



**CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI ANTICHE CULTIVAR DI MELO (*MALUS PUMILA* MILLER, ROSACEAE) DEL SUD ITALIA**

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF OLD CULTIVAR OF APPLE TREE (*MALUS PUMILA* MILLER, ROSACEAE) IN SOUTHERN ITALY

**Candidata:** Iole Nigna, matr. N89/00000X (nigna.iole@gmail.it)

---

Tesi di laurea triennale, sperimentale, 2016-2017

**Relatore:** Prof.ssa Olga De Castro; Botanica Sistemica (BIO/02); Dip. Biologia; odecastr@unina.it

[-----spazio per firma.....]

**Correlatore:** Prof.ssa Paola Cennamo; Botanica Generale (BIO/01); Università degli Studi Suor Orsola Benincasa; p.cennamo@unisob.com

[-----spazio per firma.....]

**INDICE**

<b>Riassunto/Abstract</b>	3
<b>Introduzione</b>	4
<i>Cenni storici</i>	4
<i>La mela gelata e la mela limoncella</i>	4
<b>Scopo del lavoro</b>	5
<b>Materiali e Metodi</b>	6
<i>Campioni analizzati</i>	6
<i>Analisi molecolari</i>	6
<i>Analisi dei dati</i>	6
<b>Risultati</b>	7
<b>Discussione</b>	7
<b>Conclusione</b>	8
<b>Bibliografia</b>	8
<b>Ringraziamenti</b>	10

## RIASSUNTO

Due antiche cultivar di *Malus pumila* (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) al fine di conoscere il loro patrimonio genetico e di favorirne il recupero e la riutilizzazione commerciale.

**Parole chiave:** mela, conservazione, ITS, *Malus pumila*, piante utili

## ABSTRACT

Two ancient cultivars of *Malus pumila* (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 markers (ITS, Internal Transcribed Spacer) were carried out in order to understand the genetic heritage of the two varieties and to assist with their conservation and commercial use.

**Keywords:** apple, conservation, ITS, *Malus pumila*, useful plants

## INTRODUZIONE

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 (cultivar). 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 *M. pumila* o da incroci tra quest'ultima e altre specie, quali *M. sieversii* (Mill.), *M. orientalis* (Uglitzk.) e *M. sylvestris* (Mill.), tutte provenienti dall'Europa o dall'Asia (Forsline et al. 2002). 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).

## CENNI STORICI

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. Ippocrate (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 MELA GELATA E LA MELA LIMONCELLA

La Mela Gelata è diffusa nel Centro e Sud Italia (Fig. 1), con le sue diverse denominazioni locali, Cerina, Oleata, Diacciata e Cera, ed 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 laccia, 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 siciliana. 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 (Figura 1). 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. La Limoncella ha anche una sottocategoria che è definita Limoncella 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%.

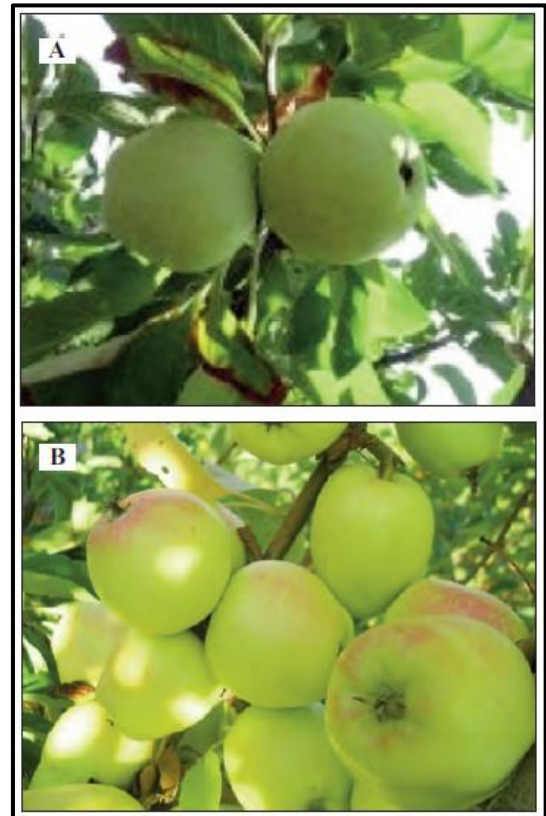


Figura 1. A: Mela gelata; B: Mela limoncella.

## SCOPO DEL LAVORO

Il presente lavoro ha lo scopo di studiare le due varietà di *M. pumila* tipiche del Sud Italia, la "Mela Gelata" e la "Mela Limoncella" (Figura 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 analizzato i marcatori molecolari presenti nel DNA genomico nucleare (spaziatori interni trascritti dei geni ribosomali, ITS1 e ITS2) di esemplari di entrambe le cultivar provenienti dalla Basilicata, dalla Calabria e dalla Campania.

## **MATERIALI e METODI**

### *CAMPIONI ANALIZZATI*

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. Per ogni cultivar sono stati campionati due individui per le analisi molecolari e le foglie sono state conservate in un congelatore. In aggiunta per ogni cultivar è stato allestito un campione d'erbario e conservato presso l'erbario del Dip. di Biologia sito presso l'Orto Botanico di Napoli (NAP).

### *ANALISI MOLECOLARI*

Tra la grande quantità di marcatori molecolari disponibili sono stati scelti il marcatore nucleare costituito dagli spaziatori interni dei tre geni ribosomali (ITS1 e ITS2). Gli ITS sono ampiamente utilizzati per risolvere problematiche di filogenesi e per individuare eventuali specie ibridogene. Il DNA genomico è stato isolato da circa 100 mg di foglie utilizzando il protocollo proposto da Doyle & Doyle (1987). I tratti di genoma scelti sono stati amplificati attraverso l'utilizzo di un termocicizzatore (PCR) ed usando i primer presenti in letteratura (Aceto et al. 1999). Successivamente i frammenti purificati sono stati sequenziati per comparare le sequenze delle cultivar in esame con quelle già note in letteratura attraverso la banca dati delle sequenze internazionale (GenBank; Benson et al. 2013).

La mix di reazione contiene 10 ng di DNA genomico. La PCR è stata condotta nelle seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 94 °C per 3 minuti, seguita da 30 cicli con denaturazione a 94 °C per 30 secondi, appaiamento a 50 °C per 1 minuti, estensione a 72 °C per 1 minuto ed un'estensione finale a 72 °C per 3 minuti. I prodotti amplificati sono stati purificati e successivamente analizzati su un sequenziatore automatico 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific).

### *ANALISI DEI DATI*

Le sequenze ottenute sono state editate utilizzando il software Chromas Lite versione 2.1.1 (Technelysium Pty) ed allineate utilizzando CLUSTAL W (multiple sequence alignment) implementato nel software BioEdit (Hall 1999). I confronti di identità attraverso le sequenze presenti in banca dati (GenBank) è stata eseguita attraverso un'analisi BLASTA (Standard Nucleotide BLAST) ottimizzata con MegaBlast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## RISULTATI

Le lunghezze dei frammenti ottenute sono di 190 bp per l'ITS1 e di 259 bp per l'ITS2. Le sequenze di entrambi i marcatori sono state comparate attraverso l'ausilio del sistema operativo BLASTA con le 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. Nella Figura 2, è mostrato un allineamento dove si evince la possibile natura ibridogena della

cultivar Mela gelata con due specie affini.

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

con campioni di *M. sylvestris* presenti in banca dati.

Mela Gelata	GGGCCTCCTG	GCCCGGCGTC	CCYTTGCTCC	CGGAGCCCG	CTCCGGGGCG	TACAAACTTA
<i>M. domestica</i>	GGGCCTCCTG	GCCCGGCGTC	CCCTTGTCTC	CGGAGCCCG	CTCCGGGGCG	TACAAACTTA
<i>M. prunifolia</i>	GGGCCTCCTG	GCCCGGCGTC	CCTTTCGTCC	CGGAGCCCG	CTCCGGGGCG	TACAAACTTA
	*****	*****	***	**	*****	*****
Mela Gelata	CACCGGCGCG	TGTTGCGCCA	AGGAATCTGA	ACGAAAGAGC	GCGCTCCCGC	CGCCCGGAA
<i>M. domestica</i>	CACCGGCGCG	TGTTGCGCCA	AGGAATCTGA	ACGAAAGAGC	GCGCTCCCGC	CGCCCGGAA
<i>M. prunifolia</i>	CACCGGCGCG	TGTTGCGCCA	AGGAATCTGA	ACGAAAGAGC	GCGCTCCCGC	CGCCCGGAA
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Mela Gelata	W-GGTGCGCG	CGCGG-TGCG	TCGTGCTCTT	CGATAAATCA	AAACGACTCT	CGGCAACGGA
<i>M. domestica</i>	ACGGTGC	CGCGGTTGCG	TCGTGCTCTT	CGATAAGTCA	AAACGACTCT	CGGCAACGGA
<i>M. prunifolia</i>	A-GGTGCGCG	CGCGGTTGCG	TCGTGCTCTT	CGATAAGTCA	AAACGACTCT	CGGCAACGGA
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Mela Gelata	TATCTCGGCT	CTC				
<i>M. domestica</i>	TATCTCGGCT	CTC				
<i>M. prunifolia</i>	TATCTCGGCT	CTC				
	*****	***				

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

## DISCUSSIONE

Considerando i risultati molecolari ottenuti, i tratti nucleari ascrivibili alla cultivar Mela gelata indicano che questa cultivar potrebbe essere il risultato della ibridazione tra *M. domestica* Borkh. e *M. prunifolia* (Willd.) Borkh., in quanto le sequenze di entrambe le specie presentano delle basi in comune (Figura2). È da ipotizzare a tal riguardo un evento di ibridazione che avrebbe generato la Mela Gelata. *Malus prunifolia* 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. prunifolia*) non permette di confermare con certezza questa ipotesi. Per quanto concerne la Mela Limoncella, ed a causa dei risultati ottenuti si può ipotizzare un possibile rimescolamento tra differenti genotipi di queste due specie che avrebbero generato il genotipo della Mela Limoncella.

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

## CONCLUSIONE

I dati ottenuti hanno permesso di caratterizzare l'identità genetica delle due cultivar esaminate. 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 geneticamente 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.

## BIBLIOGRAFIA

**Aceto S., Caputo P., Cozzolino S., Gaudio L., Moretti A.** 1999. Phylogeny and evolution of Orchis and allied genera based on ITS DNA variation: morphological gaps and molecular continuity. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 13: 67-76.

**Catone M.P.** 1979. *De Agri Cultura*. Cambridge: Harvard University Press.

**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.** 2002. Collection, maintenance, characterization, and utilization of wild apples of Central Asia. *Horticultural Reviews*, 29: 1-62.

**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 Genet.*, 18 (8): 426-430.

**Ippocrate.** 1994. Ippocrate. Scritti etici e politici del Corpus Ippocraticum. Cagliari: Demos.

**Juniper B.E., Mabberley D.J.** 2006. *The Story of the Apple*. Portland: Timber Press.

**Plinio G.S.** 1988. *Storia Naturale*. Edizione diretta da B. Conte con la collaborazione di A. Barchiesi, G. Ranucci. Torino: Einaudi.

**Rohrer J.R., Robertson K.R., Phipps J.B.** 1994. Floral morphology of Maloideae (Rosaceae) and its systematic relevance. *American Journal of Botany*, 81: 574-581.

**Tamaro D.** 1929. *Frutta di grande reddito*. Milano: Hoepli.

**Tassinari G.** 1976. *Manuale dell'Agronomo*. (5a edizione). Roma: Reda.

**Teofrasto.** 1990. *Historia Plantarum*. Cambridge: Harvard University Press.

**Varrone M.T.** 1952. *De Re Rustica*. Milano: Istituto Editoriale Italiano.

**Virgili S., Neri D.** 2002. *Mela Rosa e mele antiche. Valorizzazione di ecotipi locali di melo per un'agricoltura sostenibile*. Ancona: Assam.

## RINGRAZIAMENTI

Uno speciale ringraziamento alla mia famiglia che mi ha sostenuto in questo percorso di tesi, dandomi la forza di credere in me stessa.

*.....a chi mi guarda con un'altra prospettiva...*



*Chiunque abbia osservato almeno una volta con i propri occhi  
la bellezza della natura non è destinato alla morte,  
ma alla natura stessa.*

*(Konrad Lorenz)*