



**Università  
degli Studi  
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA  
in  
Biologia Evoluzionistica ed Ecologia**

In convenzione con:  
Università degli Studi di Parma  
Università degli Studi di Firenze  
CICLO XXXIII

COORDINATORE Prof. Guido Barbujani

***Caratterizzazione molecolare di 9 tipi razziali di mais  
locale peruviano, alcuni in coesistenza con il mais  
Yellow dent, per scopi di biosicurezza***

Settore Scientifico Disciplinare BIO/04

***Dottorando***

Dott. López Bonilla César Fernando

---

(firma)

***Tutore***

Prof. Bernacchia Giovanni

---

(firma)

Anni 2017/2020



**Università  
degli Studi  
di Ferrara**

PH.D. Course  
in  
Evolutionary Biology and Ecology

In cooperation with:  
Università degli Studi di Parma  
Università degli Studi di Firenze

CYCLE XXXIII

COORDINATOR Prof. Guido Barbujani

***Caratterizzazione molecolare di 9 tipi razziali di mais  
locale peruviano, alcuni in coesistenza con il mais  
Yellow dent, per scopi di biosicurezza***

Scientific/Disciplinary Sector (SDS) BIO/04

***Candidate***

Dott. López Bonilla César Fernando

---

(signature)

***Supervisor***

Prof. Bernacchia Giovanni

---

(signature)

Year 2017/2020



Università  
degli Studi  
di Ferrara

Sezioni

## Dottorati di ricerca

Il tuo indirizzo e-mail

lpzcrf@unife.it

Oggetto:

Dichiarazione di conformità della tesi di Dottorato

Io sottoscritto Dott. (Cognome e Nome)

Lopez Bonilla Cesar Fernando

Nato a:

La Oroya -Yauli

Provincia:

Perú

Il giorno:

11-07-1962

Avendo frequentato il Dottorato di Ricerca in:

Biologia Evoluzionistica ed Ecologia

Ciclo di Dottorato

XXXIII

Titolo della tesi:

Caratterizzazione molecolare di 9 tipi razziali di mais locale peruviano, alcuni in coesistenza con il mais Yellow dent, per scopi di biosicurezza

Titolo della tesi (traduzione):

Molecular characterisation of 9 racial types of local Peruvian maize, some in coexistence with Yellow dent maize, for biosecurity purposes

Tutore: Prof. (Cognome e Nome)

Bernacchia Giovanni

Settore Scientifico Disciplinare (S.S.D.)

BIO/04

Parole chiave della tesi (max 10):

Mais locale, Diversità genetica, Microsatellite, mais Yellow dent, Razze, biosicurezza

Consapevole, dichiara

**CONSAPEVOLE:** (1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decade fin dall'inizio e senza necessità di alcuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni; (2) dell'obbligo per l'Università di provvedere al deposito di legge delle tesi di dottorato al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi; (3) della procedura adottata dall'Università di Ferrara ove si richiede che la tesi sia consegnata dal dottorando in 2 copie, di cui una in formato cartaceo e una in formato pdf non modificabile su idonei supporti (CD-ROM, DVD) secondo le istruzioni pubblicate sul sito : <http://www.unife.it/studenti/dottorato> alla voce ESAME FINALE – disposizioni e modulistica; (4) del fatto che l'Università, sulla base dei dati forniti, archiverà e renderà consultabile in rete il testo completo della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" oltre che attraverso i Cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze. **DICHIARO SOTTO LA MIA RESPONSABILITÀ:** (1) che la copia

della tesi depositata presso l'Università di Ferrara in formato cartaceo è del tutto identica a quella presentata in formato elettronico (CD-ROM, DVD), a quelle da inviare ai Commissari di esame finale e alla copia che produrrà in seduta d'esame finale. Di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi; (2) di prendere atto che la tesi in formato cartaceo è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a mia richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie. **PLR ACCLIAZIONE DI QUANTO SOPRA RIPORTATO**

**Dichiarazione per embargo**

per 12 mesi

**Richiesta motivata embargo**

1. Tesi in corso di pubblicazione

**Liberatoria consultazione dati Eprints**

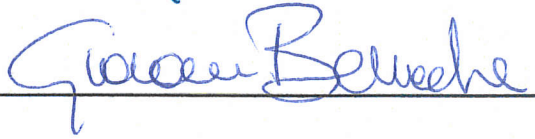
Consapevole del fatto che attraverso l'Archivio istituzionale ad accesso aperto "EPRINTS.unife.it" saranno comunque accessibili i metadati relativi alla tesi (titolo, autore, abstract, ecc.)

**Firma del dottorando**

Ferrara, li 21 marzo 2022 Firma del Dottorando

**Firma del Tutore**

Visto: Il Tutore Si approva Firma del Tutore



### **Riconoscimenti:**

Al professor Giovanni Bernacchia per il sostegno a realizzare questa parte della mia formazione professionale.

A mia moglie María Luisa e mia figlia Mariana Mia per il loro sostegno e forza nella mia vita

A mia figlia e collega Luisa Fernanda che mi ha sostenuto molto in laboratorio

Ai miei colleghi e amici Rosa Espejo, Isamar Bazo, Roberto Mansilla che mi hanno sempre sostenuto all'Università.

## Indice

Indice	3
Abbreviazioni	6
Riassunto	7
Abstract	9
1. Introduzione	11
1.1. Classificazione tassonomica	14
1.2. Aspetti botanici e floreali	14
1.3 Aspetti genetici e genomici	19
1.4 Origine	21
1.5 Progenitori selvatici	24
1.6 Domesticazione	24
1.7 Evoluzione	26
1.8 Diversità del mais in Perù	28
Razza Alazan	31
Razza Mochero	31
Razza Chancayano	32
Razza Chaparreño	32
Razza Canteño	32
Razza Cusco Gigante	32
Razza San Geronimo	33
Razza Huancavelicano	33
Razza San Gerónimo Huancavelicano	33

1.9 Importanza economica del mais	36
1.10 Marcatori molecolari	41
Microsatelliti o ripetizioni brevi di sequenza (SSR)	41
Polimorfismo di lunghezza del frammento amplificato (AFLPs)	42
1.11 Parametri di struttura Diversità genetica e struttura della popolazione	43
Corpo della ricerca	46
2. Componente 1: Diversità genetica del mais peruviano	47
2.1. Obiettivi	48
2.2. Materiali e metodi	49
2.2.1. Materiale vegetale	49
2.2.2. Estrazione del DNA	53
2.2.3. Determinazione della qualità e quantificazione del DNA	54
2.2.4. Amplificazione PCR dei microsatelliti:	55
2.2.5. Elettroforesi in poliacrilammide	58
2.2.6. Digestione, ligazione e amplificazione di AFLP	61
2.2.7. Analisi statistiche	65
2.3 Risultati	71
2.3.1 Valutazioni della diversità genetica intra-popolazione (razziale)	71
2.3.2 Confronto tra popolazioni	89
3. Componente 2: La gestione delle sementi come promotore del flusso genico	149
3.1. Obiettivi	150
3.2. Materiali e metodi	151
3.2.1 Materiali e disegno del sondaggio	151
3.2.2 Luogo di campionamento	151

3.2.3 Analisi statistica	152
3.3 Risultati	153
4. Componente 3: Definizione di un modello di base e di criteri per il verificare il flusso genico in appezzamenti di colture controllate.	174
4.1 Obiettivi	175
4.2. Materiali e metodi	176
4.2.1 Materiali e metodi per i test di crossability	177
4.2.2. Materiali e metodologia per l'analisi molecolare del locus PSY1.	180
4.3 Risultati	183
4.3.1 Risultati delle prove di incrocio in Lambayeque	183
4.3.2 Risultati delle prove di incrocio a Lima - La Molina	186
4.3.3 Risultati dei test molecolari al locus PSY1	191
5. Discussione della ricerca:	195
6. Conclusione generale della ricerca:	214
7. Referenze bibliografiche	218
8. Allegato	237
Allegato 1. Qualità del DNA e concentrazione dei nuovi campioni	
Allegato 2. Elenco dei primer testati nello studio	
Allegato 3. Parametri genetici di ogni popolazione (frequenze geniche, numero di alleli, alleli effettivi, indici di diversità, ecc.)	
Allegato 4. Parametri genetici di popolazione dei diversi raggruppamenti interpopolazione.	
Allegato 5. Disegno del sondaggio per conoscere la gestione delle colture di mais e il sondaggio compilato.	
Allegato 6. Regione di consenso del locus PSY1 nel mais	



## Abbreviazioni

PCA: Analisi delle componenti principali

DNA: acido desossiribonucleico

AFLP: polimorfismo di lunghezza del frammento amplificato

AMOVA: Analisi della varianza molecolare

Banca: Banca del germoplasma

Primer ZM04: Primer p-bnlg1169

Primer ZM015: Primer phi115

Primer ZM022: Primer p-bnlg1839

Primer ZM25: primer phi034

Primer ZM27: Primer phi056

Primer ZM31: Primer phi109188

Primer ZM33: Primer phi227562

Primer ZM37: Primer Umc1153

CIAT: Centro internazionale per l'agricoltura tropicale

CIMMYT: Centro internazionale di miglioramento del mais e del grano

IBPGR: Consiglio internazionale per le risorse fitogenetiche

YDM Yellow dent mais o ibrido dentato

na: numero totale di alleli

ne: numero effettivo di alleli

PCR: reazione a catena della polimerasi

SSR: Ripetizione di sequenza singola o microsatellite

TBE: Tris, acido borico ed EDTA

TE: Tris e EDTA

UNALM: Universidad Nacional Agraria La Molina: Università Agraria Nazionale La Molina

## Riassunto

Il Perù, centro di diversità del mais, mantiene una moratoria sull'ingresso di OGM che è stata estesa fino al 2035, con l'obiettivo di sviluppare maggiormente la biosicurezza. Tuttavia, sono stati fatti pochi progressi nella ricerca, nonostante il fatto che il Perù importi il 70% della sua domanda di mais, che è triplicata negli ultimi 20 anni, e ha una bassa produzione. Pertanto, tra il 2010-2012 il progetto LAC Biosafety ha stabilito Lambayeque come un'area di coesistenza tra varietà locali e mais ibrido dentato per più di 70 anni. Prima di tutto è stato confrontato lo stato di diversità genetica delle popolazioni coltivate e del materiale della banca del germoplasma dell'UNALM. È stato incorporato anche il mais andino, adattato alle condizioni costiere per la produzione di mais "choclo", che è più richiesto. Inoltre, è stata analizzata la situazione della gestione delle sementi e sono state fatte prove di incrocio tra mais locale e mais dentato.

28 popolazioni, 9 dalla banca, 11 dal luogo di origine e 8 ibridi dentati sono state studiate utilizzando 8 loci polimorfici SSR. Quindici di queste popolazioni sono state studiate anche con 3 combinazioni AFLP. Sono stati descritti i parametri genetici delle popolazioni locali e la possibile introgressione con mais ibrido. Inoltre, sono stati valutati i problemi di gestione delle sementi nel mais locale e ibrido in Lambayeque con visite e indagini.

Nel mais locale, una media di 9,5 alleli è stata trovata negli 8 loci SSR analizzati. Il mais locale costiero di Lambayeque: Alazán (AL), Mochero (MO), Chancayano (CY) e Chaparreo (CH) ha mostrato 65 alleli diversi, di cui 9 erano esclusivi del gruppo. Il mais alto andino aveva 60 alleli diversi, di cui 4 erano unici per quel gruppo di mais. La percentuale di alleli comuni tra il mais locale Lambayeque e banca è stata medio-bassa nel caso di MO e CY, mostrando valori del 38,98% e 45,95%; tuttavia, AL ha avuto una percentuale di alleli comuni più alta, pari al 54,72%. Queste percentuali possono essere dovute alla gestione delle sementi; dalla raccolta alla commercializzazione nei mercati locali o intermediari, che poi finiscono nei mercati all'ingrosso, dove alcuni agricoltori comprano il grano come fonte di sementi. In questo modo, si mantiene un mix allelico molto intenso. D'altra parte, il gruppo del mais dentato ha mostrato 46 alleli diversi, di cui 6 unici.

Lo scambio di semi sarebbe responsabile dell'alto grado di polimorfismo e diversità genetica di Nei, che nella maggior parte delle popolazioni era superiore a 0,50. Gli indici di fissazione intra-popolazione erano relativamente bassi, sotto lo 0,20 nel mais locale e più alti nel mais dentato. Tutte le analisi effettuate hanno indicato una marcata differenza genetica tra il mais locale e quello ibrido dentato, il che supporta l'assenza di flusso genico tra questi gruppi

durante il tempo di coesistenza. D'altra parte, le analisi della struttura genetica hanno mostrato che il MO in Lambayeque è molto misto e non si separa in gruppi discreti. Lo stesso si osserva in altre varietà di mais dell'altopiano andino. Il mais Piricinco (PI) nella giungla, che coesiste con mais ibrido, ha mostrato una maggiore uniformità genetica, simile al CY.

In Lambayeque ci sono 3 situazioni di coltivazione: 1) dove si coltiva solo mais ibrido dentato, 2) dove si coltiva mais locale per il "choclo" e 3) dove ci sono situazioni di coesistenza di mais ibrido con mais MO e AL. Tra i principali problemi della coltura ci sono: l'informalità del seme di mais locale, la mancanza di buone pratiche nell'uso del seme ibrido, problemi fitosanitari, mancanza di acqua, ecc.

Le prove di outcrossing hanno dimostrato che le razze si comportano diversamente se coltivate vicino a quelle ibride; tuttavia, a 30 m i tassi di outcrossing sono molto bassi, quindi sembra che 100 m siano sufficienti per evitare il mescolamento.

## Abstract

Peru, the main centre of corn diversity, maintains a moratorium on the entry of GMOs that has been extended until 2035, to develop biosafety capacities. However, little progress has been made in the investigation, although Peru imports 70% of its demand for hybrid Yellow Dent Mais (YDM), which has tripled in the last 20 years, due to low production. Therefore, between 2010 - 2012, the LAC Biosafety project established Lambayeque as an area of coexistence between local varieties and YDM for more than 70 years. First of all, the status of the genetic diversity of the cultivated populations and the material from the germplasm bank of UNALM was compared. Andean corn was also incorporated, adapted to conditions of the coast to produce "choclo" corn, which is more requested. Besides, the seed management situation was analyzed and two crossbreeding trial models between local maize and YDM were established.

Twenty-eight populations were studied, 9 from the bank, 11 from the place of origin and 8 YDM hybrids, using 8 polymorphic SSR loci. Fifteen of these populations were also studied with 3 AFLP combinations. Genetic parameters of local populations and possible introgression with YDM were described. Also, seed management problems in local maize and the YDM in Lambayeque were evaluated through visits and surveys.

In local maize, a mean of 9.5 alleles was found at the 8 SSR loci tested. Local coastal maize from Lambayeque: Alazán (AL), Mochero (MO), Chancayano (CY) and Chaparreño (CH) showed 65 different alleles, of which 9 were exclusive to the group. High Andean maize had 60 different alleles, of which 4 were unique to that group of maize. The percentage of common alleles between the local maize from Lambayeque and the bank maize was medium-low in the case of MO and CY, showing values of 38.98% and 45.95%; however, AL had a higher percentage of common alleles (54.72%). This low values may be due to seed management; from the harvest to the commercialization in local or intermediary markets, which then end up in the wholesale markets, where some farmers buy the grain as a source of seeds. In this way, very intense allelic mixing is maintained. On the other hand, the YDM group showed 46 different alleles, of which 6 were unique.

The exchange of seeds would be responsible for the high degree of polymorphism and genetic diversity of Nei, greater than 0.50 in most populations. Intrapopulation fixation indices were relatively low, less than 0.20 in local maize and higher in YDM. All analyzes indicated a marked genetic difference between local maize and YDM, supporting the absence of gene flow between these groups during more than 70 years of coexistence. On

the other hand, the analysis of the genetic structure showed that the OM in Lambayeque is very mixed and does not separate into discrete groups. The same is observed in other varieties of maize from the Andean highlands. Piricinco maize (PI) from the jungle, which coexists with YDM, showed greater genetic uniformity, similar to that of CY.

In the Lambayeque area, there are 3 cultivation situations: 1) where only YDM is grown, 2) where local maize is grown for "corn" and 3) where there are situations of coexistence of YDM with MO and AL maize. The main problems of the crop are the informality of local corn seeds, the lack of good practices in the use of YDM seeds, phytosanitary problems, lack of water, etc.

Crossing trials have shown that the breeds behave differently when grown near the YDM; however, at 30 m the crossing rates are very low, so it seems that 100 m is sufficient to avoid mixing.

## 1. Introduzione

Il Perù fa parte della regione andina-amazzonica, considerata un grande centro di origine di diverse specie come *Gossypium barbadense*, *Phaseolus lunatus*, *Capsicum spp.* etc. (Sevilla, 2005); è anche un centro di diversificazione di altre specie importanti come il mais e la patata (Sevilla, 2005). Per questo motivo, negli anni '50, la Fondazione Rockefeller finanziò uno studio per identificare e caratterizzare le razze di mais in Perù, e lo stesso avvenne in altri paesi della regione centro e sudamericana (Salhuana, 2002). Come risultato di questa ricerca, vennero definiti 49 gruppi razziali (Grobman et al. 1961), che in seguito aumentarono a 55, includendo le razze introdotte (Manrique, 1988). Per mantenere questa grande diversità, è stata creata una banca del germoplasma presso l'Universidad Nacional Agraria La Molina, dove attualmente sono conservate più di 3200 accessioni provenienti da tutto il paese, che vengono rinnovate in base alla perdita del grado di germinazione dei semi, in periodi da 5 a 15 anni. Questo grande numero di razze e di accessioni è la giustificazione che politici, ONG, ecc. usano come argomento per opporsi all'uso di nuove tecniche di allevamento e per impedire l'ingresso di sementi migliorate, compresi gli ibridi OGM.

Sulla base di quanto sopra, è importante capire meglio che cosa si intende per "razza" nel mais. Questo termine è usato nei libri pubblicati negli anni '60 (Grobman et al. 1961), dove non è chiaramente definito. Con razza si intendono quegli insiemi di popolazioni che condividono una serie di caratteristiche comuni come gli aspetti morfologici (secondo i descrittori IBPGR, 1991), la citogenetica, la distribuzione geografica, il contributo culturale delle popolazioni umane dove si trovano questi mais, sono considerati razze di mais. Tuttavia, a causa della natura allogama del mais, queste caratteristiche potrebbero essere facilmente modificate o mescolate, perdendo le caratteristiche fenotipiche distinguibili di una razza. Per questo c'è il desiderio dei conservazionisti di mantenere la purezza razziale, come afferma Ricardo Sevilla, uno specialista che ha partecipato all'identificazione di queste razze, che usa spesso questo termine per sottolineare la grande diversità del mais. Lo studio presente mira a dimostrare che il concetto di "razza" contiene una buona dose di soggettivismo, e crediamo che dovrebbero essere chiamate solo 'popolazioni locali' di mais.

Un aspetto utilizzato dai conservazionisti per sostenere le differenze razziali ha a che vedere con le testimonianze archeologiche lasciate dalle culture pre-Inca e Inca, che hanno contribuito in modo significativo all'addomesticamento della specie, utilizzando e coltivando diversi tipi di mais in base alle loro qualità nutrizionali e alle caratteristiche di adattamento alle diverse aree in cui si diffusero, e che possiamo osservare ancora oggi grazie alle

usanze che si sono tramandate attraverso le generazioni nelle comunità native. A causa di questo fatto, possiamo trovare una serie di usi e prodotti che si preparano da questo mais, come: chicha (bevanda fermentata), tamales, humitas, choclo, cancha, ecc. Questa storia culturale ha contribuito a rafforzare la categoria delle razze di mais; si ripete anche in altri paesi dell'America Latina come il Messico e il Guatemala.

Per comprendere meglio questa diversità genetica nel mais e per poterla utilizzare nei programmi di conservazione e di allevamento, per ottenere varietà più produttive con la capacità di rispondere ai cambiamenti ambientali che aumentano ogni anno, è necessario conoscere lo stato di alcuni parametri genetici nelle diverse popolazioni. Per questo scopo, gli studi con marcatori molecolari come i microsatelliti e l'AFLP si sono rivelati molto utili. Sono state così sviluppate diagnosi genetiche e studi filogenetici, come quello di Matsuoka Y. et al (2002) e di Vigouroux Y. et al (2008). Ad esempio, Matsuoka et al. (2002), mediante l'uso di tali marcatori, hanno identificato il progenitore selvatico del mais coltivato, ovvero il teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglimus*), mentre Warbuton et al. (2002, 2011) hanno effettuato studi di flusso genico in mais utilizzando tali marcatori. I marcatori microsatelliti sono stati usati per la prima volta nel 2004 nello studio sulla denominazione di origine del mais bianco gigante di Cusco (Lopez, 2005).

Altri aspetti importanti da considerare sono la necessità di accorciare i lunghi cicli vegetativi (un raccolto all'anno), aumentare le rese e la produttività della coltura in vista dell'aumento della domanda, dato che si consuma di più sotto forma di prodotti freschi, farina, ecc. Fino a qualche anno fa, il consumo fresco era limitato al periodo post-raccolta tra febbraio e aprile, e il resto dell'anno era possibile trovare solo grani secchi. Oggi, questa situazione sta cambiando e il mais fresco si può trovare tutto l'anno, come nel caso dei mercati di Lima, dove vivono più di 9,8 milioni di persone, e altre regioni dell'interno del paese. Questo cambiamento sta avvenendo perché alcuni tipi di mais degli altipiani vengono coltivati in condizioni costiere, anche se questa situazione sta generando un problema di parassiti e malattie. Inoltre, c'è la preoccupazione che queste varietà di mais d'altura possano essere introdotte in luoghi dove viene regolarmente coltivato il mais ibrido dentato importato. Per questo motivo, la zona di Lambayeque è stata scelta come modello per questo studio, dove alcune razze native coesistono con questi ibridi.

Nel contesto di questa grande diversità nel mais locale, si deve tener conto della presenza del mais dentato giallo, che è stato introdotto diversi decenni fa e non si sa ancora se si sono verificate situazioni di introgressione nel mais locale e come questo possa influenzare la loro diversità genetica. Va anche considerato che negli ultimi 20 anni la domanda di mais

ibrido è triplicata a 5,5 milioni di tonnellate, mentre 3,6 milioni di tonnellate devono essere importate.

Per questo, dal 2010 al 2012 abbiamo potuto partecipare al progetto regionale LAC Biosafety, finanziato dal GEF - WB e coordinato dal Centro Internazionale per l'Agricoltura Tropicale (CIAT), che ci ha permesso di realizzare questo studio e di continuarlo ancora per qualche anno, parte del quale è presentato nel rapporto di Quispe J. (2015). D'altra parte, il MINAM ha assunto consulenti negli ultimi 5 anni per sviluppare le linee di base della diversità genetica del mais peruviano e di altre colture; tuttavia, il libro ottenuto non è un documento molto utile per il processo decisionale, poiché è un inventario molto generale della diversità, poiché non include alcuno studio genetico che analizzi lo stato della diversità allelica, non ci sono registrazioni di come stanno andando i parametri gene-popolazione, ecc.

Nel contesto presentato, la tesi presente ha, quindi, come obiettivi principali la caratterizzazione genetica delle popolazioni di mais coltivate nella zona di Lambayeque e la comparazione con materiale collezionato nella stessa area geografica e mantenuto nella Banca del germoplasma dell'UNALM. Il materiale mantenuto nella banca di germoplasma rappresenta un "fotografia" della diversità di tali popolazioni prima dell'introduzione delle varietà ibride moderne, e il confronto permette di studiare l'evoluzione dei materiali di mais ancora coltivati on farm dopo decenni di co-coltivazione con ibridi di mais moderni.

Il Perù, a differenza di altri paesi come Colombia, Brasile, Costa Rica e Messico, ha pochi studi che utilizzano metodi di biologia molecolare sulle sue specie native, tra cui il mais locale. Per questo motivo, questo studio aiuterà a sensibilizzare le istituzioni che finanziano la ricerca di base e applicata, come il Consiglio Nazionale della Scienza e della Tecnologia (CONCYTEC), il Ministero dell'Ambiente (MINAM), il Ministero dell'Agricoltura e dell'Irrigazione (MINAGRI) e il Ministero della Produzione - Programma Innovare. Al fine di dare priorità ai loro programmi per rafforzare la valutazione delle specie di agrobiodiversità.



## 1.1. Classificazione tassonomica

Il mais, *Zea mays* L. spp *mays*, è un'erbacea appartenente alla famiglia delle Poaceae, che assieme al genere *Tripsacum* fa parte della tribù Andropogoneae. La classificazione tassonomica del mais è riportata in Tabella 1.1.

Tabella 1.1. Classificazione tassonomica del mais

Tassonomia	Classificazione
Regno	Plantae
Divisione	Angiospermae
Classe	Monocotyledoneae
Sottoclasse	Commelinidae
Ordina	Poales
Famiglia	Poaceae
Sottofamiglia	Panicoideae
Tribù	Andropogoneae
Genere	<i>Zea</i>
Specie	<i>Zea mays</i> L.

Fonte: MINAM, 2008

## 1.2 Aspetti botanici e floreali

Il mais è un'erbacea annuale monocotiledone. La sua altezza è di solito variabile, da 60 cm a 5 m durante il suo sviluppo (Figura 1.1). La dimensione della pianta varia a seconda del genotipo e dalle condizioni agro-ambientali, essendo più bassa nelle colture tropicali e subtropicali (OGTR, 2008).

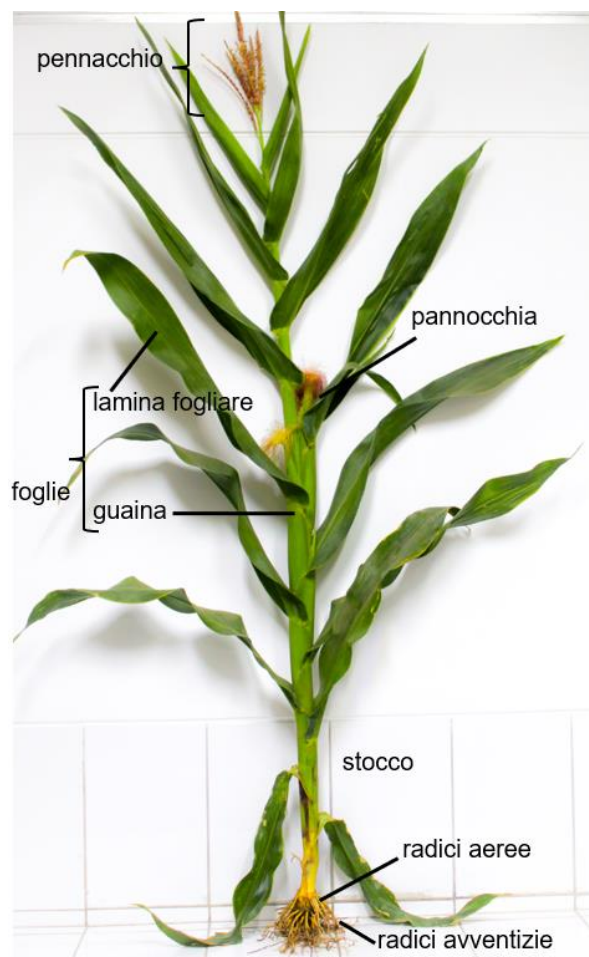


Figura 1.1. Pianta di mais e le sue parti  
Fonte propria

Il sistema radicale del mais ha origine alla germinazione, con la crescita e lo sviluppo della radichetta e delle radici seminali. Successivamente, si formerà il sistema radicale permanente, composto dalle radici seminali permanenti, che sostituiscono le radici seminali iniziali (Rimache, 2008). Ci sono anche le radici avventizie, che si formano dai nodi sotto il suolo, e hanno la funzione di assorbire acqua e nutrienti. Queste possono essere da 4 a 6, tutte di dimensioni simili (Awata et al. 2019). Alla fine della fase vegetativa, dopo che la pannocchia è completamente sviluppata, si sviluppano le radici aeree che sosterranno la pianta (Tripathi, 2011). In terreni favorevoli, il sistema radicale può estendersi fino a 1,5 m lateralmente e 2,0 m in profondità (Awata et al. 2019).

Il fusto è un cilindro solido con uno spessore da 3 a 4 cm. È composto da nodi e internodi distanti. Gli internodi possono essere numerosi, da 8 a 21 internodi, a seconda della varietà (du Plessis, 2003). Gli internodi sono corti alla base della pianta, diventando più lunghi in cima, più la pianta è alta (Tripathi, 2011). La dimensione dello stelo al suo massimo sviluppo, dopo l'emergenza della pannocchia e l'inizio dell'antesi, può misurare da 50 cm a 5 m (Rimache, 2008). Può sviluppare rami laterali o "tillers", che emergono da nodi sotto la superficie (linea del suolo), variando da 1 a 2 "tillers" (du Plessis, 2003).

Il tessuto staminale è costituito da epidermide, tessuto parenchimale e fasci vascolari (Awata, et al. 2019). L'epidermide è costituita da piccole cellule di dimensioni lineari, che sottostanno agli stomi e all'ipoderma. Il tessuto parenchimatrico è circondato dall'epidermide e consiste di cellule lunghe con grandi spazi intercellulari. Queste cellule hanno un grande vacuolo con molte sostanze di riserva, principalmente acqua e zuccheri. Man mano che si raggiunge il centro, si trovano cellule sempre più rotonde con meno spazi intercellulari, formando così il midollo del fusto. I fasci vascolari fanno parte del sistema conduttivo e sono sparsi nel tessuto parenchimatrico sotto forma di colonne verticali (Rimache, 2008).

Da ogni nodo si sviluppano le foglie, che avvolgono il fusto per mezzo di una guaina. Sono opposti e hanno una disposizione distica. A maturità, una pianta può avere da 8 a 20 foglie, che variano in numero, dimensione e orientamento (OGTR, 2008). Sono composte dalla guaina, dalla ligula, dalle orecchiette, dalla nervatura centrale e dalle lamine fogliari, queste ultime lunghe, strette e glabre (du Plessis, 2003). Le cellule del fascio fogliare sono ricche di cloroplasti (OGTR, 2008), quindi le foglie superiori sono responsabili di catturare la maggior parte della luce e quindi hanno una maggiore capacità fotosintetica (Tripathi, 2011). Le cellule stomatiche si trovano principalmente sul lato inferiore delle foglie, in file parallele alle vene (Rimache, 2008). Le foglie di solito hanno un bordo ondulato, ma questo è anche legato al clima in cui si trovano; in condizioni di alta umidità, diventano turgide e possono perdere questa ondulazione (du Plessis, 2003).

Il mais è una pianta monoica con fiori unisessuali incompleti, quindi l'impollinazione è allogama e anemofila, ed è influenzata dalle dimensioni della pannocchia e dalle condizioni ambientali (OECD, 2006). Inoltre, ha un meccanismo riproduttivo noto come protoandria, in cui la fioritura maschile avviene prima di quella femminile, favorendo l'incrocio tra individui diversi (du Plessis, 2003). Dopo lo sviluppo delle strutture della fase vegetativa (foglie, radici, fusto), vengono prodotte le strutture riproduttive, corrispondenti ai fiori maschili e femminili. I fiori maschili (Figura 1.2) hanno la forma di un'infiorescenza chiamata pennacchio e si trovano nella parte superiore della pianta (Figura 1.4). Questo avviene con il passaggio del meristema apicale a un meristema apicale dell'infiorescenza, che va a formare meristemi laterali per i rami del pennacchio (Rimache, 2008).

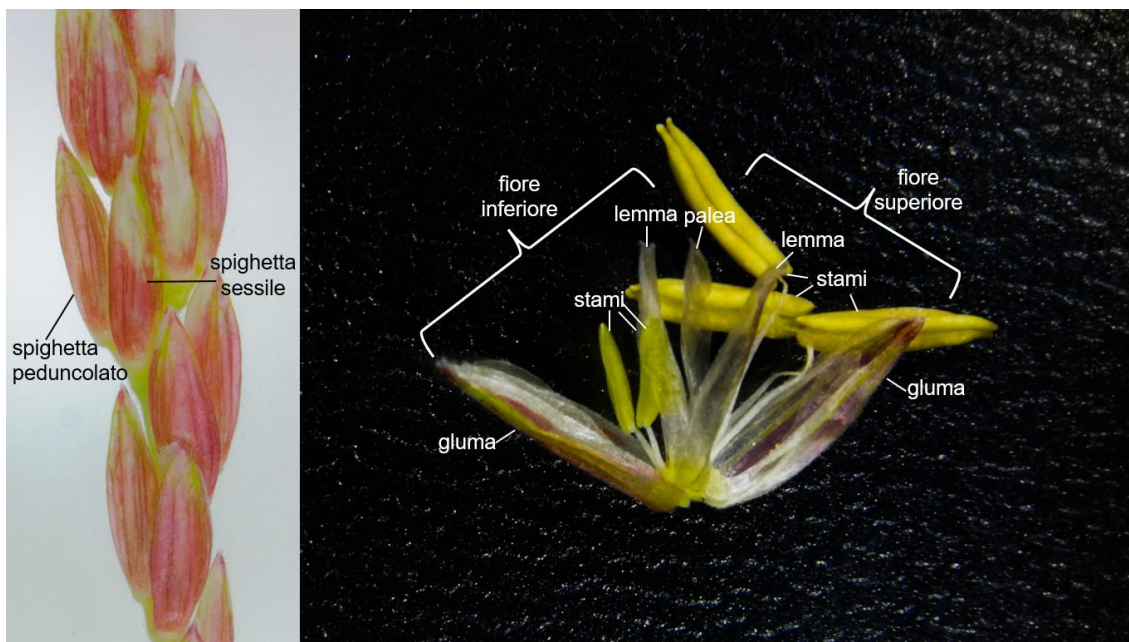


Figura 1.2. (a) struttura riproduttiva maschile con brattee; (b) immagine interna di antere e filamenti

Fonte propria

Il pennacchio consiste in un asse centrale, da cui emergono una spighetta centrale e diverse spighette laterali. Queste spighette sono composte da spighette a coppie, che hanno una disposizione distica. Le spighette sono composte da due fiori maschili, ciascuno con un pistillo rudimentale, e tre stami, con due antere per stame. Ogni fiore è coperto da lemmi e glume, e sono separati l'uno dall'altro dalla palea (OGTR, 2008).

I fiori femminili (Figura 1.3) sono in un'infiorescenza modificata a forma di spiga chiamata pannocchia, nata da gemme ascellari. La pannocchia è una spiga cilindrica modificata che contiene un rachide centrale, dove le spighette sono inserite a coppie. Ogni spighetta è composta da due fiori femminili, solo uno dei quali è funzionale. Questo fiore funzionale consiste in un pistillo con un lungo stilo e tre stami rudimentali. Come i fiori maschili, questi sono coperti da lemmi e glume all'esterno, e separati l'uno dall'altro dalla palea (Awata, 2019).



Figura 1.3. (a) struttura riproduttiva femminile con brattee; (b) immagine interna di stili e ovaie

Fonte propria

Il frutto generato è una cariosside, che può avere dimensioni e consistenza diverse nelle diverse varietà e razze. Questi sono composti dal pericarpo, la buccia, l'endosperma, l'embrione o germe e il pedicello. I chicchi di mais sono inseriti in un rachide cilindrico a coppie e formano file, ma possono presentare alcune anomalie come: file fasciati, biforcati, ramificati, con file irregolari e file dispari (Rimache, 2008).



Figura 1.4. Piantagione di mais

Fonte propria

### 1.3 Aspetti genetici e genomici

Secondo alcuni testi di genetica e alcune importanti pubblicazioni scientifiche (Piercé, 2017; Strickberger, 1976, Schnable, 2009), il mais è considerato una specie modello, come lo sono *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, ecc. Questa specie è stata oggetto di ricerche fin dall'inizio del XX secolo, essendo stata utile per la scoperta degli elementi trasponibili da parte di Barbara McClintock, che ora sappiamo fornire un grande dinamismo nel genoma della specie (Fedoroff, 1984). Tuttavia, come molte specie di piante, il sequenziamento del suo genoma è stato completato solo alla fine del 2009 (Schnable et al. 2009) ed è costato circa 31 milioni di dollari.

Secondo Schnable et al. (2009) le piante hanno genomi dalle dimensioni molto varie, potendo essere molto piccoli come in *Arabidopsis* con 140Mb o più grandi di 6500Mb. Lo stesso autore riferisce che il mais possiede un grande genoma di circa 2400Mb, dove, secondo il sequenziamento, sono stati predetti circa 32.540 geni codificanti proteine, di cui il 99,8% è stato assegnato ai cromosomi di riferimento. Va notato che il mais è riportato con un numero di cromosomi di base  $X = 10$ . Inoltre, è chiaro dallo studio del genoma (Schnable et al., 2009) che quasi l'85% del genoma del mais è occupato da famiglie di elementi trasponibili distribuiti in modo non uniforme.

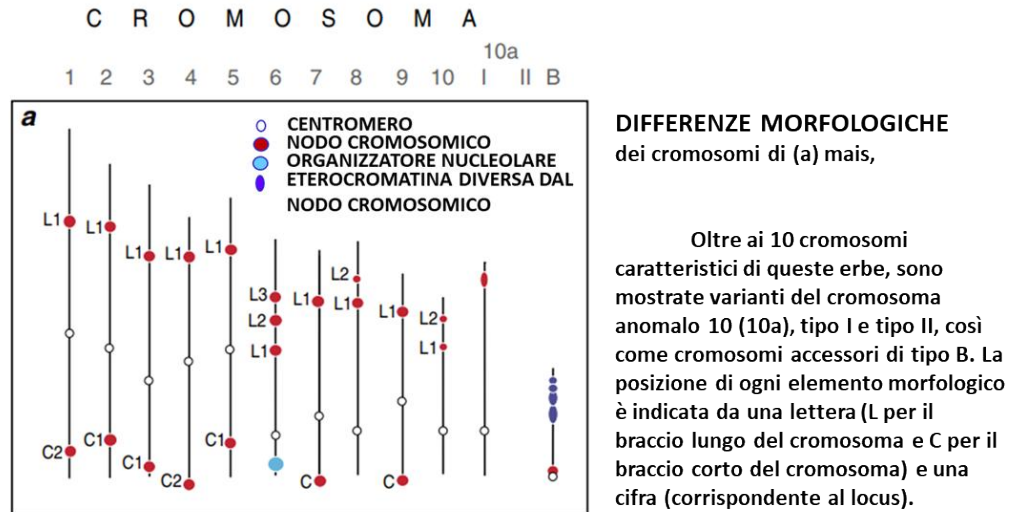
I geni del mais sono disposti come isole in un mare di elementi trasponibili, il che significa che questa specie ha un genoma instabile, dove le inserzioni di questi elementi trasponibili possono essere rapidamente cancellate in pochi milioni di anni (Bennetzen, 2009).

Tramite il sequenziamento dell'intero genoma della linea inbred B37, gli autori Schnable et al. (2009) descrivono le regioni del genoma che possono essere imprinted e sottolineano la correlazione tra le regioni povere di citosine metilate e le inserzioni dell'elemento trasponibile noto come Mutator (Mu), che non è distribuito uniformemente nel genoma, ma piuttosto è collocato preferenzialmente in regioni ricche di geni che hanno alti tassi di ricombinazione.

Le grandi dimensioni del genoma sono aumentate negli ultimi 3 milioni di anni, con eventi di retrotrasposizione molto rilevanti (Schnable, 2009). Inoltre, nel mais è molto importante capire l'effetto del vigore ibrido quando 2 linee inbred sono incrociate reciprocamente. Pertanto, Swanson et al. (2009) hanno presentato uno studio in cui hanno incrociato reciprocamente linee B37 e Mo17 e hanno osservato che gli ibridi non solo differiscono fenotipicamente ma anche nell'espressione differenziale del 30-50% dei loro geni, di cui circa 4000 loci corrispondono a tratti quantitativi; di questi il 78% agisce in configurazione trans e l'86% regola differentemente l'accumulo di trascritti. Questa configurazione del genoma è coerente con l'espressione genica negli ibridi regolata esclusivamente da alleli trasmessi paternamente ed è una conseguenza del modo in cui l'imprinting genico generalizzato si verifica in questi genitori.

Dawe nel Handbook of maize (Bennetzen, 2009) si riferisce a strutture chiamate nodi cromosomici, presenti nei cromosomi meiotici del mais e del teosinte, allo stadio pachitene. Si tratta di regioni di DNA ripetute migliaia o milioni di volte, con motivi ripetuti da 180 a 185 bp, che generano modelli polimorfici. Sono riportati in 23 posizioni note sui cromosomi, come mostrato nella Figura 1.5 da Kato (2005) che nota che i nodi cromosomici possono variare da piccoli a grandi. Dawe nel Handbook of maize (Bennetzen, 2009) menziona che uno dei

primi nodi ad essere clonato fu chiamato 180bp, seguito da TRA1 e dalla regione chiamata CentC nel centromero, le ripetizioni in questi nodi sono disposte in tandem, coprendo diversi kilobasi. I suddetti autori menzionano che i nodi cromosomici contengono anche elementi trasponibili. La grande importanza di questi nodi cromosomici è che sono utilizzati per studiare l'origine del mais attraverso l'analisi citogenetica in cellule pachitene in meiosi I.



Tratto da Kato 2005.

Figura 1.5. Differenza nella posizione dei nodi cromosomici nei genomi dei teosinti e del mais

## 1.4 Origine

L'origine del mais è stata oggetto di controversie da parte di molti e ci sono ancora discrepanze sulla sua origine. Anche se la sua origine Mesoamericana è stata determinata, ci sono due teorie riguardanti i suoi possibili centri di origine (Wilkes, 1979). Il primo è nella



regione sud-occidentale del Messico e dell'America centrale, 8000-9000 anni fa, dovesono stati trovati resti fossili di grani di polline e altri fitoliti (Poehlman & Sleper, 2003).

Il secondo possibile centro di origine è nelle alte valli andine del Perù, dell'Ecuador e della Bolivia. Anche se non ci sono parenti selvatici in quella regione, prove archeologiche della coltivazione del mais risalenti a 7000 anni fa sono state trovate nella valle di Chicama nel Perù settentrionale, similmente a quelle trovate in Messico (Grobman et al., 2012; MINAM, 2018).

Il dibattito sull'origine sudamericana nasce dalla limitata presenza di mais nel periodo preceramico, tuttavia, secondo Galinat (1971), non è possibile determinare l'esatto centro di origine. Le prove archeologiche dovrebbero essere utilizzate per dimostrare l'evoluzione del mais in Sud America e non per definire la sua origine (MINAM, 2018).

Come menzionato da Kato (2005), il dibattito sull'origine è già definito, ciò che si discute è la distribuzione dell'addomesticamento, se sia stato uni-centrico o multicentrico, la prima ipotesi essendo supportata da analisi filogenetiche con microsatelliti; mentre la seconda ipotesi è supportata da analisi citogenetiche e dalla disposizione dei nodi cromosomici.

Gli studi molecolari hanno anche fatto luce sull'origine del mais, con Matsuoka et al. (2002) che usando 99 SSR hanno scoperto che il mais è sorto 9000 anni fa nel Messico meridionale, con una modesta presenza di flusso genico dal teosinte. Sulla stessa linea di pensiero, Van Heerwaarden et al. (2011) notano che il mais sarebbe sorto da un parente selvatico noto come Balsas teosinte (*Zea mays* sub *parviglumis*) dalle pianure medie e basse del Messico meridionale; tuttavia, c'è un paradosso che deve essere considerato, poiché le cultivar che sarebbero più strettamente legate a quell'antenato teosinte sono distribuite negli altipiani del Messico dove quell'antenato *parviglumis* non esiste.

Van Heerwaarden et al. (2011) utilizzando i dati dei marcatori SNP hanno scoperto che il flusso genico tra il mais e i suoi progenitori selvatici ha un impatto significativo sull'inferenza dell'origine geografica; tuttavia, sono stati in grado di trovare una coerenza con i dati ecologici, archeologici e genetici che spiegherebbe questo paradosso.

I centri di domesticazione secondaria sono stati identificati sulla base di siti di ibridazione tra mais con teosinte e *Tripsacum*. Se ne trovano due: (a) messicano: mais derivato da incroci con *Tripsacum* e (b) guatemalteco: mais derivato da incroci con teosinte (Manrique, 1997; Macuri, 2016; Dávalos, 2017).

Da un punto di vista storico, ci sono molte testimonianze di utensili di ceramica o resti di pannocchie di mais risalenti a più di 6000 anni fa, trovate in valli come Teotihuacan in Messico o Moche in Perù, così come in vari musei tra cui lo Yale Art Museum o il Chicago Natural History Museum negli Stati Uniti (Eubanks, 2001), che sostengono l'origine del mais in questa parte del mondo.

Quando gli europei arrivarono nelle Americhe, la prima volta che si parlò di mais fu nel diario di bordo del primo viaggio di Cristoforo Colombo, come fa notare Brandolini (in Mais: origine e diffusione [www.colturaecultura.it](http://www.colturaecultura.it)). Nelle versioni del diario di Bartolomé de las Casas, si narra che nell'ottobre 1492 Colombo descrisse il mais che era stato visto dai membri del suo equipaggio su un'isola di Cuba. Al momento della conquista dell'America, il mais era già coltivato in varie parti delle Americhe e faceva parte della dieta degli indigeni. Colombo, tornando dalla sua spedizione, introdusse il mais in Europa, dove i primi raccolti erano già evidenti a metà del 1500, con un migliore adattamento delle varietà portate dall'America. Più tardi, nel XVI secolo, fu introdotto in Africa e in Asia (Acosta, 2009; Macuri, 2016).

## 1.5 Progenitori selvatici

Tra i progenitori selvatici del mais abbiamo quelli del genere *Zea*. Questo è diviso in due gruppi. Il primo è composto da quattro specie di teosinte, due perenni (*Z. diploperennis* e *Z. perennis*) e due annuali (*Z. luxurians* e *Z. nicaraguensis*). Il secondo gruppo ha una sola specie (*Z. mays*), che a sua volta ha quattro sottospecie: mais (*Z. mays* subsp. *mays*) e teosinte annuali (*Z. mays* subsp. *mexicana*; *Z. mays* subsp. *parviglumis* e *Z. mays* subsp. *huehuetenanguensis*).

Tra i suoi progenitori selvatici abbiamo anche *Tripsacum* spp., che è distribuito in alcune regioni degli Stati Uniti, dell'America centrale e fino al sud del Brasile, dove viene utilizzato come foraggio. Questo genere è composto da 16 specie, di cui 12 sono distribuite in Messico. Questo genere è diviso in due gruppi: (a) *Fasciculata* (ha cinque specie che si distinguono per la presenza di un pedicello sulla spighetta maschile) e (b) *Tripsacum* (ha 11 specie che non presentano pedicelli), come sottolinea Gonzalez-Ledesma, 2007 in CONABIO (2008).

In Perù, Grobman (1967) ha riportato solo la specie *Tripsacum australe* come parente più prossimo del mais. Mangelsdorf (Sevilla, 2005) menziona che è molto difficile per le specie di questo genere incrociarsi con il mais, motivo per cui ha sottolineato che è quasi impossibile che si sia verificata un'ibridazione tra loro in natura.

## 1.6 Domesticazione

L'addomesticamento è un processo evolutivo risultante dall'interazione umana con piante e animali. È considerata uno dei più grandi risultati della selezione ed evoluzione (Tian et al., 2009), in cui le specie in esame acquisiscono modifiche per selezione secondo vari criteri e requisiti. Queste modifiche forniscono nuove opportunità per l'agricoltura o l'allevamento e il loro adattamento a diversi ambienti. Questo processo ha anche influenzato l'evoluzione del mais nel tempo trasformando una pianta infestante del Messico centrale nella coltura più produttiva del mondo (Tian et al., 2009). La prima prova della domesticazione del mais risale a 9000 anni fa nella regione di Balsas, nel Messico sud-occidentale. Sebbene non siano stati trovati resti macro botanici di mais, sono stati trovati fitoliti di pannocchie (Piperno et al., 2009 in Stizer & Ross-Ibarra, 2018).

Nella regione di Balsas i coloni vivevano di attività come la caccia, la pesca e la raccolta. Come cita Itis, 2006 in Gonzáles (2008), questi gruppi umani consumavano le giovani spighe del teosinte, masticandole e succhiandole, come fonte di zucchero o per la fermentazione. Questo era di grande importanza nelle loro cerimonie e rituali. Una mutazione probabilmente avvenuta 7000 o 8000 anni fa ha permesso la modifica del glume esterno, permettendo la riduzione delle dimensioni ed insieme a fattori di ammorbidimento del chicco ha reso possibile il suo consumo umano (Doebley, 2004, Itis, 2006 in Gonzales, 2008).

Per capire il processo di addomesticamento del mais, sono stati realizzati molti studi genetici, i più importanti sono quelli che analizzano il caso da una prospettiva molecolare come quelli realizzati da Matsuoka et al. (2002), Tian et al. (2009); tuttavia, da anni si cerca di trovare una spiegazione provata su come il mais abbia avuto origine, Kato (2005).

Alcuni ricercatori pensano che sia impossibile ottenere la trasformazione dal teosinte al mais in soli 10.000 anni. D'altra parte, Beadle ed Emerson (come notato da Tian et al., 2009) considerano tali cambiamenti evolutivi possibili se guidati da cambiamenti in pochi geni importanti. Per Beadle (1980), il tratto 'carattere cariosside vestita' avrebbe giocato un ruolo importante nell'origine del mais. Ha anche considerato che la relazione tra capsule e cupole sarebbe una forte prova della direzione del cambiamento dal teosinte al mais. Tra i diversi esperimenti realizzati, quelli che riguardavano gli incroci tra mais e teosinte furono molto importanti perché riuscirono a stimare che cinque geni erano responsabili dei cambiamenti più notevoli nella conversione del teosinte in mais (Beadle, 1980). Sulla stessa linea, Tian (2009) sottolinea che dopo 20 anni la proposta di Beadle è stata convalidata attraverso la mappatura dei QTL; menziona anche che questi loci proposti da Beadle sono in realtà regioni del genoma che controllano caratteri quantitativi con un grande effetto.

Un altro studio presentato da Zhao et al. (2008) ha trovato che 17 dei 72 geni candidati analizzati in diverse varietà di mais hanno mostrato segni di selezione durante la domesticazione; hanno anche osservato che una parte di quei geni regolatori selezionati nello studio erano sovrarappresentati rispetto a quelli analizzati.

Uno studio di Tian (2009) ha analizzato una grande regione del cromosoma 10 che sembra essere coinvolta nell'adattamento e nella domesticazione, trovando che 1,1 Mb e più di 15 geni hanno perso diversità durante la selezione in quella regione come risultato del processo di domesticazione.

## 1.7 Evoluzione

Sul tema dell'evoluzione del mais, ci sono diversi studi che propongono vari episodi che si sono verificati durante il processo evolutivo del mais. Uno di questi studi propone un'origine allotetraploide del mais e si basa sull'analisi del tempo di coalescenza in 14 coppie di geni duplicati, che suggerisce un modello di allotetraploidia segmentale che si è verificato 11,4 milioni di anni fa, da due progenitori diploidi che si sarebbero differenziati circa 20,5 milioni di anni fa, uno dei quali condivide la maggiore somiglianza con il sorgo (Gaut et al., 1997). Un allotetraploide segmentale si riferisce a un organismo che porta due genomi parzialmente omologhi che provengono da due specie; e nel caso del mais questi sarebbero due genomi parzialmente omologhi con numeri base  $X = 5$ . Il mais sarebbe quindi un allotetraploide (Poggio et al., 2014).

La prima teoria sull'origine evolutiva di *Zea mays* L. è quella del mais a cariossido vestita, che si basa sul fatto che il mais ha avuto origine da una forma selvatica di mais in Sud America. Mangelsdorf fu colui che propose che il teosinte fosse un ibrido naturale di *Zea* e *Tripsacum*. Questa teoria fu poi scartata perché non era supportata da dati citogenetici e tassonomici.

La teoria successiva è quella del mais selvatico, che sostiene che il mais ha avuto origine da una forma selvatica di mais nativo, ora estinto, nella zona del Messico e del Guatemala. Randolph nel 1959 ha suggerito che gli antenati del mais coltivato erano una forma di mais selvatico. Tuttavia, il mais primitivo, il teosinte e il *Tripsacum* divergevano molto l'uno dall'altro prima che il mais selvatico si evolvesse in una pianta coltivata.

C'è anche la teoria del teosinte come antenato del mais, attraverso mutazioni e selezione. Questa teoria ha ricevuto un sostegno considerevole da diversi autori (Galinat, 1971; Mangelsdorf, 1986). Beadle fu in grado di ottenere i primi ibridi incrociando il mais con il teosinte. Studi citogenetici successivi hanno concluso che hanno cromosomi compatibili, il che spiega il raggiungimento di ibridi fertili. Nel 1970, Beadle fece nuovi incroci su larga scala, trovando differenze tra i genitori con gli F2 solo in 5 geni. Più tardi, nel 1976, Kato eseguì anche studi citogenetici sui nodi cromosomici di teosinte, giungendo alla stessa conclusione.

Studiando il DNA cloroplastico e 13 sistemi isoenzimatici in 56 popolazioni di teosinte e 99 di mais del Messico e del Guatemala, Doebley (1990) ha trovato congruenza con la teoria che il teosinte sia l'antenato del mais, la sottospecie *Z. mays* subsp. *parviglumis* viene indicata come progenitore selvatico per somiglianza e sarebbe situata nella valle del fiume

Balsas nel sud-ovest del Messico.

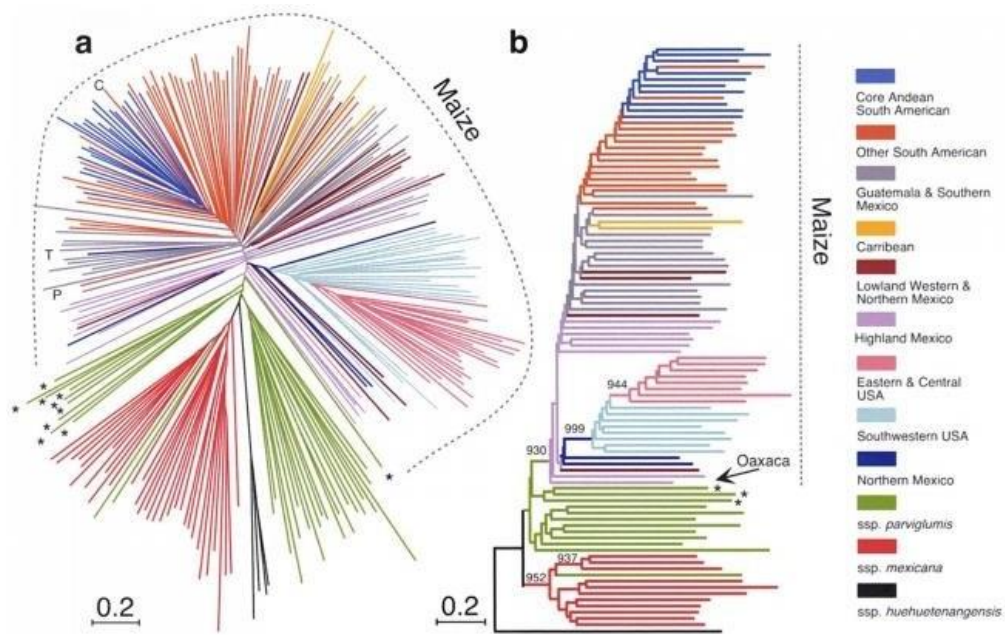
Nel 1979 una nuova teoria nasce con la scoperta di un nuovo teosinte (*Z. diploperennis*) suggerendo che il mais abbia un'origine tripartita, il mais deriverebbe quindi da un'ibridazione tra questo teosinte ed un mais estinto seguita poi da successive introgressioni con i genitori. Eubanks nel 1997 ha analizzato i frammenti di restrizione tra ibridi di teosinte con *Tripsacum*, trovando correlazioni intergenomiche, mettendole in relazione con la variazione dell'architettura della spiga. Con questi risultati Eubank propone che durante l'evoluzione del mais ci fu un'ibridazione tra un teosinte e *Tripsacum*, ma questa teoria non sarebbe d'accordo con le osservazioni di Galinat nel 1971.

C'è un'altra ipotesi che viene dall'integrazione dei dati di altri autori come Montgomery nel 1906 e Gay & Menetir nel 1978 con i risultati di Itis nel 1983 basati sulle caratteristiche delle infiorescenze maschili. Questa teoria fa riferimento ad una trasmutazione sessuale catastrofica tra il teosinte e un'erba sconosciuta. Tuttavia, questa teoria non concorda con le tappe proposte da Galinat per il passaggio dalla spiga di teosinte al mais, né con le tappe proposte da Doebley (2004).

### **Sull'ipotesi dell'origine monofiletica del mais**

Nell'ambito dell'ipotesi sull'origine monofiletica del mais, Beadle (1980) menziona che ci sono due scuole opposte, una seguita da Paul Mangelsdorf che propone che ci sia stato un antenato non ancora trovato del mais e un'altra di cui Beadle è un seguace, che propone che il mais sia derivato da teosinte e che poche mutazioni sarebbero state sufficienti per determinare l'origine del mais.

Per verificare quale delle due ipotesi sia quella corretta, alcuni studi sono stati sviluppati utilizzando strumenti molecolari; Matsuoka et al. (2002) hanno analizzato campioni di mais provenienti da diversi luoghi, dal mais nordamericano al mais sudamericano e anche diverse specie di teosinte. Utilizzando 99 microsatelliti gli autori hanno potuto osservare la separazione del gruppo di mais da teosinte della specie *parviglumis* (Balsas). In Figura 1.6 possiamo anche vedere che il mais sudamericano forma un gruppo separato dal mais messicano di pianura, dal altopiano, caraibico e americano.



Fonte: Matsuoka et al. 2002

Figura 1.6. Filogenesi di mais e teosinte con 99 microsatelliti

### 1.8 Diversità del mais in Perù

La diversità del mais è riportata come una qualità della specie stessa. Vigouroux et al. (2008) in uno studio su 350 ecotipi provenienti da vari paesi delle Americhe con 96 loci microsatelliti hanno scoperto che sono raggruppati in 4 gruppi principali: i più diversi negli altipiani del Messico, nel nord degli Stati Uniti, nei bassopiani tropicali e nelle Ande. Il secondo e l'ultimo sarebbero i meno diversificati geneticamente. Un altro studio (Sanchez et al., 2000) condotto nel 2000 con 300 accessioni di mais e 23 loci isoenzimatici ha anche riportato una minore diversità genetica nelle accessioni andine e nel mais dentato nordamericano.

Salhuana (2003) presenta una tabella con il numero di accessioni situate in ogni paese, in CIMMYT e in Ames-NSSL, dove si può vedere che il Perù è una delle zone con la maggiore diversità di accessioni, seguita dal Brasile, mentre il Paraguay è la zona con la minore diversità, con 654 accessioni (Tabella 1.2).

Salhuana (2003) nota che il concetto di razza utilizzato è basato su quello definito da Mayr nel 1942 e si riferisce a una popolazione che ha tratti morfologici e fisiologici comuni e quindi deve contenere geni comuni che determinano tali caratteristiche.

Salhuana (2003) racconta che negli anni '50 diversi paesi latinoamericani ricevettero finanziamenti dalla National Academy of Sciences - National Research Council, con l'appoggio del dottor Paul C. Mangelsdorf, consulente della Rockefeller Foundation; anche la dottoressa Barbara McClintock partecipò agli studi citogenetici delle collezioni. Il Perù ha ottenuto un importo di 25.000 dollari che ha permesso la classificazione della diversità razziale, identificando un totale di 52 razze che sono state descritte in un libro di Grobman et al. (1961).

Le razze di mais in Perù sono state divise in sei gruppi principali (Salhuana et al., 2002): a) Razze primitive, b) Derivate da razze primitive, c) Razze derivate recentemente, d) Razze introdotte, e) Razze incipienti e f) Razze imperfettamente definite. La Tabella 1.3 riassume il raggruppamento di tutte le razze di mais in Perù.

Tabella 1.2. Numero di accessioni di mais in vari paesi delle Americhe

PAESE	Numero di accessioni			
	In ogni paese	%	CIMMYT	Ames-NSSL
ARGENTINA	2,073	6	869	1,629
BOLIVIA	1,448	4	975	1,353
BRASILE	3,886	12	3,036	2,123
CILE	831	3	376	588
COLOMBIA	2,635	8	595	2,090
ECUADOR	1,140	4	1,140	909
GUATEMALA	937	3	937	480
MESSICO	9,317	29	8,690	4.867
PARAGUAY	654	2	654	478
PERU	3,931	12	1,762	2,024
URUGUAY	975	3	975	591
VENEZUELA	776	2	776	258
CUBA	302	1	302	209
AMERICA CENTRALE	963	3	963	650
STATI UNITI	1,926	6	1,926	1,926
Altri Caraibi	651	2	651	411
Totale	32,445	100	24,627	20,586

Fonte: Salhuana, (2003)



Tabella 1.3. Distribuzione delle razze peruviane in categorie secondo la derivazione

Razze di mais	Razze primitive	Confite morado
		Confite puntiagudo
		Kculli
		Confite puneño
		Enano
	Razze derivate da razze primitive	Rabo de zorro
		Chaparreño
		Chullpi
		Huyleño
		Paro
		Morocho
		Huancavelicano
		Ancashino
		Shujate
		Piscorunto
		Cusco cristalino amarillo
		Cusco
		Granada
		Uchuquilla
		Sabanero
		Piricinco
		Mochero
		Pagaladroga
		Alazán
		Razze di recente derivazione
	Chancayano	
	Perla	
	Rienda	
	San Gerónimo huancavelicano	
	Cusco gigante	
	Arequipeño	
	Chimlos	
Marañon		
Razze introdotte	Pardo	
	Arizona	
	Alemán	
	Cubano dentado amarillo	
	Chuncho	
Razze incipienti	Jora	
	Coruca	
	Morado	
	Cajabambino	

		Morado canteño
		Sarco
	Razze imperfettamente definite	Ajaledo
		San Gerónimo
		Perilla
		Tumbesino
		Colorado
		Chancayano amarillo
		Amarillo de huancabamba
		Blanco de Ayabaca

Fonte: Grobman et al. (1961)

Alcune di queste razze sono descritte di seguito.

### **La razza Alazán:**

Manrique (1988) segnala che Alazán appartiene al gruppo delle razze di prima derivazione ed è costituita da piante alte 2,20 m, di colore verde, che portano 13 foglie e fiori a 90 giorni. Le sue pannocchie sono lunghe 12 cm e larghe 4 cm, piccole e cilindriche. I grani sono farinosi di medie dimensioni e allungati di colore rosso, marrone o bianco e sono distribuiti nel Piura, Lambayeque e La Libertad. Sevilla (2005) riporta inoltre che circa 3000 ha sono dedicati a questotipo razziale. Salhuana et al. (2002) aggiunge che questo tipo di mais si trova in aree marginali con poca acqua.

### **Razza Mochero:**

Manrique (1988) descrive questa come una pianta di 1,6 m, di colore verde, ad 11 foglie e più precoce di Alazán, poiché fiorisce a 70 giorni. Le sue pannocchie sono piccole, 8 cm di lunghezza e 4 cm di diametro, e hanno forma cilindrico-sferoidale con file di grani irregolari, endosperma farinoso e grani principalmente bianchi, anche se a volte ci possono essere aleuroni bronzeei o rossi. Si trova nelle valli di Lambayeque, Moche a La Libertad. Salhuana et al. (2002) riferisce che si trova nelle valli aride e che è abbastanza resistente alla mancanza d'acqua poiché richiede una o due irrigazioni al massimo. Si stima che circa 2000 ettari siano dedicati a questa coltura (Sevilla, 2005).

### **Razza Chancayano:**

È riportata da Manrique (1988) come un tipo di seconda derivazione, costituita da piantati di 2,5 m, di colore verde, con 13 foglie; la fioritura avviene a 100 giorni. Le pannocchie sono 15 cm per 6 cm di diametro di forma cilindro-conica. I grani sono grandi e appiattiti con endosperma farinoso, bianco, alcuni con pericarpo rosso. È presente nella costa centrale, nella valle di Huaura a Lima e si irradia verso nord fino alla zona di Supe - Pativilca in Ancash (Salhuana et al., 2002). L'estensione riportata per questa razza è di 2000 ha ed è indicato che il suo uso è come mais (Sevilla, 2005).

### **Razza Chaparreo:**

Considerata come una razza di prima derivazione distribuita dalla costa centrale, dalla valle del Rimaca a Lima alla valle del fiume Tambo ad Arequipa (Salhuana et al., 2002). Produce pannocchie cilindriche di 11 cm circa per 4 cm di diametro e raggiunge un'altezza di 1,70 m, con fioritura a 80 giorni. I suoi grani sono bianchi, farinosi e raramente gialli. La polpa e il pericarpo sono incolori (Manrique, 1988).

### **La razza Canteo:**

Chiamata anche "mais viola", è classificata da Manrique (1988) e Salhuana (2002) all'interno del gruppo delle razze incipienti ed è formata da piante di altezza compresa tra 1,80 e 2,50 m, con steli, foglie e pannocchie viola. Presenta una fioritura a 110 giorni e può essere prolungata fino a 130 giorni. Le pannocchie, compresi i pericarpi dei grani e il tutolo, sono pigmentati di viola. Le pannocchie sono cilindriche coniche con 8-12 file di semi, di lunghezza fino a 15 cm per 5 cm di diametro. Si coltivano da 500 a 2500 m.s.l.m. nelle valli di Canta (Salahuana et al., 2002); tuttavia, si stanno testando e coltivando in altri luoghi come riportato da Medina (Medina et al., 2020) che descrive esempi di coltivazione in 28 zone del dipartimento di Cajamarca e fino ad altitudini che hanno raggiunto i 3175 m.s.l.m.

### **Razza Cusco Gigante:**

Questa razza di mais è coltivata nella Valle dell'Urubamba a Cusco e nel 2006 il grano è stato riconosciuto come Denominazione di Origine dall'Istituto per la Difesa della Concorrenza e la Protezione della Proprietà Intellettuale (INDECOP), come indicato nel file sviluppato da Lopez et al. (2005). Questa razza è considerata una razza di seconda derivazione secondo Manrique (1988) e si caratterizza per avere piante di altezza fino a 2,0

m di colore rosso chiaro con 10 foglie. Le piante hanno fioritura tardiva a 140 giorni, il che limita la coltivazione ad una volta all'anno. Le pannocchie raggiungono lunghezze di 18 cm per 7 cm di diametro. Sono ellissoidali con 8 file di grani grandi e piatti, caratteristica molto particolare di questo mais. L'endosperma è farinoso, bianco così come il tutolo, anche se a volte possono presentare colori marroni o a volte cristallini gialli. Il pericarpo è incolore. Sevilla (2005) indica che ci sono fino a 10000 ha coltivati. Questo mais viene esportato in Spagna, Giappone e Stati Uniti, dove viene lavorato e consumato fritto come snack (López et al., 2005).

#### **Razza San Geronimo:**

Salhuana et al. (2002) la descrivono come una razza formata da piccole piante con poche (tra 9 e 11) e piccole foglie; la pannocchia è impiantata nella parte inferiore della pianta. Le pannocchie sono a forma di melograno e bianche con grani rotondi e farinosi. Appartiene al gruppo delle razze imperfettamente definite. È distribuito nella valle del Mantaro nel Dipartimento di Junín e vive ad altitudini di 3200 m.s.l.m. Sevilla (2005) descrive che è usato come "mote" e "choclo", con una superficie di coltivazione di 8000 ha.

#### **Razza Huancavelicano:**

Classificata da Salhuana et al. (2002) e Manrique (1988) come razza di prima derivazione, è costituita da piccole piante che raggiungono 1,4 m di altezza con fusti e foglie di colore viola rossastro. Mancano di gemme del fusto alla base e hanno 11 foglie. La fioritura avviene tra 120 e 140 giorni. Le pannocchie sono sottili con dimensioni che raggiungono i 12 cm per 5 cm di diametro. Hanno 8 file di semi ed i grani sono spessi e appuntiti. L'endosperma è bianco e farinoso. Si coltivano nei dipartimenti di Huancavelica, Apurímac, Ayacucho e Junín.

#### **Razza San Gerónimo Huancavelicano:**

È considerata da Manrique (1988) come razza di seconda derivazione o di derivazione recente come la chiama Salhuana et al. (2002), è formata da piante di 1,20 m di altezza, colore rosso porpora, con 14 foglie e fioritura a 100 giorni (media a 134 giorni). Le pannocchie sono impiantate molto vicino al terreno ad una distanza di 20 cm e sono di forma conica e globosa di 10 cm di lunghezza per 6 cm di diametro, con 12 file di grani di medie dimensioni allungati e spessi. L'endosperma è bianco farinoso. Il pericarpo può essere incolore, rosso, marrone o variegato e anche il tutolo può avere lo stesso colore. È distribuito in tutta la valle del Mantaro nel dipartimento di Junín, raggiunge Huancavelica, fino

ad altitudini medie di 3100 m.s.l.m.

La Figura 1.7 mostra la mappa della diversità delle diverse razze che sono state documentate nel paese. Questa versione corrisponde alla nuova classificazione che è stata sviluppata con alcune accessioni che sono state introdotte tra il 2013 e il 2016 e che differisce dalla prima perché è stata sviluppata con le accessioni dal 1952 al 1989 (MINAM 2018).

# Mapa 4 RAZAS DE MAÍZ DEL PERÚ

PERU Ministerio del Ambiente

Los que más se exportan

**Cusco gigante**  
Total de exportación 2017  
6 058,2 toneladas  
US\$ FOB 12 111,492

**Maíz Morado**  
Total de exportación 2017  
890,8 toneladas  
US\$ FOB 1 286,7

Cantidad de razas por provincia



Número de regiones en las que se encuentra cada raza



Este mapa muestra la distribución y concentración de las razas de maíz en el Perú. Ha sido elaborado por el Ministerio del Ambiente, con información obtenida de las prospecciones realizadas del 2013 al 2016, en las 24 regiones y 189 provincias.

Figura 1.7. Mappa di distribuzione delle razze di mais peruviane

Fonte: MINAM (2018)

## 1.9 Importanza economica del mais

Il mais è una delle colture più importanti dal punto di vista economico in Perù e nel mondo, essendo una delle colture con la maggiore superficie coltivata in Perù, superiore alle colture transitorie come patata, riso e canna da zucchero e altre colture permanenti come cacao e caffè. Uno dei mais più coltivati in Perù è il mais vitreo, che è molto importante nella dieta delle famiglie andine. Un altro tipo di mais abbastanza coltivato in Perù è il mais ibrido dentato (YDM) che si differenzia dal mais vitreo, nei luoghi in cui si coltiva e nel suo uso (MINAM, 2018).

Per quanto riguarda la produzione di YDM, gli Stati Uniti guidano la produzione a livello mondiale, anche se la produzione durante le campagne 2019/2020 è diminuita dell'1,6% rispetto agli anni precedenti a causa delle condizioni meteorologiche. Questa diminuzione della produzione si vede anche in altri paesi con alta produzione, come la Cina e l'Argentina, tra gli altri. Questo calo della produzione globale di YDM potrebbe riflettersi in una riduzione dei prezzi a causa di un maggiore accumulo di scorte. D'altra parte, il consumo domestico di YDM è aumentato con ogni stagione. Anche gli Stati Uniti guidano il consumo interno a livello mondiale e, sebbene abbiano diminuito il loro consumo del 0,4% in questa stagione, questa maggiore offerta non implicherà un aumento dei prezzi (MINAGRI, 2019a).

Uno dei principali usi del YDM è nell'alimentazione animale, specialmente per gli allevamenti di bestiame e pollame. In Perù, il YDM viene coltivato soprattutto nella costa e nella giungla, essendo destinato principalmente alla produzione di mangimi equilibrati per l'industria avicola, l'industria suina e in quantità minori per l'alimentazione umana (farina, fiocchi, ecc.) (MINAM, 2018).

Il consumo di carne di pollo è uno dei più alti nel mondo e anche in Perù, con un tasso annuale di crescita attorno al 7,0% (MINAGRI, 2019b). Questo aumento del consumo di carne di pollo è collegato alla crescita della popolazione, soprattutto nelle città, raggiungendo un consumo pro capite di 50 kg nel 2017. Allo stesso modo, anche il consumo di carne di maiale è aumentato del 46%, raggiungendo 5,3 kg pro capite nel 2017. Questo aumento della domanda di pollame e maiale si è riflesso in un aumento del 12% della domanda di YDM da parte dell'industria del pollame e del maiale. La domanda di YDM supera l'offerta nazionale, per cui il 60-65% del fabbisogno totale deve essere importato (MINAM, 2018 e MINAGRI, 2019b).

Tabella 1.4. Dati sulla produzione di mais in Perù

Dipartimento	Superficie coltivata (ha)	Raccolto (ha)	Produzione (t)	Resa (t/ha)
Piura	13,340	9,410	39,870	3.70
Lambayeque	14,080	7,570	46,040	6.71
Ancash	12,480	10,860	124,870	10,65
La Libertad	12,060	9,690	84,130	8,58
Lima	9,900	10,620	107,490	9,50
Ica	15,220	15,310	153,620 mil	10,17
Arequipa	240	225,00	1,710	8,40
San Martín	28,730	39,870	102,540il	2,46
<b>Totale Nazionale</b>	<b>167,470</b>	<b>178,470</b>	<b>198,563</b>	<b>4,94</b>

Fonte: MINAGRI (2021).



Fonte: MINAGRI (2019).

Figura 1.8. Mappa che mostra le 23 regioni del Perù e le aree in cui si coltiva il mais ibrido dentato .



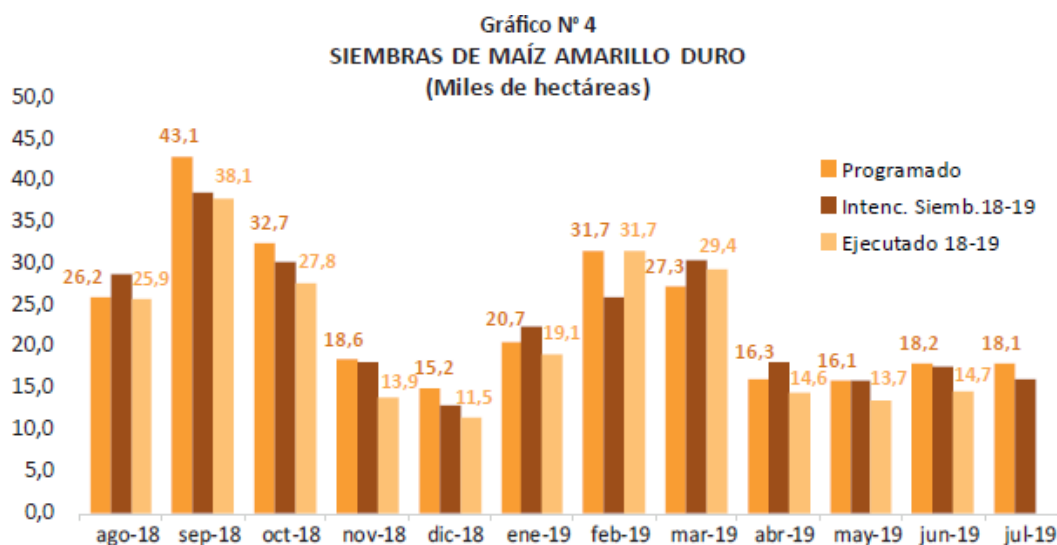
Come si può vedere nella Tabella 1.4 e Figura 1.8, il dipartimento con la più grande superficie coltivata di YDM in Perù è San Martin, con 28,730 ettari. Allo stesso modo, è anche il dipartimento della regione della giungla con la più grande superficie coltivata. Nella regione costiera, il dipartimento con la maggiore superficie coltivata è Ica con 15,220 ettari. Per quanto riguarda la produzione, i dipartimenti di Ica, Ancash, Lima e San Martin sono i dipartimenti con la maggiore produzione, con 153.620 t, 124.870 t, 107.490 t. e 102.540 t. rispettivamente. In termini di resa, i dipartimenti che si distinguono maggiormente sono Ancash, Ica, Lima, La Libertad e Arequipa, con rese di 10,65 t/ha, 10,17 t/ha, 9,50 t/ha, 8,58 t/ha e 8,40 t/ha. La Tabella 1.5 e le Figure 1.9, 1.10, 1.11 rappresentano l'evoluzione della produzione nazionale, della superficie piantata e del valore delle importazioni per diversi anni, dal 2002 al 2019 in alcuni casi.

Tabella 1.5. Produzione di mais dentato secondo la regione in Perù

Cuadro N° 7  
VARIABLES PRODUCTIVAS DEL MAÍZ AMARILLO DURO POR REGIONES 2010-2019

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2018* (ene-jun)*	2019 (ene-jun)*
<b>PRODUCCIÓN NACIONAL (t)</b>											
<b>TOTAL NACIONAL</b>	<b>1 283 621</b>	<b>1 260 123</b>	<b>1 392 972</b>	<b>1 365 239</b>	<b>1 227 562</b>	<b>1 438 562</b>	<b>1 232 383</b>	<b>1 249 600</b>	<b>1 265 072</b>	<b>604 211</b>	<b>572 730</b>
COSTA NORTE	543 693	527 267	605 311	564 504	438 062	558 455	439 783	426 002	467 230	215 356	182 698
COSTA CENTRO	361 907	357 108	377 582	361 163	363 412	438 058	373 409	403 042	335 620	150 346	149 982
COSTA SUR	1 908	2 678	7 803	6 604	2 932	1 598	1 598	1 327	1 843	407	190
SELVA ALTA	274 878	262 553	290 222	289 903	290 185	294 876	274 487	259 603	296 264	219 341	232 772
SELVA BAJA	101 236	110 518	112 055	143 068	132 972	145 575	143 104	159 626	164 115	57 897	51 204
<b>SUPERFICIE COSECHADA NACIONAL (ha)</b>											
<b>TOTAL NACIONAL</b>	<b>295 848</b>	<b>277 388</b>	<b>294 843</b>	<b>293 718</b>	<b>271 085</b>	<b>297 588</b>	<b>267 576</b>	<b>265 128</b>	<b>256 240</b>	<b>126 316</b>	<b>121 863</b>
COSTA NORTE	88 116	79 562	93 301	86 172	66 580	84 525	69 687	65 264	60 173	25 092	21 545
COSTA CENTRO	41 792	39 777	40 926	38 287	37 945	44 405	39 367	43 064	33 912	7 236	14 945
COSTA SUR	315	436	1 021	829	398	241	266	224	268	91	52
SELVA ALTA	118 592	110 029	116 145	117 605	116 671	114 477	106 246	99 196	104 195	65 563	67 684
SELVA BAJA	47 035	47 586	43 451	50 826	49 492	53 942	52 010	57 380	57 692	19 471	17 101
<b>RENDIMIENTO NACIONAL (kg/ha)</b>											
<b>TOTAL NACIONAL</b>	<b>4 339</b>	<b>4 543</b>	<b>4 724</b>	<b>4 648</b>	<b>4 528</b>	<b>4 834</b>	<b>4 606</b>	<b>4 713</b>	<b>4 937</b>	<b>4 783</b>	<b>4 700</b>
COSTA NORTE	5 246	5 461	5 350	5 488	5 277	5 708	5 640	5 915	6 659	6 776	6 930
COSTA CENTRO	8 600	8 936	9 192	9 394	9 508	9 931	9 481	9 367	9 834	9 767	10 039
COSTA SUR	4 603	4 831	5 392	5 157	4 923	4 904	4 346	4 468	5 133	4 572	4 307
SELVA ALTA	2 189	2 227	2 308	2 313	2 272	2 313	2 326	2 450	3 321	2 510	2 504
SELVA BAJA	2 219	2 283	2 409	2 540	2 503	2 505	2 579	2 660	2 791	2 800	2 859

Fonte: MINAGRI, 2019b



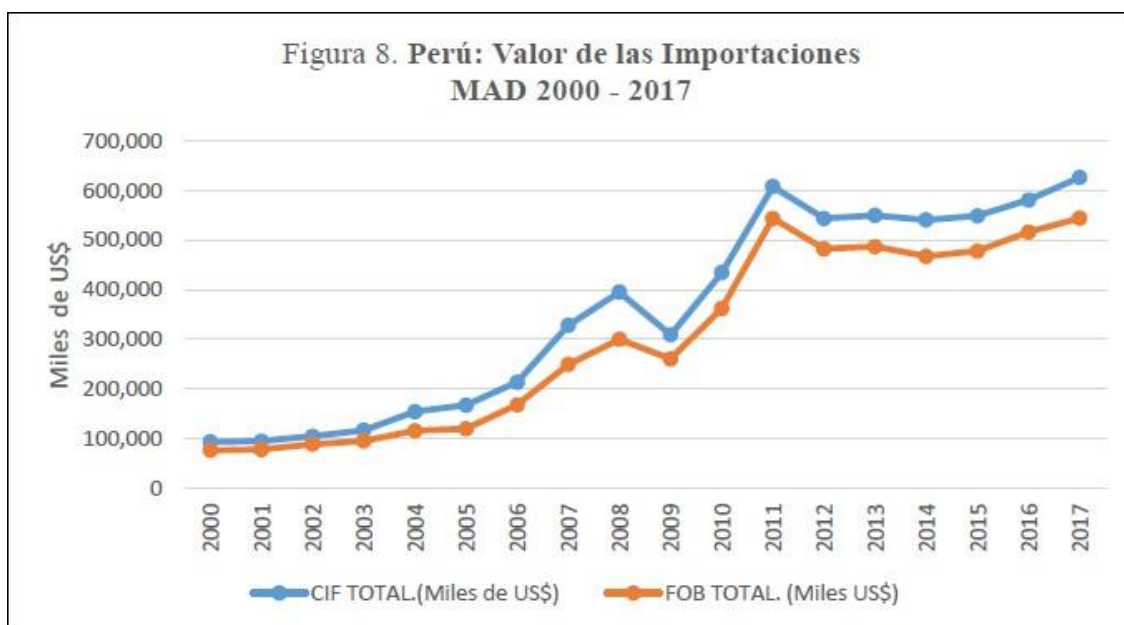
Fonte: MINAGRI, 2019b

Figura 1.9. Importazioni di mais dentato in Perù



Fonte: MINAGRI, 2019b

Figura 1.10. Importazione di mais dentato in Perù



Fonte: Escalante, 2018

Figura 1.11. Valore delle importazioni di mais dentato in Perù

## 1.10 Marcatori molecolari

I marcatori molecolari sono gli strumenti utilizzati per la caratterizzazione genetica degli organismi viventi. Possono essere utilizzati per diversi fini, quali ad esempio il miglioramento genetico assistito da marcatori molecolari (Ribaut & Hoisington, 1998; Schlotterer, 2004; Bedoya, 2012), identificazione di geni e/o regioni geniche di interesse, ricostruzioni filogenetiche etc... Recentemente sono state sviluppate anche tecnologie di sequenziamento di nuova generazione che permettono di caratterizzare un ingente numero di loci con costi e tempi relativamente brevi.

Dalla prima metà del XX secolo, la genetica ha aumentato il suo contributo alla conoscenza biologica e con essa la genetica delle popolazioni, che ha sviluppato anche tutto il supporto matematico per studiare come sono strutturate le popolazioni, mancavano però gli strumenti per accedere ai genotipi degli individui. Tuttavia, dalla metà del secolo scorso fino agli anni '80, sono state sviluppate metodologie per valutare i genotipi degli organismi sulla base del DNA (Caballero, 2017). Una delle tecniche che ha causato molto impatto è stata la reazione a catena della polimerasi (PCR) che è riuscita a posizionarsi come una tecnica molto versatile (Mullis, 1990; Ferreira et al., 1998). Tuttavia, oggi siamo nell'era genomica, dove sono state sviluppate metodologie di sequenziamento massivo di ultima generazione, che hanno generato un aumento esponenziale dei marcatori molecolari (Caballero, 2017) che permettono di accedere alla sequenza nucleotidica dei genomi completi di vari organismi. Tuttavia, le tecniche che potrebbero essere chiamate classiche, come quelle basate sul riconoscimento di brevi sequenze ripetute (SSR o microsatelliti) e AFLPs, continuano ad essere molto utili e importanti, poiché in qualsiasi laboratorio possono essere implementate per fare diagnosi genetiche rapide a basso costo.

### **Microsatelliti o ripetizioni brevi di sequenza (Simple Sequence Repeat, SSR)**

Si tratta di marcatori che si basano sul riconoscimento delle aree del genoma in cui abbondano brevi ripetizioni di poche decine o centinaia di paia di basi e che, per la loro natura ripetitiva, sono soggette a variazioni di numero causate da accoppiamenti errati o da "slittamenti" della polimerasi durante la replicazione, (Weaver, 2012). Questi marcatori hanno diversi vantaggi tra cui il tipo di eredità codominante, che permette di differenziare gli omozigoti dagli eterozigoti (Bedoya, 2012). Possono essere analizzati in sistemi di elettroforesi su agarosio,

poliacrilammide o analizzatori genetici; inoltre hanno una buona affidabilità, come notato da Bedoya (2012). Inoltre, sono considerati marcatori genetici molto informativi ed efficaci, secondo Goldstein, citato da Peña (2017).

Nel mais, diversi studi sono stati sviluppati applicando microsatelliti, come quello di Matsuoka (2002) che ha utilizzato questo marcatore per dimostrare l'origine monofiletica del mais in un'analisi di popolazioni di teosinte e mais. Altri studi effettuati sul mais messicano hanno utilizzato questi marcatori per valutare i parametri genetici di popolazione in alcune razze di mais di Sinaloa come quello effettuato da Pineda-Hidalgo (2013), utilizzando 28 accessioni per un totale di 396 individui e 20 microsatelliti, ottenendo 121 alleli che variavano da 2 a 8 per locus e una media di 6,1 alleli per locus. Inoltre, i livelli medi di diversità sono stati 0,72 e un indice di fissazione di 0,17 e hanno dimostrato che il mais di Sinaloa ha un'ampia base genetica. Anche lo studio presentato da Herrera-Saucedo (2018) è stato in grado di quantificare la diversità genetica nel mais nativo del Messico settentrionale per 8 razze, utilizzando 31 microsatelliti su 63 collezioni e 25 individui per collezione. Sono stati trovati 570 alleli con una media molto alta di 18,3 per locus e 87,9% di polimorfismo e 75,6% di diversità genetica. Altri studi come quelli di Perales et al. (2014), Warburton et al. (2011), Warburton et al. (2002), Bracco et al. (2013) hanno caratterizzato razze di mais autoctone in Argentina.

### **Polimorfismi in lunghezza dei frammenti amplificato (AFLP)**

La tecnica AFLP, descritta da Vos (1995) e Ferreira et al. (1998), consiste nel combinare la digestione del DNA con 2 enzimi di restrizione con la capacità della PCR di amplificare una grande quantità di frammenti di DNA. Uno degli enzimi di restrizione a taglio poco frequente, riconosce regioni di 6 nucleotidi come substrato in tutto il genoma. Il DNA viene inoltre digerito con un secondo enzima a taglio frequente, perché riconosce regioni di 4 nucleotidi; creando in questo modo un gran numero di frammenti classificati in 3 tipi: rari - rari, frequenti - frequenti e rari-frequenti. In quest'ultimo gruppo si realizzeranno reazioni di PCR, ma per questo si dovranno ancorare alle estremità dei frammenti di DNA degli oligonucleotidi chiamati adattatori mediante una reazione di ligazione, a sequenza nota e compatibile con le estremità create dagli enzimi di restrizione (di solito *EcoRI* e *MseI*). Dopo la ligazione vengono eseguite due reazioni di PCR, la prima è la pre-selettiva dove vengono utilizzati i primer *EcoRI* +1 e *MseI* +1, mentre la seconda reazione di PCR chiamata selettiva, viene eseguita sui prodotti della prima PCR usando i primer *EcoRI*

+3 nucleotidi arbitrari e *MseI* +3. In questo modo, si formano centinaia di frammenti di diverse dimensioni (lungi centinaia di paia di basi), che possono essere, per esempio, separati in un'elettroforesi su gel di poliacrilammide seguita da colorazione con nitrato d'argento o mediante etichettatura con digossigenina.

Tra i vantaggi dell'AFLP, come sottolineato da Vicente et al. (2004), ci sono il gran numero di frammenti che si formano con una semplice combinazione di primer, per cui può essere utilizzata per diversi scopi come la costruzione di mappe genetiche, la ricerca di marcatori associati, l'analisi della diversità genica, gli studi di filogenesi; tuttavia, ha anche degli svantaggi come il tipo di eredità dominante che si registra nella lettura dei dati e che rende impossibile differenziare tra omozigoti ed eterozigoti.

Anche se al giorno d'oggi sono state sviluppate tecniche genomiche basate sul sequenziamento, i marcatori AFLP sono ancora molto utili per la valutazione della diversità o nella ricerca di marcatori molecolari specifici (Giordani et al., 2018): per esempio Giordani et al. (2018) hanno utilizzato 4 combinazioni di primer specifici come strumenti per studiare la struttura della popolazione in linee inbred di mais, in modo da poter trovare marcatori associati alla risposta contro la ruggine meridionale. Nel loro studio hanno identificato 19 associazioni candidate ad essere valutate in ulteriori studi. Inoltre, gli AFLP sono stati applicati ad altre specie come descritto da Achleitner et al. (2008) in uno studio sull'avena dove 23 marcatori sono stati trovati associati a diversi tratti quantitativi.

### **1.11 Parametri di struttura Diversità genetica e struttura della popolazione**

Per valutare l'impatto delle forze evolutive sulle popolazioni naturali e artificiali di piante, animali e microrganismi, sono stati sviluppati una serie di parametri statistici che vengono utilizzati in biologia della conservazione, genetica delle popolazioni e nel miglioramento per capire meglio come la composizione genetica delle popolazioni si mantiene, cambia ed evolve nello spazio e nel tempo. Questi strumenti statistici ci permettono di studiare le popolazioni e di poter tracciare linee di base come riferimento per diverse colture, specie native, specie introdotte o specie di importanza culturale ed economica. In questo modo, i futuri studi di base o applicati possono essere pianificati in modo appropriato, minimizzando il impoverimento genetico delle popolazioni, che può portare a situazioni di omogeneità, deriva genetica, erosione ed estinzione, influenzando fortemente la

diversità genetica e quindi la loro risposta adattativa all'ambiente.

- **Loci polimorfici**

Il polimorfismo si riferisce in termini genetici alla coesistenza di due o più fenotipi alternativi in una popolazione o, a livello molecolare, si riferisce alla coesistenza di varianti nel DNA o negli alleli di un locus (de Vicente et al., 2004). Pertanto, definiamo un locus polimorfico quando la frequenza di uno dei suoi alleli è inferiore o uguale a 0,99 o 0,95, a seconda del grado di errore che vogliamo assegnare alla perdita che può generare la deriva genetica (Cavalli-Sforza et al., 1981).

- **Percentuale di polimorfismo**

Questo si riferisce al rapporto tra il numero di loci che soddisfano la condizione di "polimorfismo" rispetto al numero totale di loci analizzati.

- **Numero medio di alleli osservati**

Il numero di alleli diversi che sono stati identificati in una popolazione.

- **Numero medio di alleli effettivi o attesi**

Il numero di alleli che ci aspettiamo di trovare in un locus in una popolazione in panmissia.

- **Indice di diversità di Shannon**

L'indice è stato sviluppato da Shannon e Weaver nel 1949 per stimare la quantità di informazione in un sistema applicato alla diversità delle specie (Quispe, 2015) e afferma che maggiore è la diversità, più difficile è trovare un allele preso a caso.

- **La Eterozigosità attesa (diversità genetica), Nei (1978)**

Definito da Masatoshi Nei come la probabilità di trovare eterozigoti in un locus in una popolazione, si riferisce anche alla media dell'eterozigosità attesa in vari loci.

- **Indice Garza-Williamson**

È una stima sensibile per quelle popolazioni che hanno subito una riduzione nel numero e hanno subito un effetto "collo di bottiglia". Quando si studiano le variazioni nel numero

di motivi di ripetizione che si verificano in un locus microsatellite, la presenza di piccole differenze nel numero di ripetizioni tra gli alleli indicherebbe che questi alleli hanno avuto origine recentemente da un allele ancestrale. Tuttavia, quando ci sono alleli che mostrano differenze maggiori nel numero di ripetizioni, ciò indicherebbe che questa popolazione ha subito una forte riduzione del numero di riproduttori, cioè un effetto "collo di bottiglia" (Garza & Williamson, 2001).

- **Identità genetica, Nei**

È una misura basata sulle medie delle frequenze alleliche quadrate lungo il genoma, confrontando due popolazioni affini ed è espressa come un rapporto tra la somma del prodotto delle frequenze alleliche delle popolazioni X e Y ( $J_{XY}$ ), sulla radice quadrata del prodotto delle somme delle frequenze alleliche quadrate per ogni popolazione ( $\sqrt{J_X} \cdot \sqrt{J_Y}$ )

- **Distanza genica Nei**

L'identità genica descrive una trama esponenziale negativa e per linearizzarla, viene espressa come il logaritmo meno neperiano di tale identità genica; tuttavia in questa stima, Nei (1972) considera le stime di frequenza allelica per l'intera popolazione. Propone poi una modifica per i dati di frequenza allelica basati sul campione, Nei (1978) ed è conosciuta come "Nei Li's imparziale o unbiased gene distance".



**Corpo della ricerca**

## **2. Componente 1: Diversità genetica del mais peruviano**

## **2. Componente 1: Stato della diversità genetica razziale del mais**

### **2.1 Obiettivi**

#### **Obiettivo generale:**

- L'obiettivo principale di tale studio è la caratterizzazione del livello e della struttura della diversità genetica di popolazioni di mais Peruviano coltivate ancora on farm, sia in isolamento che in condizione di coesistenza con il mais ibrido dentato e il confronto con mais nativo conservato nella banca del germoplasma UNALM

#### **Obiettivi specifici:**

- Stimare i parametri genetici in 37 popolazioni appartenenti a 12 tipi razziali dalla banca del germoplasma dell'UNALM, di mais coltivato in zone di coesistenza con mais dentato e 3 razze di mais dell'altopiano e della giungla.
- Confrontare lo stato delle strutture di popolazione tra il mais conservato nella banca del germoplasma UNALM e quelli utilizzati come sementi per la coltivazione nei campi di Lambayeque.
- Determinare indirettamente lo stato del flusso genico tra il mais nativo e i mais ibridi dentati che hanno coesistito per più di 70 anni.
- Stabilire criteri che servano come una vera linea di base di biosicurezza.

## 2.2 Materiali e metodi

### 2.2.1 Materiale vegetale

Alcuni campioni provengono dalla costa settentrionale del Perù (Regione Lambayeque), dove c'è coesistenza con i mais ibridi dentati: 2 Alazan, 3 Mochero e un Chancayano. Dalla banca del germoplasma del Programma Cerealie Legumi, Sezione Mais UNALM, sono state prese miscele di diverse vecchie accessioni di ogni tipo di razza, formando i seguenti gruppi razziali: Alazan, Mochero, Chancayano e Chaparreo (tutti adattati alle condizioni costiere). Dagli altipiani sono stati presi i tipi razziali Canteño, Cusco Gigante, Huancavelicano, San Geronimo, San Geronimo Huancavelicano. Inoltre, nello studio sono stati incorporati anche; un campione di mais della razza Piricinco di Tarapoto nella giungla media bassa; dagli altipiani, campioni del Kculli da Cusco e 3 del mais Cabanaconde da Arequipa (una nuova razza proposta da Sevilla R. Comunicazione personale).

Un gruppo di campioni della banca del germoplasma UNALM, corrispondenti ad accessioni che sono state rinnovate alcuni anni fa (dal 2012 al 2014) sono stati incorporati per questo studio (Tabella 2.1). Questi campioni sono raggruppati in 9 popolazioni costituite da una miscela di 1, 2 o 3 accessioni ciascuna: 1 popolazione di Chancayano (accessioni E44 e E45), 1 di Mochero (accessioni ML6 e ML14), 1 Alazan (accessioni AL11 e AL16), 1 Canteño (CA12), 2 Cusco Gigante (accessioni CU15 e CU18), 2 Piricinco (T03, T04, SM21), 1 San Gerónimo Huancavelicano (SH87, SH129), 1 mais ibrido dentato di UNALM (accessioni PMX5, PMX212) e 1 delle varietà Dekalb (7088, 7500).

La Tabella 2.1 presenta l'elenco del materiale vegetale utilizzato e il numero di individui analizzati.

Da ogni tipo razziale della banca del germoplasma, sono stati presi a caso 200 semi, 50 sono stati fatti germinare e circa 24 piante sono state considerate per l'estrazione del DNA individuale. Questo numero è stato fissato sulla base di uno stimatore proposto da Warburton et al. (2002), che considera il numero minimo di individui che devono essere presi per avere una confidenza del 90% di prendere fino a 4 alleli in media per locus, se si considera un totale di 8 loci.

D'altra parte, dai campioni delle aree di coltivazione in Lambayeque, sono state

considerate quantità di 2 chilogrammi, da cui sono stati presi 200 semi a caso e 50 sono stati germinati per estrarre il DNA da 24. Per il mais ibrido, assumendo omogeneità tra gli individui e che lo stato di eterozigosi è rappresentato da 2 alleli diversi, 100 semi sono stati raccolti, 50 sono stati germinati e 12 sono stati presi per l'estrazione del DNA. Sono stati considerati 548 individui in totale nel primo gruppo di 28 popolazioni; successivamente sono stati incorporati altri 127 individui, raggruppati in 9 popolazioni (15 per tipo razziale e 11 pe ibrido), per un totale di 675 individui in 37 popolazioni: 27 mais locali delle diverse razze peruviane e 10 ibridi di mais dentato.

Equazione per determinare la dimensione del campione con microsatelliti (Warburton et al., 2002)

$$n > \frac{\log \left[ 1 - P^{\left( \frac{1}{m} \right)} \right] - \log(k-1)}{\log(1-P)}$$

n = Numero di individui da analizzare

m = N° di loci

k = N° di alleli

P = Probabilità di significato

**Tabella 2.1. Dati di provenienza dei tipi razziali nativi e del mais dentato raggruppati in 39 popolazioni (i colori differenziano l'origine del mais).**

N° Popolazione	Nome della popolazione e codice di accessioni	Provenienza	Distribuzione originale	Altitudine (mslm)	N° Individui
1	AB Alazàn banca LBQU – 001	Banca UNALM	Lambayeque	30 a 60	24
2	MB Mochero banca LBQU – 002	Banca UNALM	Lambayeque	30 a 60	24
3	CB Canteño banca Lima – 064	Banca UNALM	Canta - Lima	2800 a 3200	24
4	CYB Chancayano banca LIM – 030	Banca UNALM	Lima	60 a 100	22
5	CHB Chaparriño banca ICA – 012	Banca UNALM	Ica	300 a 500	21
6	CGB Cusco Gigante banca CUZ – 200	Banca UNALM	Cusco - Urubamba	2800 a 3200	24
7	HUB Huancavelicano banca HVCA – 080	Banca UNALM	Junín	3100 a 3400	23
8	SGH Huancavelicano banca SGHVCA – 001	Banca UNALM	Junín	3100 a 3400	21
9	SGB San Geronimo banca SG – 001	Banca UNALM	Ayacucho	2600 a 2800	21
10	CYI Chancayano INIA	Stazione sperimentale. Vista Florida	INIA	40 a 70	11
11	MT Mochero Túcume	Agricoltore Túcume	Lambayeque - Túcume	40 a 70	20
12	AT Alazàn Túcume	Agricoltore Túcume	Lambayeque - Túcume	40 a 70	24
13	AI Alazàn Illimo	Agricoltore Illimo	Lambayeque - Illimo	40 a 70	19
14	MMA Mochero Mochumí 1	Negoziò di semi Mochumi	Lambayeque - Mochumí	40 a 70	24
15	MMB Mochero Mochumi 2	Mercato Mochumi	Lambayeque - Mochumí	40 a 70	24
16	PI Piricinco Tarapoto	Tarapoto	San Martin - Tarapoto	200 a 500	18
17	K Kully Cusco	Mercato Calca	Cusco - Calca	2900 a 3200	12
18	CA Cabanita	Agricoltore Cabanaconde	Arequipa - Cabanaconde	3100 a 3300	72
19	PN Cabanita	Agricoltore Pinchollo	Arequipa - Pinchollo	3500 a 3700	12
20	MA Cabanita	Agricoltore Madrigal	Arequipa - Madrigal	3500 a 3700	12

21	HA	Ibrido Pioneer 30K73	Negozio di semi	Importato	----	12
22	HB	Ibrido Pioneer 3862	Negozio di semi	Importato	----	12
23	HC	Ibrido Pioneer 30F35	Negozio di semi	Importato	----	12
24	HD	Ibrido INIA 605	Stazione sperimentale Vista Florida	Lambayeque - Ferreñafe	40 a 70	12
25	HE	Ibrido INIA 608	Stazione sperimentale Vista Florida	Lambayeque - Ferreñafe	40 a 70	12
26	HF	Ibrido INIA 611	Stazione sperimentale Vista Florida	Lambayeque - Ferreñafe	40 a 70	12
27	HG	Ibrido INIA 609	Stazione sperimentale Vista Florida	Lambayeque - Ferreñafe	40 a 70	12
28	HI	Compuesto 617 "La Chusca"	Stazione sperimentale Vista Florida	Lima	240	12
29	ABU	Alazàn Lambayeque (AL-11)	Banca UNALM - Chiquero	Lambayeque	40 a 70	15
		Alazàn Lambayeque (AL-16)	Banca UNALM - Chiquero	Lambayeque	40 a 70	
30	MBU	Mochero Lambayeque (ML-06)	Banca UNALM - La Molina	Lambayeque	40 a 70	15
		Mochero Lambayeque (ML-14)	Banca UNALM - La Molina	Lambayeque	40 a 70	
31	CYU	Chancayano (Lima - E44)	Banca UNALM - La Molina	Lima	240	15
		Chancayano (Lima - E45)	Banca UNALM - La Molina	Lima	240	
32	CBU	Canteño - (CA12)	Banca UNALM - Chiquero	Canta - Lima	2800 a 3200	15
33	CGBU	Cuzco Gigante (CU-15)	Banca UNALM - Chiquian	Cusco - Urubamba	2800 a 3200	15
		Cuzco Gigante (CU-18)	Banca UNALM - Junín	Junín - Huancayo	3200 a 3400	
34	PIU	Piricinco - Loreto (T03)	Banca UNALM - Loreto	Loreto	200 a 500	15
		Piricinco - Loreto (T04)	Banca UNALM - Loreto	Loreto	200 a 500	
		Piricinco - San Martín 21	Banca UNALM - San Martín	San Martín	200 a 500	
35	SGHU	San Gerónimo Huancavelicano Ayacucho (SH87 y SH129)	Banca UNALM - Chiquian	Ayacucho	2600 a 2800	15
36	HJ	PM - MAD - (PMX-5)	UNALM - La Molina 2017	Lima	240	11
		PM - MAD- (PMX-212)	UNALM - Chinchá 2014	Lima	240	
37	HK	DEKALB - 7088	Lima 2017	Asociación Peruana de Semillas	---	11
		DEKALB - 7500	Lima 2017	Asociación Peruana de Semillas	---	

### 2.2.2 Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, è stato utilizzato il protocollo di Doyle e Doyle (1990) modificato secondo il manuale dal Laboratorio di Biologia Molecolare delle Piante del Centro Internazionale della Patata (1999).

Il DNA è stato ottenuto da foglie tenere di piantine germinate. Per questo, porzioni di circa un grammo sono state prese e messe nei mortai. Poi è stato aggiunto l'azoto liquido ed è stata effettuata la macinazione. Circa 100 mg di foglie macinate sono stati messi in ciascuna delle microprovette sterili da 1,5 ml, dove sono stati aggiunti 700 µl di tampone CTABal 2% contenente 2µl di B-mercaptoetanololo. È stato mescolato più volte per inversione e posto in un bagno d'acqua per 40-45 minuti a 65°C, ripetendo l'agitazione di ogni provetta ogni 10-15 minuti. Alla fine di questo tempo, è stato lasciato raffreddare per 5 minuti a temperatura ambiente.

Per separare le fasi acquose contenenti DNA dai detriti organici e cellulari, sono stati usati 700 µl di cloroformio: alcool isoamilico (24:1), aggiunti a ciascuna provetta e poi agitati per inversione. Si è proceduto a centrifugare per 5 minuti a 10000 rpm. Poi, il supernatante è stato trasferito in una nuova provetta e il tampone CTAB al 10% (50 µl) è stato aggiunto di nuovo, mescolando delicatamente. 700 µl di cloroformio: alcool isoamilico (24:1) sono stati aggiunti nuovamente, mescolati per inversione e centrifugati per 10 minuti.

Il surnatante (fase acquosa) è stato trasferito in una nuova provetta, dove sono stati aggiunti 1000 µl di etanolo assoluto freddo per precipitare il DNA per diverse ore a -20°C.

Dopo la precipitazione a freddo, il pellet è stato centrifugato per 15 minuti a 10000 rpm, l'etanolo è stato rimosso e le provette sono state lasciate asciugare a temperatura ambiente. Il pellet è stato poi lavato due volte con etanolo al 70% per 3 minuti. Il pellet è stato centrifugato e tutto l'etanolo è stato rimosso. Il pellet è stato lasciato asciugare di nuovo. Il pellet è stato risospeso in tampone TE in un bagno d'acqua a 55°C.

L'ultimo passo del processo consisteva nell'aggiungere 1µl di RNase [10mg/ml] ad ogni tubo per degradare tutto l'RNA co-precipitato. È stato incubato per un'ora a 37°C. In seguito, sono state valutate la qualità e la concentrazione; successivamente, sono state preparate le diluizioni di lavoro e lo stock di DNA è stato conservato a -20°C.



### **2.2.3 Determinazione della qualità e quantificazione del DNA**

La determinazione della qualità del DNA nei campioni è stata eseguita mediante elettroforesi orizzontale in gel di agarosio all'1% in tampone TBE 1X, utilizzando il DNA fagico  $\lambda$  tagliato con *HindIII* come standard dimensionale. I risultati sono stati visualizzati su un fotodocumentatore Biometra UVsolo TS e quantificati su uno spettrofotometro Epoch 2. Sulla base delle concentrazioni, sono state preparate diluizioni di lavoro ad una concentrazione di 10 ng/ $\mu$ l. L'allegato 1 presenta i valori di qualità e concentrazione del DNA.

## 2.2.4 Amplificazione PCR dei microsatelliti:

Sulla base di diversi studi di diversità genetica condotti nel mais e della nostra proposta per il LAC Biosafety Project, sottoprogetto Gene Flow in Maize, abbiamo selezionato un totale di 41 coppie di primer utilizzati in altri studi come Warburton et al. (2002), Vigoroux et al. (2008), Maize GDB (<https://www.maizegdb.org/>). Da questo set di primer ne abbiamo scelti 8 che hanno mostrato un alto livello di polimorfismo. L'elenco completo è presentato nell'Appendice 2 e nel corpo di questa parte dello studio, indichiamo solo gli 8 selezionati che sono mostrati nella Tabella 2.2.

Per la miscela di reazione e il programma di amplificazione, sono stati utilizzati i protocolli modificati presentati nell'International Potato Center's Manual of Molecular Biology Protocols in Plants (1999).

La miscela di reazione era composta da: dNTPs [0.2mM]; primer a [1.5 µM]; MgCl<sub>2</sub> [2.5 mM]; 10 ng di DNA genomico; DNA Taq polimerasi [0.5 U] in tampone 1X. Acqua distillata è stata aggiunta per formare il volume di 10 ul; questi valori sono presentati nella Tabella 2.3.

Sono stati utilizzati 3 programmi di amplificazione con touchdown (Tabelle 2.4, 2.5 e 2.6). Di questi programmi, il primo è il più semplice e genera profili di amplificazione definiti e chiari per i primers del locus Phi116 (ZM15). Il programma 2 è più lungo e ha prodotto buoni frammenti di amplificazione per i primer bnlg1169 (ZM04), bnlg1839 (ZM22), Phi034 (ZM25), Phi 056 (ZM27), Phi109188 (ZM31) e umc1153 (ZM37). Il terzo programma è più lungo e ha funzionato solo per il primer Phi227562(ZM33).

**Tabella 2.2. Primer microsatelliti selezionati per il mais**

Codice e nome del locus	Direzione	Sequenze (5'→3')	Motivo	N°nt	% GC	Tm (°C)	Temperatura di appaiamento (°C)	PIC
<b>ZM04 = p-bnlg1169</b>	F	CTAAGCTAGACACGGCCCTG	(TTA)	20	60	61.4	60.8	
	R	GATCTCGTCCCGATTTTCAA		20	45	57		
<b>ZM15 = p-phi116</b>	F	GCATACGGCCATGGATGGGA	Comp.	20	60	64.5	56	0.78
	R	TCCCTGCCGGGACTCCTG		18	65	66.73		
<b>ZM22 = p-bnlg1839</b>	F	AGCAGACGGAGGAAACAAGA	(AG)	20	50	60.7	64.1	
	R	TCTCCCTCTCCCTCTTGACA		19	57.9	60.5		
<b>ZM25 = phi034</b>	F	TAGCGACAGGATGGCCTCTTCT	(CCT)	22	54.5	68.15	56	0.84
	R	GGGGAGCACGCCTTCGTTCT		20	65	71.77		
<b>ZM27 = phi056</b>	F	ACTTGCTTGCTGCCGTTAC		20	55	66.3	56	0.7
	R	CGCACACCACTTCCCAGAA		19	57.9	57.9		
<b>ZM33 = phi227562</b>	F	AAGCTCAGAAGCCGGAGC	(AAAG)	18	61.1	64.77	54	0.71
	R	GGTCATCAAGCTCTGTATCG		21	52.4	63.84		
<b>ZM31 = phi109188</b>	F	TGATAAAGCTCAGCCACAAGG		21	47.6	64.08	54	0.79
	R	ATCTCGGCTACGGCCAGA		18	61.1	65.92		
<b>ZM37 = umc1153</b>	F	CAGCATCTATAGCTTGCTTGCAAT		24	41.7	65.2	54	0.72
	R	TGGGTTTTGTTGTTGTTGTTG		24	33.3	66.23		

**Tabella 2.3. Componenti della miscela di reazione PCR**

<b>Componenti [iniziale]</b>	<b>Concentrazione finale</b>
Buffer Taq DNApol 10X [Tris base 900mM + NH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 200mM]	1X
DNA genomico	10ng
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	2.5 mM
dNTPs [2.5 mM]	0.2 mM
Primer Forward [2 µM]	0.15 µM
Primer Reverse [2 µM]	0.15 µM
Taq DNA pol [5U/µl]	0.5 U
Acqua distillata ultra pura	q.b.
Volume finale	10 µl

**Tabella 2.4. Programma di amplificazione PCR 1.**

	T (°C)	Cicli	Tempo
<b>Denaturazione</b>	94	1X	2.0
<b>Denaturazione</b>	94		0.20
<b>Appaiamento</b>	65 -1/ciclo	5X	1.00
<b>Estensione</b>	72		2.00
<b>Denaturazione</b>	94		0.20
<b>Appaiamento</b>	60	30X	1.00
<b>Estensione</b>	72		2.00
<b>Estensione</b>	72	1X	7.00
<b>Fine</b>	10	1X	∞

**Per il primer ZM15 ( Phi 116)**

**Tabella 2.5. Programma di amplificazione PCR 2**

	T (°C)	Cicli	Tempo
<b>Denaturazione</b>	94	1X	2.00
<b>Denaturazione</b>	94		0.30
<b>Appaiamento</b>	55 -1/ciclo	5X	0.30
<b>Estensione</b>	72		1.00
<b>Denaturazione</b>	94		0.30
<b>Appaiamento</b>	50	10X	0.30
<b>Estensione</b>	72		1.00
<b>Denaturazione</b>	94		0.30
<b>Appaiamento</b>	50 -1/ciclo	5X	0.30
<b>Estensione</b>	72		1.00
<b>Denaturazione</b>	94		0.30
<b>Appaiamento</b>	45	10X	0.30
<b>Estensione</b>	72		1.00
<b>Estensione</b>	72	1X	5.00
<b>Fine</b>	10	1X	∞

**Per i primer: ZM04, ZM22, ZM25, ZM27, ZM31, ZM37**

**Tabella 2.6. Programma di amplificazione PCR 3.**

	<b>T (°C)</b>	<b>Cicli</b>	<b>Tempo</b>
<b>Denaturazione</b>	94	1X	1.00
<b>Denaturazione</b>	94		0.30
<b>Appaiamento</b>	62	14X	0.30
	-		
	0.5/ciclo		
<b>Estensione</b>	72		1.00
<b>Denaturazione</b>	94		0.30
<b>Appaiamento</b>	55	10X	0.30
<b>Estensione</b>	72		1.00
<b>Denaturazione</b>	94		0.30
<b>Appaiamento</b>	55	10X	0.30
	-		
	0.5/ciclo		
<b>Estensione</b>	72		1.00
<b>Denaturazione</b>	94		0.30
<b>Appaiamento</b>	50	10X	0.30
<b>Estensione</b>	72		1.00
<b>Estensione</b>	72	1X	5.00
<b>Fine</b>	10	1X	∞

**Per primer: ZM33**

### 2.2.5 Elettroforesi in poliacrilammide

I prodotti amplificati dalla PCR sono stati separati su gel di poliacrilammide, preparati seguendo il protocollo del manuale di laboratorio di biologia molecolare dell'International Potato Center (1999). Per prima cosa bisogna preparare i vetri, che hanno dimensioni di 35 cm x 30 cm. I vetri vengono accuratamente lavati con etanolo al 96%, rimuovendo tutti i resti con carta velina. Poi si prepara la soluzione di adesione, composta da 3µl di Bind Silane, 1 ml di acido acetico glaciale 0,5% in etanolo 95%. Si sparge bene su tutto il vetro per tutta la lunghezza e la larghezza della superficie.

Dopo aver aspettato 5 minuti che il Bind Silane si asciughi, pulire delicatamente la camera 3 volte con etanolo al 95%, rimuovendo l'adesivo in eccesso. La camera viene lavata altre 3 volte con etanolo al 96% e poi la soluzione repellente Rain X viene applicata sull'altro vetro con una carta velina, l'eccesso viene rimosso e lasciato per 10 minuti.

Una volta che i vetri sono pronti, uno con la soluzione adesiva e l'altro con il repellente, la camera viene assemblata con i distanziatori di 0,4 mm di spessore alle estremità e i dispositivi di fissaggio.

Preparare il gel al 6% di poliacrilamide: 40 ml di acrilamide [57g/l], Bis - acrilamide [3g/l], 7M Urea e 1X TBE; aggiungere 40 µl di TEMED e 400 µl di persolfato di ammonio al 10%.

Subito dopo che la miscela di gel è stata preparata, viene versata con attenzione nello spazio tra i vetri, evitando la formazione di bolle. Il gel è posto orizzontalmente con un pettine a denti di squalo. Si lascia polimerizzare per circa un'ora.

Pre-esecuzione del gel: il gel viene pre-corso a 500 V per 15-30 minuti fino a quando la temperatura raggiunge circa i 50 °C. A questo punto vengono caricati i campioni.

Ogni campione viene preparato con un tampone di caricamento composto da 500 µl di EDTA 0.2M e 100 µl di xilene cianolo e blu di bromofenolo 50 mg/ml in una soluzione di formamide (9.4 ml).

I campioni vengono denaturati a 94°C per 3 minuti, immediatamente raffreddati in ghiaccio e caricati con una micropipetta. L'elettroforesi viene eseguita a 1200V per cinque o sei ore o a 200V durante la notte.

Per la colorazione del gel, sono stati seguiti i seguenti passi:

Fissazione, una volta terminata l'elettroforesi, il sistema viene smontato e il vetro contenente il gel viene posto in un vassoio con soluzione fissativa per 10 minuti (Tabella 2.7). Colorazione, dopo il primo passo, il vetro con il gel viene posto nella soluzione colorante

con nitrato d'argento per 10 minuti (Tabella 2.8). Lavaggio, il gel viene poi immerso in acqua distillata, drenato e trasferito rapidamente nel vassoio per un'altra soluzione. Sviluppo e fissazione, il gel viene immerso nella soluzione di sviluppo (Tabella 2.9) e con una delicata agitazione si attende fino all'comparsa delle bande, poi si trasferisce nella soluzione stop che è uguale alla soluzione fissativa per 5 minuti, risciacquando con acqua distillata e lasciando asciugare il vetro a temperatura ambiente.

**Tabella 2.7. Soluzione fissativa per elettroforesi**

<b>Componente</b>	<b>quantità</b>
Etanolo assoluto	100 ml
Acido acetico glaciale	5 ml
Acqua distillata	895 ml

**Tabella 2.8. Soluzione di colorazione al nitrato d'argento**

<b>Componente</b>	<b>quantità</b>
Acqua distillata	1000 ml
Nitrato d'argento	2 g

**Tabella 2.9. Soluzione di sviluppo**

<b>Componente</b>	<b>quantità</b>
Idrossido di sodio	30 g
Sodio Formaldeide 37%	6 ml
Acqua distillata	994 ml

## 2.2.6 Digestione, legatura e amplificazione di AFLP

Per lo studio di marcatori AFLP è stato seguito il protocollo sviluppato da Vols (1995), che combina la digestione RFLP e la reazione a catena della polimerasi (PCR). È una tecnica ampiamente utilizzata per studi di genotipizzazione e di identificazione dei geni (Liu et al., 2012), diversità genetica, mappatura genetica, filogenesi e domesticazione (Spooner et al., 2005), ecc.

Le fasi della procedura che sono state seguite sono state:

- a) **Digestione:** I campioni di DNA genomico, diluiti ad una concentrazione di 50 ng/μl sono stati digeriti con gli enzimi *EcoRI* (G|AATTC) di taglio raro e con *MseI* (C|CGG) di taglio frequente. Per questo, 5 μl di DNA (100 ng/μl), 2.0 μl di *EcoRI* (10U/μl) e 0.5 μl di *MseI* (10 U/μl) e 2 μl di 1X Tango buffer sono stati messi nei tubi e portati ad un volume finale di 20 μl (Tabella 2.10), incubati per 16 ore a 37°C. Dopo questo tempo la reazione è stata fermata ponendo i campioni a 70°C per 15 minuti e immediatamente trasferiti su ghiaccio.

**Tabella 2.10. Miscela di reazione di digestione del DNA**

Componenti e concentrazioni	Volume (μl)
Buffer Tango 10X	4.00
Template di DNA genomico [100 ng/μl]	5.00
Eco RI [10U/μl]	2.00
Mse I [10U/μl]	0.50
Acqua distillata ultra pura	q.b.
Volume finale	20

- b) **Ligazione degli adattatori:** i frammenti di DNA digeriti sono posti nella reazione di ligazione degli adattatori: uno compatibile con l'estremità *EcoRI* e l'altro con l'estremità di taglio *MseI*. Le reazioni sono state eseguite prendendo 20 μl di DNA digerito, aggiungendo 5 μl di miscela di ligazione, preparata secondo le indicazioni della Tabella 2.11. Le provette con questa miscela vengono incubate per una notte a temperatura ambiente.



**Tabella 2.11. Miscela di reazione di ligazione degli adattatori**

Componenti e concentrazioni	Volume ( $\mu$ l)
Adattatore <i>EcoRI</i> [10 $\mu$ M] (*)	1.00
Adattatore <i>MseI</i> [100 $\mu$ M] (**)	1.00
Buffer di ligasi T4 con ATP [10X]	2.50
T4 DNA ligasi [1U/ $\mu$ l]	0.20
Acqua distillata ultra pura	0.30
Volume finale	5.00

(\*) Adattatore *EcoRI* (EcoA1): 5' -CTC GTA GAC TGC GTA CC- 3'

(\*) Adattatore *EcoRI* (EcoA2): 5' -AAT TGG TAC GCA GTC- 3'

(\*\*) Adattatore *MseI* (MseA1):5' -GAC GAT GAG TCC TGA G- 3'

(\*\*) Adattatore *MseI* (MseA2): 5' -TAC TCA GGA CTC AT- 3'

- c) **Preamplificazione PCR con primer non specifici +0 e +1:** Una volta terminata la reazione di ligazione degli adattatori, i campioni di DNA digerito e ligato vengono diluiti in tampone TE con un rapporto 1:5. Questa diluizione serve come DNA templato per la reazione PCR, che utilizza i primer non specifici + 1. La Tabella 2.12 presenta la reazione di preamplificazione utilizzata in questa fase: un volume di reazione di 25  $\mu$ l contiene 5  $\mu$ l della reazione di ligazione [1:5], 1.0  $\mu$ l di ciascuno primer (*EcoRI*+0 e *MseI*+1), 2.5  $\mu$ l di dNTPs, 1.5  $\mu$ l di  $MgCl_2$ , 2.5  $\mu$ l di Taq DNA polymerase buffer, 0.20  $\mu$ l di Taq DNA polymerase. Ogniprovetta con la miscela di reazione è stata posta in un termociclatore Applied Biosystem Veriti model e il DNA è stato amplificato utilizzando il programma presentato nella Tabella 2.13.

**Tabella 2.12. Miscela di reazione di preamplificazione con primer +0 e +1**

Componenti	Concentrazione finale
Buffer Taq DNApol 10X [Tris base 900mM + $NH_4(SO_4)_2$ 200mM]	1X
DNA con adattatori diluiti [1:5]	2 $\mu$ l
$MgCl_2$ [25mM]	1.5 [mM]
dNTPs [2.5 mM]	0.3mM
Primer <i>EcoRI</i> +0 [10 $\mu$ M] (*)	0.40 [ $\mu$ M]
Primer <i>MseI</i> +1 [10 $\mu$ M] (**)	0.40 [ $\mu$ M]
Taq DNA pol [5U/ $\mu$ l]	1 U
Acqua distillata ultra pura	q.b.
Volume finale	25 $\mu$ l

(\*) Primer *EcoRI* +0: 5' -GAC TGC GTA CCA ATT C-3'

(\*\*) Primer *MseI* +1: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA A|A- 3'

**Tabella 2.13. Programma di amplificazione non selettiva con primer +0 e +1**

	T (°C)	Cicli	Tempo
<b>Denaturazione</b>	94	1X	4.0
<b>Denaturazione</b>	94		0.30
<b>Appaiamento</b>	56	22X	1.00
<b>Estensione</b>	72		1.00
<b>Estensione</b>	72	1X	5.00
<b>Fine</b>	10	1X	∞

- d) **Amplificazione selettiva del DNA mediante PCR:** una volta completata la preamplificazione, si esegue un test di verifica mediante elettroforesi orizzontale in gel di agarosio al 3,0%.

Per la reazione di amplificazione selettiva sono state testate 6 combinazioni di primer specifici +3: E-33/M-41, E-33/M-61, E-33/M-40, E-33/M-47, E-35/M-50, E-41/M-48, scegliendo le prime 3 combinazioni per mostrare un maggiore polimorfismo. Con ciascuna delle coppie di primer, le reazioni di amplificazione sono state effettuate prendendo 2,0 ul di DNA preamplificato [1/20], aggiungendo i componenti presentati nella Tabella 2.14. I campioni sono stati poi messi in un termociclatore Applied Biosystem Veriti per l'amplificazione, secondo il programma presentato nella Tabella 2.15. I frammenti amplificati sono stati separati mediante elettroforesi in poliacrilammide con colorazione al nitrato d'argento, come descritto nelle sezioni precedenti.

**Tabella 2.14. Miscela di reazione di amplificazione selettiva con +3 primer**

Componenti	Concentrazione finale
Buffer Taq DNApol 10X [Tris base 900mM + NH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 200mM]	1X
DNA preamplificato diluito [1:20]	2 µl
MgCl <sub>2</sub> [25mM]	2.75 [mM]
dNTPs [2.5 mM]	0.3 mM
Primer <i>EcoRI</i> +3 [50 ng/µl] (*)	10 [ng/µl]
Primer <i>MseI</i> +3 [50 ng/µl] (**)	1.5 [ng/µl]
Taq DNA pol [5U/µl]	1 U

Acqua distillata ultra pura  
Volume finale

q.b.  
10  $\mu$ l

- (\*) Primer *EcoRI* +3 (E33): 5' -GAT GAG TCC TGA GTA A|AGG- 3'  
 (E35): 5' -GAC TGC GTA CCA ATT C|AC A- 3'  
 (E41): 5' -GAC TGC GTA CCA ATT C|AG G- 3'
- (\*\*) Primer *MseI* +3 (M41): 5' -GAT GAG TCC TGA GTA A|AGG- 3'  
 (M47): 5' -GAT GAG TCC TGA GTA A|CAA-3'  
 (M61): 5' -GAT GAG TCC TGA GTA A|CTG-3'  
 (M40): 5' -GAT GAG TCC TGA GTA A|AGC-3'  
 (M50): 5' -GAT GAG TCC TGA GTA A|CTT-3'  
 (M48): 5' -GAT GAG TCC TGA GTA A|CAC-3'

Tabella 2.15. Programma di amplificazione selettiva con +3 primer

	T (°C)	Cicli	Tempo
<b>Denaturazione</b>	94	1X	4.00
<b>Denaturazione</b>	94		0.20
<b>Appaiamento</b>	65	1X	0.30
<b>Estensione</b>	72		2.00
<b>Denaturazione</b>	94		0.30
<b>Appaiamento</b>	50	1X	0.30
<b>Estensione</b>	72		1.00
<b>Denaturazione</b>	94		0.30
<b>Appaiamento</b>	65	10X	0.30
<b>Estensione</b>	-0.7/ciclo 72		1.00
<b>Denaturazione</b>	94		0.20
<b>Appaiamento</b>	56	20X	0.30
<b>Estensione</b>	72		2.00
<b>Estensione</b>	60	1X	30.00
<b>Fine</b>	4	1X	$\infty$

## 2.2.7 Analisi statistiche

Per le analisi della struttura di popolazione razziale del mais nativo e locale sono stati utilizzati i programmi di analisi genetica POPGENE 2.1 (Yeh et al., 1997) e Arlequin 3.5.2.2. (Excoffier et al., 2015) per stimare i seguenti parametri, sulla base di de Vicente et al. (2004):

- I. Parametri per la struttura e la diversità intrapopolazione:

1.1 Per i microsatelliti:

- **Frequenza allelica del locus SSR co-dominante ( $p_i$ )**, stimata come la frequenza relativa degli omozigoti ( $P_{ii}$ ) portatori dell'allele più la metà della somma di tutte le frequenze degli eterozigoti osservate ( $P_{ij}$ ).

$$p_i = fre(A_i) = P_{ii} + \frac{1}{2} \sum_{ij} P_{ij}$$

- **Numero di loci polimorfici**, un locus polimorfico è considerato tale se uno dei suoi alleli ha una frequenza maggiore o uguale a 0,05 o 0,01 (Cavalli-Sforza et al., 1981). Questo parametro si riferisce quindi al numero di loci che soddisfano la definizione di polimorfismo.
- **Percentuale di loci polimorfici ( $P_j$ )**, è il valore percentuale dei loci che soddisfano la condizione di polimorfismo rispetto al totale.
- **Numero di alleli diversi osservati ( $A_o$ )**, è il numero di alleli diversi per locus meno uno.

$$A_o = A - 1$$

- **Il numero effettivo di alleli ( $A_e$ )** è il numero di alleli che ci aspetteremmo se la popolazione si comportasse in modo ideale ed è determinato come la somma degli inversi delle frequenze omozigoti attese.

$$A_e = \frac{1}{\sum p_j^2}$$

- **L'indice di diversità di Shannon (Shannon et al., 1949)**, predice la probabilità di trovare un allele estratto a caso nella popolazione, essendo più alto quando la popolazione è più diversificata.

$$I = -\sum p_j \ln(p_j)$$

- **La diversità genica Nei (He)**, indica il grado di eterozigotità che ci si aspetta di trovare in un locus. È anche l'eterozigotità attesa.

$$H_e = (1 - \sum p_j^2) ; \text{ secondo Nei Li (1972)}$$

$$H = \frac{2n}{2n-1} (1 - \sum p_j^2) ; \text{ secondo Levene (1949)}$$

- **L'eterozigotità osservata (Ho)**, ci mostra il valore di omozigoti che troviamo ed è contenuto in un locus di una popolazione. Si prende anche la media dell'eterozigotità osservata.

$$P_{ij} = \text{fre}(A_j A_j)$$

- **L'indice Garza-Williamson (G-W), (Williamson et al., 2001)**, ci permette di sapere se un locus ha sperimentato un recente evento di bottleneck, in quanto confronta il rapporto tra il numero di alleli in un locus rispetto alla gamma in coppie di basi tra l'allele più grande e quello più piccolo.

$$G-W = \frac{N^{\circ} \text{alleli}}{R} ; R = \text{intervallo (bp) tra l'allele più grande e quello più piccolo}$$

- **Indice di Fissazione Wright (F<sub>IS</sub>)**, che quantifica le deviazioni dalle proporzioni di Hardy-Weinberg all'interno di ogni popolazione e fornisce informazioni sull'inbreeding o l'outbreeding.

$$F_{IS} = \left[ \frac{P_{11} - p^2}{pq} \right]$$

P<sub>11</sub> = frequenza omozigote osservata

p<sup>2</sup> = frequenza omozigote attesa

## 1.2 Per AFLPs:

Frequenza allelica locus dominante

$$q = \sqrt{q^2} = \sqrt{P_2} ; P_2 = \text{freOb(aa)}$$

I parametri: numero di loci polimorfici, percentuale di loci polimorfici, numero di alleli osservati, numero effettivo di alleli, indice di diversità di Shannon, Nei gene diversity, sono stimati seguendo gli stessi criteri dei marcatori microsatelitari, tuttavia, non è possibile valutare i tassi di fissazione.

### II. Parametri per la struttura e la diversità inter-popolazione

La valutazione degli indici di fissazione stabiliti da Wright (Wright, 1978), che considerano la fissazione intra-popolazione ( $F_{IS}$ ), inter-popolazione ( $F_{ST}$ ) e totale ( $F_{IT}$ ), è stata effettuata utilizzando il programma POPGENE 1.31 (Yeh et al., 1999), che utilizza un approccio diverso da Weir (1990); essi consistono in:

- **Indice di fissazione intrapopolazione ( $F_{IS}$ )**, quantifica il grado di inbreeding che esiste tra individui all'interno di una popolazione.

$$F_{IS} = \left[ 1 - \frac{H_I}{H_S} \right] \quad H_I = \text{eterozigosità media all'interno di una popolazione}$$

$H_S$  = eterozigosità media attesa tra le popolazione

- **Indice di fissazione interpopolazione ( $F_{ST}$ )**, quantifica il grado di inbreeding interpopolazione e serve a stimare indirettamente il grado di flusso genico tra le popolazioni attraverso il parametro  $Nm$ , che secondo Slatkin et al. (1989) produce stime coerenti.

$$F_{ST} = \left[ 1 - \frac{H_S}{H_T} \right] \quad H_S = \text{eterozigosità media interpopolazione osservata}$$

$H_T$  = eterozigosità media totale

- **Indice di fissazione totale ( $F_{IT}$ )**, quantifica il grado di inbreeding totale.

$$F_{IT} = \left[ 1 - \frac{H_I}{H_T} \right] \quad H_S = \text{eterozigosità intra-popolazione media osservata}$$

$H_T$  = eterozigosità media totale

- **Indice di diversità genica interpopolazione ( $D_{ST}$ )**, qualifica il grado di diversità tra le popolazioni.

$$D_{ST} = H_T - H_S \quad H_S = \text{eterozigosità intra-popolazione media osservata}$$

$H_T$  = eterozigosità media totale

- **Indice di differenziazione ( $G_{ST}$ )**, quantifica il grado di differenziazione della popolazione tra un gruppo di popolazioni, raccomandato per i marcatori molecolari dominanti.

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_T} * 100$$

- **Nei 1972 distanza genica ( $D_{XY}$ )**, indica il grado di separazione genica tra due popolazioni, basato sulle frequenze geniche.

$$D_{XY} = -\ln(I_{XY}); \quad I_{XY} = \text{identità genica tra le popolazioni X e Y}$$

$$I_{XY} = -\ln \left[ \frac{J_{XY}}{(\sqrt{J_X})(\sqrt{J_Y})} \right]; \quad J_{XY} = \text{omozigosi media interpopolazione}$$

$J_X$  = omozigosi media attesa della popolazione X

$J_Y$  = omozigosi media attesa della popolazione Y

Per la distanza genica corretta, è stata utilizzata l'identità genica imparziale di Nei (1978).

$$I_{XY} = -\ln \left[ \frac{J_{XY}}{\sqrt{\left(\frac{2n_x}{2n_x-1} J_x\right)} \sqrt{\left(\frac{2n_y}{2n_y-1} J_y\right)}} \right]$$

Le analisi molecolari della varianza (AMOVA) sono state impiegate per stabilire come la variazione sia distribuita tra i gruppi e all'interno dei gruppi (gialli vitrei e duri) e tra le popolazioni, utilizzando il programma Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier et al., 2015) per l'insieme delle 28 popolazioni iniziali, con gli 8 loci microsatelliti e un AMOVA è stato generato anche per il totale includendo i 9 aggiuntivi, che rappresentano 37 popolazioni.

Le relazioni tra le diverse popolazioni sono state rappresentate per mezzo di un'analisi delle coordinate principali (PCA) basata sulle distanze dei Nei, utilizzando il programma R con il pacchetto Adegnet e la funzione dudi.pca.

Per analizzare e valutare le strutture della popolazione, è stata utilizzata l'analisi Bayesiana dei cluster con STRUCTURE 2.3 (Pritchard et al, 2000), e i parametri sono stati stabiliti con i seguenti criteri: durata del periodo di burnin 50.000, seguito da 100.000 interazioni Markov Chain Monte Carlo (MCMC) per analisi; il modello di ascendenza è di miscele che stabilisce che ogni adesione presenterebbe frazioni del suo genoma relative ai k gruppi stabiliti, frequenze alleliche correlate e il numero di gruppi o popolazioni è stato impostato da k 1 a 28 per il gruppo di 28 popolazioni e poi per il gruppo completo, dove sono state incluse altre 9 popolazioni, ottenendo un totale di 37 popolazioni, come mostrato nella Tabella 2.1, il numero di gruppi è stato stabilito tra k 1 e 20, valutato in ogni caso con 10 simulazioni indipendenti per ogni valore di k stabilito. Utilizzando il metodo di Evanno et al. (2005), sono stati stimati i valori di  $\Delta K$  e il grafico che permette di determinare il numero ottimale di cluster.

Le analisi filogenetiche per stabilire le relazioni tra individui di diverse popolazioni sono state effettuate utilizzando il programma Darwin 6.0 (Pierrer et al., 2006) e l'opzione di calcolo della similarità Simple Matching e il metodo di costruzione del dendogramma Neighbor-joining. Allo stesso modo, le relazioni tra le popolazioni sono state analizzate utilizzando i valori di frequenza allelica e le stime delle distanze genetiche di Nei imparziali (Nei, 1978) e il



metodo di costruzione Neighbor-joining.

La valutazione della neutralità dei loci è stata eseguita con il programma PopGene 1.32 (Yeh et al., 1999) utilizzando il metodo Ewens-Watterson che confronta l'omozigosi osservata dei loci analizzati dal programma con l'omozigosi attesa e l'ipotesi del locus neutro viene accettata o rifiutata se il valore osservato è entro i limiti stabiliti per un livello di confidenza del 95%.

## 2.3 Risultati

### 2.3.1 Valutazione della diversità genetica intra-popolazione(razziale)

La descrizione della stima dei parametri genetici per le razze studiate è stata effettuata considerando anche gli ibridi gialli duri.

#### Razza Alazàn

Nel primo gruppo di campioni del 2011, nell'ambito del progetto regionale LAC Biosafety GEF/BM - CIAT, è stato analizzato lo stato di diversità di 3 popolazioni con i rispettivi confronti (AB-AT, AB-AI e AT-AI, secondo la Tabella 2.1), dove si osserva che gli 8 loci analizzati erano polimorfici al 100% (Tabella 2.16 e Figura 2.1). I diversi alleli e le loro rispettive frequenze geniche non coincidono completamente tra le popolazioni Lambayeque (AT e AI) e UNALM (AB), questi risultati sono mostrati nella Tabella 2.17, dove in 3 loci c'era una coincidenza in 2 alleli (ZM15, ZM25 e ZM31), in altri 3 loci la coincidenza era in 3 alleli (ZM04, ZM27 e ZM37) e in 2 loci 4 alleli erano osservati in comune (ZM22 e ZM33).

Tuttavia, tutti i loci hanno presentato frequenze alleliche inferiori a 0.99, evidenziando l'elevato polimorfismo. Il numero medio di alleli osservati ( $n_a$ ) ed effettivi ( $n_e$ ) nelle popolazioni di campo ha presentato medie più alte rispetto alla popolazione della banca del germoplasma dell'UNALM (AB), 5 contro 4 nel numero osservato e 3.151 contro 2.679 nel numero effettivo. Il livello di diversità misurato dall'indice di Shannon è stato più alto nei campioni di campo così come l'eterozigosità osservata e la diversità genetica di Nei, evidenziando la popolazione di Illimo (AI) con una diversità di 0,65; mentre la popolazione della banca (AB) ha presentato un valore di 0,59. Anche se è un valore inferiore, livelli di 50% o più di diversità possono essere considerati alti per questo parametro in una popolazione. La Figura 2.1 contiene i grafici degli 8 loci e le loro rispettive frequenze alleliche nelle popolazioni analizzate.

Il confronto dell'eterozigosità attesa con l'eterozigosità osservata indica che nelle 3 popolazioni Alazan c'è stata una bassa frequenza di inbreeding, essendo la popolazione di Túcume (AT) quella con il minor grado di inbreeding (circa 4%). L'analisi dell'indice di Garza-Williamson mostra che ci sono differenze tra il numero e la dimensione dei diversi alleli, il

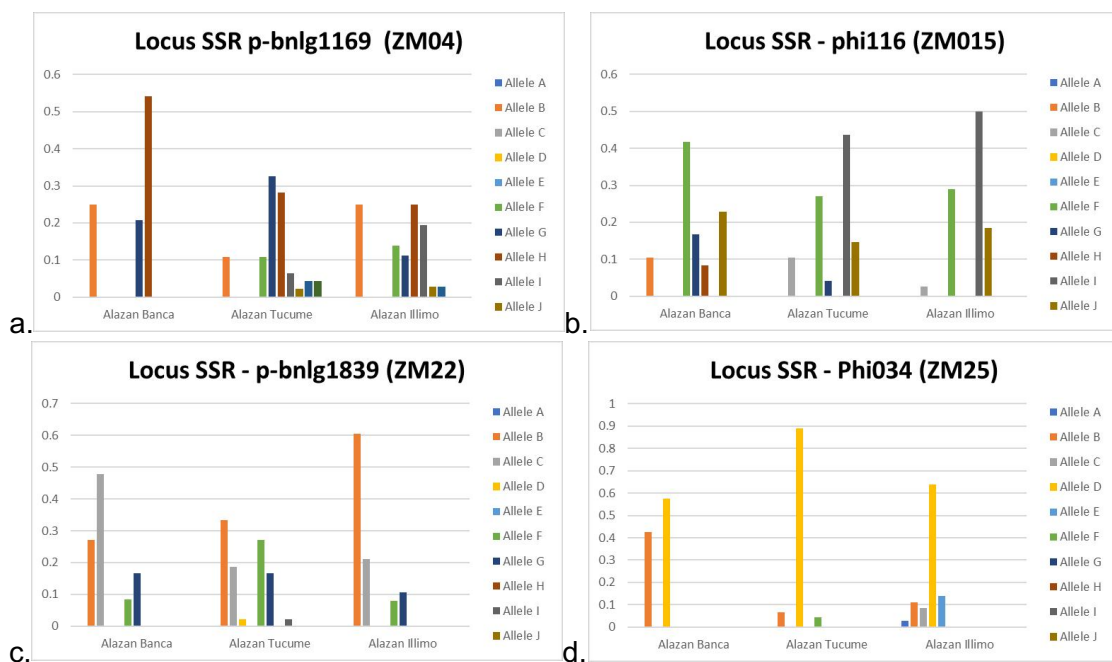
che indicherebbe che queste popolazioni hanno sperimentato leggere costrizioni a collo di bottiglia durante la loro storia, considerando che nella zona il mais Alazán è spesso coltivato in piccoli appezzamenti e non continuamente. A ciò si aggiunge che quella zona è colpita dal verificarsi del “El Niño” che danneggia fortemente le coltivazioni nel nord della costa del Perù, causando distruzione per inondazioni e perdita di raccolti.

Tabella 2.16. Parametri delle popolazioni nel mais Alazan, 8 loci microsatellite

Popolazione	N° Loci freq. allelica < 99%	% Poli-morfismo	na*	ne*	Indice di Shannon (I)	Eterozigosità osservata	Eterozigosità attesa di Nei**	Indice G-W
Alazan Banca (AB)	8	100	4.000	2.679	1.095	0.483	0.594	0.259
Alazan Tucume (AT)	8	100	5.000	3.151	1.235	0.603	0.629	0.250
Alazan Illimo (AI)	8	100	5.000	3.146	1.261	0.542	0.651	0.252

Tabella 2.17. Confronto tra popolazioni di mais Alazan

Confronto tra le popolazioni	Loci SSR							
	ZM-04	ZM-15	ZM-22	ZM-25	ZM-27	ZM-31	ZM-33	ZM-37
AB - AT	3	3	4	2	4	2	4	3
AB - AI	3	2	4	2	3	2	4	3
AT - AI	7	4	4	2	3	4	5	5
<b>Alleli totali 8 loci</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>6</b>
<b>Alleli comuni totali</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>3</b>



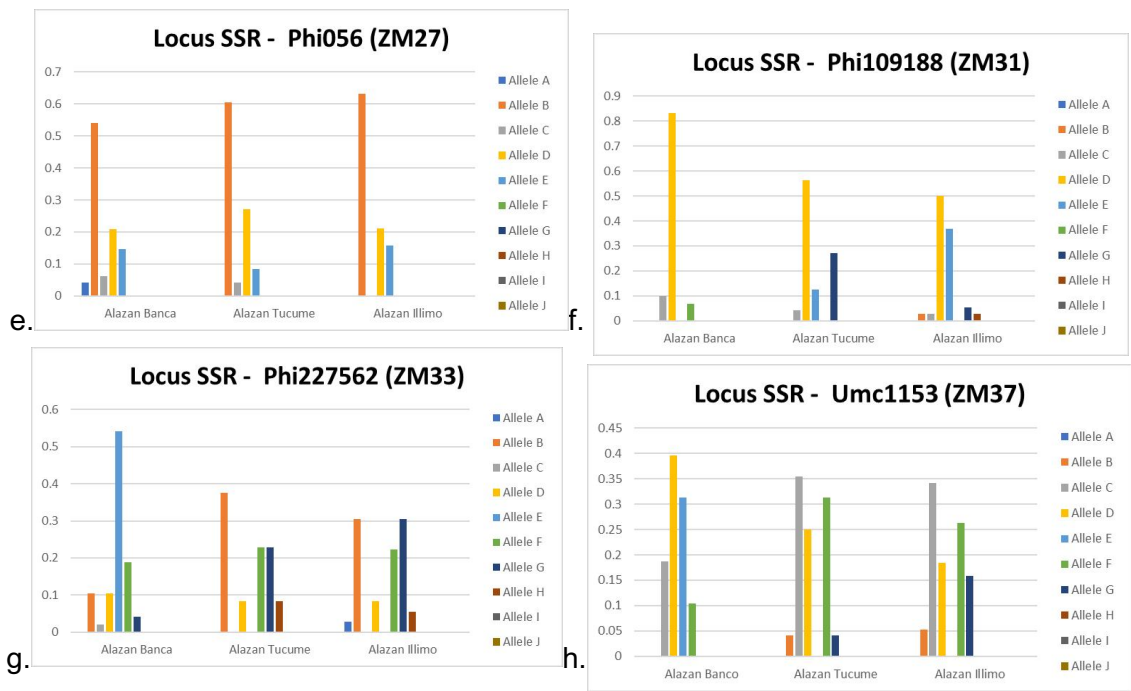


Figura 2.1 Frequenze alleliche negli 8 loci SSR analizzati nelle diverse popolazioni.

Nell'analisi sviluppata includendo 9 nuove popolazioni provenienti dalla banca del germoplasma dell'UNALM (come indicato nella Tabella 2.1), sono stati considerati 7 loci microsatelliti perché le condizioni sono diventate molto difficili per il proseguimento dello studio a causa della pandemia di COVID19. Si può notare che la nuova popolazione inclusa di Alazan (ABU) presentava in alcuni dei loci 3 alleli in comune con il resto delle popolazioni; tuttavia, c'erano anche da 1 a 4 nuovi alleli come nel caso del locus ZM27 (Allegato 3). Questi alleli hanno cambiato le caratteristiche dell'analisi della struttura della popolazione che sarà presentata di seguito.

Il confronto tra le popolazioni di Alazán è stato anche effettuato tramite marcatori AFLP. Il confronto tra la popolazione della banca (AB) e la popolazione di Túcume (AT), analizzate con marcatori AFLP, mostrano che la popolazione di Túcume risulta possedere un maggiore polimorfismo (47,11% vs. 40,5%) mentre la differenza tra il numero di alleli medi osservati ed effettivi è piccola, risultando sempre inferiore nella popolazione della banca. Per quanto riguarda l'eterozigosità attesa (diversità genica), entrambi hanno valori medi simili, anche se leggermente superiore era quello di Tucume (AT). Questi parametri sono visualizzati nella Tabella 2.18.

Tabella 2.18. Parametri delle popolazioni nel mais Alazan, marcatori AFLP

Popolazione	Polimorfismo (%)	na*	ne*	Eterozigosità attesa di Nei**	I*
Alazan Banca (AB)	40.50	1.405	1.286	0.159	0.231
Alazan Túcume (AT)	47.11	1.471	1.308	0.1776	0.2626

### Razza Mochero

Le 4 popolazioni della razza Mochero (MB, MMA, MMB, MT) hanno presentato, secondo la Tabella 2.19, medie nel numero di alleli osservati comprese nell'intervallo 5,500-4,375 (MMB e MT). Tuttavia, il numero effettivo di alleli era più alto nella popolazione della banca (MB) con 3,602, mentre il più basso era nella popolazione di Mochumí 1 (MMA) con 2,873. Il polimorfismo era massimo in tutti le popolazioni eccetto Mochumí 2 (MMB) con 87,5%. Il grado di diversità di Shannon variava da 1,392 (MB) a 1,151 (MT)). Questo comportamento si è verificato anche nell'indice di diversità genetica Nei: la popolazione della banca (MB) aveva un'alta diversità (0,70) mentre Túcume (MT) aveva la più bassa (0,61). Per quanto riguarda le differenze nelle dimensioni degli alleli e la possibilità che abbiano sperimentato un collo di bottiglia, notiamo che i valori dell'indice Garza-Williamson sono simili alle

popolazioni di mais Alazan, quindi potremmo dire che anche loro hanno sperimentato un leggero collo di bottiglia, spiegato dagli stessi eventi che si verificano nel mais Alazan, dato che sono coltivati nelle stesse aree di distribuzione.

La Tabella 2.20 contiene il confronto due a due del numero di alleli comuni tra le popolazioni Mochero (MB-MMA, MB-MMB, MB-MT, MMA-MMB, MMA-MT, MMB-MT), rispetto al totale osservato. Notiamo che il locus ZM04 ha presentato il maggior numero di alleli diversi (11) in tutte le popolazioni di Mochero; mentre il locus ZM25 ha presentato il numero più basso (5 alleli diversi). La coincidenza allelica tra le popolazioni di Mochero di Lambayeque (MT, MMA e MMB) e la popolazione della banca (MB) varia tra 3 a 5. La Figura 2.2 mostra i grafici delle frequenze alleliche per i diversi loci nelle popolazioni.

Per valutare il grado di inbreeding nel mais Mochero, abbiamo confrontato la differenza tra l'eterozigosità attesa e quella osservata, divisa per quella attesa; ottenendo lo stimatore dell'inbreeding medio intra-popolazione (FIS), che per la popolazione della banca (MB) il valore percentuale era inferiore (4.9%), seguito da Tucume (MT) con il 10,4%; mentre le popolazioni Mochero Mochumi 1 e 2 (MMA, MMB) hanno i valori più alti con 14,6% e 15,9% rispettivamente. Questi risultati indicano che la possibilità che le popolazioni perdano la diversità genetica è bassa, poiché il mantenimento della variazione in Lambayeque è legato al modo in cui il seme è distribuito: agricoltore, mercato, contadino. Il mercato è il luogo dove si crea la variazione.

Tabella 2.19. Parametri delle popolazioni nel mais Mochero, 8 loci microsatellite

Popolazione	N° Loci freq. allelica < 99%	% Poli-morfismo	na*	ne*	Indice di Shannon (I)	Eterozigosità osservata	Eterozigosità attesa di Nei**	Indice G-W
<b>Mochero Banca (MB)</b>	8	100	5.125	3.602	1.392	0.672	0.707	0.247
<b>Mochero Tucume (MT)</b>	8	100	4.375	2.882	1.151	0.547	0.611	0.261
<b>Mochero Mochumi 1 (MMA)</b>	8	100	5.500	2.873	1.238	0.525	0.615	0.247
<b>Mochero Mochumi 2 (MMB)</b>	7	87.5	5.500	3.337	1.235	0.516	0.613	0.254

Tabella 2.20. Confronto tra le popolazioni di mais Mochero

<b>Confronto tra le popolazioni</b>	<b>Loci SSR</b>							
	<b>ZM-04</b>	<b>ZM-15</b>	<b>ZM-22</b>	<b>ZM-25</b>	<b>ZM-27</b>	<b>ZM-31</b>	<b>ZM-33</b>	<b>ZM-37</b>
<b>MB - MT</b>	4	3	3	3	5	3	4	5
<b>MB - MMA</b>	5	2	5	4	5	4	4	5
<b>MB - MMB</b>	4	4	4	1	4	4	4	4
<b>MT - MMA</b>	5	3	4	3	5	3	4	5
<b>MT - MMB</b>	5	4	4	1	4	3	4	5
<b>MMA - MMB</b>	6	4	5	1	4	5	5	4
<b>Alleli totali 8 loci</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>Alleli comuni totali</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

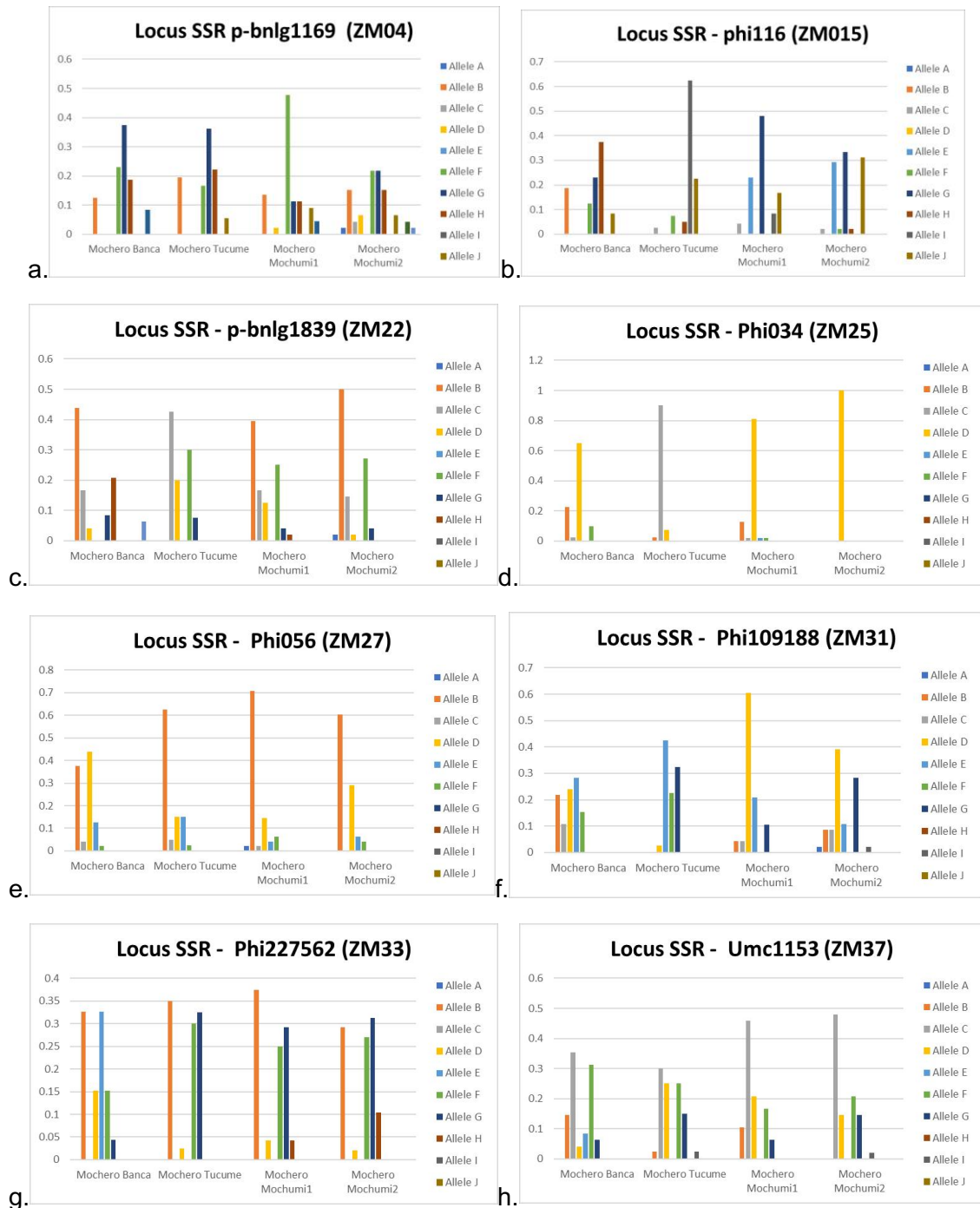


Figura 2.2. Frequenze alleliche negli 8 loci SSR analizzati nelle diverse popolazioni.

L'analisi sviluppata includendo le 9 nuove popolazioni (Tabella 2.1) e considerando i 7 loci mostra da 1 a 3 nuovi alleli che non sono presenti nelle altre popolazioni Mochoero (allegato 3). Questi dati, come è successo nel mais Alazan, determinano anche un cambiamento nella struttura della popolazione.



Il confronto con i marcatori AFLP fatto tra le popolazioni di Mochero Banca (MB) e Mochero Túcume (MT) indica che la popolazione della Banca (MB) presenta valori più alti nel polimorfismo e nel numero di alleli osservati e attesi. Questo comportamento della diversità è simile a quello che vediamo con i microsatelliti. Per quanto riguarda gli indici di diversità genetica di Nei e Shannon, la Tabella 2.21 mostra che la popolazione della Banca (MT) ha un grado di diversità genetica di Nei quasi doppio di quello osservato nella popolazione di Túcume (MT). La stessa tendenza ha seguito l'indice Shannon.

Tabella 2.21. Parametri genico popolazioni nel mais Mochero, marcatori AFLP

Popolazione	Poli- morfismo (%)	na*	ne*	Eterozigosità attesa di Nei**	I*
Mochero Banca (MB)	62.81	1.628	1.436	0.249	0.364
Mochero Túcume (MT)	35.54	1.355	1.240	0.136	0.201

### Razza Chancayano

Nelle 2 popolazioni analizzate (Chancayano Banca -CYB e Chancayano INIA-CYI) sono stati stimati i diversi parametri genetici, notando che la popolazione della banca (CYB) ha presentato meno polimorfismo (Tabella 2.22); con 7 su 8 loci hanno frequenze allelica superiori all'1% e il numero osservato e atteso di alleli era un po' più basso che nella popolazione INIA (CYI) con valore di 3,12 e 2,21 contro 3,5 e 2,33 rispettivamente.

Per quanto riguarda il numero di alleli diversi per gli 8 loci, il confronto tra le due popolazioni (CYB – CYI) presentato in Tabella 2.23 indica che il numero di alleli diversi variava tra 6 e 3 con il locus ZM04 che mostrava 4 alleli comuni su 6, mentre i loci ZM25 e ZM37 presentavano solo un allele comune su un totale di 3 e 5 alleli rispettivamente. La Figura 2.3 presenta i grafici delle frequenze alleliche per gli 8 loci tra le 2 popolazioni analizzate.

L'indice di Shannon (Tabella 2.22) era in entrambi i casi inferiore a uno in CYB e CYI (0,83 vs. 0,93). Nelle 2 popolazioni si apprezza una leggera esogamia espressa in una eterozigosità osservata leggermente superiore all'indice di diversità atteso o di Nei (0,49 contro 0,48 e 0,53 contro 0,52), questa situazione si apprezza meglio nel valore FIS negativo nelle due popolazioni di Chancayano (-0,01 e -0,02). L'indice di Garza-Williamson si è comportato come nelle altre popolazioni di mais con valori che indicherebbero una riduzione moderata in un passato remoto con effetto collo di bottiglia.

Tabella 2.22. Parametri delle popolazioni nel mais Chancayano, Chaparreo e Piricinco, 8 loci microsatellite

Popolazione	N° Loci freq. allelica < 99%	% Polimorfismo	na*	ne*	Indice di Shannon (I)	Eterozigosità osservata	Eterozigosità attesa di Nei**	Indice G-W
Chancayano Banca (CYB)	7	87.5	3.125	2.215	0.830	0.493	0.485	0.236
Chancayano INIA (CYI)	8	100	3.5	2.333	0.932	0.534	0.523	0.251
Chaparreo Banca (CHB)	8	100	4	2.414	0.973	0.490	0.515	0.238
Piricinco Tarapoto (PI)	4	50	1.625	1.350	0.281	0.174	0.179	0.168

Tabella 2.23. Confronto tra le popolazioni di mais Chancayano

Confronto tra le popolazioni	Loci SSR							
	ZM-04	ZM-15	ZM-22	ZM-25	ZM-27	ZM-31	ZM-33	ZM-37
CYB - CYI	4	3	2	1	2	2	2	1
Alleli totali 8 loci	6	5	6	3	3	4	5	5
Alleli comuni totali	4	3	2	1	2	2	2	1

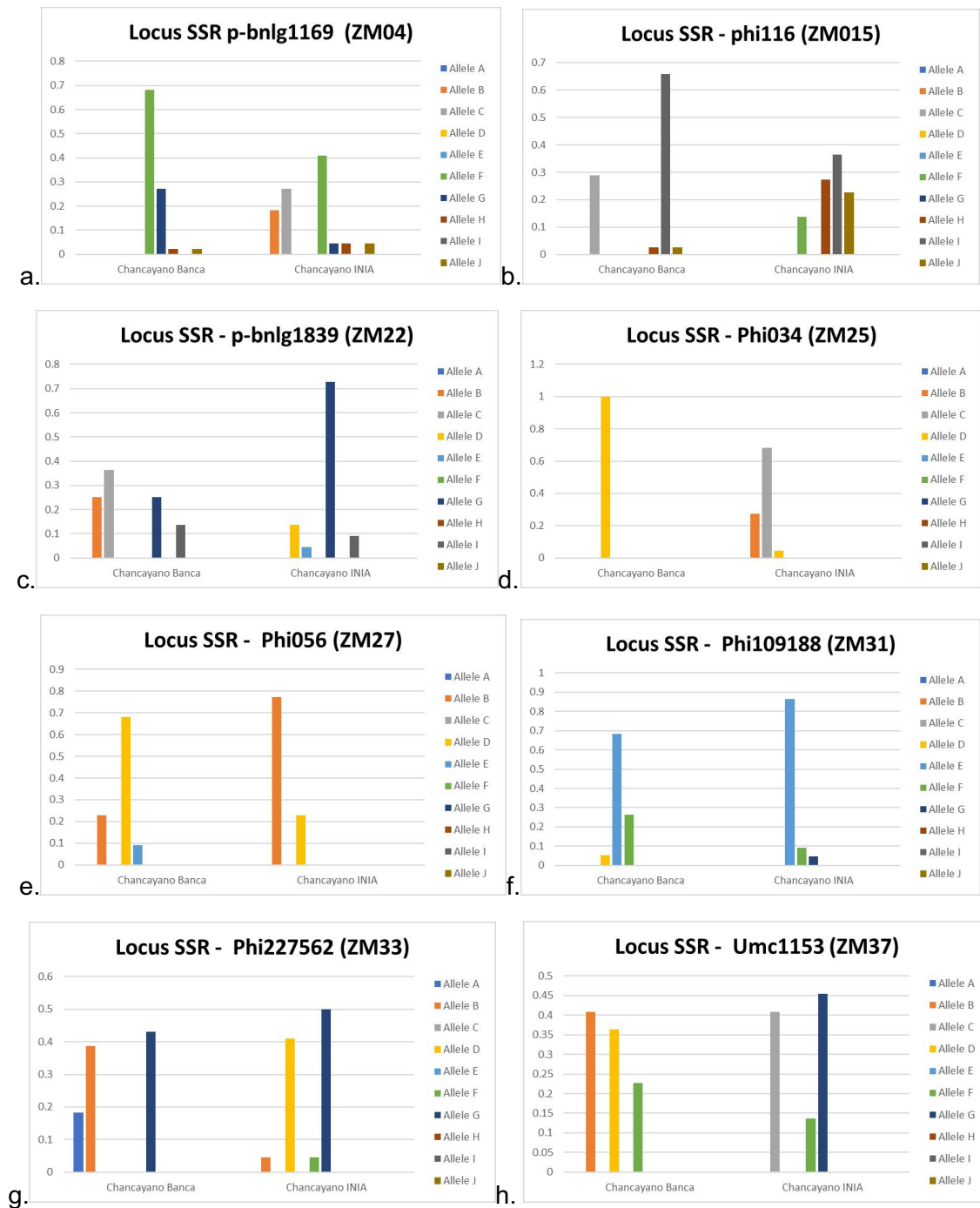


Figura 2.3 . Frequenze alleliche negli 8 loci SSR analizzati nelle diverse popolazioni.

Dall'analisi sviluppata includendo le 9 nuove popolazioni (Tabella 2.1) e considerando i 7 loci, notiamo che nella popolazione Chancayano (CYU) non appare nessuno dei tre nuovi alleli, come nel locus ZM15, e che tutte le popolazioni (CYB, CYI e CYU) hanno solo un allele in comune.

Il confronto tra le popolazioni di Chancayano Banca e Chacayano INIA (CYB–CYI) per mezzo di marcatori AFLP mostra che la diversità genetica è più alta nella prima popolazione con un

valore di 0,16 contro 0,10 per la seconda. Questo comportamento della diversità valutato con questo marcatore è diverso da quello ottenuto con i microsatelliti, dove la popolazione INIA (CYI) ha presentato una diversità più elevata rispetto alla popolazione della banca (CYB), come mostrato nella tabella 2.24. Nell'analisi con AFLP abbiamo considerato anche la popolazione della razza Chaparreo (CHB) che sarà presentata in seguito.

Tabella 2.24. Parametri delle popolazioni nel mais Chancayano e Chaparreo, marcatori AFLP

Popolazione	Poli-morfismo (%)	na*	ne*	Eterozigosità attesa di Nei**	I*
Chancayano Banca (CYB)	42.98	1.430	1.287	0.164	0.242
Chancayano INIA (CYI)	28.1	1.281	1.180	0.102	0.151
Chaparreo Banca (CHB)	42.98	1.430	1.314	0.174	0.253

### Razza Chaparreo

Nel caso della popolazione Chaparreo (CHB) presente nella banca può essere visto in Tabella 2.22 che gli 8 loci considerati nello studio hanno presentato frequenze geniche inferiori a 0,99, questo rappresenta un 100% di polimorfismo; allo stesso modo, nella Tabella 2.25 e nella Figura 2.4 possiamo apprezzare il numero di alleli diversi per ogni locus e la distribuzione di questi alleli in modo grafico. Il numero effettivo di alleli stimato è inferiore al valore osservato (2,41 contro 4), mentre l'indice di diversità Shannon ha un valore di 0,97, inferiore a quelli registrati per il mais Mochero e Alazan, ma, simile al Chancayano di INIA. La diversità genetica di Nei corrisponde a un valore medio (0,51) e l'inbreeding intra-popolazione ( $F_{IS}$ ) è risultato 0,05, un valore piuttosto basso che indica una predominanza di panmissia. In relazione alla possibilità che la popolazione di Chaparreo provenga da un collo di bottiglia, possiamo anche sottolineare che ha lo stesso comportamento nell'indice G-W degli altri mais. Con i marcatori AFLP, è stato determinato un valore di diversità genetica di Nei di 0,17 (Tabella 2.24), valore molto simile a quello registrato dalla popolazione di Alazan di Tucume (AT).

### Razza Piricincio

Questo tipo razziale è coltivato nella zona di giungla medio bassa tra 200 e 800 m.s.l.m. (Salhuana, 2002) dove si coltiva anche il mais giallo ibrido. Anche se i suoli della giungla sono acidi e non adatti alla coltivazione del mais e quindi gli specialisti non raccomandano questa pratica, ci sono agricoltori che sono abituati a piantare il mais come fonte di

alimentazione animale, quindi è importante conoscere lo stato della diversità genetica del mais Piricinco.

In questo studio riportiamo che 4 degli 8 loci analizzati nel campione avevano frequenze alleliche inferiori a 0,99; questo valore rappresenta una percentuale di solo il 50% di polimorfismo, molto più bassa che nelle altre popolazioni di mais. Il numero totale di alleli diversi per i loci analizzati è presentato nella Tabella 2.25, dove si nota la presenza di poche varianti alleliche in questo tipo di mais (PI).

Nella figura 2.4, presentiamo la distribuzione delle frequenze alleliche per tutti i loci ed è molto evidente vedere una bassa variabilità genetica di questo mais. Inoltre, la Tabella 2.22 mostra un basso numero di alleli osservati e attesi (1.625 e 1.350 rispettivamente). Notiamo anche che gli indici di diversità genetica di Shannon e Nei erano bassi rispetto al resto delle popolazioni analizzate, i valori medi registrati erano rispettivamente 0,28 e 0,17.

Per quanto riguarda lo stimatore di inbreeding intra-popolazione (FIS), è stato registrato un valore molto basso di 0,02, che indicherebbe che la carenza di eterozigoti è minima e quindi, la popolazione si comporterebbe in modo panmico. Tuttavia, l'effetto collo di bottiglia sarebbe molto più grande che nell'altro mais, come evidenziato dall'indice Garza-Williamson.

La popolazione Piricinco della banca UNALM (PIU), che è stata inclusa nello studio, facendo parte delle 37 popolazioni valutate per 7 loci microsatelliti, ha registrato un polimorfismo del 100% con un numero medio di alleli osservati e attesi di 3.429 e 1.618 rispettivamente; questi valori erano più alti di quelli registrati nella popolazione Piricinco di Tarapoto (PI). Allo stesso modo, anche gli indici di diversità Shannon e Nei erano più alti nella popolazione PIU rispetto a PI, con valori di 0,77 e 0,41; tuttavia, i valori di questi parametri erano più bassi nel mais Piricinco rispetto agli altri mais locali. L'indice Garza-Williamson (G-W) era molto simile a quello della popolazione PI con un valore di 0,16, indicando il verificarsi dell'effetto collo di bottiglia.

Tabella 2.25. Confronto tra le popolazioni di mais Chaparreño e Piricinco

N° alleli diversi tra le popolazioni	Loci SSR							
	ZM-04	ZM-15	ZM-22	ZM-25	ZM-27	ZM-31	ZM-33	ZM-37
Chaparreño Banca (CHB)	4	6	4	2	3	4	4	5
Piricinco Banca (PI)	2	2	1	1	2	1	3	1
<b>Alleli totali</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>7</b>

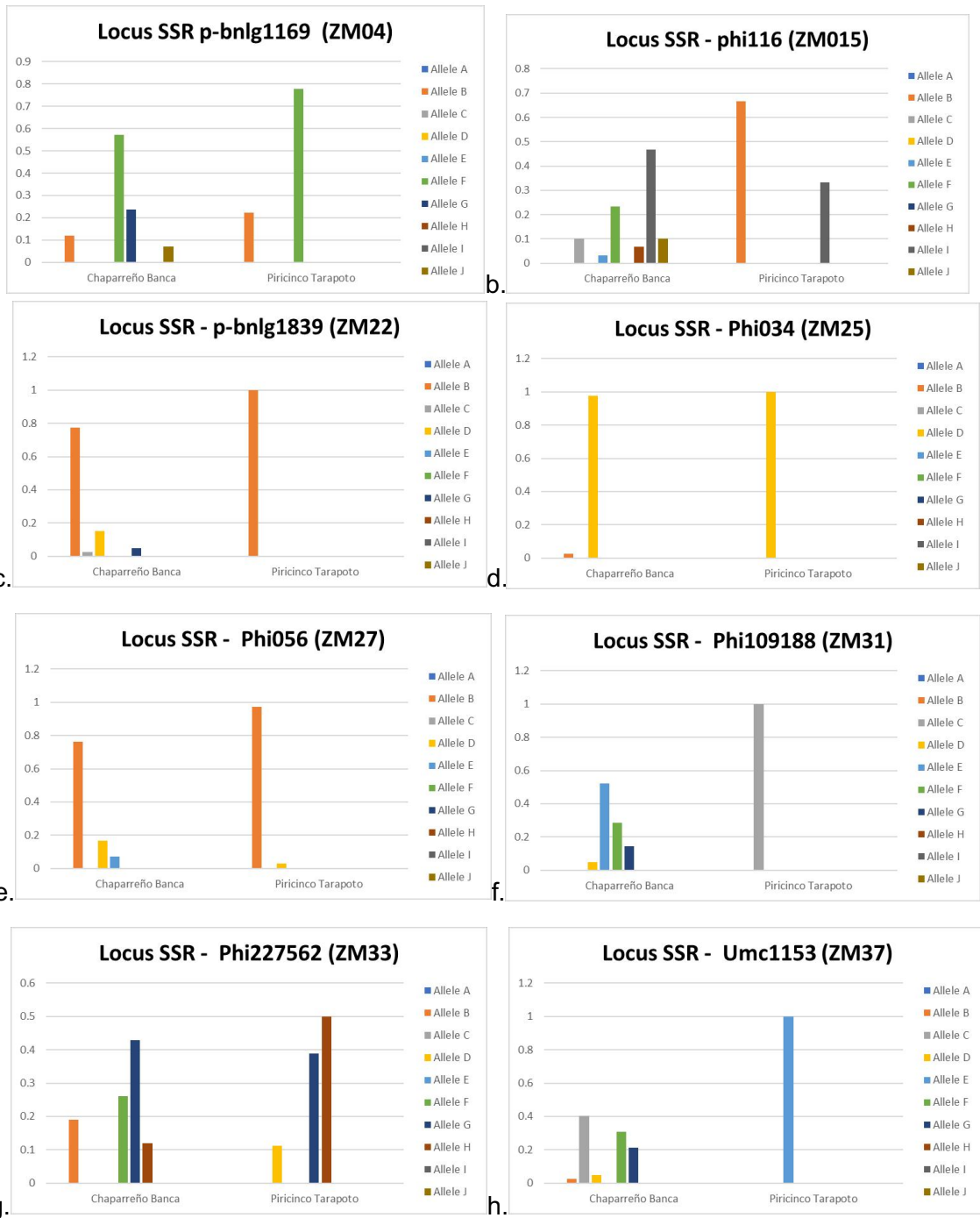


Figura 2.4. Frecuenze alleliche negli 8 loci SSR analizzati nelle diverse popolazioni.

## **Razza Canteño**

Per la popolazione di mais Canteño del Banco (CB), abbiamo trovato il 100% di polimorfismo per tutti i loci analizzati. Inoltre, secondo la Tabella 27, abbiamo osservato che il numero di alleli diversi era più alto al locus ZM33, con 7 varianti, mentre il locus ZM25 ha registrato solo 2 tipi diversi. Tuttavia, la maggior parte dei loci studiati ha mostrato 5 alleli diversi. Queste varianti alleliche e le loro rispettive distribuzioni per locus sono presentate graficamente nella figura 2.5.

Per quanto riguarda il numero medio di alleli osservati e attesi, possiamo vedere nella Tabella 2.26 che i valori erano rispettivamente 4,5 e 2,74. L'indice di diversità di Shannon era simile a quello del mais Mochero e Alazán, con un valore di 1,12. Anche la diversità genetica Nei era alta con una grandezza di 0,60.

Il grado di inbreeding intra-popolazione (FIS) è risultato un valore basso di solo 0,04, indicando una bassa probabilità di accoppiamento predominante tra parenti (inbreeding basso). L'indice Garza-Williamson, che è legato al verificarsi dell'effetto collo di bottiglia, ha mostrato un valore di 0,27, indicando che questa popolazione è stata anche colpita da questo effetto nel suo passato remoto.

Per la popolazione di mais Canteño della Banca UNALM (CBU) incorporata successivamente, è stato registrato un polimorfismo dell'85,7%, con una media di 3 alleli osservati e 2.15 alleli attesi; un indice di Shannon di 0,71 e una diversità genetica Nei di 0,40, inferiore a quella riportata nella popolazione CB. L'indice Garza-Williamsom (G-W) ha mostrato un valore che indica il verificarsi dell'effetto collo di bottiglia (0,23).

## **Razze degli altipiani andini: Cusco Gigante, Hancavelicano, San Gerónimo Huancavelicano, San Gerónimo, Kculli, Cabanita de Cabanaconde, Cabanita de Pinchollo, Cabanita de Madrigal**

Nelle popolazioni di Cusco Gigante (CGB) e San Gerónimo Huancavelicano (SGH) 7 degli 8 loci hanno mostrato frequenze alleliche inferiori a 0,99, suggerendo quindi meno polimorfismo (87,5%). Tutte le popolazioni (Tabella 2.26), tranne San Geronimo Huancavelicano (SGH) e Kculli (K), hanno presentato un numero osservato di alleli superiore a 4 (4,12, 4,87 e 4,12). Per quanto riguarda il numero effettivo di alleli, San Geronimo Huancavelicano (SGH) ha il numero più basso previsto con un valore di 1,95;

per gli altri mais, i valori sono superiori a 2,5. La diversità di Shannon, inoltre, si è rivelata più bassa in San Geronimo Huancavelicano (0,77); mentre gli altri mais avevano valori da 1,10 a 1,03. La diversità genetica di Nei è risultata più alta nella razza San Geronimo (SGB) con un valore di 0,59 mentre San Geronimo Huancavelicano (SGH) ha il valore più basso 0,42. Negli altri mais l'indice Nei varia da 0,56 (HUB) a 0,56 (CGB). In tutti i mais, attraverso l'indice Garza-Williamson, è evidente che si è verificato un effetto collo di bottiglia (i valori variano tra 0,34 e 0,23).

Per quanto riguarda il numero di alleli diversi tra le varietà di mais dell'altopiano, la Tabella 27 mostra che il locus ZM04 ha il maggior numero di varianti diverse (7 e 6 alleli) nelle varietà di mais Cabanita de Cabanaconde (CA) e Huancavelicano del Banco (HUB), mentre valori di 3, 4 e 5 alleli diversi sono stati registrati per le altre varietà di mais. Al locus ZM15, il mais con i valori più alti di alleli diversi erano San Gerónimo (SGB) e Cusco Gigante del Banco (CGB) con 7 e 6 alleli rispettivamente. Per il locus ZM22, solo il mais Huancavelicano (HUB) aveva 7 alleli diversi, mentre il resto dei campioni aveva valori che andavano da 5 a 3. Il locus ZM25 era quello con i valori più bassi (3 in HUB e 1 in mais CGB e SGH). D'altra parte, i loci ZM27, ZM31 e ZM37 hanno mostrato una maggiore somiglianza rispetto al numero di alleli diversi, che varia tra 5 e 2, con il locus ZM33 che ha il valore più alto tra i tre. I diversi alleli e le loro rispettive frequenze per i loci studiati sono mostrati nel grafico della figura 5.

Nelle popolazioni incorporate per formare le 37 popolazioni studiate con 7 loci microsatellitari, Cusco Gigante (CGBU) e San Gerónimo Huancavelicano (SGHU), hanno presentato un numero medio di alleli osservati e previsti di 3.143 - 2.088 e 3.286 - 2.136 rispettivamente. Gli indici di diversità Shannon (I) e Nei (H) indicano che si tratta di popolazioni con una bassa diversità genetica, dato che valori di indice Shannon = 0,74 e diversità Nei  $H = 0,39$  sono stati osservati nel mais CGBU e  $I = 0,74$  e  $H = 0,41$  nella popolazione SGHU. La statistica che misura l'eccesso o il deficit di eterozigoti (FIS) ha mostrato valori di 0,30 per CGBU e 0,08 per SGHU, indicando quale popolazione del Gigante di Cusco sarebbe più affetta da inbreeding.



Tabella 2.26. Parametri delle popolazioni nel mais della sierra, 8 loci microsatellite

Popolazione	N° Loci freq. allelica < 99%	% Poli- morfismo	na*	ne*	Indice di Shannon (I)	Eterozigosità osservata	Eterozigosità attesa di Nei**	Indice G-W
Canteño Banca (CB)	8	100	4.500	2.740	1.125	0.574	0.601	0.277
Cusco Gigante Banca (CGB)	7	87.5	4.125	2.753	1.031	0.526	0.560	0.299
Huancavelicano Banca (HUB)	8	100	4.875	2.539	1.072	0.464	0.565	0.345
San Gerónimo Huancavelicano Banca (SGH)	7	87.5	3.625	1.954	0.774	0.358	0.421	0.295
San Gerónimo Banca (SGB)	8	100	4.125	2.849	1.106	0.605	0.595	0.261
Kculli Cusco (K)	8	100	3.875	2.576	1.046	0.560	0.564	0.233
Cabanita di Cabanaconde (CA)	8	100	4.500	2.584	1.019	0.496	0.554	0.270
Cabanita di Pinchollo (PN)	8	87.5	3.500	2.499	0.965	0.523	0.530	0.313
Cabanita di Madrigal (MA)	8	100	3.125	2.433	0.905	0.404	0.540	0.326

Tabella 2.27. Confronto tra le popolazioni di mais della sierra

N° alleli diversi tra le popolazioni	Loci SSR								
	ZM-04	ZM-15	ZM-22	ZM-25	ZM-27	ZM-31	ZM-33	ZM-37	
Canteño Banca (CB)	5	4	5	2	4	4	7	5	
Cusco Gigante Banca (CGB)	4	6	5	1	3	3	7	4	
Huancavelicano Banca (HUB)	6	5	7	3	5	4	5	4	
San Geronimo Huancavelicano Banca (SGH)	3	3	4	1	4	4	6	4	
San Geronimo Banca (SGB)	4	7	3	2	4	3	6	4	
Kculli (K) Cabanita Cabanaconde (CA)	7	5	3	2	3	5	6	5	
Cabanita Pinchollo (PN)	4	4	3	1	3	4	5	4	
Cabanita Madrigal (MA)	3	3	3	2	2	4	5	3	
<b>Alleli totali</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	

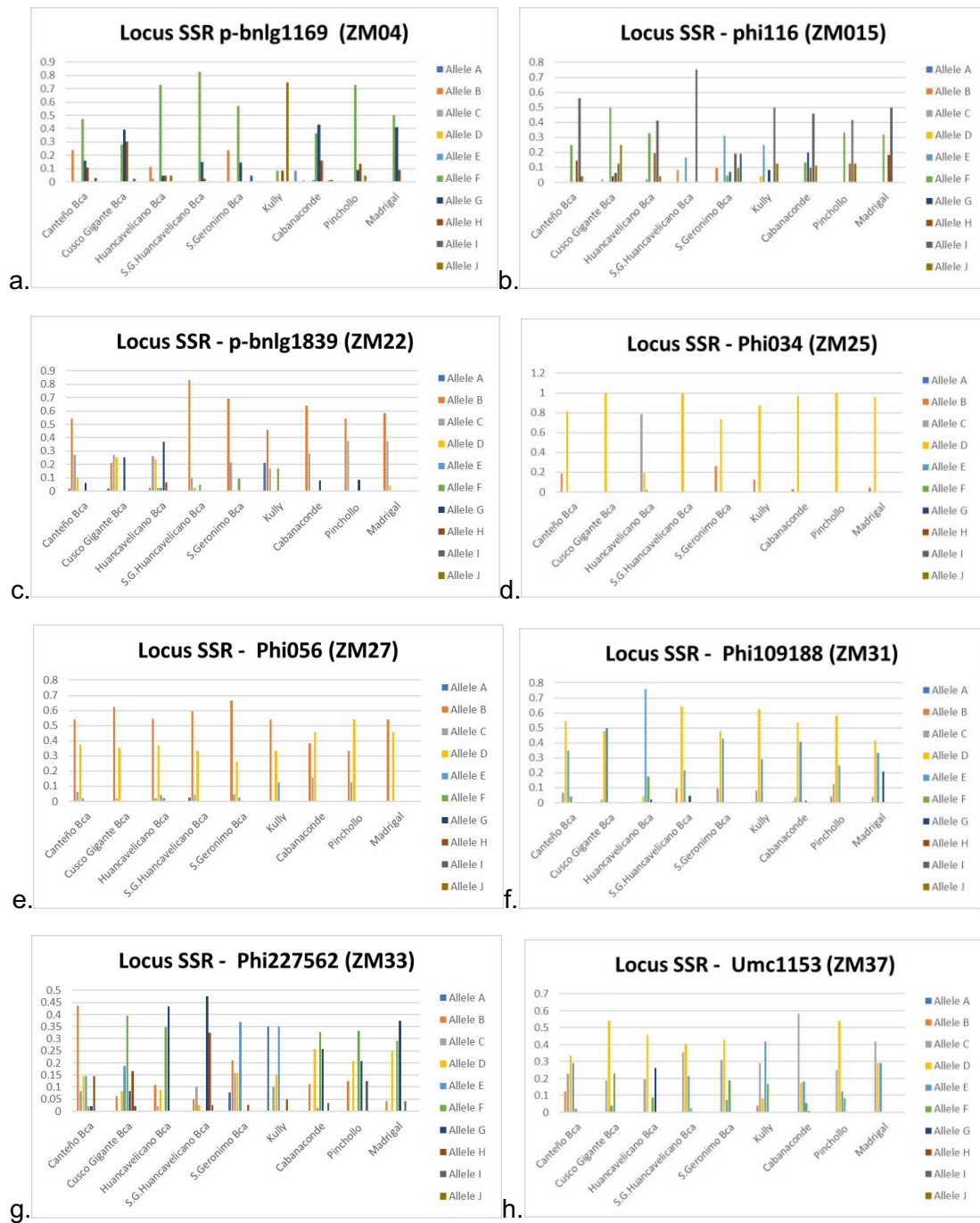


Figura 2.5. Frecenze alleliche negli 8 loci SSR analizzati nelle diverse popolazioni.

### Popolazioni di mais dentato Pioneer.

Sono stati analizzati tre tipi di ibridi di mais dentato: YDM Pioneer 30K73 (HA), YDM Pioneer 3862 (HB) e YDM Pioneer 30F35 (HC). Quest'ultimo tipo ha mostrato il più alto polimorfismo in tutti gli 8 loci con frequenze inferiori a 0,99. L'ibrido (HA) era il meno polimorfico con un valore del 75%. Nella tabella 2.28 presentiamo le medie del numero di alleli osservati, che variavano da 2 a 2,62 e il numero atteso che era più basso nei 3 ibridi, con cifre tra 1,88 e 1,61. La diversità di Shannon ha anche registrato un valore più basso nell'ibrido (HB) con 0,48; mentre l'ibrido HC ha mostrato una maggiore diversità (0,71). La diversità genetica Nei ha seguito la stessa tendenza con il valore più alto in HC (0,46) e il più basso nell'ibrido HB (0,32).

Tabella 2.28. Parametri delle popolazioni di mais ibrido dentato Pioneer

Popolazione	N° Loci freq. allelica < 99%	% Poli morfismo	na*	ne*	Inice di Shannon (I)	Eterozigosità osservata	Eterozigosità attesa di Nei**	Indice G-W
Ibrido Pioneer 30K73 (HA)	6	75	2.125	1.729	0.533	0.258	0.336	0.283
Ibrido Pioneer 3862 (HB)	7	87.5	2.000	1.614	0.480	0.234	0.323	0.304
Ibrido Pioneer 30F35 (HC)	8	100	2.625	1.889	0.712	0.458	0.461	0.309

### Popolazioni di mais dentato INIA

Degli ibridi INIA di mais dentato, sono state considerate 5 popolazioni: INIA 605 (HD), INIA 608 (HE), INIA 611 (HF), INIA 609 (HG) e INIA 617 "La Chusca" (HI). Tutte e 5 le popolazioni sono risultate polimorfe al 100%, con frequenze alleliche inferiori a 0,99 in tutti i loci studiati. Il numero di alleli osservati variava da 2,5 a 3,5; mentre il numero atteso variava da 2,03 a 2,42. L'eterozigosità attesa di Nei era anche più bassa e variava tra 0,44 e 0,56 (tabella 2.29). Va notato che il mais dentato chiamato "La Chusca" è stato il più eterogeneo, a causa delle molteplici origini del suo allevamento, essendo derivato da una serie di incroci di parentali diversi. L'allegato 3 presenta i parametri genetici di ogni locus per ciascuna delle popolazioni studiate.

Le due popolazioni ibride incluse nello studio di 37 popolazioni erano PMX5 da UNALM (HJ) e DeKalb (HK) e hanno mostrato polimorfismi dell'85,71% e 42,86% rispettivamente. Per i parametri numero di alleli osservati e attesi, l'ibrido HJ ha mostrato valori di 2,28 - 1,66, mentre HK ha mostrato valori inferiori (1,42 - 1,42).

Anche gli indici di diversità di Shannon e Nei erano bassi in entrambe le popolazioni (0,56 - 0,34 contro 0,29 - 0,21).

Tabella 2.29. Parametri delle popolazioni nel mais ibrido dentato del INIA

Popolazione	N° Loci freq. allelica < 99%	% Poli morfismo	na*	ne*	Inice di Shannon (I)	Eterozigosità osservata	Eterozigosità attesa di Nei**	Indice G-W
Ibrido INIA 605 (HD)	8	100	2.500	2.107	0.781	0.969	0.523	0.210
Ibrido INIA 608 (HE)	8	100	3.500	2.427	0.990	0.677	0.568	0.223
Ibrido INIA 611 (HF)	8	100	2.875	2.039	0.749	0.728	0.456	0.267
Ibrido INIA 609 (HG)	8	100	3.125	2.261	0.903	0.596	0.538	0.228
Ibrido INIA 617 "La Chusca" (HI)	8	100	2.875	2.047	0.744	0.500	0.441	0.230

### 2.3.2 Confronto tra popolazioni

#### a) Differenziazione tra le popolazioni

Per definire se le 28 popolazioni del primo gruppo che sono state studiate per le diverse varietà di mais peruviano hanno un basso, moderato o alto grado di differenziazione tra loro, si è ritenuto conveniente determinare e analizzare lo stato di questa differenziazione genetica attraverso la stima delle statistiche "F" di Wright, che sono state sviluppate per conoscere lo stato di inbreeding degli individui di una popolazione strutturata. A questo scopo, abbiamo utilizzato le analisi sviluppate con i programmi POPGENE 1.31 nell'opzione di popolazioni multiple e raggruppate in 2 e 7 gruppi, secondo il loro tipo razziale o luogo di distribuzione, e il programma Arlequin 3.5, con cui sono state determinate le analisi molecolari della varianza (AMOVA).

Secondo l'analisi delle popolazioni a scelta multipla nel programma POPGENE, sono evidenti due grandi gruppi. Il primo è formato dal mais vitreo che comprende quelli locali della costa (AB, AI, AT, MB, MMA, MMB, MT, CYB, CYI, CHB), degli altipiani (CB, CGB, HUB, SGH, SGB, K, CA, PN, MA) e della giungla (PI); e il secondo che comprende il mais ibrido dentato di origine introdotta (HA, HB, HC, HD, HE, HF, HG, HI). La media degli stimatori di eterozigosità osservati e attesi e la statistica "F" sono stati determinati anche per questi due grandi gruppi di mais (vitrei locali e ibridi dentati) e sono presentati nella Tabella 2.30.

Per il mais vitreo locale, l'indice di fissazione intra-popolazione ha portato a un valore  $F_{IS} = 0,08$ ; la fissazione totale ( $F_{IT}$ ) ha raggiunto 0,26 e il valore  $F_{ST} = 0,20$ . Mentre per i mais ibridi dentati, i valori erano:  $F_{IS} = -0,21$ ,  $F_{IT} = 0,18$  e  $F_{ST} = 0,32$ . Questi valori di fissazione registrati per i mais vitrei indicano che tutto questo gruppo ha un grado moderato di inbreeding intra-popolazione ( $F_{IS} = 0,08$ ), un'alta carenza di eterozigoti ( $F_{IT} = 26,96\%$ ) e una certa differenziazione tra popolazioni ( $F_{ST} = 20,05\%$ ). La distribuzione geografica irregolare del Perù, che va dal deserto costiero con valli provenienti dagli altipiani e dalla catena montuosa delle Ande, che può arrivare fino a 6768 m.s.l.m., per poi scendere a 1000 o 800 m.s.l.m. nella giungla, o le piccole dimensioni degli appezzamenti di coltivazione posseduti dagli agricoltori, possono spiegare l'elevata differenziazione genetica di queste varietà di mais. Bisogna anche sottolineare che molte di queste popolazioni provengono dalla banca del germoplasma e sono rappresentative delle zone in cui si trovano e vengono coltivate; inoltre, questi mais vengono rinnovati nella banca ogni 7 o 10 anni, a seconda dello stato di vitalità dei semi, facendo attenzione che non si impollinino liberamente con altri mais.

L'analisi molecolare della varianza (AMOVA) considerando le 28 popolazioni come una metapopolazione, ha mostrato un  $F_{ST}$  tra tutte le popolazioni di 0,24, cioè il 24,43% (Tabella 2.31), ma la variazione maggiore era concentrata tra individui (71,48%). Allo stesso modo, la differenziazione tra le 28 popolazioni utilizzando il programma POPGENE è stata elevata al 29,76% ( $F_{ST} = 0.2976$ ). Questi valori di differenziazione sono diversi ma elevati, perché ogni programma utilizza criteri diversi (numero di alleli diversi nell'AMOVA del programma Arlequin e frequenze alleliche nel programma POPGENE).

L'alto livello di differenziazione osservato ci permette di affermare che abbiamo a che fare con una specie con diversi gruppi di popolazione, poiché stiamo confrontando il mais locale con il gruppo di mais introdotto (ibridi). Inoltre, il mais locale è il risultato della grande diversità geografica, climatica e culturale del Perù, così come i tipi di appezzamenti di dimensioni molto variabili e relativamente piccole, e anche il movimento di semi durante ogni stagione agricola, ecc.

L'inclusione delle 9 popolazioni per costituire le 37 popolazioni studiate è

stata analizzata utilizzando l'AMOVA presentata nella Tabella 2.32, che mostra una differenziazione molto alta (32,18%) tra tutte le popolazioni di mais; la variazione percentuale tra gli individui all'interno di ogni popolazione è stata del 6,87%, ma il valore più alto era nella variazione tra individui (60,95%), questi valori indicano che questa è una coltura molto eterogenea, ma con un grado molto alto di inbreeding totale ( $F_{IT} = 0,39$ ).

**Tabella 2.30. Wright F-statistica del mais vitreo e degli ibridi dentati (28 popolazioni)**

Media	Dimensioni del campione	Eterozigosità osservata	Eterozigosità attesa di $N_{ej}^{**}$	Fis	Fit	Fst	Nm*
Mais ibrido dentato	189	0.5502	0.6746	-0.2126	0.1808	0.3244	0.5205
Mais vitreo	883	0.5072	0.6839	0.0864	0.2696	0.2005	0.9966

**Tabella 2.31. AMOVA basato sul numero di alleli diversi ( $F_{ST}$ ) per 28 popolazioni come un unico gruppo**

Fonti di variazione	G.l	Somma dei quadrati	Componenti della varianza		% di varianza
Tra popolazioni	27	780.862	0.68997	Va	24.43
Tra individui all'interno delle popolazioni	520	1170.285	0.11569	Vb	4.1
All'interno degli individui	548	1106.5	2.01916	Vc	71.48
Totale	1095	3057.647	2.82483		
Indici di fissazione					
FIS = Tra indiv/pop = $Vb/(Vt-Va)$	0.05419				
FST = Differenziazione tra le popolazioni = $Va/Vt$	0.24425	≈ 24.425%			
FIT	0.28521				

**Tabella 2.32. AMOVA basato sul numero di alleli diversi (Fst) per 37 popolazioni come un unico gruppo**

Fonti di variazione	G.I	Somma dei quadrati	Componenti della varianza		% di varianza
Tra popolazioni	36	1209.296	0.895	Va	32.18
Tra individui all'interno delle popolazioni	638	1290.117	0.19109	Vb	6.87
All'interno degli individui	675	1120	1.69481	Vc	60.95
Totale	1349	3619.413	2.7809		
Indici di fissazione					
FIS = Tra indiv/pop = $Vb/(Vt-Va)$	0.10132				
FST = Differenziazione tra le popolazioni = $Va/Vt$	0.32184	≈ 32.18%			
FIT	0.3906				

### **a.1) Confronto tra mais vitreo locale e ibridi dentati (2 sottogruppi)**

L'AMOVA per le 28 popolazioni separate in 2 gruppi (vitreo locale ed ibridi dentati) è presentata nella 2.33, dove possiamo vedere come si distribuisce la variazione. Un 16,93% è concentrato tra i 2 grandi gruppi di mais; un altro 16,41% è contenuto tra le popolazioni all'interno di ogni gruppo; ma, la maggior quantità di variazione totale è tra individui con il 63,05%. Questi valori indicano che, sebbene il mais vitreo locale e quello ibrido abbiano origini diverse, l'allogamia del mais e il fatto che si tratta di una specie con un sistema di allevamento monoico significa che gli alleli si combinano in modo permanente e questo fatto comporta una grande quantità di variazione all'interno degli individui.

L'AMOVA ottenuta per l'insieme di 37 popolazioni, separate nei gruppi vitrei e ibridi dentati è presentata nella Tabella 2.34, dove notiamo che la differenziazione tra gruppi è stata del 13,16%, un valore moderato, la variazione percentuale tra individui all'interno di ogni popolazione è stata del 24,73% e la variazione tra individui è risultata del 62,11%, un valore simile a quello trovato per l'analisi con le 28 popolazioni iniziali. L'inbreeding totale è molto alto in questi due gruppi con 0,37, indicando che le popolazioni recenti della banca del germoplasma dell'UNALM stanno cambiando nella loro composizione allelica e quindi, è necessario costituire una collezione di nuclei affinché si possa realizzare una caratterizzazione più intensa e aggiornata, considerando che i campioni del primo gruppo appartengono a vecchie accessioni mantenute dal programma di ricerca UNALM

Per quanto riguarda la descrizione della differenziazione tra le popolazioni e le statistiche "F" per le 28 popolazioni che sono state separate in 7 gruppi secondo il tipo razziale d'origine: Alazanes (AB, AI, AT); Mocheros (MB, MMA, MMB, MT), Chancayanos (CYB, CYI); Chaparreño e Piricinco (CHB, PI); mais di altopiano (CB, CGB, HUB, SGH, SGB, K, CA, PN, MA); ibridi Pioneer (HA, HB, HC); ibridi INIA (HD, HE, HF, HG, HI), Tabella 2. 35 presenta i risultati. Il mais Alazan e Mochero hanno mostrato inbreeding e differenziazione moderati ( $F_{ST}$  di 0,07 e 0,12); tuttavia, in base al valore FIT, abbiamo notato che c'era un'elevata mancanza di eterozigoti nella popolazione Alazan (AB) con bassa differenziazione rispetto ad altri mais da amido. Il mais Mochero (MB) ha mostrato un'alta differenziazione (0,18) e inbreeding. Il mais Chancayano (CYB, CYI) si è comportato come popolazioni con alta consanguineità e differenziazione ( $F_{ST} = 0,19$ ), ma con leggera esogamia ( $FIS = -0,03$ ). Allo stesso modo, Chaparreño (CHB) e Piricinco de Tarapoto (PI), hanno registrato un'assenza di eterozigoti e una differenziazione molto alta ( $FIT = 0,29$ ,  $F_{ST} = 0,25$ ).

Il mais dell'altopiano (CB, CGB, HUB, SGH, SGB, K, CA, PN, MA) ha mostrato un'alta mancanza di eterozigoti, inbreeding moderato e differenziazione  $F_{ST} = 0,14$ ; tuttavia, ma 5 delle 9 popolazioni hanno mostrato un'elevata differenziazione ( $F_{ST} > 0,20$ ). È importante conoscere questi parametri in questo gruppo di mais, come parte di una linea di base, dal momento che, negli ultimi anni, ci sono agricoltori nel sud di Lima (provincia di Cañete) che stanno coltivando con l'obiettivo di adattare il mais di alta montagna a queste zone costiere; tuttavia, c'è ancora un forte problema di parassiti in questi mais, a causa dei valori di umidità e temperatura più elevati della costa peruviana. Inoltre con la crescente domanda di mais Canteño (CB) conosciuto come "mais viola"), che viene esportato negli Stati Uniti e in Europa, ci sono agricoltori che mostrano grande interesse a coltivare questo tipo di mais sulla costa, dove viene coltivato anche il mais ibrido dentato potrebbe verificarsi un flusso genico..

Nei campioni degli ibridi Pioneer dentato (HA, HB, HC) sono stati trovati alti valori di inbreeding, carenza di eterozigoti e differenziazione ( $FIS = 0,15$ ,  $FIT = 0,37$ ,  $F_{ST} = 0,25$ ), mentre gli ibridi INIA (HD, HE, HF, HG, HI), al contrario,



avevano un'alta differenziazione, ma con una predominanza di accoppiamenti esogami ( $F_{ST} = 0,06$ ,  $F_{IS} = -0,37$ ). La tabella 2.35 presenta i 3 indici di fissazione nelle 9 popolazioni aggiunte allo studio.

Abbiamo osservato che la popolazione di Alazán (ABU) ha mostrato un'alta mancanza di eterozigoti, un'alta inbreeding e una differenziazione negativa. Anche il mais Mochero (MBU) e Chancayano (CYU) hanno mostrato un'alta differenziazione con  $F_{ST}$  di 0,17 e 0,15 rispettivamente e hanno mostrato un'alta consanguineità e una carenza di eterozigoti molto alta. Canteño (CBU), Cusco Gigante (CGBU) e San Gerónimo Huancavelicano (SGHU), così come Chancayano hanno mostrato una carenza di eterozigoti molto alta, con una differenziazione molto alta in CBU e SGHU e moderata in CGBU. La popolazione Piricinco (PIU) ha mostrato una differenziazione molto alta, un'alta consanguineità e omogeneità genetica. L'ibrido DeKalb (HK) ha mostrato una differenziazione molto alta ( $F_{ST} = 0,72$ ) dal mais Pioneer introdotto, che si spiega in gran parte con le poche varianti alleliche trovate nei campioni. Il mais ibrido PMX5 (HJ) ha mostrato una bassa differenziazione con il mais ibrido INIA; si spiega con il fatto che tutti i mais ibridi dell'università e INIA sono di origine introdotta e adattati alle condizioni della costa peruviana.

**Tabella 2.33. AMOVA basato sul numero di alleli diversi (Fst) per 2 gruppi: mais vitreo (gruppo 1) e dentato (gruppo 2), 28 popolazioni**

Fonti di variazione	G.I	Somma dei quadrati	Componenti della varianza		% di varianza
Tra i gruppi	1	189.693	0.542	Va	16.93
Tra le popolazioni all'interno dei gruppi	26	591.169	0.52549	Vb	16.41
Tra individui all'interno delle popolazioni	520	1170.285	0.11569	Vc	3.61
All'interno degli individui	548	1106.5	2.01916	Vd	63.05
Totale	1095	3057.647	3.20234		
Indici di fissazione					
FIS = Tra indiv/pop/gruppo = $Vc/(Vt-Va-Vb)$	0.05419				
FSC = Tra pop/gruppo = $Vb/(Vt-Va)$	0.19753				
FCT = Differenziazione tra gruppi = $Va/Vt$	0.1693	≈ 16.93%			
FIT	0.36947				

**Tabella 2.34. AMOVA basato sul numero di alleli diversi (Fst) per 2 gruppi: mais vitreo (gruppo 1) e dentato (gruppo 2), 37 popolazioni**

Fonti di variazione	G.I	Somma dei quadrati	Componenti della varianza		% di varianza
Tra i gruppi	1	115.751	0.29.86	Va	13.16
Tra individui all'interno delle popolazioni	673	1659.301	0.54647	Vc	24.73
All'interno degli individui	675	926.5	1.37259	Vd	62.11
Totale	1349	2701.552	2.20992		
Indici di fissazione					
FIS = Tra indiv/pop/gruppo = $Vc/(Vt-Va-Vb)$	0.28476				
FST = Differenziazione tra gruppi = $Va/Vt$	0.13161	≈ 13.16%			
FIT	0.3789				

**Tabla 2.33. Wright "F" statistica in 28 popolazioni iniziali (distribuito in 7 gruppi) e 9 popolazioni aggregati**

Gruppi	Popolazione	Codice	F <sub>IS</sub>	F <sub>IT</sub>	F <sub>ST</sub>
1	Alazan Banca	AB	0.1868	0.1957	0.0110
	Alazan Tucume	AT	0.0418	0.1957	0.1606
	Alazan Illimo	AI	0.1666	0.1957	0.0350
	"F" Media mais Alazan		<b>0.1298</b>	<b>0.1957</b>	<b>0.0758</b>
2	Mochero Banca	MB	0.0491	0.2229	0.1828
	Mochero de Tucume	MT	0.1046	0.2229	0.1322
	Mochero de Mochumi 1	MMA	0.1464	0.2229	0.0896
	Mochero de Mochumi 2	MMB	0.1589	0.2229	0.0761
	"F" Media mais Mochero		<b>0.1121</b>	<b>0.2229</b>	<b>0.1247</b>
3	Chancayano Banca	CYB	-0.0153	0.1666	0.1791
	Chancayano INIA	CYI	-0.0208	0.1666	0.1836
	"F" Media mais Chancayano		<b>-0.0300</b>	<b>0.1666</b>	<b>0.1909</b>
4	Chaparreo Banca	CHB	0.0561	0.291	0.2488
	Piricinc Tarapoto	PI	0.0291	0.291	0.2698
	"F" Media mais della costa e giungla		<b>0.0486</b>	<b>0.291</b>	<b>0.2548</b>
5	Canteño Banca	CB	0.0462	0.2696	0.2342
	Cusco Gigante Banca	CGB	0.0616	0.2696	0.2217
	Huancavelicano Banca	HUB	0.1775	0.2169	0.0479
	San Geronimo Huancavelicano Banca	SGH	0.1505	0.2169	0.0782
	San Geronimo Banca	SGB	-0.0156	0.2169	0.2289
	Kully Cusco	K	0.0064	0.2169	0.2119
	Cabanita di Cabanaconde	CA	0.1049	0.2169	0.1251
	Cabanita di Pinchollo	PN	0.0132	0.2169	0.2064
	Cabanita di Madrigal	MA	0.2508	0.2169	-0.0453
	"F" Media mais dell'alto piano		<b>0.0855</b>	<b>0.2169</b>	<b>0.1437</b>
	"F" Media mais vitreo		<b>0.0864</b>	<b>0.2696</b>	<b>0.2005</b>
6	Ibrido dentato Pioneer 1	HA	0.2303	0.3704	0.1820
	Ibrido dentato Pioneer 2	HB	0.2767	0.3704	0.1295
	Ibrido dentato Pioneer 3	HC	0.0067	0.3704	0.3661
	"F" Media ibridi dentati Pioneer		<b>0.1514</b>	<b>0.3704</b>	<b>0.2580</b>
7	Ibrido dentato INIA 1	HD	-0.8524	-0.0562	0.4298
	Ibrido dentato INIA 2	HE	-0.1929	-0.0562	0.1146
	Ibrido dentato INIA 3	HF	-0.5959	-0.0562	0.3382
	Ibrido dentato INIA 4	HG	-0.1079	-0.0562	0.0467
	Ibrido dentato INIA 5	HI	-0.1351	-0.0562	0.0695
	"F" Media ibridi dentati INIA		<b>-0.3742</b>	<b>-0.0562</b>	<b>0.2314</b>
	"F" Media ibridi dentati		<b>-0.2126</b>	<b>0.1808</b>	<b>0.3244</b>
<b>9 popolazioni aggiunte per formare un totale di 37</b>					
	Popolazione	Codice	F <sub>IS</sub>	F <sub>IT</sub>	F <sub>ST</sub>
	Alazan Banca 11-16	ABU	0.3723	0.3359	-0.0580

Mochero Banca 06-14	MBU	0.1663	0.3110	0.1735
Chancayano Banca E44-45	CYU	0.1644	0.2973	0.1590
Canteño Banca CA12	CBU	0.1086	0.3878	0.3132
Cusco Gigante Banca CU15-18	CGBU	0.3081	0.3878	0.1152
Piricincó Banca T3-4-21	PIU	0.2721	0.5226	0.3442
San Gerónimo Huancavelicano Banca 87-129	SGHU	0.0852	0.3878	0.3308
Ibrido dentato mais PMX-5	HJ	0.0785	0.1110	0.0353
Ibrido dentato mais Dekalb	HK	-1.0047	0.4584	0.7298

## a.2) Confronto tra i mais separati in 4 raggruppamenti (Costa e giungla, altipiani, ibridi Pioneer ed ibridi INIA)

Il confronto fatto separando il mais vitreo in base all'origine geografica, della costa e degli altipiani, accanto agli ibridi dentati (Pioneer e INIA) ha mostrato il seguente comportamento nei parametri di popolazione (Tabella 2.36):

**a.2.1) Sottogruppo mais vitrei della costa e della giungla**, presentano medie nei numeri dialleli osservati e attesi di 8,25 e 4,09, rispettivamente. Il locus ZM04 presentava fino a 12 alleli diversi, seguito dal locus ZM22 con 10 alleli diversi. I loci che presentavano valori più bassi erano ZM25 e ZM27 con 6 alleli. Gli indici di diversità di Shannon e Nei erano 1,53 e 0,71. La statistica "F" ha dato come risultato una fissazione intra-popolazione di 0,08, una differenziazione genica del 22,37% e la fissazione totale del gruppo ha raggiunto il 29,15%. Il flusso genico era basso e inferiore a 1 (0,86).

**a.2.2) Sottogruppo di mais vitreo della Sierra**, in questo gruppo di mais i loci ZM04 e ZM25 mostravano 11 e 4 diversi alleli, rispettivamente, con un valore medio di 7,5 e un numero atteso di 3,2. Gli indici di diversità Shannon e Nei hanno mostrato medie di 1,30 e 0,63 rispettivamente. Il grado di diversità genetica di Nei era in media più basso in questo gruppo di mais rispetto al mais costiero. Le statistiche "F" che indicano il grado di fissazione o di inbreeding erano inferiori a quelle del mais costiero con valori di 0,21 nell'inbreeding totale, 8,55% nell'inbreeding intra-popolazione (simile al mais costiero) e la differenziazione stimata da Fst era inferiore con una media di 0,14 contro il 22,37% del mais costiero. Anche lo stimatore del flusso genico era più alto con una media di 1,49,

indicando che il flusso genico predomina sull'inbreeding in questo gruppo di mais

**a.2.3) Sottogruppo mais ibrido dentato Pioneer**, i parametri del mais dentato dell'azienda Pioneer hanno mostrato medie per il numero di alleli osservati e previsti pari a 3,3 e 2,30. Gli indici di diversità di Shannon e Nei erano 0,90 e 0,50. L'eterozigosità osservata era 0,31 e l'eterozigosità attesa Nei era 0,50. La statistica "F" ha presentato valori di 0,37 come indice di fissazione totale, un inbreeding intrapopolazione di 0,15 e una differenziazione del 25,8% e il valore del flusso genico inferiore a uno, indicando che il flusso genico non predomina.

**a.2.4) Sottogruppo mais ibrido dentato INIA**, questo sottogruppo ha presentato medie più alte nel numero di alleli osservati e attesi rispetto agli ibridi Pioneer, con valori di 5,12 e 3,21. Nei loci ZM04 e ZM15 sono stati osservati fino a 7 alleli diversi, mentre i loci ZM31 e ZM33 hanno mostrato solo 3 alleli diversi. Gli indici di diversità di Shannon e Nei in questo sottogruppo presentavano cifre più alte che negli altri ibridi (1,27 e 0,65). In relazione alla statistica "F", si è ottenuta una media Fis negativa (-0,37), che indica la presenza di esogamia media in questo gruppo. L'inbreeding totale medio quantificato da Fit era di 0,23 e la differenziazione tra le popolazioni era del 23,14%, inferiore a quella degli altri mais dentato. Lo stimatore di flusso genico è troppo basso per cui è da escludersi un flusso genico tra questi mais.

**Tabella 2.36. Parametri genetico popolazioni tra 4 gruppi di mais (costa, sierra, ibridi Pioneer, ibridi INIA)**

Media	Dimensioni del campione	Eterozigosità osservata	Eterozigosità attesa di Nei**	Fis	Fit	Fst	Nm*
Mais della costa e giungla	451	0.512	0.714	0.087	0.292	0.224	0.868
Mais della sierra	432	0.502	0.634	0.086	0.217	0.144	1.490
Dentato Pioneer	71	0.317	0.505	0.151	0.370	0.258	0.719
Dentato INIA	118	0.690	0.657	- 0.37 4	0.056	0.231	0.831

Un test AMOVA è stato poi eseguito sui 4 sottogruppi per determinare come la variazione sia distribuita in questo tipo di disposizione. La Tabella 2.37 mostra che la maggior quantità di variazione si è concentrata all'interno degli individui con un 69,03%, seguita dalla variazione tra le popolazioni all'interno dei gruppi con il 16,44%. Segue la variazione tra i quattro gruppi con il 10,58% mentre il valore più basso è stato registrato tra gli individui all'interno delle popolazioni con il 3,96%. La differenziazione tra i sottogruppi era del 10,58%.

**Tabella 2.37. AMOVA basato sul numero di alleli diversi (Fst) per i 4 gruppi di mais: costa, sierra, ibridi Pioneer, ibridi INIA**

Fonti di variazione	G.I	Somma dei quadrati	Componenti della varianza		% di varianza
Tra i gruppi	3	279.366	0.30952	Va	10.58
Tra le popolazioni all'interno dei gruppi	24	501.496	0.48086	Vb	16.44
Tra individui all'interno delle popolazioni	520	1170.285	0.11569	Vc	3.96
All'interno degli individui	548	1106.5	2.01916	Vd	69.03
Totale	1095	3057.647	2.92523		
Indici di fissazione					
FIS = Tra indiv/pop/gruppo = $Vc/(Vt-Va-Vb)$	0.05419				
FSC = Tra pop/gruppo = $Vb/(Vt-Va)$	0.18383				
FCT = Differenziazione tra gruppi= $Va/Vt$	0.10581	≈ 10.58%			
FIT	0.30974				

### **a.3) Confronto tra i mais vitrei, separandoli in 6 raggruppamenti**

**a.3.1) Il sottogruppo Alazán** ha presentato una media nel numero di alleli osservati ed effettivi di 6,62 e 3,48. Sono stati osservati due loci con 8 alleli diversi mentre il locus ZM27 ha presentato il numero più basso di alleli diversi (5). La diversità di Shannon era alta con un valore di 1,38 mentre la diversità genetica di Nei era pari a 0,67. L'inbreeding medio totale era del 19,57%, l'inbreeding intra popolazione del 12,98% e la differenziazione tra tutti i campioni del gruppo era del 7,58%, indicando l'esistenza di una grande mescolanza, quantificata per mezzo del flusso genico  $N_m$  con un valore di 3,04.

**a.3.2) Il sottogruppo Mochero** ha presentato valori più alti nel numero di alleli osservati ed effettivi (7,37 e 4,02) e la quantità di alleli diversi variava tra 11 per il locus ZM04 e 5 nel locus ZM25. Gli indici medi di diversità erano 1,52 (Shannon) e 0,72 (Nei). Secondo le statistiche "F", possiamo apprezzare che l'inbreeding medio intrapopolazione  $F_{is}$  era dell'11,21%, l'inbreeding  $F_{it}$  totale del 22,29% e la differenziazione tra il mais Mochero era del 12,47%, superiore a quella del mais Alazan. Allo stesso modo, il flusso genico era più basso, ma con una cifra che indica che c'è flusso genico tra questi mais ( $N_m = 1,75$ ).

**a.3.3) Il sottogruppo Chancayano**, a differenza del mais Mochero e Alazan, ha presentato valori più bassi nel numero di alleli osservati e attesi (con valori di 4,62 e 2,82 rispettivamente). Il locus con più varianti alleliche era ZM04 (6) mentre i loci ZM25 e ZM27 avevano solo 3 alleli diversi. Gli indici di diversità hanno registrato valori di 1,15 per l'indice di Shannon e 0,60 per l'indice di Nei. Gli indici di fissazione "F" hanno registrato valori di  $F_{is} = -0,03$  (indicando la presenza di accoppiamenti esogamici),  $F_{it} = 0,16$  e la differenziazione tra questi mais era 19,09%. Per quanto riguarda lo stimatore del flusso genico, il valore è maggiore di uno ( $N_m = 1,06$ ) indicando che c'è un basso livello di flusso genico.

**a.3.4) Il sottogruppo Chaparreño e Piricinco** ha presentato valori simili al Chancayanone nel numero di alleli osservati e attesi (4,50 e 2,36); mentre il numero di alleli diversi variava tra 7 e 2. L'indice medio di Shannon era basso (0,93) e la diversità genetica di Nei era inferiore (0,47). Gli indici di fissazione erano pari a 0,04 per  $F_{is}$ , l'inbreeding totale era 0,29 e la differenziazione tra il mais Chaparreño e

Piricinco era del 25,48%. Lo stimatore del flusso genico indica che l'inbreeding predomina tra queste varietà di mais.

**a.3.5) Sottogruppo mais d'altopiano (Sierra).** Per queste popolazioni di mais abbiamo registrato che il numero osservato e atteso di alleli diversi era 7,5 e 3,22, il locus ZM04 ha registrato il numero più alto (11) mentre il valore più basso è stato visto nel locus ZM25 con 4 alleli diversi. Gli indici di diversità erano 1,30 per Shannon e 0,63 per la diversità genetica di Nei. Il comportamento degli indici di fissazione era 8,55% per l'inbreeding intrapopolazione, 21,69% per l'inbreeding totale e la differenziazione tra tutti i mais della Sierra era 14,37%. Per quanto riguarda il flusso genico, lo stimatore  $Nm$  (1,49) era maggiore di uno, indicando che si sono verificate situazioni di flusso genico tra questi mais.

**a.3.6) Sottogruppo mais dentato,** questo gruppo ha presentato medie di 5,75 e 3,24 per il numero di alleli diversi osservati ed effettivi con un numero di alleli osservati compreso tra 8 e 3. Gli indici di diversità di Shannon e Nei erano alti con valori di 1,33 e 0,67 rispettivamente. Per quanto riguarda gli indici di fissazione, il valore negativo dell'indice  $F_{is}$  (-0,21) conferma la presenza di accoppiamenti esogamici. L'inbreeding totale era del 18,08% e la differenziazione della popolazione tra i mais dentati analizzati era del 32,44%. Non ci sono prove di flusso genico tra queste popolazioni. La Tabella 2.38 contiene un riassunto dei parametri per tutti i sottogruppi.



**Tabella 2.38. Confronto tra 6 gruppi di mais (Alazan, Mochero, Chancayano, Chaparreño – Piricinco, maïs dell’altopiano e mais ibridi dentati)**

Media	Dimensioni del campione	Eterozigosità osservata	Eterozigosità attesa di Nei**	Fis	Fit	Fst	Nm*
Mais della costa Alazan	130	0.5468	0.677	0.1298	0.1957	0.0758	3.0486
Mais della costa Mochero	181	0.5628	0.7227	0.1121	0.2229	0.1247	1.7542
Mais della costa Chancayano	64	0.5068	0.607	-0.03	0.1666	0.1909	1.0599
Mais della costa e giungla: Chaparreño, Piricinco	76	0.3343	0.4739	0.0486	0.291	0.2548	0.7311
Mais della Sierra	432	0.502	0.6335	0.0855	0.2169	0.1437	1.4903
Mais dentato	189	0.5502	0.6746	0.2126	0.1808	0.3244	0.5205

L'analisi AMOVA effettuata sui 6 gruppi evidenzia che la variazione all'interno degli individui è stata la più alta con il 70,14% mentre è più bassa tra gli individui all'interno delle popolazioni con il 4,02%. La variazione tra le popolazioni all'interno di ogni gruppo era del 16,81% e la variazione tra i gruppi era del 9,03%, essendo equivalente alla differenziazione che esiste tra i 6 gruppi. La Tabella 2.39 contiene le componenti della varianza descritte.

**Tabella 2.39. AMOVA basata sul numero di alleli diversi (Fst) per i 6 gruppi di mais: Alazan, Mochero, Chancayano, Chaparreo e Piricinco, Mais dell'altopiano e mais dentato.**

Fonti di variazione	G.I	Somma dei quadrati	Componenti della varianza		% di varianza
Tra i gruppi	5	329.445	0.26004	V <sub>a</sub>	9.03
Tra le popolazioni all'interno dei gruppi	22	451.417	0.48384	V <sub>b</sub>	16.81
Tra individui all'interno delle popolazioni	520	1170.285	0.11569	V <sub>c</sub>	4.02
All'interno degli individui	548	1106.5	2.01916	V <sub>d</sub>	70.14
Totale	1095	3057.647	2.87873		
Indici di fissazione					
FIS = Tra indiv/pop/gruppo = $V_c/(V_t-V_a-V_b)$	0.05419				
FSC = Tra pop/gruppo = $V_b/(V_t-V_a)$	0.18476				
FCT = Differenziazione tra gruppi = $V_a/V_t$	0.09033	≈ 9.03%			
FIT	0.29859				

## **b) Analisi della struttura della popolazione**

### **b.1) Analisi 28 popolazioni: 20 vitrei e 8 mais ibridi dentati, 8 loci SSR**

L'analisi della struttura genetica nelle 28 popolazioni di mais è stata effettuata con un totale di 548 individui, che sono stati considerati come una grande metapopolazione ipotizzando che sia strutturata in 28 gruppi diversi.

Per capire se questa separazione, basata principalmente sulla morfologia dei tipi razziali, è corretta, sono state prese come riferimento l'analisi degli indici di fissazione e la valutazione del valore dell'indice  $F_{ST}$  tra tutte le popolazioni. Questo parametro era alto con il 24,42%. Pertanto, possiamo pensare che le 28 popolazioni manterrebbero sufficienti differenze tra di loro come risultato dell'equilibrio tra deriva e flusso genico.

Per completare questa percezione, l'analisi delle componenti principali (ACP) è stata utilizzata come criterio aggiuntivo; dove si può vedere che le prime due componenti principali concentrano la maggiore variazione, ma raggiungono solo l'11,9%; questo è un valore basso e ci si aspetterebbe che fosse più alto se le forze evolutive stessero agendo e spiegando questa alta differenziazione.

Risultati simili sono stati ottenuti da van Heerwaarden et al. (2011), nelle loro PCA di uno studio di introgressione nel mais locale, dove spiegano che i valori bassi possono essere ottenuti a causa dell'isolamento delle popolazioni. Questo effetto è noto come "effetto distanza", e spiega la relazione tra il flusso genico tra le popolazioni, dove c'è una correlazione di maggiore differenziazione genetica con una maggiore distanza (Garrido-Garduño, T. e Vázquez-Domínguez, E.; 2013). Questo effetto era legato a valori bassi nelle PCA realizzate da Novembre et al. (2008) nella valutazione dei risultati di Cavalli-Sforza nel 1994.

La Figura 2.6 presenta l'ACP della distribuzione di queste popolazioni sui due assi, dove la prima componente ci permette di apprezzare che il mais ibrido dentato è separato in un grande gruppo disperso in 3 sottogruppi; il primo proveniente dalla società Pioneer (HC), il secondo Pioneer I, II (HA, HB)

insieme a INIA I (HD) e il terzo nucleo che comprende gli ibridi INIA (HE, HF, HG, HI).

Questi ibridi INIA fanno parte del mais che entra nel paese da più di 40 anni e da questo materiale genetico l'INIA applica i suoi processi di breeding per ottenere nuovi ibridi o varietà derivanti da incroci di più parentali come quello utilizzato in questo studio (INI V "la Chusca" - HI), che poi rilascia per l'uso da parte degli agricoltori, anche se la distribuzione di questo seme è sempre più scarsa a causa della grande presenza di nuovi ibridi più produttivi che entrano nel paese.

L'altro grande gruppo è costituito dal mais nativo o locale, dove si possono vedere fino a tre sottogruppi, uno formato dal tipo razziale Huancavelicano (HUB) insieme al Chancayano INIA (CYI), un altro che comprende una grande miscela di diversi tipi razziali e comprende le popolazioni studiate (AB, AI, AT, MB, MMA, MMB, MT, CYB, CB, CGB, CHB, SGH, SGB, K, CA, PN, MA). Il terzo sottogruppo è più separato e corrisponde al mais Piricinco (PI), che viene coltivato in piccole estensioni nella foresta pluviale di pianura dei dipartimenti di San Martín e Loreto. Notiamo che la PCA ha permesso di visualizzare che nonostante la coesistenza tra gli ibridi e alcuni mais locali, essi sono rimasti geneticamente separati e non si incrociano liberamente nonostante la natura allogama del mais.

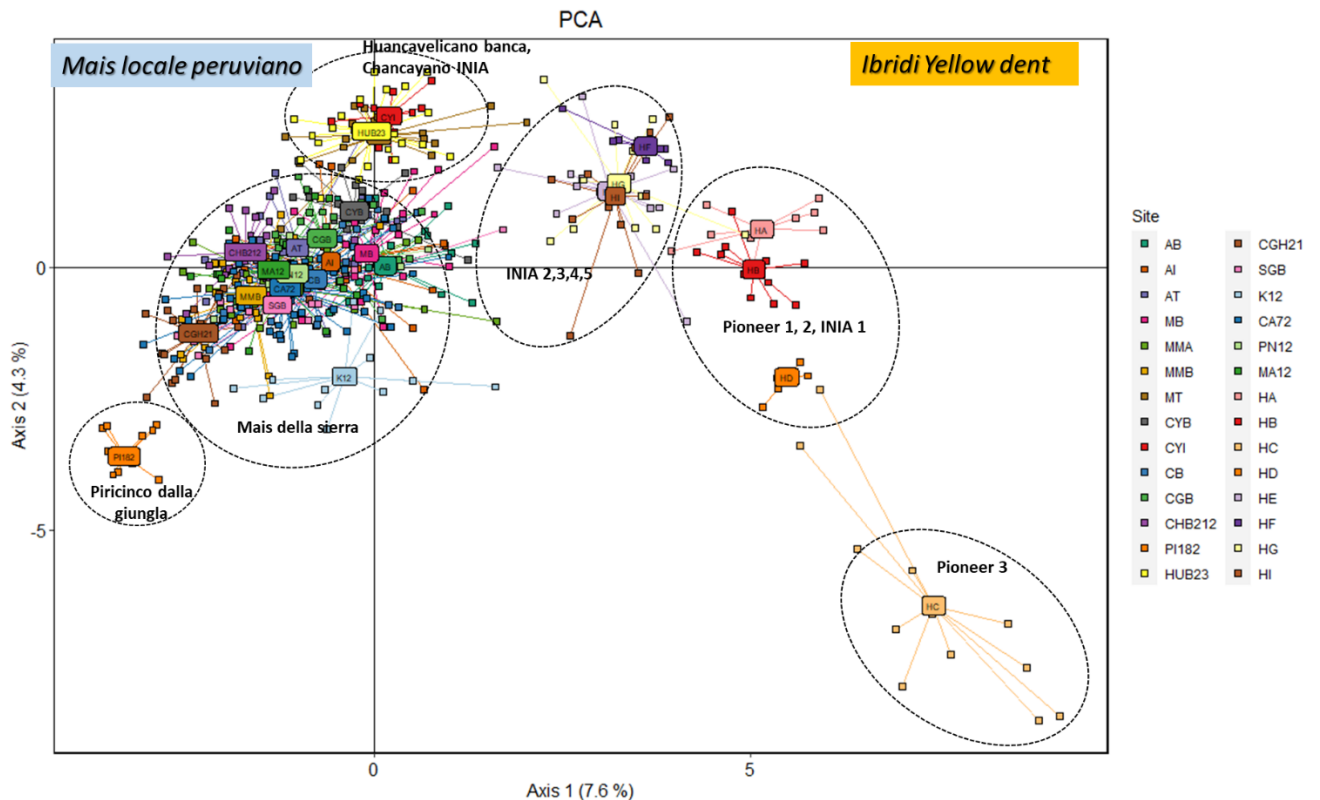


Figura 2.6. Analisi delle componenti principali su 28 popolazioni di mais: 20 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati.

Per capire meglio come sono strutturate le 28 popolazioni, abbiamo proceduto a stimare con il metodo di Rosenberg et al. (2001) il valore di probabilità più plausibile che questo insieme di individui sia distribuito in  $k$  gruppi. Secondo la Figura 2.7, per le 28 popolazioni, osserviamo che per valori di  $k$  maggiori di 4 cominciamo a notare una maggiore deviazione, essendo molto alta ad un valore di  $k = 20$ .

Pertanto, è più conveniente utilizzare il metodo di Evanno et al. (2005) più appropriato per trovare il valore di  $k$ , questo metodo considera il tasso di cambiamento del secondo ordine della probabilità ( $\Delta K$ ). Nella Figura 2.8, il valore più grande che  $\Delta k$  raggiunge si verifica quando  $k = 2$ , cioè l'insieme di 548 individui nella metapopolazione è strutturato in due grandi gruppi o cluster, come mostrato nella Figura 2.9.

L'assegnazione degli individui a ciascuno di questi cluster è stata presentata con una probabilità di appartenenza  $q \geq 0,8$ , come indicato da Vigouroux et al.

(2008); tuttavia, le 8 popolazioni ibride (HA, HB, HC, HD, HE, HF, HG e HI) hanno presentato alti valori medi di appartenenza o assegnazione; 7 dei quali superiori al 98% e uno superiore al 92%. Per tutti gli individui ibridi, i valori di appartenenza variavano, tuttavia, l'83,3% ha registrato valori di assegnazione molto alti e il 16,7% ha presentato valori di assegnazione tra 0,56 e 0,76. Con i valori di assegnazione individuali, è stata generata la Tabella 2.40 contenente i valori di assegnazione medi per ogni popolazione.

Nel gruppo del mais vitreo l'assegnazione era molto alta nella maggior parte delle popolazioni; così, per il mais Alazan, l'assegnazione media era 0,92 per AB, 0,91 AI e 0,99 AT. Nel mais Mochero, l'adesione media è stata di 0,93 MB, 0,95 MMA, 0,98 MMB, 0,90 MT. Il mais Chancayano aveva delle appartenenze medie di 0,91 (CYB) e 0,92 (CYI). Nel caso del mais Chaparreño (CHB) e Piricinco (PI), i valori di appartenenza erano superiori a 0,99. D'altra parte, il mais dell'altopiano aveva un'appartenenza ordinata dal più alto al più basso: CB, CGB, SGH, CA, PN, MA, > a 0,95 in SGB, HUB e il più basso è stato registrato in mais Kculli con 0,87.

Per analizzare come si comporterebbero le assegnazioni ( $q_1$ ,  $q_2$ ,  $q_3$ ,  $q_4$ ) se la metapopolazione fosse divisa in 4 gruppi, abbiamo proceduto a considerare queste 28 popolazioni per un  $k = 4$ , prendendo come criterio la probabilità di assegnazione "q" superiore a 0,80.

Si è sempre osservato che il mais ibrido dentato era tenuto separato in un sottogruppo e l'assegnazione media ( $q_2$ ) variava da 0,87 a 0,98. Nel primo gruppo, la più alta probabilità di appartenenza era  $q_1 = 0,8$  (80%) ed è stata registrata nelle popolazioni AB, MB e MMB. Valori di appartenenza o assegnazione tra 0,7 e 0,8 ( $0,7 \leq q_1 \leq 0,8$ ), sono stati osservati nelle popolazioni MMA, SGB e K; mentre assegnazioni inferiori a 0,7 si sono verificate nelle popolazioni CB, CGB, AI e AT. Nel terzo gruppo ( $q_3$ ), le popolazioni con alti valori di assegnazione ( $q_3 \geq 0,8$ ) sono state osservate nelle popolazioni MT, CYB, CYI e HUB e con valori inferiori a 0,7 nella popolazione CHB. Nel quarto gruppo ( $q_4$ ) c'erano valori di assegnazione  $q_4 \geq 0,8$  nelle popolazioni PI, CA, PN, SGH e per la popolazione MA il valore medio di assegnazione era  $q_4 = 0,78$  (78%).

La figura 2.10 mostra che, all'aumentare del numero di cluster (da  $K = 2$  a  $K$

= 30), la separazione tra le popolazioni native di mais vitreo si perde e la probabilità di appartenenza diventa troppo piccola per spiegare questa separazione; tuttavia, nel caso degli ibridi, si apprezza sempre la differenziazione.

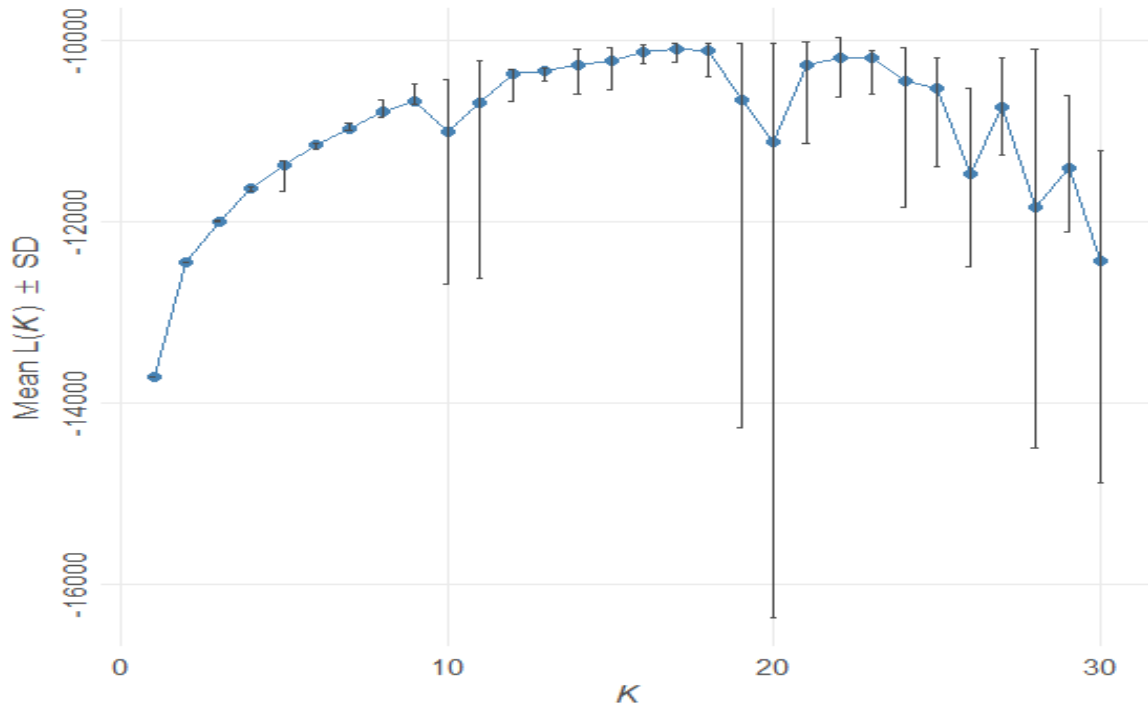


Figura 2.7. Grafico del logaritmo neperiano, L(K) per determinare il miglior valore di k in 28 popolazioni: 20 amidacee locali e 8 mais ibridi dentati.

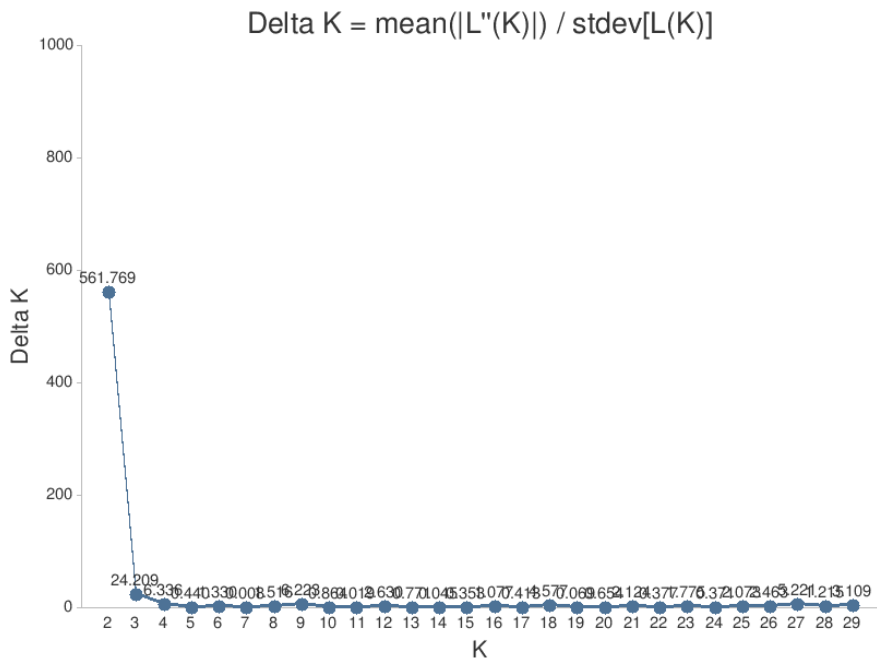


Figura 2.8. Grafico di  $\Delta K$ , dove il valore più alto si verifica quando k = 2, 28

popolazioni: 20 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati.

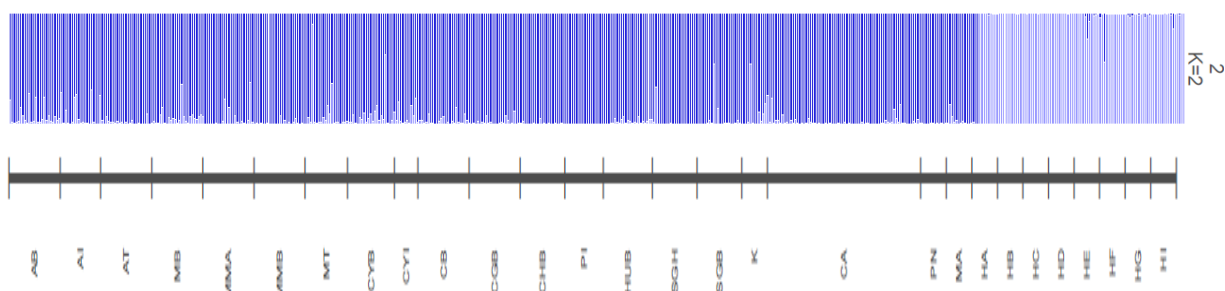


Figura 2.9. Grafico a barre dell'assegnazione genotipica in 28 popolazioni di mais (20 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati) per k = 2

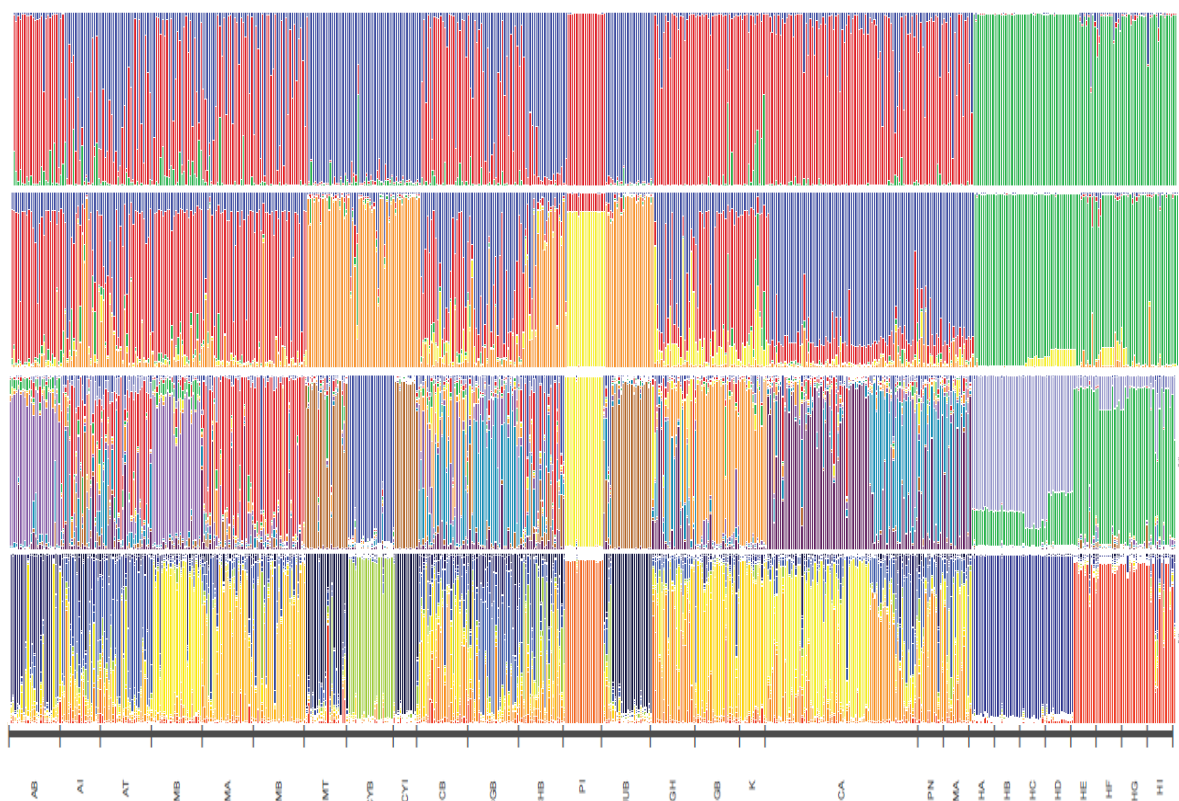


Figura 2.10. Grafico a barre dell'assegnazione genotipica in 28 popolazioni di mais (20 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati) per k = 3, 5, 10 e 13 (dall'alto al basso)



Tabella 2.40. Assegnazione media per  $k = 2$ , 28 popolazioni (20 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati) con 8 microsatelliti.

Tipo di mais	N°	Popolazione	Ibrido dentato	Vitreo Locale
			q1	q2
Mais locale	1	Alazan banca ( <b>AB</b> )	0.069	0.925
	2	Alazan Illimo ( <b>AI</b> )	0.089	0.911
	3	Alazan Tucume ( <b>AT</b> )	0.020	0.980
	4	Mochero banca ( <b>MB</b> )	0.064	0.936
	5	Mochero Mochumi 1 ( <b>MMA</b> )	0.044	0.956
	6	Mochero Mochumi 2 ( <b>MMB</b> )	0.014	0.986
	7	Mochero Tucume ( <b>MT</b> )	0.097	0.903
	8	Chancayano banca ( <b>CYB</b> )	0.082	0.918
	9	Chancayano INIA ( <b>CYI</b> )	0.080	0.920
	10	Chaparreño banca ( <b>CHB</b> )	0.010	0.990
	11	Piricincó Tarapoto ( <b>PI</b> )	0.004	0.996
	12	Canteño banca ( <b>CB</b> )	0.033	0.967
	13	Cusco Gigante banca ( <b>CGB</b> )	0.024	0.976
	14	Huancavelicano banca ( <b>HUB</b> )	0.042	0.958
	15	San Geronimo Huancavelicano banca ( <b>SGH</b> )	0.006	0.994
	16	San Geronimo Banca ( <b>SGB</b> )	0.043	0.957
	17	Kculli Cusco ( <b>K</b> )	0.126	0.874
	18	Cabanita Cabanaconde ( <b>CA</b> )	0.019	0.981
	19	Cabanita Pinchollo ( <b>PN</b> )	0.029	0.971
	20	Cabanita Madrigal ( <b>MA</b> )	0.014	0.986
Ibrido dentato	21	Ibrido Pionner 1 ( <b>HA</b> )	0.992	0.008
	22	Ibrido Pionner 2 ( <b>HB</b> )	0.993	0.007
	23	Ibrido Pionner 3 ( <b>HC</b> )	0.994	0.006
	24	Ibrido INIA 1 ( <b>HD</b> )	0.994	0.006
	25	Ibrido INIA 2 ( <b>HE</b> )	0.924	0.076
	26	Ibrido INIA 3 ( <b>HF</b> )	0.984	0.017
	27	Ibrido INIA 4 ( <b>HG</b> )	0.985	0.015
	28	Ibrido INIA 5 ( <b>HI</b> )	0.979	0.021

In verde le popolazioni con frequenza maggiore a 0.90 ( $q > 0.90$ )

In azzurro le popolazioni con frequenza tra 0.80 e 0.90 ( $0.80 \leq q < 0.90$ )

## **Determinazione della possibile introgressione dei mais ibridi dentato nei mais vitrei nativi.**

Lo studio di Bitocchi et al. (2015) è stato utilizzato come riferimento, stimando il grado di introgressione del mais moderno in accessioni vecchie e recenti (da più di 50 anni e dal 2000 in poi). Per questa analisi Bitocchi et al. (2015) prende come riferimento un valore soglia di probabilità di appartenenza, considerando la media più bassa di assegnazione, fissato a 0,62 per i marcatori microsatelliti e 0,87 per l'AFLP.

In questo studio, il valore di appartenenza più basso è stato considerato  $q < 0,7$ , considerando che tutte le popolazioni di mais autoctone avevano medie di appartenenza elevate ed è stato il mais Kculli di Cusco (K) a registrare la media più bassa (87,4%). Pertanto, si è riscontrato che nel mais Alazan Illimo (AI) un individuo su 19 mostrava introgressione, cioè il 5%; mentre in Mochero della Banca (MB), Mochero Mochumi I (MMA) e Chancayano Banca (CYB) la percentuale di introgressione era del 4%, poiché si sono visti bassi valori di appartenenza in un individuo su 24 analizzati per popolazione. In Mochero Tucume sono stati registrati 2 individui su 20, cioè il 10%. In queste percentuali abbiamo considerato solo gli individui in cui l'assegnazione aveva un valore inferiore a 0,7, rispetto al numero totale di individui analizzati per ogni popolazione.

Tuttavia, se consideriamo tutto il mais vitreo nativo come una metapopolazione di 452 individui (20 popolazioni), solo 6 individui avrebbero assegnazioni inferiori a 0,7 (cioè 1,3% di introgressione nel mais vitreo). 3 individui con bassa allocazione e appartenenti a mais locale di alta quota (HUB, SGB, K) sono stati esclusi dal calcolo, perché è improbabile che si siano verificati eventi di introgressione tra questi mais di alta quota (> 2500 mslm) e gli ibridi coltivati a bassa quota (da 0 a 800 mslm).

Per capire meglio se questi due gruppi osservati nell'analisi di strutturazione sono suddivisi, formando sottogruppi che possono aver sperimentato alcune relazioni tra loro, è stata eseguita un'analisi di sottostruttura con il programma Structure. In primo luogo, sono state considerate 19 popolazioni: gli 8 ibridi (da HA a HI), 10 amidi costieri e uno della giungla (AB, AI, AT, MB, MMA,

MMB, MT, CYB, CYI, CHB e PI).

Il criterio di questo nuovo raggruppamento è legato al fatto che è più probabile che si siano verificate situazioni di coesistenza tra questi mais costieri locali e alcuni ibridi a causa della vicinanza della coltura. I mais d'altura sono separati dall'altitudine sopra i 2000 m slm. Una seconda analisi di strutturazione è stata effettuata considerando solo le 20 popolazioni locali di mais, escludendo i mais ibridi dentati; in questo modo abbiamo potuto analizzare se esistono o meno gradi di suddivisione tra di loro.

### **b.2) Analisi 37 popolazioni: 27 vitrei e 10 mais ibridi dentati, 7 loci SSR**

L'inclusione delle nuove popolazioni nello studio per un totale di 37 ha richiesto, per studiare le loro relazioni strutturanti, prima di tutto di determinare e osservare come si comporta l'analisi delle componenti principali e quanto è il contributo alla variazione di queste componenti.

Abbiamo ottenuto il plot di dispersione degli individui su un asse cartesiano formato dalle prime due componenti principali che hanno contribuito solo per il 10,5% dalla variazione totale, un valore piuttosto basso (Figura 2.11). Chiaramente si nota che gli ibridi di mais sono dispersi in un grande gruppo, con 4 nuclei, uno integrato da HC, un altro che comprende HA e HB, il terzo raggruppa HE, HG e HI. Il quarto sottogruppo contiene HD, HF, HJ e HK.

Nel caso del mais vitreo locale, esiste un grande nucleo che contiene la maggior parte delle popolazioni analizzate delle prime 28 popolazioni (mais locali) e, in modo più disperso, le popolazioni incorporate come Piricinco (PIU); un altro nucleo con Cusco Gigante (CGBU), San Geronimo Huancavelicano (SGHU) e Canteño (CBU). Più vicino al nucleo di 28 popolazioni, alla periferia, c'è Alazan (ABU), e più all'interno ci sono le varietà di mais Chancayano (CYU) e Mochero (MBU). Questa analisi ha dimostrato che i nuovi campioni di mais sono marcatamente diversi dai primi, indicando che le 50e più razze di mais del paese hanno un livello molto alto di diversità genetica e che, sebbene possano assomigliarsi morfologicamente, ci sono ancora importanti differenze genetiche.

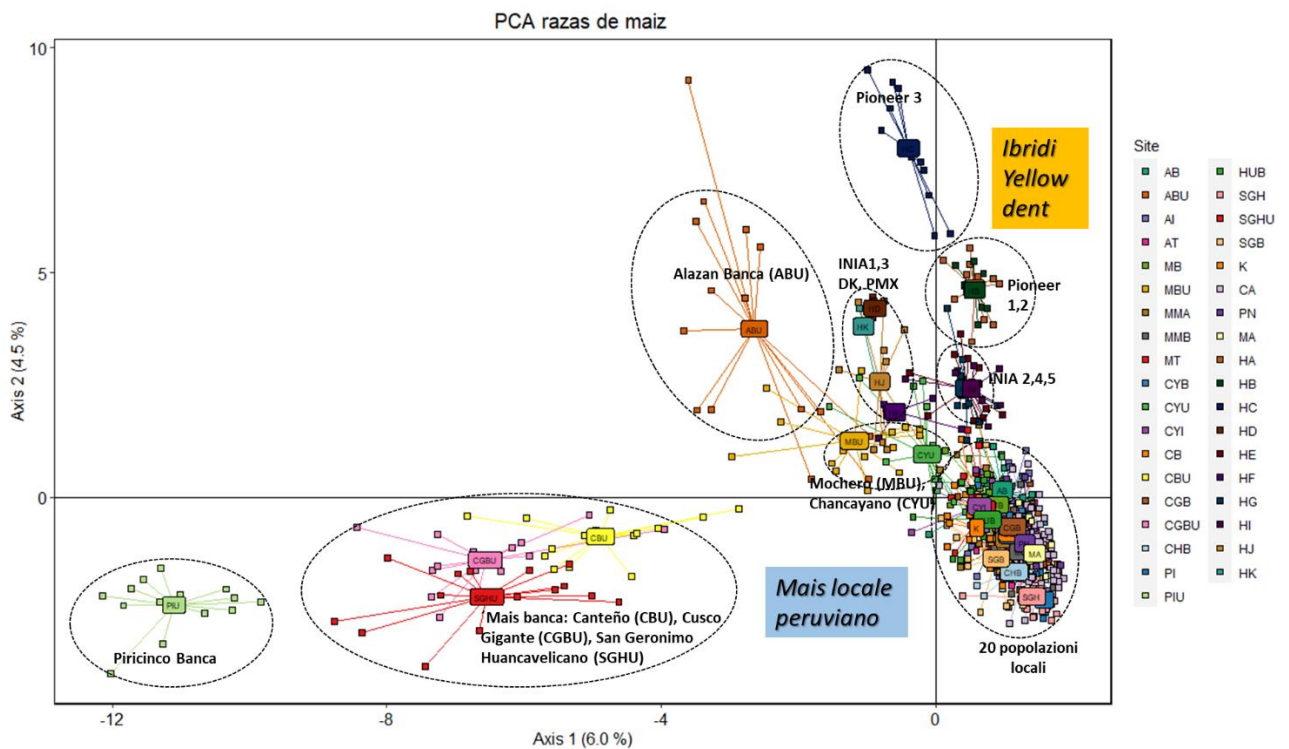


Figura 2.11. Analisi delle componenti principali su 37 popolazioni di mais: 27 vitrei locali e 10 mais ibridi dentati.

Per studiare meglio la dispersione registrata nell'analisi delle componenti principali, il modello misto è stato applicato di nuovo e il valore di verosimiglianza più probabile è stato stimato utilizzando il metodo di Rosenberg et al. La Figura 2.12 presenta il grafico del logaritmo neperiano della probabilità ( $L(K)$ ) dove ad un valore di  $k = 4$  la varianza inizia ad aumentare; tuttavia, il grafico continua a crescere costantemente. Pertanto, si è ritenuto conveniente stimare il valore di  $\Delta K$  proposto da Evanno et al. (2005) e illustrato nella Figura 2.13.

Il grafico mostra tre picchi di diversa altezza, uno più grande per  $k = 7$ , uno più piccolo per  $k = 3$  e uno più piccolo quando  $k = 13$ , quindi abbiamo proceduto ad analizzare i valori di assegnazione per tutti gli individui, prendendo come riferimento il valore medio di assegnazione per ogni popolazione.

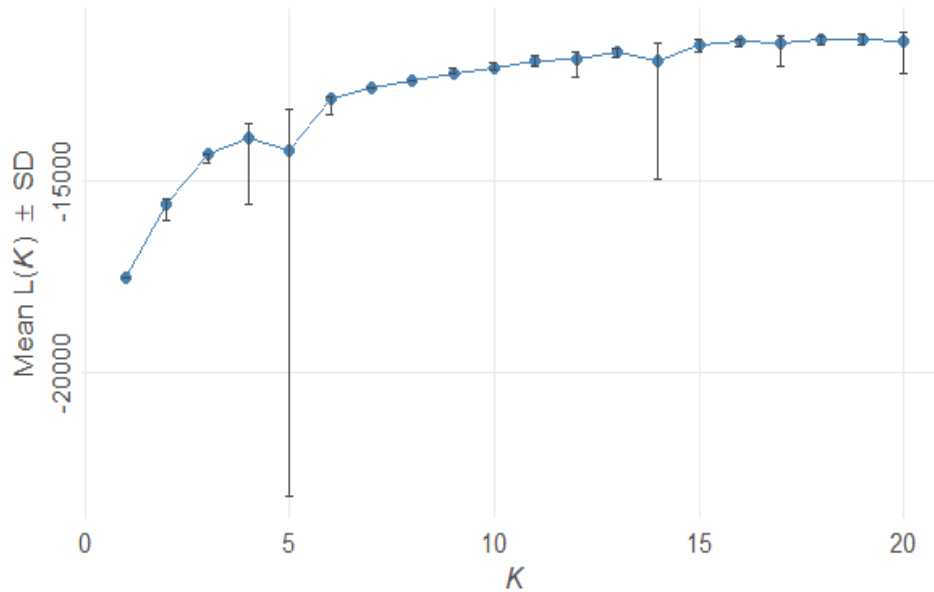


Figura 2.12. Grafico del log likelihood  $L(k)$  rispetto al numero di gruppi suddivisi ( $k$ ) per 37 popolazioni: 27 vitrei locali e 10 mais ibridi dentati.

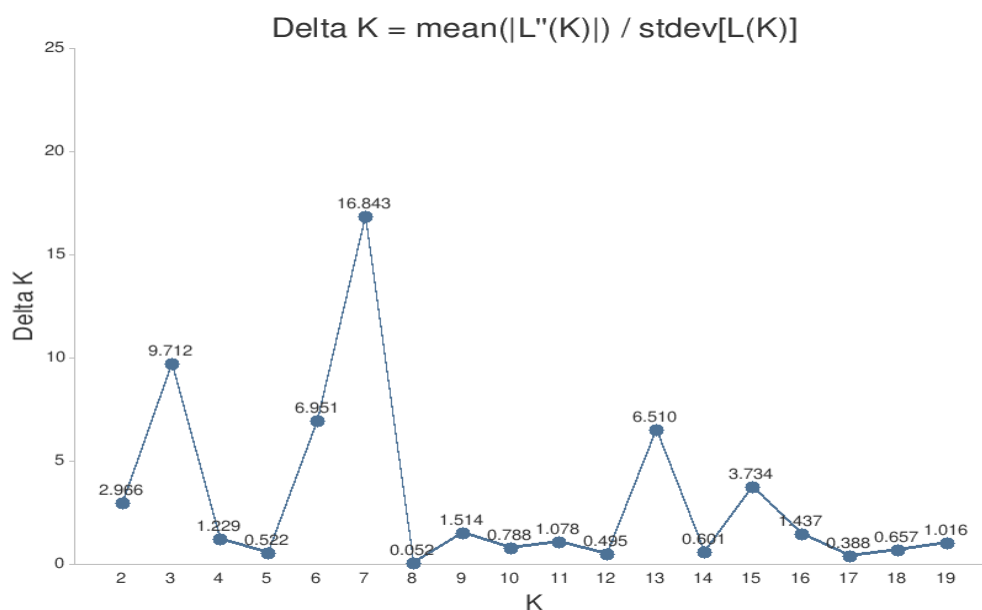


Figura 2.13. Grafico del logaritmo di  $\Delta k$  rispetto al numero di cluster ( $k$ ) per 37 popolazioni: 27 vitrei locali e 10 mais ibridi dentati.

Per il caso di  $k = 3$ , cioè se tutti gli individui fossero all'interno di 3 gruppi, le medie delle allocazioni sono presentate nella Tabella 2.41 dove si osserva che 34 delle popolazioni hanno valori di allocazione molto alti, superiori a 0,90 e le 3 popolazioni che avevano valori superiori a 0,80 corrispondevano a un Alazan (ABU) e 2 mais ibridi dentati (HE e HI). Tuttavia, i valori delle frequenze di assegnazione ( $q$ ) non generano un grafico chiaro, come si può vedere nella

Figura 2.14 a barre di assegnazione, dove solo i mais ibridi dentati del primo gruppo di campioni studiati sono differenziati dai vitrei e i campioni recenti che sono stati incorporati sono presentati separatamente con miscele parziali.

Tabella 2.41. Assegnazione media per  $k = 3$ , 37 popolazioni (27 vitrei locali e 10 mais ibridi dentati) con 7 microsatelliti

Tipo di mais	N°	Popolazione	frazione di assegnazione		
			q1	q2	q3
Mais locale	1	AB	0.960	0.028	0.013
	2	ABU	0.035	0.087	0.878
	3	AI	0.955	0.023	0.022
	4	AT	0.987	0.008	0.006
	5	MB	0.976	0.015	0.009
	6	MBU	0.008	0.005	0.987
	7	MMA	0.955	0.022	0.024
	8	MMB	0.969	0.005	0.025
	9	MT	0.961	0.018	0.022
	10	CYB	0.971	0.026	0.003
	11	CYU	0.045	0.007	0.949
	12	CYI	0.929	0.019	0.052
	13	CB	0.980	0.010	0.010
	14	CBU	0.012	0.934	0.054
	15	CGB	0.979	0.007	0.014
	16	CGBU	0.004	0.993	0.003
	17	CHB	0.987	0.004	0.009
	18	PI	0.992	0.003	0.005
	19	PIU	0.002	0.993	0.004
	20	HUB	0.970	0.013	0.017
	21	SGH	0.991	0.006	0.004
	22	SGHU	0.007	0.990	0.003
	23	SGB	0.979	0.013	0.008
	24	K	0.919	0.075	0.005
	25	CA	0.986	0.005	0.009
	26	PN	0.989	0.006	0.005
	27	MA	0.990	0.005	0.005
Ibrido dentato	28	HA	0.012	0.982	0.005
	29	HB	0.008	0.986	0.006
	30	HC	0.006	0.975	0.019
	31	HD	0.005	0.984	0.010
	32	HE	0.162	0.829	0.009
	33	HF	0.041	0.944	0.015

	34	HG	0.103	0.891	0.006
	35	HI	0.026	0.970	0.004
	36	HJ	0.004	0.005	0.991
	37	HK	0.003	0.003	0.994

In verde le popolazioni con frequenza maggiore a 0.90 ( $q > 0.90$ )  
In azzurro le popolazioni con frequenza tra 0.80 e 0.90 ( $0.80 \leq q < 0.90$ )

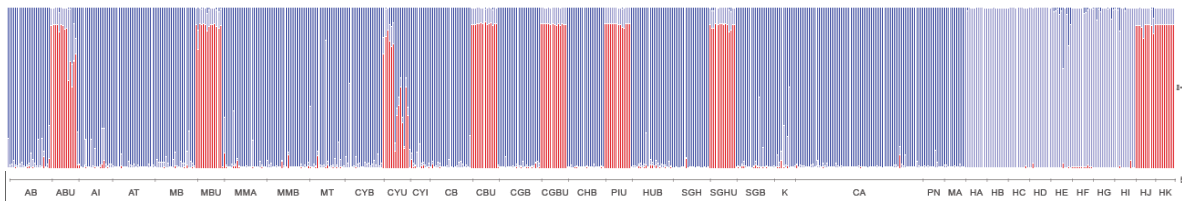


Figura 2.14. Grafico a barre dell'assegnazione genotipica in 37 popolazioni di mais (27 vitrei locali e 10 mais ibridi dentati) per  $k = 3$

Per studiare meglio le sottostrutture, abbiamo considerato di analizzare i valori di assegnazione per un  $k = 7$ , che secondo Evanno et al. (2005) sarebbe il valore più probabile da considerare. I 7 gruppi contengono mais costiero, dell'altopiano o misto, tuttavia, gli ibridi sono sempre tenuti separati.

La figura 2.15 presenta le barre di assegnazione, dove uno di questi sottogruppi è formato da: AB, AI, AT, MB, MMA, MMB, MMB, CGB, CHB e CB. Il secondo gruppo è composto da: MT, CYI e HUB. Il terzo: CBU, CGBU, PIU e SGHU. Quarto sottogruppo: CYB, CA, PN e MA. Il quinto: SGH, SGB, K e PI. Il sesto sottogruppo è composto da ABU, MBU, CYU, HJ e HK. Il settimo gruppo contiene gli 8 ibridi delle prime 28 popolazioni (HA, HB, HC, HD, HE, HF, HG e HI).

La tabella con le assegnazioni genotipiche medie per ogni sottogruppo (Tabella 2.42) mostra che 14 delle 37 popolazioni avevano un'assegnazione media superiore a  $q > 0,90$ : MBU ( $q_2 = 0.97$ ), CYI ( $q_1 = 0.95$ ), CBU ( $q_5 = 0.963$ ), CGBU ( $q_5 = 0.97$ ), PI ( $q_4 = 0.98$ ), PIU ( $q_5 = 0.98$ ), SGHU ( $q_5 = 0.97$ ), HA ( $q_3 = 0.97$ ), HB ( $q_3 = 0.97$ ), HC ( $q_3 = 0.97$ ), HD ( $q_3 = 0.97$ ); HI ( $q_3 = 0.95$ ), HJ ( $q_2 = 0.97$ ), HK ( $q_2 = 0.98$ ).

10 delle 37 popolazioni hanno registrato un'assegnazioni media ( $0.80 \leq q \leq 0.90$ ): AB ( $q_6 = 0.89$ ), ABU ( $q_2 = 0.89$ ), MB ( $q_6 = 0.84$ ), MT ( $q_1 = 0.83$ ), CYB

(q7 = 0.89), HUB (q1 = 0.82), PN (q7 = 0.84), HE (q3 = 0.81), HF (q3 = 0.87), HG (q3 = 0.89).

Assegnazioni tra  $(0,70 \leq q \leq 0,80)$  sono state osservate in 5 popolazioni: MA (q7 = 0,78), CA (q7 = 0,79), K (q4 = 0,75), SGH (q4 = 0,71), CYU (q2 = 0,71). Tuttavia, 8 delle popolazioni hanno avuto allocazioni basse che vanno da  $(0,39 \leq q \leq 0,58)$ : AI (q6 = 0,39), AT (q6 = 0,50), MMA (q6 = 0,50), MMB (q6 = 0,53), CB (q6 = 0,34), CGB (q6 = 0,55), CHB (q7 = 0,39), SGB (q4 = 0,58). Questi bassi valori di attribuzione in queste popolazioni, sia nelle medie che a livello di ogni individuo, indicherebbero che anche se il grafico  $\Delta k$  indicherebbe che il valore più alto si è verificato per un  $k = 7$ , non sarebbe opportuno considerare le 37 popolazioni di mais come 7 gruppi diversi.

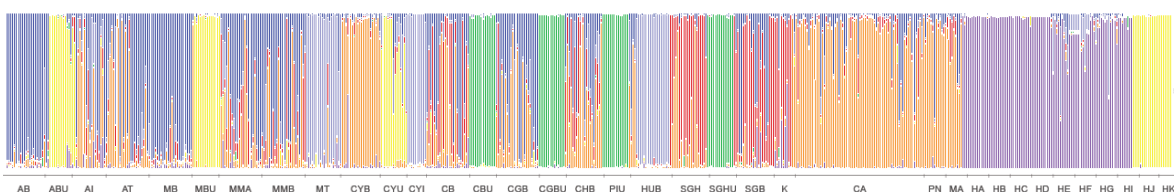


Figura 2.15. Grafico a barre dell'assegnazione genotipica in 37 popolazioni di mais (27 vitrei locali e 10 mais ibridi dentati) per  $k = 7$

Tabella 2.42. Assegnazione media per  $k = 7$ , 37 popolazioni (27 vitrei locali e 10 mais ibridi dentati) con 7 microsatelliti

Tipo di mais	N°	Popolazione	frazione di assegnazione						
			q1	q2	q3	q4	q5	q6	q7
Mais locale	1	AB	0.030	0.007	0.015	0.018	0.007	0.897	0.025
	2	ABU	0.007	0.895	0.026	0.020	0.011	0.029	0.011
	3	AI	0.158	0.015	0.046	0.071	0.005	0.388	0.317
	4	AT	0.072	0.005	0.010	0.039	0.004	0.502	0.368
	5	MB	0.019	0.007	0.021	0.033	0.004	0.838	0.079
	6	MBU	0.006	0.966	0.004	0.005	0.005	0.008	0.007
	7	MMA	0.076	0.020	0.030	0.137	0.007	0.499	0.232
	8	MMB	0.042	0.017	0.010	0.163	0.003	0.529	0.236
	9	MT	0.830	0.010	0.025	0.018	0.004	0.080	0.035
	10	CYB	0.011	0.003	0.042	0.018	0.004	0.026	0.896
	11	CYU	0.170	0.708	0.009	0.026	0.005	0.059	0.023
	12	CYI	0.954	0.006	0.007	0.006	0.004	0.013	0.010
	13	CB	0.032	0.020	0.029	0.328	0.005	0.345	0.240
	14	CBU	0.010	0.009	0.004	0.004	0.963	0.005	0.005
	15	CGB	0.095	0.014	0.008	0.056	0.004	0.553	0.269
	16	CGBU	0.004	0.004	0.007	0.004	0.974	0.003	0.004



	17	CHB	0.104	0.015	0.006	0.209	0.005	0.275	0.386
	18	PI	0.004	0.004	0.003	0.976	0.003	0.005	0.006
	19	PIU	0.003	0.004	0.003	0.003	0.980	0.003	0.003
	20	HUB	0.817	0.007	0.008	0.011	0.004	0.054	0.100
	21	SGH	0.009	0.005	0.004	0.707	0.007	0.032	0.236
	22	SGHU	0.006	0.003	0.005	0.005	0.970	0.004	0.007
	23	SGB	0.009	0.006	0.035	0.577	0.007	0.321	0.044
	24	K	0.008	0.006	0.140	0.750	0.010	0.053	0.034
	25	CA	0.016	0.008	0.010	0.042	0.003	0.127	0.794
	26	PN	0.026	0.005	0.014	0.019	0.003	0.096	0.838
	27	MA	0.019	0.006	0.010	0.075	0.004	0.111	0.776
Ibrido dentato	28	HA	0.005	0.004	0.973	0.004	0.002	0.006	0.006
	29	HB	0.003	0.004	0.975	0.004	0.003	0.007	0.005
	30	HC	0.004	0.007	0.974	0.004	0.002	0.004	0.005
	31	HD	0.004	0.009	0.973	0.003	0.003	0.004	0.004
	32	HE	0.104	0.004	0.810	0.012	0.004	0.050	0.016
	33	HF	0.084	0.006	0.873	0.008	0.008	0.010	0.011
	34	HG	0.060	0.004	0.896	0.008	0.003	0.019	0.011
	35	HI	0.008	0.003	0.946	0.008	0.010	0.011	0.014
	36	HJ	0.005	0.972	0.007	0.004	0.004	0.004	0.004
	37	HK	0.003	0.980	0.003	0.004	0.002	0.003	0.003
			q > 0.90						
			0.80 ≤ q < 0.90						
			0.70 ≤ q < 0.80						
			q < 0.70						

### b.3) Analisi 15 popolazioni: 7 vitrei e 8 mais ibridi dentati, con AFLP

Nello studio AFLP, sono state scelte 15 popolazioni appartenenti al primo gruppo di 28 popolazioni: 7 mais vitrei locali e 8 mais ibridi dentati. L'analisi delle componenti principali è stata effettuata al fine di visualizzare la distribuzione spaziale tra le popolazioni, formando un piano con le prime due componenti che contribuiscono alla maggior quantità di variazione. Tuttavia, come nell'analisi con microsatelliti, il contributo delle prime due componenti era solo del 14%, leggermente superiore, ma ancora troppo basso per contenere tutta la variazione.

La Figura 2.16 mostra che la prima componente ha contribuito per l'8,3% e la seconda per il 5,7%. Chiaramente, il mais ibrido è disperso in un sottogruppo

più grande suddiviso in un nucleo più grande che contiene tutti gli ibridi (HA, HB, HC, HE, HF, HG e HI) e uno più lontano che contiene l'ibrido INIA I (HD). Questo modello coincide con l'analisi delle componenti principali effettuata con i microsatelliti. Tuttavia, nel gruppo del mais vitreo locale, la maggior parte delle popolazioni sono raggruppate in un grande nucleo e un gruppo più distante appare formato dal mais Alazan della Banca (AB).

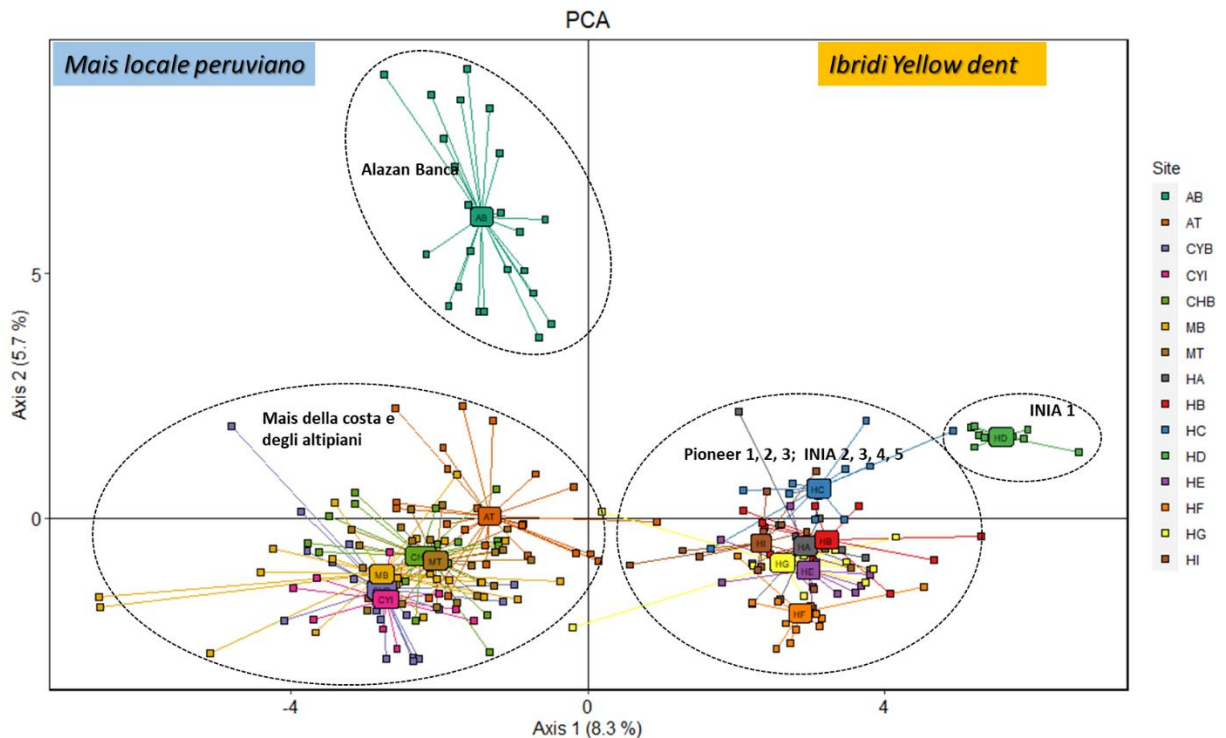


Figura 2.16. Analisi delle componenti principali su 15 popolazioni di mais: 7 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati.

Poiché ci sono delle sotto-divisioni tra le popolazioni, il grado di differenziazione tra tutte le popolazioni e tra i due gruppi (vitrei locali e mais ibridi dentati) è stato stimato utilizzando il programma POPGENE 1.32. Il parametro GST utilizzato per stimare la differenziazione tra tutte le popolazioni per i marcatori dominanti era molto alto, pari al 43,29% e la differenziazione tra le popolazioni all'interno di ciascun gruppo, quando si considerano il mais vitreo locale e i mais ibridi dentati, ha portato a valori GST del 30,22% e 41,14% rispettivamente.

Avendo trovato che tutte le popolazioni mostrano alti valori di differenziazione

genetica, l'analisi è stata continuata utilizzando Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2010). Il grafico in Figura 2.17 è stato generato usando il metodo di Rosenberg et al. (2001), che aumenta quando  $k = 2$  e poi tiene e le varianze aumentano a valori  $k$  più alti. Tuttavia, applicando il metodo di Evanno et al. (2005), i valori di  $\Delta K$  sono stati stimati, generando il grafico mostrato nella Figura 2.18.

Il miglior valore proposto per l'insieme delle 15 popolazioni considerate come una metapopolazione è  $k = 2$ . Questi due grandi gruppi corrispondono ai due tipi di mais considerati in questo studio (vitrei locali e mais ibridi dentati). Per comprendere meglio lo stato delle miscele tra questi diversi tipi di mais, la Figura 2.19 illustra, attraverso il diagramma a barre, le frequenze di assegnazione genotipica di ogni individuo secondo il cluster in cui è probabilmente considerato.

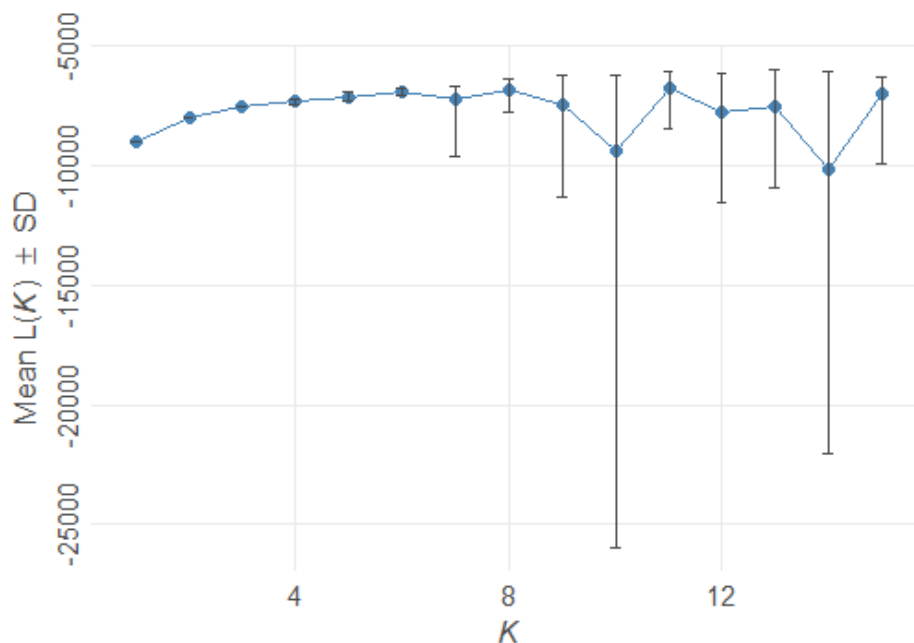


Figura 2.17. Grafico del log likelihood  $L(k)$  rispetto al numero di cluster ( $k$ ) per 15 popolazioni: 7 amidacee locali e 8 mais ibridi dentati.

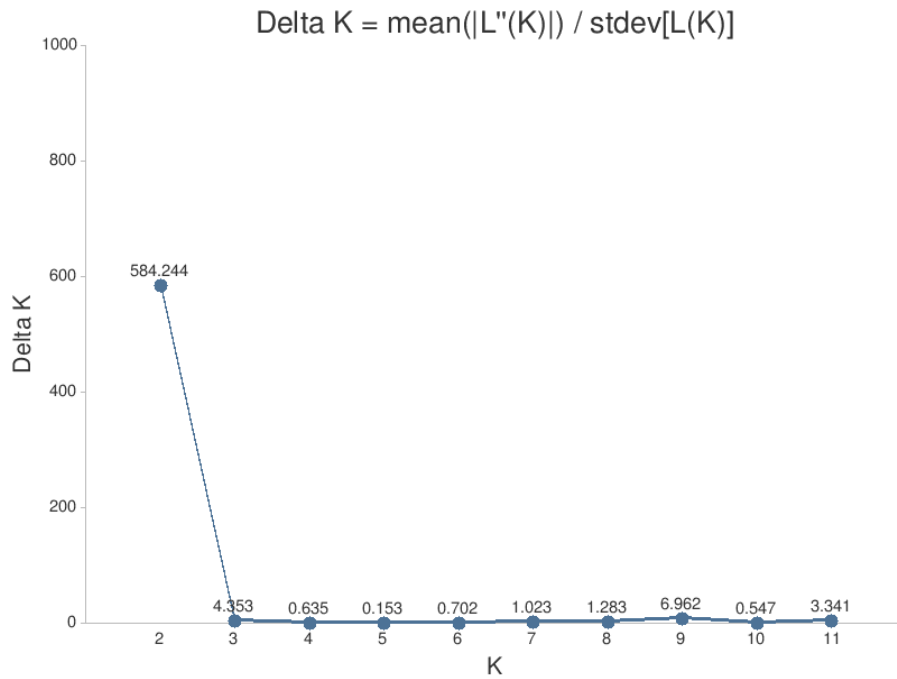


Figura 2.18. Grafico del logaritmo di  $\Delta k$  rispetto al numero di cluster (k) per 15 popolazioni: 7 amidacee locali e 8 mais ibridi dentati.

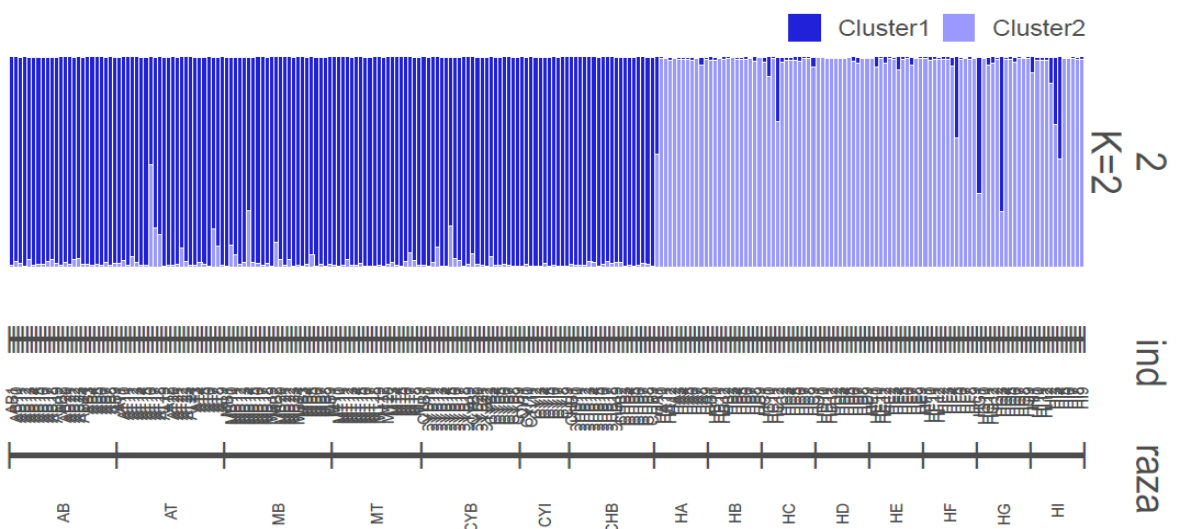


Figura 2.19. Grafico a barre dell'assegnazione genetica in 15 popolazioni di mais (7 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati) per  $k = 2$ , marcatori AFLP

In questo modo possiamo vedere che i mais ibridi dentati hanno sempre alti livelli di assegnazione al loro gruppo e lo stesso accade per il mais vitreo locale, che forma un altro blocco con alti livelli di assegnazione genetica. Questo dato è opportunamente completato dalla Tabella 2.43, che contiene i valori medi di assegnazione per ogni popolazione, dove tutti i mais locali hanno mostrato valori medi di assegnazione che vanno da 0,93 a 0,99 e, per

gli ibridi, i valori vanno da 0,89 a 0,99.

Secondo i valori di assegnazioni presentati, possiamo vedere che sebbene il mais ibrido sia entrato nel paese negli anni '50, difficilmente si è mescolato con le popolazioni di Lambayeque e con il materiale conservato nella banca del germoplasma, che contiene collezioni di mais provenienti dalle diverse zone in cui si coltiva il mais.

Quando visualizziamo le barre di assegnazione per valori di  $k > 2$ , possiamo vedere che appaiono nuovi sottogruppi, come nello studio di a et al. (2009) tra il mais del nord-ovest dell'Argentina e altri degli Stati Uniti o del Messico, riuscendo a trovare il grado di affiliazione razziale.

La Figura 2.20 ci dice che questi marcatori molecolari hanno una buona capacità di discriminare i diversi tipi di mais; per esempio, notiamo che il mais Alazan della Banca (AB) e Tucume (AT) si separano molto bene. Anche i Mochero sono diversi, anche se MB è più misto di Tucume (MT). Anche i mais Chancayano (CYB, CYI) sono differenziati, sebbene il mais INIA (CYI) sia più misto e più simile al mais Chaparreño della Banca (CHB). Gli ibridi sono anche differenziati in 5 sottogruppi, uno contenente 2 mais Pioneer (HA e HB); il terzo HC è diverso. Negli ibridi INIA dent, INIA I (HD) è abbastanza diverso dagli altri, ma INIA II (HE) è raggruppato con INIAIV (HG) e INIA V (HI). L'ibrido INIA III (HF) è anche molto distinto.

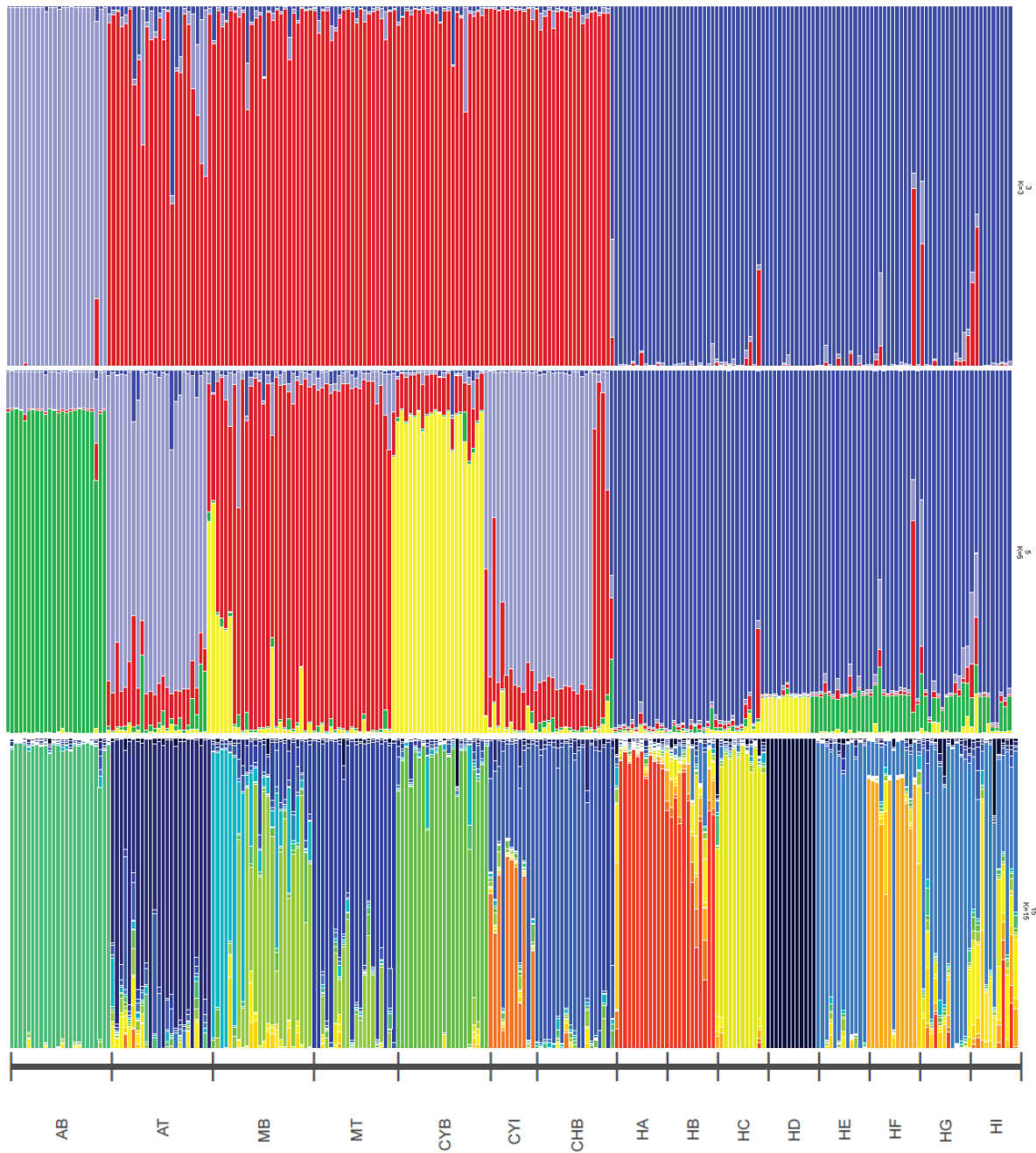




Figura 2.20. Grafico a barre di assegnazione genotipica in 15 popolazioni di mais (7 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati) per  $k = 12$  e  $k = 15$ , marcatori AFLP.

**Tabella 2.43.** Assegnazione media per  $k = 2$ , 15 popolazioni (7 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati) con AFLP

Tipo di mais	N°	Popolazione	Vitreo Locale	Ibrido dentato
			q1	q2
Mais locale	1	AB	0.981	0.019
	2	AT	0.938	0.062
	3	MB	0.963	0.037
	4	MT	0.984	0.016
	5	CYB	0.971	0.029
	6	CYI	0.992	0.008
	7	CHB	0.985	0.015
Ibrido dentato	8	HA	0.051	0.949
	9	HB	0.010	0.990
	10	HC	0.050	0.950
	11	HD	0.008	0.992
	12	HE	0.020	0.980
	13	HF	0.044	0.956
	14	HG	0.129	0.871
	15	HI	0.092	0.908

  $q > 0.90$   
  $0.80 \leq q < 0.90$

#### **b.4) Analisi di struttura su 19 popolazioni: 11 popolazioni costiere e 8 ibridi, 8 loci SSR**

Per questa parte dell'analisi abbiamo proceduto di nuovo a stimare il valore di verosimiglianza più probabile con il metodo di Rosenberg et al. (2001), in modo da valutare se l'intero set di mais locale costiero e forestale si separi dai mais ibridi dentati nelle 19 gruppi o popolazioni. Abbiamo tuttavia notato che il log likelihood  $L(K)$  per diversi valori di  $k$  cresce in modo continuo (Figura 2.21) e non ci permette di definire correttamente il valore di  $k$ . Abbiamo quindi applicato il metodo di Evanno et al. (2005) per generare il grafico mostrato nella Figura 2.22, dove il  $\Delta K$  presenta un picco più alto quando  $k$  è uguale a 2, cioè ci sono due gruppi principali, uno di mais vitreo locale e l'altro contenente mais ibridi dentati, che possono anche essere distinti nella Figura 2.23.

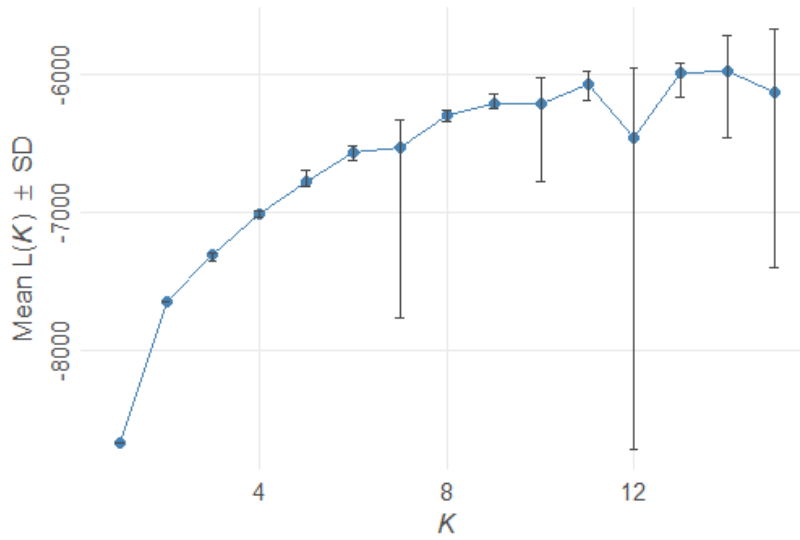


Figura 2.21. Grafico del log likelihood  $L(k)$  rispetto al numero di cluster ( $k$ ) per 19 popolazioni: 11 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati.

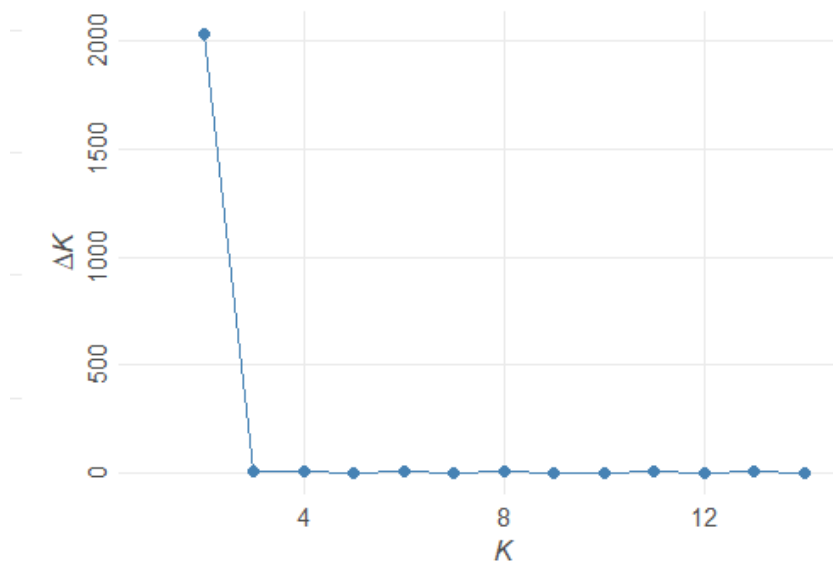


Figura 2.22. Grafico del logaritmo di  $\Delta k$  rispetto al numero di cluster ( $k$ ) per 19 popolazioni: 11 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati.



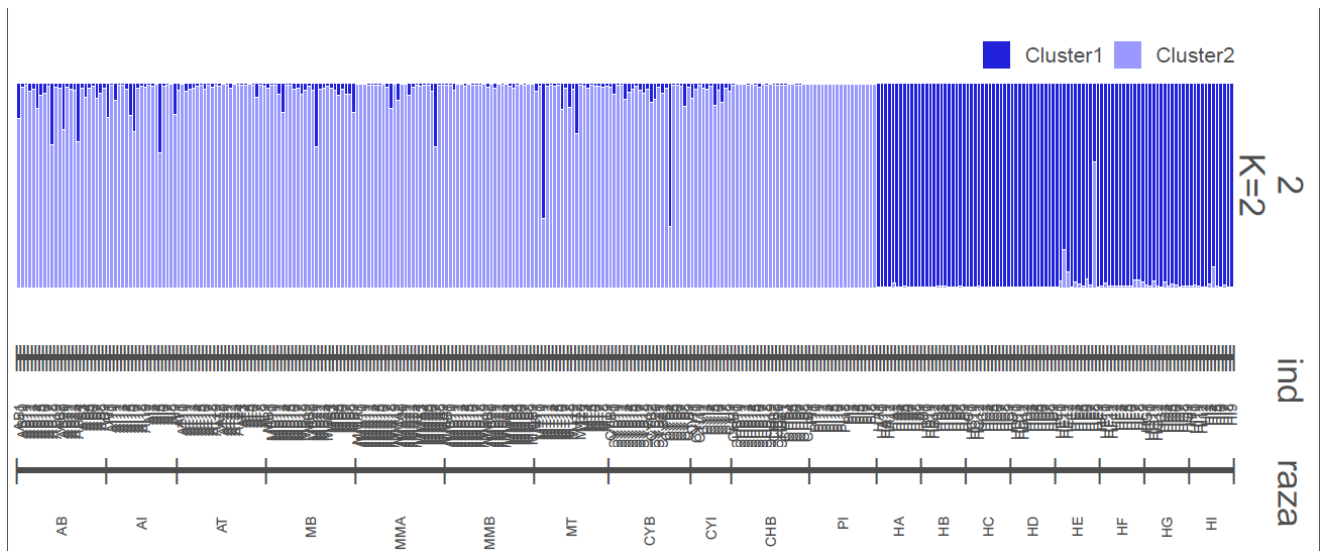


Figura 2.23. Grafico a barre dell'assegnazione genotipica in 19 popolazioni di mais (11 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati) per  $k = 2$

In questi gruppi più grandi notiamo che c'è una sottostruttura come si può vedere nella Figura 2.24, dove a valori più alti di  $k$  è possibile osservare che il mais ibrido è suddiviso in due sottogruppi quando il valore di  $k = 8$ , uno contenente gli ibridi Pioneer I, II e III, anche se il terzo è parzialmente raggruppato con gli ibridi INIA (HD, HE, HF, FG, HI). Allo stesso modo, anche se con un maggior grado di commistione, le varietà locali di mais vitreo sono suddivise, in modo da poter distinguere Alazan della Banca (AB) e Mochero Banca (MB). Alazan de Illimo e Tucume (AI, AT) sono raggruppati in un unico blocco, con miscele di Chaparrefño (CHB). I Mochero de Mochumi I e II sono in un unico sottogruppo, probabilmente spiegato dalla comune origine dell'area Mochumi in Lambayeque.

Per Mochero de Túcume (MT) si raggruppa meglio con Chancayano INIA (CYI), ma Chancayano della Banca (CYB) si presenta come un sottogruppo differenziato dal resto anche se con miscele di Chaparrefño Banca (CHB); Piricinco (PI) è marcatamente differenziato in un sottogruppo che si mantiene da un valore di  $k = 4$  a  $k$  maggiore di 15. Questa differenziazione si spiega con la distanza di questo mais dagli altri analizzati e con la mancanza di diffusione in altre zone del paese.

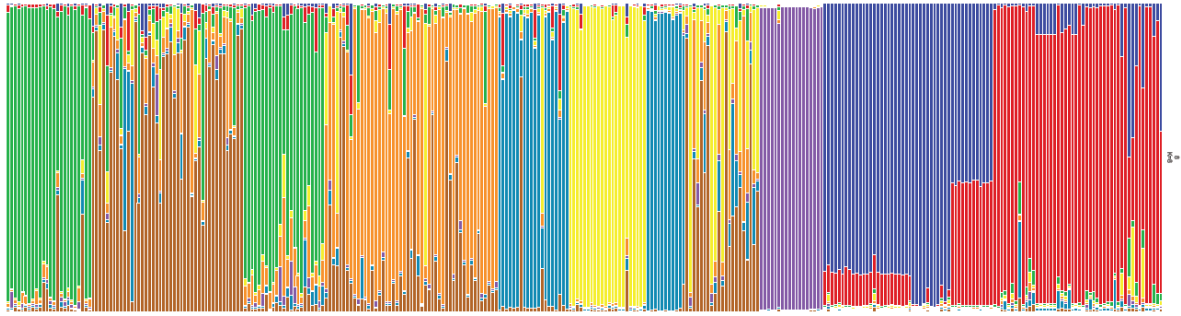


Figura 2.24. Grafico a barre dell'assegnazione genotipica in 19 popolazioni di mais (11 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati) per  $k = 8$

L'analisi dell'assegnazione dei genotipi agli individui in ciascuno dei due gruppi (quando  $k = 2$ ), ha mostrato un'alta probabilità di appartenenza  $q \geq 0,9$  nelle 19 popolazioni (Tabella 2.44), anche se in altri studi vengono considerati valori più bassi di appartenenza, come nello studio del mais locale in Argentina di Lia et al. (2009), Bitocchi et al. (2015) e Vigouroux et al. (2008).

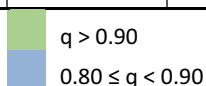
Tutte le 8 popolazioni ibride (HA, HB, HC, HD, HE, HF, HG e HI) tuttavia hanno avuto valori di assegnazione o appartenenza compresi tra 0,98 e 0,99, ad eccezione dell'ibrido INIA II (HE) che ha registrato un'assegnazione di 0,91. Nel mais locale della costa e della giungla, le assegnazioni medie variavano da 0,93 per Mochero de Tucume (MT), Alazan della Banca (AB), Alazan Illimo (AI) e Chancayano Banca (CYB). Per Mochero Banca (MB) e Chancayano INIA (CYI) il valore medio era 0,95. Nel caso del Mochero de Mochumi I (MMA) l'assegnazione è stata di 0,97; per Alazan Tucume (AT) 0,98 e per i tipi Mochero Mochumi II (MMB), Chaparreño Banca (CHB) e Piricinco de Tarapoto (PI) l'assegnazione media è stata superiore a 0,99.

Quando abbiamo analizzato il processo di strutturazione con un valore di  $k = 4$ , troviamo 13 popolazioni con assegnazioni superiori a 0,90 (AB, MB, MT, CYB, CYI, PI, HA, HB, HC, HD, HF, HG, HI), 3 con assegnazioni tra 0,80 e 0,90 (MMB, CHB, HE), 1 con assegnazioni tra 0,70 e 0,80 (MMA) e 2 con assegnazioni inferiori a 0,70 (AI con 0,67 e AT con 0,57). Possiamo ancora sottolineare che si tratta di valori di allocazione alti o medi. Quando analizziamo il comportamento dei valori di probabilità di assegnazione per  $k = 8$ , notiamo che in 10 delle 19 popolazioni le assegnazioni medie rimangono

alte con valori superiori a 0,90 (CYB, CYI, PI, HA, HB, HC, HD, HE, HF, HG). In 2 popolazioni le allocazioni erano tra 0,80 e 0,90 (AB, MT); per valori di allocazione tra 0,70 e 0,80 sono state osservate 4 popolazioni (AT, MB, MMB, HI) e per allocazioni inferiori a 0,70 c'erano 3 popolazioni (AI, MMA, CHB).

Tabella 2.44. Assegnazione media per  $k = 2$ , 19 popolazioni (11 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati) con 8 microsatelliti.

Tipo di mais	N°	Popolazione	Ibrido dentato	Vitreo locale
			q1	q2
Mais locale	1	AB	0.070	0.930
	2	AI	0.068	0.932
	3	AT	0.016	0.984
	4	MB	0.050	0.950
	5	MMA	0.032	0.968
	6	MMB	0.010	0.990
	7	MT	0.072	0.928
	8	CYB	0.067	0.933
	9	CYI	0.044	0.956
	10	CHB	0.007	0.993
	11	PI	0.004	0.996
Ibrido dentato	12	HA	0.993	0.007
	13	HB	0.993	0.007
	14	HC	0.994	0.006
	15	HD	0.995	0.005
	16	HE	0.913	0.087
	17	HF	0.984	0.016
	18	HG	0.986	0.014
	19	HI	0.982	0.018



I valori presentati indicano che il mais ibrido dentato rimane sempre differenziato dal resto e con alte probabilità di assegnazione, al contrario, il mais vitreo è più eterogeneo nei suoi modelli allelici per i marcatori molecolari, spiegato dal sistema di allevamento del mais, anche dalle popolazioni relativamente piccole di mais autoctono e dal modo in cui il seme viene conservato per diverse campagne di semina, viene acquistato nei mercati

comuni e non esiste un sistema di certificazione della purezza razziale. Anche se è possibile differenziare i mais morfologicamente, questo non è il caso quando i loro modelli allelici sono analizzati con i microsatelliti. Questo può essere spiegato dal fatto che i caratteri morfologici che caratterizzano le "razze" sono stati fortemente selezionati durante la domesticazione e i diversi usi di questi mais nelle popolazioni locali.

#### **Determinazione della possibile introgressione degli mais ibridi dentati nei mais vitrei nativi, considerando solo quelli costieri e della foresta pluviale.**

Seguendo il criterio considerato per le 28 popolazioni nei paragrafi precedenti, una probabilità di appartenenza inferiore a 0,70 è stata considerata per stimare il livello di introgressione. Abbiamo trovato che in Alazan Banca (AB) e Alazan Illimo (AI) c'erano 2 individui in cui l'assegnazione era inferiore o uguale a 0,7. Nel caso del mais Mochero (MB, MMA e MT) c'era un individuo ciascuno, ma in Mochero Tucume il valore di assegnazione al gruppo vitreo era  $q_2 = 0,33$  e al gruppo ibrido  $q_1 = 0,67$  e per il mais Chancayano Banca (CYB) c'era anche un valore molto basso di assegnazione al gruppo vitreo ( $q_2 = 0,31$ ) ma maggiore per il gruppo ibrido ( $q_1 = 0,69$ ).

#### **b.5) Analisi di strutturazione sulle 20 popolazioni di mais vitreo, 8 loci SSR**

Considerando la bassa probabilità di introgressione dal mais ibrido dentato al mais vitreo locale in base alle analisi precedenti, gli 8 ibridi sono stati esclusi dall'analisi di strutturazione, al fine di trovare se il grande gruppo di mais locali si suddivide, tenendo conto che tra questi mais i valori FST stimati con il programma POPGENE 1.2 erano alti (20,05%).

Seguendo il metodo di Rosenberg et al. (2001) il valore di verosimiglianza più probabile ( $L(K)$ ) che è stato generato nel grafico della Figura 2.25 ci permette di osservare una crescita continua del logaritmo, diventando costante sopra  $k = 4$ . Pertanto, abbiamo proceduto a stimare il vero valore di  $k$ , utilizzando il metodo di Evanno et al. (2005), dove il  $\Delta K$  è tracciato in funzione della serie

di valori di  $k$  e la Figura 2.26 illustra che il valore massimo si ottiene quando  $k = 4$ , ma un secondo picco più breve si vede anche quando  $k = 8$ .

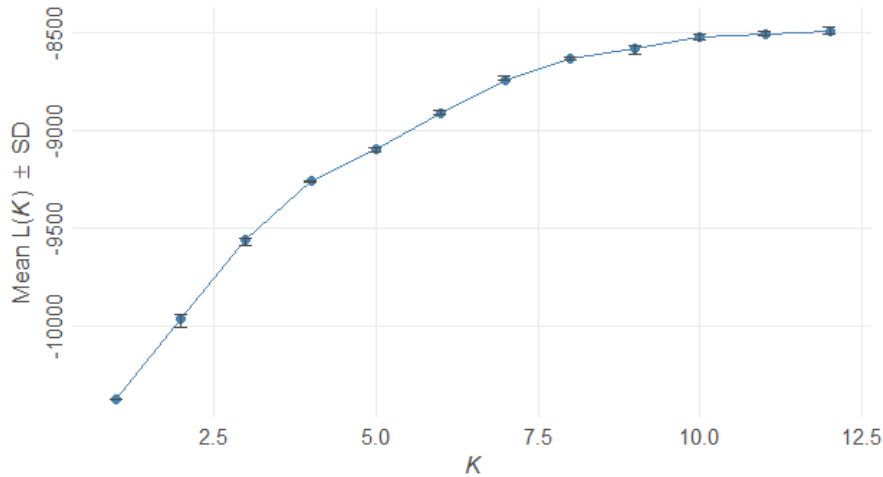


Figura 2.25. Grafico del log likelihood  $L(k)$  rispetto al numero di cluster ( $k$ ) per 20 popolazioni locali di mais vitrei

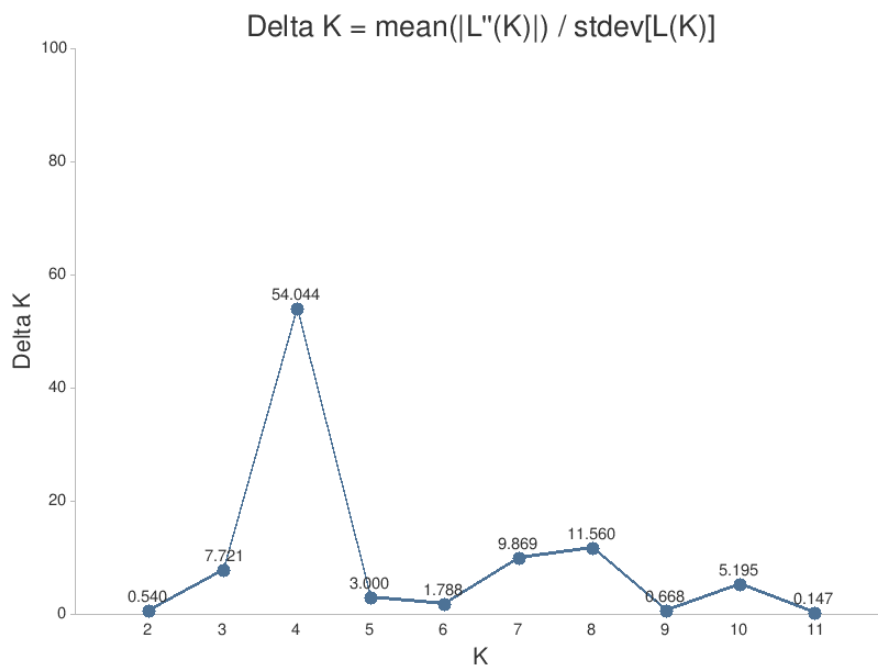


Figura 2.26. Grafico del logaritmo di  $\Delta k$  rispetto al numero di gruppi ( $k$ ) per 20 popolazioni di mais vitrei locali

Figura 2.27 mostra le barre di probabilità di assegnazione generate per valori

di  $k = 2$  e  $K = 4$ . Possiamo osservare che non si possono differenziare due gruppi principali come è successo quando è stato incluso il mais ibrido, Al contrario, ci sono due gruppi con una quantità significativa di miscele che non permettono di trovare differenze tra le varietà di mais costiero (AB, AI, AT, MB, MMA, MMB, MT, CYB, CYI, CHB), giungla (PI) e altopiano (CB, CGB, HUB, SGH, SGB, K, CA, PN, MA).

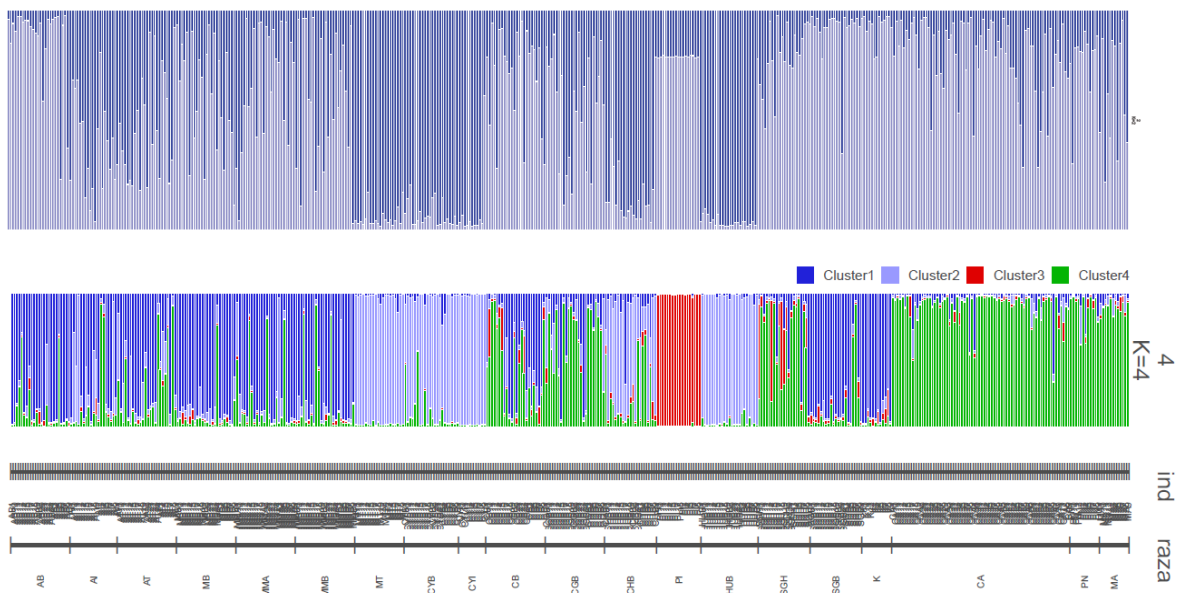


Figura 2.27. Grafico a barre dell'assegnazione genetica in 20 popolazioni di mais vitreo locale per  $k = 2$  e  $4$



Figura 2.28. Grafico a barre dell'assegnazione genetica in 20 popolazioni di mais vitreo locale per  $k = 8$

Quando si analizza il comportamento delle barre di assegnazione per  $k = 4$ , si apprezza meglio la separazione tra il mais della pianura costiera e quello dell'altopiano, anche se c'è ancora molta commistione tra gli individui. Per esempio, i campioni di Arequipa (CA, PN, MA) formano un blocco; poi gli Alazan (AB, AI, AT), i Mochero (MB, MMA, MMB) sono più simili tra loro, sebbene anche i campioni di San Geronimo Banca (SGB) e Kculli (K) siano inclusi in questo gruppo. Un altro gruppo è composto da Mochero de Tucume (MT) con Chancayano (CYB, CYI), Chaparrefño Banca e Huancavelicano Banca (HUB). Il mais Canteño Banca (CB), Cusco Gigante Banca (CGB) e San Geronimo Huancavelicano Banca (SGH) formano un gruppo misto che è più simile al mais Arequipa; tuttavia, il mais che è più diverso da tutti è il Piricinco (PI), che viene coltivato nella foresta di pianura.

I valori di assegnazione ottenuti per  $k = 4$  sono presentati nella Tabella 2.45, dove si può vedere che in 4 popolazioni sono state registrate probabilità medie di assegnazione superiori a 0,90: MT ( $q_1 = 0,95$ ), CYI ( $q_1 = 0,97$ ), PI ( $q_2 = 0,98$ ), HUB ( $q_1 = 0,95$ ). In 8 delle 20 popolazioni sono state osservate allocazioni tra 0,80 e 0,90: AB ( $q_3 = 0,83$ ), MB ( $q_3 = 0,85$ ), CYB ( $q_1 = 0,85$ ), SGB ( $q_3 = 0,81$ ), K ( $q_3 = 0,89$ ), CA ( $q_4 = 0,89$ ), PN ( $q_4 = 0,88$ ), MA ( $q_4 = 0,89$ ). Poi, in 2 popolazioni le allocazioni medie erano tra 0,70 e 0,80: MMA ( $q_3 = 0,72$ ), MMB ( $q_3 = 0,75$ ). Tuttavia, in 6 popolazioni c'erano valori bassi di assegnazioni, meno di 0,70: AI ( $q_3 = 0,58$ ), AT ( $q_3 = 0,61$ ), CB ( $q_3 = 0,46$ ), CGB ( $q_4 = 0,61$ ), CHB ( $q_1 = 0,63$ ), SGH ( $q_4 = 0,62$ ).

Questi valori indicano che queste varietà di mais si sono mescolate più intensamente tra loro. Per esempio, poiché gli Alazan sono coltivati su piccole estensioni, il seme ha un flusso di produzione e commercializzazione che si mantiene con la stessa dinamica: il seme viene acquistato nei mercati locali informali; il contadino semina, raccoglie e lo commercializza di nuovo nei mercati locali o nel mercato all'ingrosso di Lambayeque, che poi rifornisce i negozi che vendono il seme nelle città più piccole. In questo modo, si possono generare molte miscele.

Questa situazione si ripete per molti tipi di mais, specialmente per quelli di recente derivazione come Cusco Gigante (CGB), San Geronimo

Huancavelicano (SGH), che sono considerati razze che provengono da ibridazioni e selezioni effettuate in un lungo periodo di tempo. Se analizziamo come appaiono le barre di assegnazione quando  $k = 8$  e  $K = 12$  (Figura 2.28) notiamo che i valori diventano più piccoli e ci sono difficoltà nella visualizzazione discreta delle popolazioni, anche se il mais Piricinco de Tarapoto (PI) è sempre differenziato, così come il mais Chancayano della Banca (CYB) e il Huancavelicano banca (HUB).

Tabella 2.45. Assegnazione media per  $k = 4$ , 20 popolazioni di mais locali con 8 microsatelliti.

Tipo di mais	N°	Popolazione	q1	q2	q3	q4
Mais locale	1	AB	0.035	0.019	0.831	0.116
	2	AI	0.250	0.018	0.582	0.149
	3	AT	0.140	0.011	0.607	0.243
	4	MB	0.059	0.020	0.854	0.067
	5	MMA	0.091	0.012	0.724	0.173
	6	MMB	0.070	0.014	0.750	0.166
	7	MT	0.953	0.004	0.028	0.014
	8	CYB	0.852	0.008	0.042	0.098
	9	CYI	0.975	0.005	0.011	0.009
	10	CHB	0.633	0.041	0.127	0.199
	11	PI	0.005	0.983	0.005	0.007
	12	CB	0.068	0.070	0.461	0.401
	13	CGB	0.109	0.014	0.268	0.609
	14	HUB	0.948	0.005	0.019	0.028
	15	SGH	0.027	0.170	0.183	0.620
	16	SGB	0.024	0.032	0.812	0.132
	17	K	0.024	0.052	0.893	0.031
	18	CA	0.027	0.018	0.061	0.894
	19	PN	0.037	0.021	0.064	0.877
	20	MA	0.050	0.027	0.038	0.886

	$q > 0.90$
	$0.80 \leq q < 0.90$
	$0.70 \leq q < 0.80$
	$q < 0.70$



#### **b.6) Relazioni filogenetiche delle relazioni alleliche tra individui e delle distanze genetiche tra popolazioni per i casi: 28, 37 e 20 popolazioni**

Per completare le analisi di struttura, sono stati ottenuti dendogrammi per inferire le relazioni filogenetiche tra individui di diverse popolazioni appartenenti a diversi tipi razziali di mais peruviano. Sono stati costruiti alberi usando il metodo di neighbour-joining utilizzando i valori di similarità Simple Matching per un totale di 548 individui di 28 popolazioni analizzate con gli 8 microsatelliti; un altro dendogramma è stato poi generato per un totale di 675 individui, comprese le 9 popolazioni aggiuntive (37 popolazioni). Successivamente, è stato generato un dendogramma per un totale di 452 individui, prendendo in considerazione solo il mais vitreo locale con gli 8 microsatelliti. Allo stesso modo, i dendogrammi neighbour-joining sono stati fatti per dedurre le relazioni tra le 28 popolazioni, poi per le 37 e infine per le 20 popolazioni di mais locale, utilizzando in tutti i casi, le distanze geniche di Nei unbiased (Nei, 1978).

Il filogramma ottenuto per i 548 individui (28 popolazioni) ha mostrato una marcata differenza tra il mais vitreo nativo e i mais ibridi dentati. La Figura 2.29 mostra anche le differenze tra gli ibridi secondo la loro origine (ibridi Pioneer e ibridi INIA). Nel caso del mais vitreo locale, c'è una grande quantità di commistione; tuttavia, alcuni mais tendono a raggrupparsi più su un ramo, per esempio il mais Huancavelicano (HUB) è presentato separatamente dal resto ma con una certa commistione; lo stesso vale per Piricinco (PI). D'altra parte, gli Alazani sono separati con una quantità regolare di miscele. Nel caso dei masi Chancayano, alcuni sono anche separati e altri sono mescolati. I campioni dell'altopiano come SGB, SGH e CGB sono abbastanza sparsi e misti.

In Figura 2.30 si osserva un ramo principale che contiene i mais ibridi dentati e gli altri rami da cui derivano altri mais come Piricinco (PI), Kculli da cui derivano mais di altopiano come Canteño Banca (CB), San Geronimo Banca e il mais Cabanita (CA, PN, MA). È interessante notare che l'Alazan della Banca (AB) e il Mochero Banca (MB) sono più vicini agli ibridi; su un altro ramo ci sono i Mochero e gli Alazan (MMA, MMB, AT, AI). Un ramo da cui derivano i Chancayano (CYB), Mochero Tucume (MT) Huancavelicano (HUB) e Chancayano INIA (CYI).

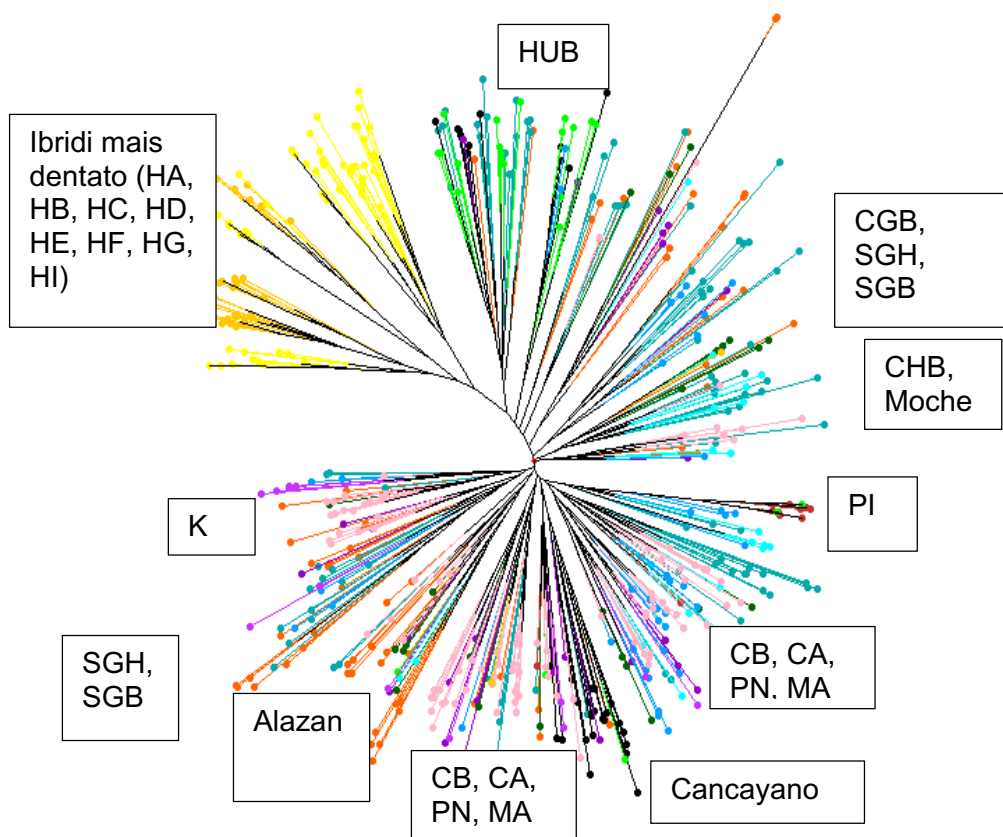


Figura 2.29. Dendrogramma di 548 individui distribuiti in 28 popolazioni (20 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati), basato sugli alleli di 8 loci microsatelliti (Neighbour-joining, utilizzando la similarità Simple Matching)

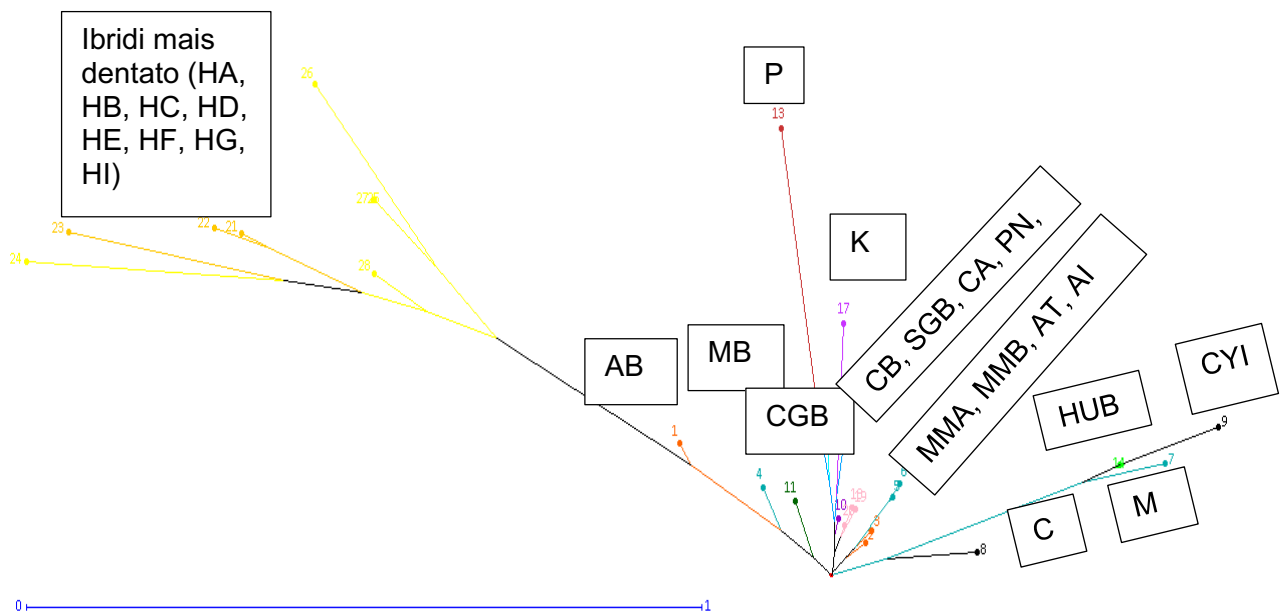


Figura 2.30. Dendrogramma di 28 popolazione (20 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati) basato sugli 8 loci microsatelliti (Neighbour-joining, utilizzando la distanza genetica di Nei)

Il filogramma in Figura 2.31 include tutti i 675 individui delle 37 popolazioni. L'analisi mostra una grande mescolanza tra le varietà di mais e si possono chiaramente osservare 5 rami principali; uno contenente 5 sottogruppi con il mais ibrido dent HJ e HK, Alazan, Mochero e il sottogruppo Chancayano con gli ibridi HA, HB, HC, HD, HE, HF, HG, HI; un altro con il Piricinco (PI) e il mais dell'altopiano, un altro con Huancavelicano (HUB), Mochero e Alazan. Un altro con il mais di Arequipa (CA, PN e MA).

Quando analizziamo questo insieme di popolazioni attraverso le loro distanze dei geni Nei, la Figura 2.32 mostra un albero con 3 rami, uno dei quali contiene gli ibridi (HA, HB, HC, HD, HE, HF, HG, HI). Un altro ramo contiene mais MT, CYI, CGBU, CYU, SGH, K, CGB e come ramo secondario gli ibridi HJ, HK. Il terzo ramo comprende il mais Alazan, Mochero, SGHU, SGB, Piricinco (PI, PIU), Huancavelicano (HUB) e Canteño (CB) e il mais Arequipa (CA, PN, MA).

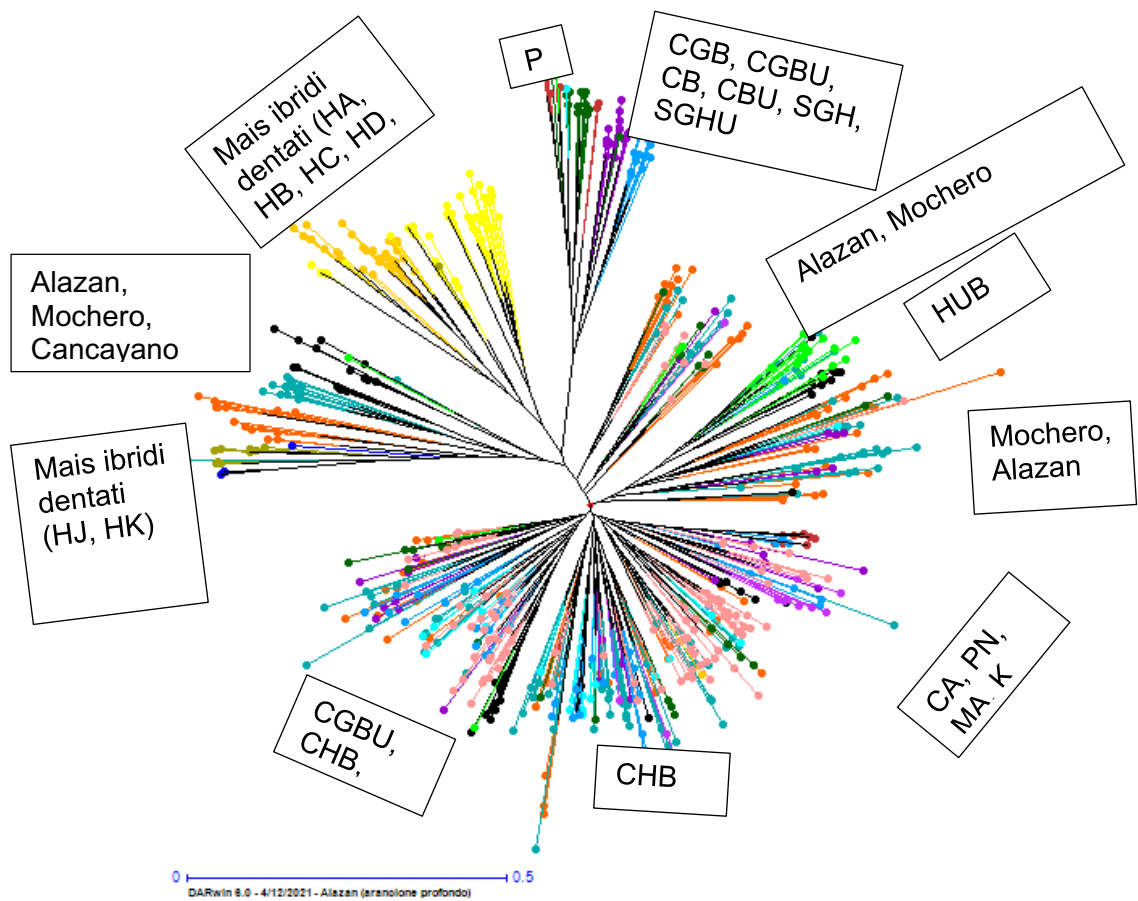


Figura 2.31. Dendrogramma di 675 individui distribuiti in 37 popolazioni (27 vitrei locali e 10 mais ibridi dentati), basato sugli alleli di 7 loci microsatelliti (Neighbour-joining, utilizzando la similarità Simple Matching)

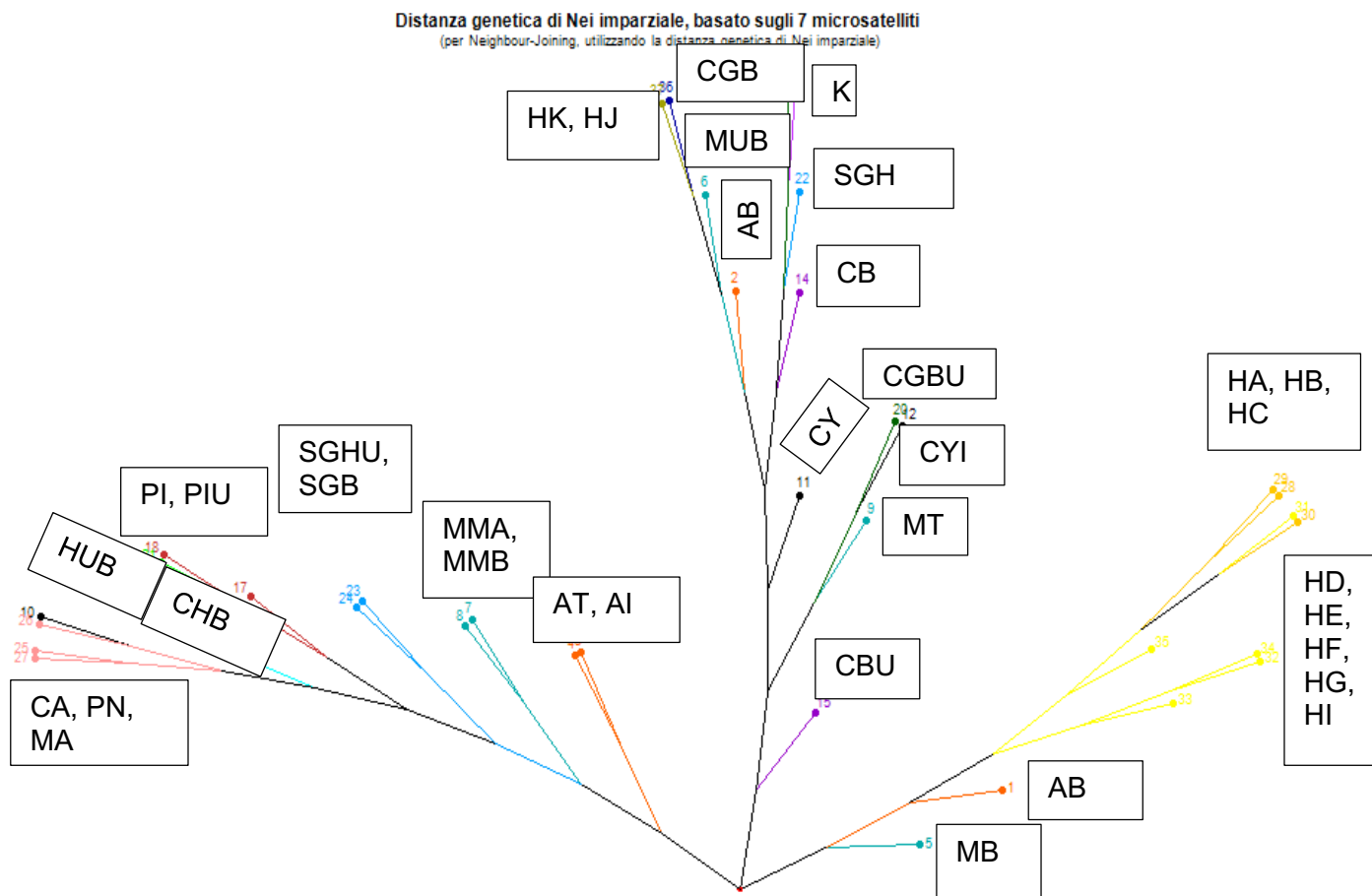


Figura 2.32. Dendrogramma di 37 popolazione (27 vitrei local e 10 mais ibridi dentati) basato sugli 7 loci microsatteliti (per Neighbour-joining, utilizzando la distanza genetica di Nei imparziale)

Quando l'analisi è stata effettuata sui 452 individui delle 20 popolazioni locali di mais, si è ottenuto un filogramma, mostrato nella Figura 2.33, nel quale si distinguono alcuni mais come PI, HUB, Mochero, K e CHB. I mais dell'altopiano sono sempre molto mescolati, sebbene quelli di Arequipa siano leggermente separati. Le relazioni tra le 20 popolazioni locali di mais attraverso la loro distanza genica Nei confermano che solo alcuni tipi di mais possono essere separati in sottogruppi (Figura 2.34).

Dendrogramma di 452 individui distribuiti in 20 popolazioni amiloidi locali, basato sugli alleli di 8 loci microsatelliti (per Neighbour-Joining, utilizzando la similarità Simple Matching)

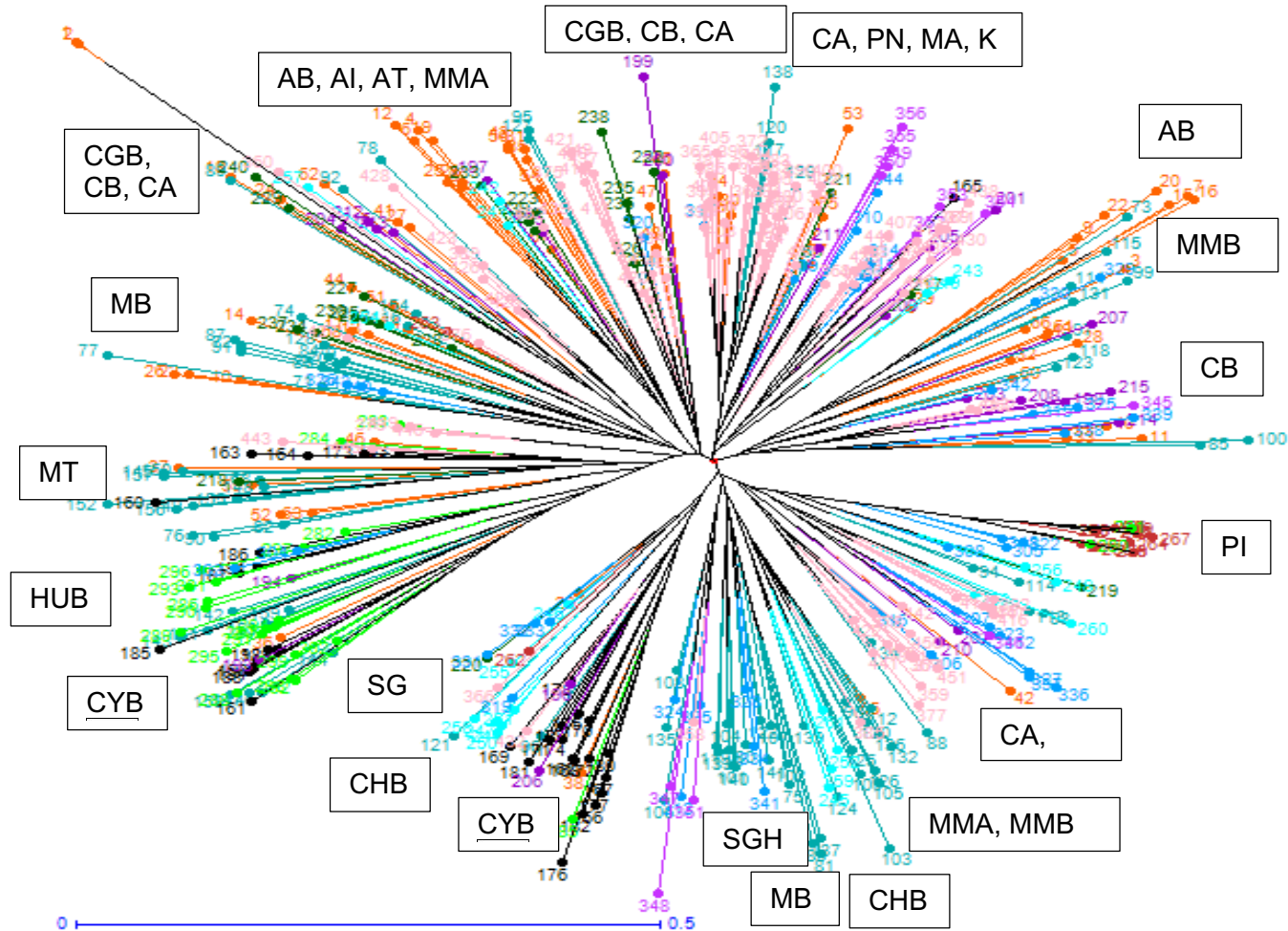


Figura 2.33. Dendrogramma di 452 individui distribuiti in 20 popolazioni vitrei locali, basato sugli alleli di 8 loci microsatelliti (Neighbour-joining, utilizzando la similarità Simple Matching)

Dendrogramma di 20 popolazioni amiloidi locali, basato sugli 8 loci microsatelliti  
(per Neighbour-Joining, utilizzando la distanza genetica di Nei imparziale)

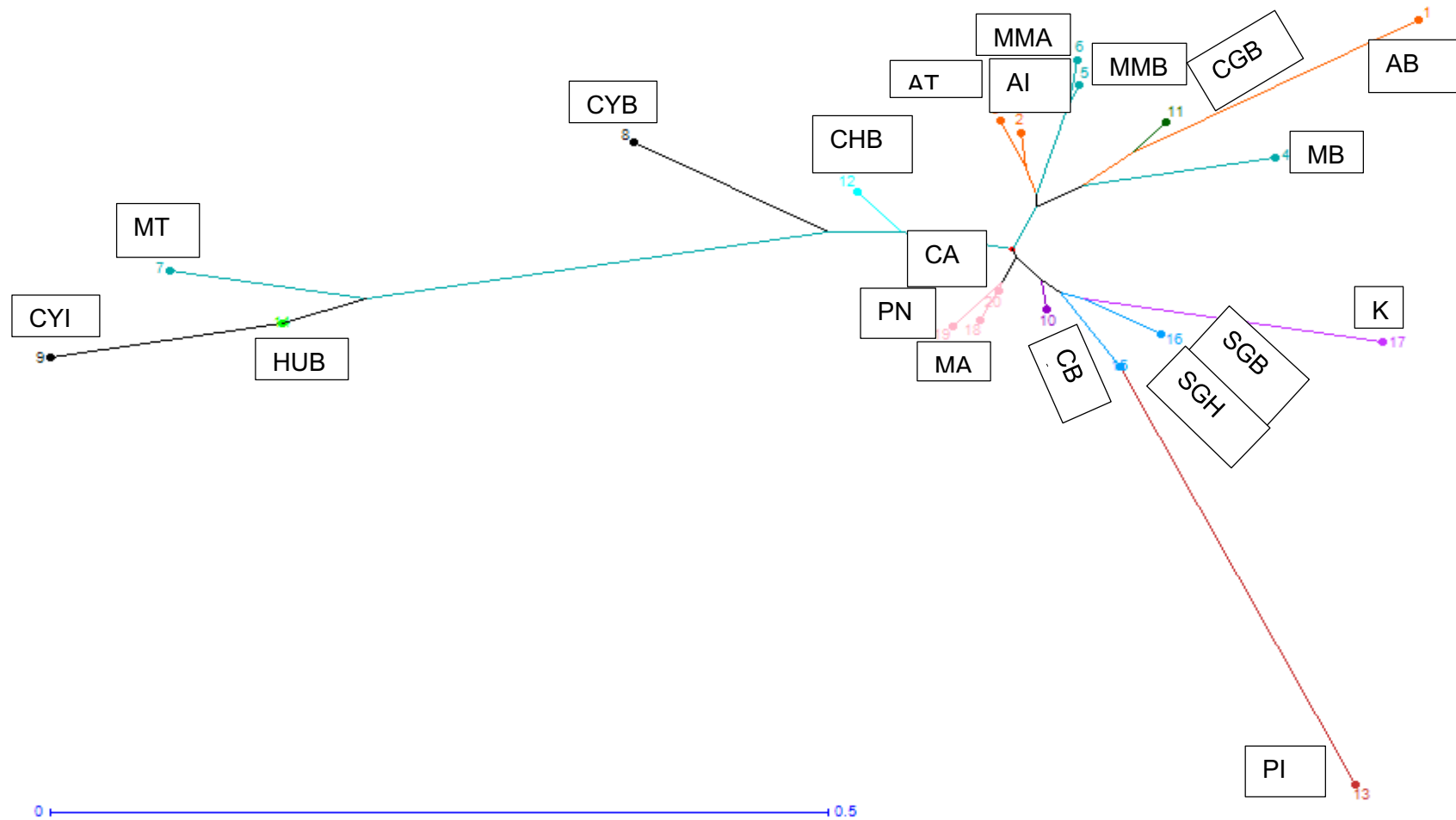


Figura 2.34. Dendrogramma di 20 popolazione vitrei locali, basato sugli 8 loci microsatelliti  
(Neighbour-joining, utilizzando la distanza genetica di Nei imparziale)



Le analisi di strutturazione e di relazioni filogeniche che abbiamo sviluppato per il mais vitreo locale e il mais ibrido dentato sono state decisive nel mostrare la differenziazione presentata da questi due gruppi. Per poter capire se la grande diversità del mais locale è il risultato di forze evolutive come la mutazione, il flusso genico, la deriva genica, o se la selezione sta influenzando in qualche modo gli 8 loci studiati è stato eseguito il test di neutralità di Ewens-Watterson utilizzando il programma PopGene 1.32.

Questo permette di capire se i loci in studio sono completamente neutri e quindi la loro diversità dipende principalmente dalle 3 forze principali menzionate. In seguito, sono stati confrontati gli indici di diversità di Shannon e Nei tra il mais della costa (Alazan, Mochero, Chancayano, Chaparreo) e il mais dell'altopiano che cresce sopra i 2000 m.s.l.m. fino a 3500 m.s.l.m., in modo da poter vedere se c'è qualche relazione tra l'origine e la distribuzione di questi mais con i loro modelli di diversità.

### **Test di neutralità Ewens-Watterson**

Il test di neutralità è stato effettuato con un'affidabilità del 95% per le 28 popolazioni analizzate con gli 8 loci microsatelliti, considerando i seguenti casi: a) 28 popolazioni come una metapopolazione; b) 20 popolazioni di mais vitreo locale, esclusi i mais ibridi dentati; c) 8 popolazioni di mais ibrido dentato.

a) Per le 28 popolazioni abbiamo osservato che in 3 loci (ZM15, ZM33 e ZM37) la selezione è al lavoro, con valori di omozigosi osservati (Obs. F) per gli alleli k in ciascuno di questi loci al di fuori dell'intervallo di variazione (L95 - U95) che viene considerato per accettare l'ipotesi che si tratti di un locus sotto selezione. La Tabella 2.46 presenta il risultato del test di neutralità Ewens-Watterson generato utilizzando PopGene 1.32. Dei 3 loci, notiamo che quello che presentava un valore più lontano dai limiti stabiliti per l'accettazione era ZM33 e negli altri il valore osservato di omozigosi era minore.

Tabella 2.46 Test di neutralità Ewens-Watterson per 8 loci SSR in 28 popolazioni di mais (20 vitrei locali e 8 mais ibridi dentati).

Locus	n	k	Obs. F	Min F	Max F	Mean*	SE*	L95*	U95*	
p-bnlg116	1050	13	0.2196	0.0769	0.9774	0.3143	0.0151	0.1587	0.6376	
Phi116	1062	11	0.1752	0.0909	0.9813	0.3663	0.0191	0.1841	0.7241	Locus sotto selezione
p-bnlg183	1092	13	0.2513	0.0769	0.9783	0.3217	0.0157	0.161	0.6558	
Phi034	1056	6	0.5242	0.1667	0.9906	0.5618	0.0371	0.2785	0.9406	
Phi056	1096	6	0.3334	0.1667	0.9909	0.5606	0.0377	0.2715	0.9586	
Phi109188	1044	9	0.3125	0.1111	0.9848	0.4255	0.0253	0.2129	0.8184	
Phi227562	1082	9	0.1687	0.1111	0.9853	0.4281	0.0267	0.2007	0.8144	Locus sotto selezione
Umc1153	1096	9	0.1964	0.1111	0.9855	0.4277	0.0254	0.2057	0.8026	Locus sotto selezione

b) Considerando solo il mais vitreo locale, il test di neutralità permetterebbe di scoprire se la selezione sta agendo su qualche locus legato a caratteri che potrebbero essere di adattabilità o di differenziazione razziale. Notiamo nella Tabella 2.47 che due loci hanno presentato valori di omozigosi osservati al di fuori dell'intervallo di accettazione stabilito dal programma PopGene 1.32 e sono ZM33 e ZM37. Ciò indicherebbe una leggera azione di selezione su entrambi i loci.

Tabella 2.47. Test di neutralità Ewens-Watterson per 8 loci SSR in 20 popolazioni di mais locale peruviano.

Locus	n	k	Obs. F	Min F	Max F	Mean*	SE*	L95*	U95*	
p-bnlg116	858	13	0.2556	0.0769	0.9724	0.3121	0.0149	0.158	0.634	Neutro
Phi116	878	10	0.1998	0.1	0.9797	0.386	0.0218	0.1921	0.7596	Neutro
p-bnlg183	900	10	0.3002	0.1	0.9802	0.388	0.0217	0.1916	0.7572	Neutro
Phi034	864	6	0.6453	0.1667	0.9885	0.543	0.034	0.2672	0.9261	Neutro
Phi056	904	6	0.4217	0.1667	0.989	0.5492	0.0356	0.2692	0.9374	Neutro
Phi109188	866	9	0.3029	0.1111	0.9817	0.4193	0.0246	0.2083	0.8016	Neutro
Phi227562	890	9	0.1762	0.1111	0.9822	0.4215	0.0257	0.2071	0.8158	Locus sotto selezione
Umc1153	904	7	0.2273	0.1429	0.9868	0.4997	0.0322	0.2443	0.8974	Locus sotto selezione

c) Per i mais ibridi dentati, è stata generata la Tabella 2.48 che mostra 2 loci con valori che erano al di fuori dei limiti di accettazione; tuttavia, il locus ZM27 sarebbe quello che registrerebbe un maggiore effetto dell'azione di selezione poiché lo scostamento dall'intervallo accettabile è molto più alto, (0,26) vs [L95 (0,32) - U95 (0,93)]. Per l'altro locus (ZM15) la differenza è

molto piccola, quindi l'azione di selezione sarebbe più blanda.

Tabella 2.48. Test di neutralità Ewens-Watterson per 8 loci SSR in 8 popolazioni di mais ibridi dentati.

Locus	n	k	Obs. F	Min F	Max F	Mean*	SE*	L95*	U95*	
p-bnlg116	192	7	0.4142	0.1429	0.9395	0.4161	0.0222	0.2167	0.779	Neutro
Phi116	184	8	0.1926	0.125	0.9268	0.3753	0.0186	0.1974	0.7237	Locus sotto selezione
p-bnlg183	192	8	0.3329	0.125	0.9297	0.3753	0.0184	0.1981	0.7183	Neutro
Phi034	192	4	0.2634	0.25	0.9692	0.6114	0.0335	0.3283	0.939	Locus sotto selezione
Phi056	192	6	0.3155	0.1667	0.9493	0.4702	0.0263	0.2439	0.8429	Neutro
Phi109188	178	3	0.3864	0.3333	0.9778	0.699	0.035	0.3769	0.9777	Neutro
Phi227562	192	4	0.3823	0.25	0.9692	0.6064	0.0341	0.3232	0.9488	Neutro
Umc1153	192	6	0.316	0.1667	0.9493	0.468	0.0262	0.2426	0.8421	Neutro

### Confronto degli indici di diversità di Shannon e Nei tra il mais della costa e dell'altopiano.

La Figura 2.35 presenta i valori dell'indice di Shannon per il mais della costa rispetto al mais dell'altopiano, dove possiamo vedere che c'è una tendenza leggermente negativa nei valori, con il mais della costa che ha valori di diversità più alti del mais dell'altopiano. Va chiarito che questo grafico include solo le popolazioni del primo gruppo, che sono state analizzate con 8 loci microsatelliti e dove gli ibridi sono stati esclusi.

Per quanto riguarda l'eterozigosità osservata e attesa (indice di diversità genetica di Nei), notiamo anche nelle Figure 2.36 e 2.37 che le linee di tendenza mostrano una leggera pendenza negativa. Quando analizziamo il comportamento di questi parametri nelle popolazioni introdotte nello studio insieme alle prime 28, notiamo che la tendenza alla diminuzione dei valori di diversità Shannon, diversità osservata e diversità Nei si mantiene nel mais vitreo degli altipiani e con valori leggermente più alti nel mais locale della costa (Figure 2.38 e 2.39).

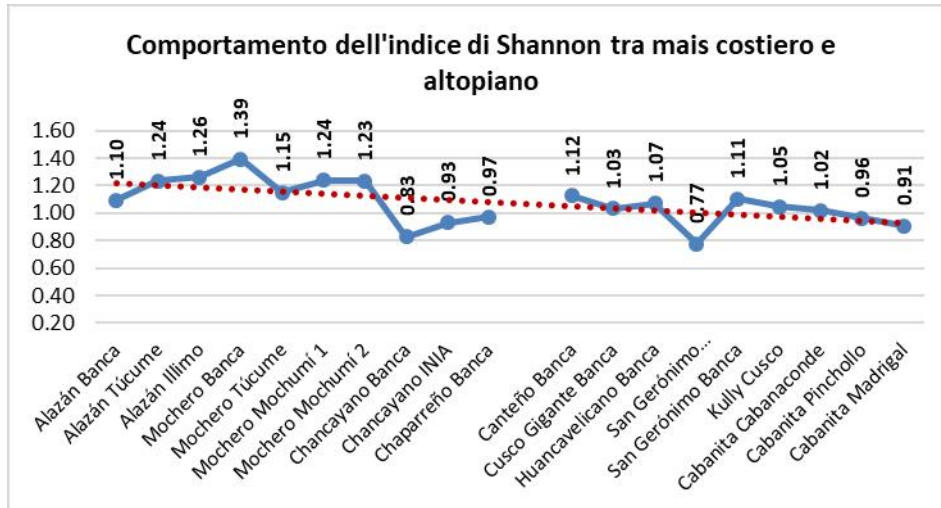


Figura 2.35. I valori di diversità di Shannon nel mais d'alta quota rispetto al mais costiero.

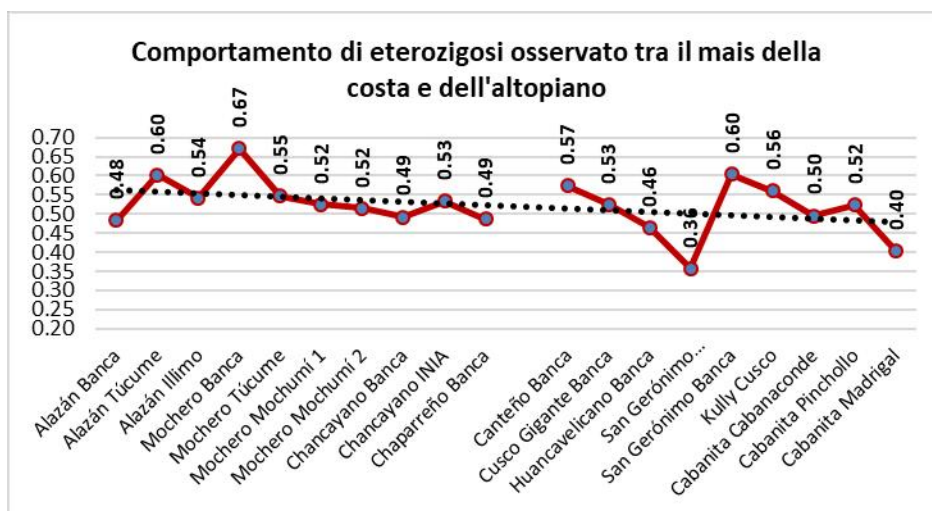


Figura 2.36. I valori di diversità osservati nel mais dell'altopiano rispetto al mais della costa.

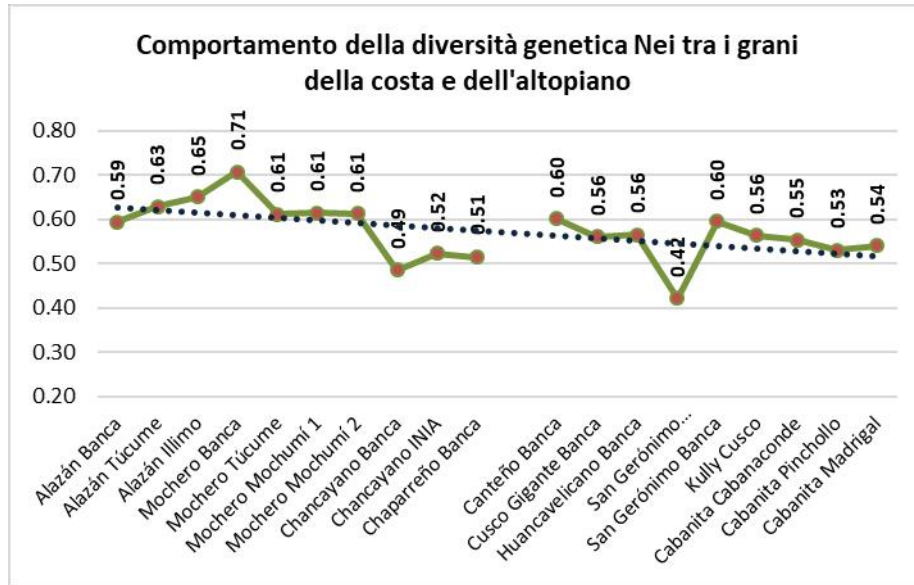


Figura 2.37. I valori della diversità genetica Nei nel mais d'alta quota rispetto al mais costiero.

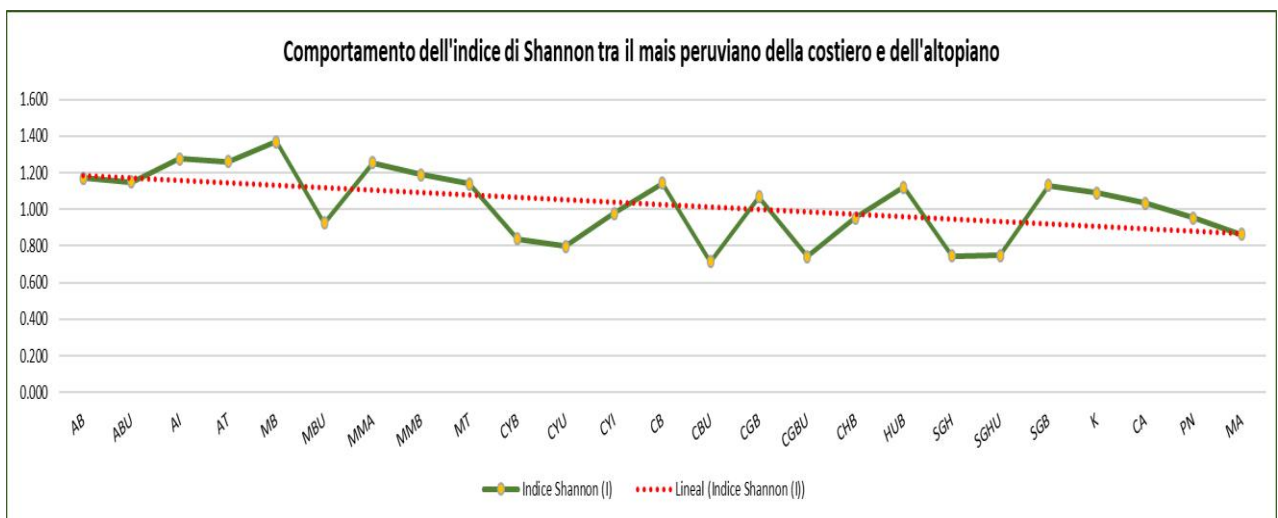


Figura 2.38. Valori di diversità di Shannon per il mais d'alta quota rispetto al mais costiero (AB, ABU, AI, AT, MB, MMA, MMB, MT, CYB, CYU, CYI, CHB).

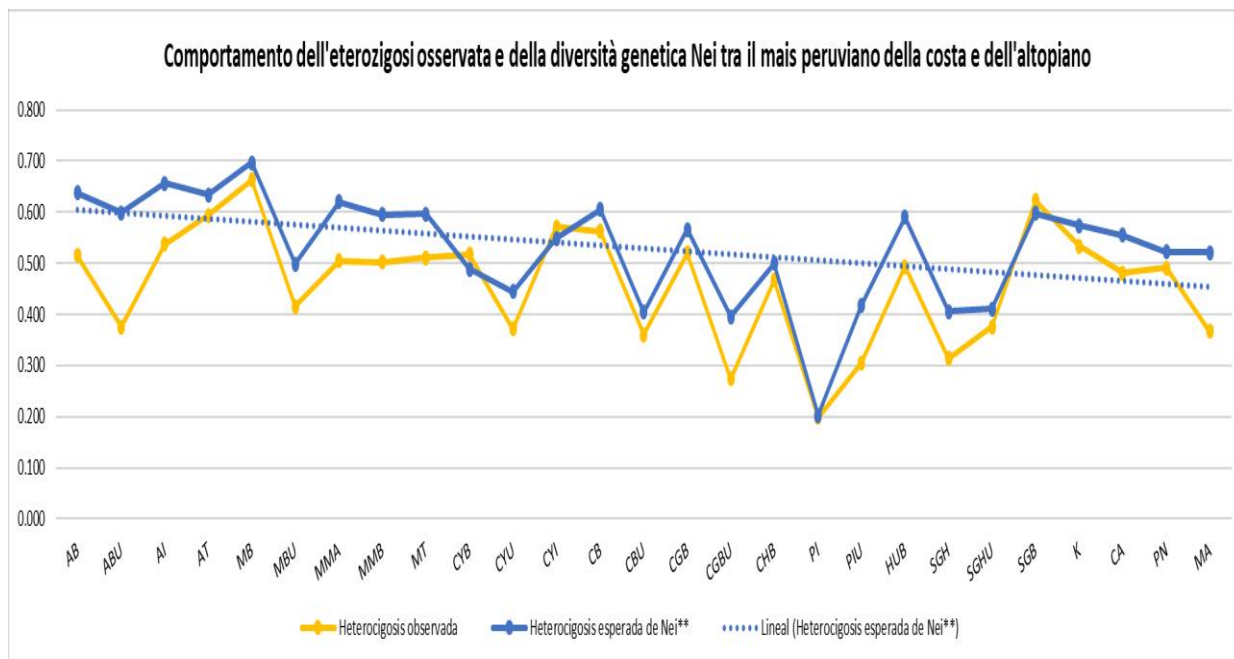


Figura 2.39. Valores de diversidad observada y genética Nei para el maíz de alta cuota respecto al maíz costero (AB, ABU, AI, AT, MB, MMA, MMB, MT, CYB, CYU, CYI, CHB).

Per dimostrare questa grande variazione allelica, presentiamo alcune fotografie con i modelli allelici trovati nel mais locale peruviano per entrambi i marcatori microsatelliti e AFLP. La Figura 2.40 presenta il gel di poliaccrilammide contenente gli alleli per il mais Alazan banca (AB) e Mochero banca (MB) con il primer ZM04; La Figura 2.41 contiene i pattern allelici per Alazan banca (AB), Mochero banca (MB), Canteño banca (CB) e Cusco Gigante banca (CGB) con il primer ZM15 e la Figura 2.42 i pattern allelici su un gel di poliaccrilamide di un AFLP con la combinazione EcoRI+AAG/MseI+CTG per Chancayano banca e INIA (CYB, CYI) e per Chaparreo banca (CHB).

Alazan banca

Mochero

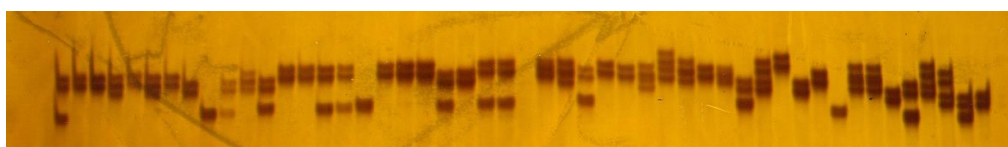


Figura 2.40. Primer ZM04

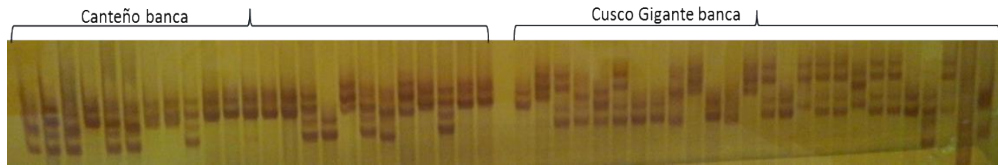


Figura 2.41. Primer ZM15

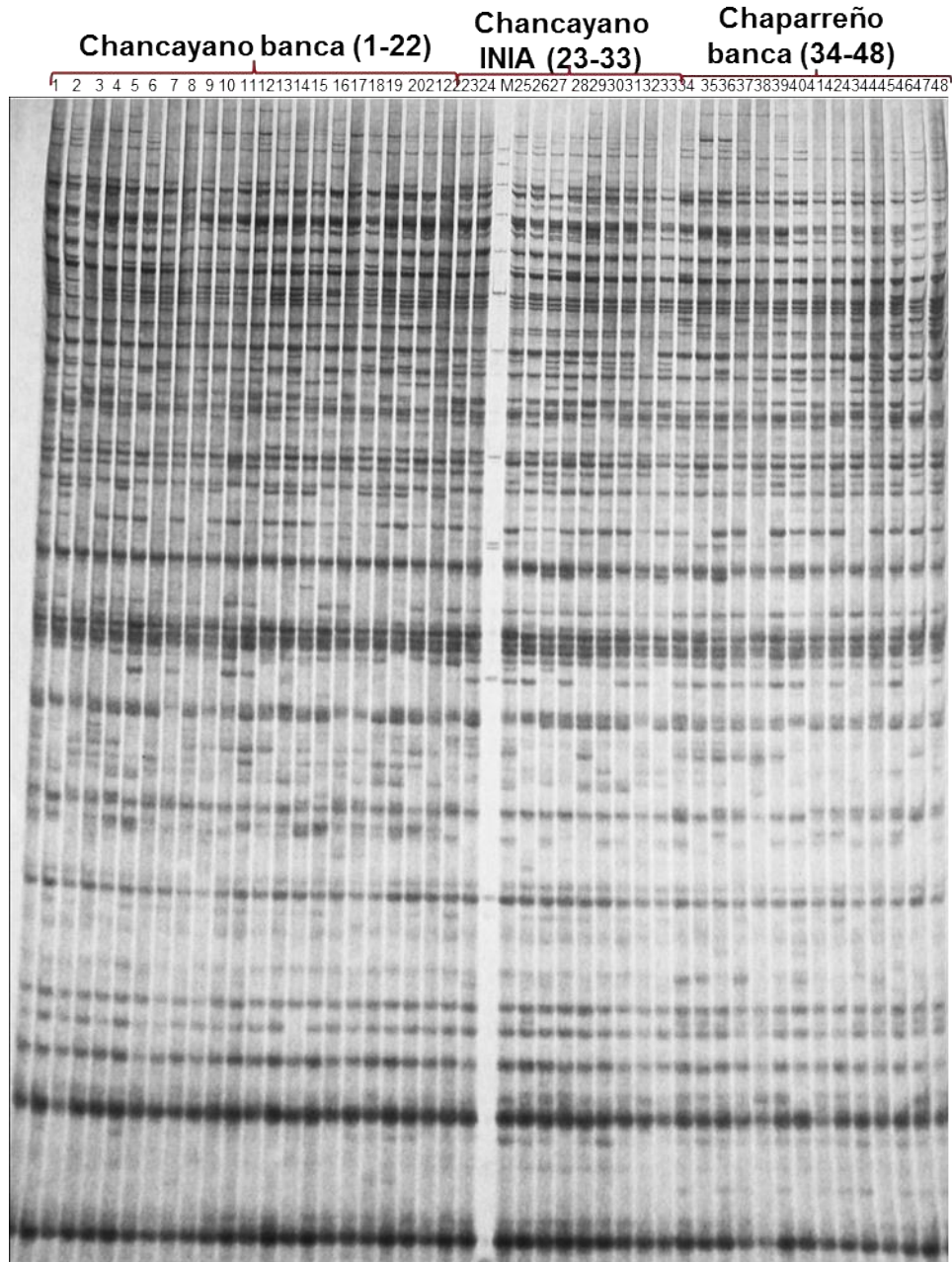


Figura 2.42. AFLPs, EcoRI+AAG/MseI+CTG delle razze Chancayano (Banca e INIA) e razza Chaparreseño Banca

### **3 Componente 2: La gestione delle sementi come promotore del flusso genico**



### **3. Componente 2: Gestione delle sementi come promotore del flusso genico**

#### **3.1 Obiettivi**

##### **Obiettivo generale:**

- Documentare e valutare i sistemi di produzione, la commercializzazione, il movimento dei semi e le stagioni di crescita degli ibridi di mais dentati in coesistenza con le popolazioni native di mais in Lambayeque.

##### **Obiettivi specifici:**

- Analizzare lo stato di gestione e i periodi di coltivazione del mais locale e degli ibridi dentati nella zona di Lambayeque.
- Valutare lo stato della gestione e del movimento dei semi di mais nativi e ibridi in Lambayeque.

## **3.2 Materiali e metodi**

### **3.2.1 Materiali e disegno del sondaggio**

Sondaggio: è stato progettato un sondaggio per raccogliere informazioni sulle attività che gli agricoltori praticano per la coltivazione del mais. Questa indagine raccoglie i dati sulle coordinate geografiche, l'area dell'appezzamento, le altre coltivazioni, i periodi di semina, fioritura e raccolta, i tipi di mais coltivati (nativo e/o giallo duro), le varietà utilizzate, l'acquisizione delle sementi e la commercializzazione del raccolto, problemi ambientali nella coltivazione del mais, ecc. L'allegato 5 contiene il modello di indagine utilizzato.

Per il corretto sviluppo dell'indagine, è stato utilizzato un apparecchio di georeferenziazione GPS, per registrare le coordinate geografiche come latitudine, longitudine e altitudine.

### **3.2.2 Luogo di campionamento**

Sono stati presi contatti con istituzioni come il Board of Irrigators, Vista Florida Experimental Station dell'Istituto Nazionale per l'Innovazione Agraria (INIA) e la Direzione Regionale Agraria di Lambayeque.

Sono state considerate le seguenti province con alcuni dei loro distretti: Ferreñafe (Ferreñafe), Chiclayo (Callanca, Reque) e Lambayeque (Mochumí, Túcume, Illimo, Pacora, Jayanca). La metodologia utilizzata per l'indagine consisteva in una visita diretta all'appezzamento di ogni agricoltore, con l'appoggio dell'ingegnere Gloria Gonzales, un funzionario della Direzione Agraria di Lambayeque.

L'indagine è stata condotta in 8 distretti come mostrato nella Tabella 3.1, per un totale di 169 agricoltori intervistati. I risultati dell'indagine sono raccolti nell'allegato 5.

**Tabella 3.1. Località con numero di agricoltori intervistati sulla gestione delle colture di mais in Lambayeque**

<b>Distretto</b>	<b>N° Agricoltori</b>
Ferreñafe	24
Callanca	17
Reque	15
Mochumí	22
Túcume	27
Ilimo	28
Pacora	27
Jayanca	9

### **3.2.3 Analisi statistica**

Il programma DIVA Gis 7.5 è stato utilizzato per elaborare le coordinate geografiche e le informazioni meteorologiche di riferimento della zona di Lambayeque, utilizzando i dati delle serie temporali di più di 40 anni forniti dal Servizio Nazionale di Meteorologia e Idrologia (SENAMHI). Le variabili prese in considerazione sono state le precipitazioni, le temperature massime e minime. Le indagini sono state elaborate utilizzando i programmi Microsoft Office Excel e SPSS23, ottenendo i rispettivi grafici e tabelle.

### 3.3 Risultati

Il programma di georeferenziazione della diversità delle specie DIVA Gis è stato utilizzato per generare la mappa mostrata nella Figura 3.1 nella quale figurano le coordinate geografiche degli agricoltori intervistati accanto ai luoghi in Perù dove è stata identificata la ricchezza razziale della coltura del mais.

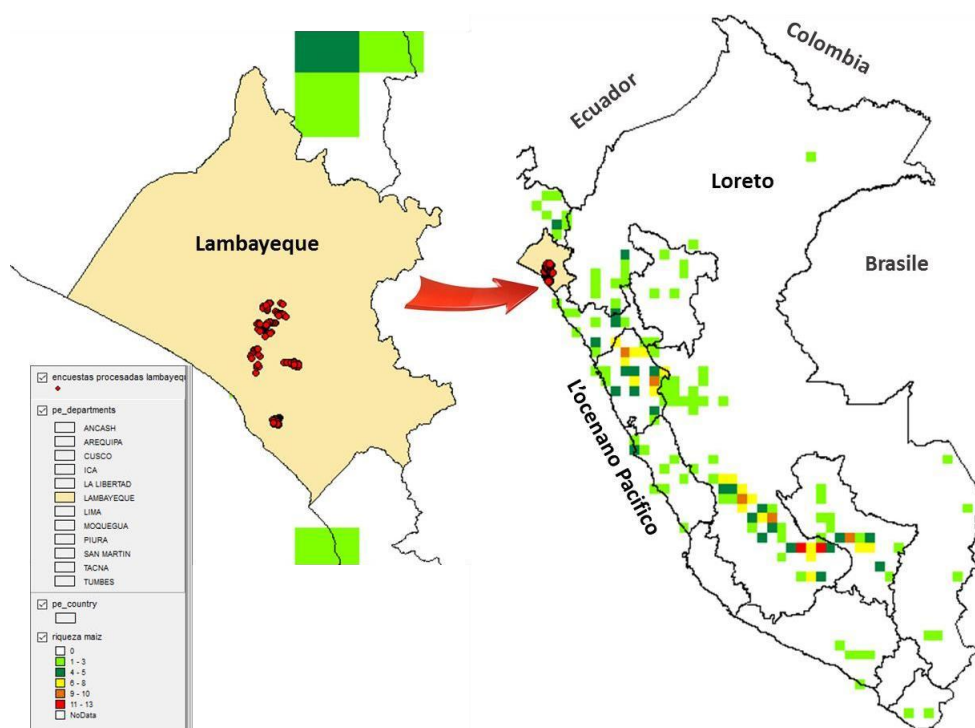


Figura 3.1. Mappa di distribuzione del mais locale e degli ibridi di mais dentato in Lambayeque

Nella zona di Lambayeque, oggetto dell'indagine e della raccolta di campioni di mais, abbiamo condotto interviste direttamente con gli agricoltori, accanto a controlli in loco effettuati da noi. Possiamo menzionare che in Lambayeque ci sono tre scenari:

- Il primo, nella zona costiera della provincia di Ferreñafe, dove si coltiva solo mais ibrido dentato,
- Il secondo, nella provincia di Chiclayo, dove si coltiva mais vitreo come il tipo "Huachano" per la commercializzazione di mais, tamales o grano secco.
- Il terzo nella provincia di Lambayeque, con i distretti di Illimo, Pacora, Túcume, Mochumí e Jayanca, dove si coltivano mais delle razze Mochero e Alazán ma vicini a

coltivazioni di mais ibrido dentato, quindi è un interessante luogo di coesistenza. La Figura 3.2 mostra i chicchi di mais Alazán in mano al signor Nicáceo Tejada. È uno dei pochi agricoltori che conserva questo tipo di razza. In Figura 3.3a possiamo vedere l'appezzamento di mais Mochero del signor Sandoval mentre la Figura 3.3b mostra due appezzamenti contigui, uno di mais ibrido dentato e l'altro con mais Mochero. Lo stesso agricoltore aveva un altro appezzamento con mais Alazan accanto a del mais ibrido dentato, Figura 3.4.



Figura 3.2. Nicáceo Tejada con mais Alazán (Illimo)



Figura 3.3. (a) Mais Mochero (Túcume); (b) esempio di coesistenza, a sinistra ibrido dent corn e a destra Mochero



Figura 3.4. (a) Appezzamenti in coesistenza, a sinistra mais Alazan e a destra mais dentato; b) pannocchia Alazán.

### **Resultati del sondaggio:**

#### **3.4.1. Caratteristiche dell'area e della proprietà dei terreni coltivati**

Nella zona analizzata di Lambayeque gli appezzamenti di mais dentato e autoctono si

trovano tra i 15 e gli 80 metri di altitudine sul livello del mare, con una media di 48,2 metri sul livello del mare. I terreni di coltivazione sono pianeggianti e non ci sono montagne o appezzamenti che sono disposti con pendenze superiori a 10°. Poiché questa è una zona molto secca, i livelli di precipitazione sono scarsi e i picchi di precipitazione possono essere osservati solo durante gli eventi "El Niño" o "La Niña", come mostrato nella Figura 3.5, che mostra anche il comportamento delle temperature massime e minime in due province della regione di Lambayeque (Ferreñafe e Lambayeque). L'area totale dedicata a diverse colture nel campione di questa indagine è di 385,6 ettari, di cui 238,0 ha sono dedicati alla coltivazione del mais, che rappresenta il 65,14%. Tuttavia, a livello dell'intera regione di Lambayeque, l'area dedicata alla coltivazione del mais ibrido dentato è di 5133 ha e del mais vitreo di 1406 ha. I totali nazionali sono 126.257 ha e 214.287 ha, rispettivamente.

Per quanto riguarda la proprietà degli appezzamenti di coltivazione, l'90,0% degli intervistati indica che possiede la terra; mentre il 10,0% degli intervistati coltiva appezzamenti affittati (Figura 3.6). Secondo il rapporto del MINAM (2013), un sondaggio su 43 agricoltori della costa settentrionale ha mostrato che il 69,8% ha indicato di essere proprietario della terra.

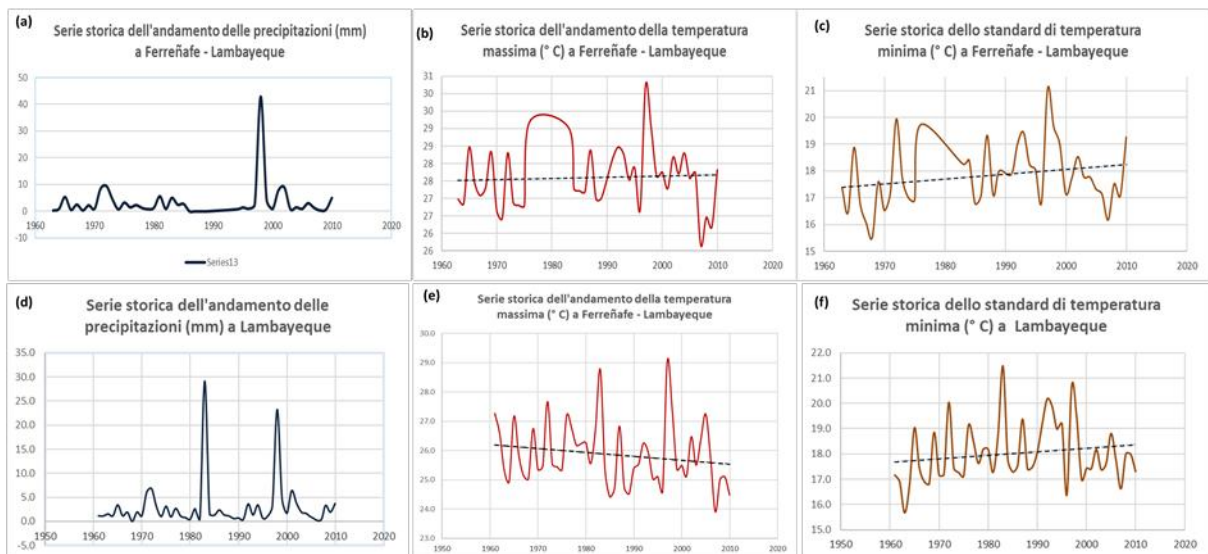


Figura 3.5. Serie temporali di variabili meteorologiche nelle zone di Lambayeque e Ferreñafe



Figura 3.6. Percentuale di possesso dei terreni coltivati.



### 3.4.2. Esperienza nella gestione e nei tipi di mais che si coltivano

Gli intervistati possedevano un'esperienza in agricoltura tra i 2 e i 60 anni e il mais è la coltura principale in tutta l'area di analisi. Tutti coltivano mais ibrido dentato e circa il 55,6% coltiva mais autoctono (Figura 3.7), alcuni di loro insieme a mais ibrido Il 42% non specifica la varietà di ibrido coltivata, il 21,9% usa la varietà Marginal, 14,2% Dkalb, 9,5% diverse varietà e in misura minore altre varietà (Figura 3.8). Per quanto riguarda il mais autoctono, vengono segnalati principalmente il Mochero e l'Alazán; il tipo Chancayano, così come Huachano.

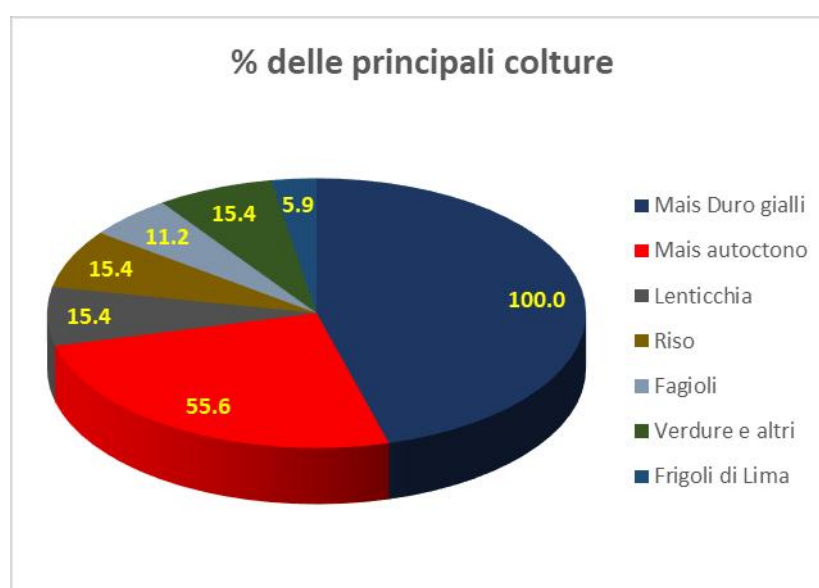


Figura 3.7. La coltura principale è il mais ibrido dentato (100%), seguito dal mais nativo (55,6%) e il meno importante è il fagiolo di Lima (5,9%)

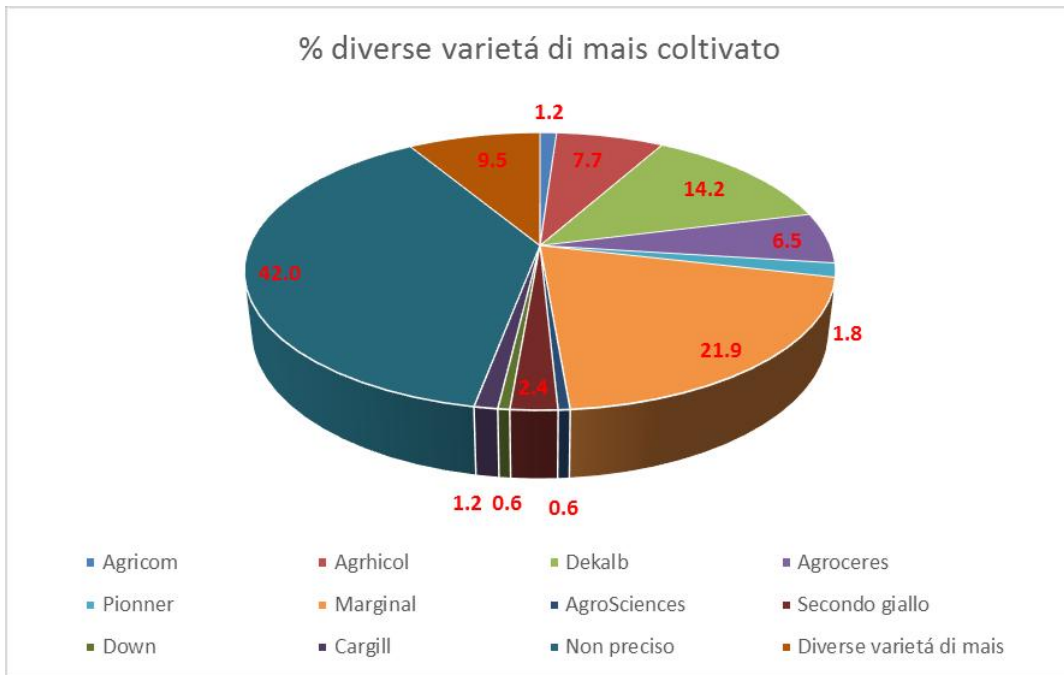


Figura 3.8. Varietà di mais ibrido coltivate

### **3.4.3 Acquisizione di semi per la coltivazione**

La maggior parte dei produttori afferma di essere in grado di riconoscere le varietà commerciali di mais dentato in base all'aspetto e all'uniformità nella crescita, nel fogliame, nella pannocchia, ecc. Quando c'è eterogeneità tra le piante in un appezzamento, questo potrebbe essere un caso in cui è stato utilizzato il secondo seme, cioè dal raccolto ibrido vengono selezionati i grani da utilizzare per la semina nella stagione di raccolta successiva, ma la conseguenza di questa attività è una bassa produttività delle piante e una scarsa resa. Tuttavia, diversi agricoltori riferiscono di aver adottato questa pratica perché credono di risparmiare la spesa per l'acquisto di sementi ibride certificate. Inoltre, alcuni agricoltori riferiscono di aver smesso di usare alcune varietà a causa dei bassi rendimenti, degli alti costi dei semi, della siccità e della mancanza d'acqua, o a causa di problemi di parassiti o malattie.

Il 54,5% degli intervistati acquista i semi in un negozio agrochimico, Figura 3.9, il 34,3% non ha risposto e l'11,2% compra i semi nei mercati. Per quanto riguarda l'abitudine di scambiare semi tra produttori, lo studio ha mostrato che il 68,6% non scambia semi, solo il 3% scambia semi tra vicini e il 28,4% non ha risposto alla domanda (Figura 3.10).

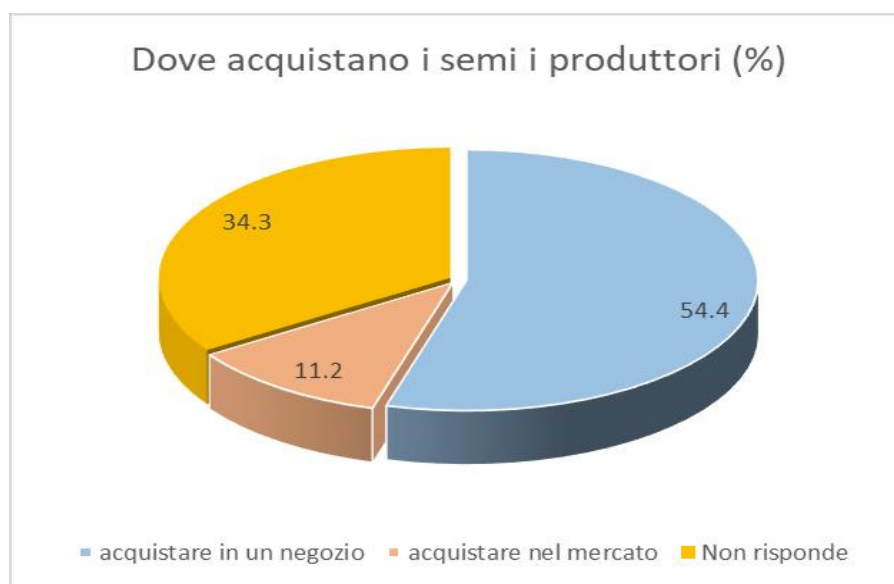


Figura 3.9. Origine dei semi di mais coltivati

...

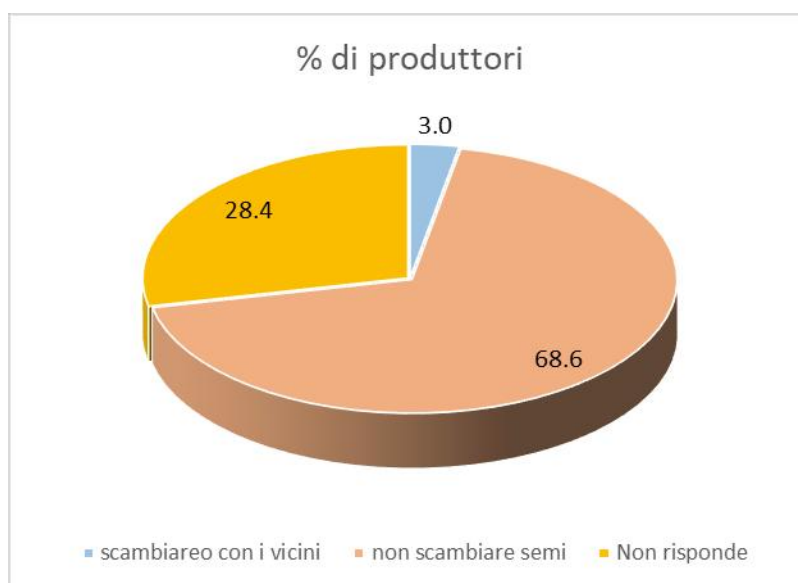


Figura 3.10 Percentuali di scambio di semi tra coltivatori.

#### 3.4.4. Varietà e gestione delle colture

Durante l'indagine, è stato chiesto se i produttori usassero ruotare le loro colture di mais. La maggior parte di loro (73,4%) non applica la rotazione delle colture mentre il 26,6% usa ruotare il mais con un'altra coltura a breve ciclo vegetativo (Figura 3.11) come alcune leguminose. Inoltre, il 20,1% ha l'abitudine di coltivare il mais associato ad altre specie; mentre il 79,9% coltiva solo mais (Figura 3.12). Tra le principali colture associate al mais ci sono fagioli, lenticchie, fagioli di Lima, fagiolo dall'occhio.

Il 98,2% degli intervistati esegue solo un ciclo di coltivazione all'anno, mentre l'1,8% pianta fino a due colture di mais all'anno (Figura 3.13). La resa mediaraggiunta è di 6187,5 kg/ha, ma con un'alta deviazione standard (2824,6 kg/ha).

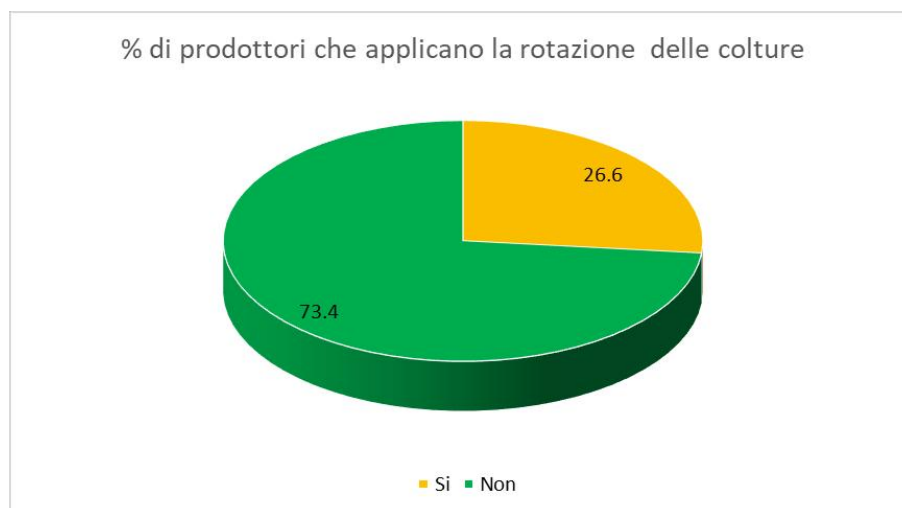


Figura 3.11. Frequenza di rotazione delle colture.

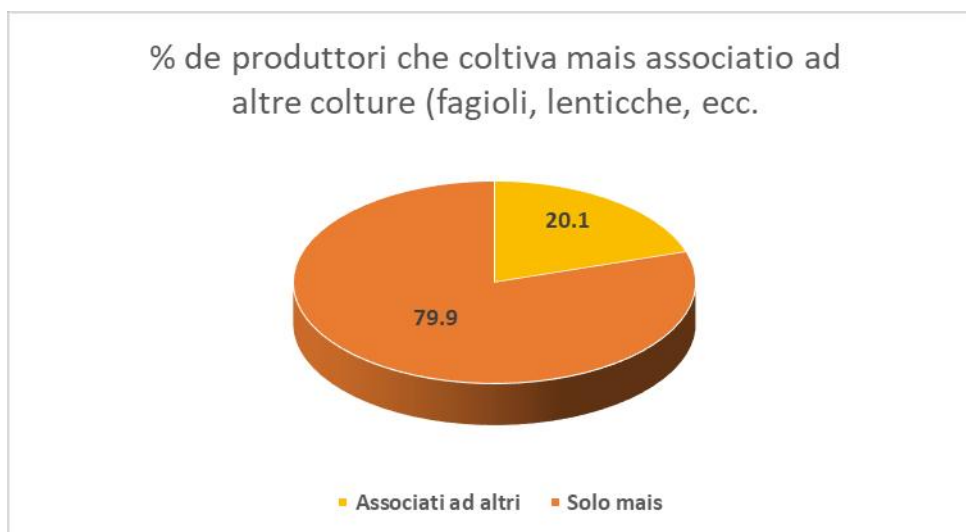


Figura 3.12. Coltivazione del mais in associazione con altre specie.

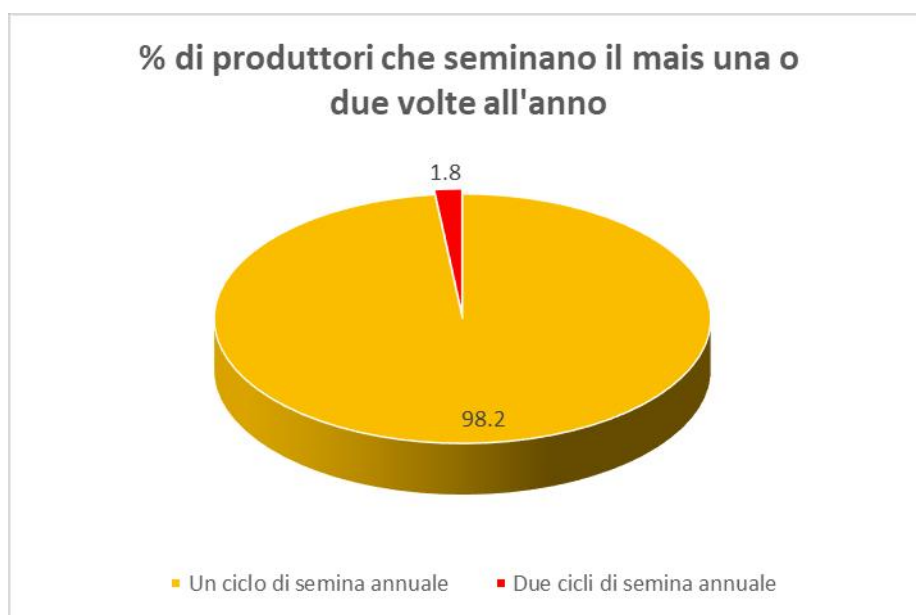


Figura 3.13. Numero di cicli di semina nella regione del Lambayeque.

### 3.4.5. Stagione di crescita del mais

La maggior parte degli agricoltori inizia a seminare la coltura nei mesi da maggio a settembre, con la fioritura più abbondante nei mesi da giugno a ottobre (Figura 3.14). Dicembre è il mese di maggiore raccolta. Tuttavia, il mais della razza Mochero, che richiede

poca acqua, e l'Alazán, che è un po' meno resistente alla siccità, sono disolito coltivati dopo il raccolto del riso, che avviene principalmente tra i mesi di maggio e luglio. Questa abitudine sfrutta l'umidità del suolo che deriva dalla grande quantità di acqua richiesta dal riso e dal breve periodo vegetativo del mais Mochero di soli 3 mesi e mezzo (Salhuana et al., 2004).

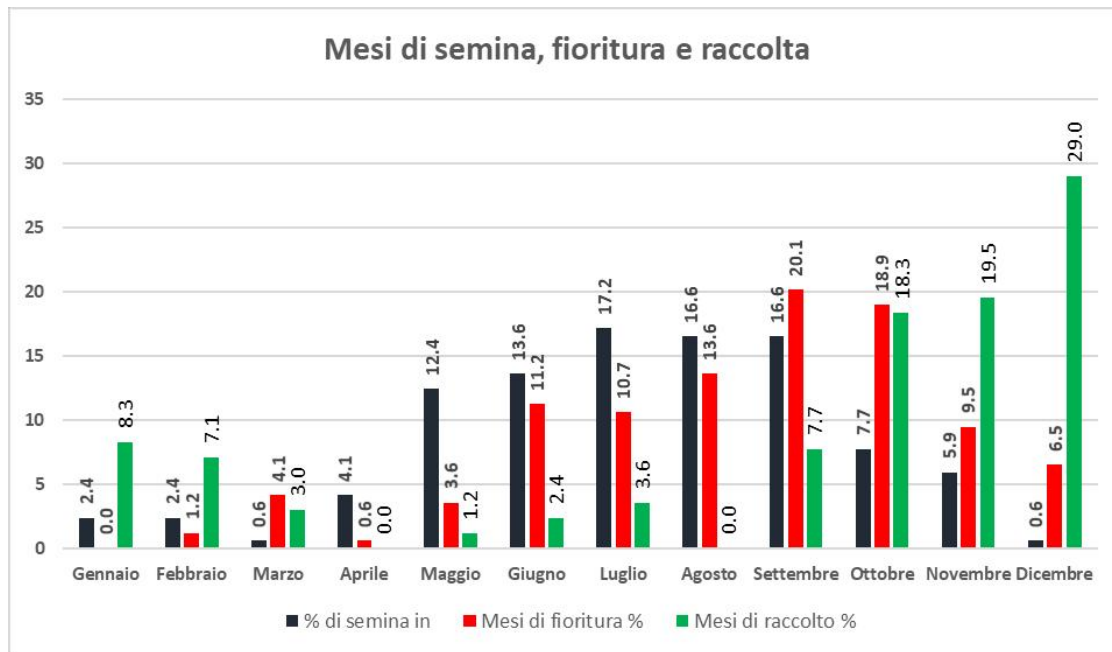


Figura 3.14. Mesi di semina, fioritura e raccolta del mais.

### 3.4.6. Consigli e aspetti della raccolta e della commercializzazione

Per quanto riguarda le fonti di informazioni sulla coltivazione del mais, il 100% dei produttori si rivolge ai negozi che vendono fertilizzanti e sementi. Per quanto riguarda la destinazione dei loro raccolti, si può vedere in Figura 3.15 che il 57,4% vende il suo raccolto nei mercati locali mentre il 42,6% utilizza un intermediario che vende poi il prodotto nel mercato all'ingrosso della Moshoqueque di Lambayeque. L'importanza che i mercati hanno sul mais autoctono è menzionata anche nel rapporto MINAM (2013). Nel nostro studio si evince che molti agricoltori usano i mercati locali, i mercati all'ingrosso o i negozi che vendono prodotti agricoli per ottenere le sementi.



Figura 3.15. Commercializzazione del mais raccolto.

Per quanto riguarda la differenza tra i produttori che coltivano mais YDM e nativo, i primi vendono la loro produzione per il consumo animale o per l'alimentazione, mentre i secondi vendono i loro prodotti per il consumo umano sotto forma di tamales, humitas, chicha e choclo principalmente.

Nelle Figure 3.16 e 3.17 possiamo vedere i mercati locali di Túcume e Illimo e il modo di commercializzazione del mais locale (Mochero) sotto forma di mais o grano secco per cancha o tamales. Inoltre osserviamo, nella Figura 3.18, un venditore di tamales preparati con mais Huachano nel mercato di Reque, dove non c'è coesistenza con il mais ibrido dentato. La Figura 3.19 mostra spighe di mais ibrido giallo ottenute in una piantagione dove la coesistenza tra seme di mais ibrido dentato certificato e mais Mochero ha dato origine a spighe ibride ottenute da impollinazione incrociata. Questo mais è usato come mangime per gli animali.





Figura 3.16. (a) Mercado local de Tucumán, (b) maíz Mochero en pan de azúcar and (c) in granosecco.



Figura 3.17. Mercado local Illimo (a), mais Mochero mais (b)



Figura 3.18. Signora che vende tamales al mercato locale di Reque, con in mano una spigadi mais Huachano.



Figura 3.19. Mais dentato (F2) incrociato con Mochero per il consumo animale.

### 3.4.7. Principali problemi che riguardano la coltura e i raccolti

La coltivazione del mais ibrido dentato e dei mais nativi presenta anche una serie di problemi che influenzano direttamente la produttività e la qualità dei grani. Per questo motivo, i produttori sono stati consultati su quali siano i problemi più gravi che affrontano durante la coltivazione:

- a) **Mancanza d'acqua:** il 52,7% (Figura 3.20) ha indicato che vorrebbe avere varietà resistenti alla siccità, considerando che la zona nord del Perù è molto secca e calda e dipende dalle acque sotterranee e dall'acqua immagazzinata nella diga Olmos-Tinajones. D'altra parte, il 47,3% ha evidenziato altri problemi. La Figura 3.21 (b) e (c) mostra le immagini dei pozzi di acqua freatica da cui si estrae l'acqua per l'irrigazione e il consumo. Tuttavia, l'Autorità dell'acqua in Lambayeque ha sottolineato che negli ultimi anni queste riserve d'acqua stanno diminuendo, a causa della maggiore frequenza di episodi di siccità. In Figura 3.21 (d) si vede che la siccità ha indotto la maturazione riproduttiva maschile precoce delle piante, colpendo così le colture.

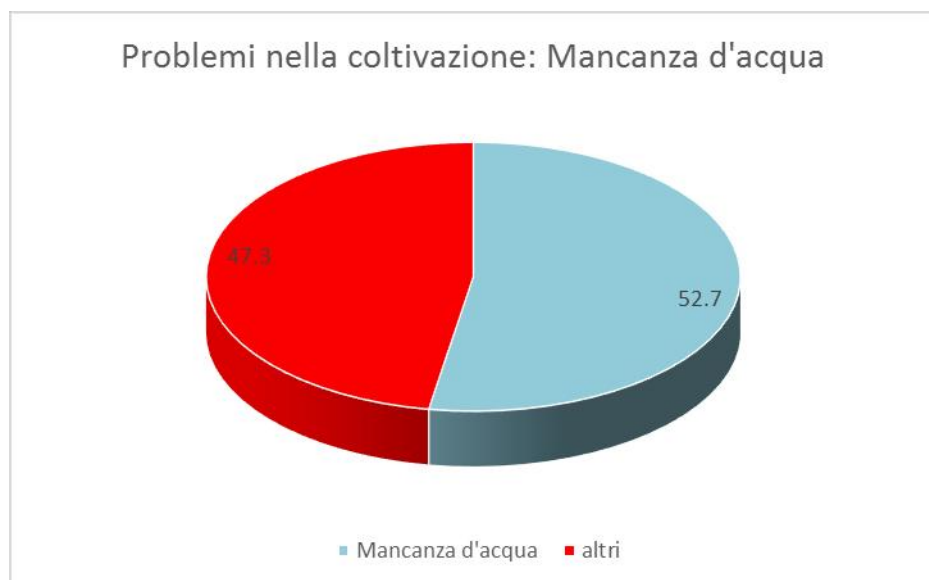


Figura 3.20. Problemi incontrati dai produttori di mais in Lambayeque.



Figura 3.21. Irrigazione Olmos-Tinajones (a), (b) e (c) pozzi d'acqua nel sottosuolo, (d) pianta di mais che matura in anticipo per mancanza d'acqua.

- b) **Erbacce:** secondo le indagini, il 58% degli intervistati ha indicato che le erbacce rappresentano un problema economico perché devono usare più manodopera per rimuovere le erbacce o investire di più nell'uso di erbicidi (Figura 3.22). Considerando che questi contadini hanno piccoli appezzamenti di terreno e sono economicamente poveri, le erbacce rappresentano una voce importante nei costi della loro produzione di mais.

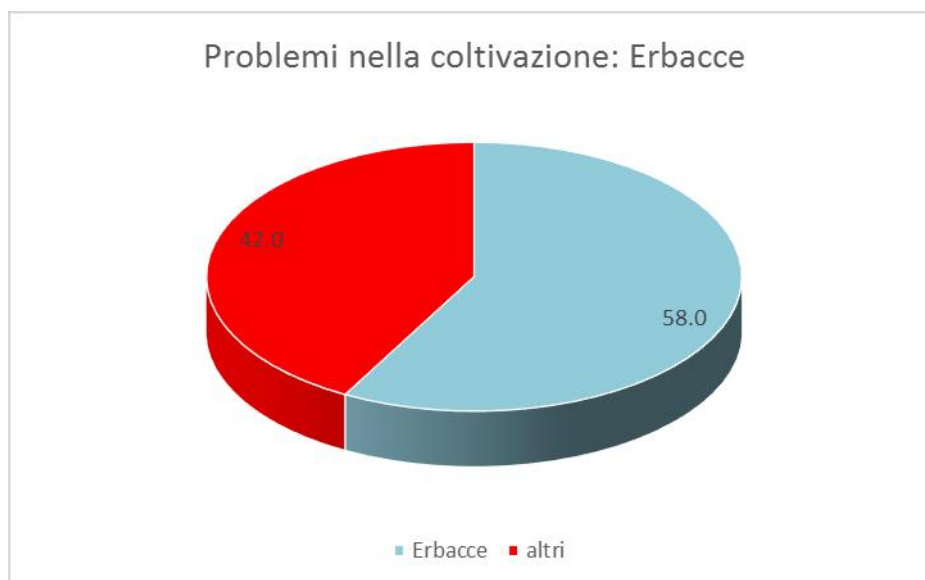


Figura 3.22. Problemi durante la coltivazione del mais.

- c) **Parassiti:** il 71,6% dei produttori (Figura 3.23) riporta perdite nella produzione a causa di parassiti come il tarlo del mais, che colpisce il mais vitreo nativo più del mais ibrido dentato. Solo il 28,4% ha indicato di non avere problemi con i parassiti. Anche il rapporto MINAM (2013) indica che i problemi di parassiti risultano essere importanti per ottenere un buon raccolto ed evidenziano che il 51,2% ha problemi con il lombrico, il 39,5% con *Spodoptera frugiperda* e il 4,6% con altre specie di parassiti; mentre il 4,7% ha detto di non avere problemi con i parassiti. L'86% applica tuttavia prodotti chimici.

**Problemi con le malattie,** il 98,8% ha riferito di non avere problemi con le malattie e quindi non ritiene che sia importante tenerne conto, Figura 3.24, mentre solo l'1,2% ha indicato che le loro coltivazioni sono state colpite da agenti patogeni, anche se non specificano quali sono le principali malattie. Anche se l'indagine non rivela un problema forte di malattie e di parassiti, nelle visite agli appezzamenti abbiamo verificato che c'è un grado molto alto di infezione con diversi virus, funghi e che la piralide del mais colpisce con maggiore intensità il mais vitreo nativo (Figura 3.25).

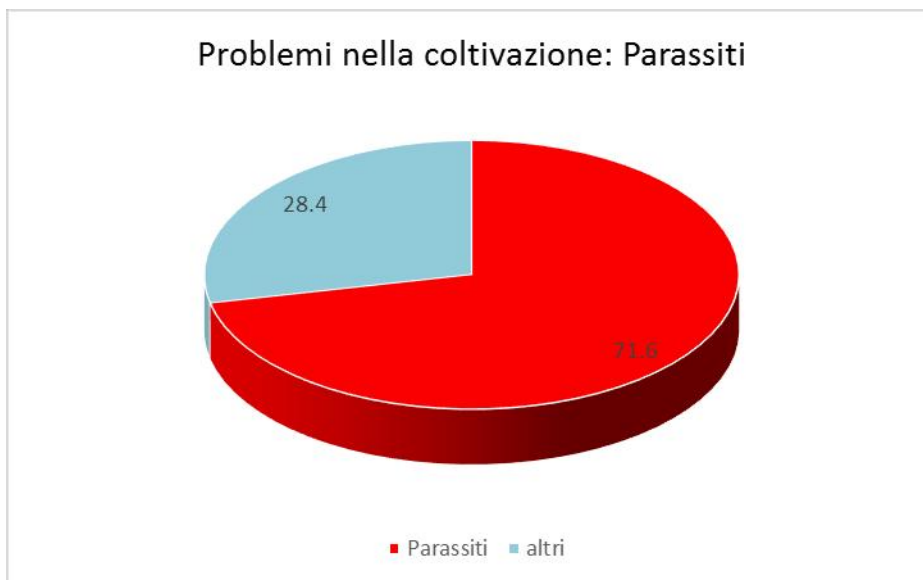


Figura 3.23. Problemi di coltivazione: i parassiti.

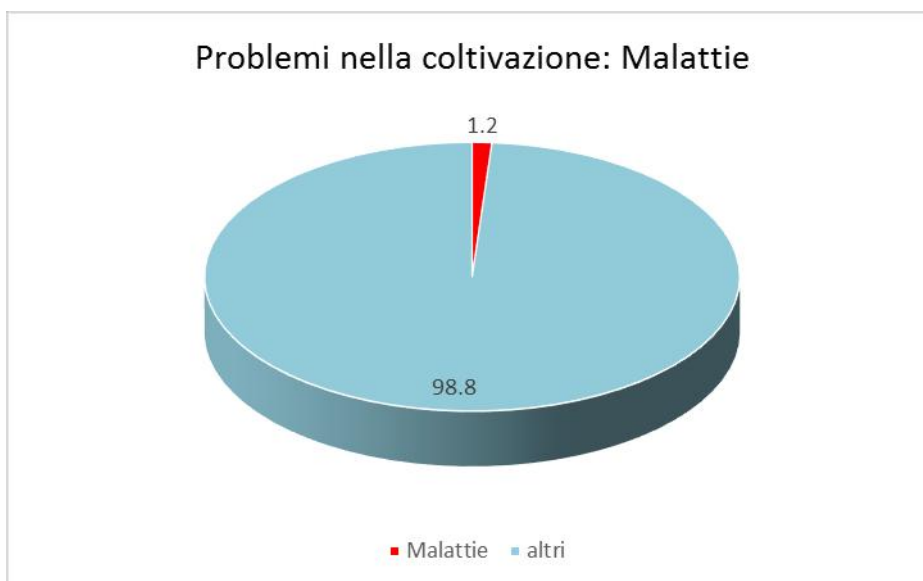


Figura 3.24. Problemi di coltivazione: le malattie.



Figura 3.25. Malattie virali (a) e (c), malattie fungine (b), (d) ed (e) e parassiti come la piralide del mais (f)



**4. Componente 3: Definizione di un modello di base e di criteri per verificare il flusso genico in appezzamenti di colture controllate.**

## 4.1 Obiettivi

### Obiettivo generale:

- Presentare un modello per testare l'incrocio naturale tra mais locale e ibridi dentati, per valutare i livelli di incrocio che si verificano a diverse distanze. L'amplificazione di una regione del gene per la colorazione dell'endosperma per il mais locale e ibridi dentati serve come modello per studiare l'incrocio del mais locale con gli ibridi dentati, senza usare ibridi transgenici vietati dalla legge di moratoria contro gli OGM in Perù.

### Obiettivi specifici;

- Stabilire due modelli per testare l'incrocio tra il mais ibrido dentato e quello autoctono nelle coste settentrionali e centrali
- Determinare le percentuali di incrocio a diverse distanze tra il mais ibrido dentato e quello nativo.
- Valutare le differenze tra mais bianco vitreo e ibridi dentati studiando i frammenti di amplificazione del gene per la colorazione dell'endosperma.

## **4.2 Materiali e metodi**

### **4.2.1 Materiali e metodi per i test di crossability**

#### **4.2.1.1 Posizione dei test di crossover**

Sono stati scelti due siti per le prove, uno situato sulla costa nord e l'altro sulla costa centrale.

Costa nord: Regione di Lambayeque, provincia di Lambayeque, distretto di Illimo, settore San Pedro de Sasape, in un terreno affittato dal signor Jaime Acosta Zuñiga con DNI 17547132, di 10.000 m<sup>2</sup>, latitudine 06°28'12.5", longitudine 79°52'59.2", altitudine 49 m.s.l.m.

Le condizioni climatiche della zona sono: direzione del vento prevalentemente da sud a sud-est con una velocità di 1,7 a 5,9 m/s in estate; 1,6 a 6,5 m/s in autunno; 2,5 a 7,5 m/s in inverno e 2,4 a 9,1 m/s in primavera. La media delle ore totali di sole accumulate in un anno è di 2509,8 ore. L'umidità relativa media annua è del 78,1%, la precipitazione media annua accumulata è di 3,1 mm, con una deviazione di 5,12 e un coefficiente di variazione del 167,59% spiegato dagli episodi del "El Niño" che si sono verificati in tempi diversi. La media annuale delle temperature massime e minime era di 25,9°C e 18,0°C rispettivamente.

Costa centrale: campus della Universidad Nacional Agraria La Molina, situato nella regione di Lima, distretto La Molina, latitudine 12°04'56.1", longitudine 76°57'16.6", altitudine 219 metri sul livello del mare. Estensione di 4.000 m<sup>2</sup>.

Le condizioni meteorologiche nel campo de La Molina Lima sono: velocità del vento durante l'anno variabile da 2,6 a 3,6 m/s. L'umidità relativa media annuale è del 77,7%, la precipitazione media annuale è di 0,0 mm e le temperature medie annuali massime e minime sono di 27,4°C e 14,3°C.

#### **4.2.1.2 Materiale vegetale per le prove di incrocio**

Nella prima prova (costa nord) sono stati scelti due tipi di mais vitreo: Chancayano e Pardo mentre la varietà DEKALB è stata utilizzata come ibrido dentato.

Nella seconda prova (costa centrale), sono stati scelti i mais vitrei Mochero e Alazán di Lambayeque e la varietà ibrida di mais ibrido dentato è stata sempre la DEKALB.

Sono stati analizzati più di 2000 chicchi di ogni varietà di mais.

##### **a) Progettazione di test di crossover**

Per la prova in condizioni di costa settentrionale, è stato proposto un disegno in un appezzamento di 10000m<sup>2</sup> mettendo il mais ibrido dentato in una striscia trasversale posteriore e poi il mais vitreo in due strisce parallele, in modo che il vento passasse dal mais dentato a quello nativo o locale. In questo modo, è possibile valutare il grado di incrocio a distanze di 1, 3, 5, 10, 15, 30 e 50m. Il diagramma del campo è mostrato in Figura 4.1.

### Test di crossability tra mais amidaceo e ibrido Dent nella costa nord (Lambayeque)

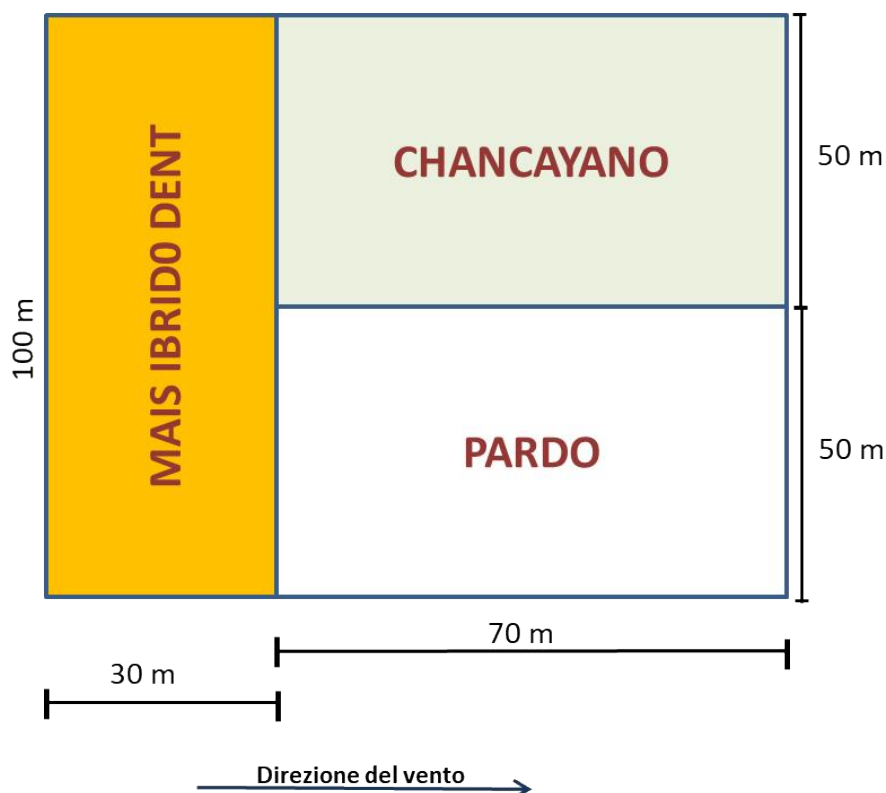


Figura 4.1. Schema di campo in Lambayeque nell'esperimento di incrocio tra mais locale e ibridi di mais dentato.

Per l'esperimento condotto sulla costa centrale, il disegno della parcella di 4000m<sup>2</sup> aveva la stessa disposizione della costa nord, con la differenza che la profondità della striscia di mais giallo era di 20 m e la larghezza di 80 m. Le strisce di mais nativo erano larghe 26 m x 30 m di profondità per il mais Alazán e 50 m per una profondità di 30 m per il mais Mochero. Questo criterio era basato sulla disponibilità dei semi. Le valutazioni sono state condotte alle stesse distanze della prova di Lambayeque. La Figura 4.2 mostra la disposizione dei diversi tipi di mais studiati. La raccolta delle pannocchie è stata fatta tagliando preventivamente le piante e lasciandole essiccare al sole nella stessa parcella per 5 giorni, poi, da ogni varietà, sono state prese da 7 a 15 pannocchie a caso per ciascuna delle distanze considerate. Il numero di grani gialli e bianchi formati dalle rispettive piante è stato quantificato.

**Test di crossability tra mais amidaceo e ibrido Dent nella costa centrale (Università Agraria)**

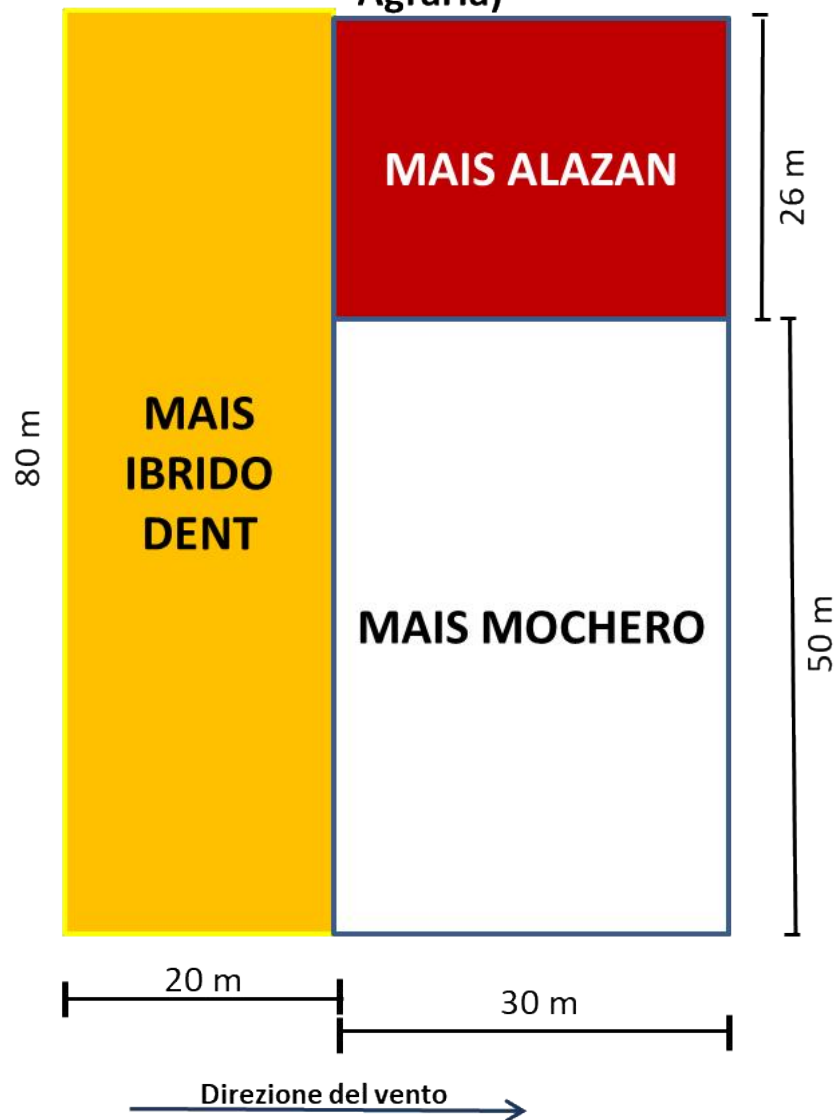


Figura 4.2. Schema di campo in La Molina, Lima dell'esperimento di incrocio tra mais locale e ibridi di mais dentati.

**b) Analisi statistica dei test di crossability**

Il programma Microsoft Excel è stato utilizzato per l'analisi del grado di crossability. Il grado di incrocio è stato determinato come il rapporto percentuale tra il numero di chicchi gialli rispetto al totale dei semi nelle spighe considerate di mais vitreo impollinato liberamente a una certa distanza.

## **4.2.2 Materiali e metodologia per l'analisi molecolare del locus PSY1.**

### **4.2.2.1 Valutazione PCR del locus PSY1**

Una ricerca delle sequenze riportate per il locus PSY1 in diverse varietà di mais è stata considerata, sulla base dello studio di Palaisa et al. (2003), al fine di identificare le regioni conservate che potrebbero essere utilizzate per studiare gli incroci tramite PCR e cercare eventuali differenze tra il mais vitreo e il mais ibrido dentato. Questo studio potrebbe permetterci di valutare gli amidi nativi che hanno aleurone colorato e che non ci permettono di apprezzare la presenza dell'endosperma giallo. Questo modello potrebbe essere utilizzato per studi di incrocio a fini di biosicurezza per mais autoctono come: Alazán, Piricinco, Canteño, Kculli, Cabanita, ecc.

### **4.2.2.2 Materiale vegetale**

Per questa parte dello studio, sono stati utilizzati gli stessi campioni di DNA di individui di mais vitreo e di ibridi dentati del gruppo di 28 popolazioni presentate nella componente di analisi della diversità genetica e costituite da Alazan (AB, AI, AT), Mochero (MB, MMA, MMB, MT), Chancayano (CYB, CYI), Canteño (CB), Cusco Gigante (CGB), Huancavelicano (HUB), San Geronimo Huancavelicano (SGH), Kculli (K), Piricinco (PI), ibridi dentati Pioneer I, II e III (HA, HB, HC), ibridi dentati INIA I, II, III, IV e V (da HD a HI). Le reazioni PCR sono state preparate individualmente e anche in gruppi di 5 individui.

Successivamente, il test è stato ripetuto con gli stessi primer sul DNA dei nuovi campioni nelle 9 popolazioni che sono state incorporate per lo studio della diversità genetica e consistevano di mais vitreo: Alazan (ABU), Mochero ((MBU), Chancayano (CYU), Canteño (CBU), Cusco Gigante (CGBU), San Geronimo Huancavelicano (SGHU), Piricinco (PIU) e di mais ibrido dentato PMX5 (HJ) e DeKalb 70800-7500 (HK).

Il DNA è stato ottenuto come descritto negli studi di caratterizzazione molecolare della componente 1 di questa ricerca, vedi paragrafo 2.2.2.

#### 4.2.2.3 Disegno di primer per il locus PSY1

La ricerca di sequenze legate al locus PSY1 ha permesso di identificare 59 sequenze per il gene PSY di *Zea mays*. Nella regione conservata nell'allegato III.2 è stata identificata la regione che è stata utilizzata per il disegno dei primer da studiare.

#### 4.2.2.4 Amplificazione PCR con primer del locus PSY1:

La miscela di reazione per l'analisi PCR è stata preparata ed era composta da: dNTPs 0.2 mM; primer a 3.75 ng/μl ; 10ng di DNA genomico; 1X DNA Taq polimerasi in tampone [Tris 900 mM, NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 200mM], MgCl<sub>2</sub> [2.5mM], acqua distillata è stata aggiunta per arrivare al volume di 10 μl. La Tabella 4.1 contiene i componenti e le concentrazioni della reazione PCR.

Il programma di amplificazione utilizzato e dettagliato nella Tabella 4.2 ha preso in considerazione i valori di T<sub>m</sub> per i primer proposti da IDT (Integrated DNA Technologies INC). Il DNA amplificato è stato separato mediante elettroforesi orizzontale su gel di agarosio al 2,0% in tampone TBE 1X.

**Tabella 4.1. Componenti della miscela di reazione PCR**

<b>Componenti [iniziale]</b>	<b>Concentrazione finale</b>
Buffer Taq DNApol 10X [Tris base 900mM + NH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 200mM	1X
MgCl <sub>2</sub> [25mM]	2.5 mM
DNA genomico	10 ng
dNTPs [2.5 mM]	0.2 mM
Primer Forward [50 ng/μl]	3.75 ng/μl
Primer Reverse [50 ng/μl]	3.75 ng/μl
Taq DNA pol [5U/μl]	1 U
Acqua distillata ultra pura	q.b.
Volume finale	10 μl



**Tabella 4.2. Programma di amplificazione PCR**

<b>Passo</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Tempo</b>	<b>Cicli</b>
<b>Denaturazione</b>	95	3 min	1X
<b>Denaturazione</b>	95	30 sec	
<b>Appaiamento</b>	58-49	30 sec	10X
<b>Estensione</b>	72	1.5 min	
<b>Denaturazione</b>	94	30 sec	
<b>Appaiamento</b>	48	30 sec	25X
<b>Estensione</b>	72	1.5 min	
<b>Fine</b>	10	∞	1X

#### **4.2.2.5 Analisi statistica del test molecolare del locus PSY1.**

I programmi di analisi di sequenza Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Bioedit SequenceAlignment Editor 7.0 e Primer 3 sono stati utilizzati per la valutazione delle zone di consenso nel locus PSY1.

## 4.3 Risultati

### 4.3.1 Risultati delle prove di incrocio in Lambayeque

Come si può vedere nelle Figure 4.3, 4.5 e 4.6 il mais tipo Pardo ha i livelli più alti di incrocio rispetto al Chancayano ad una distanza di 1 metro (67,80% contro 45,14%). Tuttavia, per le altre distanze, i valori di incrocio per i due tipi di mais sono risultati abbastanza simili tra loro, come si apprezza nella spaziatura di 3 metri, dove entrambi i tipi di mais (Chancayano e Pardo) hanno presentato valori di incrocio del 21,70% e 21,07% rispettivamente. All'aumentare della distanza, la percentuale di incrocio diminuisce fino a quando, a distanze di 30 metri, la percentuale si riduce a valori molto piccoli, meno dell'1%, che potrebbero essere considerati trascurabili (0,41% e 0,17%). Ad una distanza di 50 metri i valori registrati erano rispettivamente 0,04% e 0,13%.

Dall'analisi dei risultati possiamo sottolineare che, se le parcelle fossero separate da più di 80 o 100 metri, l'incrocio tra il mais vitreo (Pardo e Chancayano) e gli ibridi dentati dovrebbe essere nullo. Le Figure 4.4 e 4.7 mostrano le spighe di mais Pardo e Chancayano a diverse distanze e la presenza di chicchi gialli, che indicano la presenza di incroci. La Figura 4.8 mostra i chicchi separati in base alla presenza o meno di endosperma giallo.

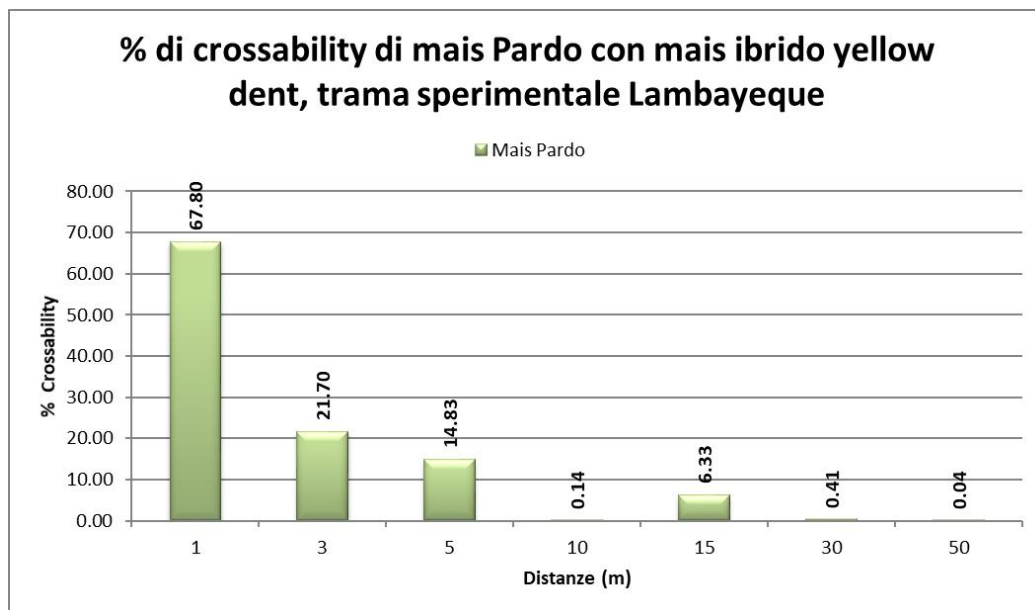


Figura 4.3. Percentuali di incrocio tra mais Pardo e mais ibrido all'aumentare della distanza, campo di Lambayeque.



Figura 4.4. Pannocchie di mais Pardo con grani bianchi e gialli ottenute a diverse distanze dal mais ibrido dentato in Lambayeque.

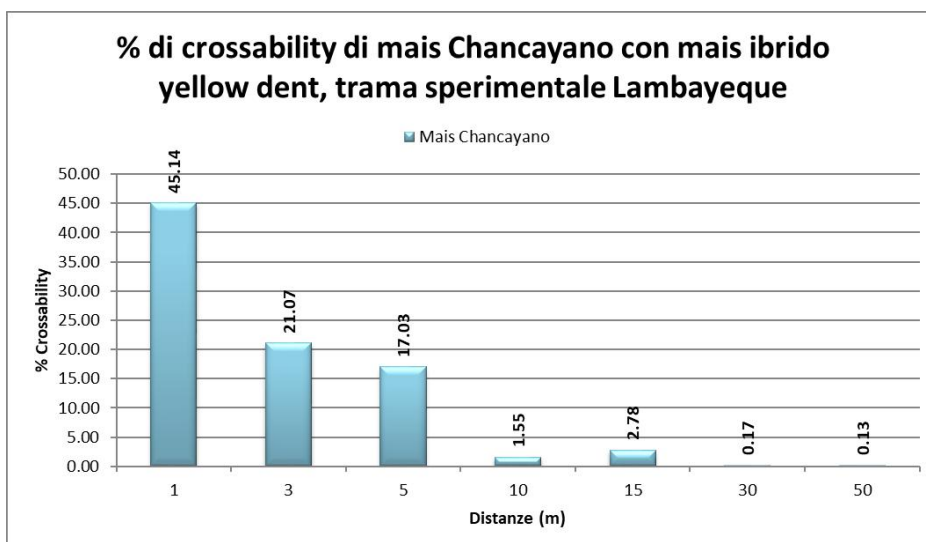


Figura 4.5. Percentuali di incrocio tra mais Chancayano e mais ibrido all'aumentare della distanza, campo di Lambayeque.

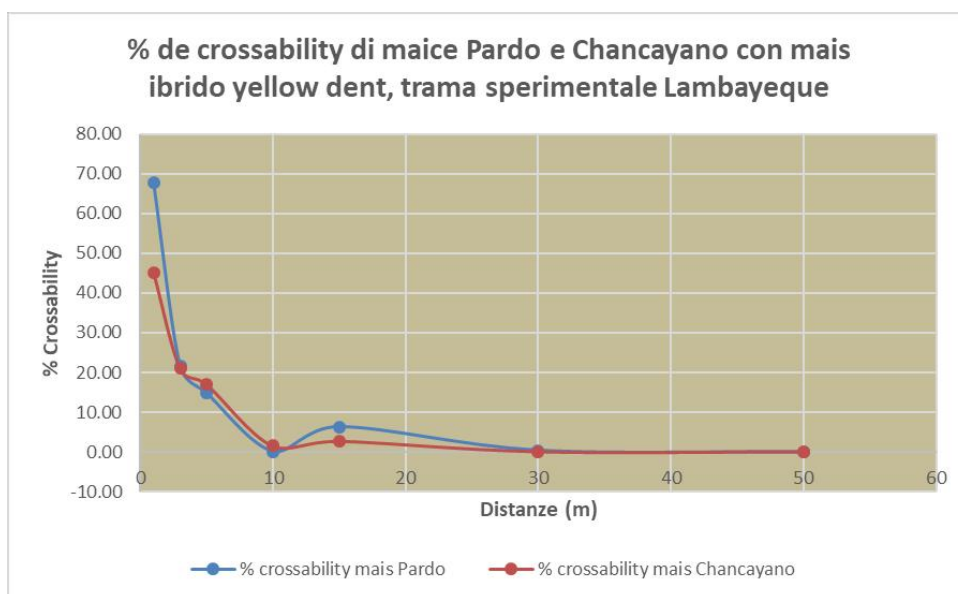


Figura 4.6. Confronto delle percentuali di incrocio tra il mais Pardo e Chancayano con gli ibridi dentati in Lambayeque.



Figura 4.7. Pannocchie di mais Chancayano con grani bianchi e gialli ottenute a diverse distanze dal mais ibrido dentato.



Figura 4.8. Grani bianchi e gialli di una pannocchia di mais Chancayano

#### 4.3.2 Risultati delle prove di incrocio a Lima - La Molina

Nell'appezzamento di Lima (La Molina, Figura 4.9), abbiamo notato che il mais Alazán ha mostrato un maggior grado di incrocio rispetto al mais Mochero (Figure 4.10 e 4.13). Per esempio, a 1 metro di distanza, il mais Alazan ha mostrato il 9,58% di incrocio, mentre il mais Mochero ha mostrato solo lo 0,93%; questi valori sono inferiori a quelli trovati nella prova di Lambayeque. Ad una distanza di 3 metri, il grado di incrocio è diminuito nell'Alazan al 5,44%, raggiungendo un valore di 2,70% ad una distanza di 10 metri. Per distanze maggiori, sono stati osservati valori del 2,43% a 15 m e dello 0,27% a 30 m.

D'altra parte, il mais Mochero ha sempre mantenuto valori molto bassi di incrocio: 0,55%, 0,43%, 0,29% e 0,05% per distanze di 5, 10, 15 e 30 metri rispettivamente.

La Figura 4.14 mostra graficamente come il mais Alazan può incrociarsi più facilmente del Mochero a parità di distanza. Tuttavia, a causa della colorazione rossastra dei chicchi del mais Alazán (Figure 4.11,4.12, 4.15 e 4.16) è difficile distinguere i chicchi che sono stati incrociati con il mais ibrido. Questo problema non si pone nel caso del mais Mochero che è bianco. Per questo motivo, abbiamo dovuto sezionare i chicchi per verificare la colorazione dell'endosperma.



Figura 4.9. Campo sperimentale per l'incrocio di mais locale e ibridi dentati a La Molina, Lima in diversi momenti della coltivazione del mais.

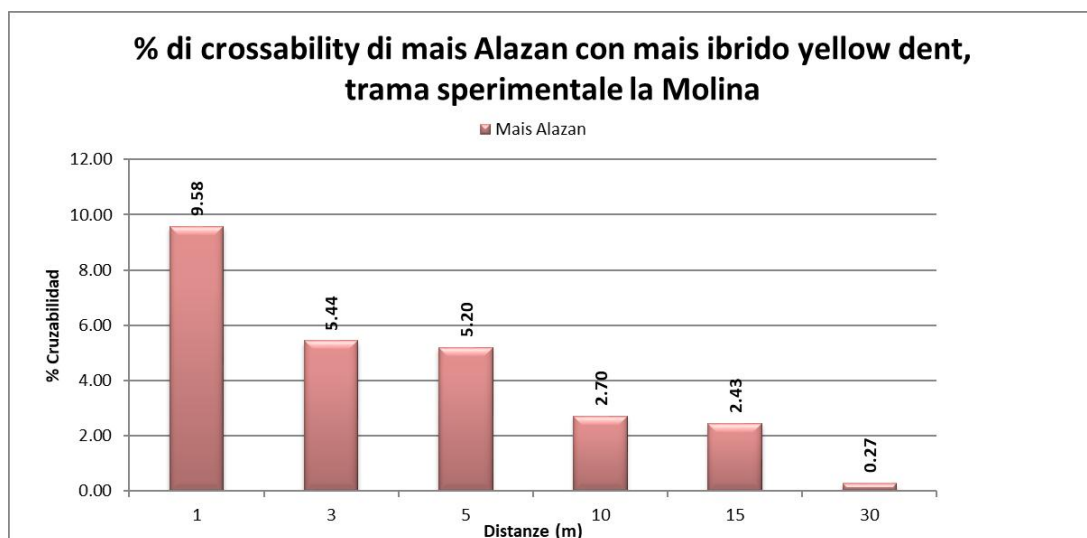


Figura 4.10. Percentuali di incrocio tra mais Alazan e mais ibrido all'aumentare della distanza, campo La Molina, Lima



Figura 4.11. Pannocchie di mais Alazan con grani rossi e gialli a 1 m di distanza dal mais ibrido dentato.



Figura 4.12. Pannocchie di mais Alazan con grani rossi e gialli a 5 m di distanza dal mais ibrido dentato. Quello bianco è di mais Mochero

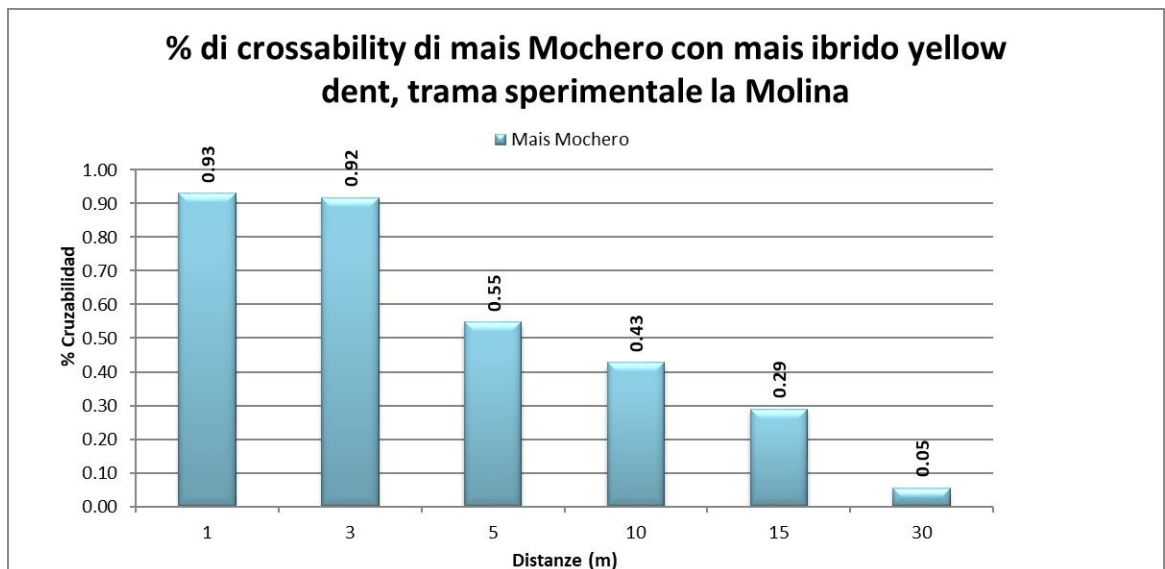


Figura 4.13. Percentuali di incrocio tra mais Mochero e mais ibrido all'aumentare della distanza, campo La Molina, Lima



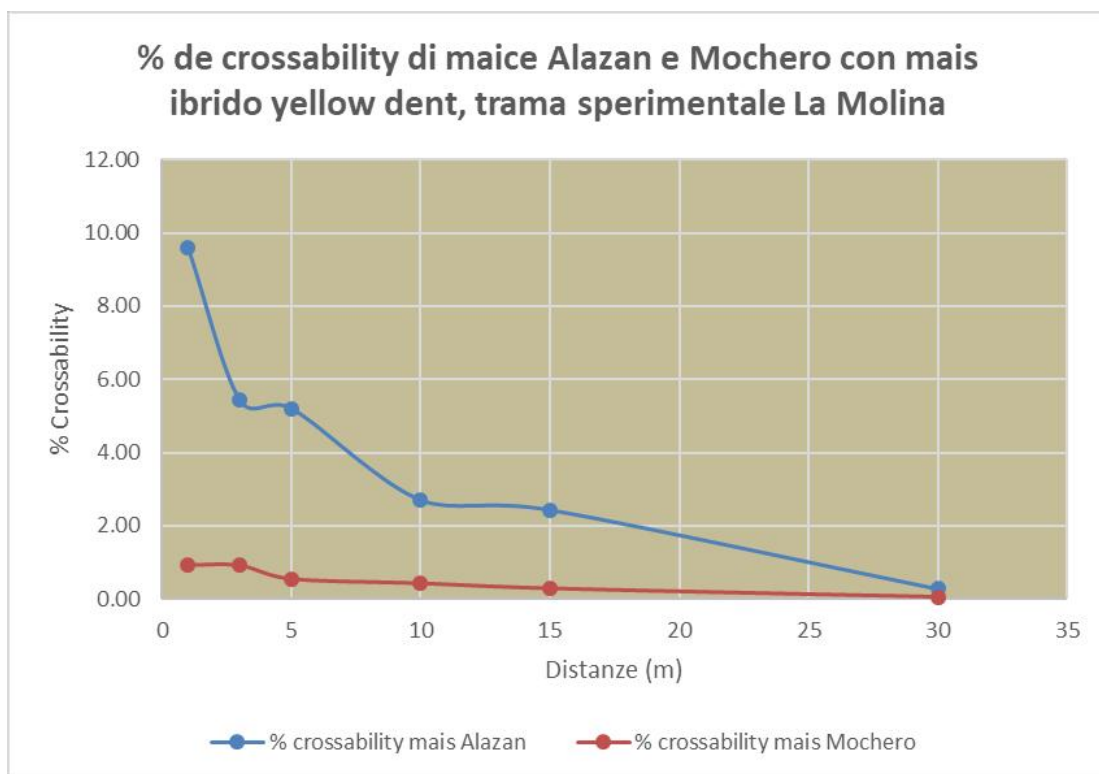


Figura 4.14. Confronto delle percentuali di incrocio tra il mais Alazan e Mochero con gli ibridi dentati in La Molina, Lima.



Figura 4.15. Pannocchie di mais Mochero con grani bianchi e nessun grano giallo visibile a 3 m di distanza dal mais ibrido dentato. Quello rosso è il mais Alazan.



Figura 4.16. Pannocchie di mais Mochero con grani bianchi e nessun grano giallo visibile a 10 m di distanza dal mais ibrido dentato.

#### 4.3.3 Risultati dei test molecolari al locus PSY1

Secondo l'analisi della regione di consenso del locus PSY1, che ha una lunghezza di 7841 bp (allegato III.2), le 59 sequenze ottenute per il mais sono state analizzate (Figura 4.17) per scegliere 3 primer per l'analisi PCR. Due di questi primer sono stati riportati e studiati da Palaisa et al. (2003) (Y1-F, Y2-R) in uno studio sull'effetto della selezione al locus Y1, confrontando mais bianco e giallo. Il terzo primer è stato progettato e presentato in questo studio (Y3-R).

Con i tre primer sono state formate due combinazioni (Y1-F con Y2-R e Y1-F con Y3-R) per rilevare la presenza di endosperma giallo nel mais vitreo, a seguito di incroci con ibridi dentati. Le sequenze di questi primer sono presentate nella Tabella 4.3.

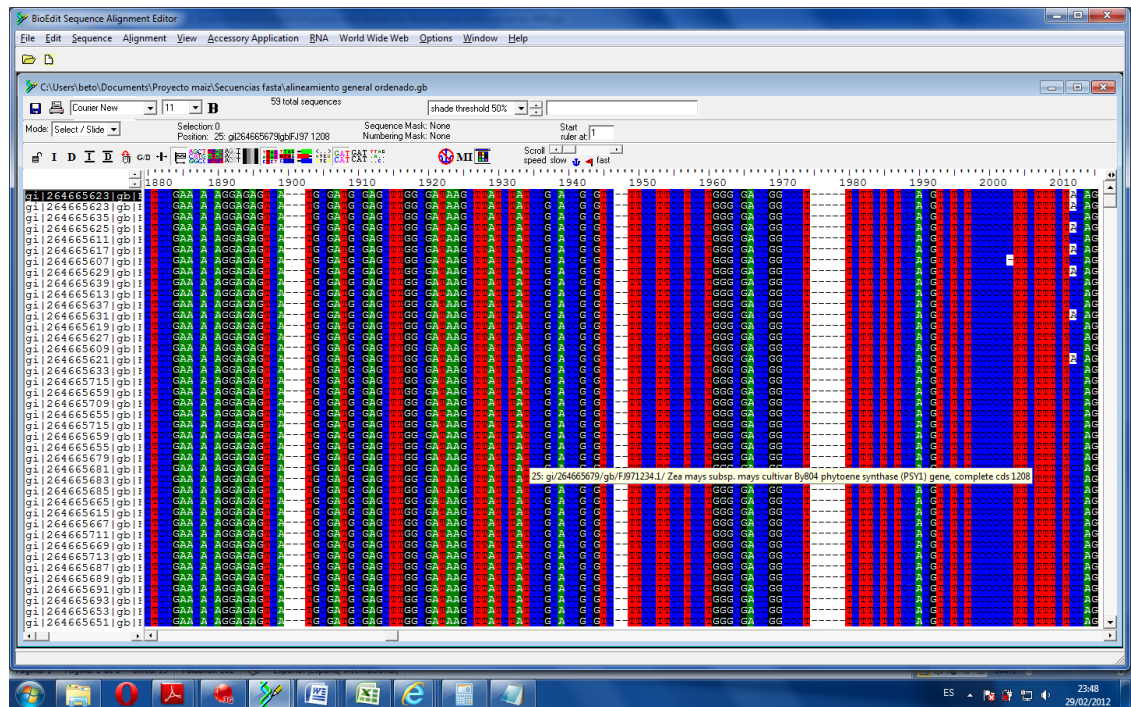


Figura 4.17. 59 sequenze di DNA del locus Y nel mais ottenute dalla Gene Bank e allineate con il software BioEdit.

Tabella 4.3. Primer della zona di consenso del locus PSY1

Primer	Verso	Sequenza (5'→3')	N° nt	% GC	Tm (°C) (Sigma)	Temperatura di appaiamento (°C)	Posizione nella regione consenso
Y1 F	F	CTTCTCTCCACGTCTCTCC	19	57.89	54.84	52	1981
Y2 R	R	ACCAGTCAGCAGAACAGC	18	55.56	54.62		2851
Y3 R	R	TGGCCATATATTTGCTATC TTATCC	25	36	62.7		2935

Nelle prove di amplificazione con il DNA di ogni individuo e con i campioni in bulk, sono stati ottenuti sempre due frammenti dai campioni di mais locale caratterizzato da un endospermo bianco, come nel caso del mais Mochero, Alazan, Chancayano, ecc, del primo gruppo di 28 popolazioni e anche nei campioni che sono stati aggiunti per costituire le 37 popolazioni; tuttavia, questi frammenti amplificati non erano

presenti nel mais ibrido. Uno dei frammenti è lungo circa 97 bp e l'altro è lungo circa 120 bp. Nelle figure 4.18, 4.19 e 4.20 si osservano le elettroforesi di questi frammenti nei campioni individuali e nei bulk di mais Alazan, Mochero, Chancayano e Canteño, in contrasto con i campioni degli ibridi di mais dentato, dove non c'era alcuna evidenza di amplificazione.

Al fine di stabilire criteri appropriati per il processo decisionale sulla biosicurezza, considerando che, in Perù, la legge di moratoria per impedire l'ingresso di semi OGM è stata estesa per 15 anni a partire dal 2020. Si propongono ulteriori studi su questi frammenti di amplificazione trovati al locus Y1, in modo che possano essere considerati per prove controllate e valutazioni di incrocio che coinvolgono il mais ibrido dentato con le varietà locali peruviane che hanno endosperma colorato o viola, come Canteño (attualmente esportato), Piricinco, ecc., la cui qualità è la presenza di aleurone colorato o viola e in cui non è possibile osservare la presenza di grani con endosperma giallo che presentano l'effetto noto come "Xenia". In questo modo, sarà possibile stabilire con maggiore precisione i criteri per separare il mais locale da quello ibrido, soprattutto in luoghi dove la maggior parte degli agricoltori ha piccoli appezzamenti di terreno (circa 0,5-2 ettari).

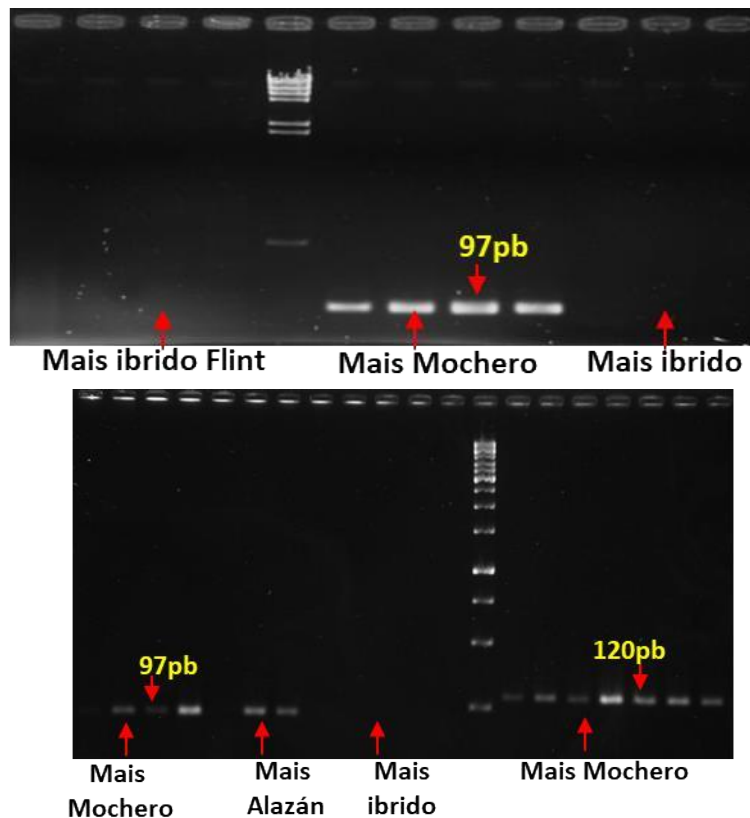


Figura 4.18. Frammenti di DNA di 97 bp e 120 bp del locus Y1 in mais locale e ibridi dentato: Mais Mochero (MB), Alazan (AB), ibrido (HA), (HD) e (HI).

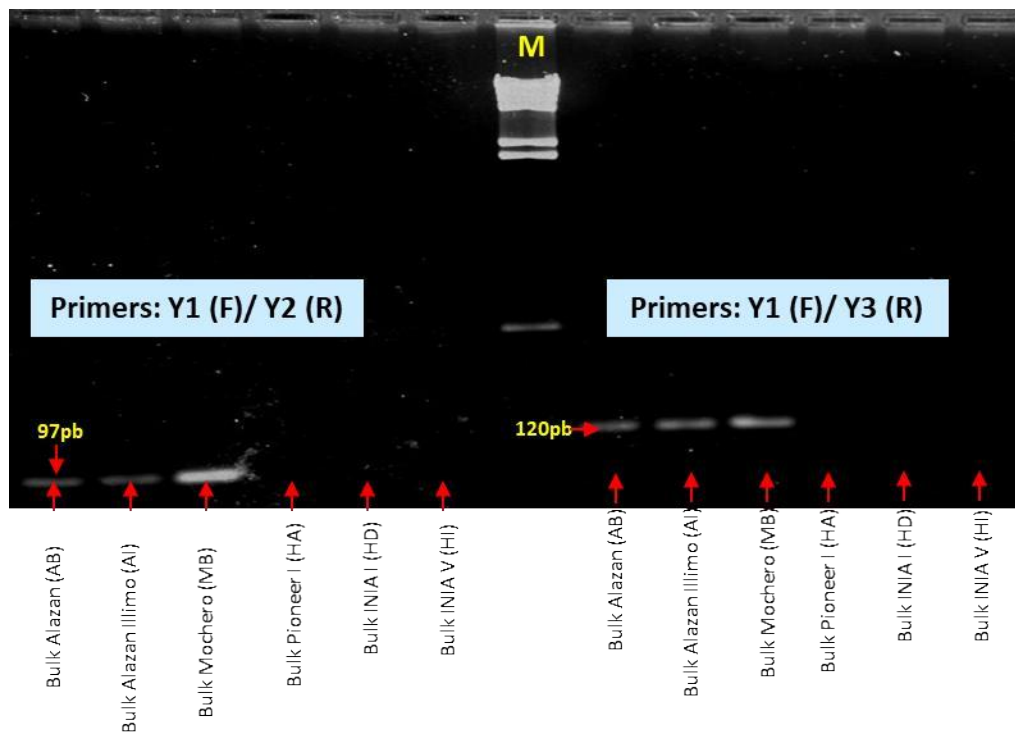


Figura 4.19. Frammenti di DNA di 97 bp e 120 bp del locus Y1 in bulk di mais locale e ibridi dentati: Alazan (AB), Alazan (AI), Mochero (MB), ibrido (HA), (HD) e (HI).

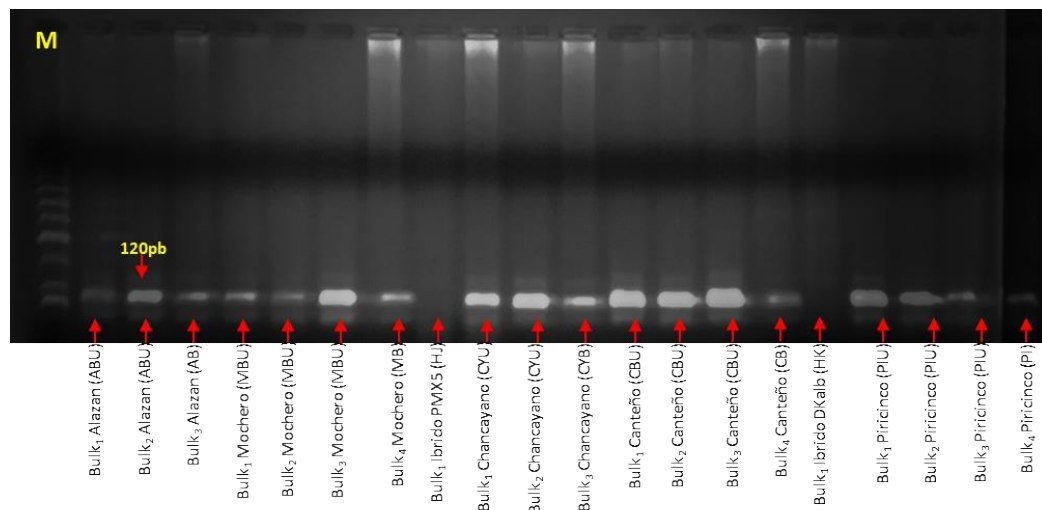


Figura 4.20. Frammenti di DNA di 120 bp del locus Y1 in bulk di mais locale e ibridi dentati: Alazan (ABU e AB), Mochero (MBU e MB), Chancayano (CYU e CYB), Canteño (CBU e CB), ibridi (HJ e HK).

## **5 Discussione della ricerca**

## 5. Discussione della ricerca

Nel nostro studio, abbiamo registrato un totale di 76 alleli diversi per gli 8 loci in tutte le popolazioni di mais, che rappresentano una media di 9,5 alleli per locus. Questi valori sono comparabili con altri studi come Pineda-Hidalgo et al. (2013) che hanno riportato una media di 6,1 alleli per locus in uno studio in cui hanno analizzato 28 accessioni di mais da Sinaloa (Messico) con 20 SSR per un totale di 396 individui.

Lo studio presentato da Vigouroux et al. (2005) ha confrontato la diversità genetica tra 45 individui di 2 tipi di teosintes e 45 individui di mais locale usando un numero molto grande di loci SSR (462). Gli autori hanno trovato un maggior numero di alleli e diversità nei teosintes (11,8 e 0,74) rispetto al mais (9,0 e 0,64), spiegando questi risultati con il verificarsi di un collo di bottiglia durante la domesticazione, a causa della selezione positiva che potrebbe essere stata applicata, secondo dedotto dal test di Ewens-Watterson. Altri studi, come quello presentato da Bitocchi et al. (2015), hanno utilizzato diversi test di selezione per identificare gli effetti dell'evoluzione di varietà locali di mais in 50 anni di coesistenza con ibridi moderni, identificando regioni che sono state selezionate nelle varietà locali a seguito di introgressione dagli ibridi moderni (selezione recente) e regioni che differenziano maggiormente le varietà locali vitree dalle varietà moderne (dentate), segno di una selezione più antica che ha portato alla separazione di mais vitreo e dentato.

Nel nostro studio, abbiamo eseguito il test di neutralità Ewens-Watterson per analizzare come questi loci sono stati espressi (neutri o influenzati dalla selezione). Abbiamo valutato l'intero set di 28 popolazioni e abbiamo anche analizzato separatamente il mais vitreo locale e gli ibridi dentati. Abbiamo trovato che per tutte le 28 popolazioni 3 degli 8 loci hanno valori al di fuori dei limiti di accettazione dei loci neutri ipotizzati; Questi risultati suggeriscono che la selezione potrebbe operare nelle popolazioni di mais in modo diverso a causa forse delle diverse gestioni dei semi, nel mais locale c'è infatti una forte componente di scambi di semi, molta informalità nella fornitura di semi, generando più mescolanza. Questo fatto porterebbe queste popolazioni ad essere più vicine all'equilibrio Hardy-Weinberg, mentre gli ibridi sono prodotti in modo controllato per mantenere fisse le loro caratteristiche produttive.

I loci ZM33 e ZM37 sono stati quelli a mostrare l'azione della selezione nel mais vitreo locale, anche se con un effetto molto basso. Per gli ibridi dentati, l'azione di selezione non si osserva sugli stessi loci ma sui loci ZM15 e ZM27, di cui il secondo mostrerebbe un maggiore effetto di selezione, forse spiegato dalla maggiore richiesta selettiva dei suoi caratteri nell'ottenimento di semi.

Vigouroux et al. (2008) in uno studio più ampio di quello condotto da Matsuoka (2002),

hanno trovato un numero maggiore di alleli per il mais di origini diverse; per questo, hanno analizzato circa 350 razze di diversi paesi dell'America centrale e meridionale con 96 loci SSR, registrando valori medi di 12,4 e 14,9 alleli per locus. Lia et al. (2009) hanno analizzato la variazione e la struttura della popolazione in 6 razze di mais argentino con 18 SSR per un totale di 147 individui, registrando una media di 10,2 alleli per locus. In un altro studio con il mais argentino Bracco et al. (2013) hanno trovato una media di 12,8 alleli per locus per un totale di 15 loci SSR.

Nel mais introdotto adattato alle zone di alta quota tra 1500 e 2700 metri in Etiopia, Beyene et al. (2006) hanno trovato una media di 4,9 alleli e una dissimilarità genetica di 0,49 in 62 accessioni analizzate con 20 SSR; questi valori sono inferiori a quelli riportati da noi e a quelli presentati negli studi sul mais messicano e in America Latina dove è riportata una maggiore diversità genetica.

Nei mais Dent e Flint dell'area balcanica (Serbia) Ignjatovic-Micic et al. (2015) hanno utilizzato 18 accessioni da 18 località, con gruppi di 30 piante, hanno testato 10 coppie di primer SSR e sono riusciti a trovare un numero medio di alleli (6,2 per Dent e 5,6 per il mais Flint). In altri mais introdotti in Africa e adattati alle condizioni estreme del Sahara, hanno valutato materiali tolleranti allo stress con 18 SSR, dove più del 93% erano polimorfici, con un totale di 87 alleli con una media di 5,8 e una diversità genica di 0,57.

Possiamo quindi sottolineare che il nostro studio identifica una buona dotazione allelica per ciascun locus studiato. Inoltre, abbiamo analizzato come questi alleli siano distribuiti per gruppi di mais, identificando che il mais della costa settentrionale del Perù (Alazán, Mochero, Chancayano e Chaparreo, che si trovano nella costa centrale) presenta 65 alleli diversi negli 8 loci, di cui 9 esclusivi per questi mais, assenti nel mais degli altipiani o negli ibridi dentati. Il numero di alleli diversi osservati nel mais dell'altopiano negli 8 loci è stato di 60, di cui solo 4 erano esclusivi per questo mais. Va notato tuttavia che questi risultati corrispondono al mais della banca del germoplasma dell'Università Agraria.

Nel caso del mais ibrido dentato, il numero di alleli diversi registrati erano 46 negli 8 loci, 6 dei quali erano esclusivi e non erano presenti nel mais locale studiato. La presenza di alleli specifici è più difficile nel mais perché è una coltura allogama; tuttavia, siamo stati in grado di identificare un certo numero di alleli che non erano ripetuti nei due gruppi di mais (locali vitrei e ibridi dentati), così come tra mais costiero e altopiano. Per identificare più chiaramente questi alleli specifici, lo studio condotto da Liu et al. (2003) ha utilizzato 94 loci



studiati e 260 linee inbred, trovando un alto numero medio di alleli SSR (21,7) ed un alto numero di alleli totali (2039). Tra questi sono stati trovati 556 alleli specifici e la diversità genetica per il gruppo era 0,81.

Per quanto riguarda i livelli di diversità genetica trovati nel nostro studio, abbiamo riportato che il mais Mochero era leggermente più diversificato rispetto al mais Alazan, tuttavia, entrambi i tipi razziali hanno presentato livelli più elevati di diversità genetica rispetto al mais Chancayano. Questo comportamento è stato descritto anche nelle relazioni del progetto LAC Biosafety (Lac Biosafety, 2012) e da Quispe (2014).

In generale, il mais costiero peruviano studiato ha mostrato un grado di diversità genetica più alto rispetto al mais dell'altopiano andino che cresce principalmente sopra i 2000 metri. Il valore medio di diversità genetica osservato nel gruppo di mais della pianura e della costa (come i mais Alazán, Mochero, Chancayano, Chaparreño e Piricinco della giungla) è stato del 51,17% contro il 50,2% che è stato registrato nel mais degli altipiani. D'altra parte, l'eterozigosità attesa di Nei o l'indice medio di diversità genetica per il gruppo di pianura è stato 71,42% contro il 63,35% per il mais dell'altopiano (Tabella 2.34). Le Figure 2.35, 2.36, 2.37, 2.38 e 2.39 della componente 1 di questa ricerca ci permettono di verificare questa tendenza di diversità inferiore da parte del mais dell'altopiano.

Questo comportamento in termini di diversità del mais locale degli altipiani delle Ande rispetto a quelli che vivono in zone più basse, contrasta con altri studi pubblicati. Roncadio-Rodriguez et al. (2014) hanno studiato 107 accessioni di 7 razze dagli altipiani del Messico, trovando che questi mais hanno una diversità genetica attesa media pari a 0,71 (71,0%), diversi rispetto al mais delle pianure. In modo simile, lo studio di Lia et al. (2009) ha trovato una diversità genetica media di 0,57. Tuttavia, in entrambi gli studi, la diversità genetica nel mais d'altura aveva valori più alti rispetto al mais di pianura. Potremmo spiegare questo comportamento nei modelli di diversità utilizzati, dato che nel nostro studio abbiamo analizzato un maggior numero di popolazioni (non solo della banca di germoplasma) del mais costiero, ma anche della zona di Lambayeque, dove abbiamo registrato un'intensa contaminazione durante la gestione dei semi.

La difficile geografia degli altipiani, la dipendenza in molti luoghi dalla stagione delle piogge, la mancanza di canali d'irrigazione e il lungo ciclo vegetativo del mais d'alta quota, che dura da 6 a 9 mesi, generando un raccolto all'anno, sono tutte possibili ragioni per spiegare

questa minore diversità. Quando si analizza un numero maggiore di mais provenienti da zone diverse, tra cui il centro di origine e i centri di diversificazione, i livelli di diversità genetica aumentano, ma in media sono simili ai nostri risultati. Nello studio di Vigouroux et al. (2008) i risultati mostrano livelli molto alti di diversità genetica che variano da 0,70 a 0,81.

In Perù, l'identificazione delle razze di mais è stata fatta negli anni '60 ed era basata su valutazioni morfologiche, geografiche e di uso culturale come si è visto nello studio pubblicato da Grobman et al. (1961). Successivamente, altri studi sono stati sviluppati come quelli di Ortiz et al. (2008a e 2008b). Tuttavia, dagli anni '80, con l'espansione delle tecniche di analisi genetica basate sul DNA, non sono stati sviluppati studi con marcatori molecolari per determinare lo stato della diversità razziale del mais locale, nonostante il fatto che la zona andina sia considerata un grande centro di diversità razziale. Data questa mancanza di informazioni, proponiamo, attraverso il progetto LAC Biosafety, di avviare questi studi in modo che possano essere applicati in aspetti di biosicurezza, tenendo conto che il Perù ha approvato nel 2011 una moratoria fino al 2035 sull'ingresso di organismi geneticamente modificati, per sviluppare studi a sostegno delle valutazioni di rischio; inoltre, in tutta la regione del Sud America, c'è una maggiore estensione delle aree coltivate con mais e soia GM.

Dal progetto LAC Biosafety (2012) abbiamo ottenuto lo studio di Quispe (2014), dove viene presentato lo stato di diversità in alcune popolazioni delle razze e che sono state ampliate nel presente studio. I nostri risultati contrastano con la quantità di studi realizzati in altri luoghi come il Messico, Argentina (Matsuoka, 2002; Vigouroux et al., 2008; Herrera-Saucedo, 2018; Lia, 2009, tra gli altri), dove le analisi sono state svolte utilizzando i bulk di DNA di diversi individui; al contrario, noi abbiamo analizzato i pattern allelici nelle popolazioni prendendo in considerazione ogni individuo come un genotipo.

Per conoscere lo stato di concordanza allelica tra il mais della banca del germoplasma e quelli coltivati in Lambayeque, abbiamo pensato di fare dei confronti. Pertanto, abbiamo effettuato le valutazioni del mais Alazan dalla banca del germoplasma dell'Università e dal Lambayeque, dove non c'era un'alta concordanza nella composizione allelica. Abbiamo registrato che su un totale di 53 alleli diversi per le 3 popolazioni (AB, AI, AT) negli 8 loci SSR, 29 coincidevano tra le popolazioni, una coincidenza del 54,72% di alleli comuni. Nel caso delle popolazioni di mais Mochero, su 59 alleli diversi registrati per le 4 popolazioni (MB, MMA, MMB, MT) negli 8 loci, 23 erano coincidenti, corrispondenti a una coincidenza del 38,98%; mentre per il mais Chancayano, abbiamo registrato 37 alleli nelle 2 popolazioni

(CYB, CYI) per tutti i loci, ma 17 erano comuni, rappresentando una coincidenza del 45,95%. Nell'ambito del progetto LAC Biosafety, Quispe (2014) ha riportato che c'era poca coincidenza nella corrispondenza allelica. In questo studio abbiamo quantificato questa caratteristica.

Per quanto riguarda lo stato della diversità genetica tra i mais Alazan, Mochero e Chancayano, l'unico studio realizzato da Quispe (2014) ha riportato che le popolazioni di questi mais non mostrano erosione genetica, poiché hanno alti indici di diversità. Espandendo questo studio, abbiamo verificato buoni livelli di diversità genetica e polimorfismo con valori che vanno da 0,70 (70,66%) a 0,59 (59,53%) e 100% di polimorfismo.

Anche se le aree dedicate alla coltivazione di questi tipi di razze (Mochero e Alazán) sono relativamente piccole e il numero di produttori è ridotto, secondo lo studio che abbiamo realizzato, intervistando questi agricoltori, diversi non piantano solo mais, ma anche altre colture che hanno una maggiore richiesta di consumo. Abbiamo scoperto che i produttori di mais autoctono sia sulla costa che sugli altipiani considerano che negli ultimi anni i giovani non mantengono più le abitudini dei loro antenati per quanto riguarda il mantenimento della coltivazione delle razze autoctone. La globalizzazione sta influenzando fortemente le abitudini alimentari, ci sono pochi giovani, figli dei produttori, che si preoccupano di mantenere la coltivazione delle razze autoctone.

Per il momento, sono i produttori più anziani che mantengono le usanze di produrre questi mais per uso alimentare come tamales, chicha o cancha (chicchi di mais secchi arrostiti); tuttavia, la coltivazione del mais locale è anche influenzata dalla presenza di colture economicamente più attraenti, poiché questi produttori migrano molto facilmente verso altre colture con prezzi più alti e maggiore facilità di commercializzazione.

Il MINAM (2019) nello studio di base che sta sviluppando per varie colture tra cui il mais, riferisce che negli anni '80 la piantagione di mais dentato cominciò a sostituire le coltivazioni di mais Alazan, poiché si cominciò a produrre la bevanda tradizionale "chicha de maíz" cambiando l'ingrediente dal mais Alazan al mais dentato, che è anche più commerciale del mais locale. Questo fatto ha portato alla scomparsa di questo mais nella zona e a causa della necessità di tornare all'input originale a causa della bassa qualità della chicha prodotta con il mais ibrido YDM, è stato necessario ripiantare la razza Alazan utilizzando un composto preparato con il germoplasma della banca della Universidad Nacional Agraria La

Molina (UNALM).

In realtà, nel nostro studio abbiamo trovato che i buoni livelli di diversità genetica per il mais Lambayeque possono essere spiegati dal movimento dei semi. L'agricoltore acquista le sementi dai mercati locali, dai grossisti (come la Moshoqueque a Lambayeque) o dai negozi locali di agrochimica e sementi. Successivamente, il raccolto viene commercializzato sotto forma di "mais fresco", grani secchi che vengono acquistati dai commercianti nei mercati. Quindi, è soprattutto il mercato il luogo dove si rimescola tutta la variazione generata durante l'impollinazione aperta che la coltura subisce.

Inoltre, abbiamo scoperto che alcuni produttori conservano i loro semi e li vendono ad altri per la semina. Questo modo di spostare il seme differisce da quello che succede nel mais autoctono degli altipiani, dove è evidente che ci sono più contadini che conservano i semi per le loro prossime stagioni di semina. Per esempio, ad Arequipa e a Cabanaconde, gli appezzamenti sono molto piccoli (tra 0,2 e 2 ettari circa) e diversi agricoltori hanno diversi appezzamenti in diverse località della zona di Cabanaconde e l'usanza è di ottenere sementi dall'appezzamento 1 per usarle nell'appezzamento 2 e viceversa.

Per quanto riguarda i parametri di diversità e differenziazione all'interno e tra il gruppo di mais nativi e gli ibridi, abbiamo notato che quando abbiamo analizzato tutte le popolazioni insieme, considerandole come una metapopolazione, la differenziazione quantificata attraverso l'indice  $F_{st}$  dell'AMOVA, è risultata del 24,43%, un valore considerato alto. La variazione maggiore era concentrata all'interno degli individui (71,48%). Abbiamo anche completato la stima dell'indice di differenziazione dalle frequenze alleliche utilizzando il programma POPGENE 1.32, ottenendo un  $F_{st}$  di 0,29 (29,76%), confermando così che questi insiemi di popolazioni sono differenziati tra loro. Allo stesso modo, quando abbiamo incluso le 9 popolazioni, ma considerando solo i 7 loci SSR, abbiamo di nuovo ottenuto una differenziazione molto alta tra le 37 popolazioni del 32,18% e l'indice di fissazione totale era 0,39, indicando un elevato inbreeding o un eccesso di omozigoti e un deficit di eterozigoti.

Altri studi in cui sono stati analizzati gli indici di fissazione sono stati molto utili, come quello condotto da Pressoir et al. (2004) e che ha sottolineato che la gestione dei landraces da parte degli abitanti dei villaggi dell'Oaxaca centrale, in Messico, ha generato popolazioni con poca differenziazione tra di loro ( $F_{st} = 0,01$ ) e tra villaggi vicini ( $F_{st} = 0,003$ ); oltre a un eccesso significativo di omozigoti ( $F_{is} = 0,13$ ). Gli autori hanno collegato questa bassa

differenziazione da un lato (che rifletterebbe un maggiore flusso genico) e un eccesso di omozigoti dall'altro (che rifletterebbe un aumento dell'inbreeding) ad alcuni dei loci SSR studiati che sono associati a QTL relativi alla fioritura. Questo genererebbe una mancanza di sincronia negli accoppiamenti liberi e produrrebbe accoppiamenti selettivi, generando così una sottostruttura o sotto-divisione delle popolazioni.

Anche i nostri risultati in Lambayeque mostrano importanti livelli di diversità genetica e allo stesso tempo un eccesso di omozigoti, suggerendo un certo grado di inbreeding. Possiamo spiegare questo comportamento in base alla dinamica di produzione e commercializzazione del mais locale sarebbe responsabile degli importanti livelli di diversità genetica, dato che i mercati locali e il mercato provinciale all'ingrosso servono come luogo dove si verificano le miscele delle colture commercializzate; Tuttavia, avendo anche registrato casi di eccessi omozigoti e deficit eterozigoti come nelle popolazioni di mais Alazan (in AB il deficit eterozigote, osservato vs. atteso, era 0,48 vs. 0,59, in AI 0,54 vs. 0,65, AT 0,60 vs. 0,63) e Mochero (MB 0,67 vs. 0,70, MMA 0,52 vs. 0,61, MMB 0,51 vs. 0,61) si potrebbe spiegare col fatto che si tratta di una coltura coltivata in pochi e piccoli appezzamenti e che ogni tanto gli episodi del "Fenomeno El Niño" causano forti perdite di raccolto a causa di gravi inondazioni. Questa situazione genererebbe piccoli colli di bottiglia che abbiamo evidenziato nei valori medi dell'indice Garza-Wiillamson, che è stato progettato per quantificare questo tipo di episodio.

Un altro studio che descrive questa controversia è stato sviluppato da Lia et al. (2009) analizzando la struttura e la differenziazione genetica tra le popolazioni di mais locale coltivato in piccoli appezzamenti nell'Argentina nord-occidentale. Gli autori hanno registrato una minore differenziazione nelle popolazioni locali ( $F_{st} = 0,22$ ) rispetto alle popolazioni naturali che si incrociano liberamente e spiegano questo comportamento dal punto di vista della dinamica della coltivazione, dato che si tratta di piccoli appezzamenti che sono utilizzati per la sussistenza degli abitanti della zona.

Per comprendere meglio la differenziazione tra le popolazioni di mais di diversi tipi di razza, sono state analizzate le componenti principali. L'analisi ha evidenziato basse percentuali di contributo delle prime due componenti: per 8 SSR e 28 popolazioni entrambe le componenti hanno contribuito per l'11,9%; per le 37 popolazioni (le 28 più 9 aggiuntive), con 7 SSR la percentuale era del 10,5% e per 15 popolazioni (7 di mais locale e 8 ibridi dentati) con 121 loci marker AFLP la percentuale era leggermente superiore (14%).

Altri studi che hanno utilizzato l'analisi per componenti principali, (come van Heewarden

et al., 2011) hanno evidenziato l'importanza di queste analisi per stabilire la distribuzione delle popolazioni locali di mais secondo la loro origine. Tuttavia, in molti studi si registrano valori bassi nel contributo delle componenti che potrebbero essere spiegati sulla base delle forze evolutive come spiegato da Novembre et al. (2008) che aveva analizzato i risultati pubblicati da Cavalli-Sforza.

Lo studio di van Heerwaarden et al. (2011) che abbiamo citato si proponeva di risolvere la controversia sull'origine del mais da un teosinte delle pianure del Messico sud-occidentale che è più strettamente correlato alle cultivar di mais dell'altopiano e non a quelle delle regioni di pianura o medie. Questi autori hanno sviluppato uno studio SNP che ha identificato 9 di 58 componenti principali che hanno spiegato il 18,7% della variazione e raggruppato tutto il mais in 10 cluster. Di questi, il Mesoamericano è diviso in 3 (pianura, messicano occidentale e altopiano). Inoltre, la prima componente principale ha confermato che il gruppo di mais dell'altopiano è più legato alla sottospecie *parviglumis* e la seconda componente (4,8%) ha separato il mais settentrionale andino negli estremi.

Nel nostro studio l'analisi ha permesso di identificare che le prime due componenti erano importanti nel separare il mais ibrido dentato dal mais vitreo (7,6%), mentre la seconda componente (4,3%) separava il mais Huancavelicano (HUB) dall'alta Sierra e Piricincio della giungla medio bassa (PI) agli estremi e nella parte intermedia una grande miscela di mais andino tra cui quelli della costa e della sierra. Nelle analisi AFLP abbiamo considerato solo il mais costiero rispetto agli ibridi dentati e abbiamo confermato che la prima componente (8,3%) separa anche con la percentuale più alta questi due gruppi e che per il mais costiero, gli Alazan del banco (AB) sono più distanti dall'altro gruppo che comprende Alazan de Tucume (AT), Mochero Banco (MB), Mochero Tucume (MT), Chancayano Banco e INIA (CYB, CYI) e Chaparreño Banco (CHB).

Le analisi di struttura di popolazione applicate alle 28 popolazioni (548 individui) e poi alle 37 (675 individui) sono state divise in 4 blocchi:

La prima ha considerato le 28 popolazioni come un'unica metapopolazione e applicando il metodo di Evanno et al. (2005) è stato possibile definire un valore di  $K$  pari a 2, cioè tutto il mais poteva essere assegnato a 2 gruppi principali con valori di assegnazione o frequenza di appartenenza molto alti. Per esempio, tutto il mais ibrido dentato mostrava medie di  $q_1 > 0,92$  mentre nel mais locale la maggior parte mostrava un'assegnazione superiore a  $q_2 > 0,90$ , solo la popolazione di mais Kculli di Cusco (K) aveva una media  $q_2$  di 0,87.

Quando abbiamo analizzato come si sono comportate le frequenze di assegnazione con  $K = 4$ , abbiamo notato che gli ibridi erano sempre molto diversi dal mais vitreo locale,

dimostrando che hanno origini nella loro storia di domesticazione, poiché gli ibridi a dente giallo sono il risultato di materiali che sono stati introdotti nel paese più di 70 anni fa. I valori di assegnazione per  $k = 4$  mostrano che gli ibridi sono assegnati con valori elevati che vanno da  $q_2 = 0,87$  a  $0,98$ .

Le popolazioni AB, MB e MMB sono state assegnate a uno dei sottogruppi con  $q_1 > 0,80$ , in questo stesso sottogruppo, le popolazioni di MMA, SGB e K sono state assegnate con appartenenze tra  $0,70 \leq q_1 < 0,80$ ; altre popolazioni hanno registrato valori inferiori a  $0,70$  (CB, CGB, AI, AT). Nel sottogruppo  $q_3$ , MT, CYB, CYI, HUB sono stati assegnati con appartenenze  $q_3 \geq 0,80$  e con  $q_3 < 0,70$  nella popolazione CHB. Il quarto sottogruppo conteneva il mais PI, CA, PN, SGH con assegnazioni  $q_4 > 0,8$  e la popolazione Cabanita de Madrigal (MA) con un  $q_4 = 0,78$ .

Inoltre, si può vedere nella figura delle barre colorate (Fig 2. 10) che descrivono le frequenze di assegnazione per un  $k = 13$ , si generano separazioni tra il mais CYB e CYI, gli Alazani sono molto mescolati, gli MMA e MMB si differenziano dagli MB, ma il mais Piricinco de Tarapoto (PI) della giungla è abbastanza differenziato; Inoltre, gli ibridi sono suddivisi in due sottogruppi, uno composto dagli ibridi Pioneer (HA, HB, HC) e l'ibrido INIA I (HD), mentre gli altri ibridi sono raggruppati (HE, HF, HG, HI).

L'analisi con 37 popolazioni ha prodotto un grafico deltaK con 3 punti più alti, con il valore di  $k = 3$  che è quello con i valori di assegnazione più appropriati, poiché ha mostrato medie più alte. Ma l'analisi di strutturazione che abbiamo applicato ai dati dei marcatori AFLP si è rivelata più utile, poiché siamo stati in grado di discriminare le assegnazioni molto meglio, e la separazione tra il mais ibrido e gli vitrei costieri locali è stata ottenuta in modo definito. I valori di assegnazione per i masi locali variavano da  $q_1 [0,93$  a  $0,99]$  e per gli ibridi  $q_2 [0,87$  a  $0,99]$ .

Tuttavia, secondo la figura 2.20, i valori di  $k = 12$  e  $15$  differenziano ancora abbastanza bene le popolazioni. Pertanto, crediamo che questi marcatori sarebbero un'alternativa molto importante per i futuri studi di strutturazione e assegnazione, anche se, essendo marcatori dominanti, ci possono essere limitazioni nella stima di alcuni parametri genetici come gli indici di fissazione.

Santos et al. (2018), confrontando 16 popolazioni di mais locale da 4 aree del Messico meridionale con marcatori ISSR dominanti, sono stati in grado di differenziare con il

programma Structure 2 gruppi definiti con una differenziazione elevata di  $F_{st} = 0,18$  e superiore all'interno di ciascuno di questi gruppi ( $F_{st} = 0,22$ ). Hanno trovato percentuali di adesione del 51% per il mais dello Yucatan e leggermente inferiori per il mais del Chiapas (49%). Per quanto riguarda i livelli di diversità genetica, hanno osservato valori elevati per i 69 loci polimorfici trovati (0,40).

Utilizzando AFLP in 7 popolazioni di mais locale costiero rispetto a 8 popolazioni di ibridi di mais dentato, abbiamo osservato per l'intero gruppo un totale di 82,64% di polimorfismo per 121 loci, una differenziazione moderata tra tutti i mais di 0,09 e una diversità genetica di Nei pari a 0,30 e Shannon 0,44. Tuttavia, all'interno di ogni gruppo i valori di differenziazione tra le popolazioni erano alti per il mais locale ( $G_{st} = 0,30$ ) e un  $G_{st} = 0,41$  per gli ibridi; la diversità genetica era più bassa a 0,24 e 0,21. Si può vedere che entrambi i marcatori dominanti (ISSR e AFLP) sono molto appropriati per definire la differenziazione tra gruppi di popolazioni locali, così come per il confronto con il mais ibrido introdotto.

I dati sono stati analizzati anche considerando 19 popolazioni costiere (AB, AI, AT, MB, MMA, MMB, MT, CYB, CYI, CHB) e della giungla (PI) con 8 SSR per capire come sono strutturate rispetto agli ibridi dentati (HA, HB, HC, HD, HE, HF, HG e HI). Il test di Evanno et al. (2005) ha indicato che il valore più appropriato di  $k$  è 2, cioè che questo gruppo di mais è meglio assegnato a due gruppi principali, uno per gli vitrei e l'altro per gli ibridi (Figura 2.22) e in tutte le popolazioni abbiamo ottenuto valori di frequenza di assegnazione superiori a 0,91, cioè si è generata una separazione molto marcata dove solo due individui, uno da AB e l'altro da AI, hanno presentato  $q_2 \leq 0,7$ , che potrebbe essere la prova di molto basso introgressione con il mais ibrido.

Nel caso del mais Mochero, ci sono stati 3 individui in cui abbiamo registrato assegnazioni  $q_2$  inferiori o uguali a 0,7, evidenziando quello corrispondente a MT che ha presentato un'assegnazione molto bassa ( $q_2 = 0,33$ ), per CYB un individuo ha presentato un valore di assegnazione molto basso ( $q_2 = 0,31$ ). Nel grafico a barre generato dall'analisi con il programma Structure, si può vedere che per valori di  $k = 8$ , si sono formati gruppi abbastanza ben definiti: gli AB sono stati separati in un gruppo insieme a MB, un altro gruppo è formato dagli Alazan (AI e AT), allo stesso modo, i Mochero (MMA e MMB) sono stati raggruppati insieme alle miscele di AI e AT. CYI e MT si sono riuniti in un altro sottogruppo e CYB si è separato in un altro gruppo. Chaparreño Banco (CHB) si è presentato come una miscela di CYB con AI e AT. D'altra parte, il mais Piricincio (PI) era molto chiaramente differenziato. Gli ibridi di mais sono stati separati in due sottogruppi, uno contenente HA, HB, HC e parzialmente HD; mentre l'altro sottogruppo conteneva ibridi HE,



HF, HG e HI, mostrando un'alta concordanza con AFLP.

L'analisi di strutturazione basata solo sul mais locale peruviano ha mostrato che con  $k = 4$ , i valori di assegnazione ( $q$ ) erano alti sopra 0,90 nella maggior parte delle popolazioni e nella Figura 2.27 barre di assegnazione, il mais di Arequipa (CA, PN, MA) appare come un gruppo più vicino; d'altra parte, il mais di Alazan (AB, AI e AT) si unisce al mais di Mochero (MB, MMA e MMB) e al mais di altopiano SGB e K. I Mochero de Tucume (MT) sono più vicini ai Chancayano (CYB, CYI) e al gruppo Huancavelicano (HUB). Il mais Piricinco della giungla di Tarapoto (PI) è marcatamente differenziato. Il mais Canteño, Cusco Gigante e Chaparreño sono molto eterogenei, il che potrebbe essere dovuto al fatto che queste varietà sono state coltivate negli ultimi anni (fine degli anni 90) per l'interesse di promuovere prodotti gastronomici come la "chicha morada" e la "mazamorra morada" ottenuti dal mais Canteño (CB), che viene esportato nei mercati degli Stati Uniti e Spagna e come nel caso del mais gigante di Cusco che viene coltivato per la sua attrattiva come snack e viene esportato principalmente in Spagna e Giappone.

Per esempio, lo studio condotto da Bitocchi et al. (2009) per capire come è cambiata la composizione genetica delle popolazioni locali di mais che si sono stabilite da molti anni (oltre 50 anni) nelle aree marginali delle Marche in Italia ha analizzato la strutturazione e l'introggressione con il mais moderno, utilizzando microsatelliti. Per questo studio, hanno confrontato accessioni di mais locale antico (OL), mais locale recente (RL) e mais moderno che è stato introdotto, al fine di misurare i loro parametri genetici. Hanno trovato che i livelli di diversità nella ricchezza allelica e genetica erano alti: 4,69 - 0,42 nel gruppo OL e 5,17 - 0,62 nelle popolazioni RL. Tuttavia, questi valori sono inferiori a quelli registrati nel nostro studio, poiché abbiamo analizzato campioni dal grande pool genetico andino in Perù e le condizioni geografiche e le dinamiche di movimento dei semi sono diverse nelle due località.

Il mais coltivato in Europa è arrivato sotto forma di piccoli campioni centinaia di anni fa da popolazioni americane, centroamericane, caraibiche e andine, il che si riflette in alti livelli di diversità. Nello stesso studio, Bitocchi et al. (2009) sono stati in grado di eseguire un'analisi di strutturazione che ha identificato un certo numero di gruppi  $k = 2$ , dove le popolazioni OL sono state differenziate dal moderno Flint, così come RL dai moderni dentati (DMM). Inoltre, hanno stabilito un criterio di assegnazione di 0,7 per analizzare la presenza di introggressioni, trovando alti livelli di ibridi moderni nel mais DMM. Questa metodologia è molto potente per comprendere le storie di outcrossing che le popolazioni di mais e di altre specie hanno subito.

In un altro studio esteso Bitocchi et al. (2015) hanno analizzato comparativamente gli eventi di introgressione, ma utilizzando marcatori SSR e AFLP nelle collezioni di vecchi (OL) e nuovi (RL) mais locali rispetto ai moderni mais Flint e Dent (FMM, DMM) e come riferimento hanno utilizzato un gruppo del nord del paese (NI), riuscendo a trovare tramite analisi bayesiana 2 gruppi in cui tutti i mais erano assegnati. Così, per l'analisi SSR, il mais OL con una probabilità  $q_1 > 0$  è stato assegnato al primo gruppo mentre il secondo gruppo corrispondeva al mais RL con una miscela maggiore con il mais moderno ( $q_1 > 0,63$ ) e il mais NI aveva un'assegnazione intermedia. Per il mais moderno i valori di assegnazione erano tra  $q_2 = 0,98$  (DMM) e  $q_2 = 0,89$  (FMM), confermando le nostre osservazioni con i marcatori AFLP. Inoltre, bisogna notare che nel nostro studio, anche se abbiamo ottenuto alte medie di assegnazione per le diverse popolazioni, consideriamo il criterio arbitrario di  $q = 0,70$  come un massimo per stabilire un gruppo definito e valori inferiori come popolazioni molto miste.

Studiando 194 popolazioni di 23 paesi dell'America Latina e dei Caraibi, Bedoya et al. (2017) hanno utilizzato 28 loci SSR con i quali hanno potuto identificare 3 gruppi razziali principali e, utilizzando il programma Structure, sono riusciti a osservare una strutturazione e a definire 3 valori massimi per  $k$ , il primo quando  $k = 2$ , poi  $k = 4$  e  $k = 6$ . Hanno poi scelto un numero di cluster  $k = 4$  poiché in accordo con la cluster analysis NJ e il grafico ottenuto dalle PCA. In questi 4 cluster hanno ottenuto il 95% delle popolazioni assegnate ai rispettivi gruppi razziali.

Lia et al. (2009) hanno analizzato il comportamento delle assegnazioni nelle popolazioni locali di mais dell'Argentina nord-occidentale, osservando alti valori di appartenenza per  $k = 3$  e  $4$  (0,84 e 0,82). Sono riusciti a differenziare alcune razze come le cosiddette Pisingallo e Orgullo Cuarentón, che sono rimaste diverse per valori più alti di  $k = 6$ , mentre altre sono rimaste come un gruppo omogeneo. Nei nostri risultati abbiamo segnalato che ci sono mais locali con miscele elevate come conseguenza del fatto che sono per lo più scambiati nei mercati in modo totalmente informale, il che spiegherebbe questa grande eterogeneità.

Nel nostro studio, come in quello di Lia et al. (2009), è stato anche possibile analizzare come si è comportata la separazione delle popolazioni eseguendo un'analisi di sottostrutturazione e abbiamo trovato che, con i marcatori SSR, il mais costiero e altopiano ha mostrato molte miscele, anche se alcune popolazioni potrebbero essere differenziate con alti livelli di assegnazione per  $k = 5, 10$  e  $13$ , come nel caso del mais Chancayano (CYB e CYI), il Huancavelicano (HUB) e Piricinco de Tarapoto (PI). Tuttavia, con AFLP, la

separazione tra le 15 popolazioni analizzate era più rilevante per valori più alti di  $k$  ( $k = 15$ ). Questa affermazione è confermata anche nello studio di Glordani et al. (2018) dove, utilizzando 4 combinazioni AFLP, sono stati in grado di differenziare 2 gruppi e 19 associazioni di marcatori legati alla ruggine meridionale.

Un altro studio condotto presso l'International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) da Rief et al. (2006) ha utilizzato un set di 25 SSR per 25 accessioni di 24 varietà di mais messicano. Inoltre, applicando il programma Structure, sono stati in grado di stabilire tramite il grafico a barre di assegnazione un  $k = 25$ , per il quale l'86% degli individui è raggruppato nelle rispettive accessioni, mostrando una chiara separazione. Gli individui delle razze Cónico e Cacahuacintle non erano invece separati, ma formavano un gruppo diverso.

A livello di campo, uno dei principali problemi che è stato riscontrato nell'area di studio di Lambayeque è il fatto che i produttori di mais ibrido dentato non usano sementi certificate nelle due campagne di semina che effettuano ogni anno; al contrario, per la prima campagna principale, che inizia verso novembre, usano sementi ibride che comprano nei negozi di prodotti agricoli. Tuttavia, nella seconda campagna di semina, preferiscono risparmiare sui costi delle sementi e quindi si autoalimentano con grani che separano selezionando le pannocchie del primo raccolto, in modo da ottenere piantagioni molto eterogenee nel loro sviluppo in campo e allo stesso modo, i raccolti che ottengono sono molto bassi in termini di resa e produttività, riducendosi da 4,5 t/ha a solo 1,5 t/ha (comunicazione personale di agricoltori di Ferreñafe); tuttavia, nelle statistiche gestite dal Ministero dell'Agricoltura, questi dettagli non vengono riportati e al contrario vengono pubblicate le medie generali, che per l'anno 2019 è stata di 4,45 t/ha (MINAGRI, 2019).

Per quanto riguarda la gestione delle sementi locali di mais, è stato sottolineato nei risultati che in Lambayeque c'è un'interessante dinamica di rotazione delle sementi, poiché mantiene un'alta diversità genetica. Tuttavia, questo processo non mantiene alcun controllo sulla certificazione dei semi o sulla purezza della razza. Inoltre, gli agricoltori non sono sempre disposti a mantenere la coltivazione di queste colture di mais e possono sostituirle se si presentano migliori opportunità economiche con la semina di altre colture che possono essere commercializzate rapidamente e a prezzi migliori. Inoltre, si è riscontrato che pochi appezzamenti di terreno sono dedicati alla coltivazione di queste colture di mais e a volte sono anche coltivate in associazione con altre specie come lenticchie, fagioli, ecc.

La semina del mais Mochero avviene preferibilmente dopo la prima stagione in cui è stato

coltivato il riso, poiché questa coltura utilizza una grande quantità di acqua e lascia il terreno umido. Questo perché il riso è molto più facile da commercializzare in questa zona, tradizionalmente conosciuta come "risicola". In questo modo, si approfitta del fatto che il mais Mochero è abbastanza tollerante alla siccità, richiedendo solo un'irrigazione durante l'intero raccolto, poiché il mais Mochero è adatto a questa zona costiera molto secca. Al momento del raccolto, il mais Mochero è commercializzato fresco come "choclo" da mangiare cotto o preparato in una specie di torta dolce chiamata "humitas". Altri contadini essiccano i grani all'aria aperta per venderli a intermediari che raccolgono i raccolti di diversi contadini per venderli successivamente nei mercati all'ingrosso della città principale (mercato della Moshoqueque), che poi rivendono questi grani a piccoli negozi che vendono vari prodotti o a negozi che offrono prodotti per l'agricoltura, e sono questi luoghi che forniscono ai contadini il grano per le prossime stagioni di semina. Inoltre, alcuni agricoltori hanno dichiarato che usano separare i grani come sementi per le stagioni successive.

Nel caso del mais Alazan, l'area di coltivazione è molto piccola, poiché questo mais è utilizzato principalmente per la produzione della bevanda "chicha de maíz", che si può trovare nei piccoli mercati dei villaggi della zona. A causa di questa situazione, anche questo mais segue la stessa dinamica di commercializzazione che abbiamo descritto per il mais Mochero. Tuttavia, poiché questi prodotti a base di mais si trovano in piccole quantità, sono anche molto vulnerabili ad essere persi a causa dei cambiamenti nelle abitudini alimentari dei giovani, che sono fortemente influenzati dal consumo di altri tipi di prodotti trasformati (biscotti, snack, bevande gassate, ecc.).

In Lambayeque c'è un'unità chiamata Associazione dei produttori di sementi di mais, che dovrebbe lavorare a stretto contatto con la Direzione dell'Agricoltura e dell'Irrigazione del Governo Regionale di Lambayeque e con il Consiglio degli Irrigatori; tuttavia, poiché non ci sono fondi per finanziare programmi di semina, miglioramento genetico, o per dare maggior valore aggiunto alla produzione, e l'appoggio del Ministero dell'Agricoltura e del Governo Regionale è molto scarso, questa Associazione è diventata un'istituzione che non ha assunto alcuna importanza. D'altra parte, gli stessi agricoltori non sono in grado di creare forti Associazioni di Produttori; al contrario, per altre colture come la zucca "Loche", le Associazioni vengono create e formalmente registrate, ma non riescono a farle funzionare perché richiedono il contributo economico di ogni agricoltore.

D'altra parte, è stato notato il grande problema fitosanitario che interessa la coltivazione di mais vitreo e mais ibrido giallo. In un documento del Ministero dell'Agricoltura e dell'Irrigazione, Sevilla (2016) sottolinea che, a seconda dello stadio fenologico della pianta di mais, parassiti, malattie e infestanti la colpiranno con maggiore o minore intensità;

Così, quando la pianta è nel periodo di crescita vegetativa lenta (sviluppo delle foglie), è fortemente colpita da insetti pungenti come la *Spodoptera frugiperda* e da erbacce che crescono più velocemente della pianta. Alla maturità, il mais è più colpito da funghi come il *Fusarium*, che intensifica il suo affetto a causa dell'eccesso di umidità nell'ambiente.

D'altra parte, Jara in INIA (2014) ha presentato uno studio sulla gestione integrata dei parassiti per il mais a Cusco dove menziona come i vari parassiti influenzino le varie fasi di sviluppo della coltura; indicando tra i principali la nottua (*Agrotis spp*), la piralide (*Ostrinia nubilalis*), il verme pungente (*Elasmopalpus lignosellus*), la lafigma (*Spodoptera frugiperda*) o il cimici (*Nezara viridula*). In uno studio commissionato dal Ministero dell'Ambiente, sono stati identificati molti insetti parassiti del mais e un gran numero di organismi legati a questa coltura (MINAM 2016).

In un altro documento generato dal LAC Biosafety Project sull'analisi ex ante del mais ibrido dentato OGM vs. convenzionale, viene presentato il rapporto dei costi per piantare un ettaro di mais, da cui risulta che i costi per il controllo fitosanitario raggiungono il 15,13% (Diez et al., 2017).

Per mostrare le possibilità di incrociare il mais locale con gli ibridi giallo duro, sono stati valutati due scenari, uno sulla costa nord, dove le condizioni di umidità, vento etc. sono diverse dalla costa centrale come La Molina - Lima. In Lambayeque per esempio il livellodi precipitazioni è molto basso (a parte il fenomeno "El Niño", che causa grandi inondazioni), la velocità media del vento è più alta a Lambayeque che a Lima, così come l'umidità relativa (78,1% contro 77,7%). La differenza tra le temperature massime e minime è maggiore a Lima con una differenza di 13.1 °C per le temperature massime medie e 7.9 °C per le temperature minime medie. In altri studi, come Bannert (2006) e Goggi et al. (2007), la direzione e la velocità del vento sono state considerate come variabili meteorologiche, anche se per altre colture, è noto che fattori come l'umidità relativa o la temperatura possono influenzare la maturazione e la vitalità dei grani di polline (Corazza et al., 2016).

Nella nostra ricerca, è stato osservato che, sulla costa nord, i due tipi razziali utilizzati si sono comportati in modo diverso nelle percentuali di incrocio, essendo maggiore nel mais Pardo (67,80% di incrocio ad un metro di distanza), mentre il mais Chancayano ha presentato il 45,14% di incrocio. Entrambi i tipi di mais hanno sperimentato una diminuzione delle percentuali di incrocio a distanze maggiori, ad esempio a 10 metri le percentuali erano 0,14% e 1,55% rispettivamente mentre a 30 metri il mais Pardo ha presentato solo lo 0,41%

di incrocio, mentre Chancayano lo 0,17%. Nelle prove realizzate a Lima - La Molina, il mais Mochero ha mostrato bassi livelli di incrocio a diverse distanze (0,93% a 1 m e 0,29% a 15 m); tuttavia, il mais Alazan ha mostrato percentuali più alte: a 1 m l'incrocio era del 9,58%, ma a 15 m la percentuale era del 2,43%.

È noto che l'Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), come affermato da Goggi et al. (2007), ha stabilito che la separazione appropriata per evitare l'incrocio di varietà transgeniche con varietà non transgeniche è di 200 m; tuttavia, Stevens et al. (2004) riporta che il flusso di polline e gli incroci che genera diminuiscono nei primi 10 e 20 m, poiché non sono stati trovati granuli di polline a distanze maggiori di 200 m. Nel caso del nostro studio, possiamo osservare che a distanze di 50 m le percentuali di granuli erano molto basse; tuttavia, la realtà di molte aree in cui si coltiva il mais sulla costa del Perù è piccola ed è molto difficile per gli agricoltori rispettare questo criterio di separazione se il mais transgenico dovesse essere coltivato accanto ad altre varietà locali.

La capacità di incrociarsi più o meno facilmente dipende da diversi fattori. È noto che alcuni mais sono più compatibili di altri, come nel caso di Ayacucho (Aragon et al., 2013) dove è consuetudine anno dopo anno seminare nello stesso campo il mais bianco Cusco (varietà tardiva) con il mais Confite Morocho. I due tipi non si incrociano a causa di una certa incompatibilità tra loro. Similmente avviene per il mais Cusco gigante e la razza Cuscogiallo nella valle dell'Urubamba a Cusco.

Inoltre, è improbabile che nella zona degli altipiani si verificano incroci tra mais ibrido dentato e nativo degli altipiani, considerando che il primo viene coltivato tra zero e 800 metri. I nostri risultati presentano valori simili a quelli ottenuti da altri studi. Gustafson et al. (2006) per esempio hanno trovato che se si usano barriere di piante coltivate di 20 metri di lunghezza tra due appezzamenti vicini si può ottenere meno dello 0,9% di flusso genico da mais GM. Nei modelli testati però, c'era molta variabilità nella quantità di flusso dovuta a diversi fattori come la temperatura, direzione e velocità del vento, umidità relativa, ecc.

In uno studio presentato da Pla et al. (2006) è stato riportato che 20 m di distanza sono sufficienti per raggiungere lo standard europeo di flusso. In un altro studio, Halsey et al. (2005), utilizzando un donatore ibrido contenente i marcatori P1-rr e R1-nj in omozigosi, che in eterozigosi produce l'effetto "xenia", hanno trovato che il polline è stato rilasciato a temperature e umidità medie di 21,6-26,0°C e 34,1-49,8% e che tenendo conto della sincronizzazione dell'impollinazione in California, le percentuali di incroci erano 0,7 e 0,6% a 24 e 32 metri.

Messenguer et al. (2006), d'altra parte, utilizzando mais GM e simulando situazioni reali di flusso genico, analizzate con RTq-PCR, hanno trovato un basso tasso di impollinazione incrociata sotto la soglia del 0,9% richiesta dalla Comunità europea a distanze tra 10 a 20m. Questo viene spiegato sulla base delle asincronie nella fioritura, anche se si è visto che il polline si può spostare col vento a distanze superiori ai 30 a 50m. Abbiamo anche notato questa tendenza quando abbiamo analizzato i modelli di incrocio spontaneo nelle nostre prove.

Il mais locale (Pardo e Chancayano) che è stato usato per la prova a Lambayeque ha mostrato una bassa percentuale di incrocio (0,41% e 0,17%) a 30 m di distanza dal mais ibrido. Allo stesso modo, nella prova a Lima, La Molina, il mais Alazan e Mochero hanno mostrato percentuali dello 0,27% e dello 0,05% a 30 m di distanza. Questi valori sono inferiori alla soglia suggerita e si osserva che i landraces Mochero e Alazan hanno mostrato basse percentuali di incrocio anche a brevi distanze dal mais ibrido dentato.

In uno studio condotto da Bannert (2006), analizzando l'impollinazione incrociata in campi di mais per due anni a diverse distanze, orientamento del vento e tempi di fioritura, si sono osservati valori di incroci dello 0,009% a 52m. Inoltre, è stato riferito che in tempi di forti venti piccole porzioni di polline possono essere disperse su grandi distanze; tuttavia, il massimo viene raggiunto per lo più a 55m, anche se si possono raggiungere anche i 350m.

In un secondo studio a Zurigo, Bannert (2006) ha trovato che i tassi di impollinazione iniziavano dal 5% e diminuivano allo 0,9% a 13 m; allo stesso modo, si osservava lo 0,9% di impollinazione in campi con fioritura sincrona a distanze maggiori di 15 m.

Avendo trovato valori diversi nell'incrocio tra il mais ibrido e il mais autoctono, è stato considerato importante convalidare la presenza di incroci anche attraverso un'analisi molecolare. L'amplificazione di due frammenti di PCR specifici per il locus PSY1 è servita a monitorare e documentare quegli eventi di incrocio che potrebbero verificarsi tra questi due tipi di mais nelle zone di coesistenza e dove ci sono appezzamenti molto vicini. Pertanto, è probabile che possano verificarsi situazioni di impollinazione incrociata.

Considerando anche che nei prossimi anni dovrebbero continuare le valutazioni di incrocio nei nuovi progetti, in modo che siano disponibili informazioni utili per le decisioni delle autorità competenti. Questa necessità deve essere soddisfatta entro i prossimi 15 anni, considerando che la legge di moratoria per l'ingresso di organismi geneticamente modificati è stata estesa fino al 2035 e che dal 2011 ad oggi ci sono pochissime prove di incrocio che permettono di fornire dati sufficienti per una buona gestione della diversità delle razze di mais nelle zone

di coesistenza. Inoltre, poiché il mais GM non può essere utilizzato per le prove, i tratti di colorazione dell'endosperma giallo e altri marcatori come alcuni frammenti di PCR potrebbero essere utili per ottenere informazioni appropriate.



## **6. Conclusione generale della ricerca**

## 6. Conclusione generale della ricerca

- a. Il numero medio di alleli diversi per i loci studiati è stato di 9,5, una cifra comparabile con altri studi e che indica che le popolazioni di mais autoctono mantengono un buon stato di diversità genetica; tuttavia, in tutte le varietà di mais studiate, l'eterozigosità osservata era inferiore al previsto (diversità genetica), mostrando un deficit di eterozigoti e un aumento degli accoppiamenti inbred. Abbiamo anche trovato che i valori dell'indice Garza-Williamson mostrano che le popolazioni analizzate hanno subito un effetto di costrizione della popolazione equivalente a un collo di bottiglia durante il processo di domesticazione del mais nella regione andina del Perù.
- b. Le popolazioni di mais Alazan e Mochero analizzate sia dalla banca del germoplasma UNALM che da Lambayeque presentavano una diversità genetica, un polimorfismo ed un numero di alleli diversi leggermente più alti rispetto al mais della zona andina e che vive tra i 1500 ed i 3400 metri di altitudine (65 alleli nel mais Alazan e Mochero contro un numero di 60 alleli nel mais andino). Questo comportamento dei modelli di diversità era diverso da quello riportato per il mais messicano. Inoltre, abbiamo trovato percentuali medio-basse di concordanza allelica tra la banca e le popolazioni di campo (54,72% per gli Alazan, il 38,98% per i Mochero e il 45,95% per i Chancayano).
- c. Il mais autoctono Alazán e Mochero in Lambayeque ha mostrato un buon livello di diversità genetica, nonostante le poche aree dedicate alla coltivazione, la coesistenza con ibridi e le riduzioni nelle aree coltivabili durante gli eventi del fenomeno " El Niño" oppure della sostituzione di colture più redditizie e dalla progressiva perdita delle tradizionali usanze di consumo di questi mais locali. Questa elevata diversità genetica si spiega con il movimento del seme: dalla sua raccolta, alla commercializzazione nei mercati locali o nel mercato all'ingrosso e all'acquisizione del seme da parte degli agricoltori.
- d. Nonostante diversi decenni di coesistenza tra mais autoctono (Alazán e Mochero) con mais ibrido introdotto, non c'è evidenza di flusso genico che abbia generato miscele alleliche marcate, per questo esistono alleli esclusivi nei loci ZM04 e ZM31 (6 alleli). Negli altri loci si trovano dai 2 ai 4 alleli diversi rispetto al mais ibrido. Altri programmi di analisi statistica e genetica come R con il pacchetto Adegnet e la funzione dudi.pca, Structure, PopGene, Arlequin e Darwin confermano le differenze dei mais autoctoni della costa e degli altipiani andini, rispetto al mais ibrido dentato e indicano una separazione molto marcata, con valori di frequenza di assegnazione

genotipica molto alti, superiori allo 0,90.

- Tra i due tipi di marcatori molecolari utilizzati, abbiamo trovato che gli AFLP, a differenza degli SSR, producono modelli di assegnazione genotipica meglio definiti e permettono una migliore differenziazione tra le diverse popolazioni analizzate in questo studio; tuttavia, con gli AFLP, non abbiamo trovato che le popolazioni Alazan della banca e del campo fossero più strettamente correlate, e lo stesso vale per il mais Mochero e Chancayano. Abbiamo anche scoperto che, con entrambi i marcatori molecolari, c'è una grande quantità di mescolanza tra le popolazioni di mais dell'altopiano e della costa, anche se le popolazioni di mais Huancavelicano (HUB) sono leggermente più lontane.
- Il mais Piricincio che vive nella foresta bassa e coesiste con il mais ibrido dentato è caratterizzato da un basso polimorfismo, riflesso in uno dei valori più bassi nella diversità genetica Nei (0,17). Questo dato può essere dovuto alla sua bassa diffusione e area seminata e forse dallo spostamento di altre colture come il riso ed il mais ibrido dentato. Tuttavia, questo mais locale era altamente differenziato nelle analisi della componente principale e della struttura rispetto al resto delle popolazioni analizzate.
- Il dipartimento di Lambayeque è un sito interessante da studiare per l'analisi del rischio di flusso genico dal mais GM al mais locale, perché contiene 3 scenari: zone dove si coltiva solo il mais ibrido (Ferrefe), zone dove si coltiva il mais locale vitreo e non si pianta il mais dentato ed infine zone dove si coltivano entrambi i tipi di mais in coesistenza o in tempi diversi. Inoltre, alcuni appezzamenti sono vicini l'uno all'altro.
- Secondo l'analisi di incrocio tra tipi diversi di mais, abbiamo trovato che a distanze di 50 m la percentuale di incroci tra il mais ibrido e il mais vitreo nativo di Lambayeque è molto bassa, quindi consideriamo che distanze di 100 m siano sufficienti per evitare il verificarsi di incroci involontari tra questi mais. Tuttavia, in Lambayeque, il mais Pardo e Chancayano hanno mostrato un alto grado di incrocio a 1 metro (67,80% e 45,14%) che si è ridotto a 0,04% e 0,13% a 50 metri. A Lima - La Molina, l'Alazan ha mostrato un maggior grado di incrocio con i mais ibridi rispetto al Mochero a 3 metri (9,58% e 0,93%). Tuttavia, a 30 metri si è ridotto allo 0,27% e allo 0,05%. Pertanto, consideriamo che 100 m di separazione siano sufficienti per impedire loro di incrociarsi.
- Il Perù ha bassi livelli medi nella resa sia del mais ibrido dentato che del mais vitreo

nativo, questo genera una grande dipendenza dalle importazioni, pari a circa il 70%. La causa della bassa resa è da ricercarsi nella mancanza di semi migliorati; manca un buon controllo delle imprese che vendono sementi e c'è bisogno di un piano nazionale a lungo termine per il miglioramento genetico e la produzione di sementi certificate di varietà locali e ibridi, per questi motivi il Ministero dell'Agricoltura e le università dovrebbero ricevere più budget per la ricerca. Inoltre, diventa sempre più importante pianificare programmi di selezione di nuove varietà che possano rispondere ai problemi ambientali che incombono e diventano più ricorrenti (mancanza d'acqua, aumento delle temperature, inondazioni, comparsa di nuovi parassiti e malattie, ecc.)

## **7. Referenze bibliografiche:**

## 2. Referenze Bibliografici

- Achleitner A., Tinker N., Zechner E., Buerstmayr H. (2008). Genetic diversity among oat varieties and associations of AFLP markers with quantitative traits. *Theor Appl Genet.* 117: 1041 – 1053.
- Acosta R. (2009). El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba. *Cultivos Tropicales* 30(2):113-120.
- Adetimirin V., Vroh-Bi I, The C., Menkir A., Mitchell S. & Kresovich S. (2008). Diversity analysis of elite maize inbred lines adapted to West and Central Africa using SSR markers. *Maydica* 53: 143 - 149
- Aragón L., Castillo J., Romero V., López C., E.N.Fernandez. (2013). Maíz genéticamente modificado: Estrategias de manejo y guías para minimizar flujo de genes así como para evitar o minimizar un probable efecto en organismos no-blanco. Boletín Técnico. Proyecto LAC Biosafety, Perú. Instituto de Biotecnología , Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú.
- Aris-Brosou S., Excoffier L. (1996). The impact of population expansions and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Molecular Biology and Evolution* 13: 494-504
- Awata L., Tongoona, P., Danquah E., Ifie B. E., Suresh L. M., Jumbo M. B., Marchelo-D'ragga P. & Sitonik C. (2019). Understanding tropical maize (*Zea mays* L.): The major monocot in modernization and sustainability of agriculture in sub-Saharan Africa. *International Journal Advance Agricultural Research.* 7 (1): 32-77
- Baltasar M., Sánchez-Gonzales J.J., De la Cruz L.& Schoper J.B. 2005. Pollination between maize and teosinte: an important determinant of gene flow in Mexico. *Theor Appl Genet.* 110: 519-526.
- Bannert M. 2006. Simulation of transgenic pollen dispersal by use of different grain colour maize. Thesis Doctor of Sciences. Technical University Munich. Germany.
- Bennetzen J., Hake S. (2009). Handbook of maize: genetics and genomics (pp. 163-239). Springer Science & Business Media.
- Barrera-Guzmán, Luis A., Legaria-Solano, Juan P., & Ortega-Paczka, Rafael.

- (2020). Diversidad genética en poblaciones de razas mexicanas de maíz. *Revista fitotecnica mexicana*, 43(1), 121-125. Epub 28 de diciembre de 2020. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.1.121>
- BCR. (2020). Boletín estadísticas del Banco Central de Reserva del Perú. <https://estadisticas.bcrp.gob.pe/estadisticas/series/anuales/resultados/PM04862A/A/html>
  - Beadle G. (1980). The ancestry of corn. *Scientific American* . 242: 112-119.
  - Bedoya C. (2012). Estudios de diversidad genética en poblaciones de maíz (*Zea mays* L.) evaluadas con microsatélites [Tesis Doctoral, Departament de Biologia, Universitat de les Illes Balears].  
[http://ibdigital.uib.es/greenstone/sites/localsite/collect/tesisUIB/index/assoc/Bedoya\\_S.dir/Bedoya\\_Salazar\\_ClaudiaA.pdf](http://ibdigital.uib.es/greenstone/sites/localsite/collect/tesisUIB/index/assoc/Bedoya_S.dir/Bedoya_Salazar_ClaudiaA.pdf)
  - Bedoya CA., Dreisigacker S., Hearne S., Franco J., Mir C., Prasanna BM., Taba S., Charcosset A., Warburton M. (2017). Genetic diversity and population structure of native maize populations in Latin America and the Caribbean. *PLoS ONE* 12(4): e0173488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173488>
  - Beyene, Y., Botha AM. & Myburg, AA. (2006). Genetic diversity among traditional Ethiopian highland maize accessions assessed by simple sequence repeat (SSR) markers. *Genet Resour Crop Evol* **53**, 1579-1588  
. <https://doi.org/10.1007/s10722-005-8509-y>
  - Bitocchi, E., Nanni, L., Rossi, M., Rau, D., Bellucci, E., Giardini, A., ... & Papa, R. (2009). Introgression from modern hybrid varieties into landrace populations of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.) in central Italy. *Molecular Ecology*, 18(4), 603-621., <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04064.x>
  - Bitocchi, E., Bellucci, E., Rau, D., Albertini, E., Rodriguez, M., Veronesi, F., ... & Nanni, L. (2015). European flint landraces grown in situ reveal adaptive introgression from modern maize. *PLoS One*, 10(4), e0121381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121381>

- Bracco, M., Lia, V. V., Poggio, L., Cámara Hernández, J. A., & Gottlieb, A. M. (2013). Caracterización genética de razas de maíz autóctonas de Misiones, Argentina. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (20), 52-60.
- Caballero A. (2017). *Genética Cuantitativa*. Ed. Síntesis S.A. Madrid, España. 353p.
- Cavalli-Sforza L.& Bodmer W. F. (1981). *Genética de las Poblaciones Humanas*. Ed. Omega, Barcelona.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). 1999. *Protocolos de Laboratorio de Biología Molecular*. Lima, Perú.
- Ciofi C., Funk S.M., Coote T., Cheesman D.J., Hammond R.L., Saccheri I.J., Bruford M.W. (1998). Genotyping with Microsatellite Markers. En *Molecular Tools for Screening Biodiversity: 195-201*. Editado por A. Karp, P. Isaac & D. Ingram. Chapman & Hall. Londres, Inglaterra.
- Coltura & cultura. Le storie, i protagonisti, le novità. L'agricoltura Italiana da leggere, guardare, scoprire. Il mais: storia e arte. [www.colturaecultura.it](http://www.colturaecultura.it)
- CONABIO (2008). Documento de trabajo para el taller: Agrobiodiversidad en Mexico: el caso del maíz. <http://www2.inecc.gob.mx/dgipea/descargas/agrodiversidad.pdf>
- Dávalos A. D. (2017). *Diversidad de maíz (Zea mays L.) en la selva peruana* [Tesis para optar el título de ingeniero agrónomo]. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- de Vicente M.C., López C. & Fulton T. (eds.). (2004). *Genetic Diversity Analysis with Molecular Marker Data: Learning Module*. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy. <https://www.biodiversityinternational.org/e-library/publications/detail/molecular-marker-learning-modules-vols-1-and-2/>
- Diaw, Y., Tollon-Cordet, C., Charcosset, A., Nicolas, S. D., Madur, D., Ronfort, J., ... & Gouesnard, B. (2021). Genetic diversity of maize landraces from the South-West of France. *PLoS One*, 16(2), e0238334. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238334>



- Diez R., Gómez R., Guillén L., Falck-Zepeda J. (2017). Evaluación Ex - ante de la liberación de alternativas transgénicas en el cultivo de maíz amarillo duro en el Perú. Boletín Técnico. Proyecto LAC Biosafety, Perú. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú. [http://www.lamolina.edu.pe/institutos/ibt/portal/genomica/PUBLICACIONES\\_LAC-BIOSAFETY/Evaluaci%C3%B3n%20Ex-ante%20MAD%20MAD%2023.10.17.pdf](http://www.lamolina.edu.pe/institutos/ibt/portal/genomica/PUBLICACIONES_LAC-BIOSAFETY/Evaluaci%C3%B3n%20Ex-ante%20MAD%20MAD%2023.10.17.pdf)
- Doebley, J. (2004). The genetics of maize evolution. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 37-59. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092425>
- Doebley, J. (1990). Molecular evidence and the evolution of maize. *Economic Botany*, 44(3), 6-27.. Doi.org/10.1007/BF02860472
- Stirnberg, A., & Djamei, A. (2016). Characterization of ApB73, a virulence factor important for colonization of Zea mays by the smut Ustilago maydis. *Molecular plant pathology*, 17(9), 1467-1479. <https://doi.org/10.1111/mpp.12442>
- Doyle J.J. & Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Du Plessis, J. (2003). Maize production (pp. 1-38). Pretoria, South Africa: Department of Agriculture.
- Escalante Josue. V. (2018). Rentabilidad de la semilla de maíz amarillo duro INIA 619 – megahíbrido en la provincia de Huaura, región Lima. [Tesis para optar el título de Economista. Universidad Nacional Agraria La Molina].
- Eubanks, M. W. (2001). The mysterious origin of maize. *Economic Botany*, 492-514.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564-567.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.

- FAO. (2000). Ley general de semillas Perú: <http://www.fao.org/faolex/results/details/en/c/LEX-FAOC020279>
- Fassio A., Cozzolino D., Bonjour V., Pascal A., Condón F., Delucchi I. (2000). MAIZ:variabilidad genética y usos alternativos del grano. Unidad de Difusión e Información Tecnológica del INIA. Andes 1365, Piso 12. Ed Hemisferio Sur S.R.L. Montevideo – Uruguay. 45p.
- Fedoroff N. (1984). Elementos genéticos transponibles en el maíz. *Investigación y Ciencia*. 95. Agosto.
- Ferreira M., Grattapaglia D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1ra Ed. Basílica; EMBRAPA – CENARGEN. 220pp.
- Fukunaga, K., Hill, J., Vigouroux, Y., Matsuoka, Y., Sanchez G, J., Liu, K., ... & Doebley, J. (2005). Genetic diversity and population structure of teosinte. *Genetics*, 169(4), 2241-2254. [doi.org/10.1534/genetics.104.031393](https://doi.org/10.1534/genetics.104.031393)
- Galinat W. C. ( 1971). The origin of maize. *Ann. Review of Genetics*. 5:447-478.<https://doi.org/10.1146/annurev.ge.05.120171.002311>
- Garza J., Williamson E. (2001). Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*. 10: 305 – 318.
- Gaut, B. S., & Doebley, J. F. (1997). DNA sequence evidence for the segmental allotetraploid origin of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(13), 6809-6814.
- George, M. L., Regalado, E., Warburton, M., Vasal, S., & Hoisington, D. (2004). Genetic diversity of maize inbred lines in relation to downy mildew. *Euphytica*, 135(2), 145-155.
- Giordani, W., Scapim, C. A., Ruas, P. M., Ruas, C. D. F., Contreras-Soto, R., Coan, M., ... & Gonçalves, L. S. A. (2019). Genetic diversity, population structure and AFLP

markers associated with maize reaction to southern rust. *Bragantia*, 78, 183-196.  
<https://doi.org/10.1590/1678-4499.20180180>

- Gobierno Regional Moquegua. (2018). Plan nacional de cultivos 2018 – 2019.  
[https://www.agromoquegua.gob.pe/doc/PLAN\\_NACIONAL\\_DE\\_CULTIVOS\\_2018-2019.pdf](https://www.agromoquegua.gob.pe/doc/PLAN_NACIONAL_DE_CULTIVOS_2018-2019.pdf)
- Goggi, A. S., Lopez-Sanchez, H., Caragea, P., Westgate, M., Arritt, R., & Clark, C. A. (2007). Gene flow in maize fields with different local pollen densities. *International journal of biometeorology*, 51(6), 493-503.
- Goggi, A. S., Caragea, P., Lopez-Sanchez, H., Westgate, M., Arritt, R., & Clark, C. (2006). Statistical analysis of outcrossing between adjacent maize grain production fields. *Field Crops Research*, 99(2-3), 147-157. Doi:10.1016/j.frc.2006.04.005.
- Gonzáles, A. (2008). El maíz: Planta portentosa. *Ciencias Sociales de la Universidad Iberoamericana*. 3(5): 1-17.
- González Ledesma M. (2020). Diversidad y distribución del género *Tripsacum* (Poaceae: Tripsacinae) en México. Segunda fase. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Informe final SNIB-CONABIO, Proyecto No. FZ025. Ciudad de México.
- Grobman, A., Bonavia, D., Dillehay, T. D., Piperno, D. R., Iriarte, J., & Holst, I. (2012). Pre-ceramic maize from paredones and huaca prieta, Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5), 1755-1759. doi: 10.1073/pnas.1120270109.
- Grobman A. (2005). Magnitud e impacto potencial de la liberación de organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales Caso: Comercialización y consumo de organismos genéticamente modificados y sus productos derivados en el Perú. p. 99-111. En O. Hidalgo; W. Roca; E.N.Fernandez-Northcote (eds.). Magnitud e impacto potencial de la liberación de organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales: Casos Algodón, Leguminosas de grano, Maíz y Papa. Consejo Nacional del Ambiente. Lima, Perú.
- Grobman A. (1967). *Tripsacum* in Peru. *Bot.Mus.Harvard University*. 21: 285-287.

- Grobman A., Salhuana W., Sevilla R. & Mangelsdorf E. (1961). Races of maize in Peru; their origin, evolution and classification. National Academy of Science-National Research Council. Pub. 390. Washington DC.
- Gustafson, D. I., Brants, I. O., Horak, M. J., Remund, K. M., Rosenbaum, E. W., & Soteres, J. K. (2006). Empirical modeling of genetically modified maize grain production practices to achieve European Union labeling thresholds. *Crop Science*, 46(5), 2133-2140. <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.01.0060>
- Gustafson, D. I., Horak, M. J., Rempel, C. B., Metz, S. G., Gigax, D. R., & Hucl, P. (2005). An empirical model for pollen-mediated gene flow in wheat. *Crop Science*, 45(4), 1286-1294. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.0137>
- Gupta, P. K., & Varshney, R. K. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113(3), 163-185. <https://doi.org/10.1023/A:1003910819967>
- Guzzon, F., Arandia Rios, L. W., Caviedes Cepeda, G. M., Céspedes Polo, M., Chavez Cabrera, A., Muriel Figueroa, J., ... & Pixley, K. V. (2021). Conservation and use of Latin American maize diversity: Pillar of nutrition security and cultural heritage of humanity. *Agronomy*, 11(1), 172. [Doi.org/10.3390/agronomy11010172](https://doi.org/10.3390/agronomy11010172)
- Halsey, M. E., Remund, K. M., Davis, C. A., Qualls, M., Eppard, P. J., & Berberich, S. A. (2005). Isolation of maize from pollen-mediated gene flow by time and distance. *CropScience*, 45(6), 2172-2185. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.0664>
- Herrera-Saucedo, V., Santacruz-Varela, A., Rocandio-Rodríguez, M., Córdova-Téllez, L., Moreno-Ramírez, Y. R., & Hernández-Galeno, C. Á. (2019). Diversidad genética de maíces nativos del norte de México analizada mediante microsatélites. *Agrociencia*, 53(4), 535-548.
- IBPGR. (1991). Descriptores para maíz. Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y Trigo/ Internacional Board for Plant Genetic Resources, Roma.

- INIA. (2014). Manejo integral del cultivo y de las plagas del maíz. Edición N°1 Cusco, autor M.C.Wladimir Jara Calvo. Programa Nacional de Innovación Agraria en Maíz. [https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/inia/112/1/Manejo\\_integrado\\_del\\_cultivo\\_2014.pdf](https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/inia/112/1/Manejo_integrado_del_cultivo_2014.pdf)
- Invitrogen life technologies. (2003). Instruction Manual AFLP Analysis System I. [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/aflpi\\_man.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/aflpi_man.pdf)
- Izquierdo M. (2001). Ingeniería genética y transferencia génica. Ed. Pirámide, Madrid.
- Kato T. (2005). Cómo y dónde se originó el maíz. Investigación y Ciencia. Agosto. 347, 68-75.
- Kato Yamakake, T. A. (1975). Cytological studies of maize (*Zea mays* L.) and teosinte (*Zea mexicana* (Schraeder) kuntze) in relation to their origin and evolution. Massachusetts. Agricultural Experiment Station. Bull. 635: 1-185.
- LAC Biosafety, (2012). Línea de base molecular de la estructura poblacional de razas locales de maíz y posible flujo genético en zonas de co-existencia con cultivos híbridos de maíz amarillo duro. **César López B., Perú.** [http://pe.biosafetyclearinghouse.net/lacbio\\_cartagena.shtml](http://pe.biosafetyclearinghouse.net/lacbio_cartagena.shtml)
- Lia, V. V., Poggio, L., & Confalonieri, V. A. (2009). Microsatellite variation in maize landraces from Northwestern Argentina: genetic diversity, population structure and racial affiliations. *Theoretical and Applied Genetics*, 119(6), 1053-1067. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1108-0>
- Liu, K., Goodman, M., Muse, S., Smith, J. S., Buckler, E. D., & Doebley, J. (2003). Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics*, 165(4), 2117-2128. <https://doi.org/10.1093/genetics/165.4.2117>
- Lopez C., Sanchez E., Mansilla R., Calderon A., Quinteros Z. & Yglesias E. (2005). Estudio para lograr la denominación de origen del “maíz blanco gigante Cusco del Valle Sagrado de los Incas Urubamba”. INDECOPI-Of. De Signos Distintivos.
- Macuri, E. R. (2016). Estudio de la diversidad fenotípica del maíz (*Zea mays* L.) en

lasierra baja y media del Perú [Tesis para optar el título de ingeniero agrónomo].  
Universidad Nacional Agraria La Molina.

- Maize Genetics and Genomics Database ([www.maizegdb.org/ssr.php](http://www.maizegdb.org/ssr.php)).
- Mangelsdorf P. (1986). El origen del maíz. *Investigación y Ciencia*. N°121. 64 – 71.
- Manrique .A. (1988). El maíz en el Perú. Fondo de Promoción de la Cultura Agraria, Banco Agrario del Perú. Ed. Edigraf, Lima, Perú. 276.
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M. M., Sanchez, J., Buckler, E., & Doebley, J. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6080-6084.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.052125199>
- Matsuoka, Y., Mitchell, S. E., Kresovich, S., Goodman, M., & Doebley, J. (2002). Microsatellites in Zea–variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(2), 436-450.  
<https://doi.org/10.1007/s001220100694>
- Matus-Cádiz, M. A., Hucl, P., & Dupuis, B. (2007). Pollen-mediated gene flow in wheat at the commercial scale. *Crop Science*, 47(2), 573-579.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci06.07.0441>
- Matus-Cadiz, M. A., Hucl, P., Horak, M. J., & Blomquist, L. K. (2004). Gene flow in wheat at the field scale. *Crop Science*, 44(3), 718-727.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci2004.7180>
- Medina A., Narro L., Chávez A. (2020). Cultivo de maíz morado (*Zea mays* L.) en zona altoandina de Perú: Adaptación e identificación de cultivares de alto rendimiento y contenido de antocianinas. *Sientia Agropecuaria*. 11(3): 291 – 299.  
[doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.01](https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.01)
- Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). (2013). Dinámica Agropecuaria 2004 –2013. Dirección General de Seguimiento y Desarrollo de Políticas. 72p.

- Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). (2019a). Observatorio de Commodities: Maíz Amarillo Duro. Lima, Perú.
- Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). (2019b). Panorama y perspectivas de la producción de carne de pollo en el Perú. Lima, Perú.
- Ministerio de Agricultura (MINAGRI).(2021). Perfil productivo y competitivo de los principales cultivos del sector. Recuperado de: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiZmM2NzYyMzYtMmVINi00NGI5LWEyOGMtOTAwMjI1YmQxMGQzliwidCI6IjdmMDg0NjI3LTdmNDAtNDg3OS04OTE3LTk0Yjg2ZmQzNWYzZiJ9>
- MINAM. (2016). Servicio de consultoría para el análisis sobre organismos y microorganismos del aire y suelo del maíz. Elaborado por Consorcio Eco Development Group SAC – Wilfredo Catalán Bazán. Dirección General de Diversidad Biológica – DGDB.117p. [https://bioseguridad.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/02/maiz\\_microsuelo\\_aire.pdf](https://bioseguridad.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/02/maiz_microsuelo_aire.pdf)
- MINAM. (2018). Línea de base de la diversidad genética del maíz peruano con fines de bioseguridad. Dirección General de Diversidad Biológica – Dirección de Recursos Genéticos y Bioseguridad. Ed. Ministerio del Ambiente, Lima – Perú. 146p.
- Molina M. C. (2011). Estudios citogenéticos evolutivos del género *Zea* [Tesis doctoral]. Universidad Politécnica de Valencia.
- Moeller, D. A., & Schaal, B. A. (1999). Genetic relationships among Native American maize accessions of the Great Plains assessed by RAPDs. *Theoretical and applied genetics*, 99(6), 1061-1067. <https://doi.org/10.1007/s001220051415>
- Mohammadi, S. A., & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. *Crop science*, 43(4), 1235-1248. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1235>
- Muhammad L. & Underwood E. (2004). The maiz agricultural context in Kenya pp: 21 – 56. In: Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms. Vol 1.

A case study of Bt Maize in Kenya. Hilbeck, A., D. Andow, Ed. 281pp.

- Mullis K. (1990). Reacción en cadena de la polimerasa. *Investigación y Ciencia*. N°165. 30 – 37.
- Nei Masatoshi. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583 – 590.
- Nei Masatoshi. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 106: 283 – 292.
- Novembre, J., & Stephens, M. (2008). Interpreting principal component analyses of spatial population genetic variation. *Nature genetics*, 40(5), 646-649. <https://doi.org/10.1038/ng.139>
- OECD (2006). "Section 3 - Maize (ZEA MAYS SUBSP. MAYS)", in Safety Assessment of Transgenic Organisms, Volume 1: OECD Consensus Documents, OECD Publishing, Paris.
- OGTR. (2008). The Biology of Zea mays L. ssp mays (maize or corn). Office of the Gene Technology Regulator, Department of Health, Australian Government
- Onishi, M., Matsuoka, T., Kodama, T., Kashiwaba, K., Futo, S., Akiyama, H., ... & Hino, A. (2005). Development of a multiplex polymerase chain reaction method for simultaneous detection of eight events of genetically modified maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(25), 9713-9721. <https://doi.org/10.1021/jf0515476>
- Ortiz-García, S., Ezcurra, E., Schoel, B., Acevedo, F., Soberón, J., & Snow, A. A. (2005). Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico (2003–2004). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(35), 12338-12343. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503356102>
- Ortiz R., Engels J. (2004). Genebank management and the potential role of molecular genetics to improve the use of conserved genetic diversity. In de Vicente, MC (ed.). The evolving role of genebanks in the fast-developing field of molecular



genetics.Rome, Italy. Genetic Resources 11:8-12.  
[https://www.researchgate.net/publication/236668218\\_Genebank\\_management\\_and\\_the\\_potential\\_role\\_of\\_molecular\\_genetics\\_to\\_improve\\_the\\_use\\_of\\_conserved\\_genetic\\_diversity](https://www.researchgate.net/publication/236668218_Genebank_management_and_the_potential_role_of_molecular_genetics_to_improve_the_use_of_conserved_genetic_diversity)

- Ortiz, R., Crossa, J., Franco, J., Sevilla, R., & Burgueño, J. (2008). Classification of Peruvian highland maize races using plant traits. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(1), 151-162. <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9224-7>
- Ortiz, R., Sevilla, R., Alvarado, G., & Crossa, J. (2008). Numerical classification of related Peruvian highland maize races using internal ear traits. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(7), 1055-1064. <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9312-3>
- Pla M., La Paz J., Peñas G., García N., Palauelmas M., Esteve T., Messeguer J. & Melé E. (2006). Assessment of real-time PCR based methods for quantification of pollen-mediated gene flow from GM to conventional maize in a field study. *Transgenic Research*. 15: 219-228. DOI 10.1007/s11248-005-4945-x
- Peña R. (2017). Variables morfológicas y análisis molecular para la identificación de razas colombianas de maíz (*Zea mays* L.). [Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Colombia]. 92p.
- Perales H, Golicher D (2014) Mapping the Diversity of Maize Races in Mexico. *PLoS ONE* 9(12): e114657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114657>
- Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P. (2006). DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin>
- Piercé B., & Freeman W.H. (2017). *Genetics: A conceptual approach*. New York : W.H.Freeman/Macmillan Learning.
- Pineda-Hidalgo, K. V., Méndez-Marroquín, K. P., Alvarez, E. V., Chávez-Ontiveros, J., Sánchez-Peña, P., Garzón-Tiznado, J. A., ... & López-Valenzuela, J. A. (2013). Microsatellite-based genetic diversity among accessions of maize landraces from Sinaloa in México. *Hereditas*, 150(4-6), 53-59.  
<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2013.00019.x>

- PIÑEYRO-NELSON, A., Van Heerwaarden, J., Perales, H. R., SERRATOS-HERNÁNDEZ, J. A., Rangel, A., Hufford, M. B., ... & Álvarez-Buylla, E. R. (2009). Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular ecology*, 18(4), 750-761. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03993.x>
- Piperno, D. R., Ranere, A. J., Holst, I., Iriarte, J., & Dickau, R. (2009). Starch grain and phytolith evidence for early ninth millennium BP maize from the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), 5019-5024. DOI: 10.1073/pnas.0812525106
- Poehlman J., Sleper D.A. (2003). Mejoramiento genético de las cosechas. Ed. Limusa S.A. Mexico.
- Poggio L., Gonzales G. 2014. Congreso y reuniones científicas: La citogenética, clásica y molecular, revela una compleja historia evolutiva en maíz y teosintes. A 50 años del híbrido maíz forrajero perenne. A 45 años de la fundación de la Sociedad Argentina de Genética. Hurlingham, Buenos Aires.  
[https://www.conicet.gov.ar/new\\_scp/detalle.php?keywords=&id=20808&congresos=yes&detalles=yes&congr\\_id=5215885](https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=20808&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=5215885)
- Pressoir, G., & Berthaud, J. (2004). Patterns of population structure in maize landraces from the Central Valleys of Oaxaca in Mexico. *Heredity*, 92(2), 88-94. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800387>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000a). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945–959.
- Quispe J. (2015). Desarrollo de una línea base molecular para la evaluación del flujogénico entre maíz amarillo duro (*Zea mays* L. var. *Indurata*) y el amiláceo (*Zea mays* L. var. *Amylacea*). [Tesis Magister Scientiae en Ecología Aplicada. Universidad Nacional Agraria La Molina]. Lima – Perú.
- Ribaut J., & Hoisington D. (1998). Marker-assisted selection new tools and strategies. *Trends Plant Science*, 3:236-239

- Ritala, A., Nuutila, A. M., Aikasalo, R., Kauppinen, V., & Tammissola, J. (2002). Measuring gene flow in the cultivation of transgenic barley. *Crop Science*, 42(1), 278-285.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci2002.2780>
  - Rief J.C., Warburton M., Xia X., Hoisington D., Crossa J., Taba S., Muminovic J., Bohn M., Frisch M., Melchinger A. (2006). Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers. *Theoretical Applied Genetics*. 113: 177 – 185. DOI 10.1007/s00122-006-0283-5
  - Rimache M. (2008). Cultivo del Maíz. Lima. Ed. Macro. 1ra ed. P. 10 – 32.
  - Roberts L., Grant U., Ramirez R., Hatheway W., Smith D. & Mangelsdorf E. (1957). Races of maize in Colombia. National Academy of Science-National Research Council. Pub. 153. Washington DC.
- Rocandio-Rodríguez, M., Santacruz-Varela, A., Córdova-Téllez, L., López-Sánchez, H., Castillo-González, F., Lobato-Ortiz, R., & García-Zavala, J. J. (2014). Detection of genetic diversity of seven maize races from the high central valleys of Mexico using microsatellites. *Maydica*, 59(2014), 144-151.
- Rosenberg, N. A., Burke, T., Elo, K., Feldman, M. W., Freidlin, P. J., Groenen, M. A., Hillel, J., Maki-Tanila, A., Tixier-Boichard, M., Vignal, A., Wimmers, K., and Weigend, S. (2001). Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics*, 159:699–713
  - Rossini Pinto, L., Carneiro Vieira, M. L., Lopes de Souza, C., & Pereira de Souza, A. (2003). Genetic-diversity assessed by microsatellites in tropical maize populations submitted to a high-intensity reciprocal recurrent selection. *Euphytica*, 134(3), 277-286.  
<https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000004946.15260.4a>
  - Salhuana W., Valdéz A., Sheuch F., and Davelouis J.(2002). Universidad Nacional Agraria La Molina: Cincuenta años del Programa Cooperativo de Investigaciones en maíz (PCIM) 1953 - 2003. UNALM, Lima - Perú. 537p.

- Salhuana W. (2004). Diversidad y descripción de las razas de maíz del Perú. [https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/50301000/Races\\_of\\_Maize/Diversidad%20y%20razas%20de%20maiz%20en%20Peru.pdf](https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/50301000/Races_of_Maize/Diversidad%20y%20razas%20de%20maiz%20en%20Peru.pdf)
- Sánchez G., Stuber JJC. & Goodman M. (2000b). Isozymatic diversity in the races of maize of the Americas. *Maydica* **45**: 185– 203.
- Santos L., Andueza R., Ruiz E., Latournerie L., Garruña R., Mijangos-Cortes J., Castillo J. (2017). Characterization of the genetic structure and diversity of maize (*Zea mays* L) landrace populations from Mexico. *Maydica*, [S.I.], 62, 2, p. 7. <<https://journals-crea.4science.it/index.php/maydica/article/view/1576>
- Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., ... & Presting, G. G. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *science*, 326(5956), 1112-1115. DOI: [10.1126/science.1178534](https://doi.org/10.1126/science.1178534)
- Schlotterer, C. (2004). The evolution of molecular markers—just a matter of fashion?. *Nature reviews genetics*, 5(1), 63-69.
- Segovia V., Machin A., Pérez M., Fuentemayor F. (1999). Origen, historia y evolución del maíz Venezolano. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). <http://www.ceniap.gov.ve/pbd/Monografias/maiz/orimaiz.htm>
- Sevilla R. (2005). Magnitud e impacto potencial de la liberación de organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales Caso: Maíz. p. 41-61. En O. Hidalgo; W. Roca; E.N.Fernandez-Northcote (eds.). Magnitud e impacto potencial de la liberación de organismos genéticamente modificados y sus productos comerciales: Casos Algodón, Leguminosas de grano, Maíz y Papa. Consejo Nacional del Ambiente. Lima, Perú.
- Sevilla R. (2016). Programa Subsectorial de Irrigaciones (PSI) [http://www.psi.gob.pe/wp-content/uploads/2016/03/biblioteca\\_exposiciones CULTIVO DEL -MAiZ.pdf](http://www.psi.gob.pe/wp-content/uploads/2016/03/biblioteca_exposiciones_CULTIVO_DEL_-MAiZ.pdf)
- Smith J., Chin E., Shu H., Smith O., Wall S., Mitchell S., Kresovich S., Ziegler J. (1997). An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparisons with data from RFLPS and pedigree. UPOV. Fourth Session,

Cambirdge, United Kingdom, march 11 to 13.

- Spooner, D. M., McLean, K., Ramsay, G., Waugh, R., & Bryan, G. J. (2005). A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *proceedings of the national academy of sciences*, 102(41), 14694-14699. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507400102>
- Stitzer, M. C., & Ross-Ibarra, J. (2018). Maize domestication and gene interaction. *New phytologist*, 220(2), 395-408.. <https://doi.org/10.1111/nph.15350>
- Stevens, W. E., Berberich, S. A., Sheckell, P. A., Wiltse, C. C., Halsey, M. E., Horak, M. J., & Dunn, D. J. (2004). Optimizing pollen confinement in maize grown for regulated products. *Crop Science*, 44(6), 2146-2153.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci2004.2146>
- Strickberger M. (1976). *Genética*. Ed. OMEGA S.A., Barcelona.
- Schnable P.S., Swanson-Wagner R.A. (2009) Heterosis. In: Bennetzen J.L., Hake S.C. (eds) *Handbook of Maize: Its Biology*. Springer, New York, NY.  
[https://doi.org/10.1007/978-0-387-79418-1\\_23](https://doi.org/10.1007/978-0-387-79418-1_23)
- Swanson-Wagner RA, DeCook R, Jia Y, Bancroft T, Ji T, Zhao X, Nettleton D, Schnable PS. (2009). Paternal dominance of trans-eQTL influences gene expression patterns in maize hybrids. *Science*. 20;326(5956):1118-20. doi: 10.1126/science.1178294. PMID: 19965432.
- Tian, F., Stevens, N. M., & Buckler, E. S. (2009). Tracking footprints of maize domestication and evidence for a massive selective sweep on chromosome 10. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(Supplement 1), 9979-9986. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901122106>
- Tripathi K. K. (2011). *Biology of Zea mays (Maize)*. (pp. 6 - 8). New Delhi. Department of Biotechnology, Ministry of Science & Technology, & Ministry of Environment and Forests
- Vallejo F., Estrada E. (2002). *Mejoramiento genético de plantas*. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Ed. Feriva S.A. Cali – Colombia . 404p

- van Etten, J., Fuentes López, M. R., Molina Monterroso, L. G., & Ponciano Samayoa, K. M. (2008). Genetic diversity of maize (*Zea mays* L. ssp. *mays*) in communities of the western highlands of Guatemala: geographical patterns and processes. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(2), 303-317. <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9235-4>
- Van Heerwaarden, J., Doebley, J., Briggs, W. H., Glaubitz, J. C., Goodman, M. M., Gonzalez, J. D. J. S., & Ross-Ibarra, J. (2011). Genetic signals of origin, spread, and introgression in a large sample of maize landraces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(3), 1088-1092. [doi.org/10.1073/pnas.1013011108](https://doi.org/10.1073/pnas.1013011108)
- Vigouroux Y., Mitchell S., Matsuoka Y., Hamblin M., Kresovich S., Smith J., Jaqueth J., Smith O., Doebley J. (2005). An Analysis of Genetic Diversity Across the Maize Genome Using Microsatélites, *Genetics*, Volume 169, Issue 3, páginas 1617–1630, <https://doi.org/10.1534/genetics.104.032086>
- Vigouroux, Y., Glaubitz, J. C., Matsuoka, Y., Goodman, M. M., Sánchez G, J., & Doebley, J. (2008). Population structure and genetic diversity of New World maize races assessed by DNA microsatellites. *American journal of botany*, 95(10), 1240-1253. <https://doi.org/10.3732/ajb.080009>
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Friters A., Pot J., Paleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Research*, 23(21): 4407–4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Wang Huai, Nussbaum-Wagler T., Li, B., Zhao, Q., Vigourous, Y., Faller, M., Bomblies-Yant, K., Lukens, L. & Doebley, J. (2005). The origin of the naked grains of maize. *Nature* 436: 714-719. <https://doi.org/10.1038/nature03863>
- Warburton, M. L., Xianchun, X., Crossa, J., Franco, J., Melchinger, A. E., Frisch, M., ... & Hoisington, D. (2002). Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. *Crop Science*, 42(6), 1832-1840. <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.1832>

- Warburton, M. L., Wilkes, G., Taba, S., Charcosset, A., Mir, C., Dumas, F., ... & Franco, J. (2011). Gene flow among different teosinte taxa and into the domesticated maize gene pool. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58(8), 1243-1261.  
<https://doi.org/10.1007/s10722-010-9658-1>
- Weaver R.F. (2012). *Molecular Biology*. 5th ed. McGraw-Hill. 892p.
- Weir B.S. (1990). *Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data*. Sinauer Associates, Inc Publishers, Sunderland Massachusetts.
- Wellhausen E., Fuentes A., Hernández A., & Mangelsdorf E. (1957). *Races of maize in Central America*. National Academy of Science-National Research Council. Pub.142. Washington DC.
- Wellhausen E., Roberts M., Hernández X., & Mangelsdorf E. (1952). *Races of maize in Mexico*. The Bussey Institution of Harvard University. Pub. 222.
- Wilkes H.G. (1979). Mexico and Central America as a centre for the origin of agriculture and the evolution of maize. *Crop Improvement*. 6(1): 1-18.
- Wright S. (1978). *Evolution and the genetics of populations*. Vol.4, variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago. 580p.
- Yeh F., Yang R., Boyle T., Ye Z., Mao J. (1997). POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.
- Zhao Q., Thuillet A., Uhlmann N., Weber A., Rafalski J., Allen S., Tingey S., Doebley J. (2008). The role of regulatory genes during maize domestication: evidence from nucleotide polymorphism and gene expression. *Genetics* 178(4): 2133-43. Doi: 10.1532/genetics.107.085506.