mais come forma di pagamento per i minatori e per gli operai in aziende agricole e zootecniche (Smale e Jayne, 2003). Le persone quindi iniziarono a introdurre il mais bianco nell'alimentazione quotidiana e ciò era favorito anche dal fatto che richiedeva minori tempi di cottura e risultava avere un sapore e una consistenza che lo rendevano più appetibile. Conseguentemente l'utilizzo del mais bianco divenne uno *status simbol* corrispondente ad un elevato rango sociale a cui aspirare (Messer, 2002). Per concludere Saunders (1930) ci dice che il mais bianco era preferito per il consumo umano perché si credeva che il mais giallo fosse meno digeribile, in accordo con il maggior tempo di cottura richiesto. Nel 1920 venne introdotto in Sudafrica il mulino a martelli (*hammer mills*) (Smale e Jayne, 2003) e questo favorì ancor più il mais rispetto

al miglio e il sorgo che necessitano di un ulteriore lavorazione preliminare di decorticazione.

Un consumo esclusivo di Pap, o polenta, spesso frequente tra le popolazioni più povere, è causa di malattie come la pellagra dovuta a carenze nutrizionali di amminoacidi essenziali (triptofano e lisina) e vitamine (Sebrell, 1981).

Come già accennato, la denutrizione e la deficienza di alcuni micronutrienti sono ancora un problema di rilevanza pubblica e nazionale in Sudafrica (Acham *et al*., 2012). Più del 10% della popolazione è affetta da carenze nutrizionali causate principalmente da apporti insufficienti di ferro e zinco nella dieta (Oelofse et al., 2002). L'assunzione di zinco non è sufficiente per il 45.3 % dei bambini sud africani tra 1 e 9 anni (Samuel et al., 2010).

Carenze di vitamina A nella dieta causano anemia e cecità, oltre che ridotta resistenza alle infezioni aumentando i rischi di morte (Gannon *et al*., 2014).

2.3.2 Biofortificazione

Il mais grazie alla sua ampia diffusione, al suo profilo energetico e nutrizionale è il miglior candidato per strategie di biofortificazione (Zhu et al., 2007) volte a ridurre l'insicurezza alimentare. Biofortificazione è un termine utilizzato per comprendere le quattro strategie endogene più frequentemente utilizzate per la fortificazione: *breeding* convenzionale, mutagenesi, modificazione genetica e l'uso di fertilizzanti (Newell-Mcgloughlin et al., 2008; Cakmak, 2008). Il risultato è che il mais è una delle piante meglio studiate in termini di ereditabilità genetica e la sua intera sequenza genomica è disponibile (Sasaki e Burr., 2000). Il germoplasma del mais è composto da genotipi provenienti da popolazioni adattate, materiale esotico introdotto e *landraces* (popolazioni locali), e caratterizzato da una buona variabilità genetica (Ara'ujo and Nass, 2002) e quindi un eccellente potenziale per il miglioramento.

Il mais ha un profilo di composti organici e minerali con potenziali benefici sulla salute, come antiossidanti (carotenoidi e composti fenolici), cofattori per enzimi antiossidanti (selenio, zinco, ferro, manganese e rame) o antiossidanti con azione indiretta (betaina, colina e folati) (Hansch e Mendel, 2009).

I semi di mais sono caratterizzati dall'avere un alto contenuto di amido (circa 75-80 % del peso) ed essere inoltre fonte di proteine (10-15%) (nonostante il contenuto degli amminoacidi essenziali triptofano e lisina sia basso) e lipidi (5%) (Panzeri *et al*., 2011). Nonostante l'importanza nutrizionale che riveste questa coltura, che la inserisce alla base della piramide alimentare umana, pochi studi hanno evidenziato che possa essere una fonte di micro e macronutrienti. La maggior parte delle pubblicazioni indicano frutta e verdura come maggiori fonti di composti fitochimici (Haleem et al., 2008). Questo probabilmente perché negli ortaggi i composti fitochimici sono perlopiù sotto

forma di glicosidi coniugati (in forma libera o solubile), mentre nei cereali queste sostanze sono presenti sia in forma coniugata sia insolubile) soprattutto alle cellule della parete (da Silva Messias et. al, 2015). Il 70% del totale dei composti fenolici sono presenti del mais in forma insolubile (Serpen et al., 2007).

Come già detto, la variabilità genetica del mais è estremamente ampia. Ciò è direttamente riscontrabile nella morfologia e nella colorazione che risultano essere molto differenti se si confrontano le varietà di tutto il mondo. Molta attenzione, non solo nell'ambito della ricerca, è stata posta alle varietà con un alto contenuto di composti bioattivi, come i carotenoidi, i tocoferoli, l'acido fitico e i composti fenolici (Bacchetti et al., 2013).

2.3.3 Principali composti bioattivi nel mais

2.3.3.1 I minerali

I micronutrienti come zinco (Zn), ferro (Fe), rame (Cu) e manganese (Mn) e gli elementi presenti in tracce, come il selenio (Se) hanno un'importante ruolo come cofattori di numerosi enzimi antiossidanti (Da Silva Messias et. al., 2015). Le piante assorbono questi minerali principalmente dal terreno e li accumulano in differenti tessuti, inclusi i semi. La concentrazione di questi minerali è variabile nei cereali anche in funzione delle condizioni pedoclimatiche di crescita. Tuttavia molti suoli negli ultimi decenni, come risultato dell'intensivo processo di produzione agricola, si sono impoveriti e di conseguenza si è ridotta anche la fitodisponibilità dei minerali (Raut et al., 2010). Questo è diventato il fattore limitante per la produttività e la qualità dei cereali. Inoltre alcuni minerali sono persi durante la filiera e altri non sono assimilabili perché sono complessati (soprattutto come polifenoli) o perché la presenza di altre molecole interferisce con la loro disponibilità per l'organismo (Da Silva Messias et. al., 2015) (vedi paragrafo successivo).

La malnutrizione da micronutrienti è una grave problematica diffusa principalmente dei paesi in via di sviluppo e sotto sviluppati dove la base alimentare delle popolazioni è rappresentata da cereali poveri di micronutrienti (Bouis e Welch, 2010). Più della metà della popolazione mondiale è affetta da carenze di ferro (Fe) e zinco (Zn) nella dieta, ed è una delle maggiori cause di malattie nei paesi poveri, dove viene chiamata popolarmente "*hidden hunger*", la fame nascosta (Khush et al., 2012).

In questo contesto la biofortificazione mostra migliori risultati della fortificazione esogena che consiste nell'aggiunta di minerali al prodotto finito(Da Silva Messias et. al., 2015).

Un metodo di biofortificazione dei minerali è la riduzione dell'acido fitico (Inositolo esafosfato) nei semi di mais perché ha caratteristiche antinutrizionali nei confronti di Fe e Zn (Glahn e Wortley, 2002).

Un'altra strategia di biofortificazione è quella di un'aggiunta diretta del contenuto di questi minerali nella granella. Per esempio lo zinco è un'importante cofattore di trascrizione, per il suo potere antiossidante e nella riparazione del DNA e una carenza nella dieta può contribuire a danni ossidativi e modificazioni del DNA, con l'aumento del rischio di cancro (Mafra, 2005). Il mais contiene una media di 20µg/g di Zn, più che sufficiente per soddisfare il fabbisogno giornaliero di donne e bambini post allattamento. Purtroppo nel mondo circa metà delle terre coltivabili è carente di questo microelemento e il cibo prodotto da questi suoli, se non opportunamente integrato, può causare carenze nutrizionali da Zn (Cakmak, 2008).

Il *breeding* convenzionale è comunque la strategia più utilizzata dall' *Harvest Plus program* (http/www.harvestplus.org/) che ha come obiettivo la biofortificazione di colture chiave (frumento, riso, mais, cassava, miglio, fagiolo e patata dolce) per lo sviluppo del paese attraverso l'identificazione di caratteristiche relazionate con l'alta concentrazione di minerali (Zn e Fe) e il loro trasferimento a *cultivar* locali già adattate (in Asia e Africa) (Da Silva Messias et. al., 2015). La mappatura di *quantitative trait loci* (QTL) associati con l'accumulo di minerali nella granella fornisce la disponibilità di marcatori molecolari che possono essere utilizzati nella MAS (selezione assistita da marcatori) o nella creazione di OGM al fine di ottenere mais fortificati con nutrienti (Sharma e Chauhan, 2008). Già sono state ottenute varietà migliorate per il contenuto di Fe di fagiolo e di riso (Gregorio, 2002). Nel germoplasma del mais ci sono buone variazioni del contenuto di Zn (Simic et al., 2009), ma a livello molecolare sono disponibili poche informazioni riguardo al meccanismo di accumulo di questo elemento, come anche di altri micronutrienti.

La malnutrizione da carenze di ferro colpisce circa due miliardi di persone in tutto il mondo (WHO, 2000) e in Sud Africa è ancora un problema ampiamente diffuso. Il ferro ha scarsa mobilità nel terreno, ma la fertilizzazione fogliare (con $FeSO_4$ e i chelati Fe-EDDHA e Fe-EDTA) ha un ottimo effetto sull'assorbimento (Zhu et al., 2007).

L'uso di fertilizzanti e/o elicitori è un'altra importante strategia per la biofortificazione minerale ed è stato mostrato avere positivi effetti sull'assorbimento e/o la traslocazione dei minerali per via xilematica incrementando lo sviluppo vegetativo e la resa (Hawrylak-Nowak, 2008). Applicazioni di urea contente zinco aumentano il contenuto di Zn e proteine nella granella (da Silva Messias et. al, 2015). In generale si può dire che la fertilizzazione ha mostrato migliori risultati in terreni poveri.

Anche l'effetto sinergia/antagonismo osservato tra i diversi minerali può essere un'efficace strategia di incremento del contenuto di questi elementi. Per esempio l'applicazione di N, P e/o K è stato mostrato che porta all'aumento dell'assorbimento di Fe, Zn e calcio dal suolo, mentre quando si eccede con questa fertilizzazione gli effetti osservati sono opposti (Frossard et al., 2000).

Il Calcio (Ca), come lo Zn, è un importante cofattore, segnale molecolare ed è essenziale nella coagulazione sanguinea (da Silva Messias et. al, 2015). Carenze di

calcio hanno un effetto sulla salute delle ossa che può portare a rachitismo o osteoporosi, dipendendo dall'età (Relea et al., 1995).

Il selenio (Se), elemento in tracce nei cereali, ha la funzione di cofattore per la glutatione peroxidasi, un enzima che protegge i tessuti contro i danni ossidativi. L'utilizzo di varietà mais con un alto contenuto in Se e la fertilizzazione con questo elemento possono portare ad un miglioramento del potenziale antiossidante nel corpo umano (da Silva Messias et. al., 2015). Ad oggi non ci sono ancora mais Ogm modificati per l'accumulo di Se (da Silva Messias et. al., 2015).

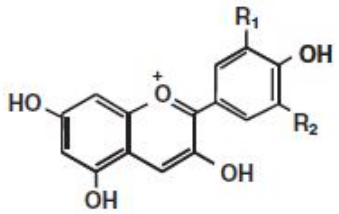
2.3.3.2 Il fosforo

Il fosforo è presente nel seme in tre forme: fosforo libero, fitico e quello cellulare, e la sua disponibilità è considerata un problema in ambito nutrizionale. L'acido fitico è la forma più presente nel seme, principalmente accumulato nello scutello (O'Dell*et al*., 1972; Raboy, 1990) e rappresenta circa il 50-80% del fosforo totale (Doria *et al*., 2015).E' presente sotto forma di sali di cationi, come per esempio potassio, ferro, zinco e magnesio (Raboy, 2002). Durante la germinazione l'acido fitico è degradato dalla fitasi e viene rilasciato principalmente fosforo libero, myo-inositolo, e cationi necessari per la crescita del seme (Badone *et al*., 2010). Un altro importante ruolo dell'acido fitico, dovuto al suo potere antiossidante, è la protezione dell'embrione del seme dai danni dovuti all'invecchiamento che portano a una riduzione della germinabilità (Badone *et al*., 2010). Nonostante i numerosi benefici dovuti all'attività antiradicali, acido fitico è definito un fattore antinutrizionale, come già anticipato precedentemente, per gli animali monogastrici, capace di interferire nella digestione dell'amido e delle proteine e chelare i cationi metallici riducendo la loro disponibilità nell'apparato digerente (Nuss and Tanumihardjo, 2011). Tuttavia l'utilizzo del mutante di mais Ipa-1-241, che sintetizza minori contenuti di acido fitico durante la maturazione dei semi, mostra una bassa capacità di germinazione rispetto al *wild-type* (Doria et al. 2009) e maggiori danni al DNA (da Silva Messias et. al., 2015). In questo contesto l'utilizzo di fitasi durante la pre-fermentazione a pH 5-5.5, che serve per la preparazione del pane (Leenhardt et al., 2005) sembra essere una valida alternativa per ridurre il contenuto di acido fitico e aumentare la biodisponibilità dei minerali, specialmente Fe e Zn (Lopez et al., 2003).

2.3.3.3 I flavonoidi

Molti sono i composti fenolici accumulati nei semi di mais, i flavonoidi, e in particolare antocianine e flavoni, sono tra le classi maggiormente presenti. Dopo l'ingestione i flavonoidi sono rapidamente assorbiti dall'intestino tenue, coniugati maggiormente ad agliconi e accumulati nel sangue (Scalberte Williamson, 2000), mentre altri sono resi disponibili solo durante la fermentazione nel colon (Adom e Liu, 2002; Ndolo e Beta, 2014). Rispetto a molti altri cereali il mais è conosciuto per avere un alto contenuto di composti fenolici (Adome Liu, 2002; Ndolo e Beta, 2014). La maggior parte di quest'ultimi si trova nella pianta sotto forma di composti vincolati e insolubili, associati con i polisaccaridi della parete cellulare; la forma libera rappresenta una piccola frazione del totale (Bunzel *et al*., 2001; Lloyd et al., 2000) ed è chiamata antocianidina (Tsuda, 2012).

Le antocianine nelle pianta possono essere classificate in differenti tipi, i principali sei sono: pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina e malvidina.



R_1	R_2	Anthocyanidin
H	H	Pelargonidin
OH	H	Cyanidin
OCH_3	H	Peonidin
OH	OH	Delphinidin
OCH_3	OH	Petunidin
OCH_3	OCH_3	Malvidin

Fig. 2.11 Struttura chimica dei principali tipi di antocianine nelle piante (Tsuda, 2012).

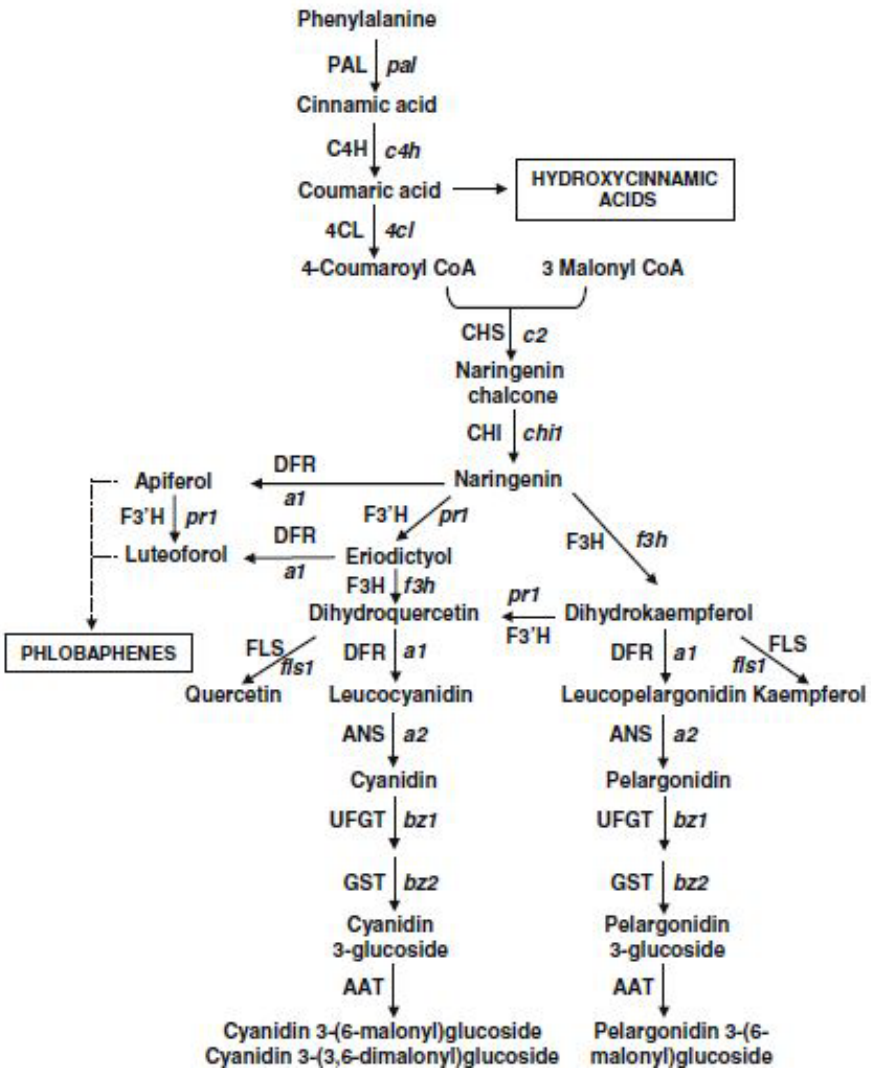


Fig. 2.12 Biosintesi delle principali antocianine in mais (Petroni et al., 2014).

Nel mais sappiamo che le varietà che presentano una colorazione violacea contengono antocianine e che la più frequente è la cianidina 3-glucoside. Le antocianine sono idrosolubili e a pH acido assumono la tipica colorazione rossa e forma relativamente stabile (Tsuda, 2012).

Nella piante i flavonoidi giocano un ruolo essenziale nel richiamo degli insetti impollinatori, nella maschio fertilità, protezione dagli UV e in generale dallo stress ossidativo (Winkel-Shirley, 2002). La via biosintetica è regolata da due differenti fattori di trascrizione che appartengono alle famiglie di geni bHLH e MYB. I membri di bHLH sono r1 (*red color*1) e b1 (*booster*1), mentre c1 (*colored aleurone*1), pl1 (*purple plant*1) e p1 (*pericarp color*1) appartengono alla famiglia di geni MYB (Pilu et al, 2003). Molte varietà e ibridi di mais sono in grado di sintetizzare antocianine in differenti tessuti e generalmente stress biotici e abiotici accrescono il livello di pigmentazione (Petroni et al., 2014).

Quindi la differenza tra varietà di mais "colorato" e sta nella presenza di "forti alleli" dominanti dei geni regolatori che inducono la biosintesi di geni che determinano la pigmentazione da antocianine di specifici tessuti (Petroni et al., 2014).

Nei semi di mais il gene dominante R1C1 attiva la pigmentazione da antocianine nell'aleurone nei cosiddetti mais blu (Procissi et al., 1997),mentre dove il gene dominante è B1Pl1 si ottiene l'induzione della sintesi di antocianine nel pericarpo nel cosiddetto mais viola (Chandler et al., 1989). Il contenuto di antocianine può essere modulato usando "*geographic allels*" del gene regolatore Pl1 (Pilu, 2003). Semi con alti livelli di flobafeni nel pericarpo possono essere ottenuti usando il gene regolatore P1 MYB (Fig. 2.13d; Grotewold et al., 1994), mentre varietà di mais che contengono altri flavonoidi o intermedi metabolici possono essere ottenuti combinando geni regolatori e mutazioni di geni della biosintesi (Petroni et al., 2014). Una mutazione nel gene della biosintesi A1, codificante per DFR (diidroflavonol riduttasi, enzima che attiva la sintesi della pelargonidina), combinato con R1 C1 può essere usato per ottenere semi di mais arricchiti in flavonoidi (quercitina e kanferolo, Fig.2.13e), mentre una mutazione del gene Pr1, codificante per F3'H (flavanone

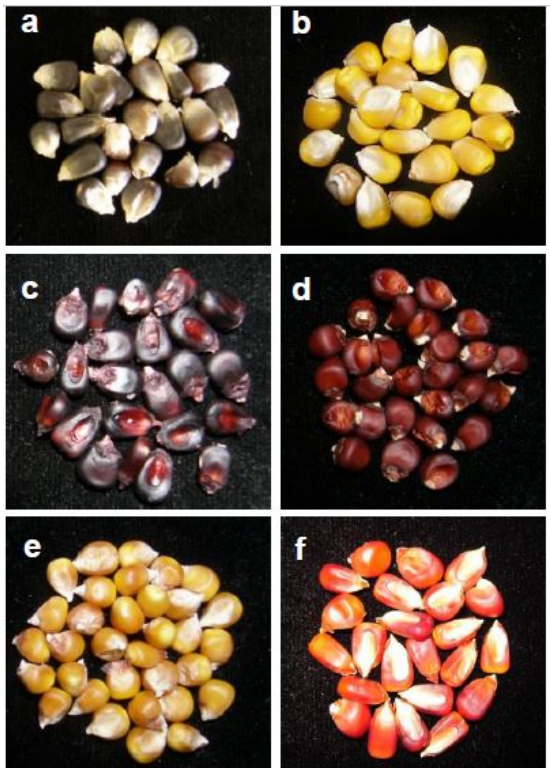


Fig. 2.13 Linee di mais che mostrano diversità di colorazione in funzione della specifica classe di flavonoidi contenuta. Mais con alti livelli di antocianine nell'aleurone (a) o nel pericarpo (c). Semi di mais ricchi di idrooxycinnamicina (b), flobafeni (d), flavonoidi (e) e pelargonidina (f) (Petroni et al., 2014).

3'idroxilasi, enzima responsabile della conversione di DHK, diidrokanferolo, in DHQ, diidroquercitina), combinato con R1C1 produrrà semi di mais ricchi in pelargonidina e kanferolo (Fig. 2.13 f) (Petroni et al., 2014). Quando la mutazione di pr1 è combinata con il gene regolatore P1 viene sintetizzato nel pericarpo solo apiferolo, uno dei due precursori della sintesi dei flobafeni. (Sharma et al., 2012). Dal momento che tutte queste linee di mas contengono anche acido idroxycinnamico in aggiunta alle specifici classi di flavonoidi, piante di mais con recessivi alleli dei geni MYB e bHLH conterranno solo acido idroxycinnamico. Questo garantisce di utilizzare queste piante come modello di controllo in studi nutrizionali (Fig.2.13b) (Petroni et al., 2014).

Mais ricchi di antocianine utilizzati nell'alimentazione di ratti, è stato provato che, siano in grado di ridurre di circa il 30% il tessuto cardiaco danneggiato da ischemia, rispetto ai ratti alimentati con mais senza antocianine (Toufektsian et al., 2008). La protezione del tessuto cardiaco è associata con l'incremento della glutatione a livello del miocardio e con aumento degli omega-3 nel sangue (Toufektsian et al., 2011). Inoltre è provato che l'utilizzo di mais ricchi in antocianine prevenga l'aumento di peso e obesità oltre che ridurre alcune complicazioni legate a malattie come il diabete (Petroni et al., 2014). Alcuni studi mostrano anche che una dieta ricca di antocianine provenienti da mais "colorati" può giocare un'azione antitumorale in ratti affetti da cancro colon rettale e al seno, provocate da agenti cancerogeni quali ad esempio le ammine eterocicliche (Fukamachi et al., 2008). Effetto antiossidante delle antocianine è ampiamente dimostrato in studi oftalmologici, nello specifico questi flavonoidi in animali modello hanno mostrato un effetto di inibizione della cataratta, una riduzione significativa dei lipidi nel sangue, un effetto antiossidante a livello dell'epitelio retineo e un miglioramento della vista, agendo inibendo il progredire della miopia, riducendo la fatica oculare, migliorando l'adattamento al buio e incrementando il flusso sanguineo in retine con glaucoma (Tsuda, 2012).

2.3.3.4 I terpeni

I terpeni sono la famiglia più vasta di composti secondari prodotti dalle piante e dai batteri. Gli Egizi utilizzavano i terpeni di piante per cure, funzioni religiose, cosmesi e per igiene quotidiana. Gli indiani d'America utilizzavano frasche di Artemisia (*Artemisia annua*), contenente terpeni, per proteggere le derrate alimentari da patogeni. Anche gli oli essenziali sono terpeni e già nel Medioevo era conosciuto il processo d'estrazione, descritto poi nel XII sec. da Arnaud de Villanova. La scoperta dell'unità isoprenica è alla base del concetto della " regola isoprenica" di Ruzicka L. nel 1953, e completata successivamente, secondo la quale appartengono alla classe dei terpeni i composti la cui struttura è scomponibile in unità C5 ramificate denominate: unità isopreniche.

I carotenoidi sono una classe di pigmenti organici prodotti conseguentemente a processi di fotosintesi in organismi autotrofi quali: vegetali, alcune specie di alghe e batteri. Le tipologie di carotenoidi sono oltre 750, suddivise in due grandi categorie:

-CAROTENI: che non sono ossigenati, come ad esempio α-carotene, β-carotene, licopene e altri.

-XANTOFILLE: derivati ossigenati dei carotenoidi come la luteina, zeaxantina, βcriptoxantina, astraxantina, capasantina e alti (Jackson et al., 2008)

Dalla degenerazione ossidativa dei carotenoidi derivano un gruppo particolare di alcheni, detti *apocarotenoidi*, di cui il più importante per l'alimentazione umana è il retinolo, comunemente chiamata vitamina A. Nelle cariossidi di mais è visibile la presenza di carotenoidi grazie alla colorazione gialla o rossa, differente appunto per la concentrazione variabile di β-carotene e xantofille.

2.3.3.4.1 I carotenoidi.

I carotenoidi sono composti da 40 atomi di carbonio, ottenuti dalla condensazione di 8 unità di isoprene. Lo scheletro è composto da una porzione centrale con 22 atomi di carbonio, terminali ciascuno con 9 atomi di carbonio. Sono presenti doppi legami coniugati, modificabili con ciclizzazione ad una estremità o ad entrambe, cambiamento del livello di idrogenazione, ossidazione o aggiunta di un gruppo funzionale. Quest'ultima genera la maggior parte della struttura dei carotenoidi, mentre i doppi legami rappresentano la causa delle proprietà fisiche e chimiche.

Sono generalmente liposolubili e i loro doppi legami coniugati costituiscono la parte cromofora che gli consente l'assorbimento nello spettro del visibile (tra 400 e 500nm).

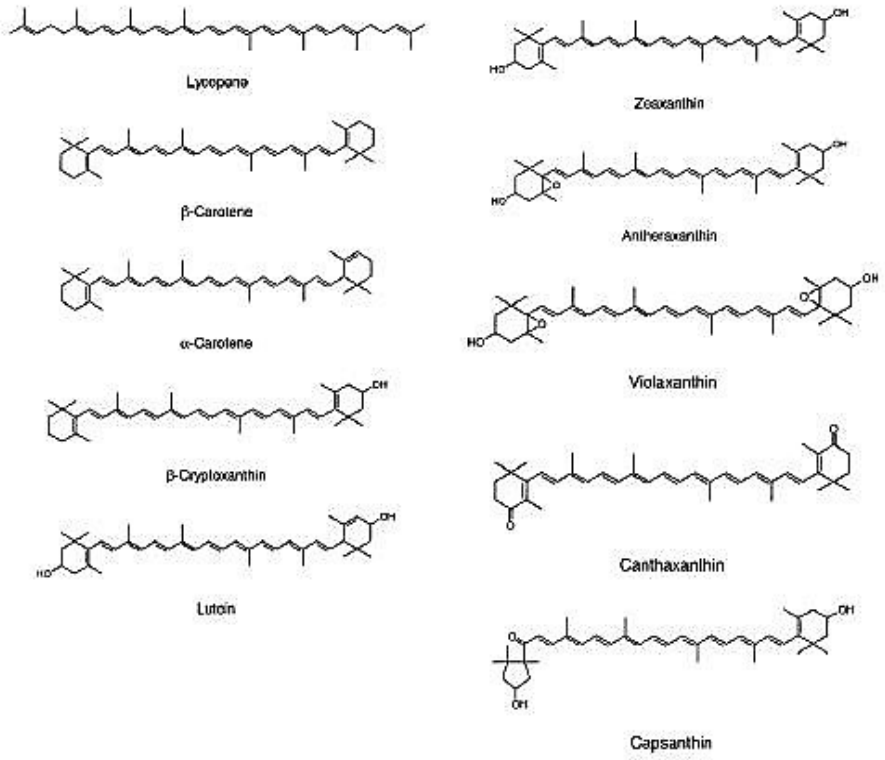


Fig. 2.14 Struttura di alcuni dei principali carotenoidi (Takaiche, 2007).

2.3.3.4.1.1 Carotenoidi nelle piante: la biosintesi

La biosintesi dei carotenoidi ha origine dal geranil-geranilpirofosfato (GGPP), ottenuto da 3 reazioni di condensazione catalizzate dall'enzima geranilgeranildifosfatosintetasi (GGPPS) a partire da prodotti della glicolisi.

Quindi l'enzima fitoenesintasi (PSY) (Armstrong, 1994), codificato dai geni crtB nei batteri e psy nelle piante, catalizza in due passaggi la conversione del GGPP in fitoene (incolore) che viene accumulato nei tessuti.

Successivamente quattro reazioni di desaturazione trasformano il fitoene in licopene. L'enzima fitoenedesaturasisintasi (PDS) catalizza le reazioni che portano alla formazione di z-carotene, mentre l'enzima γ-carotenedesaturasi (ZDS) permette la formazione del licopene.

La via biosintetica a questo punto si dirama:

-Nel ramo detto β-ε il licopene può essere ciclizzato a formare un anello β e uno ε all'estremità della molecola, portando alla formazione dell'α-carotene e i suoi derivati, zeinoxantina e luteina. Gli enzimi che catalizzano la formazione dell'α-carotene sono il licopene β-ciclasi e il licopene-α-ciclasi, che permette introduzione di un anello a una delle estremità del licopene per formare δ-carotene (Nazia et. al., 2015).

-Nel ramo dettoβ-βil licopene può essere ciclizzato a formare 2 anelli β all'estremità della molecola, formando il β-carotene e i suoi derivati, β-ciproxantina e zeaxantina. L'enzima che catalizza la reazione per ottenere β-carotene è licopene β-ciclasi.

Per ossidazione, attraverso delle idrolasi, dalβ-carotenee dall'α-carotene è possibile ottenere le xantofille, rispettivamente β-criptoxantina e poi la zeaxantina (dal β-carotene) e zeinoxantina e luteina (dall' α-carotene). Dalla zeaxantina si originano poi anteraxantina e violaxantina, grazie all'enzima zeaxantina epossidasi (ZEP), e sotto stress luminoso la violaxantina può essere riconvertita a zeaxantina ad opera dell'enzima violaxantinadepossidasi (VDE) o convertita dall'enzima neoxantinasintasi (NXS) in neoxantina (Pfundel e Bilger 1994), l'ultimo carotenoide della via del β-carotene.

La violaxantina e neoxantina, ad opera dell'enzima 9-cis-epossicarotenoide di ossigenasi (NCED), possono essere degradate fino ad ottenere dei prodotti che possono essere modificati per produrre acido abscissico (ABA), che è coinvolto nella risposta della pianta a vari stress abiotici, soprattutto legati con la siccità e la salinità (Davies et al., 2005).

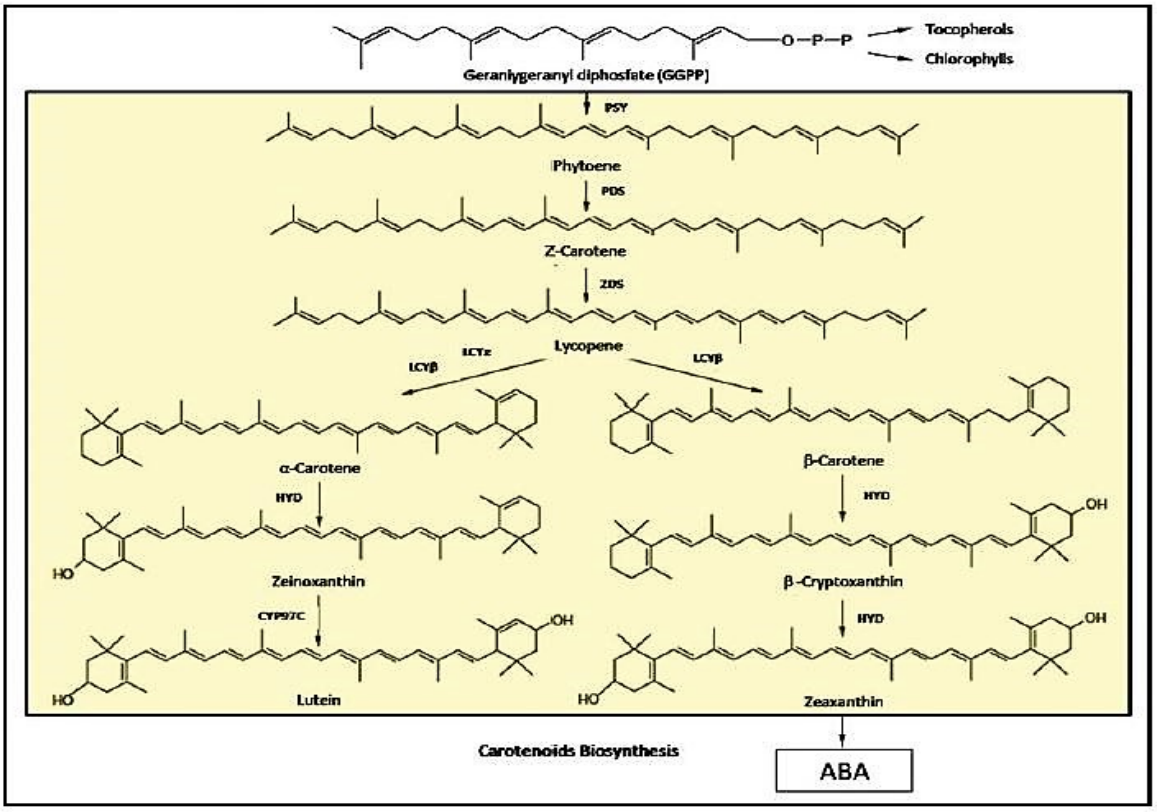


Fig. 2.15 Via biosintetica per la produzione dei carotenoidi e alcuni esempi degli enzimi chiave coinvolti nella sintesi (Da Silva Messias et al., 2015).

2.3.3.4.1.2 Carotenoidi nel mais: i geni coinvolti nella via biosintetica

La caratterizzazione genetica ha definito 8 geni coinvolti nel *pathway* biosintetico dei carotenoidi (Neuffer et. al., 1997).

La descrizione è così composta:

- *y1*: endosperma bianco, buona espressione e una normale vitalità. Endosperma bianco o giallo pallido in alcune varietà genetiche. Basso contenuto dei pigmenti carotenoidi nell'endosperma. Alcuni alleli influenzano la presenza di clorofilla nelle plantule. Numerosi alleli noti diventano debolmente verdi quando la temperatura sale oltre i 35°C. quando crescono in campo aperto, le piante con questi alleli presentano zebrature o maculature. Tra questi alleli esistono numerose mutazioni, tra cui i mutatori-induttori (y1-mum e y1-mus) classificati in base alla cariosside, alla pianticella o alla pianta.
- *y3*: endosperma giallo pallido, buona espressione e vitalità discreta. Il colore può variare da giallo crema pallido a color limone a seconda del *background* che presentano. La riduzione della concentrazione di pigmenti nell'endosperma è associato con un tratto chiaro anche nelle pianticelle. Questo associazione è dovuta al pleiotropismo. Non si sono mai ottenuti individui con un cross-over stabile.
- *y8*: endosperma giallo pallido, con una discreta espressione, buona vitalità.
- *y9*: endosperma giallo pallido, con espressione e vitalità buone. Le cariossidi giallo chiare sono occasionalmente vivipare, piante e pianticelle presentano a tratti colorazioni da verdi a pallide. La via biosintetica dei carotenoidi è bloccata, ma accumulano fitoene, fitofluene e γ-carotene. La maturità è ritardata.
- *y10*: endosperma bianco, espressione eccellente e vitalità pessima per le pianticelle.
- *y11*: endosperma giallo pallido, espressione e vitalità molto buone. Le cariossidi giallo pallido producono pianticelle verdi intenso.
- *y12*: endosperma giallo pallido, espressione e vitalità molto buone. In numerosi caratteri sono simili all'allele *y11*.

2.3.3.4.1.3 Carotenoidi nel mais: il locus y1

Il mais è il cereale che contiene la più alta concentrazione di carotenoidi (mediamente 11 mg/kg SS) (Vallabhaneni et al., 2009). Tutti i genotipi di mais contengono carotenoidi, ma solo un 10-20% svolge la funzione di provitamina A (β-criptoxantina, α-carotene e β-carotene), mentre la maggior parte (circa il 30-50% rappresentato da zeaxantina e luteina, principalmente contenuti nella cariosside) ha una funzione antiossidante (Brenna e Berardo, 2004; De Oliveira and Rodriguez-Amaya, 2007).

Gli enzimi che portano alla biosintesi dei carotenoidi sono codificati nel nucleo della cellula vegetale e inviati alle membrane dei cloroplasti, cromoplasti e amiloplasti, dove catalizzano le reazioni di sintesi (Kirk and Tinley-Bassett, 1978). Il colore giallo dell'endosperma è in parte controllato dal locus *"yellow endosperm-1" Y1* e le varietà

omozigoti recessive per *y1* hanno il seme colore bianco o giallo chiaro (Buckner e al., 1996). L'allele *y1* è localizzato sul cromosoma 6 del genoma del mais, ed è coinvolto nello stadio iniziale della via biosintetica, portando alla produzione dell'enzima fitoenesintasi (PSY) (Buckner et al., 1996). PSY è codificato da tre diversi gruppi di geni, il *psy1,* che agisce sull'accumulo del pigmento nell'endosperma, *psy2,* trascritto nelle cellule delle foglie (Gallagher et al., 2004) e *psy3,* responsabile della colorazione nelle radici e nell'embrione (Li et al., 2008).

Nelle varietà di mais dalla cariosside chiara, così come nel riso, il gene *y1* ha una perdita di funzione che determina il blocco dell'accumulo di carotenoidi (Gallegher e al., 2004). L'endosperma nel mais è triploide (3n=30), come conseguenza della doppia fecondazione tipica delle angiosperme, quindi le classi fenotipiche possibili del locus *y1* sono quatto, a seconda del numero di alleli dominanti o recessivi:

1. *y1y1y1* per un fenotipo bianco con omozigosi
2. *Y1y1y1* per un fenotipo giallo pallido con eterozigosi derivante dal padre
3. *Y1Y1y1* per un fenotipo giallo chiaro, con eterozigosi derivante dalla madre
4. *Y1Y1Y1* per un fenotipo giallo acceso, in omozigosi.

Nei programmi di miglioramento genetico si tende a utilizzare la femmina, anziché il maschio, come parentale contenente un alto dosaggio di carotenoidi così da ottenere cariossidi con un'alta concentrazione di queste molecole (Randolph and Hand, 1940).

Il livello e la composizione dei carotenoidi nella granella di mais non sono influenzati solo dalla presenza del gene *y1,* ma anche dal livello di espressione dei geni lyc-β e lyc-ε che codificano per gli enzimi licopene β-ciclasi (LCYβ) e licopeneε-ciclasi (LCYε). A seconda della maggiore presenza del primo o del secondo enzima si avrà come conseguenza una sintesi differente di β-carotene e di α-carotene e dei relativi derivati (Harjes et al., 2008).

2.3.3.4.1.4 Funzioni biologiche: nelle piante

I carotenoidi oltre alla citata indiretta funzione riguardo risposte a stress abiotici, come la siccità e salinità essendo precursori della sintesi dell'ABA (Davies et al., 2005), nelle piante e nelle alghe svolgono innumerevoli funzioni:

-Sono definiti pigmenti accessori, localizzati nelle membrane dei tilacoidi, e fanno parte insieme alla clorofille e alcune proteine del cosiddetto complesso d'antenna, agendo da collettori di energia luminosa (assorbendo tra i 400-500 nm). L'energia viene trasferita alla clorofilla a denominata centro di reazione.

-Nel processo fotosintetico svolgono un'altra importantissima funzione di foto protezione, dai radicali liberi e dalle specie reattive dell'ossigeno (stress ossidativo) che si formano in condizioni di stress luminoso, nei confronti dl centro di reazione (Esteban et al., 2009).

-Sono responsabili del colore rosso, arancione e giallo in molti frutti e fiori con un importante ruolo nell'impollinazione nelle piante ad impollinazione entomofila e nella dispersione del seme quando maturo.

-Nelle alghe svolgono un ruolo nel fototropismo e nella fitotassi (Borowitzka, 1998).

2.3.3.4.1.5 Funzioni biologiche: nell'uomo

I carotenoidi, nel metabolismo umano, sono importanti molecole con attività antiossidante, antinfiammatoria e con funzioni di potenziatori immunitari. Inoltre studi epidemiologici mostrano un'attività inibitoria nello sviluppo di tumori e malattie degenerative (William et al., 1999). Queste ultime funzioni potrebbero essere spiegate dal fatto che il β-carotene è in grado di agire direttamente sul DNA al fine di regolare la sintesi di mRNA (Guerin et al., 2003).

La World Health Organization stima che centinaia di milioni di persone nel mondo, soprattutto nei Paesi più poveri dell'Africa e dell'America Latina, soffrono di carenza di vitamina A (VAD) (West et al., 2002). In questi Paesi il mais rappresenta l'alimento di base nell'alimentazione e potrebbe essere l'unica fonte di tale vitamina per dipiù di 1 miliardo e 200 milioni persone (De Almeida et al., 2014).

Recentemente è stato dimostrato che la macula, la zona centrale della retina, contiene i carotenoidi luteina e zeaxantina. L'assunzione di cibi ricchi di queste molecole possono essere un'importante prevenzione dai danni provocati dalla luce e dalla formazione di radicali liberi, come anche la xeroftalmia, condizione in cui gli occhi non hanno più la capacità di lacrimare. Per questo motivo, l'assunzione di vegetali ricchi di queste due molecole rallenta la degenerazione maculare progressiva dovuta all'età e la formazione di cataratte (Ahmed et al., 2005).

Nell'ambito della cosmesi la loro capacità detossificante nei confronti dei radicali liberi dell'ossigeno è sfruttata per la creare di nuove creme anti invecchiamento e solari (Heinrich e al., 2003). L'industria mangimistica li utilizza per esaltare il colore e il sapore delle carni (Vilchez et al., 2011) delle uova e dei crostacei (Dufosse et al., 2005);

mentre in ambito alimentare vengono aggiunti principalmente in succhi di frutta, bibite, dolciumi, margarina, prodotti da forno e caseari (Plaza et al., 2009; Dufosse et al., 2005).

2.3.4 Landraces

L'agricoltura è una pratica umana utilizzata da circa 10.000 anni per la produzione del cibo e che è stata in grado di nutrire più di 7 miliardi di persone sul pianeta (Doebley et al., 2006). La popolazione mondiale nel 2050 è previsto che raggiunga più di 9 miliardi (Godfray et al., 2010). Inoltre, come già detto precedentemente, è bene ricordare che quando si parla di malnutrizione ci si riferisce sia alla quantità di cibo prodotto, sia alle carenze di specifici nutrienti che sono una delle principali cause di malattie, soprattuttoin PSS e PVS. E' necessaria "un'intensificazione sostenibile" dell'agricoltura (Mueller et al., 2012) che sia in grado di assicurare la sicurezza alimentare senza usurare i rimanenti ecosistemi naturali sulla terra (Palmgren et al., 2015). In questo contesto la riscoperta di genotipi locali (*landraces*), solitamente con numerosi caratteri d'interesse agronomico e nutrizionale, anche se spesso con una resa minore, si sta rilevando una delle principali strategie soprattutto in agroecosistemi di piccola scala e a bassi input.

Le *landraces* sono popolazioni dinamiche di piante coltivate con un’origine storica, un’identità distinta che non hanno subito interventi di miglioramento; sono geneticamente diverse, adattate localmente e associate ai sistemi di coltivazione tradizionali (Camacho Villa et al., 2005). C'è una notevole differenza tra le *landraces*, generalmente piante eterogenee (poiché mantenute attraverso la libera impollinazione) e le moderne *cultivar*, chiamate anche *élite*, piante geneticamente uniformi, essendo il risultato di programmi di *breeding* applicati nel corso degli anni (Newton et al., 2010). In passato, attraverso i secoli, gli agricoltori sono stati i maggiori guardiani della diversità generica. Già durante il congresso agricolo internazionale tenutosi nel 1927 a Roma era stata evidenziata l'importanza di queste popolazioni per l'agricoltura e la sicurezza alimentare (Zeven, 1998). Nell'ultimo secolo secondo la FAO (1998) è stata persa il 75% della diversità genetica delle piante coltivate, come conseguenza della progressiva scomparsa dei sistemi agricoli tradizionali e l'esodo delle popolazioni rurali, della globalizzazione, e del degrado ambientale (Newton et al., 2010). L'erosione di questa agro-biodiversità è una minaccia per la sicurezza alimentare mondiale nel lungo periodo (Newton et al., 2010). Le *landraces* sostenevano la produzione agricola fino alla fine del diciannovesimo secolo quando iniziarono a diffondersi le piante moderne che garantivano una resa più elevata (Hallauer et al., 1988; Brandolini e Brandolini, 2009).

Le *landraces* sono popolazioni caratterizzate, spesso, da:

- avere maggiore resistenza a stress biotici e abiotici grazie alla loro variabilità genetica, che ha origine dalla selezione naturale (Frankel et al., 1995).Questa caratteristica le rende di crescente interesse anche per far fronte al dichiarato cambiamento climatico.

- garantire una resa costante in condizioni di bassi input e di clima variabile, rispetto alle moderne cultivar adattate a condizioni agricole ad elevati input.

-una maggiore efficienza nell'utilizzo dei nutrienti disponibili nel suolo (Baresel et al., 2005).

- contenere una maggiore varietà e quantità di importanti composti nutraceutici se comparati con le moderne *cultivar* che li persero durante i processi di *breeding* a favore della resa (Zeven, 1998).

Per le ragioni sopra elencate, negli ultimi anni sta aumentando l'interesse per queste varietà antiche a causa della nuova visione dei sistemi colturali non solo basati sulle performance produttive, ma anche sulla sostenibilità e sulla qualità del prodotto (Newton et al., 2010).

La conservazione di queste popolazioni può essere effettuata secondo due principali metodi:

1. *in-situ*, detta anche "*on farm conservation*", caratterizzata dal mantenere in modo dinamico la variabilità genetica che resta sottoposta al continuo processo evolutivo naturale. La necessità di continuare a conservare in situ le *landraces* è una delle più importanti necessità al giorno d'oggi nel mantenimento delle risorse generiche (Dhillon et al., 2004)..

2. *ex-situ*, in banche del germoplasma. Qui la variabilità viene conservata ma in modo statico, perché la naturale pressione evolutiva non esercita selezione.

Gli obiettivi di processi di *breeding* a lungo termine dovrebbero, quindi, basarsi sull'utilizzo dei geni presenti nelle *landraces* che permettono di aumentare la produttività in ambienti con alti stress e concentrarsi sull'adattamento e la conservazione della diversità genetica (Newton et al., 2010).

L'evoluzione di queste popolazioni vegetali può essere accelerata o modificata dall'intervento dell'uomo combinando così la selezione naturale con quella artificiale - un programma di miglioramento genetico basato sulla selezione degli agricoltori in una popolazione evolutiva si può definire partecipativo-evolutivo (PEB, Ceccarelli, 2016). Il *breeding* partecipativo e la selezione varietale sono stati definiti come le più efficaci vie per coniugare le conoscenze dei *breeders* e i criteri di selezione degli agricoltori, enfatizzando così la selezione varietale direttamente negli ambienti d'interesse con la partecipazione degli agricoltori locali (Newton et al., 2010).

Oggi parlare di sicurezza alimentare non significa soltanto sfamare, ma anche nutrire. Da questo punto di vista l'agro biodiversità è importante anche perché molte malattie a base infiammatoria e legate al sistema immunitario dipendono da diete troppo uniformi (Ceccarelli, 2016).

3 MATERIALI E METODI

3.1 Localizzazione dei campi sperimentali e codici

Le attività di campo (*breeding*) sono state svolte durante la primavera/estate del 2016 nell'Azienda agricola "Angelo Menozzi" dell'università degli studi di Milano a Landriano (PV), e in contro stagione durante l'estate sudafricana, da novembre 2016 a marzo 2017, presso il VUT Southern Gauteng Science & Technology Park in Sebokeng.

Fig. 3.1 I campi sperimentali per il breeding, a sinistra indicato con il numero 1 quello presso l'azienda agricola "Angelo Menozzi" dell'università degli studi di Milano a Landriano (PV, Italia) (45°23'51.0"N 9°02'39.0"E), a destra indicato con il numero 2 quello avviato presso il VUT Southern Gauteng Science & Technology Park in Sebokeng (Sudafrica) (26°36'50.7"S 27°50'04.3"E). Coordinate satellitari ottenute da Google maps (https://maps.google.com/).

I materiali genetici seminati nei campi sperimentali provengono dalla banca del germoplasma del CREA (Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria) di Stezzano (BG, Italia), da quella del dipartimento DISAA dell'Università degli Studi di Milano (MI, Italia), una varietà campionata in Sudafrica (QwaQwa, Thibela, Phomolong, 28°37'20.81" S, 28°53'58.07" E) e cinque *landraces* sudafricane ottenute dalla National Gene Bank di Pretoria.

Il materiale genetico coltivato è stato suddiviso in codici:

- Il codice R4941 e R4946 corrisponde ad una progenie della varietà *Millo Corvo*, proveniente dalla regione della Galizia (Spagna).

- Il codice R4865 corrisponde alla varietà campionata precedentemente, presso l'appezzamento a conduzione famigliare di un agricoltore sudafricano, nella regione montana di Qwa-Qwa, Thibela, Phomolong (28°37'20.81" S, 28°53'58.07" E).

- Il codice R4783 ottenuto precedentemente dall'incrocio delle linee *B73* e *Mo17* coltivate a Landriano e denominato "*B73xMo17"*

- Per il *test* di complementazione è stato usato:
    - Il codice R4904, ottenuto dal Maize Stock Centre (USA).
    - Il codice R4800 Bianco Perla, e R4801 Bianco Vitreo. Entrambe le varietà sono con fenotipo di colore bianco delle cariossidi e originarie del nord Italia.
    - Le cinque *landraces* sudafricane ottenute dalla *National Gene Bank* di Pretoria e quella campionata precedentemente denominata "Africa Bianco ".

3.2 Lavorazioni preliminari e conduzione agronomica in Italia

Il campo sperimentale per le attività di *breeding* in Italia è stato allestito, nell'annata agraria 2016 a Landriano (Pavia), presso l'azienda agricola "Angelo Menozzi" dell'Università degli studi di Milano su una superficie di 1,6 ha. La preparazione del letto di semina è stata realizzata con un'aratura superficiale, seguita da una fresatura utilizzando una zappatrice attivata dalla presa di potenza del trattore. Successivamente con l'utilizzo di un erpice a denti trainato è stato amminutato il terreno.

La semina nell'annata agraria 2016 è stata effettuata nella seconda metà di aprile tracciando linee con picchetti e fili lunghi 40 m.
La semina è stata realizzata con l'utilizzo della seminatrice manuale *Earth Way,* dotata di un organo circolare rotante monoseme, mantenendo una distanza sulla fila di 20 cm e interfila di 70 cm. Sono poi stati posizionati picchetti per identificare i differenti genotipi (vedi in figura 3.3).

Fig. 3.3 A sinistra la seminatrice *EarthWay,* al centro il campo di Landriano seminato, a destra il picchetto con il codice identificativo del materiale genetico seminato sul filare corrispondente.

E' stato realizzato un trattamento di diserbo in pre-emergenza e uno in post-emergenza, ad un mese dalla semina, con CLARIDO®. Durante il ciclo colturale si è intervenuto con diserbo manuale all'occorrenza di alcune specie infestanti (Sorghetta – *Sorghum halepense L.* e cencio molle –*Abutilon theophrasti Medicus*).

E' stata effettuata una concimazione di fondo distribuendo 200 Kg/ha, mentre quella a[illegible] mais p[illegible]

Sono stati inoltre realizzati tre interventi irrigui per scorrimento, eseguiti in condizione di assenza di precipitazioni prolungate, con l'utilizzo di una motopompa ad immersione. L'acqua viene distribuita in canali poco profondi, preventivamente realizzati nell'interfila, scavati manualmente a file alterne cosicché ogni fila riceva acqua da un solo lato abbassando il rischio di allettamento provocato dall'eccessiva forza dell'acqua sullo stocco.

3.3 Lavorazioni preliminari e conduzione agronomica in Sudafrica

Il campo sperimentale allestito in Sudafrica è stato realizzato presso il VUT *Southern Gauteng Science & Technology Park* in Sebokeng della VUT University of technology, su una superficie di 120 m^2. Il sito individuato è stato preventivamente decespugliato e

Fig. 3.4 Successione di quattro fotografie rappresentative dell'individuazione dell'area (in alto a sinistra) la lavorazione primaria con l'aratro a dischi e la successiva livellazione e amminutazione.

successivamente, con l'utilizzo di un aratro a dischi, lavorato primariamente. Durante l'aratura sono affiorate numerose pietre che sono state rimosse. Il sito è stato quindi livellato e amminutato utilizzando utensili agricoli. L'area lavorata era precedentemente mantenuta a prato stabile e sfalciata con manutenzioni ordinarie. E' stato inoltre predisposto un allaccio alla rete idrica utilizzata per l'irrigazione del giardino del *Campus* e realizzato un pozzetto, con gli opportuni raccordi, alla testata del sito lavorato al fine di avere la diponibilità di acqua per irrigazioni di soccorso, spesso necessarie in questo areale.

Fig. 3.5 A sinistra l'aratro utilizzato per la preparazione primaria del terreno, mentre a destra il pozzetto di controllo dell'impianto di irrigazione con valvola d'apertura e chiusura

La semina è stata realizzata manualmente mantenendo una distanza tra le file di 70 cm e sulla fila di 20 cm. Il sito è stato diviso in 12 blocchi (parcelle sperimentali) e ogni codice seminato in 3 di questi distribuiti in modo randomizzato. L'area d'impianto è spesso soggetta a raffiche di vento, per questa ragione si è deciso di seminare lungo tutto il perimetro dell'appezzamento un mais bianco locale (acquistato al mercato di Veerenging) con funzione di barriera antivento. Ai quattro angoli del campo sperimentale sono stati posti dei pali di sostegno ai quali è stata fissata una corda di *nylon* per il sostegno della barriera vegetale.

La concimazione azotata è stata realizzata con 1,5 Kg di urea in data 12/12/2016 (alla levata) e 1,5 Kg di urea in data 5/01/2017 (in copertura).

Sono stati inoltre realizzati due interventi irrigui per scorrimento, eseguiti in condizione di assenza di precipitazioni prolungate.

3.4 Attività di conservazione e *breeding* in Italia e in Sudafrica

Nelle annate agrarie 2016 in Italia e 2016/2017 in Sudafrica l'attività principale di incroci controllati è stata effettuata utilizzando degli isolatori, sacchetti di carta trattati con sostanze idrorepellenti per raccogliere il polline e per impedire la contaminazione delle sete con polline estraneo (Figura 3.6).

Fig. 3.6 Progressione (A, B, C) di fotografie che rappresentano i passaggi fondamentali del processo di *breeding.* In A la raccolta del polline dall'infiorescenza maschile. In B si può vedere nel dettaglio il polline di colore giallo e le antere secche. In C, ad impollinazione incrociata avvenuta, la registrazione dell'incrocio e la copertura della spiga fecondata con l'apposito sacchetto idrorepellente e traspirante.

Il lavoro del *breeder* è agevolato dalla caratteristica proterandria della pianta di mais: l'infiorescenza femminile si sviluppa più tardivamente rispetto a quella maschile. In questo modo sono facilmente individuabili le piante in cui la spiga è in fase di sviluppo dove le sete non sono ancora state emesse. In questa fase la "femmina" è stata coperta per impedire la contaminazione con polline estraneo. L'isolatore femminile è stato apposto in modo da fissarlo allo stelo tra la spiga e lo stocco e fissato utilizzando una pinzatrice manuale.

In alcuni casi, per agevolare la fecondazione, nel giorno che precede l'impollinazione, la spiga in via di sviluppo è stata tagliata a circa 2 cm dalla punta delle brattee al fine di provocare la fuoriuscita di una spazzola di sete lunghe 1 o 2 cm.

Per la conservazione delle varietà vengono effettuate operazioni di autofecondazione, di "*sib*" e di "*sib pool*". Nelle prime il polline di una pianta viene prelevato e distribuito sulle sete di una pianta appartenente allo stesso codice genotipico, nelle "*sib pool*" è stato prelevato polline da 4-5 piante di uno stesso codice genotipico, mescolato e distribuito sulle sete delle piante della stessa popolazione, scelte come portaseme. Per gli incroci finalizzati all'ottenimento di ibridi, il polline di una varietà è stato prelevato e trasferito sulle sete delle piante di un'altra varietà, scelta come portaseme. Conclusa l'operazione di impollinazione, l'isolatore maschile è stato posto sulla spiga, affrancandolo al fusto della pianta e si sono registrati su di esso la data ed il codice dell'operazione effettuata (autoimpollinazione o incrocio)

3.5 Raccolta ed Essicazione

La raccolta in Italia nell'annata 2016 è stata effettuata manualmente nei primi giorni del mese di settembre. Anche in Sudafrica la raccolta è stata effettuata manualmente il 23 e 24 marzo 2017. Per entrambi i campi sperimentali:

- Le spighe una volta raccolte sono state divise in casse secondo il codice del genotipo.
- Per garantire una migliore conservazione le spighe sono state poste in un essiccatore mantenendo la temperatura tra i 40 - 43°C così da raggiungere un contenuto di acqua nelle cariossidi pari al 12 - 14%.

3.6 Test di complementazione

Il *test* di complementazione è stato operato utilizzando uno schema sperimentale di allelico, che consiste nell'incrociare ogni codice con gli altri in analisi considerandoli prima come individui portaseme e ripetendo poi l'incrocio considerando lo stesso individuo come donatore di polline.

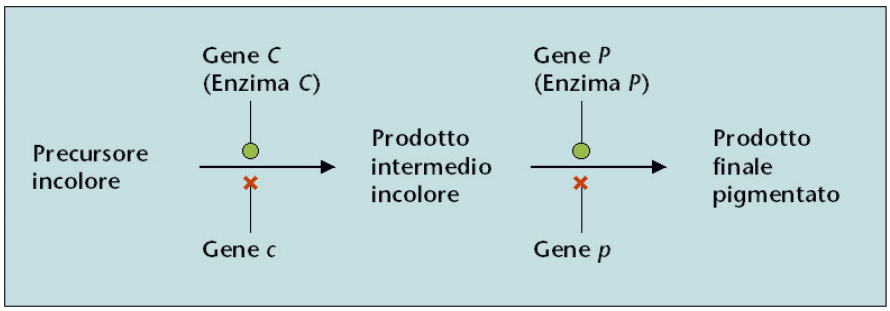


Fig. 3.7 Ipotetica catena metabolica che dal precursore incolore conduce al prodotto finale pigmentato attraverso un prodotto intermedio incolore. Il livello e la composizione dei carotenoidi nella granella di mais sono influenzati dalla presenza del gene *y1* ma anche dei geni lyc-β e lyc-ε. Varietà omozigoti recessive per *y1* possiedono il seme di colore bianco o giallo chiaro. La caratterizzazione genetica ha definito 8 geni y_s che controllano la biosintesi dei carotenoidi nel mais.

Successivamente il test prevede un confronto visivo del colore della cariosside della progenie degli incroci al fine di rivelare la base genetica della caratteristica, nel nostro caso quella della "cariosside bianca" .

3.7 Analisi quantitativa del contenuto di carotenoidi

L'estrazione dei carotenoidi è stata effettuata su aliquote di farina ottenuta da granella, seguendo diversi passaggi. Le farine sono state ottenute dalla macinazione di 10 semi per ogni popolazione attraverso un mulino a sfere d'agata, Retsch MM20 (Retsch GmbH Germany), impostato a 21 Hz per un tempo di 2'.

Per l'estrazione dei pigmenti è stato seguito il seguente procedimento (Heredia et al., 2010):

1) Pesare circa 0,25 g di farina di mais per ogni campione. Per la determinazione del peso è stata usata la bilancia analitica;

2) Sospendere la farina in 3 ml di miscela 1:1:1 di acetone, esano e metanolo

3) Lasciare in agitazione *over night* (12 ore) in bagno di ghiaccio in camere fredde a 4 °C

4) Al termine dell'agitazione aggiungere 1 ml di H2O distillata

5) I campioni sono stati posti in centrifuga pre-raffreddata, a 3000 rpm per 10 minuti;

6) Prelevare il surnatante con una pipetta ed è stato trasferito in una siringa con filtro da 2 micron, ed è stato così filtrato;

7) Ogni campione è stato diluito 1:10. Quindi, per ogni campione, sono stati usati 900 microlitri di miscela 1:1:1 (acetone:esano:metanolo) e 100 microlitri di campione.

8) I campioni così diluiti sono stati trasferiti in Cuvetta di vetro e letti allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 440 nm. Tra ogni campione la Cuvetta è stata sciacquata con acetone.

9) Infine i valori delle letture sono stati così elaborati:

$$\text{Carotenoidi} = (((A440*10) + 0{,}0124) / (0{,}2091) * (1/W))$$

dove: A: assorbanza W: peso delle farine

I valori sono espressi in $mg*g^{-1}$

3.8 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata ottenuta unendo le tre repliche per ogni varietà/ibrido di mais che è stato coltivato in Sudafrica. I dati sono stati inizialmente ordinati su un foglio di lavoro Excel e successivamente l'analisi statistica è stata effettuata con il *software* SPSS (Statistical Package for Social Science) utilizzando come soglia errore di significatività 0,05 per l'accettazione o il rifiuto dell'ipotesi H_0: non ci sono differenze significative tra le medie delle diverse varietà/ibridi. Per cogliere le differenze statistiche è stato usato il *test* di Tuckey. I grafici sono stati disegnati con Excel.

4 RISULTATI

4.1Campionamento e ottenimento di *landraces* di mais bianco

La varietà campionata è stata recuperata presso l'appezzamento a conduzione famigliare di un agricoltore sudafricano, nella regione montana di Qwa-Qwa (28°37’20.81” S, 28°53’58.07” E). La varietà, usata solitamente per l'alimentazione umana in Sudafrica, è povera di carotenoidi e di ferro, ma ha un contenuto significativo di zinco (23.44 ± 6.06 µg/g) (Cantaluppi et al., 2017). Il codice R4865 è stato ottenuto a Landriano per autofecondazione della varietà campionata nell'estate 2016 e denominato "Africa Bianco".

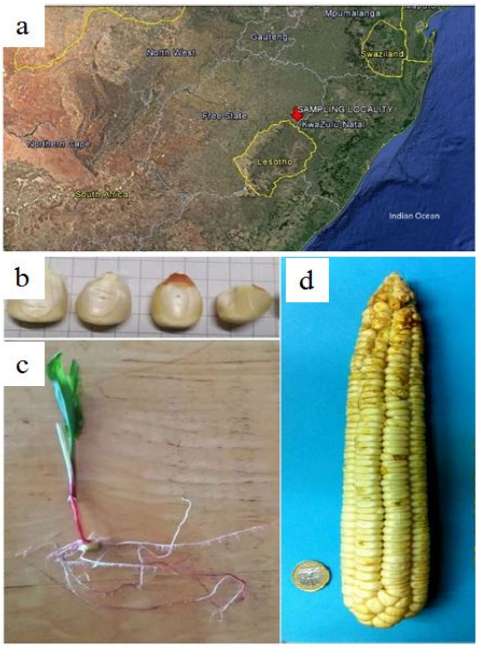


Fig. 4.1 Nella figura il luogo di campionamento (a), le cariossidi (b), la plantula cresciuta in condizioni di normale luminosità (c) e la spiga (d).

Dalla *National Gene Bank* di Pretoria sono state ottenute cinque *landraces* di mais bianco con le relative informazioni allegate in tab. 4.1.

	Informazioni ottenute dalla Gene Bank di Pretoria												
Codice	***Accesssion no:***	***Collection date***	***Sci. name***	***Province***	***Topography***	***Stoniness***	***Drainage***	***Ethnic group***	***Soil texture***	***Sample type***	***Sample source***	***Altitude***	***Uses***
R4961	**1249**	5/15/2001	Zea mays L.	Limpopo	Plain level	Low		Xi-Tsonga	Loam	Seed	Farmland	1330	Food
R4962	**1592**	5/16/2001	Zea mays L.	Limpopo	Hilly	Low	Moderate	Xi-Tsonga	Loam	Seed	Farm store	1400	Food
R4963	**1353**	5/3/1999	Zea mays L.	Limpopo	Plain level	None	Good	Venda	sandy loam	Seed	Farm store	510	Food
R4964	**1759**	5/23/2001	Zea mays L.	Limpopo	Plain level	Low	Good	Xi-Tsonga	Loam	Seed	Backyard	1450	Food
R4965	**1422**	5/5/1999	Zea mays L.	Limpopo	Mountainous	None		Venda	sandy loam	Seed	Farm store	780	Food

Tab. 4.1 Informazioni, rilasciate dalla *National Gene Bank* di Pretoria, sulle *landraces* africane di mais ottenute e relativi codici assegnati per la semina (R4961, R4962, R4963, R4964 e R4965).

I campioni di queste varietà presentavano variabilità fenotipica riguardo alla colorazione delle cariossidi (vedi tab. 4.2).

Codice genotipo	Peso (g) tot. semi	Fenotipo colore giallo (n°)	Fenotipo colore bianco (n°)	Totale semi (n°)	Peso medio seme (g)
G1592	43,55	41	57	98	2,25
G1422	40,70	81	20	101	2,48
G1249	36,33	34	61	95	2,61
G1353	39,05	73	18	91	2,33
G1759	37,88	60	39	99	2,61

Tab. 4.2 Misurazioni effettuate sulle cariossidi delle *landraces* sudafricane di mais. Per ogni campione sono indicati il peso totale semi, il numero di semi a fenotipo di colore giallo e bianco, il numero totale di semi e il peso medio del singolo seme.

Sono stati separati i semi dividendoli in due classi, quelli a fenotipo colore giallo e bianco. Per il testdi complementazione e il programma di miglioramento genetico sono state utilizzate le cariossidi a fenotipo bianco di ogni varietà (vedi fig. 4.2)

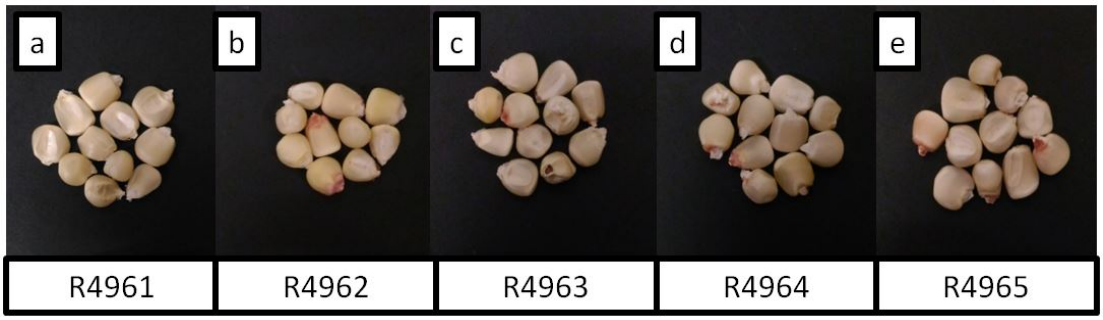


Fig. 4.2 Cariossidi, con fenotipo colore bianco, a confronto dei codici corrispondenti alle cinque *landraces* sudafricane ottenute dalla *National Gene Bank* di Pretoria. Per la semina nel campo sperimentale di Landriano (Italia) sono stati assegnati i codici R4961 (a), R4962 (b), R4963 (c), R4964 (d) e R4965 (e).

Questa decisione deriva dal fatto che, come già citato, il mais bianco ricopre nell'alimentazione umana in Sudafrica un ruolo primario nell'apporto energetico giornaliero, ed è preferito culturalmente al mais di colore giallo, che spesso viene destinato all'alimentazione degli animali.

4.2 Allestimento del campo sperimentale, test di complementazione e attività di *breeding*.

4.2.1Allestimento del campo sperimentale

La semina nell'annata agraria 2016 in Italia è stata realizzata il 21 aprile, presso l'azienda agricola "Angelo Menozzi" dell'Università degli Studi di Milano, è stata effettuata con la seminatrice *Earth Way* distinguendo le varietà in funzione degli obiettivi del progetto di tesi:

1. Per il test di complementazione: Il codice R4904, ottenuto dal *Maize Stock Centre* (USA) di cui è noto che porti la mutazione y_1 / y_1 della via biosintetica dei carotenoidi, il codice R4800: Bianco Perla, e R4801: Bianco Vitreo, il codice R4865: *landraces* sudafricana campionata precedentemente e i codici R4961, R4962, R4963, R4964 e R4965 corrispondenti alle 5 *landraces* ottenute dalla *National Gene Bank* di Pretoria.

Fig. 4.3 Cariossidi, con fenotipo colore bianco, e relativi codici, utilizzate per il test di complementazione, corrispondenti alle cinque *landraces* sudafricane ottenute dalla *National Gene Bank* di Pretoria (a,b,c,d,e), la varietà portante la mutazione y_1 / y_1 (f) le varietà Bianco Perla (g), Bianco Vitreo (h) e quella campionata precedentemente denominata "Africa Bianco".

2. Per l'attività di *breeding:* la varietà *Millo Corvo* (codici: R4941 e R4946), quella campionata in Sudafrica (codice: R4865) e l'ibrido denominato "*B73x Mo17"*a due vie precedentemente ottenuto (codice: R4783).

3. La semina in contro stagione in Sudafrica presso il VUT Southern Gauteng Science & Technology Park in Sebokeng della VAAL University of technology è stata realizzata a novembre 2016 seguendo come obiettivo, in questo caso, la verifica delle *performance* delle varietà e degli ibridi precedentemente realizzati nel contesto sede del proseguimento futuro del programma di miglioramento. Per l'attività di *breeding* sono state quindi utilizzatela varietà *Millo Corvo* (codice: R4946), quella campionata in Sudafrica (codice: R4865) il diibrido B73/Mo17xR4865 e l'ibrido R4941x R4865. A queste varietà e ibridi sono stati

assegnati i codici A1, A2, A3, A4 (vedi fig. 4.4) per indicare il primo ciclo di miglioramento genetico in Sudafrica, dove A è l'abbreviazione di Africa.

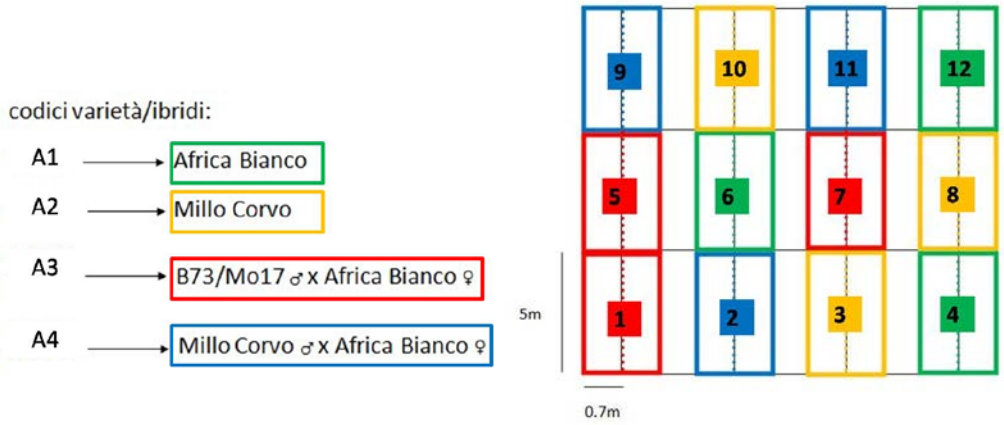


Fig. 4.4 Schema sperimentale a blocchi randomizzati utilizzato per l'allestimento del campo sperimentale in Sudafrica presso il VUT Southern Gauteng Science & Technology Park in Sebokeng della VAAL University of technology. I codici A1, A2, A3, A4 corrispondono rispettivamente a: la varietà di mais bianco campionata (codice: R4865), Millo corvo (codice: R4946), il diibrido B73/Mo17xR4865, e l'ibrido R4941x R4865; entrambi ottenuti in Italia presso l'azienda agricola "Angelo Menozzi" dell'Università degli Studi di Milano.

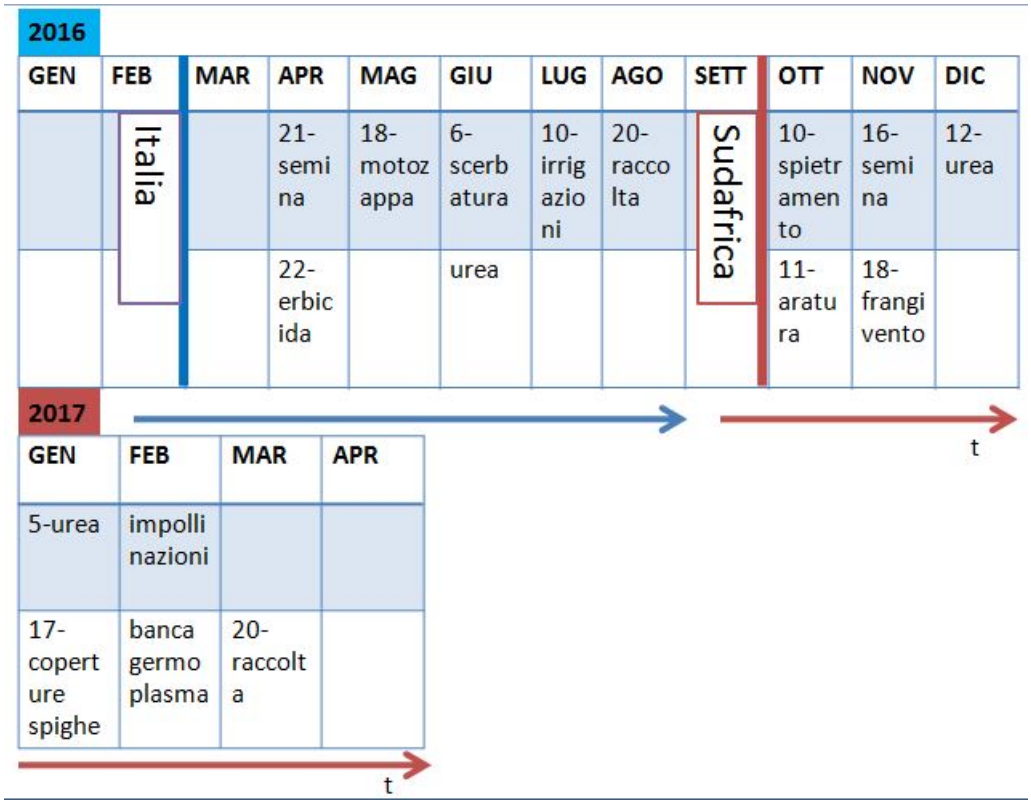


Fig. 4.5 Cronogramma delle principali attività di campo in Italia e Sudafrica.

Le tecniche di *breeding* hanno previsto:

- Autofecondazione (prelievo del polline da un individuo e fecondazione dell'individuo stesso), per avere un materiale *standard* da valutare con il materiale incrociato nel *test* di complementazione.
- Autofecondazione con *Sib* (prelievo del polline da un individuo di un codice e fecondazione di un altro individuo del medesimo codice) e con *Sib pool* (prelievo del polline da più individui di un solo codice e fecondazione di un individuo del medesimo codice), per controllare che all'interno del codice non ci sia inquinamento eccessivo che possa far variare significamene il risultato.
- Incrocio tra il codice portatore noto della mutazione y_1 e un Y non noto per svelare con il test di complementazione la forma allelica Y non nota e l'eventuale presenza di un diverso gene nel controllo del fenotipo "colore cariosside".

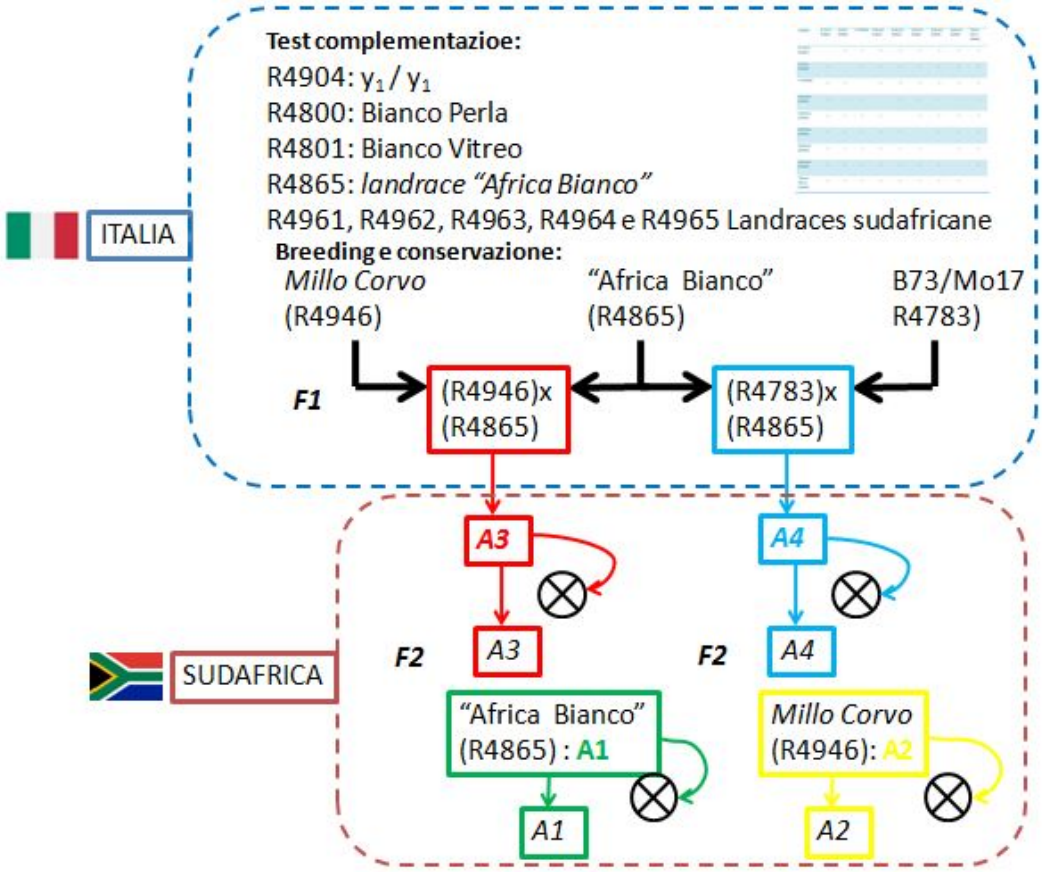


Fig. 4.6*Test* di complementazione e attività di *breeding*e conservazione in Italia e in Sudafrica.

I campi sperimentali in Italia e in Sudafrica hanno permesso alla ricerca di ottenere materiale non inquinato per effettuare tutte le prove di laboratorio e fornire il materiale di partenza per la conservazione "*in situ*" del germoplasma e proseguire nel processo di miglioramento genetico. Non sono state registrate problematiche durante le fasi di fecondazione e tutte le varietà hanno prodotto materiale sufficiente per gli obiettivi preposti.

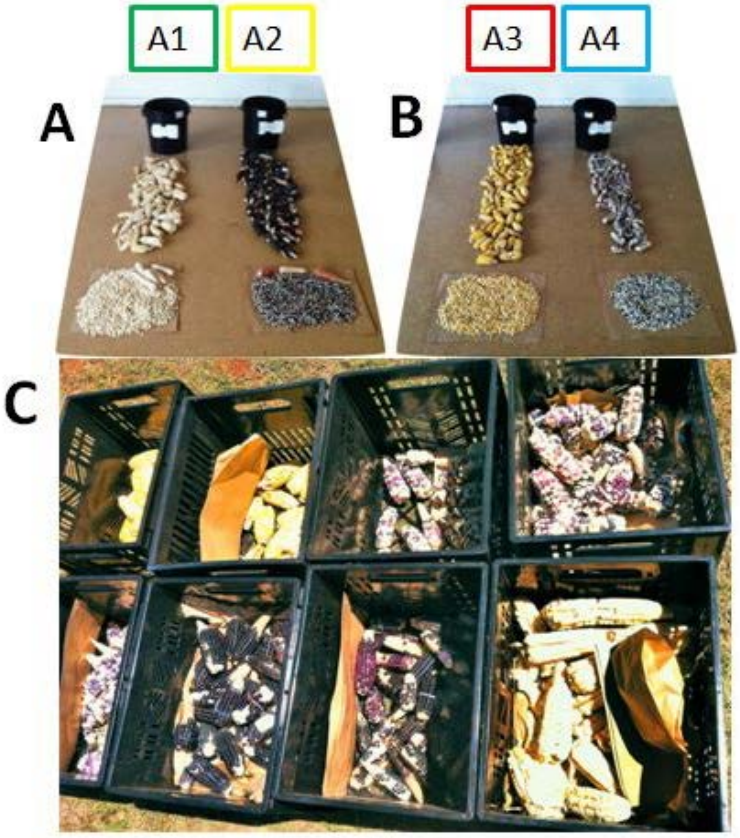


Fig. 4.7 Raccolto dal campo sperimentale sudafricano. In A possiamo vedere le varietà a confronto (Africa Bianco e Millo Corvo), in B gli ibridi B73/Mo17 x Africa Bianco e Millo Corvo x Africa Bianco, mentre in C i codici separati in cassette subito dopo la raccolta.

4.2.2 Test di complementazione

I risultati del test di complementazione hanno confermato la tesi iniziale, che ipotizzava che la mutazione presente in tutte le cultivar di mais bianco fosse riconducibile a una sola, individuata nel gene y_1. Da ricordare che nell'analisi si tiene conto della maggior carica genetica portata dall'apparato femminile rispetto a quello portato dal polline di origine paterna.

I test per riconoscere la complementazione sono iniziati con il controllo e l'analisi visiva del colore delle cariossidi. Gli incroci tra y_1 ♀ (R4904) e polline ♂ di altri individui, oppure l'inverso, hanno dimostrato in tutti i casi non complementazione, ovvero la mutazione responsabile del fenotipo colore cariosside si trova sul medesimo allele del gene responsabile.

CODICI	B.Vitreo (R4801)	B.Perla (R4800)	Y1 (R4904)	landraces (R4961)	landraces (R4962)	landraces (R4963)	landraces (R4964)	landraces (R4965)	"Bianco Africa" (R4865)
B.Vitreo (R4801)		-	-	-	-	-	-	-	-
B.Perla (R4800)	-		-	-	-	-	-	-	-
Y1 (R4904)	-	-		-	-	-	-	-	-
landraces (R4961)	-	-	-		-	-	-	-	-
landraces (R4962)	-	-	-	-		-	-	-	-
landraces (R4963)	-	-	-	-	-		-	-	-
landraces (R4964)	-	-	-	-	-	-		-	-
landraces (R4965)	-	-	-	-	-	-	-		-
"Bianco Africa" (R4865)	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tab. 4.3 Risultati del test di complementazione, ordinati secondo una matrice triangolare (i segni + e – indicano, rispettivamente, presenza e assenza di complementazione).

Questo risultato conferma la tesi che i genotipi considerati nell'analisi sono portatori della mutazione y_1 nel genoma che blocca la via biosintetica dei carotenoidi.

4.2.3Analisi qualitativa del contenuto di carotenoidi

Per determinare l'effettiva quantità di carotenoidi nelle varietà selezionate di mais, si procede seguendo il protocolli di Heredia e coautori. È stata effettuata un'estrazione di aliquote di farina mediante una soluzione 1:1:1 di acetone, esano e metanolo; successivamente, attraverso l'utilizzo dello spettrofotometro, si è potuto quantificare il contenuto di carotenoidi negli estratti leggendo la loro assorbanza specifica a 400 nm. In tabella 4.4 sono mostrati i risultati della quantificazione di carotenoidi espressa come µg su 1 g di farina.

CODICI	B.Vitreo (R4801)	B.Perla (R4800)	Y1 (R4904)	landraces (R4961)	landraces (R4962)	landraces (R4963)	landraces (R4964)	landraces (R4965)	"Bianco Africa" (R4865)	Millo corvo (R4946)	*B73x Mo17* (R4783)
Carotenoidi (µg/g)	2,67	1,95	2,15	2,10	2,87	2,24	1,92	2,12	2,6	2,77	13,3

Tab. 4.4 Analisi quantitativa dei carotenoidi presenti nel seme delle popolazioni di mais selezionate. L'analisi è stata effettuataquantificando allo spettrofotometro l'estratto (1:1:1 di acetone, esano e metanolo).

Come previsto dall'analisi visiva con il test di complementazione, tutte le varietà mostrano un basso contenuto di carotenoidi.

La concentrazione di carotenoidi di riferimento presa per l'esperimento è stata quella della luteina (vedi fig. 4.8), xantofilla maggiormente presente nel mais (Brenna e Berardo, 2004) e la quantificazione è stata effettuata attraverso la curva di taratura riferita a questo pigmento.

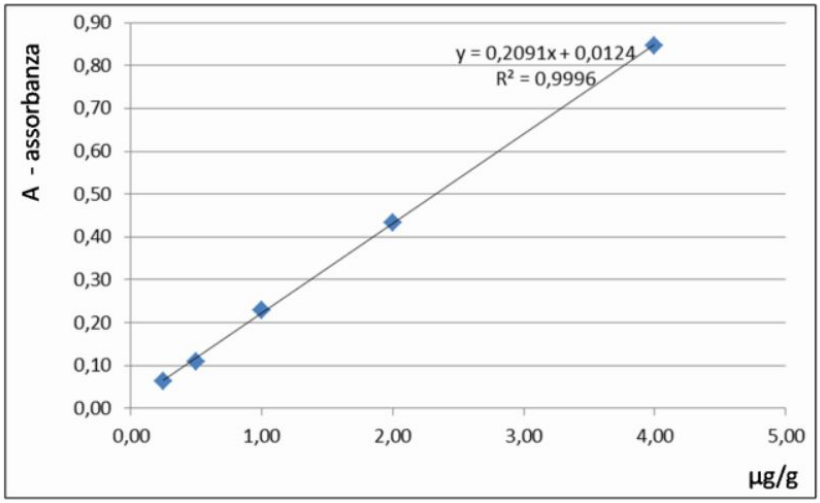


Fig. 4.8 Curva di taratura riferita alla luteina, utilizzata per la quantificazione di carotenoidi.

4.3 Analisi statistica: caratteri agronomici

Le caratteristiche agronomiche che sono state misurate e analizzate statisticamente sono:

-altezza pianta **(h PIANTA, m)**,

-altezza spiga **(h SPIGA, m)**,

-numero ramificazioni infiorescenza maschile **(N° RAMIFICAZIONI INF. ♂)**

-lunghezza spiga/raccolta **(L.S.,cm)**,

-diametro spiga/raccolta **(Ø S., cm)**,

-diametro tutolo/raccolta **(Ø T., cm),**

-peso totale spiga/raccolta **(W.Tot S., g)**,

-peso semi/raccolta **(W. semi S., g)**,

-peso 50 semi/raccolta **(W. 50 semi, g)**.

,

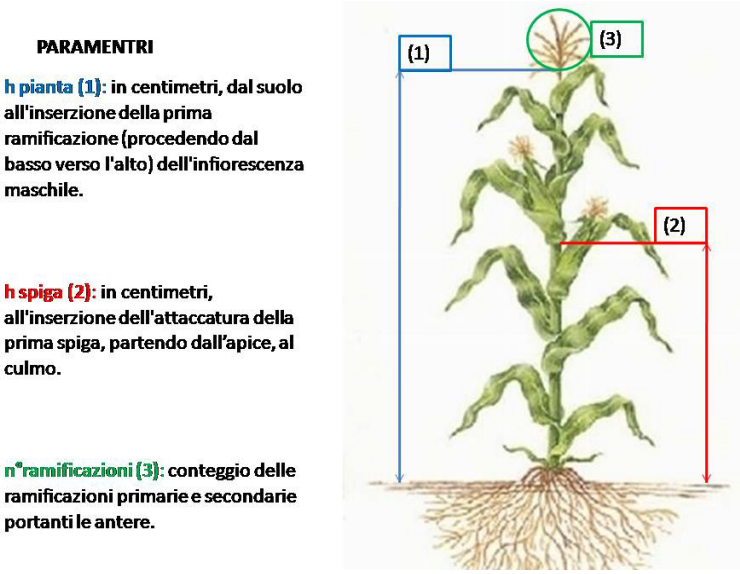


Fig. 4.9 Descrizione della modalità di campionamento per alcuni dei parametri misurati e analizzati

I grafici che seguono sono stati ottenuti confrontando media e deviazione *standard* per ogni codice presente nel campo sperimentale sudafricano. Le lettere indicano, indicano l'appartenenza del codice, per la caratteristica in esame, a uno o più gruppi omogenei, basandosi sull'analisi delle differenze significative. L'appartenenza allo stesso gruppo, ad esempio gruppo a-b, di due codici in analisi, significa che tra loro le differenze riscontrate non sono statisticamente significative.

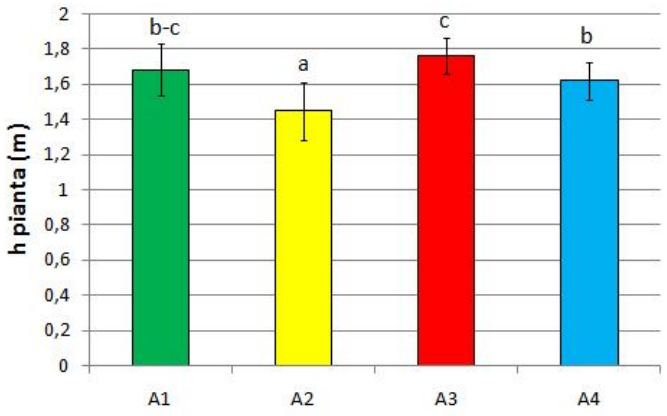


Fig. 4.10 L'altezza della pianta è stata misurata, come evidenziato in fig. 4.9, in centimetri, dal suolo all'inserzione della prima ramificazione, procedendo dal basso verso l'alto, dell'infiorescenza maschile. L'analisi statistica, effettuata con il test di Tuckey ha evidenziato differenze significative tra gli ibridi/varietà (vedi allegati). La barra sull'istogramma indica l'errore standard calcolato a partire dalla deviazione standard.

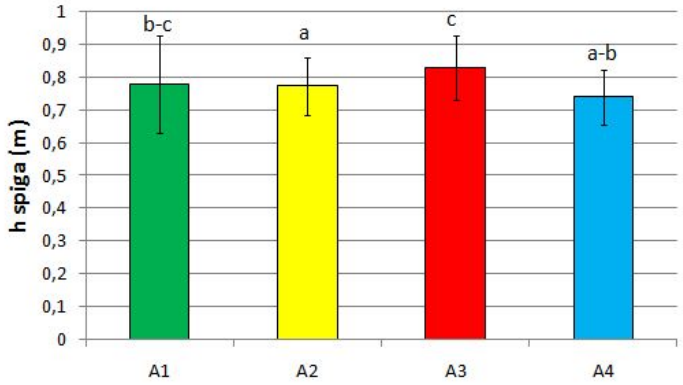


Fig. 4.11 L'altezza spiga è stata misurata, come evidenziato in fig. 4.9, in centimetri, dall'inserzione dell'attaccatura della prima spiga, partendo a contare dall'apice, fino al culmo. L'analisi statistica, effettuata con il test di Tuckey, ha evidenziato differenze significative tra gli ibridi/varietà. La barra sull'istogramma indica l'errore standard calcolato a partire dalla deviazione standard.

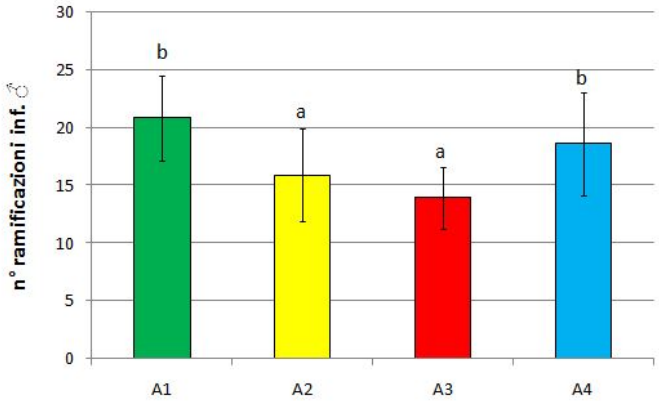


Fig. 4.12 Il numero di ramificazioni dell'infiorescenza maschile è stato ottenuto conteggiando le primarie e secondarie portanti le antere. L'analisi statistica, effettuata con il test di Tuckey ha evidenziato differenze significative tra gli ibridi/varietà (vedi allegati). La barra sull'istogramma indica l'errore standard calcolato a partire dalla deviazione standard.

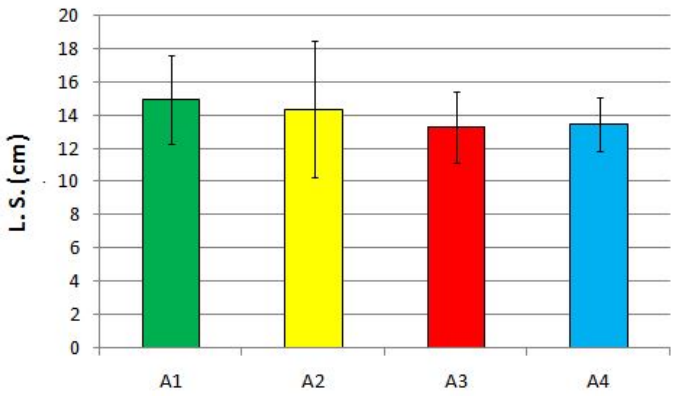


Fig. 4.13 La lunghezza spiga/raccolta (L.S.,cm) è stata misurata in centimetri sulle spighe ritenute rappresentative del codice. L'analisi statistica, effettuata con il test di Tuckey non ha evidenziato differenze significative tra gli ibridi/varietà (vedi allegati) per questo carattere. La barra sull'istogramma indica l'errore standard calcolato a partire dalla deviazione standard.

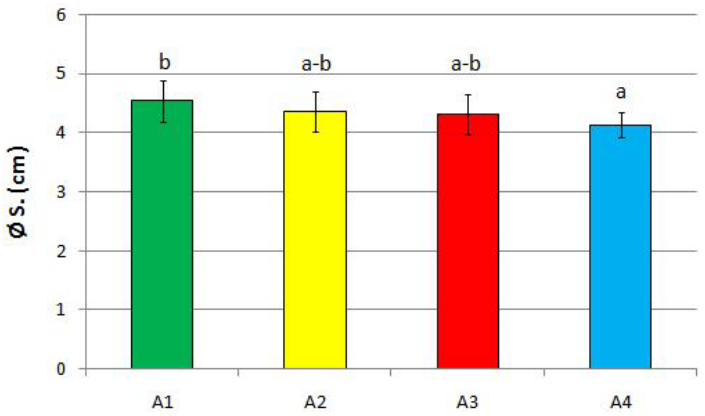


Fig. 4.14 Il diametro della spiga (Ø S., cm) è stato misurato in centimetri. L'analisi statistica, effettuata con il test di Tuckey ha evidenziato differenze significative tra gli ibridi/varietà (vedi allegati). La barra sull'istogramma indica l'errore standard calcolato a partire dalla deviazione standard.

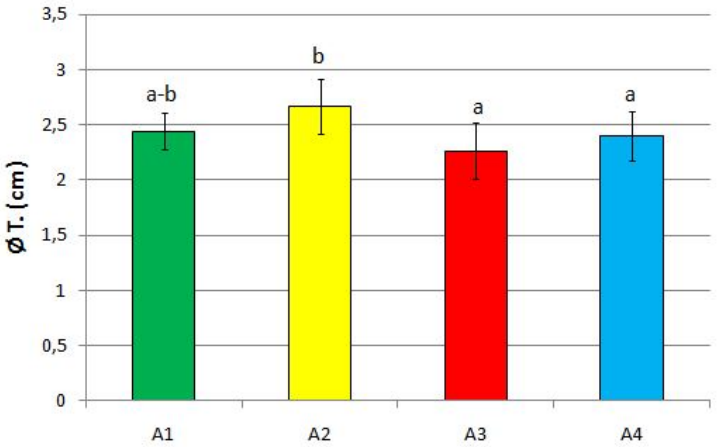


Fig. 4.15 il diametro tutolo (Ø T., cm) è stato misurato in centimetri. L'analisi statistica effettuata con il test di Tuckey ha evidenziato differenze significative tra gli ibridi/varietà (vedi allegati). La barra sull'istogramma indica l'errore standard calcolato a partire dalla deviazione standard.

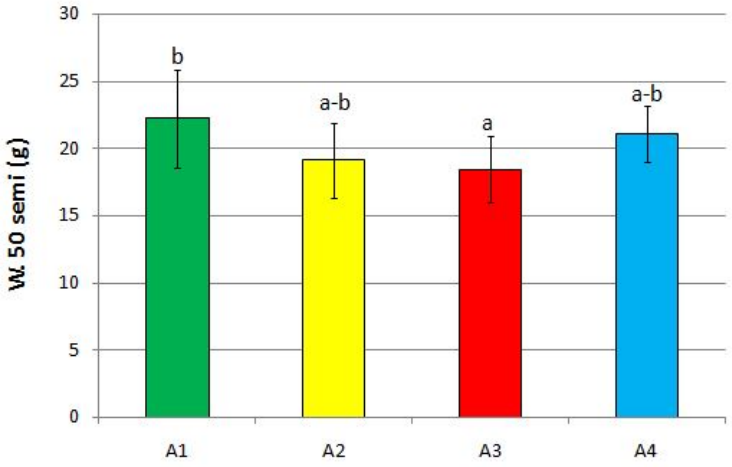


Fig. 4.16 Il peso di 50 semi è stato è stato misurato in grammi e le varietà/ibridi confrontati attraverso l'analisi statistica, effettuata con il test di Tuckey, che ha evidenziato differenze significative (vedi allegati). La barra sull'istogramma indica l'errore standard calcolato a partire dalla deviazione standard.

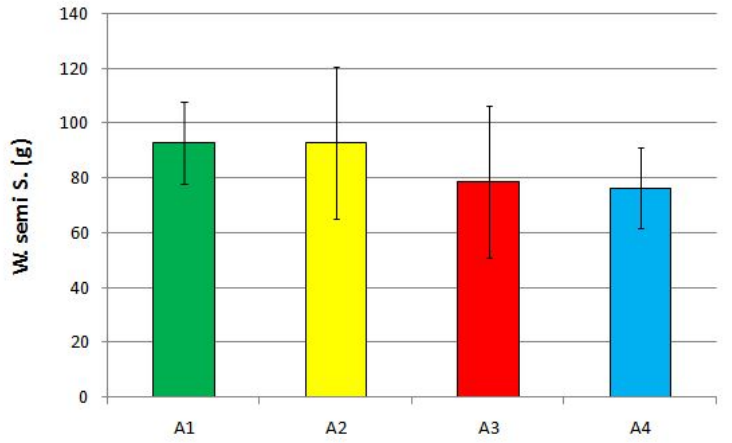


Fig. 4.17 Il peso dei semi della spiga è stato misurato in grammi e le varietà/ibridi confrontati attraverso l'analisi statistica, effettuata con il test di Tuckey, che non ha evidenziato differenze significative tra i codici (vedi allegati). La barra sull'istogramma indica l'errore standard calcolato a partire dalla deviazione standard.

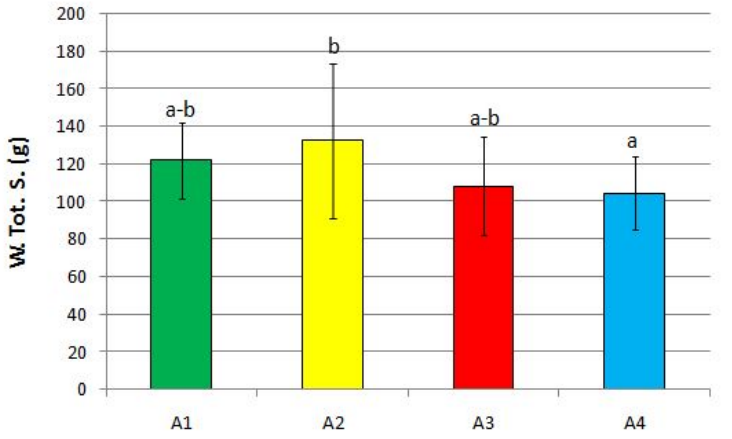


Fig. 4.18 Il peso totale della spiga è stato è stato misurato in grammi e le varietà/ibridi confrontati attraverso l'analisi statistica, effettuata con il test di Tuckey, hanno evidenziato differenze significative (vedi allegati). La barra sull'istogramma indica l'errore standard calcolato a partire dalla deviazione standard.

DISCUSSIONE

Ci sono almeno tre ragioni che rendono attuale occuparsi di sicurezza alimentare. Anzitutto la quantità di persone, che soffrono di fame e malnutrizione a livello mondiale, nonostante gli innegabili progressi verso il raggiungimento del *Millennium Development Goal 1C* (dimezzare entro il 2015 la percentuale di sottonutriti esistente nel 1990) (Fao, Ifad, Wfp, 2014), resta ancora a livelli inaccettabilmente elevati: a livello globale una persona su otto continua a soffrire la fame, un bambino in età *pre*-scolare ogni sette continua a essere sottopeso (UN, 2015) e, contemporaneamente, un bambino in età prescolare ogni tredici è sovrappeso oppure obeso (de Onis *et al*., 2010). Ancora più importanti sono le prospettive future. Se guardiamo all'evoluzione delle principali variabili che determinano domanda e offerta di beni alimentari a livello globale dinamica demografica, urbanizzazione, crescita del reddito, disponibilità di risorse produttive (terra e acqua), innovazioni tecnologiche e cambiamento delle rese e al loro impatto, si vede come da qui al 2050 sia necessario produrre circa il 70% in più di cibo rispetto a quanto mediamente prodotto nel 2005-07 (Alexandratos e Bruinsma, 2012) e, nel complesso, la transizione verso la saturazione dei consumi alimentari non sarà completata prima del 2070-2090. Ovviamente, questo vale nel complesso, mentre permane una notevole insicurezza in paesi/gruppi di popolazione poveri, che rischiano di rimanere imprigionati nella "trappola malthusiana" della povertà. In questo quadro, poi, ci sono notevoli rischi che aumentano l'insicurezza dei gruppi di popolazione più vulnerabili. Basta guardare a quanto accaduto negli ultimi anni, con l'incremento degli *shock* economici (volatilità dei prezzi e crisi finanziarie), ambientali (cambiamento climatico e disastri naturali), sociali e politici (conflitti, violenze), e alle cause che li hanno determinati, per comprendere come tale tendenza probabilmente continuerà anche nei prossimi decenni, mettendo sotto pressione le disponibilità alimentari, con un impatto notevole sulla sicurezza alimentare e nutrizionale dei soggetti più vulnerabili (Zseleczky e Yosef, 2014).

In questo contesto di insicurezza alimentare, che ancora permane, a livello globale la cooperazione allo sviluppo, quale parte integrante della politica estera del nostro Paese, fondata sull'esigenza solidaristica di garantire a tutti gli abitanti del pianeta la tutela della vita e della dignità umana ed è considerata come il metodo per instaurare, migliorare e consolidare le relazioni tra i diversi Paesi e le diverse comunità...,favorisce relazioni finalizzate ad una crescita economica, sociale ed umana, rispettosa dell'ambiente e delle diverse culture e che sappia tutelare i beni comuni come acqua, cibo ed energia, così da assicurare la crescita del benessere delle popolazioni e perseguire la pace tra i popoli (http://www.esteri.it).

Secondo la FAO (2010) il Sudafrica è soggetto ad un alto grado di erosione e perdita di fertilità dei suoli che influenza la produttività delle colture. Si stima che il 41% dei suoli coltivati sia gravemente degradato (Bai e Dent, 2007) e la siccità, che spesso si somma a questa problematica, sia spesso la causa di una completa perdita delle produzioni (FAO, 2009b)

Il mais essendo un'importante coltura alimentare di base in Africa, specialmente in Sudafrica che è il primo paese produttore (FAOSTAT, 2014), e grazie al suo profilo energetico, nutrizionale; ed essendo ampiamente seminato dagli agricoltori di piccola scala, per i quali è la principale fonte di sostentamento ordinario risulta essere la miglior coltura candidata per programmi di miglioramento genetico che hanno come obiettivo l'aumento della sicurezza alimentare (Zhu et al., 2007). Tradizionalmente il mais coltivato in Sudafrica a scopo alimentare è a cariosside bianca: sembrerebbe che la preferenza attuale, derivi dall'influenza che ebbe il mercato cerealicolo britannico a partire dal 1920 (Smale e Jayne, 2003). Il commercio favoriva il mais con consistenza più morbida (*soft dent-type*) perché era più facile lavorarlo e meno dannoso per i mulini (*roller mills*) (Smale e Jayne, 2003). Inoltre era usanza da parte dei coloni britannici usare razioni di mais come forma di pagamento per i minatori e per gli operai in aziende agricole e zootecniche (Smale e Jayne, 2003). Le persone quindi iniziarono a introdurre il mais bianco nell'alimentazione quotidiana e ciò era favorito anche dal fatto che richiedeva minori tempi di cottura e risultava avere un sapore e una consistenza che lo rendevano più appetibile. Conseguentemente l'utilizzo del mais bianco divenne uno *status simbol* corrispondente ad un elevato rango sociale a cui aspirare (Messer, 2002). Per concludere Saunders (1930) ci dice che il mais bianco era preferito per il consumo umano perché si credeva che il mais giallo fosse meno digeribile, in accordo con il maggior tempo di cottura richiesto.

Un consumo esclusivo di Pap, o polenta di mais bianco, spesso frequente tra le popolazioni più povere, è causa di malattie come la pellagra dovuta a carenze nutrizionali di amminoacidi essenziali (triptofano e lisina) e vitamine (Sebrell, 1981), e cecità infantile, per mancanza di carotenoidi nelle farine. La denutrizione e la deficienza di alcuni micronutrienti sono ancora un problema di rilevanza pubblica e nazionale in Sudafrica (Acham *et al*., 2012).

Ed è quindi per queste ragioni che l'impostazione del programma di miglioramento si è concentrato sui mais a cariosside bianca, e gli incroci che sono stati effettuati erano mirati al miglioramento delle varietà locali (*landraces*), utilizzando tecniche di *breeding* classiche.

E' necessaria "un'intensificazione sostenibile" dell'agricoltura (Mueller et al., 2012) che sia in grado di assicurare la sicurezza alimentare senza usurare i rimanenti ecosistemi naturali sulla terra (Palmgren et al., 2015). In questo contesto la riscoperta di genotipi locali (*landraces*), solitamente con numerosi caratteri d'interesse agronomico e nutrizionale, si sta rilevando una delle principali strategie soprattutto in agroecosistemi di piccola scala e a bassi *input*. L'erosione dell'agro biodiversità è una minaccia per la sicurezza alimentare mondiale nel lungo periodo (Newton et al., 2010).Gli obiettivi di processi di *breeding* a lungo termine dovrebbero, quindi, basarsi sull'utilizzo dei geni presenti nelle *landraces*, che permettono di aumentare la produttività in ambienti molto variabili, quindi potenzialmente sottoposte a differenti stress, e concentrarsi sull'adattamento e la conservazione della diversità genetica (Newton et al., 2010).

E' proprio per questo che in primavera/estate del 2016 nell'Azienda agricola "Angelo Menozzi" dell'università degli studi di Milano a Landriano (PV), e in controstagione durante l'estate Sudafricana, da novembre 2016 a marzo 2017, presso il VUT Southern Gauteng Science & Technology Park in Sebokeng sono stati creati due campi sperimentali per il miglioramento genetico di *landraces* sudafricane di mais per caratteri agronomici e nutrizionali (vedi fig. 3.1)

In Italia è stato effettuato il test di complementazione; tra il portatore della mutazione y_1/y_1 controlla tutto il testo della via biosintetica dei carotenoidi, ottenuto dal Maize Stock Centre (USA), responsabile del fenotipo "cariosside bianca", le varietà italiane Bianco Perla, Bianco Vitreo e sei *landraces* sudafricane; che ha confermato che i genotipi considerati nell'analisi sono portatori della medesima mutazione y_1 nel genoma che blocca la via biosintetica dei carotenoidi (vedi tab. 4.3). La ricerca era volta principalmente a comprendere se in tutte le varietà bianche analizzate la mutazione fosse quella ipotizzata e successivamente nell'impostazione di un piano di *breeding* classico volto alla biofortificazione delle *landraces* bianche sudafricane.

Possiamo desumere dai dati ottenuti che y_1 potrebbe essere l'unica mutazione che non conferisce effetti pleiotropici negativi (citati nel capitolo 2.3.3.4.1.2.) essendo presente in tutte le *landraces* analizzate in questo studio attraverso il test di complementazione. E' noto che anche le altre mutazioni y_s possano conferire il fenotipo bianco/ "giallo pallido", ma evidentemente la selezione per un utilizzo nella diretta alimentazione umana ha portato all'affermazione di *y*1 in tutte le varietà bianche.

Sempre a Landriano è stato inoltre ottenuto l'ibrido tra la varietà spagnola *Millo Corvo* (codice: R4946) e la *landrace* sudafricana "Africa Bianco" (codice: R4865); e tra la stessa *landrace* e l'ibrido B73/Mo17xR4865 (fig. 4.6).

Dal campo sperimentale in Sudafrica sono stati ottenuti dati agronomici sulla generazione F2 auto incrociata degli ibridi, precedentemente realizzati, *Millo Corvo*xR4865 (codice A4) e B73/Mo17xR4865 (codice A3), e sul materiale ottenuto dal primo ciclo di auto e sib-pool della varietà *Millo Corvo* e del codice R4865, "Africa Bianco" (vedi Fig. 4.6). Dall'analisi statistica dei dati raccolti si è potuti giungere alla conclusione che solo per i caratteri "L.S." (lunghezza spiga) e "W. Semi S." (peso dei semi della spiga), non sono state evidenziate differenze significative tra i codici (vedi fig. 4.13 e 4.17).

Per i restanti caratteri analizzati (altezza pianta**,** altezza spiga**,** numero ramificazioni infiorescenza, lunghezza spiga, diametro spiga, peso totale spiga, peso 50 semi/raccolta**,** diametro tutolo/raccolta) sono state evidenziate differenze significative tra gli ibridi/varietà. L'ibrido B73/Mo17 ha una buona attitudine combinatoria, cioè quando incrociato con altre linee è in grado di garantire delle buone *performances*, relativamente ai caratteri agronomici. Infatti l'ibrido a tre vie ottenuto incrociando quest'ultimo con la *landrace* "Africa Bianco" (codice: R4865) ha mostrato maggior

vigore, in particolare in termini dell'altezza pianta, altezza spiga e del numero di piante giunte a fine ciclo (vedi fig. 4.10 e 4.11).

Mentre, per quanto riguarda la produzione, la media delle rese evidenzia come le *landraces* (Millo Corvo e Bianco Africa) abbiano performato meglio rispetto agli ibridi (vedi fig. 4.18). Da notare però che alcuni degli ibridi hanno dato ottime produzioni mostrando quindi proprietà emergenti rispetto ai parentali. Bisognerà concentrarsi su questi individui per ottenere il nuovo materiale di propagazione al fine di proseguire il programma di miglioramento. Per spiegare le migliori performace delle varietà rispetto agli ibridi, per le caratteristiche precedentemente citate, la causa è probabilmente da ricercare nella migliore adattabilità delle *landraces* a condizioni pedoclimatiche variabili (Frankel et al., 1995). Infatti l'ibrido B73/Mo17 è stato selezionato per essere coltivato alle latitudini italiane (tra 42° e 46°) e la differente durata del giorno e della notte, unita alla differente intensità luminosa, sono tra le principali cause delle ridotte performance degli incroci con questa linea.

La ridotta produttività può essere associata inoltre, osservando i dati, con il numero di ramificazioni dell'infiorescenza maschile (vedi fig. 4.12). Un numero ridotto di ramificazioni significa meno antere totali portate, quindi minor polline disponibile per la fecondazione (Cassani et. al., 2006)

Chiaramente questo lavoro di miglioramento genetico è da considerarsi primo step di un programma dove, direttamente in Sudafrica, saranno sviluppati ulteriori campi sperimentali e avviati nuovi processi di selezione, con l'obiettivo d'incrementare le performance delle varietà in relazione alle caratteristiche agronomiche e nutrizionali. Questa tipologia di miglioramento e selezione è stata ben esplicitata e descritta, nelle sue fasi principali, da Ceccarelli, 2016.

I risultati di questo lavoro di tesi, quindi, confermano l'importanza dell'utilizzo dei genotipi locali in programmi di biofortificazione, come proposto da Newton et al., 2010.

Infine visto che, come detto precedentemente, l'insicurezza alimentare, spesso, non è strettamente associata alla mancanza di cibo, ma relazionata con carenze di nutrienti essenziali per la salute o per la difficoltà nell'accesso alle fonti di produzione del cibo. Nello specifico una dieta a base di mais bianco, che rappresenta la principale fonte di calorie nella dieta sudafricana, (Dowswell et al., 1996; Nuss and Tanumihardjo, 2011)soprattutto nelle popolazioni più povere, è causa di malattie come la pellagra, anemia e VAD (*Vitamins A deficience*), oltre che ridotta resistenza alle infezioni aumentando i rischi di morte (Gannon *et al*., 2014).

La quantificazione dei carotenoidi ha mostrato, come previsto dall'analisi visiva con il test di complementazione, che tutte le varietà e le *landraces* con fenotipo cariosside bianca, hanno un basso contenuto di carotenoidi (vedi tab. 4.4). Collaborando con il ministero dell'agricoltura e della pesca sudafricano sarà possibile, con un'opportuna campagna di sensibilizzazione, iniziare a diffondere l'informazione (sulla base delle analisi quantificative svolte), che per l'alimentazione umana il mais giallo è preferibile, in termini di contenuto di carotenoidi e quindi di apporto di vitamina A, al mais bianco.

Lo sviluppo di nuove OPV (*open pollination varieties)*, migliorate per caratteri agronomici e nutrizionali, come espresso anche dai funzionari del Ministero dell'Agricoltura e della Pesca sudafricani, sarà di notevole utilità nell'accelerare e consentire l'eradicazione permanente di una povertà ancora diffusa che si traduce spesso in malnutrizione e deficienza di alcuni micronutrienti (Acham *et al*., 2012), in un paese considerato dalle stime economiche internazionali del "primo mondo". Queste carenze, causa d'insicurezza alimentare, sono considerate dal Sudafrica un problema di rilevanza pubblica e nazionale (Acham *et al*., 2012), e prioritaria è l'identificazione di strategie di biofortificazione efficaci, anche collaborando con enti esteri, volte alla loro risoluzione.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

Acham H, Egal AA, Oldewage-Theron WH (2012) Household Asset Index and Total Iron Intake, but not education, best predict iron status in a black population sample in Gauteng, South Africa. Sci. Res. Essays, 7(9), 1035-1050.

Adom KK, Liu RH, (2002) Antioxidant activity of grains. J Agr Food Chem, 50 (21), 6182-6187.

Ahmed SS, Lott MN, Marcus DM (2005) The macular xanthophylls. SurvOpthalmol 50: 183-193Am J Cardiol 101: 50–57

Alexandratos N, Bruinsma J (2012) World Agriculture Towards 2030/2050: The 2012 Revision. EsaWorkingPaper No. 12-03, Fao, Rome.

Angelini R, Lorenzoni C, Verderio A, Vecchiettini M (2007) Il mais, Edizione Script.

Ara´ujo PM and Nass LL (2002) Characterization and evaluation of maize landraces. Scientia Agricola. 59:589–593.

Armstrong GA (1994) Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. J Bacteriol. Aug; 176 (16): 4795–4802.

Badone FC, Cassani E, Landoni M, Doria E, Panzeri D, Lago C, Mesiti F, Nielsen E, Pilu R (2010) The low phytic acid1-241 (lpa1-241) maize mutation alters the accumulation of anthocyanin pigment in the kernel. Planta, 231(5), 1189-1199.

Bai ZG, Dent DL (2007) Land degradation and improvement in South Africa, 1. Identification by remote sensing. Report 2007/03, ISRIC- World Soil Information, Wageningen.

Baloyi RT, Belete A, Hlongwane JJ, Masuku MB (2012) Thechnical efficiency in maize producion by small-scale farmers in Ga-Mothiba of Limpopo province, South Africa. African Journal of Agricoltural Research 7 (40), 5478-5482.

Barbara Spence (2016) What is food security?. Quest science for South Africa 12 (2), 3-4.

Baresel JP, Reents HJ, Zimmermann G (2005) Field evaluation criteria for nitrogen uptake and nitrogen use efficiency, Proceedings of the Workshopon Organic Breeding Strategies and the Use of Molecular Markers Driebergen, The Netherlands, 17–19 January 2005, organised by COST 860 SUSVAR Working Group 1 and ECO-PB; in collaboration with COST 851, Working Group 3.

Borowitzka MA (1988) Vitamins and fine chemicals from micro-algae, in Micro-algal Biotechnology ed. by Borowitzka MA and Borowitzka LJ. Cambridge University Press. Cambridge, pp. 153–196

Bouis HE, Welch RM (2010) Biofortification—A Sustainable Agricultural Strategy for Reducing Micronutrient Malnutrition in the Global South Crop Science 50:1, 20-32 doi:10.2135/cropsci2009.09.0531.

Brandolini A and Brandolini A (2009). Maize introduction, evolution and diffusion in Italy. Maydica 54: 233–242

Brenna OV and Berardo N (2004) Application of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to the evaluation of carotenoids content in maize. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 5577–5582

Buckner B, Miguel DS, Janick-Buckner D, Bennetzen JL (1996) The Y1 gene of maize codes for phytoene synthase. Genetics 143: 479-488

Caballero-Briones F, Iribarren A, Peña J, Castro-Rodríguez R, Oliva AI (2000) Recent advances on the understanding of the nixtamalization process. Superficies y Vacío 10, 20-24.

Cakmak I (2008) Enrichment of cereal grains with zinc:Agronomic or genetic biofortification? Plant Soil. 302:1–17.

Camacho Villa TC, Maxted N, Scholten MA, Ford-Lloyd BV (2005) Defining and identifying crop landraces, Plant Genet. Res. 3, 373– 384.

Cantaluppi E, Manzi S, Egal AA, Puglisi D, Cassani E, Toschi I, Cesari VT, Landoni M, Scapin A, Pilu R (2017) Nutritional and phenotypical characterization of two South African maize (Zea mays L) varieties sampled in the Qwa-Qwa region. Maydica 62.

Cassani E, Landoni M, Pilu R (2006) Characterization of the Ra1 maize gene involved in inflorescence architecture. Sex Plant Reprod (2006) 19: 145–150 DOI 10.1007/s00497-006-0031-7

Ceccarelli S (2016) Diffusione ed evoluzione di popolazioni e miscugli di cereali in Italia. La biodiversità torna nei campi. Notiziario rete semi rurali #14, 5-9.

Chandler VL, Radicella JP, Robbins Chen JC, Turks D (1989) Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of B utilizing R genomic sequences. Plant Cell 1:1175–1183.

Crispin A, Howitt CA, Barry J, Pogson BJ (2006) Carotenoid accumulation and function in seed and non-green tissues. Plant Cell Environ. 29 (3):435-45.

Da Silva Messias R, Galli V, Delmar Dos Anjos E Silva S, Artigas Schirmer M, Valmor Rombaldi C (2015). Micronutrient and Functional Compounds Biofortification of Maize Grains, Critical Reviews in Food Science and Nutrition 55: 1, 123-139

Davies W, Kudoyarova G, Hartung W (2005) Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plants response to drought. J. Plant Growth Regul 24: 285–295

De Almeida Rios S, Paes MCS, Cardoso WS, Borem A and Teixeira FF (2014) Color of corn grains and carotenoid profile of importance for human health. American journal of plant sciences 5: 857-862

De Oliveira GPR and Rodriguez-Amaya DB (2007) Processed and prepared corn products as sources of lutein and zeaxanthin: Compositional variation in the food chain. J. Food Sci 72: 79–85

De Onis M, Blössner M, Borghi E (2010) Global Prevalence and Trends of Overweight and Obesity Among Preschool Children, American Journal of Clinical Nutrition 92 (5): 1257-64.

Dhillon BS, Dua RP, Brahmi P, BishtI S (2004) Onfarm conservation of plant genetic resources for food and agriculture, Curr. Sci. 87, 557–559.

Doria E, Daoudou B, Egal AK, Oldewage-Theron WH, Pilu R (2015) Preliminary analysis and biochemical characterization related to health implications for African populations in some maize cultivars. A special look at the South African environment. J Food SciNutr, 1(005). [Ref seems rather strange, please check. Are the Volume, page nos correct amd complete?].

Doria E, Galleschi L, Calucci L, Pinzino C, Pilu R, Cassani E and Nielsen E (2009). Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: Evidente from a maize (Zea mays L.) low phytic acid mutant. J.Exp.Bot. 60: 967–978.

Dufosse L, Galaup P, Yaron A, Malis Arad S, Blanc P, Murthy KNC, et al (2005) Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? Trends Food SciTechnol 16: 389–406.

DWAF (Department of Water Affairs and Forestry) (2002) 1st Edn. National water resource strategy: report. Pretoria, South Africa.

Esteban R, Martinez B, Fernandez-Marin B, Becerril JS and Garcia-Plazaola I (2009) Carotenoid composition in Rhodophyta: Insights into xanthophyll regulation in Corallina elongata. Eur J Phycol 44: 221–230.

FAO (1998) The State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 510 p.

FAO (2002) FAOSTAT: FAO Statistical Databases. Online at http://apps.fao.org. November 2001.

FAO (2009a) Global Agricolture Towards 2050. FAO, Rome.

FAO (2009b) Scaling conservation agricolture in Africa: strategy and approches.

FAO (2010) The status of conservation agricolture in Southern Africa: challenges and opportunities for expansion. REOSA Technical Brief 3.

FAO (2012) Committee on World Food Security.

FAO (2012) FAOSTAT, FoodSupply.Cited October 10, 2013. http://faostat.fao.org/site/345/default.aspx.

FAO (2012) FAOSTAT, Production.Cited February 12, 2014. http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID =567#ancor.

Fao, Ifad, Wfp (2014) The State of Food Insecurity in the World 2014, Fao-Ifad-Wfp, Rome.

FAOSTAT: FAO Statistical Databases. Online at http://apps.fao.org.

Frankel OH, Brown AHD, Burdon JJ (1995) The conservation of plant diversity, Cambridge: Cambridge University Press.

Frossard E, Bucher M, Machler F, Mozafar A and Hurrell F (2000). Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. J. Sci. Food Agr. 80:861–879.

Fukamachi K, Imada T, Ohshima Y, Xu J, Tsuda H (2008) Purple corn color suppresses Ras protein level and inhibits 7,12dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in the rat. Cancer Sci 99:1841–1846

Gallagher CE, Matthews PD, Faqiang L and Wurtzel ET (2004). Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. Plant Physiol135: 1776–1783

Gannon B, Kaliwile C, Arscott SA, Schmaelzle S, Chileshe J, Kalungwana N, MosondaM, PixleyK, Masi C, Tanumihardjo SA (2014) Biofortified orange maize is efficacious as a vitamin A supplement in Zambian children even in the presence of high liver reserves of vitamin A: a community-based, randomized placebo-controlled trial. Am J ClinNutr100 (6), 1541-1550.

Glahn RP and Wortley GM (2002). Inhibition of iron uptake by phytic acid, tannic acid, and Zn Cl2: Studies using an in vitro digestion/Caco-2cell model. J. Agr. Food Chem. 50:390–395.

Godfray HCJ, Beddington JR, CruteIr, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C (2010) Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. Review Science 327, 812-818.

Gouse M, Piesse J, Thirtle C, 2006. Output and labour effects of GM maize and minimum tillage in a communal area of KwaZulu Natal. J Dev Perspect, 2(2), 192-207.

Gregorio GB (2002). Progress in breeding for trace minerals in staple crops. Symposium: Plant breeding: A new tool for fighting micronutrient malnutrition. Am. Soc. Nutr. Sci. 132:500S–502S.

Guerin M, Huntley ME, Olaizola M (2003). Haemato coccus astaxanthin: Applications for human health and nutrition. Trends Biotech 21: 210–216.

Haleem MA, Barton KL, Borges G, Crozier A, Anderson AS (2008). Increasing antioxidant intake from fruits and vegetables: Practical strategies for the Scottish population. J. Hum. Nutr. Diet. 21:539–546.

Hallauer AR, Russell WA, Lamkey KR (1988). Corn breeding. In: Sprague G.F. and Dudley J.W. (eds), Corn and Corn Improvement. Am. Soc. Agron., Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 463–564.

Hänsch R and Mendel RR (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). Curr. Opin. Plant. Biol. 12:259–266.

Harjes C, Rocheford TR, Bai L, Brutnell TP, KandianisCB, Sowinski SG, Stapleton AE, Vallabhaneni R, Williams M, Wurtzel ET, Yan J and Buckler ES (2008). Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. Science 319: 330–333.

Hawrylak-Nowak B (2008). Enhanced selenium content in sweet basil (OcimumBasilicum L.) by foliar fertilization. Veg. Crops. Res. Bull. 69:63–72.

Heinrich U, Gartner C, Wiebusch M, Eichler O, Sies H, Tronnier H, Stahl W (2003). Supplementation with beta-carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. J. Nutr. 133: 98–10

http/www.harvestplus.org/

IWMI (International Water Menagement Institute) (1996) World water demand and supply, 1990 to 2025: Scenarios and Issues. Research Report 19.

Jackson H, Braun CL and Ernst H (2008). The chemistry of novel xanthophyll carotenoids. Am J Cardiol 101: 50–57

Khush G, Lee S, Cho JI, Jeon JS. 2012. Biofortification of crops for reducing malnutrition. Plant Biotechnol Rep 6:195–202

Kirk JTO and Tinley-Bassett RAE (1978) Proplastids, etioplasts, amyloplasts, chromoplasts and other plastids in: The Plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance, eds Kirk JTO and Tinley-Bassett RAE (Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press), pp. 217–239

Lago C, Landoni M, Cassani E, Cantaluppi E, Doria E, Nielsen E, Giorgi A, Pilu R (2015) Study and characterization of an ancient European flint white maize rich in anthocyanins: Millo Corvo from Galicia. PloS one, 10(5): e0126521. doi:10.1371/journal.pone.0126521.

Laing DR, Jones PG, Davis JHC In: Goldsworthy PR, Fisher NM (Eds.) (1984) The Physiology of Tropical Crops. Wiley, New York 305-351.

Leenhardt F, Levrat-Verny MA, Chanliaud E and Remesy C (2005). Moderate decrease of pH by sourdough fermentation is sufficient to reduce phytatecontentof whole wheat flourthroughendogenousphytaseactivity. J. Agr. Food Chem. 53:98–102.

Li F, Vallabhaneni R, Yu J, Rocheford T and Wurtzel ET (2008). The maize phytoene synthase gene family: Overlapping roles forcarotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. Plant Physiol 147: 1334–1346

Lopez HW, Duclos V, Coudray C, Krespine V, Feillet-Coudray C, Messager A, Demigne C and Remesy C (2003). Making bread with sourdoughimprovesmineralbioavailabilityfromreconstitutedwholewheatflour in rats. Nutrition. 19:524–530.

Low AH (1990) 'N perspektief op die aanbod van voedsel in Suid-Afrika met spesialeverwysingnavoedselsekerheid. Unpublished M.Sc. (Agric) dissertation, University of Pretoria.

Mabhaudhi T, Modi AT, Belestse YG (2013) Rowth phenological and yield responses of bambara groundnut (Vignasubterranea L. Verdc) landraces to imposed water stress: 11. Rain shelter condition. Water SA 39 (2), 191-198.

Mafra AGFD (2005).Zincandcancer:Areview.Revistasaude 1:144–156.

Messer E (2002) methods for determinants of food intake. Research Methods in Nutritional Anthropology (May), 1-10.

Mueller ND, Gerber JS, Johnston M, Ray DK, Ramankutty N and Foley JA (2012) Closing yield gaps through nutrient and water management. Nature 490, 254-257.

Nazia N, Li L, Shan L,Nay CK, Barry JP (2015) Carotenoid Metabolism in Plants. Elsevier 8(1): 68–82.

Ndolo VU, Beta T, 2014. Comparative studies on composition and distribution of phenolic acids in cereal grain botanical fractions. Cereal Chem, 91(5), 522-530.

Neuffer MG, Coe EH, Wessler SR (1997) Mutants of Maize. Cold Spring Harbor Laboratory press.

Newell-Mcgloughlin, M. (2008). Nutritionally improved agricultural crops. Plant Physiol. 147:939–953.

Newton AC, Akar T, Baresel JP, Bebeli PJ, Bettencourt E,Bladenopoulos KV, Czembor JH, Fasoula DA, Katsiotis A, Koutis K, Koutsika-Sotiriou M, Kovacs G, Larsson H, PinheirodeCarvalho MAA, Rubiales D, Russel J, Dos Santos TMM, VazPatto MC (2010). Cereal landraces for susteinable agriculture. A review Agron. Substain. Dev. 30: 237-269.

Nkanyiso JS, Lembe SM, Paramu LM (2016) Conservation agricolture and its impact on soil quality and maize yield: A South African perspective. Elsevier BV, Soil e Tillage Research.

Nuss ET, Tanumihardjo SA, 2011. Quality protein maize for Africa: closing the protein inadequacy gap in vulnerable populations. Adv. Nutr., 2(3), 217-224.

O'Dell BL, De Boland AR, Koirtyohann SR, 1972. Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. J Agric Food Chem, 20(3), 718-723.

Oelofse A, Van Raaij JM, Benadé AJ, Dhansay MA, Tolboom JJ, Hautvast JG, 2002. Disadvantaged black and coloured infants in two urban communities in the Western Cape, South Africa differ in micronutrient status. Public Health Nutr, 5(2), 289-294.

Oldewage-Theron WH, Dicks EG, Napier CE, Rutengwe R, 2005. Situation analysis of an informal settlement in the Vaal Triangle. Dev. South. Afr., 22(1), 13-26.

Palmgren MG, Edenbrandt AK, Vedel SE, Andersen MM, Landes X, Osterberg JT, Falhof J, Olsen LI, Christensen AB, Sandoe P, Gamborg C, Kappel K, Thorsen BJ and Pagh P (2015) Are we ready for back-to-nature crop breeding?. Plant Science 20 (3).

PanzeriD, Cesari V, Toschi I, Pilu R (2011) Seed calorific value in different maize genotypes. Energy Sourc. Part ARecov. Utiliz. Environ. Eff. 33:1700-1705.

Pardey PG, Beintema NM (2001) Slow magic: agricolturalReD a century after Mendel. Food Policy Report, International Food Policy Research Institute, Washington DC.

Peter GJ, Philip KT (2003) The potencial impacts of climate change on maize producion in Africa and Latin America in 2055. Elsevier Science Ltd.

Petroni K, Pilu R, Tonelli C (2014). Anthocyanins in corn: a wealth of genes for human health. Planta 240: 901-911

Pilu R, Piazza P, Petroni K, Ronchi A, Martin C, Tonelli C (2003) plbol3, a complex allele of the anthocyanin regulatory pl1 locus that arose in a naturally occurring maize population. Plant J 36:510–521.

Plaza M, Herrero M, Cifuentes A and Ibanez E, (2009). Innovative natural functional ingredients from microalgae. J Agric Food Chem 57: 7159–7170

Procissi A, Dolfini S, Ronchi A, Tonelli C (1997) Light-dependent spatial and temporal expression of pigment regulatory genes in developing maize seeds. Plant Cell 9:1547–1557.

Raboy V, 1990. Biochemistry and genetics of phytic acid synthesis. Plant Biology (USA). [Incomplete ref.?]

Raboy V, 2002. Progress in breeding low phytate crops. J Nutr, 132(3), 503S-505S.

Randolph LF and Hand DB (1940). Relation between carotenoid content and number of genes per cell in diploid and tetraploid corn. J. Of agric. Res. 60: 51-64

Ranum P, Peña-Rosas JP, Garcia-Casal N (2014) Global maize production, utilization and consumption. Ann. N.Y.Acad. Sci. 1312, 105-112.

Raut N, Sitaula BK and Bajracharya RM (2010). Agricultural intensification: Linking with livelihood improvement and environmental degradation in mid-hills of Nepal. J. Agr. Envir. 11:83–94.

Relea P, Revilla M, Ripoll E, Arribas I, Villa LF and Rico H (1995). Zinc, biochemical markers of nutrition, and type I osteoporosis. Age Ageing. 24:303–307.

Reutlinger S and Selowsky M (1976) Malnutrition and poverty: Magnitude and Police Options. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Ritchie JT, Singh U, Godwin DC, Bowen WT In: Tsuji GY, Hoogenboom G, Thornton PK (Eds.) (1998) Understanding Options for Agricoltural Production. Kuwer, Dordrecht 79-98.

Ruzicka L (1953) The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compunds. Experentia 10:357-67.

Samuel FO, Egal AA, Oldewage-Theron WH, Napier CE, Venter CS, 2010. Prevalence of zinc deficiency among primary school children in a poor peri-urban informal settlement in South Africa. Health SA Gesondheid (Online), 15(1), 1-6.

Sasaki T and Burr B (2000). International rice genome sequencing project: The effort to completely sequence the rice genome. Cur. Opin. Plant Biol. 3:138–142.

Saunders AR (1930) Maize in South Africa. Central News Agency Cape Town.

Scalbert A, Williamson, G, 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J Nutr, 130(8), 2073S-2085S.

Sebrell (1981) History of pellagra. Federation proceedings 40 1520-1522.

Serpen A, Capuano E, Fogliano V and Gokmen V (2007). A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. J.Agr.Food Chem. 55:7676–7681.

Sharma A and Chauhan RS (2008). Identification of candidate gene-based markers (SNPs and SSRs) in the zinc and iron transporter sequences of maize (Zea mays L.). Curr. Sci. 95:1051–1059.

Sharma M, Chai C, Morohashi K, Grotewold E, Snook ME, Chopra S (2012) Expression of flavonoid 30-hydroxylase is controlled by P1, the regulator of 3-deoxyflavonoid biosynthesis in maize. BMC Plant Biol 12:

Simic D, Sudara R, Ledencana T, Jambrovica A, Zdunica Z, Brkica I and Kovacevicb V (2009). Genetic variation of bioavailable iron and zinc in grain of a maize population. J. Cereal Sci. 50:392–397.

Smale M, Jayne T (2003) Maize in Eastern and Southern Africa: seeds of success in retrospect. EPTD Discussion Paper (97), 1-79.

Takaiche S and Mochimaru M (2007). Carotenoids and carotenogenesis in

Tessari V (2012) Lo sviluppo economico dell'Africa Sub-sahariana. http://hdl.handle.net/10579/1870

Thierfelder C, Rusinamhodzi L, Ngwira AR, Mupangwa W, Nyagumbo I, Kassie GT, Cairns JE (2014) Conservation agricolture in Southern Africa: advances in knowledge. Renew. Agric. Food Syst. 30, 328-348.

Toufektsian MC, de Lorgeril M, Nagy N, Salen P, Donati MB, Giordano L et al (2008) Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. J Nutr 138:747–752

Toufektsian MC, Salen P, Laporte F, Tonelli C, de Lorgeril M (2011) Dietary flavonoids increase plasma very long-chain (n-3) fatty acids in rats. J Nutr 141:37–41

Tsuda T (2012) Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. Mol. Nutr. Food Res. 56:159-170.

UN (2015) The Millennium Development Goals Report 2014, United Nations, New York.

United Nations (2009) World population prospects: the 2008 revision, New York.

UNSCN (2004) Nutrition for improved development outcomes. 5th report on the world nutrition situation. United Nation's System Standing Committee on nutrition. Geneva, Switzerland.

USDA (2016) https://www.usda.gov/

Vallabhaneni R, Gallagher CE, Licciardello N, Cuttriss AJ, Quinlan RF, Eleanore T Wurtzel (2009). Metabolite sorting of a germplasm collection reveals the hydroxylase locus asa new target for maize provitamin A biofortification. Plant Physiol 151: 1635–1645

Vilchez C, Forjan E, Cuaresma M, Bedmar F, Garbayo I and Vega JM, (2011). Marine carotenoids: Biological functions and commercial applications. Mar Drugs 9: 319–333

WaFS (2012) http://www.waterandfoodsecurity.org/

WEMA (2016) MAIZE INFORMATION GUIDE, Compiled by ARC-Grain Crop Institute.

West CE, Eilander A, van Lieshout M (2002) Consequences of revised estimates of carotenoid bioefficacy for dietary control of vitamin A deficiency in developing countries. J Nutr 132: 2920S–2926S

WHO—World Health Organization. (2000). Nutrition for health and development. In: Turning the Tide of Malnutrition: Responding to the Challenge of the 21st Century. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Williams GM, Williams CL, Weisburger JH (1999). Diet and cancer prevention: The fiber first diet. Toxicol. Sci. 52: 72–86

Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. CurrOpin Plant Biol 5:218–223.

www. acutis.it

Zeven AC (1998) Landraces: a review of definitions and classifications, Euphytica 104, 127–139.

Zhu C, Naqvi S, Gomez-Galera S, Pelacho AM, Capell, T and Christou P (2007). Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants. Trends Plant Sci. 12:548–555.

Zseleczky L, Yosef S (2014) “Are shocks really increasing? A selective review of the global frequency, severity, scope, and impact of five types of shocks”, in Fan S., Pandya-Lorch R., Yosef S. (eds.) Resilience for Food and Nutrition Security, Ifpri, Washington, DC: 9-17.

ALLEGATI

numero ramificazioni infiorescenza maschile

Test di effetti tra soggetti

Variabile dipendente: N° RAMIFICAZIONI INF.S

Origine	Somma dei quadrati di tipo III	gl	Media quadratica	F	Sign.
Modello corretto	824,033[a]	3	274,678	19,111	,000
Intercettazione	36122,700	1	36122,700	2513,235	,000
COD.VARIETAIBRIDI	824,033	3	274,678	19,111	,000
Errore	1667,267	116	14,373		
Totale	38614,000	120			
Totale corretto	2491,300	119			

a. R-quadrato = ,331 (R-quadrato adattato = ,313)

N° RAMIFICAZIONI INF.S

HSD di Tukey[a,b]

COD. VARIETA'/IBRIDI	N	Sottoinsieme 1	Sottoinsieme 2
(A3) B73 x Af.B.	30	13,967	
(A2) Mi. Co.	30	15,933	
(A4) Mi.Co. x Af.B.	30		18,633
(A1) Af.B.	30		20,867
Sign.		,191	,108

Vengono visualizzate le medie per i gruppi nei sottoinsiemi omogenei.

In base alle medie osservate.

Il termine di errore è media quadratica(errore) = 14,373.

a. Utilizza dimensione del campione della media armonica = 30,000.

b. Alfa = 0,05.

diametro spiga/raccolta

Test di effetti tra soggetti

Variabile dipendente: Ø S. (cm)

Origine	Somma dei quadrati di tipo III	gl	Media quadratica	F	Sign.
Modello corretto	1,272[a]	3	,424	4,351	,008
Intercettazione	1131,786	1	1131,786	11614,782	,000
COD.VARIETAIBRIDI	1,272	3	,424	4,351	,008
Errore	5,457	56	,097		
Totale	1138,514	60			
Totale corretto	6,729	59			

a. R-quadrato = ,189 (R-quadrato adattato = ,146)

Ø S. (cm)

HSD di Tukey[a,b]

COD. VARIETA'/IBRIDI	N	Sottoinsieme 1	Sottoinsieme 2
(A4) Mi.Co. x Af.B.	15	4,1327	
(A3) B73 x Af.B.	15	4,3080	4,3080
(A2) Mi. Co.	15	4,3967	4,3967
(A1) Af.B.	15		4,5333
Sign.		,103	,209

Vengono visualizzate le medie per i gruppi nei sottoinsiemi omogenei.

In base alle medie osservate.

Il termine di errore è media quadratica(errore) = ,097.

a. Utilizza dimensione del campione della media armonica = 15,000.

b. Alfa = 0,05.

lunghezza spiga/raccolta

Test di effetti tra soggetti

Variabile dipendente: L.S (cm)

Origine	Somma dei quadrati di tipo III	gl	Media quadratica	F	Sign.
Modello corretto	27,625[a]	3	9,208	1,183	,325
Intercettazione	11772,603	1	11772,603	1512,342	,000
COD.VARIETAIBRIDI	27,625	3	9,208	1,183	,325
Errore	435,924	56	7,784		
Totale	12236,153	60			
Totale corretto	463,549	59			

a. R-quadrato = ,060 (R-quadrato adattato = ,009)

L.S (cm)

HSD di Tukey[a,b]

COD. VARIETA'/IBRIDI	N	Sottoinsieme 1
(A3) B73 x Af.B.	15	13,2867
(A4) Mi.Co. x Af.B.	15	13,4400
(A2) Mi. Co.	15	14,3600
(A1) Af.B.	15	14,9433
Sign.		,373

Vengono visualizzate le medie per i gruppi nei sottoinsiemi omogenei.

In base alle medie osservate.

Il termine di errore è media quadratica(errore) = 7,784.

a. Utilizza dimensione del campione della media armonica = 15,000.

Wtot/raccolta

Test di effetti tra soggetti

Variabile dipendente: W. Tot (g)

Origine	Somma dei quadrati di tipo III	gl	Media quadratica	F	Sign.
Modello corretto	7451,912[a]	3	2483,971	3,157	,032
Intercettazione	820287,338	1	820287,338	1042,707	,000
COD.VARIETAIBRIDI	7451,913	3	2483,971	3,157	,032
Errore	44054,665	56	786,690		
Totale	871793,915	60			
Totale corretto	51506,577	59			

a. R-quadrato = ,145 (R-quadrato adattato = ,099)

W. Tot (g)

HSD di Tukey[a,b]

COD. VARIETA'/IBRIDI	N	Sottoinsieme 1	Sottoinsieme 2
(A4) Mi.Co. x Af.B.	15	104,7000	
(A3) B73 x Af.B.	15	108,2333	108,2333
(A1) Af.B.	15	122,2333	122,2333
(A2) Mi. Co.	15		132,5333
Sign.		,327	,094

Vengono visualizzate le medie per i gruppi nei sottoinsiemi omogenei.

In base alle medie osservate.

Il termine di errore è media quadratica(errore) = 786,690.

a. Utilizza dimensione del campione della media armonica = 15,000.

b. Alfa = 0,05.

W semi/raccolta

Test di effetti tra soggetti

Variabile dipendente: W. semi S. (g)

Origine	Somma dei quadrati di tipo III	gl	Media quadratica	F	Sign.
Modello corretto	3579,961[a]	3	1193,320	2,425	,075
Intercettazione	436493,751	1	436493,751	886,928	,000
COD.VARIETAIBRIDI	3579,961	3	1193,320	2,425	,075
Errore	27559,890	56	492,141		
Totale	467633,601	60			
Totale corretto	31139,850	59			

a. R-quadrato = ,115 (R-quadrato adattato = ,068)

W. semi S. (g)

HSD di Tukey[a,b]

COD. VARIETA'/IBRIDI	N	Sottoinsieme 1
(A4) Ml.Co. x Af.B.	15	76,4400
(A3) 573 x Af.B.	15	78,7867
(A1) Af.B.	15	92,9453
(A2) Ml. Co.	15	93,0000
Sign.		,184

Vengono visualizzate le medie per i gruppi nei sottoinsiemi omogenei.

In base alle medie osservate.

Il termine di errore è media quadratica(errore) = 492,141.

a. Utilizza dimensione del campione della media armonica = 15,000.

b. Alfa = 0,05.

altezza spiga

Test di effetti tra soggetti

Variabile dipendente: h SPIGA (m)

Origine	Somma dei quadrati di tipo III	gl	Media quadratica	F	Sign.
Modello corretto	,241[a]	3	,080	6,920	,000
Intercettazione	71,333	1	71,333	6144,549	,000
COD.VARIETAIBRIDI	,241	3	,080	6,920	,000
Errore	1,347	116	,012		
Totale	72,921	120			
Totale corretto	1,588	119			

a. R-quadrato = ,152 (R-quadrato adattato = ,130)

h SPIGA (m)

HSD di Tukey[a,b]

COD. VARIETA'/IBRIDI	N	Sottoinsieme 1	2	3
(A2) Ml. Co.	30	,7170		
(A4) Ml.Co. x Af.B.	30	,7400	,7400	
(A1) Af.B.	30		,7970	,7970
(A3) 573 x Af.B.	30			,8300
Sign.		,842	,176	,637

Vengono visualizzate le medie per i gruppi nei sottoinsiemi omogenei.

In base alle medie osservate.

Il termine di errore è media quadratica(errore) = ,012.

a. Utilizza dimensione del campione della media armonica = 30,000.

b. Alfa = 0,05.

Altezza pianta

Test di effetti tra soggetti

Variabile dipendente: h PIANTA (m)

Origine	Somma dei quadrati di tipo III	gl	Media quadratica	F	Sign.
Modello corretto	1,587[a]	3	,529	30,335	,000
Intercettazione	317,428	1	317,428	18198,103	,000
COD.VARIETAIBRIDI	1,587	3	,529	30,335	,000
Errore	2,023	116	,017		
Totale	321,039	120			
Totale corretto	3,611	119			

a. R-quadrato = ,440 (R-quadrato adattato = ,425)

h PIANTA (m)

HSD di Tukey[a,b]

COD. VARIETA'/IBRIDI	N	Sottoinsieme 1	2	3
(A2) Ml. Co.	30	1,4467		
(A4) Ml.Co. x Af.B.	30		1,6167	
(A1) Af.B.	30		1,6817	1,6817
(A3) 573 x Af.B.	30			1,7587
Sign.		1,000	,257	,114

Vengono visualizzate le medie per i gruppi nei sottoinsiemi omogenei.

In base alle medie osservate.

Il termine di errore è media quadratica(errore) = ,017.

a. Utilizza dimensione del campione della media armonica = 30,000.

b. Alfa = 0,05.

diametro tutolo/raccolta

Test di effetti tra soggetti

Variabile dipendente: Ø T. (cm)

Origine	Somma dei quadrati di tipo III	gl	Media quadratica	F	Sign.
Modello corretto	1,219[a]	3	,406	7,984	,000
Intercettazione	358,095	1	358,095	7034,770	,000
COD.VARIETAIBRIDI	1,219	3	,406	7,984	,000
Errore	2,851	56	,051		
Totale	362,165	60			
Totale corretto	4,070	59			

a. R-quadrato = ,300 (R-quadrato adattato = ,262)

Ø T. (cm)

HSD di Tukey[a,b]

COD. VARIETA'/IBRIDI	N	Sottoinsieme 1	2
(A3) 573 x Af.B.	15	2,2540	
(A4) Ml.Co. x Af.B.	15	2,4033	
(A1) Af.B.	15	2,4433	2,4433
(A2) Ml. Co.	15		2,6513
Sign.		,142	,050

Vengono visualizzate le medie per i gruppi nei sottoinsiemi omogenei.

In base alle medie osservate.

Il termine di errore è media quadratica(errore) = ,051.

a. Utilizza dimensione del campione della media armonica = 15,000.

b. Alfa = 0,05.

peso 50 semi/raccolta

Test di effetti tra soggetti

Variabile dipendente: W. 50 semi (g)

Origine	Somma dei quadrati di tipo III	gl	Media quadratica	F	Sign.
Modello corretto	120,363[a]	3	40,121	5,035	,004
Intercettazione	24903,955	1	24903,955	3125,367	,000
COD.VARIETAIBRIDI	120,363	3	40,121	5,035	,004
Errore	446,226	56	7,968		
Totale	25470,545	60			
Totale corretto	566,589	59			

a. R-quadrato = ,212 (R-quadrato adattato = ,170)

W. 50 semi (g)

HSD di Tukey[a,b]

COD. VARIETA'/IBRIDI	N	Sottoinsieme 1	2
(A3) 573 x Af.B.	15	18,4167	
(A2) Ml. Co.	15	19,8000	19,8000
(A4) Ml.Co. x Af.B.	15	21,0600	21,0600
(A1) Af.B.	15		22,2160
Sign.		,061	,100

Vengono visualizzate le medie per i gruppi nei sottoinsiemi omogenei.

In base alle medie osservate.

Il termine di errore è media quadratica(errore) = 7,968.

a. Utilizza dimensione del campione della media armonica = 15,000.

b. Alfa = 0,05.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro di tesi mi piace pensarlo come il risultato di un sogno.

Dal 2015, da quando sono stato in Chad a lavorare per un progetto Europeo di sicurezza alimentare "la fame" di mondo non si è più placata, come anche l'interesse a approfondire l'origine della natura umana che è strettamente in legame con l'agricoltura.

Siamo una specie sociale perché siamo agricoltori, e ciò non è visibile solo nei comportamenti, ma possiamo comprovarlo grazie alla genetica e alle sue nuove branche (epigenetica).

Il Sudafrica ospita la "culla dell'umanità": il sito di ritrovamento dei più antichi fossili della specie umana. Da lì la nostra speciazione ed è lì che ho voluto andare, per osservare prima di tutto e lavorare al progetto: "MIGLIORAMENTO GENETICO DI LANDRACES SUDAFRICANE DI MAIS PER CARATTERI NUTRIZIONALI E AGRONOMICI".

Passo ai ringraziamenti, sentiti e dovuti, ma che sicuramente non potranno essere esaustivi e completi nemmeno nel numero di persone citate.

Ringrazio chi mi ha aiutato e pure chi mi ha ostacolato, perché se oggi sono ciò che sono lo devo ad entrambi.

Grazie **prima di tutto, per tutto,** alla mia Famiglia (Padre, Madre e mio Fratello; ma anche zii, nonne, cugini...), allargata a chi, come i miei nonni, mi aiutano da più lontano. Grazie al Maestro (Roberto Pilu), con il quale spero di rimanere in contatto, a tutto il PILU CORP (Daniel, Enri, Scapino) e ad Abdul Egal per me generale Aidid, che mi ha dato la possibilità di avviare questa collaborazione Italosudafricana.

Grazie a tutti i miei Amici "vicini", che sono tenacia e dolcezza: Bosco, Elena, Clod, Nicole, Feno, Racca, Gabri, Danny, Negro, Kiwi, VeronicaBionda, Vero, Dolfo, a tutti gli amici del "vecchio" Acchiappasogni e a quelli "lontani": Mieni's family che è stata la mia casa in Sudafrica, Irene, Yuri, Simone, Simon, Gaetano, Bono, Tricky, Samson, DeborasBoccia, Alessandra de Ecrama…….Grazie ai compagni di classe che mi hanno aiutato durante le mie frequenti assenze estere con appunti e pazienza (Marta Galimberti, Sara Castelnovi, Tommy, Faifer, Danito, Brock, Zugno…..). Grazie al mio tesoro Zeno, alla Petty, al Brici and Friends. Grazie alla Breakdance che è attitudine e spirito, alla Terra che è bassa e donna e continuerò a lavorare, scalare, nuotare, mangiare, studiare.
Grazie ai Nemici con la N maiuscola, siete la ciliegina sul sentiero, e tutti quelli che ho incontrato e che riconosco come Maestri/e.

Grazie a te mio sogno, che continuerò a sognare, promesso che non ti lascerò andare.

(A)MAIZE, ECM.

Brescia, 05/10/2017