

Caratterizzazione molecolare di antiche cultivar di melo (*Malus pumila* Miller, Rosaceae) del Sud Italia

P. CENAMO¹, O. DE CASTRO², L. PAINO²

¹Facoltà di Lettere, Università degli Studi Suor Orsola Benincasa di Napoli, Via Santa Caterina 37, 80135 Napoli. ²Dipartimento delle Scienze Biologiche, Sezione di Biologia Vegetale, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Foria 223, 80139 Napoli.
paola.cenamo@unisob.na.it

Riassunto. Due antiche cultivar di *Malus pumila* Miller (Rosaceae) del Sud Italia, chiamate “Mela Gelata” e “Mela Limoncella”, sono scomparse dal mercato e sono in via di estinzione. È stato condotto uno studio sulla variabilità genetica delle due varietà utilizzando marcatori nucleari (ITS-Internal Transcribed Spacer) e plastidiali (*trnS-G*) al fine di conoscere il loro patrimonio genetico e di favorirne il recupero e la riutilizzazione commerciale.

Abstract. Two ancient cultivars of *Malus pumila* Miller (Rosaceae) from Southern Italy, called “Mela Gelata” and “Mela Limoncella,” have disappeared from markets and are in danger of extinction. An analysis of the genetic variability of the two varieties using nuclear and plastid markers was carried out in order to understand the genetic heritage of the two varieties and to assist with their conservation and commercial use.

Key words: Apple, Conservation, *Malus pumila*, Useful plants

I meli sono originari delle regioni transcaucasiche e sono diffusi in moltissime parti del mondo (JUNIPER & MABBERLEY 2006). La specie selvatica più conosciuta in Occidente è *Malus pumila* Miller (Rosaceae), da cui sono state ottenute gran parte delle varietà di mele presenti sul nostro mercato.

Il melo produce frutti le cui dimensioni e colore cambiano a seconda delle numerosissime varietà coltivate. Oltre che per il consumo fresco, le mele sono utilizzate dall'industria per la produzione di marmellate, succhi, gelatine e altri prodotti alimentari.

Il frutto del melo da sempre è simbolo di prosperità e vita ed è anche il “pomo” di tante narrazioni, dal giardino dell'Eden alla Guerra di Troia, della quale sarebbe stata la causa. IPOCRATE (1994) cita la mela più volte nel *Corpus Hippocraticum*. Nell'*Historia Plantarum*, TEOFRASTO (1990) descrive sei varietà di

meli e il loro ciclo vitale: dalla cura dell'albero, alla fioritura, raccolta e utilizzo. Altre testimonianze delle coltivazioni di melo ai tempi dell'Antica Roma provengono dal *De Agri Cultura* di CATONE (1979) e dal *De Re Rustica* di VARRONE (1952). Plinio il Vecchio (PLINIO 1988) dedica la parte centrale della sua *Naturalis Historia* alla botanica, descrivendo ampiamente il melo.

La nomenclatura del genere *Malus* Tournefort ex Linneo è estremamente complessa. La difficoltà nel delimitare le specie all'interno del genere è stata ampiamente investigata da ROHRER *et al.* (1994). I caratteri morfologici utilizzati per delimitare le specie e le sottospecie di *Malus* cambiano di continuo ed in alcuni casi si sovrappongono, entrando in contraddizione tra di loro (HARRIS *et al.* 2002). La maggior parte degli autori concorda nell'affermare che le cultivar di melo derivano da *Malus*

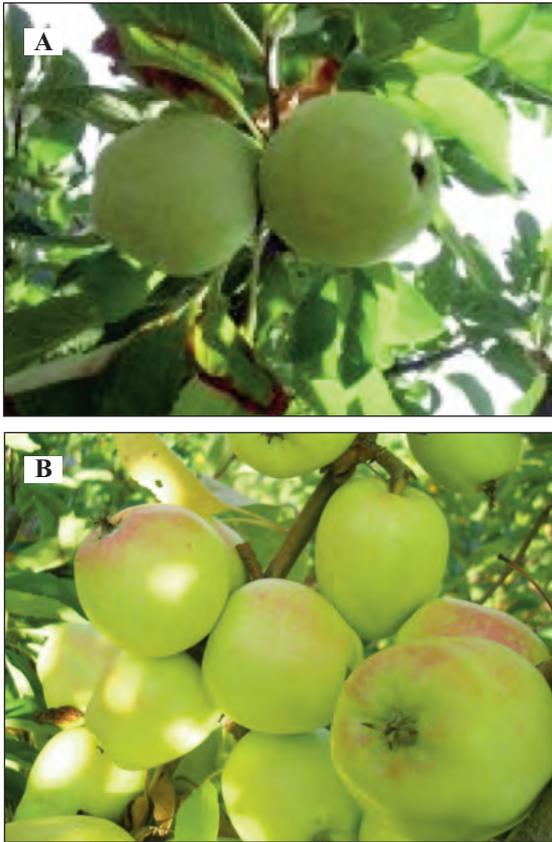


Fig. 1 - A: Mela Gelata. B: Mela Limoncella.

pumila o da incroci tra quest'ultima e altre specie, quali *Malus sieversii* (Mill.), *M. orientalis* (Uglitzk.) e *M. sylvestris* (Mill.), tutte provenienti dall'Europa o dall'Asia (FORSLINE *et al.* 2003).

Negli ultimi decenni sono stati effettuati numerosi studi di carattere genetico col fine di valutare l'origine delle cultivar. Studi sulla variabilità di tratti geneticamente informativi sono stati affrontati utilizzando differenti tecniche di biologia molecolare che miravano non solo a determinare i tratti caratteristici del genoma di ogni cultivar ma anche ad individuarne i progenitori. Tra le tecniche di biologia molecolare più usate citiamo quelle che si basano sullo studio dei frammenti di restrizione (RFLP), dei polimorfismi di lunghezza di frammenti amplificati (AFLP), del DNA satellitare (SSR) o del sequenziamento di tratti del genoma, utilizzati anche per l'analisi di alberi da frutta (COART *et al.* 2006). L'uso di queste metodologie implica uno studio comparativo al fine di scegliere il marcatore del genoma (nucleare o plastidiale) che meglio risponde

alle esigenze dell'operatore.

Tutti questi studi molto spesso sono stati affrontati nell'ambito di programmi di salvaguardia del genoma delle varietà di melo col fine di fornire informazioni su antiche varietà abbandonate con buone caratteristiche organolettiche, resistenza alle malattie e quindi utili per fornire risorse genetiche autoctone da sfruttare anche a fini commerciali.

Con la stessa finalità, il presente lavoro ha intrapreso lo studio di due varietà di *Malus pumila* tipiche del Sud Italia, la "Mela Gelata" e la "Mela Limoncella" (Fig. 1) (TAMARO 1929). Queste varietà sono attualmente confinate in piccole nicchie del territorio italiano a coltivazioni regionali a causa di ragioni prettamente economiche che hanno favorito la commercializzazione di cultivar non locali, come la Golden e la Red Stark Delicious. Al fine di valutare la diversità genetica delle due cultivar del Sud Italia abbiamo esaminato il DNA nucleare e plastidiale di esemplari di entrambe le cultivar provenienti dalla Basilicata, dalla Calabria e dalla Campania.

La "Mela Gelata" e la "Mela Limoncella"

La Mela Gelata è diffusa nel Centro e Sud Italia ed è stata citata da GALLESIO (1817-1839) nel suo trattato sugli alberi da frutto "Pomona Italiana". Una Mela Gelata, detta anche Diacciata, con caratteristiche simili, è raffigurata nei quadri del Bimbi alla fine del XVII secolo e viene descritta dal Micheli, che ne riporta la caratteristica vitrescenza del frutto: "*maculis vitreis foris et intus notato*" (ROSATI *et al.* 2001). La Mela Gelata, con le sue diverse denominazioni locali, Cerina, Oleata, Diacciata e Cera, è caratterizzata da una polpa con zone vitrescenti e da una buccia cerosa, caratteri che hanno probabilmente determinato le varie denominazioni locali attribuitele. Un altro sinonimo è anche Iaccia, denominazione ancora oggi utilizzata in Molise.

La Mela Gelata non è inserita nel vasto elenco di cultivar dello storico Manuale dell'Agronomo (TASSINARI 1976); una recensione appare in VIRGILI & NERI (2002), anche se fino al 1964 rappresentava il 20% della produzione in Abruzzo e Molise ed il 9% di quella sicilia-

na. È in commercio presso vivaisti delle Marche e dell'Abruzzo. In alcuni frutteti specializzati o presso coltivatori amatori della Basilicata e della Calabria sono presenti ancora alcuni esemplari di Mela Gelata. Essendo questi pochissimi esemplari generalmente vecchi, poco curati e senza alcun programma per una loro moltiplicazione, attualmente la cultivar può definirsi in via di estinzione

La Mela Limoncella può essere considerata un'antica e pregiata cultivar di origine campana, ancora diffusa in diverse aree dell'Italia meridionale. Era coltivata su vasta scala fino ai primi dell'Ottocento. In seguito, gli agricoltori locali si trovarono impreparati a fronteggiare le malattie tipiche alle quali va soggetto il melo (tortrice, rodilegno) causandone la scomparsa. Gli alberi divennero molto meno produttivi ed i contadini iniziarono a sostituirli con quelli di nocciolo. La ripresa della coltivazione della Mela Limoncella viene attribuita all'albergatore tedesco Max Brandmayer all'inizio del Novecento, che nella sua proprietà nei pressi di Sant'Agata sui Due Golfi (Napoli), coltivava con successo gli alberi di melo con trattamenti biologici.

L'albero della Limoncella è a portamento assurgente e scarsamente vigoroso, mediamente sensibile alla ticchialatura e resistente all'oidio. Nell'Alta Val d'Agri (Potenza) è moltiplicato da pollone da piede e raramente innestato su franco. L'epoca della fioritura è intermedia (generalmente tra la prima e la seconda decade di maggio). Il frutto è piccolo, di forma molto variabile, da oblunga tronco-conico a strozzata e da asimmetrica a trasversale, con un peduncolo medio-corto di sottile spessore e a inserzione irregolare; la buccia è sottile ma resistente alla masticazione, che va dal giallo al giallo-verde chiaro a maturazione; il sovracoloro è assente; la polpa è bianca o color crema, traslucida, poco croccante, soda, mediamente succosa, a tessitura grossolana, di qualità medio-buona, sapore dolce, mediamente aromatica, torsolo piccolo, soggetta ad ammezzimento. Il giudizio di insieme la ritiene interessante ai fini produttivi, sia per la scarsa vigoria vegetativa sia per la conservabilità (si conserva in cantina fino a gennaio). La Limoncella ha anche una sottocategoria che è definita Limon-

cella Rossa o, secondo i nomi locali, "Lamuncedda rossa" o "Rimuncedda Rossa", che si differenzia dalla classica per una buccia sottile di colore verde intenso-verde chiaro, ma con un sovracoloro rosso vinoso al 70%.

ANALISI MOLECOLARI

Per le analisi molecolari sono state utilizzate foglie di Mela Gelata e Mela Limoncello provenienti da cultivar di Castelgrande (Potenza) in Basilicata, San Sosti (Cosenza) in Calabria e dal vivaio Dal Monte (Benevento) in Campania.

Tra la grande quantità di marcatori molecolari disponibili sono stati scelti un marcatore nucleare ITS1-ITS2 e marcatori plastidiali *trnS-G*; i primi spesso utilizzati per risolvere problematiche di filogenesi e per individuare eventuali specie ibridogene, i secondi per stabilire possibili relazioni tra le cultivar e poter individuare le linee parentali.

Il DNA genomico è stato isolato da giovani foglie utilizzando il protocollo proposto da DOYLE & DOYLE (1987). I tratti di genoma scelti sono stati amplificati attraverso l'utilizzo di termociclatori (PCR) e successivamente sequenziati per comparare le sequenze delle cultivar in esame con quelle già note in letteratura. La mix di reazione, per entrambi i marcatori, contiene 10 ng di DNA genomico. La PCR è stata condotta nelle seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 94 °C per 3 min, seguita da 30 cicli con denaturazione a 94 °C per 30 sec, annealing a 50 °C per 1 min, estensione a 72 °C per 1 min ed un'estensione finale a 72 °C per 3 min. I prodotti amplificati sono stati purificati e successivamente analizzati su sequenziatore automatico 3130 Applied Biosystems. I frammenti generati sono stati analizzati attraverso il software BioEdit (HALL 1999) e la banca dati BLASTA.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le lunghezze dei frammenti ottenute sono di 190 bp per l'ITS 1 e di 259 bp per l'ITS2, e di 645 bp per il *trnS-G*. Le sequenze di entrambi i marcatori sono state comparate attraverso l'ausilio del sistema operativo BLASTA con le

Mela Gelata	GGGCCTCCTG	GCCCGGCGTC	CCYTTCGTCC	CGGGAGCCCG	CTCCCGGGCG	TACAAACTTA
<i>M. domestica</i>	GGGCCTCCTG	GCCCGGCGTC	CCCTTCGTCC	CGGGAGCCCG	CTCCCGGGCG	TACAAACTTA
<i>M. pruinifolia</i>	GGGCCTCCTG	GCCCGGTGTC	CCTTTCGTCC	CGGGAGCCCG	CTCCCGGGCG	TACAAACTTA
	*****	*****	***	**	*****	*****
Mela Gelata	CACCGGCGCG	TGTTGCGCCA	AGGAATCTGA	ACGAAAGAGC	GCGCTCCCGC	CGCCCCGAA
<i>M. domestica</i>	CACCGGCGCG	TGTTGCGCCA	AGGAATCTGA	ACGAAAGAGC	GCGCTCCCGC	CGCCCCGAA
<i>M. pruinifolia</i>	CACCGGCGCG	TGTTGCGCCA	AGGAATCTGA	ACGAAAGAGC	GCGCTCCCGC	CGCCCCGAA
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Mela Gelata	W-GGTGCGCG	CGCGG-TGCG	TCGTGCTCTT	CGATAAATCA	AAACGACTCT	CGGCAACGGA
<i>M. domestica</i>	ACGGTGCGCG	CGCGGGTGCG	TCGTGCTCTT	CGATAAGTCA	AAACGACTCT	CGGCAACGGA
<i>M. pruinifolia</i>	A-GGTGCGCG	CGCGGGTGCG	TCGTGCTCTT	CGATAAGTCA	AAACGACTCT	CGGCAACGGA
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Mela Gelata	TATCTCGGCT	CTC				
<i>M. domestica</i>	TATCTCGGCT	CTC				
<i>M. pruinifolia</i>	TATCTCGGCT	CTC				
	*****	***				

Fig. 2 - Allineamento dell'ITS1 di una cultivar di Mela Gelata con le sequenze di *Malus domestica* e *M. pruinifolia*. Gli asterischi indicano le basi in comune tra le tre sequenze.

altre sequenze degli stessi tratti genomici al fine di valutare le possibili relazioni tra le nostre cultivar e quelle presenti in banche dati internazionali.

L'analisi molecolare dei marcatori nucleari (ITS1 e ITS2) ha evidenziato che i campioni di Mela Gelata non presentano variabilità tra di loro, indicando che probabilmente derivano da processi di clonazione. Inoltre, i tratti nucleari indicano che questa cultivar potrebbe essere il risultato della ibridazione tra *Malus domestica* Borkh. e *M. pruinifolia* (Willd.) Borkh., in quanto le sequenze di entrambe le specie presentano delle basi in comune (Fig. 2). È da ipotizzare a tal riguardo un evento di ibridazione che avrebbe generato la Mela Gelata. *Malus pruinifolia* viene anche detta Mela Cinese per la sua origine asiatica; il possibile processo di ibridazione si potrebbe far risalire all'introduzione di questa specie dai paesi asiatici dove è utilizzata prevalentemente come pianta ornamentale. Questi dati fanno pensare ad una possibile origine asiatica della Mela Gelata, anche se la mancanza di tratti plastidiali (in banca dati non sono presenti sequenze plastidiali di *M. pruinifolia*) non permette di confermare con certezza questa ipotesi.

Per quanto concerne la Mela Limoncella, i campioni di questa varietà presentano una omologia di sequenza dei tratti nucleari pari al 95% sia con *Malus pumila* sia con campioni di

M. sylvestris presenti in banca dati; questo dato porta ad ipotizzare un possibile rimescolamento tra differenti genotipi di queste due specie che avrebbero generato il genotipo della Mela Limoncella.

Un dendrogramma UPGMA (Fig. 3) computato a partire dalle distanze medesime, nel quale sono state introdotte altre sequenze di antiche cultivar di melo presenti nel Sud Italia (Mela Difesa, Mela Tenneriello, Mela Ciuccio, Mela Silvana), mostra che gli individui di Mela Limoncello e Mela Gelata sono maggiormente isolati rispetto a tutte le altre cultivar e a *Malus pumila*. È possibile che le distanze ridotte tra le altre cultivar rispetto a *M. pumila* sia da correlarsi ad un possibile rimescolamento avvenuto nel corso degli anni tra genotipi di diversa provenienza che si sono ripetutamente incrociati tra di loro; i genotipi di Mela Limoncella e Mela Gelata, invece, dopo essersi differenziati da un punto di vista genotipico, sarebbero rimasti isolati in nicchie ecologiche che hanno permesso al loro genoma di distanziarsi ulteriormente da *M. domestica*.

CONCLUSIONI

Le tecniche di identificazione delle piante utilizzate in passato si basavano prevalentemente sulla valutazione di parametri morfologici che oggi non sono sufficienti per poter

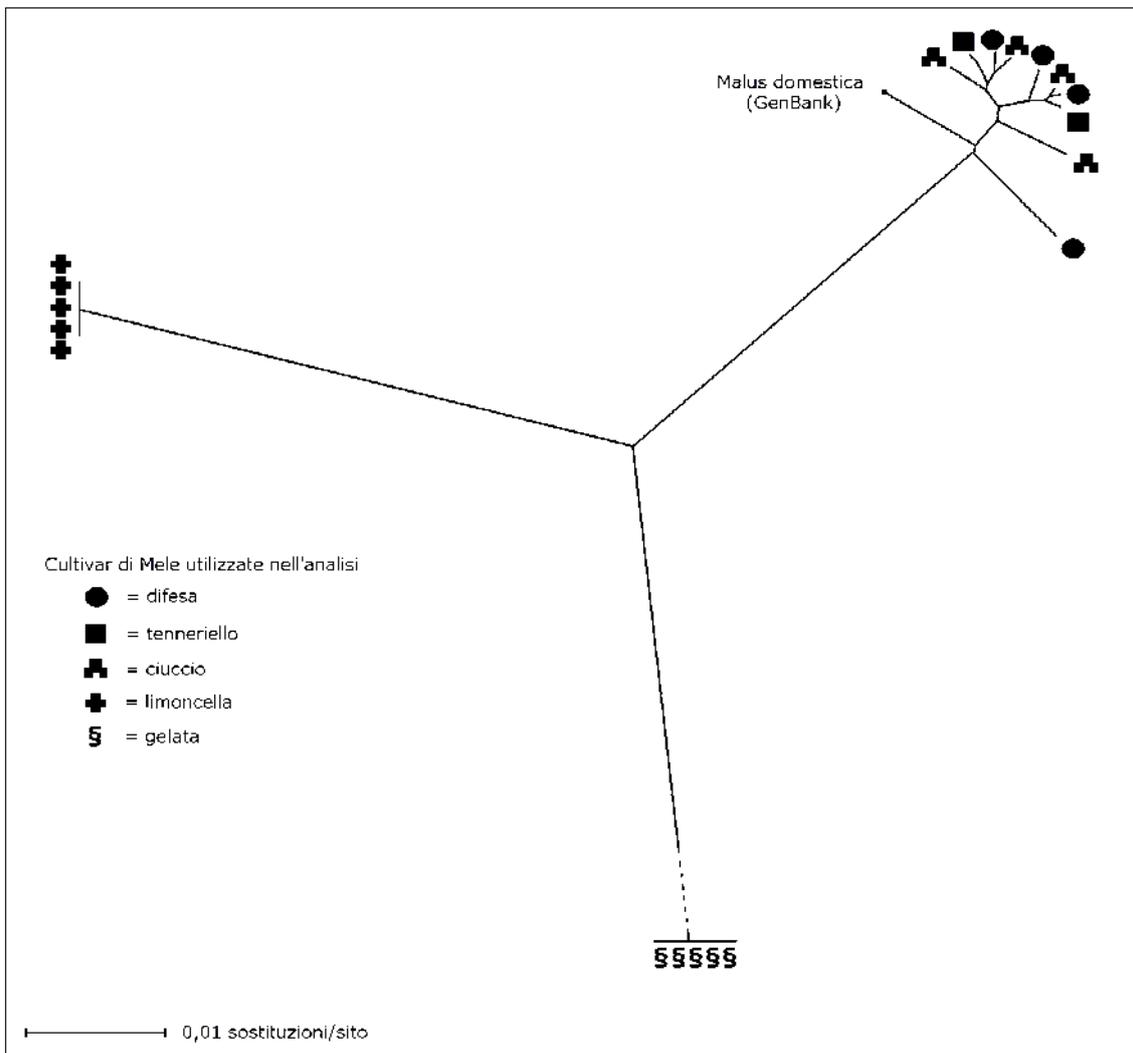


Fig. 3 - Albero UPGMA ottenuto attraverso l'analisi delle sequenze del *trnS-trnG* utilizzando la distanza di Jukes and Cantor.

identificare un genotipo; inoltre, è noto che i caratteri morfologici possono essere influenzati da condizioni ambientali, mentre il genotipo permette di valutare l'esatta identità genetica di ogni individuo, evidenziando possibili polimorfismi all'interno delle cultivar o tra le cultivar.

Sia la Mela Gelata sia la Mela Limoncella contribuiscono ad arricchire il patrimonio ortofrutticolo italiano e sono dunque meritevoli di recupero e rivalorizzazione. Secondo molti, l'estinzione genetica di antiche varietà di melo è dovuta ai grandi circuiti commerciali, sviluppatasi negli anni '50-'60, con la conseguenza della perdita di molti genotipi locali e della loro varietà genetica. Oggigiorno si sta cercando di ripristinare l'antica coltura di genotipi ormai dimenticati e non solo della Limoncella

e della Gelata, ma anche di altre varietà di meli come la Mela Tenneriello, la Mela Difesa, la Mela Ciuccio e la Mela Silvano (tali nomi possono variare a livello locale).

Molteplici sono le ragioni che ci inducono a conservare e tentare di propagare queste varietà; sicuramente la più valida è correlata al fatto che antiche cultivar a distribuzione locale costituiscono importanti risorse genetiche per incroci capaci di resistere a parassiti e malattie.

I dati ottenuti hanno permesso di caratterizzare l'identità genetica delle due cultivar esaminate e di ipotizzarne la origine. Il passo successivo sarà quello di introdurre nel nostro studio analisi molecolari più specifiche, utilizzando AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) o SSR (Simple Sequence Repeats), che permettono di identificare possibili poli-

morfismi anche all'interno di una stessa cultivar, dando la possibilità di selezionare la "migliore" cultivar da conservare e utilizzare per il processo di propagazione. È da tener presente, inoltre, che tali incroci potrebbero adattarsi meglio agli ambienti locali prevenendo la possibilità di diffondere solo individui genetica-

mente identici e garantendo un tasso di variabilità più alto. Infine, con questo tipo di studio è possibile tutelare il patrimonio delle tradizioni locali, proponendo possibili metodiche di controllo delle produzioni ed eventuale commercializzazione di queste cultivar.

LETTERATURA CITATA

- CATONE M.P. 1979. *De Agri Cultura*. (Traduzione di W. Davis Hooper). Loeb Classical, Harvard University Press, Cambridge, USA.
- COART E., VAN GLABEKE S., DE LOOSE M., LARSEN A.S., ROLDAN-RUIZ I. 2006. Chloroplast diversity in the genus *Malus*: new insights into the relationship between the European wild apple (*Malus sylvestris* Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). *Molecular Ecology* 15: 2171-2182.
- DOYLE J.J., DOYLE J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- FORSLINE P.L., ALDWINCKLE H.S., DICKSON E.E., LUBY J.J., HOKANSON S.C. 2003. Collection, maintenance, characterization, and utilization of wild apples of Central Asia. *Horticultural Reviews* 29: 1-62.
- GALLESIO G. 1817-1839. *Pomona Italiana*, ossia Trattato degli Alberi Fruttiferi. Tip. Capurro, Pisa.
- HALL T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, Series 41: 95-98.
- HARRIS S.A., ROBINSON J.P., JUNIPER B.E. 2002. Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics* 18 (8): 426-430.
- IPPOCRATE. 1994. Ippocrate. Scritti etici e politici del *Corpus Ippocraticum*. (Traduzione di M.P. Pillolla). Ed. Demos, Cagliari
- JUNIPER B.E., MABBERLEY D.J. 2006. *The Story of the Apple*. Timber Press, Portland, Oregon, USA.
- PLINIO G.S. 1988. *Storia Naturale*. Edizione diretta da B. Conte con la collaborazione di A. Barchiesi, G. Ranucci. Ed. Einaudi, Torino.
- ROHRER J.R., ROBERTSON K.R., PHIPPS J.B. 1994. Floral morphology of Maloideae (Rosaceae) and its systematic relevance. *Am. J. Bot.* 81: 574-581.
- ROSATI C., RIVALTA L., SANSAVINI S. 2001. Pero. Liste di orientamento varietale dei fruttiferi. *Terra e Vita* 42 (18): 45-48.
- TAMARO D. 1929. *Frutta di grande reddito*. Hoepli, Milano.
- TASSINARI G. 1976. *Manuale dell'Agronomo*. (5ª edizione). Ed. Reda, Roma.
- TEOFRASTO. 1990. *Historia Plantarum* (Traduzione di B. Einarson, G.K.K. Link). Loeb Classical, Harvard University Press, Cambridge, USA.
- VARRONE M.T. 1952. *De Re Rustica*. Ed. Istituto Editoriale Italiano, Milano.
- VIRGILI S., NERI D. 2002. Mela Rosa e mele antiche. Valorizzazione di ecotipi locali di melo per un'agricoltura sostenibile. *Assam*, I Quaderni, 5b, Ancona.

Finito di stampare nel mese di dicembre 2011