

## **Attività 4 - Caratterizzazione genetica del materiale coltivato**

### **4.1 Introduzione**

Lo zafferano è una specie triploide, sterile che non può essere migliorata mediante programmi di miglioramento genetico e pertanto viene riprodotta vegetativamente anno dopo anno dai cormi (Schmidt et al 2019). La moltiplicazione del cormo, tuttavia, non genera variazioni del genoma, ad eccezione di alcune mutazioni puntiformi che non sono facilmente rilevabili fenotipicamente. Nell'ultimo decennio, dato anche il ritrovato interesse per questa specie, sono stati usati diversi marcatori molecolari (RAPD, ISSR, AFLP e SSR) al fine di rilevare l'esistenza di un certo grado di diversità genetica (Rubio-Moraga et al, 2009; Nemati et al. 2012). Purtroppo le tecniche adottate, anche per la tipologia di riproduzione e di variabilità insita nei materiali, hanno prodotto risultati scadenti evidenziando l'esistenza di una limitata diversità genetica spesso non rilevabile nemmeno mediante marcatori molecolari. Nonostante questi risultati l'esistenza di una consistente variabilità fenotipica (fenologia, morfologia fiorale e caratteri produttivi) tra ecotipi di *Crocus sativus* coltivati in diverse aree geografiche ed in diverse condizioni climatiche è ampiamente riportata in letteratura (Baghalian et al., 2010; De-Los-Mozos-Pascual et al., 2010; Fernandez et al., 2011). Caratteri come lunghezza, peso secco e resa degli stimmi, numero di fiori, numero e peso fresco dei bulbi figli, peso secco delle foglie, potrebbero quindi essere influenzati dall'origine geografica dei bulbi e dall'ambiente di coltivazione. A questo proposito è stato riportato che ricercatori e coltivatori di zafferano hanno spesso osservato nei campi la presenza di variazioni fenotipiche instabili e reversibili come piante con un diverso numero di stimmi o con un diverso aspetto dei tepali (Fernández, 2004). E' noto che eventi stressanti e di adattamento possono indurre cambiamenti dell'espressione genica, talvolta ereditabili, spesso reversibili e collegati a meccanismi epigenetici di modificazioni istoniche e di cambiamenti di metilazione delle citosine.

Tutto ciò lascia ipotizzare che l'impiego di tecniche di analisi del DNA, come il sequenziamento, più sofisticate dei marcatori molecolari e in grado di rilevare differenze di singole basi e quindi anche piccole mutazioni puntiformi, possano fornire molte informazioni a livello genetico e risolvere le problematiche e le criticità nella rilevazione della variabilità genetica di questa specie.

Pertanto, la caratterizzazione genetica è stata condotta mediante analisi SNPs (polimorfismo del singolo nucleotide) usando la metodica MCSeEd (Methylation Context Sensitive Enzyme ddRAD), una tecnica di analisi dell'intero genoma basata su NGS (next generation sequencing) che permette di individuare differenze sia dello stato di metilazione dei vari individui e dei vari tessuti sia differenze di singole basi nel genoma.

### **4.2 - Collezione dei materiali vegetali**

L'indagine molecolare è stata condotta su materiale vegetale proveniente dalle aziende agrarie dei diversi partners del progetto PSR "Zafferano Puro e Certo", dalla World Saffron and Crocus Collection (WSCC) sita nella Banca del Germoplasma di Cuenca (Spagna), dal campo sperimentale del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali di Perugia (DSA3), dal WSCC, da cormi gentilmente concessi dal Dr. M. Busconi della Facoltà di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza e dal Dr. I. Yousefi Javan del Department of Plant Production, Faculty of Agriculture, University of Torbat Heydarieh, Torbat Heydarieh, Iran.

Le foglie delle accessioni di zafferano (*Crocus sativus*) sono state raccolte al raggiungimento dei 10 cm di lunghezza, poste in buste separate, contrassegnate con il codice del campione e conservate a -80°C presso il Laboratorio di Genetica e Biotecnologie Genetiche Agrarie del DSA3 (Tabella 1). Unica eccezione ha riguardato l'azienda Le Fontanelle che non avendo cormi aziendali, causa problematiche imputabili sia ad attacchi fungini sia di roditori, ed avendo utilizzato i cormi

acquistati presso l'azienda Mazzuoli anch'essa partner del progetto si è ritenuto di non caratterizzarne i cormi.

**Tabella 15.** Elenco dei materiali vegetali campionati ed analizzati

| Campione N° | Codice Laboratorio | Accessioni                            | Sito origine                 | Paese     | Collezione |
|-------------|--------------------|---------------------------------------|------------------------------|-----------|------------|
| Z_1         | MOR_3              | Società Agricola RO.LO.               | Foligno (PG)                 | ITALIA    |            |
| Z_2         | MOR_4              | Società Agricola RO.LO.               | Foligno (PG)                 | ITALIA    |            |
| Z_3         | MOR_5              | Società Agricola RO.LO.               | Foligno (PG)                 | ITALIA    |            |
| Z_4         | VEN_2              | Azienda Agricola Brunozi Alfonsa      | Gualdo Tadino (PG)           | ITALIA    |            |
| Z_5         | VEN_4              | Azienda Agricola Brunozi Alfonsa      | Gualdo Tadino (PG)           | ITALIA    |            |
| Z_6         | VEN_5              | Azienda Agricola Brunozi Alfonsa      | Gualdo Tadino (PG)           | ITALIA    |            |
| Z_7         | FIN_1              | Azienda Agraria Porta Sole            | Perugia                      | ITALIA    |            |
| Z_8         | FIN_2              | Azienda Agraria Porta Sole            | Perugia                      | ITALIA    |            |
| Z_9         | FIN_5              | Azienda Agraria Porta Sole            | Perugia                      | ITALIA    |            |
| Z_10        | MAZ_1              | Azienda Agraria Mazzuoli              | Città della Pieve (PG)       | ITALIA    |            |
| Z_11        | MAZ_2              | Azienda Agraria Mazzuoli              | Città della Pieve (PG)       | ITALIA    |            |
| Z_12        | MAZ_4              | Azienda Agraria Mazzuoli              | Città della Pieve (PG)       | ITALIA    |            |
| Z_13        | GNP_2              | Società Agricola Zafferano e Dintorni | Sant'Anatolia di Narco (PG)  | ITALIA    |            |
| Z_14        | GNP_3              | Società Agricola Zafferano e Dintorni | Sant'Anatolia di Narco (PG)  | ITALIA    |            |
| Z_15        | GNP_4              | Società Agricola Zafferano e Dintorni | Sant'Anatolia di Narco (PG)  | ITALIA    |            |
| Z_16        | VNB_2              | Azienda Agricola Vinerbi              | Città della Pieve (PG)       | ITALIA    |            |
| Z_17        | VNB_3              | Azienda Agricola Vinerbi              | Città della Pieve (PG)       | ITALIA    |            |
| Z_18        | VNB_4              | Azienda Agricola Vinerbi              | Città della Pieve (PG)       | ITALIA    |            |
| Z_19        | LIP_1              | Alfonsi Annamaria                     | Nocera Umbra (PG)            | ITALIA    |            |
| Z_20        | LIP_2              | Alfonsi Annamaria                     | Nocera Umbra (PG)            | ITALIA    |            |
| Z_21        | LIP_4              | Alfonsi Annamaria                     | Nocera Umbra (PG)            | ITALIA    |            |
| Z_22        | BRS_1              | Bariscano                             | Barisciano (AQ)              | ITALIA    | DSA3       |
| Z_23        | BRS_3              | Barisciano                            | Barisciano (AQ)              | ITALIA    | DSA3       |
| Z_24        | BRS_4              | Barisciano                            | Barisciano (AQ)              | ITALIA    | DSA3       |
| Z_25        | BSC_1              | Busconi                               |                              | ITALIA    |            |
| Z_26        | BSC_2              | Busconi                               |                              | ITALIA    |            |
| Z_27        | BSC_3              | Busconi                               |                              | ITALIA    |            |
| Z_28        | TURC_1             | BCU002472                             | Davutobasi (Safranbolu)      | TURCHIA   | WSCC       |
| Z_29        | TURC_3             | BCU002472                             | Davutobasi (Safranbolu)      | TURCHIA   | WSCC       |
| Z_30        | TURC_4             | BCU002472                             | Davutobasi (Safranbolu)      | TURCHIA   | WSCC       |
| Z_31        | IRANa_1            | BCU001695                             | Ferdos (Khorasan)            | IRAN      | WSCC       |
| Z_32        | IRANa_2            | BCU001695                             | Ferdos (Khorasan)            | IRAN      | WSCC       |
| Z_33        | IRANa_4            | BCU001695                             | Ferdos (Khorasan)            | IRAN      | WSCC       |
| Z_34        | IND_2              | WSCC                                  | AMELIA                       | INDIA     | WSCC       |
| Z_35        | IND_3              | WSCC                                  | AMELIA                       | INDIA     | WSCC       |
| Z_36        | IND_4              | WSCC                                  | AMELIA                       | INDIA     | WSCC       |
| Z_37        | FRNa_2             | BCU002479                             | Carsaj (Pirenei)             | FRANCIA   | WSCC       |
| Z_38        | FRNa_3             | BCU002479                             | Carsaj (Pirenei)             | FRANCIA   | WSCC       |
| Z_39        | FRNa_4             | BCU002479                             | Carsaj (Pirenei)             | FRANCIA   | WSCC       |
| Z_40        | FRNb_1             | BCU002864                             |                              | FRANCIA   | WSCC       |
| Z_41        | FRNb_2             | BCU002864                             |                              | FRANCIA   | WSCC       |
| Z_42        | FRNb_4             | BCU002864                             |                              | FRANCIA   | WSCC       |
| Z_43        | SPGa_1             | BCU001672                             | Monreal del Campo (Aragon)   | SPAGNA    | WSCC       |
| Z_44        | SPGa_4             | BCU001672                             | Monreal del Campo (Aragon)   | SPAGNA    | WSCC       |
| Z_45        | SPGa_3             | BCU001672                             | Monreal del Campo (Aragon)   | SPAGNA    | WSCC       |
| Z_46        | SPGb_1             | BCU001584                             | Minaya (Castillia la Mancha) | SPAGNA    | WSCC       |
| Z_47        | SPGb_3             | BCU001584                             | Minaya (Castillia la Mancha) | SPAGNA    | WSCC       |
| Z_48        | SPGb_14            | BCU001584                             | Minaya (Castillia la Mancha) | SPAGNA    | WSCC       |
| Z_49        | ARG_1              | BCU001751                             | Valle dell'Uco (Cuyo)        | ARGENTINA | WSCC       |
| Z_50        | ARG_2              | BCU001751                             | Valle dell'Uco (Cuyo)        | ARGENTINA | WSCC       |
| Z_51        | ARG_3              | BCU001751                             | Valle dell'Uco (Cuyo)        | ARGENTINA | WSCC       |
| Z_52        | GRCa_1             | BCU002911                             | Ano komi (Macedonia)         | GRECIA    | WSCC       |
| Z_53        | GRCa_3             | BCU002911                             | Ano komi (Macedonia)         | GRECIA    | WSCC       |
| Z_54        | GRCa_4             | BCU002911                             | Ano komi (Macedonia)         | GRECIA    | WSCC       |
| Z_55        | GRCb_1             | BCU002930                             | Maguola (Macedonia)          | GRECIA    | WSCC       |
| Z_56        | GRCb_1             | BCU002930                             | Maguola (Macedonia)          | GRECIA    | WSCC       |
| Z_57        | GRCb_1             | BCU002930                             | Maguola (Macedonia)          | GRECIA    | WSCC       |
| Z_58        | GG_1               | GG                                    | Gorgain                      | IRAN      |            |
| Z_59        | GG_3               | GG                                    | Gorgain                      | IRAN      |            |
| Z_60        | GG_5               | GG                                    | Gorgain                      | IRAN      |            |
| Z_61        | 4_10_3             | 4_10                                  | Ghasabeh (Khorasan)          | IRAN      |            |
| Z_62        | 4_10_4             | 4_10                                  | Ghasabeh (Khorasan)          | IRAN      |            |
| Z_63        | 8_15_1             | 8_15                                  | Gonabad (Khorasan)           | IRAN      |            |
| Z_64        | 8_15_3             | 8_15                                  | Gonabad (Khorasan)           | IRAN      |            |
| Z_66        | 4_3_1              | 4_3                                   | Ghasabeh                     | IRAN      |            |

L'estrazione del DNA è stata realizzata mediante l'utilizzo del kit commerciale GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep (*Sigma Aldrich*). La procedura di estrazione è stata sviluppata seguendo il protocollo standard indicato dalla casa produttrice. Il ricorso a kit commerciali per l'estrazione di DNA garantisce un livello elevato di purezza dello stesso ed elevata omogeneità dei quantitativi estratti. La presenza, la concentrazione e la qualità del DNA estratto, è stata verificata mediante un'elettroforesi su gel di agarosio all'1.0 % e successiva lettura spettrofotometrica mediante Nanodrop (*ThermoScientific*).

In un secondo tempo si è proceduto ad un ulteriore quantificazione dei campioni mediante fluorimetro Qubit (*Invitrogen*). Lo strumento permette di misurare gli acidi nucleici e le proteine mediante la fluorescenza emessa da specifici fluorocromi che si legano quantitativamente alle diverse molecole. La sensibilità di questo strumento è molto più elevata e precisa rispetto a quella dello spettrofotometro e quindi più idoneo per misurare la concentrazione degli acidi nucleici di campioni da analizzare con tecniche costose come gli SNPs.

Sulla base dei dati ottenuti i singoli campioni di DNA sono stati diluiti ad una concentrazione di 300 ng/30µl e conservati in congelatore a -20° C.

Per l'analisi SNPs è stata usata la metodica MCSed che combina una doppia digestione con un enzima di restrizione sensibile alla metilazione, che nel nostro caso è stato *PstI*, e un enzima di restrizione insensibile alla metilazione (*MseI*). Poiché gli enzimi sensibili alla metilazione non possono digerire i siti metilati, ci si aspetta di saggiare regioni del genoma non ripetute incrementando di molto la possibilità di indentificare polimorfismi tra gli individui oggetto di analisi. MCSed consente di rilevare sia i cambiamenti di metilazione del DNA che di isolare SNP senza l'utilizzo del genoma di riferimento ed è grazie a questa strategia che si è potuta effettuare l'analisi genetica visto che il genoma di zafferano non è stato ancora reso disponibile alla comunità scientifica.

#### 4.2 - Risultati

I frammenti di DNA (*read*) ottenuti dal sequenziamento Illumina delle librerie sono stati demultiplexati per mezzo del *process\_radtags tool* (STACKS v.1.19 package, Catchen et al., 2013) grazie alla sequenza barcode di 7bp che identifica in modo univoco il singolo individuo. Le sequenze di ogni libreria sequenziata sono state quindi analizzate con un approccio "genome-independent" cioè senza mappatura su un genoma di riferimento. Il genoma di *C. sativus* è stato sequenziato da pochi mesi ma purtroppo non è ancora disponibile e quindi non è ancora possibile assegnare gli SNP ottenuti nel presente lavoro ai rispettivi cromosomi.

Dall'analisi dei dati delle sequenze del DNA è stato possibile individuare circa 360.000 loci SNP che dopo successivi filtri per qualità, dati mancanti e coverage di sequenziamento del polimorfismo si sono ridotti fino a circa **55 mila**. I dati così ottenuti sono stati analizzati mediante pacchetto adegenet implementato in R con procedure che hanno messo in evidenza la distribuzione sul piano dei principali marcatori genetici precedentemente isolati (test PCA, Figura 1) e la struttura genetica (test DAPC, Figura 2). I test genetici sopraindicati hanno evidenziato una variabilità genetica molto ridotta tale assunzione è dimostrata dal test PCA (Figura 1) dove oltre 50 dei 65 campioni analizzati sono stati raggruppati nella parte sinistra del grafico non mostrando differenze significative tra di loro. I restanti presentano minime differenze significative che li colloca sulla parte destra del grafico. In particolare, in questa parte sono stati raggruppati prevalentemente alcuni genotipi provenienti da Iran, India, Grecia, Spagna, Argentina e Francia. Inoltre, nello stesso raggruppamento sono presenti anche 2 dei 27 individui appartenenti alle accessioni italiane denominati BSC\_3 e BRS\_1 (Figura 1). La figura 2 mette in luce la struttura genetica di ogni singolo individuo appartenente alle popolazioni prese in esame dal progetto. Quello che emerge, considerando inizialmente le popolazioni italiane, è che la loro struttura genetica è piuttosto uniforme e anche se ci sono almeno 6 su 27 che presentano polimorfismi genetici che li rendono più simili a quelle spagnole e argentine (riferirsi ai colori della figura 2). Le accessioni più uniformi sono state quelle francesi mentre un certo grado di variabilità è evidenziabile in tutte le altre

accessioni di non italiane in particolare tra quelle turche, greche e indiane. Ad esempio se si considerano le accessioni indiane è stato possibile evidenziare come le tre accessioni hanno differenze genetiche condivise con genotipi provenienti da Grecia (marrone) ed Iran (verde).

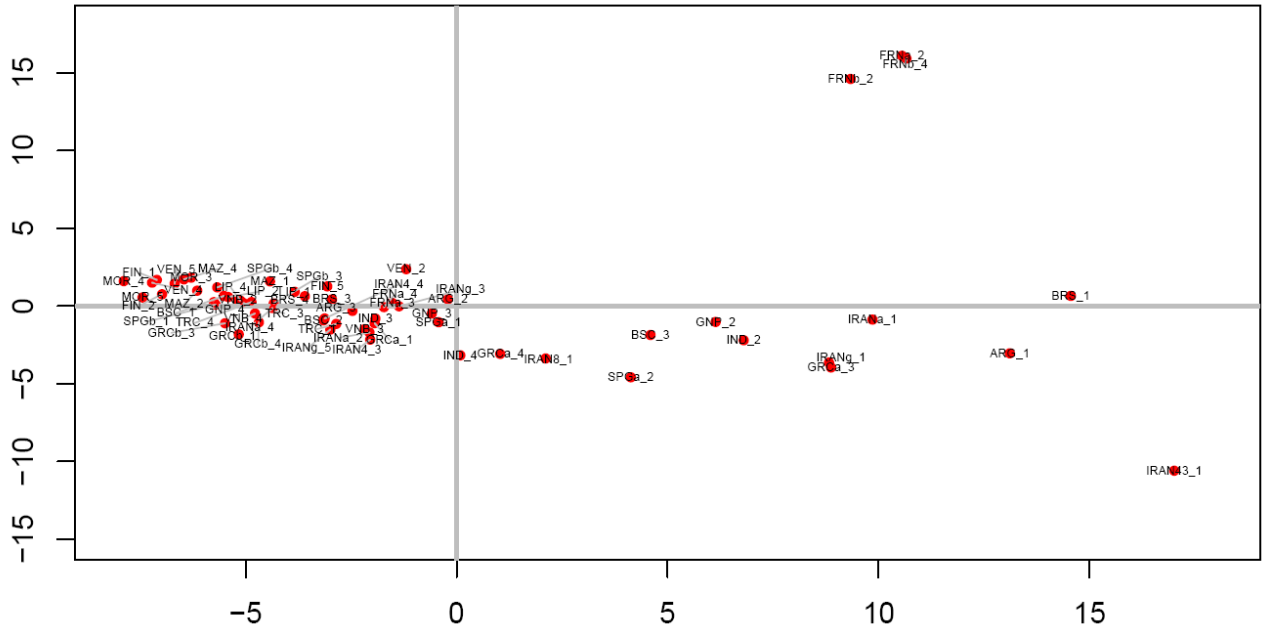


Figura 1 Analisi delle componenti principali sfruttando i circa 55.000 polimorfismi genetici identificati. Ogni pallino rosso rappresenta un singolo individuo dei 65 analizzati.

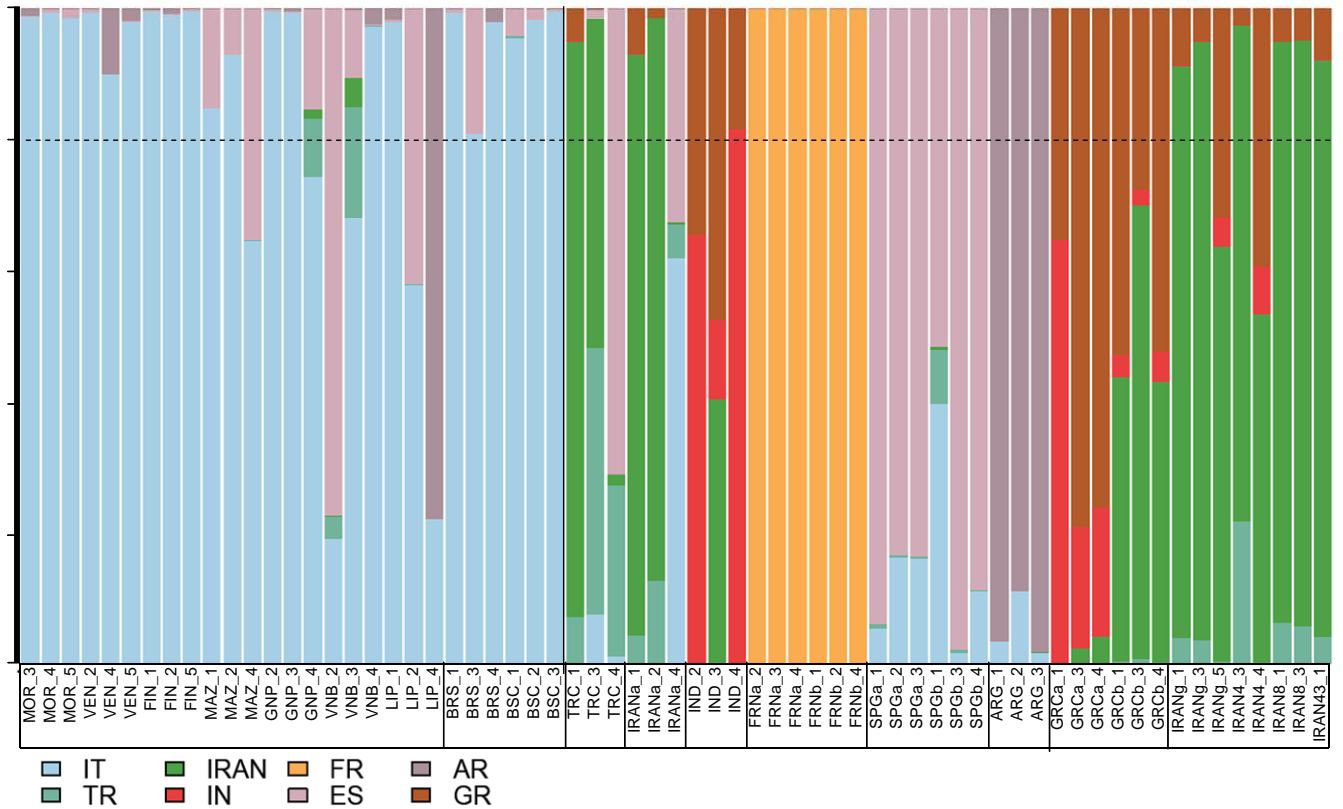


Figura 2. Analisi della struttura genetica delle 8 popolazioni oggetto di analisi.

Dei totali **55 mila SNP**, **53** sono risultati specifici delle accessioni italiane provenienti sia dalle aziende partecipanti al PSR che dalle due accessioni di controllo, Barisciano e Busconi (Tab. 15). Purtroppo **nessuno SNP tra quelli specifici è presente in tutte le accessioni italiane e assente in tutti gli altri campioni provenienti dagli altri Paesi**.

Ai fini di un loro utilizzo applicativo i marcatori specifici SNP di cui sopra potranno essere trasformati in marcatori facilmente utilizzabili per la tracciabilità dei prodotti umbri e italiani in generale. Tuttavia, allo scopo di completare il lavoro del presente progetto e trovare un metodo che sfruttasse i polimorfismi specifici presenti solo nelle accessioni italiane è stata condotta un'analisi discriminante, codificando i marcatori SNP, diallelici, in 0-1-2 per indicare per ognuno dei 53 marcatori i polimorfismi a ciascun locus in questo modo: 0=omozigote per l'allele di riferimento; 1=eterozigote con l'allele alternativo; 2=omozigote per l'allele alternativo.

La matrice dei dati molecolari così semplificata è stata analizzata mediante analisi discriminante utilizzando il software SAS. La procedura stepwise ha scartato 41 "marcatori" mantenendone 12, utilizzati in diverse procedure discriminanti non-parametriche poiché per la loro tipologia i dati non possono essere considerati normalmente distribuiti. Per le analisi sono stati utilizzati diversi metodi basati su altrettanti algoritmi: Nearest Neighbour con  $k=1$  e  $K=2$ , Metodo Kernel e Metodo Epanechnikov-Kernel. I risultati ottenuti da tutti i metodi impiegati sono risultati tra loro coerenti. La Tabella 16 riporta la riclassificazione dei singoli individui sulla base delle funzioni discriminanti. Dalla tabella è possibile notare che i tre individui per accessione sono stati tutti correttamente riclassificati nelle rispettive accessioni di appartenenza, tranne per LIP (accessione Alfonsi) e BSC (Buscone). Confrontando questi risultati con quelli rappresentati graficamente in Figura 2, ottenuti con procedure diverse su tutti i campioni analizzati, è possibile notare che il profilo dei tre corredi dell'accessione LIP siano notevolmente diversi tra loro, e alcuni di essi simili ad accessioni provenienti da altri Paesi.

Tabella 16: Numero di individui (e percentuale) riclassificati in base alle funzioni discriminanti

| da / in | BRS        | BSC      | FIN        | GNP        | LIP      | MAZ        | MOR        | VEN        | VNB        | Altre      | Totale     |
|---------|------------|----------|------------|------------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| BRS     | 3<br>(100) | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 3<br>(100) |
| BSC     | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 3<br>(100) | 3<br>(100) |
| FIN     | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 3<br>(100) | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 3<br>(100) |
| GNP     | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 3<br>(100) | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 3<br>(100) |
| LIP     | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 3<br>(100) | 3<br>(100) |
| MAZ     | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 3<br>(100) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 3<br>(100) |
| MOR     | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 3<br>(100) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 3<br>(100) |
| VEN     | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 3<br>(100) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 3<br>(100) |
| VNB     | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0) | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 0<br>(0)   | 3<br>(100) | 0<br>(0)   | 3<br>(100) |

Al fine di rendere più comprensibile il risultato dell'analisi, nella Tabella 17 è riportata la matrice dei dati analizzati. Dalla matrice è possibile individuare facilmente la specificità dei tre genotipi appartenenti alla accessione MOR: sono tutti 1, eterozigoti GA al marcatore m008, e tutti 0, omozigoti per la base di riferimento in tutti gli altri marcatori; MAZ differisce da MOR al marcatore m031, tutti 1, eterozigoti GT, e tutti 0 per gli altri. VNB ha lo stesso profilo di MAZ al marcatore m031, ma differisce da questa accessione al marcatore m033. L'analisi utilizza anche combinazioni da diversi marcatori (vedi i profili di VEN e FIN). Infine, LIP e BSC hanno lo stesso profilo ed è per questo motivo che l'analisi discriminante non è riuscita a riclassificarli correttamente (vedi Tab. 16).

Tabella 17: Matrice dei marcatori utilizzati nell'analisi discriminante. In alto la base azotata di riferimento e quella alternativa presente in ciascuno polimorfismo SNP (marcatore indicato con **m** e un numero di riferimento). A sinistra i codici delle accessioni.

|    |     |     | Riferimento |      | G    |      | T    |      | G    |      | T    |      | T    |      | G |  | G |  |
|----|-----|-----|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|--|---|--|
|    |     |     | Alternativo |      | T    |      | A    |      | G    |      | T    |      | G    |      | A |  | T |  |
| N  | Pop | Bib | m006        | m008 | m013 | m027 | m028 | m030 | m031 | m032 | m033 | m036 | m041 | m051 |   |  |   |  |
| 1  | MOR | 3   | 0           | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 2  | MOR | 4   | 0           | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 3  | MOR | 5   | 0           | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 4  | MAZ | 1   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 5  | MAZ | 2   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 6  | MAZ | 4   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 7  | GNP | 2   | 0           | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 2    |   |  |   |  |
| 8  | GNP | 3   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 1    | 1    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 9  | GNP | 4   | 0           | 1    | 0    | 0    | 0    | 2    | 1    | 0    | 1    | 2    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 10 | VNB | 2   | 0           | 0    | 1    | 0    | 2    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 11 | VNB | 3   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 12 | VNB | 4   | 0           | 1    | 0    | 0    | 2    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 13 | VEN | 2   | 0           | 1    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 14 | VEN | 4   | 1           | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 15 | VEN | 5   | 0           | 1    | 2    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 16 | FIN | 1   | 2           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 17 | FIN | 2   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 1    |   |  |   |  |
| 18 | FIN | 5   | 0           | 0    | 0    | 2    | 0    | 1    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 19 | LIP | 1   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 20 | LIP | 2   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 21 | LIP | 4   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 22 | BRS | 1   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |   |  |   |  |
| 23 | BRS | 3   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |   |  |   |  |
| 24 | BRS | 4   | 0           | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |   |  |   |  |
| 25 | BSC | 1   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 26 | BSC | 2   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |
| 27 | BSC | 3   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |   |  |   |  |