

Caratterizzazione molecolare di antiche cultivar di melo del Cilento (Salerno)

M. D. MOCCIA¹, R. DI NOVELLA², P. DE LUCA²

¹Dipartimento delle Scienze Biologiche, Sezione di Biologia Vegetale, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Foria 223, 80139 Napoli, Italia. ²Orto Botanico, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Foria 223, 80139 Napoli, Italia.

Abstract. An investigation was carried out aiming at characterizing ancient apple cultivars from the National park "Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano", in Southern Campania (Italy). Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs) were employed as molecular markers, as they are more rapid, repeatable and accurate as compared to usual morphological markers. These markers allowed genotyping and discrimination of cultivars whose identity was previously only associated to phenotypic characters and to local traditions. Results have also been discussed in the light of developing production control methods for a possible commercial exploitation.

Riassunto. Sono state caratterizzate antiche cultivar di melo del Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano (Salerno). Sono stati impiegati marcatori molecolari (AFLP-Amplified Fragment Length Polymorphisms), che hanno il vantaggio potenziale, rispetto ai marcatori morfologici normalmente impiegati, di essere più rapidi, ripetibili e accurati. Con questi marcatori è stato possibile accertare l'identità genetica e discriminare cultivar la cui identità era legata solo alle caratteristiche fenotipiche e alle tradizioni locali. I risultati sono stati discussi in relazione allo sviluppo di metodologie di controllo delle produzioni per un eventuale impiego commerciale.

Key words: Ancient cultivars, Apple tree, Microsatellites

INTRODUZIONE

Le colture di alberi da frutta antiche sono presenti in numero molto elevato in Campania. La regione è infatti un'immensa miniera di risorse genetiche autoctone, composta da varietà rustiche, con frutti dal gusto caratteristico, opera della selezione compiuta dall'uomo nel corso dei secoli. In seguito allo sviluppo della frutticoltura industriale, gli impianti tradizionali sono stati abbandonati e con essi le varietà frutticole.

In particolare, la Campania custodisce un numero elevato di cultivar di melo, antiche e a distribuzione locale, tra le quali soltanto l'Annurca ha ottenuto successo commerciale; molte altre varietà antiche hanno una diffusione, nel migliore dei casi, soltanto locale. Lo sviluppo di cultivar commerciali con caratteristiche economicamente rilevanti, infatti, ha condotto all'abbandono delle cultivar di frutta tradizionali, ed esemplari vivi di queste ultime

varietà vengono ritrovati poco frequentemente soltanto in orti abbandonati o, ancora più raramente, vengono mantenuti in coltivazione dalla popolazione locale e compaiono nei mercati soltanto a seguito di vendita diretta da parte del produttore.

Come conseguenza, molti genotipi locali sono stati persi, e la diversità genetica di queste cultivar tradizionali è stata ampiamente erosa.

Sussistono molteplici ragioni che suggeriscono di conservare e propagare queste varietà di melo. Forse la più importante di esse è correlata al fatto che cultivar antiche a distribuzione locale costituiscono importanti risorse genetiche per incroci, in particolare al fine di conferire resistenza a parassiti e malattie, di migliorare l'adattamento agli ambienti locali e di prevenire i rischi coinvolti nella monocultura di individui geneticamente identici (HARRIS *et al.* 2002). Tra le altre ragioni per la loro conservazione e propagazione, vi sono

la salvaguardia di ambienti rurali, la scomparsa dei quali avrebbe come conseguenza l'impoverimento della biodiversità e della qualità del paesaggio rurale e finanche la perdita dell'identità culturale di comunità locali.

Il recupero dei fruttiferi antichi a distribuzione ristretta è necessariamente conseguente ad un'accurata individuazione delle cultivar, come passo preliminare necessario verso qualsiasi strategia di conservazione affidabile.

Tale individuazione, se affidata esclusivamente alla morfologia, risente di svariati problemi. In primo luogo, vi è la difficoltà di distinguere cultivar molto simili; in secondo luogo, le varietà antiche in oggetto hanno spesso grande eterogeneità genetica, cui corrisponde elevata variabilità nel portamento, nonché nelle dimensioni, forma, colore e tessitura dei frutti. Si rende pertanto indispensabile, in particolare nel caso di cultivar antiche, una caratterizzazione mediante l'uso di marcatori molecolari. Oltre a quanto appena sottolineato, i marcatori molecolari hanno, come vantaggi rispetto alle metodiche di altro tipo, elevata sensibilità, maggiore velocità e riproducibilità delle analisi (GUILFORD *et al.* 1997).

AMBIENTE DELLA RICERCA E INDIVIDUAZIONE DELLE CULTIVAR

La ricerca è stata condotta nel Parco Nazionale del Cilento e del Vallo di Diano (Salerno, Campania), una delle aree meglio preservate del territorio regionale, nella quale si uniscono numerose condizioni favorevoli ad uno studio come quello in oggetto: si tratta di un'area piuttosto isolata sotto il profilo demografico, provvista di agroecosistemi prevalentemente ben conservati, di un paesaggio agrario e rurale virtualmente intatto, di una notevole quantità di colture tradizionali basate su tipi selezionati localmente e di un corpus di tradizioni locali e di cultura materiale molto ben caratterizzato.

Sono state realizzate numerose interviste con operatori agricoli e anziani residenti, spesso in presenza di collaboratori locali, in particolare nei comuni di Atena Lucana, Monte San Giacomo, Padula, Sala Consilina, San Rufo,

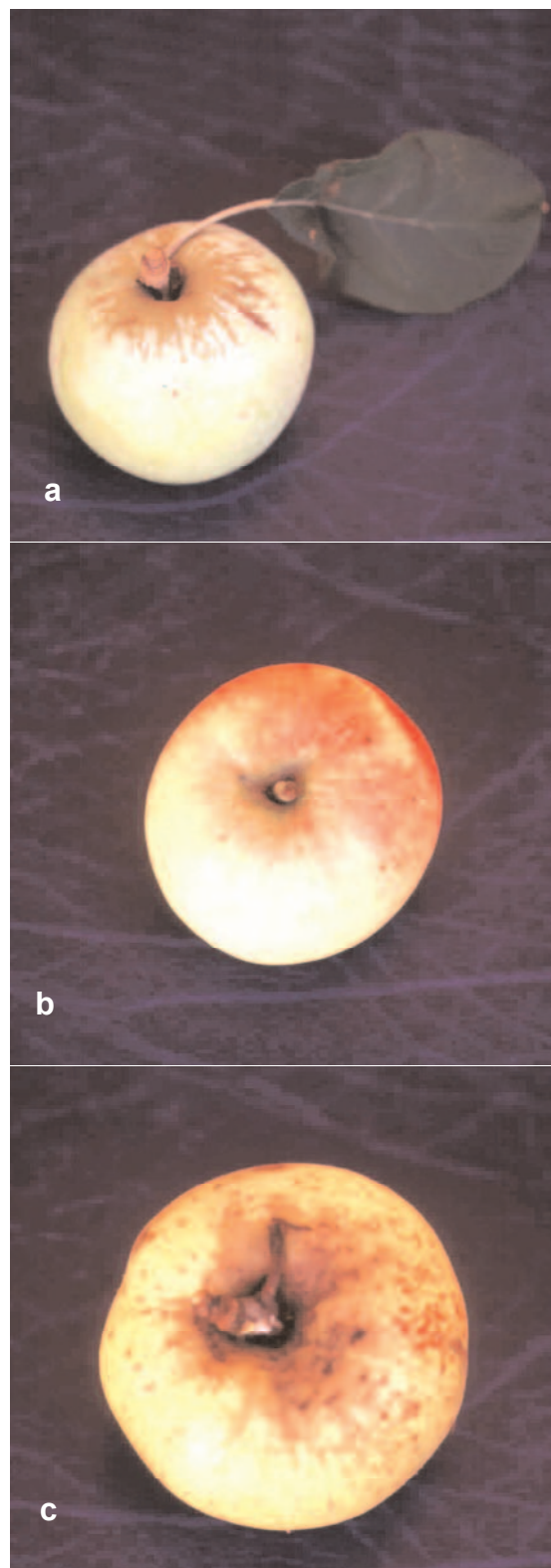


Fig. 1 - a. Frutto del "Melo della Difesa"; b. Frutto del "Melo Tenneriello"; c. Frutto del "Melo Ciuccio".

Sassano (tutti appartenenti alla Provincia di Salerno).

Tab. 1 - Origine e attribuzione varietale dei campioni impiegati

| N. | Cultivar presunta | Località |
|----|-------------------|-------------------|
| 1 | Difesa | Sassano |
| 2 | Difesa | Monte San Giacomo |
| 3 | Difesa | Sassano |
| 4 | Difesa | Sassano |
| 5 | Tenneriello | Sassano |
| 6 | Tenneriello | Sassano |
| 7 | Tenneriello | S. Rufo |
| 8 | Tenneriello | Sassano |
| 9 | Tenneriello | Sassano |
| 10 | Ciuccio | Padula |
| 11 | Ciuccio | Sassano |
| 12 | Ciuccio | Sassano |
| 13 | Ciuccio | Sassano |
| 14 | Ciuccio | Sassano |
| 15 | Ciuccio | Sassano |
| 16 | Ciuccio | Sassano |
| 17 | Ciuccio | Sassano |
| 18 | Silvana | Monte San Giacomo |
| 19 | Silvana | Sala Consilina |
| 20 | Silvana | Monte San Giacomo |
| 21 | Silvana | Atena Lucana |

A seguito delle interviste, sono state individuate quattro varietà coltivate, piuttosto eterogenee sotto il profilo morfologico, ma chiaramente e inequivocamente riconoscibili dalla popolazione locale e, segnatamente, il “melo della Difesa” (Sassano e Monte San Giacomo), il “melo Tenneriello” (San Rufo e Sassano), il “melo Ciuccio” (Padula, Sassano) e il “melo Silvana” (Atena Lucana, Monte San Giacomo, Sala Consilina).

Le poche decine di piante censite a seguito di una ricerca approfondita sul territorio dei comuni elencati, ulteriormente verificate sottoponendole a identificazione indipendente da parte di selezionati residenti anziani e soltanto quelle che sono state inequivocamente identificate da tutti gli intervistati (Tab. 1), sono state impiegate nell’indagine, per un totale di 21 individui. Un operatore, diverso da chi ha successivamente condotto le analisi, ha prelevato da detti individui campioni di foglie, cui è stato assegnato un numero progressivo.

MARCATORI MOLECOLARI

Tra la grande quantità di marcatori moleco-

Tab. 2 - Primer impiegati

| Nome | Sequenza |
|---------|---|
| CH05b06 | Forward 5' aca agc aaa cct aat acc acc g 3' Reverse 5' gag act gga aga gtt gca gag g 3' |
| CH04e03 | Forward 5' ttg aag atg ttt ggc tgt gc 3' Reverse 5' tgc atg tct gtc tcc tcc at 3' |
| CH05e03 | Forward 5' cga ata ttt tca ctc tga ctg gg 3' Reverse 5' caa gtt gtt gta ctg ctc cga c 3' |
| CH02a08 | Forward 5' gag gag ctg aag cag cag ag 3' Reverse 5' atg cca aca aaa gca tag cc 3' |
| CH02h07 | Forward 5' tga gct gac aag tgt aaa atg c 3' Reverse 5' gcc gaa caa tgt aaa gct cg 3' |

lari disponibili, sono stati scelti i microsatelliti, che hanno già dimostrato la loro utilità nella discriminazione di cultivar commerciali di melo (GUILFORD *et al.* 1997; LIEBHARD *et al.* 2002). I microsatelliti sono tratti di DNA formati da sequenze di due, tre o quattro nucleotidi, ripetuti in numero variabile. Con amplificazione mediante PCR delle regioni ipervariabili, e utilizzando primer fiancheggiati i microsatelliti, si possono determinare sequenze di DNA altamente polimorfiche. Il grado di polimorfismo determinabile con questi marcatori è legato al numero di unità nucleotidiche ripetute che presenta variazioni tra gli individui posti a confronto.

Il DNA genomico è stato isolato da giovani foglie utilizzando il protocollo proposto da DOYLE & DOYLE (1990). Cinque coppie di primer SSR (Simple Sequence Repeats) (GIANFRANCESCHI *et al.* 1998), i forward dei quali marcati con fluorocromi, sono stati utilizzati per l’amplificazione mediante PCR. Tra le possibili combinazioni sono state scelte cinque coppie (Tab. 2) dopo verifica dei risultati preliminari ottenuti attraverso una serie di esperimenti di amplificazione finalizzati alla messa a punto delle condizioni e della loro riproducibilità. Tutti i loci amplificati sono stati anche sequenziati per verificare l’effettiva presenza in essi delle sequenze ripetute microsatellitari.

La mix di reazione, con volume finale di 10 µl, contiene 10 ng di DNA genomico, tampone 10X, MgCl₂ 50 mM, dNTPs 2.5 mM, primers 50 µM e Taq Polimerasi 5U/µ.

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, 30 sec, appaiamento a 60 °C, 1 min, estensione a 72 °C, 1 min, e estensione finale a 72 °C, 5 min.

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante separazione elettroforetica capillare, eseguita dal sequenziatore automatico ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). I frammenti generati sono stati analizzati attraverso il software Genescan 3.1.2 (Applied Biosystems) e importati in GenoTyper 2.5.2 (Applied Biosystems) per analizzare i profili ottenuti e calcolare i parametri fondamentali delle popolazioni. I genotipi ottenuti dalla combinazione dei loci microsatelliti sono stati analizzati con il programma GeneClass (CORNUET *et al.* 1999) per effettuare un test di assegnazione a gruppi.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le lunghezze dei frammenti ottenuti sono riportate in Tab. 3. Tutti i loci si sono rivelati polimorfici nel campione complessivo. Il locus maggiormente variabile è CH02h07, con otto genotipi diversi, seguito da CH05e03, con sei. I risultati delle analisi relative al computo di Fst (NEI 1987) (Tab. 4) hanno indicato che l’Fst media è di 0,3000, suggerendo un ridotto grado di differenziazione genetica delle cultivar, così come caratterizzate morfologicamente.

Le distanze di NEI (1978) tra le popolazioni sono relativamente ridotte (Tab. 5) e, in particolare, le distanze tra “melo Tenneriello” e “melo Ciuccio”. Un dendrogramma UPGMA computato a partire dalle distanze medesime (Fig. 2), tuttavia, mostra come gli individui attribuiti al “melo della Difesa” e al “melo

Silvana” siano maggiormente isolati rispetto a quelli di “melo Tenneriello” e “melo Ciuccio”.

Il test di assegnazione degli individui a popolazioni (CORNUET *et al.* 1999) ha indicato che gli individui 1-4 (attribuzione morfologica al “melo della Difesa”) e gli individui 18-21 (melo Silvana) appartengono a due popolazioni differenti, mentre vari altri individui vengono spesso allocati in due gruppi (Tab. 6). In particolare, tre individui morfologicamente attribuibili al “melo Tenneriello” vengono allocati in un gruppo separato, mentre nessun individuo attribuito al “melo Ciuccio” è riconducibile a un gruppo separato, cui non appartenga anche il “melo Tenneriello”.

E’ presumibile che le distanze ridotte tra le ultime due cultivar elencate, come l’impossibilità di segregare un gruppo “melo Ciuccio” che non includa il “melo Tenneriello”, sia da correlarsi a un mescolamento, avvenuto negli anni, di genotipi di diversa provenienza e successivamente raggruppati sotto lo stesso nome (si veda il caso di un individuo morfologicamente attribuito a “melo Ciuccio” e non attribuibile su base molecolare) o, in alternativa, a selezione, sotto l’indicazione di “melo Ciuccio”, di fenotipi estremi di melo Tenneriello ripetutamente incrociati tra loro.

CONCLUSIONI

Le tecniche di identificazione varietale comunemente utilizzate in passato si basano essenzialmente sulla valutazione di caratteristiche morfologiche che sono tuttavia solo indicative del genotipo, poiché rappresentano solo alcuni loci e possono non essere in grado di caratterizzare e distinguere cultivar geneti-

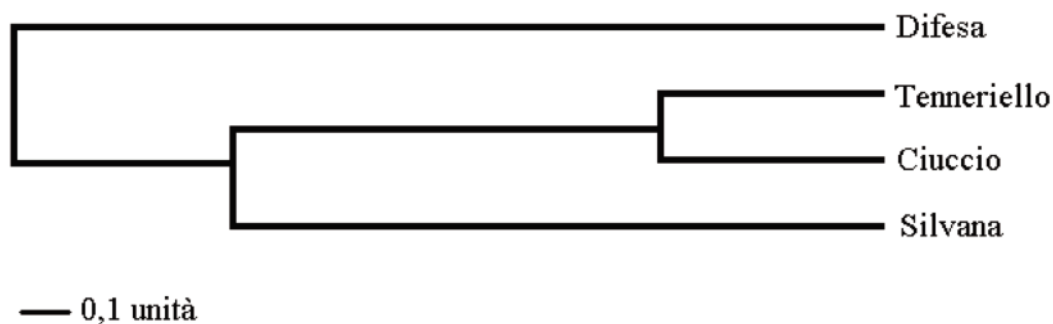


Fig. 2 - Dendrogramma UPGMA basato sulle distanze di NEI (1978).

Tab. 3 - Lunghezze dei frammenti microsatellitari ottenuti

| Loci (nome primer) | | | | | | | | | |
|--------------------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|
| CH05b06 | | CH04e03 | | CH05e03 | | CH02a08 | | CH02h07 | |
| 158 | 168 | 192 | 208 | 158 | 190 | 127 | 147 | 214 | 234 |
| 158 | 168 | 192 | 208 | 158 | 190 | 127 | 147 | 214 | 234 |
| 158 | 168 | 192 | 208 | 158 | 190 | 127 | 147 | 214 | 214 |
| 158 | 168 | 192 | 208 | 158 | 190 | 127 | 147 | 214 | 234 |
| 168 | 194 | 196 | 198 | 162 | 166 | 127 | 147 | 218 | 220 |
| 158 | 194 | 196 | 198 | 164 | 184 | 129 | 147 | 208 | 208 |
| 168 | 194 | 196 | 198 | 162 | 166 | 127 | 147 | 218 | 220 |
| 158 | 194 | 196 | 202 | 164 | 184 | 131 | 147 | 208 | 208 |
| 158 | 194 | 196 | 202 | 164 | 184 | 131 | 147 | 208 | 208 |
| 168 | 194 | 196 | 196 | 162 | 166 | 127 | 147 | 218 | 220 |
| 168 | 194 | 196 | 196 | 162 | 166 | 127 | 147 | 220 | 220 |
| 168 | 194 | 196 | 196 | 162 | 162 | 127 | 147 | 218 | 220 |
| 168 | 194 | 196 | 196 | 162 | 190 | 143 | 151 | 214 | 220 |
| 168 | 194 | 196 | 196 | 162 | 166 | 127 | 147 | 218 | 220 |
| 168 | 194 | 196 | 196 | 162 | 166 | 127 | 147 | 218 | 220 |
| 168 | 194 | 196 | 196 | 162 | 166 | 127 | 147 | 218 | 220 |
| 168 | 194 | 196 | 196 | 162 | 166 | 127 | 147 | 218 | 220 |
| 168 | 194 | 196 | 196 | 162 | 166 | 127 | 147 | 218 | 220 |
| 176 | 194 | 196 | 202 | 154 | 168 | 131 | 143 | 214 | 214 |
| 176 | 194 | 196 | 202 | 154 | 168 | 131 | 143 | 214 | 214 |
| 176 | 194 | 196 | 202 | 154 | 168 | 131 | 143 | 214 | 228 |
| 176 | 194 | 196 | 202 | 154 | 168 | 131 | 143 | 214 | 228 |

Tab. 4 - Fst dei singoli loci

| Locus | Dim.Campione | Fst |
|---------|--------------|---------|
| CH05B06 | 42 | -0.2574 |
| CH04E03 | 42 | 0.4066 |
| CH05E03 | 42 | 0.3414 |
| CH02A08 | 42 | 0.1401 |
| CH02H07 | 42 | 0.3531 |
| Media | 42 | 0.3000 |

Tab. 5 - Identità (sopra la diagonale) e distanze (sotto) di NEI (1978) tra le cultivar

| | Difesa | Tenneriello | Ciuccio | Silvana |
|-------------|--------|-------------|---------|---------|
| Difesa | **** | 0.3143 | 0.3031 | 0.2222 |
| Tenneriello | 1.1573 | **** | 0.7240 | 0.3965 |
| Ciuccio | 1.1938 | 0.3230 | **** | 0.3729 |
| Silvana | 1.5040 | 0.9251 | 0.9864 | **** |

camente vicine. Inoltre è noto che i marcatori morfologici possono essere influenzati sia dalle condizioni ambientali che di coltura, rendendo necessaria una conferma dell'osservazione in più anni.

I marcatori molecolari rappresentano dunque una valida strategia alternativa di identificazione varietale. Tra questi risultano particolarmente idonei i microsatelliti per l'accertamento dell'identità varietale, poiché evidenziano i polimorfismi in tempi brevi, in maniera assolutamente riproducibile ed utilizzando una piccola quantità di DNA (GUILFORD *et al.*

1997).

I dati qui riportati hanno permesso di accertare l'identità genetica di cultivar, la cui identità era legata solo alle caratteristiche fenotipiche e alle tradizioni locali. Analisi di questo tipo inoltre possono essere utilizzate in futuro per sviluppare efficaci metodi di conservazione del materiale vegetale preso in esame e con esso salvaguardare anche i saperi e i sapori locali, nonché metodologie di controllo delle produzioni per un eventuale immissione di queste cultivar in commercio.

LETTERATURA CITATA

- CORNUET J.M., PIRY S., LUIKART G., ESTOUP A., SOLIGNAC M. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153: 1989-2000.
- DOYLE J.J., DOYLE J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin* 19 (1): 11-15.
- GIANFRANCESCHI L., SEGLIAS N., TARCHINI R., KOMJANC M., GESSLER C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1069-1076.
- GUILFORD P., PRAKASH S., ZHU J.M., RIKKERINK E., GARDINER S., BASSET H., FORSTER R. 1997. Microsatellites in *Malus X domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 94: 249-254.
- HARRIS A., ROBINSON J.P., JUNIPER B.E. 2002. Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics* 18: 426-430.
- LIEBHARD R., GIANFRANCESCHI L., KOLLER B., RYDER C.D., TARCHINI R., VAN DE WEG E., GESSLER C. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus X domestica* Borkh). *Molecular Breeding* 10: 217-241.
- NEI M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- NEI M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. Pagg. 159-164.