

Fingerprinting necessario per conservare i genotipi della mela 'Rosa Romana'



S. Alessandri¹ - R. Gregori¹ - C. Buscaroli²
L. Dondini¹

¹ Dip. di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università di Bologna, Bologna

² Ri.Nova Società Cooperativa, Cesena

In diversi Paesi europei, tra cui l'Italia, è in atto un processo di recupero e di valorizzazione della biodiversità agraria, con particolare attenzione alle varietà locali antiche di melo

Attualmente sono rimasti pochi alberi secolari ascrivibili alla varietà 'Rosa Romana', sparsi per l'Appennino Tosco-Emiliano a testimonianza del glorioso passato, a fianco dei quali è presente solo qualche raro frutteto di giovane età. Tuttavia, questa mela, nei mercati locali, è ancora molto conosciuta e apprezzata per le sue qualità e per le caratteristiche salutistiche, essendo un frutto con un contenuto molto elevato di antiossidanti, tanto che un gruppo di agricoltori ed operatori del settore ha deciso di intraprendere la lunga e difficile strada del rilancio sia per il prodotto fresco (i frutti si conservano bene anche in frutteto per diversi mesi) che

trasformato, per il quale si adatta particolarmente bene: mele cotte, succhi torbidi e limpidi, sidro, distillati, aceto, essiccato, composte ecc.

Si stanno così realizzando nuovi impianti di 'Rosa Romana' con tecniche di coltivazione orientate verso l'agricoltura biologica, sia perché il territorio pedemontano è più adatto alla coltivazione rispetto alla pianura (minori problematiche fitopatologiche), sia perché i fattori climatici favoriscono un migliore sviluppo dei frutti. Nelle condizioni ambientali appenniniche, infatti, vengono esaltate le caratteristiche organolettiche dei frutti della varietà 'Rosa Romana'.

VALORIZZAZIONE DELLA BIODIVERSITÀ

In diversi Paesi europei, tra cui l'Italia, è in atto un processo di recupero e di valorizzazione della biodiversità agraria, con particolare attenzione alle varietà locali antiche di melo che hanno caratterizzato il territorio italiano nei secoli passati; vi concorrono molti fattori, tra cui l'interesse crescente dei composti antiossidanti (specialmente dei fenoli) e nutraceutici sulla salute umana, a fini sia preventivi sia terapeutici.

Si studiano perciò le antiche varietà ancora presenti in colture residue, alberi secolari conservati *in situ* e/o all'interno di collezioni di germoplasma. Di molte varietà antiche,

Un'antica varietà di melo

La 'Rosa Romana' è una antica varietà di melo, coltivata in passato soprattutto in aree montane e collinari, ed utilizzata per l'alimentazione delle popolazioni dall'autunno fino all'inizio della primavera dell'anno successivo, sia come frutto fresco, sia cotta o trasformata.

Il nome 'Rosa' compare nell'areale bolognese probabilmente attorno al 1500 come riportato dal botanico e naturalista Ulisse Aldrovandi. Nel primo censimento italiano delle varietà di melo, che è datato al 1929, la 'Rosa Romana' rappresentava il 25% della produzione di mele della provincia bolognese (Gaggio Montano era il fulcro della produzione). La "migrazione" della popolazione dall'appennino alla pianura nel secondo dopoguerra e l'affermarsi di altre varietà, più produttive e adatte ad una melicoltura di pianura, portarono ad una drastica riduzione della produzione a meno dello 0,5% nel giro di pochi decenni, come risulta dal censimento del 1994.

Al pari delle altre antiche varietà di melo e delle varietà locali, la 'Rosa Romana' è stata propagata per moltissimo tempo per essere coltivata in condizioni ambientali molto diverse e per questo è stata soggetta all'insorgere di una variabilità genetica cui si associa una discreta variabilità di caratteri pomologici ed organolettici. Il problema della corretta identificazione delle accessioni solo su base fenotipica viene poi complicato dalla variabilità ambientale che rende difficile l'univoca identificazione.

melo custodite nella propria collezione di germoplasma sia dal punto di vista pomologico sia con marcatori molecolari, come i microsatelliti (Ssr), riuscendo così a identificare casi di omonimie e sinonimie presenti nel germoplasma italiano della specie.

La capacità di questi marcatori di generare un profilo molecolare univoco associato alle varietà è stata alla base del loro uso nel fingerprinting delle specie da frutto e nella certificazione varietale delle specie fruttifere.

La 'Rosa Romana' come le altre varietà di mele presenta meccanismi di auto-incompatibilità gametofitica (Gsi). Quest'ultima è determinata dal locus S, contenente un determinante femminile (una S-RNasi espressa nel pistillo) e diversi determinanti maschili (espressi nel polline). La S-RNasi agisce come citotossina specifica nei tubetti pollinici incompatibili degradando gli RNA cellulari. Fin dalla sua identificazione, il gene S-RNasi è stato intensamente studiato ed è stato caratterizzato un gran numero di alleli. Le S-RNasi vengono importate nel tubetto pollinico quando questo attraversa il tessuto trasmettente dello stilo: il rigetto

non più coltivate, si dispone di ampia documentazione non solo pomologica, ma anche qualitativa, biochimica e genetica. Gli studi bibliografici in passato hanno esaminato in particolare "geni" funzionali utili nei programmi di miglioramento genetico

all'interno di antiche varietà, al fine di creare varietà con nuove caratteristiche. Il Dipartimento di Scienze e tecnologie agro-alimentari (Distal) dell'Università di Bologna ha effettuato un lavoro di caratterizzazione molecolare delle accessioni di

PIETRO CHINAGLIA
VIVAI • NURSERIES

PIETRO CHINAGLIA vivai - nurseries

via Dante Alighieri 19, 45020 Villanova del Ghebbo (RO)

tel +39 0425 66071

WhatsApp +39 347 4099991

e.mail info@pietrochinagliavivai.it

www.pietrochinagliavivai.it



VIVAIO DI PIANTE DA FRUTTO

fruit plant nursery

vivero de plantas frutales

pépinière de plantes fruitières

baumschule für obstpflanzen

питомник фруктовых растений

果树苗圃

arbokulturejo de fruktoplantoj

φυτώριο αποτροφικών φυτών

fructus plant seminarium

szkolka roślin owocowych

viveiro de fruteiras

pepiniera de plante fructifere

расадник воћних биљака

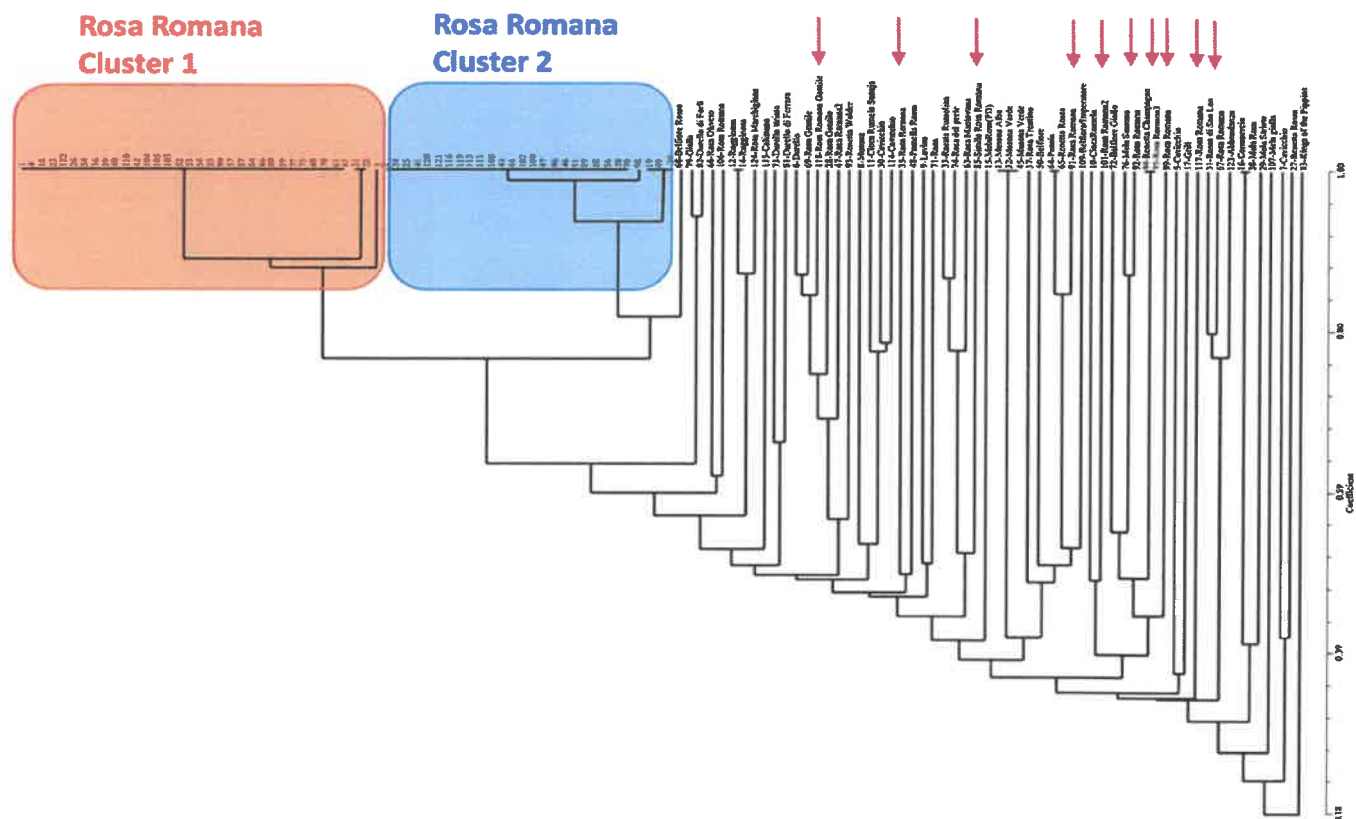
vivero de plantas frutales

gyümölcsös növényiskola

vivèi 'd piànt da frut



FIG. 1 - DENDROGRAMMA (UPGMA) RELATIVO ALLE DISTANZE GENETICHE TRA I CAMPIONI. NEL DENDROGRAMMA SONO RIPORTATI I DUE CLUSTER PRINCIPALI PER LA ROSA ROMANA; LE FRECCHE INDICANO I CAMPIONI DI ROSA ROMANA CON PROFILO MOLECOLARE DIFFERENTE



avviene quando il granulo pollinico porta un aplotipo S identico a uno di quelli posseduti dal pistillo ricevente. Le cultivar che possiedono due aplotipi S comuni sono quindi del tutto incompatibili, poiché non possono fecondarsi a vicenda.

Attualmente, la sequenza degli alleli S delle principali cultivar di melo è disponibile online, come nel Nagoya dataset (<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~hort/apple/>).

Questo servizio di ricerca può essere utilizzato dalle diverse parti della filiera agro-alimentare per progettare nuovi impianti, pianificare esperimenti. Pertanto, strumenti di questo genere migliorano la fruibilità dei dati e la loro applicazione.

La conoscenza di tecniche molecolari per la identificazione degli alleli S del melo, responsabili dei meccanismi di incompatibilità riproduttiva della specie è di estrema importanza per individuare le varietà impollinatrici migliori per la 'Rosa Romana' analogamente a quanto è stato fatto per altre varietà di melo. Per questo motivo, negli impianti di melo più recenti si adotta uno schema di campo misto, nel quale cultivar di melo differenti sono collocate in modo

alternato sullo stesso filare, favorendo così un'impollinazione incrociata da parte degli insetti pronubi.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

Un primo passo è stato quello di effettuare una caratterizzazione molecolare con 15 microsatelliti su 124 accessioni di melo campionate in diverse località dell'Appennino tosco-emiliano (tabella 1), in quanto considerati i migliori marcatori per esplorare la diversità genetica di una popolazione, grazie al loro elevato potere discriminante. I dati ottenuti serviranno per identificare le piante di riferimento per la moltiplicazione vivaistica della 'Rosa Romana'. La disponibilità dei profili genetici su un panel di piante di riferimento sarà alla base dello sviluppo di un protocollo efficiente per la certificazione varietale della mela 'Rosa Romana'. Il dendrogramma che mostra le relazioni tra le diverse accessioni è stato calcolato utilizzando il software NtsysPc 2.0 con il coefficiente di Dice (Dice, 1945). La cluster analisi e la costruzione del dendrogramma relativo alle distanze genetiche sono stati ottenuti con il metodo Upgma (Unweighted

pair-group method).

Successivamente, è stata studiata la determinazione degli alleli dell'incompatibilità riproduttiva (più noti come alleli S) per comprendere quali tra queste varietà antiche presenti possono rappresentare possibili cultivar "impollinatrici" da inserire ed utilizzare nei futuri impianti di melo 'Rosa Romana'.

RISULTATI

I 124 campioni raccolti sono stati amplificati con 15 coppie di primer già utilizzati dalla comunità scientifica per la loro buona capacità discriminante.

L'analisi cluster Upgma, basata sulla distanza genetica Dice, ha evidenziato la presenza di due gruppi principali di 'Rosa Romana' (Cluster 1 e Cluster 2) che condividono un elevato numero di alleli, confermando un alto grado di somiglianza tra i campioni analizzati (figura 1). I Cluster 1 e 2 presentano un elevato grado di parentela e, di conseguenza, di questo si dovrà tener conto per una corretta individuazione delle piante di riferimento per l'avvio dell'attività di propagazione vivaistica e per supportare

il nome della varietà protetta per il mercato. Un certo grado di eterogeneità genetica è atteso quando si analizzano varietà così antiche come la 'Rosa Romana', come risulta dai campioni Rosa Romana (#21, #98, #49, #19, #20).

L'analisi molecolare ha permesso inoltre di identificare un alto numero di piante erroneamente indicate come 'Rosa Romana' (#35, #47, #67, #85, #91, #92, #95, #99, #101, #117 e #118, indicati con una freccia in figura 1). Dal dendrogramma, inoltre, si evince che i due campioni di 'Rugginosa' (#13 e #14) hanno un profilo allelico identico; come anche i campioni di 'Musona verde' (#32, #45) e 'Musona Alba' (#12) sono tra loro identici e formano cluster solidi.

Grazie all'analisi cluster si sono identificati casi di sinonimia. In particolare, i campioni denominati 'Panaia' (#64) e 'Renetta Rossa' (#65) pur avendo una denominazione differente hanno un profilo allelico uguale. Si sono poi riscontrati anche casi di omonimia, ovvero, campioni aventi uguale denominazione ma differente profilo molecolare, quali i campioni 'Mela Rosa': uno è risultato essere all'interno del Cluster 1

(#26), un'altra accessione 'Mela Rosa PD' (#15) invece è risultata essere differente da tutti gli altri campioni analizzati. Infine, 'Mela Rosa' (#38) ha mostrato un profilo allelico coincidente a 'Commercio' (#16).

Un altro caso di omonimia è 'Cavicchio'. I campioni 'Cavicchio' (#5), 'Cavicchio' (#7) e 'Cavicchio' (#30) pur avendo la stessa denominazione risultano avere un profilo molecolare differente tra di loro e gli altri campioni analizzati.

Successivamente è stata determinata la combinazione degli alleli dell'incompatibilità riproduttiva del melo in 'Rosa Romana' e altre accessioni di mela presenti in Appennino per identificare le varietà che possano fungere da impollinatori della mela 'Rosa Romana'. Per questo motivo sono state campionate le principali varietà antiche presenti in prossimità degli alberi vetusti di 'Rosa Romana' nell'Appennino tosco-emiliano e sono state utilizzate come riferimento varietà di mele commerciali, quali 'Fuji' e 'Gala'.

La mela 'Rosa Romana' appartenente al cluster 1 presenta, come atteso essendo triploide, tre alleli S (S20 S26 S33) mentre



La mela Rosa Romana dell'Appennino bolognese



Sweet Aryana®
PAZUNIBO®



Sweet Lorenz®
PAZUNIBO®



TOP PLANT
VIVAI
PIANTE DA FRUTTO

Cherry
REVOLUTION



Marysa®
PAZUNIBO®



Sweet Gabriel®
PAZUNIBO®



Sweet Saretta®
PAZUNIBO®



Sweet Stephany®
PAZUNIBO®



Sweet Valina®
PAZUNIBO®



Areko®
(C.O.V.) • 22 Burlat



Henriette®
• 32 Burlat

Via Mazzoni, 125/E | S. Bonifacio (VR) | Italy | t. +39.045.7660205 | info@vivaitopplant.it | vivaitopplant.it

quella appartenente al cluster 2 ne evidenzia 2 pur essendo anch'essa triploide (S20 S33). La condivisione di due alleli (S20 ed S33) da parte dei campioni di 'Rosa Romana' appartenenti ai due diversi cluster rappresenta un'ulteriore prova a sostegno della somiglianza genetica fra queste accessioni (tabella 2). Tutte le antiche varietà analizzate sono compatibili per impollinare la mela 'Rosa Romana' e possono esserle consociate nei nuovi impianti che sono in fase di realizzazione.

GLI OBIETTIVI DEL FINGERPRINTING DELLA ROSA ROMANA

Questi risultati evidenziano come la mela 'Rosa Romana' sia un genotipo antico, propagato nell'area dell'Appennino tosco-emiliano da centinaia di anni, ben adattandosi ai diversi ambienti pedoclimatici che caratterizzano questi areali.

L'analisi molecolare con microsatelliti si è dimostrata l'approccio più efficiente per il fingerprinting delle varietà, per il riconoscimento di materiale precedentemente denominato in modo errato e, di conseguenza, per la conservazione dei genotipi riconducibili alla denominazione 'Rosa Romana'.

L'individuazione delle piante di riferimento corrispondenti a questa denominazione rappresentano il requisito fondamentale per impostare la corretta propagazione di questa vecchia varietà da parte dei vivaisti e per definire un piano di sviluppo per la sua rivalutazione e promozione.

Infine, non meno importante, c'è da tenere in considerazione l'interesse delle amministrazioni pubbliche, nazionali e regionali, per il recupero sul piano ambientale, sociale ed ecologico del patrimonio frutticolo e dei relativi paesaggi anche a scopo turistico. Tale attività di recupero e valorizzazione delle varietà storiche dell'Appennino rappresenta anche una occasione di supportare l'economia della montagna, anche in aree spesso disagiate.

Bibliografia disponibile in redazione

Articolo realizzato nell'ambito del Programma regionale di sviluppo rurale 2014-2020 – Tipo di operazione 16.1.01 – Gruppi operativi del partenariato europeo per l'innovazione: "produttività e sostenibilità dell'agricoltura" - Focus Area 3A - Progetto "Mela Rosa Romana dell'Appennino bolognese: organizzazione e valorizzazione di una filiera di qualità in biologico - MERR"

TAB. 1 - ELENCO DELLE 124 VARIETÀ ANALIZZATE

Nome Varietà	Numero Accessione	Numero Campione	Nome Varietà	Numero Accessione	Numero Campione
Abbondanza	1	123	Rosa del prete	1	74
Belfiore Giallo	2	50, 72	Rosa Gentile	3	28, 69, 78
Belfiore Rosso	1	68	Rosa Mantovana	1	63
Calimana	1	115	Rosa Marchigiana	1	124
Cavicchio	4	5, 7, 30, 114	Rosa Oliveto	1	66
Cioca Rumela	2	10, 11	Rosa Romana	68	1, 2, 3, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 34, 35, 36, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 46, 47, 49, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 67, 70, 75, 77, 80, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 110, 111, 113, 116, 117, 120, 121, 122
Commercio	1	16			
Durello	2	6, 73			
Durello di Ferrara	1	82			
Durello di Forlì	1	81			
Grill	1	17			
Imperatore	2	109, 112			
King of Pippins	1	83			
Lavina	1	9			
Mela Gialla	2	79, 107			
Mela Rosa	4	15, 26, 38, 71			
Mela Sassona	1	76			
Mela Striata	1	29			
Musona	4	8, 12, 32, 45			
Panaia	1	64			
Pomella Rossa	1	48	Rosa Romana Gentile	5	4, 24, 25, 118, 119
Renetta Cham- pagne	1	94	Rosa Trentino	1	37
Renetta Rossa	2	27, 65	Rosata Russolina	1	33
Renetta Walder	1	93	Rossa San Leo	1	31
			Rugginosa	2	13, 14

TAB. 2 - COMBINAZIONE ALLELICA AL LOCUS S DELLE VARIETÀ DI MELO DELL'APPENNINO E DELLE VARIETÀ DI RIFERIMENTO

Varietà	Provenienza	Alleli S
Abbondanza	DISTAL (BO)	S3 S5
Abbondanza rossa	DISTAL (BO)	S3 S5
Cavicchio	DISTAL (BO)	S1 S28
Cavicchio	Santa Maria Villiana (BO)	S5 S24
Cavicchio	Rocca Pitigliana (BO)	S1 S20
Durello di Forlì	DISTAL (BO)	S3 S50
Fuji	DISTAL (BO)	S1 S9
Gala	DISTAL (BO)	S2 S5
Gold Rush	DISTAL (BO)	S2 S28
Golden Delicious	DISTAL (BO)	S2 S3
Lavina	DISTAL (BO)	S1 S7
Musabò verde	DISTAL (BO)	S28/-
Musabò verde	Tignano-Mongardino (BO)	S6 S7
Rosa Gentile	Malfolle (BO)	S20 S50
Rosa Invernale	Montefeltro (BO)	S20 S33
Rosa Romana C1	Pietracolora (BO)	S20 S26 S33
Rosa Romana C2	Gaggio Montano (BO)	S20 S33
Rugginosa	Vigaia (BO)	S1 S20

