

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Corso di laurea in Scienze e tecnologie Agrarie

Caratterizzazione, uso e trasferimento di geni di  
resistenza alla ticchiolatura in cultivar commerciali di  
melo.

Relatore  
Prof. Francesco Favaron

Laureanda/o  
Stedile Fabio  
Matricola n. 612779

ANNO ACCADEMICO

2012 – 2013



## Riassunto

La tesi tratta l'argomento della resistenza genetica al patogeno del melo *Venturia inaequalis*, agente della ticchiolatura del melo.

L'ottenimento di produzioni esenti da sintomi di questa malattia richiede numerosi trattamenti fitosanitari, onerosi dal punto di vista economico e ambientale.

Nella trattazione si caratterizza il patogeno, il suo ciclo vitale, le razze che fino ad ora sono state identificate e i fattori di virulenza coinvolti nell'instaurarsi della malattia.

Vengono descritti i fattori di resistenza presenti nelle diverse cultivar di melo, i sintomi di resistenza e la relazione esistente, secondo la teoria di Flòr, tra i geni di resistenza e le razze del patogeno.

Segue una descrizione del lavoro di miglioramento genetico del melo per la resistenza alla ticchiolatura, compiuta fino ad oggi con i metodi di breeding classico usando il gene Vf, e il superamento di tale resistenza da parte di alcune razze del patogeno.

Vengono considerate anche le opportunità di miglioramento offerte dai metodi biotecnologici per l'ottenimento di una resistenza durevole e i risultati ottenuti con l'ingegneria genetica.

Sono descritti alcuni aspetti produttivi e commerciali delle cultivar ticchiolatura resistenti, considerando anche il germoplasma tradizionale italiano.

Vengono riportate alcune sperimentazioni effettuate su cultivar resistenti, considerando gli aspetti produttivi e qualitativi del melo e l'evoluzione epidemiologica della malattia in assenza di trattamenti fitosanitari o con trattamenti ridotti. Viene anche descritta e valutata l'efficienza della tecnica di miscele di cultivar per ridurre la malattia e diminuire la pressione selettiva contro la popolazione del patogeno. Infine si considerano alcuni aspetti legati alla commercializzazione che hanno relegato le cultivar resistenti a essere una produzione di nicchia nonostante il loro intrinseco potenziale.

## Abstract

Apple scab due to the fungus *Venturia inaequalis* is the major disease affecting apple cultivations in temperate regions. This disease is very difficult to be controlled without the use of chemicals, that are environmentally and economically costly. After a short description of pathogen's life cycle, of physiological races and of virulence factors involved in the development of the disease, I review the major scab resistance genes used in the breeding programs. Resistance genes and virulence factors seem to follow the gene x gene theory formulated by Flòr. However, the monogenic resistance is modulated by the genetic background of the cultivar and by some quantitative trait loci.

Increase of apple resistance to scab disease has been carried out with classical breeding techniques and mainly by introgressions of the Vf gene. Now biotechnological methods offers the opportunity to speed up the production of resistant cultivars and to obtain a durable resistance through the pyramidalization of several resistance genes.

Productive and commercial characteristics of the main scab resistant cultivars are described, considering also the Italian traditional germoplasm. Epidemiological studies reveal that evolution of the disease is affected by the degree of phytosanitary measures. Cultivars mixtures can lower the incidence of the disease and reduce the selective pressure against the pathogen population. Finally I discuss the reasons why the resistance cultivars are relegated to a marginal sector of the worldwide apple market.

# INDICE

1	LA COLTIVAZIONE DEL MELO.....	1
1.1	GENERALITA' .....	1
1.2	COLTIVAZIONE E CULTIVAR.....	1
1.3	IL MERCATO MELICOLO E I COSTI DI PRODUZIONE.....	3
2.	PATOGENI DEL MELO: VENTURIA INAEQUALIS.....	6
2.1	GENERALITA' .....	6
2.2	CICLO DI MALATTIA.....	6
2.3	SINTOMI.....	8
2.4	DIFESA.....	10
	2.4.1 Metodi preventivi.....	10
	2.4.2 Metodi chimici .....	10
	2.4.3 Modelli previsionali.....	11
	2.4.4 Resistenze genetiche.....	11
2.5	IL PROCESSO INFETTIVO.....	12
2.6	RAZZE.....	13
2.7	MANIFESTAZIONI DI RESISTENZA.....	15
3.	LA RESISTENZA ALL'INFEZIONE.....	19
3.1	MECCANISMI DI DIFESA.....	19
	3.1.1 Difese chimiche passive.....	19
	3.1.2 Difese chimiche attive.....	19
	3.1.3 La risposta ipersensibile.....	20
3.2	IL RICONOSCIMENTO DEL PATOGENO.....	20
3.3	LE BASI DELLA RESISTENZA GENETICA.....	21
	3.3.1 Resistenza monogenica.....	21
	3.3.1.1 I geni di resistenza.....	23
	3.3.2 Resistenza poligenica.....	25
	3.3.3 Resistenza ontogenetica.....	25

4.	MIGLIORAMENTO GENETICO DEL MELO.....	27
4.1	LA RESISTENZA VF E IL SUO USO NEL MIGLIORAMENTO.....	27
4.2	ESPRESSIONE DELLA RESISTENZA VF NELLE DIVERSE CULTIVAR.....	28
4.3	SUPERAMENTO DELLA RESISTENZA VF.....	30
4.4	RISPOSTE ISTOLOGICHE E BIOCHIMICHE DELLE CULTIVAR CONTENENTI IL GENE VF.....	33
4.5	IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEL GENE Vf.....	34
4.6	METODI DI MIGLIORAMENTO GENETICO.....	35
	4.6.1 Miglioramento genetico classico.....	35
	4.6.2 Selezione assistita da marcatori.....	37
	4.6.3 Metodi biotecnologici.....	37
	4.6.3.1 Organismi transgenici.....	38
	4.6.3.2 Organismi cisgenici.....	39
4.7	RESISTENZA DUREVOLE ALLE MALATTIE.....	41
4.8	LE RESISTENZE QUANTITATIVE.....	42
5.	CULTIVAR DI MELO RESISTENTI ALLA TICCHIOLATURA.....	44
5.1	SCELTA DELLA VARIETA' .....	45
5.2	DESCRIZIONE DI CULTIVAR COMMERCIALI RESISTENT.....	46
	5.2.1 Florina (Querina) .....	46
	5.2.2 Modì.....	47
	5.2.3 Juliet.....	48
	5.2.4 Ariwa.....	48
5.3	PROVE VARIETALI DU CULTIVAR RESISTENTI ALLA TICCHIOLATURA.....	50
	5.3.1 Cultivar resistenti: prove sui caratteri qualitativi.....	50
	5.3.2 Cultivar tradizionali italiane.....	52
6.	MESCOLANZE DI CULTIVAR.....	56
6.1	MECCANISMI DI SOPPRESSIONE DELLA MALATTIA.....	56
	6.1.1 Effetto barriera e diluizione dell'inoculo.....	57

6.1.2	Resistenza indotta.....	57
6.1.3	Modificazioni del microclima.....	58
6.2	EFFETTI DELLE MISCELE DI CULTIVAR NELL'EVOLUZIONE DELLE RAZZE DEL PATOGENO.....	58
6.3	CONSIDERAZIONI AGRONOMICHE.....	59
6.4	EFFICACIA DI MISCELE DI CULTIVAR NEL RIDURRE L'INCIDENZA DELLA TICCHIOLATURA.....	60
7.	CONSIDERAZIONI FINALI.....	63
8.	BIBLIOGRAFIA.....	64



## 1. COLTIVAZIONE DEL MELO

### 1.1 GENERALITA'

Il melo è l'albero da frutto dell'area temperata più importante al mondo sia per quantità, con circa 60 milioni di tonnellate annue prodotte, che per superfici coltivate.

Nel panorama frutticolo nazionale, la mela gioca un ruolo di protagonista indiscusso in quanto, oltre a essere il primo prodotto ortofrutticolo esportato nel mondo, l'Italia ne è anche il principale produttore europeo per quel che riguarda il consumo fresco.

Il genere *Malus* è costituito da una trentina di specie primarie, gran parte originarie dell'Asia centrale e Orientale, alcune delle americane, una soltanto (*Malus sylvestris*) nativa dell'Europa centrale.

Il melo coltivato, *Malus domestica*, è un ibrido complesso, alla costituzione del quale avrebbe contribuito il melo europeo (*M. sylvestris*), e specie asiatiche quali *M. baccata* e *M. prunifolia*, che si sarebbero ibridate naturalmente nelle valli che congiungono l'Europa all'Estremo oriente (Korban and Skirvin, 1984; Phipps et al., 1990).

Il trasferimento del melo verso l'Europa, dove ha trovato diffusione soprattutto nelle aree temperato-fredde, risalirebbe al Neolitico, circa 6000 anni fa.

### 1.2 COLTIVAZIONE E CULTIVAR

Il melo (figura 1.2.1) è una pianta arborea di dimensioni medio - elevate che può raggiungere l'altezza di 8-10 metri, tuttavia con l'uso di portainnesti nanizzanti, nelle moderne tecniche di coltivazione, si determina una marcata riduzione della taglia dell'albero intorno a 2 m. Esso presenta radici striscianti e poco profonde, le foglie sono



**Figura 1.2.1 Albero di melo**

alterne, inserite su nodi ravvicinati, di forma ovale, tomentose nella pagina inferiore e con il margine del lembo più o meno seghettato. Si manifestano gemme sia a legno che miste (gemme a legno e gemme a frutto). I fiori sono bianchi con sfumature rosate, riuniti in un'infiorescenza detta corimbo di 4-9 fiori (Figura 1.2.2). Il frutto è

un falso frutto carnosso, detto pomo o melonide, di colore e dimensioni diverse secondo le varietà. Il colore di fondo della buccia, nel frutto maturo, può essere verde, giallo, rosso o bicolore; il colore della polpa varia da bianco, a bianco verdastro, bianco-crema e giallastro.

Le principali cultivar di melo sono autosterili e quindi richiedono, per fornire regolari produzioni, l'impollinazione incrociata di tipo entomofilo. Per la costituzione di un meieto in campo, è quindi necessario che esso sia composto da più cultivar, di cui almeno una sia buona impollinatrice. Essa deve fornire una fioritura piuttosto lunga, almeno contemporanea o lievemente anticipata rispetto alla cultivar da impollinare.

Il melo viene propagato sia per via agamica che gamica. Nello specifico il portainnesto, l'elemento che fornirà la base, comprensiva dell'apparato radicale, della futura pianta, può essere propagato sia per via gamica (franchi) che per via agamica (clonali). Le cultivar invece sono propagate solo per innesto di gemme o porzioni di ramo (agamica) per mantenere le specifiche caratteristiche qualitative (Valli,1997).



**Figura 1.2.2 infiorescenza di melo**

Il panorama varietale del melo, dal secondo dopoguerra ad oggi, è radicalmente mutato. Negli anni '50 era diffusa la coltura di tipo promiscuo, ovvero erano coltivate piante appartenenti a specie o varietà diverse ed erano diffuse solo cultivar locali ottenute da semenzale. Dal 1960 si sono sempre più diffuse varietà appartenenti al gruppo Golden Delicious e Red Delicious, alle quali si sono poi aggiunte la Granny Smith e il gruppo Gala, la Fuji e la Braeburn. Queste nuove cultivar, ad elevata uniformità genetica, ottenute per moltiplicazione agamica, hanno portato una un'evoluzione delle tecniche produttive, con l'instaurarsi di monocolture varietali ed elevata meccanizzazione di tutte le tecniche colturali.

### 1.3 IL MERCATO MELICOLO E I COSTI DI PRODUZIONE

La produzione mondiale oggi supera i 63 milioni di tonnellate. Le aree maggiormente coinvolte sono l'Asia, che nel complesso contribuisce per il 55%, seguita dall'Europa con il 22% e dal continente americano con il 15%.

Nel panorama globale dei singoli paesi produttori, il primo posto è occupato dalla Cina che, con una produzione annuale in grado di superare i 20 milioni di tonnellate, distacca ampiamente gli altri paesi, ovvero gli Stati Uniti d'America, al secondo posto con una produzione di mele superiore ai 4 milioni di tonnellate, e la Turchia, con una quota media di 2,5 milioni di tonnellate di prodotto l'anno.

In riferimento alla situazione continentale, l'Unione Europea rappresenta il 15% della produzione mondiale. In particolare, le nazioni che ricoprono il ruolo dei maggiori produttori sono la Polonia, l'Italia e la Francia, seguite da Germania e Spagna (FAO, 2012).

L'Italia è il secondo produttore comunitario di mele con oltre 67 mila ettari coltivati per una produzione che supera spesso i 2 milioni di tonnellate all'anno. La coltivazione delle mele è praticata in tutto il territorio nazionale, tuttavia tre sono le regioni in cui si concentra la produzione: il Trentino Alto Adige, che detiene il primato produttivo con il 59,3% della produzione nazionale, il Veneto con il 13,8% e l'Emilia Romagna con il 9,6%, seguite dal Piemonte.

L'Italia risulta essere uno dei primi paesi esportatori nel mondo di mele e primo paese nell'Unione Europea. Quasi il 90% delle esportazioni di mele sono destinate verso paesi appartenenti all'Unione Europea e la quota rimanente viene indirizzata quasi esclusivamente a Stati europei al di fuori dell'UE. Il giro d'affari del mercato delle esportazioni melicole è variabile e dipende dall'annata e delle condizioni climatiche che influenzano la produzione, e si aggira intorno a 700.000.000 \$/anno (FAO, 2009).

La commercializzazione della mela è soggetta alla normativa europea CE N. 1221/2008, che ha modificato recentemente il regolamento (CE) n. 1580/2007, recante modalità di applicazione dei regolamenti (CE) n. 2200/96, (CE) n. 2201/96 e (CE) n. 1182/2007 nel settore degli ortofrutticoli.

Tale norma risulta applicata per tutte le varietà (cultivar) derivate da *Malus*

*domestica*, destinate ad essere fornite allo stato fresco al consumatore, ad esclusione delle mele destinate alla trasformazione industriale. Essa valuta alcuni parametri esteriori quali ad esempio la forma, il colore, il calibro ed individua, fra l'altro, la modalità di presentazione.

Le esportazioni sono inoltre condizionate dal metodo produttivo, in particolare dalla quantità di residui dei diversi agrofarmaci utilizzati, presenti sul frutto al momento della vendita. Diversi stati europei, verso i quali viene indirizzata l'esportazione, presentano diversa legislazione e diversi limiti, ponendo barriere all'acquisto di frutti con eccessiva presenza di sostanze chimiche utilizzate nell'ambito della produzione (Guerra W., comunicazione personale).

Per ottenere frutti di alta qualità, in particolare esenti da segni di attacco da parte di insetti e funghi, si rende necessario un continuo monitoraggio in campo, per valutare l'incidenza dei diversi patogeni e il raggiungimento delle soglie di intervento con insetticidi e fungicidi necessari per il controllo. Questo tipo di interventi, oltre a condizionare la possibilità di esportazione, incidono in maniera rilevante sui costi di produzione del frutto stesso (Figura 1.3.1) e (Figura 1.3.2).



**Figura 1.3.1** Composizione percentuale del costo di produzione per ettaro di meleto (GIAS, 2010).

**Figura 1.3.2** Costi delle principali operazioni effettuate per ettaro di meleto (GIAS, 2010).

L'abbattimento dei costi della produzione è possibile impiegando varietà di melo resistenti ai vari parassiti, esse comporterebbero minor numero di trattamenti per l'ottenimento di un prodotto sano, e una conseguente diminuzione dei costi totali.

In particolare molto interessanti a questo fine sono le varietà resistenti alla ticchiolatura del melo (*Venturia inaequalis*), la principale malattia fungina delle produzioni melicole nei nostri ambienti.

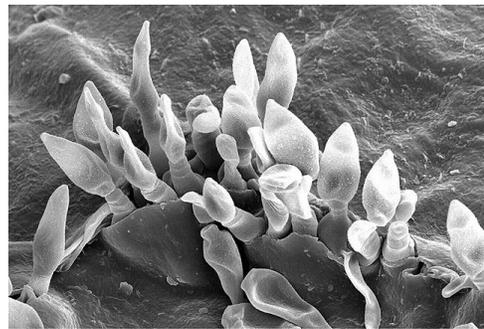
## 2. PATOGENI DEL MELO: VENTURIA INAEQUALIS

### 2.1 GENERALITA'

*Venturia inaequalis* (Wint.) è un ascomicete emibiotrofo che colpisce piante ornamentali e da frutto, agente causale della malattia detta Ticchiolatura del Melo. Questa è probabilmente la più grave patologia che affligge il melo coltivato in tutte le parti del mondo, causando ogni anno perdite di milioni di euro come perdite di produzione e spesa in fitofarmaci.

La forma anamorfa (sessuale) di *V. inaequalis* è chiamata *Fusicladium dentriticum* o *Spilocaea pomi*.

*Venturia inaequalis* è caratterizzata da micelio settato, molto ramificato, di colore olivaceo che tende al marrone con l'invecchiamento. Da ammassi ifali prendono origine i conidiofori che portano apicalmente, i conidi (Figura 2.1.1). Questi ultimi (dimensioni di 6-9 x 12-22  $\mu\text{m}$ ) possono essere costituiti da una o due cellule, sono piriformi e di colore bruno. Gli ascocarpi, che costituiscono i corpi fruttiferi del fungo sono pseudotecii (Figura 2.1.2), solitari ed immersi nelle foglie morte della pianta ospite. I pseudotecii hanno forma sferica o subsferica e caratterizzati da numerosi peli neri in corrispondenza dell'apertura, detta ostiolo. I pseudotecii contengono gli aschi, lunghi 60  $\mu\text{m}$  contenenti 8 ascospore aploidi. Il corredo cromosomico aploide di *Venturia inaequalis* è sette (Wikipedia,2012).



**Figura 2.1.1** Conidi di *V. inaequalis*



**Figura 2.1.2** Pseudotecio di *V. inaequalis*

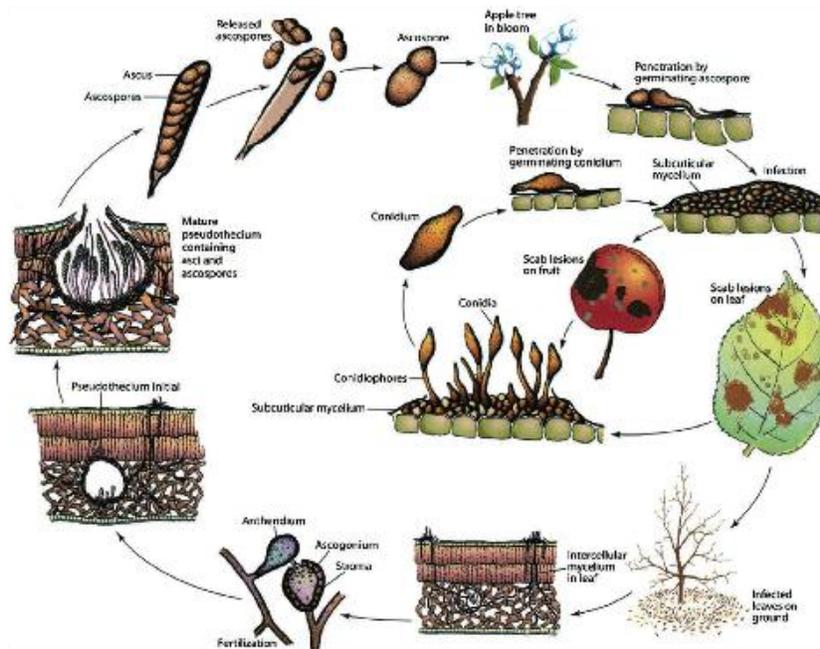
## 2.2 CICLO DI MALATTIA

Il ciclo infettivo inizia in primavera, quando le condizioni di temperatura e umidità favoriscono il rilascio in atmosfera delle ascospore e dei conidi. Negli ambienti freschi-umidi dell'Italia settentrionale, le infezioni primarie sono costituite prevalentemente da ascospore il cui rilascio avviene per lo più di giorno.

La germinazione delle ascospore e dei conidi avviene grazie alla presenza di un velo d'acqua sulla superficie dell'organo vegetale colpito. Inizialmente, si ha la produzione di un appressorio che permette l'adesione alla superficie dell'ospite; in seguito si osserva la formazione di un tubulo germinativo con successivo sviluppo di un'ifa primaria. L'ifa penetra attraverso la cuticola e si sviluppa tra quest'ultima e lo strato di cellule epidermiche sottostante, questa fase dell'infezione è biotrofica, non portando alla morte dei tessuti dell'ospite. Il sollevamento della cuticola causa le tipiche bollosità fogliari della ticchiolatura.

Dalle infezioni conidiche o ascosporiche primarie si originano nuovi conidi che andranno a costituire l'inoculo per le infezioni secondarie. Con la fuoriuscita delle ife conidiofore e la conseguente rottura della continuità dei tessuti ha inizio la fase necrotrofica della malattia.

L'approfondimento intercellulare di *Venturia inaequalis* continua nelle foglie cadute che garantiscono la conservazione dell'inoculo durante il periodo invernale. Durante questa fase saprofitaria si ha, tramite riproduzione sessuale che avviene in presenza di un altro individuo compatibile, la formazione degli ascocarpi che assumono la forma di pseudotecii e garantiscono la presenza dell'inoculo a primavera. Gli ascocarpi sono visibili con una lente osservando in trasparenza le foglie morte. In primavera, temperature attorno ai 20 °C ed elevata umidità sulle foglie sono condizioni ottimali per la maturazione finale degli ascocarpi e la liberazione delle ascospore. L'inoculo può conservarsi anche come micelio, nelle lesioni dei tessuti legnosi. In questo caso però non ci sarà riproduzione sessuale ma produzione di conidi infettivi in primavera. Il ciclo è rappresentato in Figura 2.2.1 (Belli G.,2006).



**Figura 2.2.1: ciclo di malattia di *V. inaequalis***

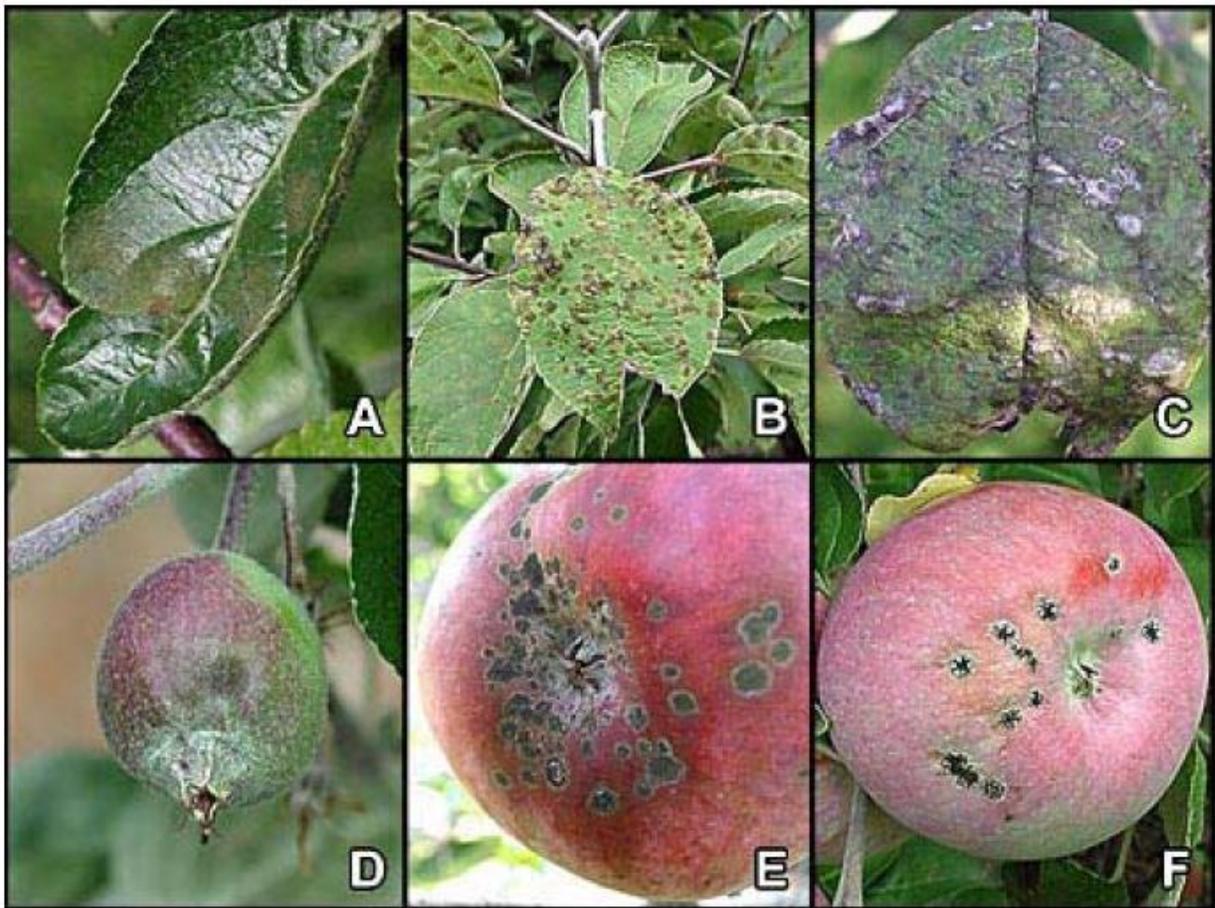
## 2.3 SINTOMI

La ticchiolatura può colpire le foglie, i germogli, i frutti ed occasionalmente anche i rami. Gli attacchi possono verificarsi sia in campo che in magazzino.

I sintomi si manifestano sulla pagina superiore delle foglie come macchie decolorate distribuite irregolarmente (Figura 2.3.1 A, B,C); in seguito, assumono una colorazione brunastra e contorni più definiti. Tali macchie, di colore più scuro, sono osservabili anche sulla pagina inferiore. Inizialmente sono poco percettibili, ma con l'avanzare della stagione tendono a confluire e a ricoprirsi di una muffa brunastra, di aspetto polverulento. Possono essere presenti bollosità e deformazioni che possono causare lacerazioni e spaccature se l'attacco avviene su foglie giovani. Le foglie ticchiate sono quindi soggette a disseccamento e a caduta precoce.

Le gemme colpite a fine stagione presentano macchie scure di dimensioni ridotte, mentre sui rami i sintomi sono visibili da fine giugno, sotto forma di pustole di pochi mm di diametro, di forma ovale o rotonda che in inverno o nella primavera successiva si spaccano, mettendo in mostra un ammasso di micelio compatto. Tale sintomatologia è però poco comune.

Sui fiori l'attacco può manifestarsi come lesioni brunastre dei tessuti, provocandone la colatura. Sui frutti (Figura 2.3 D, E, F), compaiono dapprima macchie puntiformi, bruno-olivastre, con forma rotondeggiante e aspetto vellutato in superficie. Nella parte centrale di queste macchie sono visibili, come una polverina brunastro, gli elementi riproduttivi agamici del fungo. Gli stadi giovanili sono quelli più vulnerabili; un attacco in questa fase può portare a suberificazioni, malformazioni, fessurazioni, aspetto rugoso e spaccature superficiali, causando inoltre la cascola precoce. Gli attacchi tardivi danno origine a lesioni meno estese, di colore marrone - nerastro, con un bordo bianco sottile dovuto al sollevamento della cuticola. Questo può portare a lesioni del frutto che consentono l'ingresso di microrganismi agenti di marciumi. In magazzino possono manifestarsi sintomi di ticchiolatura anche a temperature prossime a 0 °C, partendo da preesistenti infezioni di campo (Wikipedia,2012).



**Figura 2.3.1 A e B. Sintomi di ticchiolatura su foglie. C. Lesioni su una vecchia foglia ticchiolata con patogenosecondario che emerge a formare le macchie biancastre. D. Giovane lesione su un frutticino in sviluppo. E e F. Lesioni ben sviluppate su un frutto maturo (Fonte: Turechek and Koller, 2004).**

## 2.4 DIFESA

La difesa delle colture dalla ticchiolatura è un problema molto grave e oneroso dal punto di vista economico. Esso viene affrontato agendo in maniera preventiva e curativa, al fine di ridurre la quantità di inoculo (ascospore) presente nel frutteto all'inizio della stagione e limitare, con l'uso di prodotti chimici, la trasmissione dell'infezione da piante infette a piante sane in seguito al rilascio di spore asessuali.

### 2.4.1 Metodi preventivi

Limitare la presenza di fogliame caduto: il fungo sverna nelle foglie cadute, quindi la loro eliminazione riduce il potenziale di inoculo in primavera. La raccolta del fogliame caduto può risultare difficoltosa in un frutteto, si può quindi optare per concimazioni azotate autunnali, letamazioni o distribuzione di compost. Tali pratiche favoriscono l'attività microbiologica del suolo e quindi la rapida degradazione delle foglie infette. È anche possibile eseguire un'aratura al fine di interrare le foglie cadute

Ridurre della bagnatura fogliare: è necessario garantire una buona aerazione all'interno della chioma dell'albero tramite potature e sistemi d'allevamento adeguati; la concimazione deve garantire uno sviluppo equilibrato della pianta evitando un'eccessiva fittezza del fogliame (Wikipedia, 2012).

### 2.4.2 Metodi chimici

In genere la lotta comincia con il primo rilascio di ascospore e, nei nostri ambienti, prosegue fino a giugno. Successivamente, se vengono rilevati attacchi su foglie e frutti è opportuno proseguire i trattamenti fino alla raccolta.

Gli interventi possono essere effettuati a turno fisso: con cadenza di 6-7 giorni, fino a 15-20 trattamenti/anno, o a turno biologico in seguito alle piogge infettanti.

Le sostanze attive maggiormente utilizzate per la lotta a questo patogeno, appartengono a famiglie chimiche molto differenziate tra loro e sono: prodotti rameici, mancozeb, le strobilurine, gli inibitori della biosintesi di steroli (IBS) e i triazoli. Questi prodotti possono venire usati puri o in miscela tra loro. Dalla data di

introduzione sul mercato ad oggi, si sono verificati numerosi fenomeni di insorgenza di resistenze o tolleranze (Wikipedia, 2012).

#### 2.4.3 Modelli previsionali

Particolarmente utili si rivelano i modelli per una gestione razionale della malattia con trattamenti mirati. Il modello epidemiologico elaborato da Mills tiene conto della temperatura dell'aria e delle ore di bagnatura fogliare, per stabilire se insorge o meno il rischio di infezione e di rilascio di conidi, oltre alla gravità dell'infezione e l'andamento dell'incubazione. Questo modello, che deve essere adattato alle caratteristiche orografiche e meteorologiche del territorio su cui si opera, è utilizzabile dallo stadio C-C3 "orecchiette di topo", fino allo stadio di frutto a noce. Esso permette una riduzione considerevole del numero dei trattamenti e fornisce la sicurezza di intervenire nel momento più indicato (Wikipedia,2012; Mancini et al.1984).

#### 2.4.4 Resistente genetiche

Un'alternativa ai metodi preventivi e chimici per il controllo della ticchiolatura è la coltivazione di piante resistenti a questo fungo.

I geni di resistenza a *Venturia inaequalis* sono presenti naturalmente, in individui che sono evoluti a stretto contatto con il patogeno e hanno evoluto, con il passare dei millenni, forme di resistenza e tolleranza che permettono loro di svilupparsi e riprodursi anche con un elevato livello di inoculo, mostrando sintomi di infezione assenti o molto ridotti.

Le caratteristiche qualitative dei frutti prodotti dagli individui resistenti sono, dal punti di vista merceologico, piuttosto scadenti e sicuramente non appetibili dai consumatori. Dalla scoperta di questi geni di resistenza ad oggi, è stato compiuto un lunghissimo lavoro di breeding e selezione. Il fine è trasferire i geni di resistenza da specie selvatiche a cultivar commerciali, cercando poi di recuperare le caratteristiche produttive e qualitative di queste ultime. L'obiettivo di questo lavoro era risolvere definitivamente il problema della ticchiolatura (Belli,2006).

## 2.5 IL PROCESSO INFETTIVO

Per colonizzare l'ospite e dare il via alla malattia, le spore del patogeno devono aderire, germinare e formare strutture di infezione per penetrare l'ospite. Le ascospore di *V. inaequalis* aderiscono alla superficie umida e idrofobica delle foglie, formano un tubetto germinativo ad uno degli apici della spora. La penetrazione è attiva e avviene attraverso la cuticola, ma non attraverso gli stomi (MacHardy, 1996).

Una volta a contatto con la cuticola, il tubetto germinativo differenzia un appressorio e produce sostanze adesive mucillaginose che facilitano l'adesione alla superficie dell'ospite. Le sostanze mucillaginose sono composte da proteine e carboidrati come residui di B-galattosio e N-acetilglucosammina (Schumacher et al. 2008).

La presenza di un anello melanizzato alla base dell'appressorio in crescita è essenziale per il processo di patogenesi. Tuttavia Fitzgerald et al. (2004), silenziando uno dei geni deputati alla biosintesi di melanina in *V. inaequalis*, hanno osservato la persistenza della capacità di penetrazione. Non si osserva applicazione di forza meccanica durante la penetrazione della cuticola dell'ospite, si è quindi ipotizzato la penetrazione per mezzo di idrolisi enzimatica. Si è osservata l'attività di cutinasi extracellulari durante la fase di germinazione conidiale, e il trattamento con inibitori della cutinasi ha reso impossibile la penetrazione e la crescita subcuticolare. Si è inoltre osservata attività dell'enzima esterasi, forse prodotto per ammorbidire la cuticola e facilitare la penetrazione (Nicholson et al., 1972).

Dopo la penetrazione dell'ifa il micelio cresce per formare uno stroma subcuticolare. Da questo si dipartono ife conidiofore che emergono attraverso le pareti delle cellule ospiti, rompendo l'epidermide. Ife conidiofore e conidi, forniscono un aspetto vellutato alle lesioni caratteristiche dell'infezione. L'aspetto più enigmatico di *V. inaequalis* è il fatto che forma uno stroma subcuticolare senza danneggiare significativamente i tessuti dell'ospite. È stato ipotizzato che i CWDEs (Cell Wall Degrading Enzymes) degradando parete cellulare dell'ospite provochino il rilascio dei nutrienti necessari allo sviluppo del fungo. Tuttavia il fatto che non si osservano danni evidenti nei tessuti dell'ospite all'inizio della fase conidiale (necrotrofica) del patogeno, suggerisce un ruolo minore di questi enzimi nell'approvvigionamento di

nutrienti. Si ipotizza, pertanto, che i CWDEs di *V. inaequalis* siano rilasciati in maniera controllata per degradare solo la parete della cellula ospite e facilitare in questo modo la nutrizione, mentre in altri patogeni questo pool enzimatico è il più importante fattore di virulenza, in grado di scatenare risposte difensive da parte della pianta (Gopaljee et al. 2009). Il rilascio controllato di CWDEs potrebbe essere una strategia di *V. inaequalis* per prevenire l'attivazione di una risposta da parte della pianta, che contrasterebbe la crescita stessa del patogeno. La melanina prodotta, si ipotizza faciliti il lento e mirato rilascio di CWDEs e favorisca la permeabilità delle membrane delle cellule ospiti rendendo più efficace il recupero di nutrienti per la crescita e lo sviluppo del patogeno (MacHardy, 1996).

## 2.6 RAZZE

All'interno di una popolazione di *V. inaequalis* esiste una variabilità di caratteri molto elevata. Questa ipervariabilità si manifesta come una differente patogenicità su differenti cultivar di melo, probabilmente portanti geni di resistenza diversi. Basandosi su queste differenze, sono state caratterizzate otto razze fisiologiche distinte, in base alla cultivar ospite che riescono a infettare, come mostrato nella tabella sottostante (Tabella 2.6.1) (MacHardy, 1996).

Alcuni isolati di *V. inaequalis*, inoltre, riescono a infettare più di una cultivar, rendendo difficile la loro categorizzazione dentro una singola razza.

Razza	Fonte	Materiale suscettibile
1	Ovunque	La maggior parte delle cultivar mondiali
2	Sud Dakota, USA	<i>M. baccata</i> , Dolgo, Alexis, Bittercrab, progenie segreganti di R12740-7A, Geneva
3	Nuova Scozia, Canada	Geneva
4	Lafayette, Indiana, USA	Progenie segreganti di R12740-7A
5	Norwich, Inghilterra	<i>M. micromalus</i> (pit type), <i>M. atrosanguinea</i> 804
6	Ahrensburg, Germania	Prima (Vf) ma non Evereste, Perpetu e <i>M. floribunda</i> 821
7	Inghilterra	<i>M. floribunda</i> 821
8	Nuova Zelanda	Metà dell'incrocio 'Royal Gala' x <i>M. sieversii</i> W193B

**Tabella 2.6.1 razze di *V. inaequalis* e cultivar suscettibili**

L'interesse attorno alle diverse razze di ticchiolatura del melo ha portato alla seguente classificazione, la razza 1 è quella comunemente trovata in USA e in altri stati che produceva buona sporulazione su tutte le cultivar domestiche ma solo macchie o lesioni necrotiche senza sporulazione su Dolgo, 'R12740-7A' e 'Geneva'; la razza 2, invece, infettava e sporulava sulle cultivar 'Dolgo', alcuni segreganti della varietà russa 'R12740-7A' e 'Geneva'. La razza 3 infettava solo 'Geneva'.

Nel 1969 venne identificata (Williams, Kuc 1969) la cosiddetta razza 4 su semenzali ticchiolatura-resistenti (*M. pumila* R12740-7A) presso l'università di Purdue, USA (1969).

La razza fisiologica 5 è stata segnalata per la prima volta in Inghilterra, (Williams, Brown 1968). Questa razza è capace superare una resistenza di tipo 'pin-point pit' in *M. micromalus* e *M. atrosanguinea* 804.

La Razza 6 è stata per prima descritta da Parisi et al.(1993) su cultivar "Prima" portante il gene Vf. Gli isolati di questa razza sono tuttavia incapaci di infettare il progenitore *M. floribunda* 821 che resta tuttora resistente alla razza 6. La patogenicità della razza 6 è stata ulteriormente studiata da Parisi e Lespinasse (1996) su cloni di melo. La razza 6 ha dato sintomi su quasi tutte le 37 Vf-cultivar testate, mentre 'Granny Smith' e tre cultivar altri geni di resistenza (Vbj, Vr e Va) non sono suscettibili.

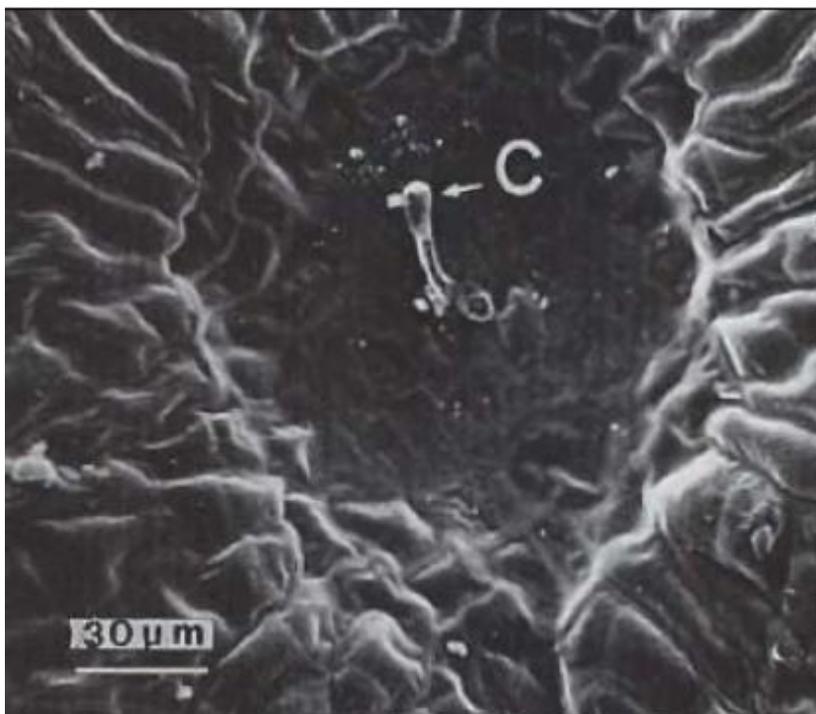
La razza 7 è stata scoperta in Inghilterra e descritta da Roberts e Crute (1994). Un isolato raccolto da un esemplare di *M. floribunda* naturalmente infetto dava lesioni su *M. floribunda* 821 e su alcune cultivar con il gene Vf mentre altre cultivar con Vf non risultavano infette. Più tardi un secondo gene dominante (Vfh) fu scoperto in *M. floribunda* 821. 'Golden Delicious' è suscettibile a tutte le altre razze del patogeno, ad eccezione della razza 7 (Benaouf e Parisi 2000) grazie alla presenza del gene Vg.

Bus et al.(2005) hanno descritto un'ulteriore razza, 8, isolata da un incrocio 'Royal Gala' x *M. sieversii* W193B capace di superare una resistenza effimera denominata Vh8.

## 2.7 MANIFESTAZIONI DI RESISTENZA

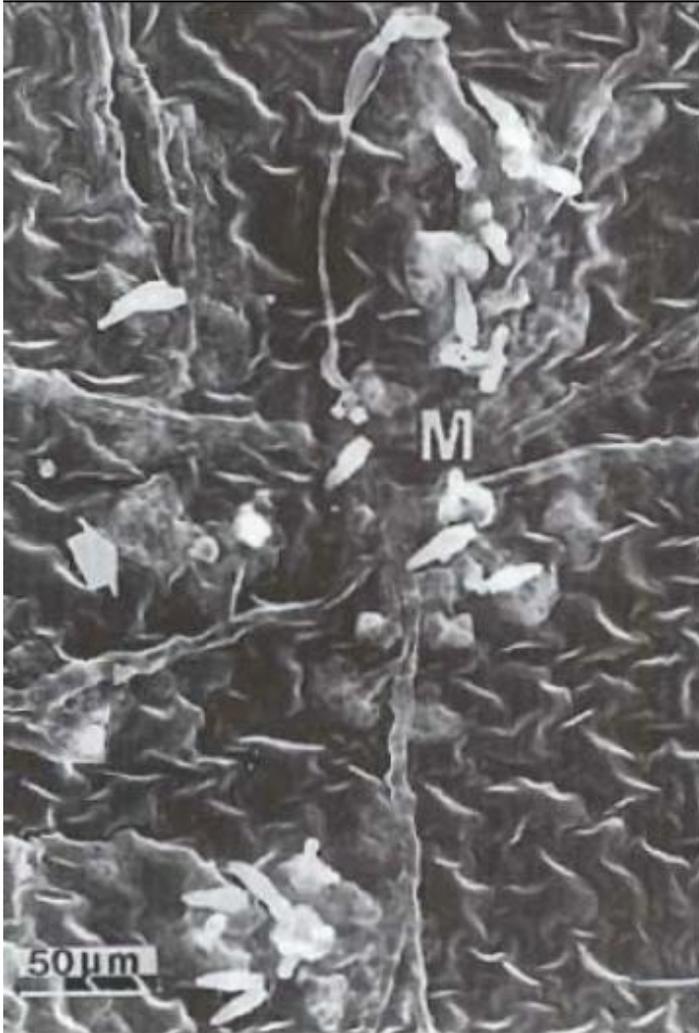
Sintomi particolari sono correlati con la presenza nell'ospite di un particolare tipo di resistenza, per esempio, la tipica reazione ipersensibile visibile come piccoli 'pin-point pits' è storicamente associata alla presenza del gene *Vm*, anche se recentemente questo tipo di risposta è stato riportato anche per altre forme di resistenza. La formazione di questi 'pin-point pits' e l'imbrunimento dei tessuti è visibile sulle foglie a 72 h dall'inoculo con il patogeno (Chevalier, 1988). Hough nel 1944 classificò tutto il suo materiale ticchiolatura-resistente utilizzando un sistema quantitativo suddiviso in 5 classi di sintomi:

- classe 0: mancanza di sintomi visibili,
- classe 1: 'pin-point pits' osservati nelle selezioni con il gene *Vm* sono il sintomo evidente di una tipica risposta ipersensibile con morte cellulare rapida ed estesa, che causa anche cambiamenti a livello del tessuto a palizzata nelle cellule venute a contatto col patogeno (Figura 2.7.1);



**Figura 2.7.1** Reazione di ipersensibilità (classe 1) del clone 9AR2T196, che porta il gene di resistenza a ticchiolatura *Vm*, alla razza 1 di *V. inaequalis*: al fondo della depressione un conidio (C) forma un appressorio. Fonte: Guillaumès et al 1995.

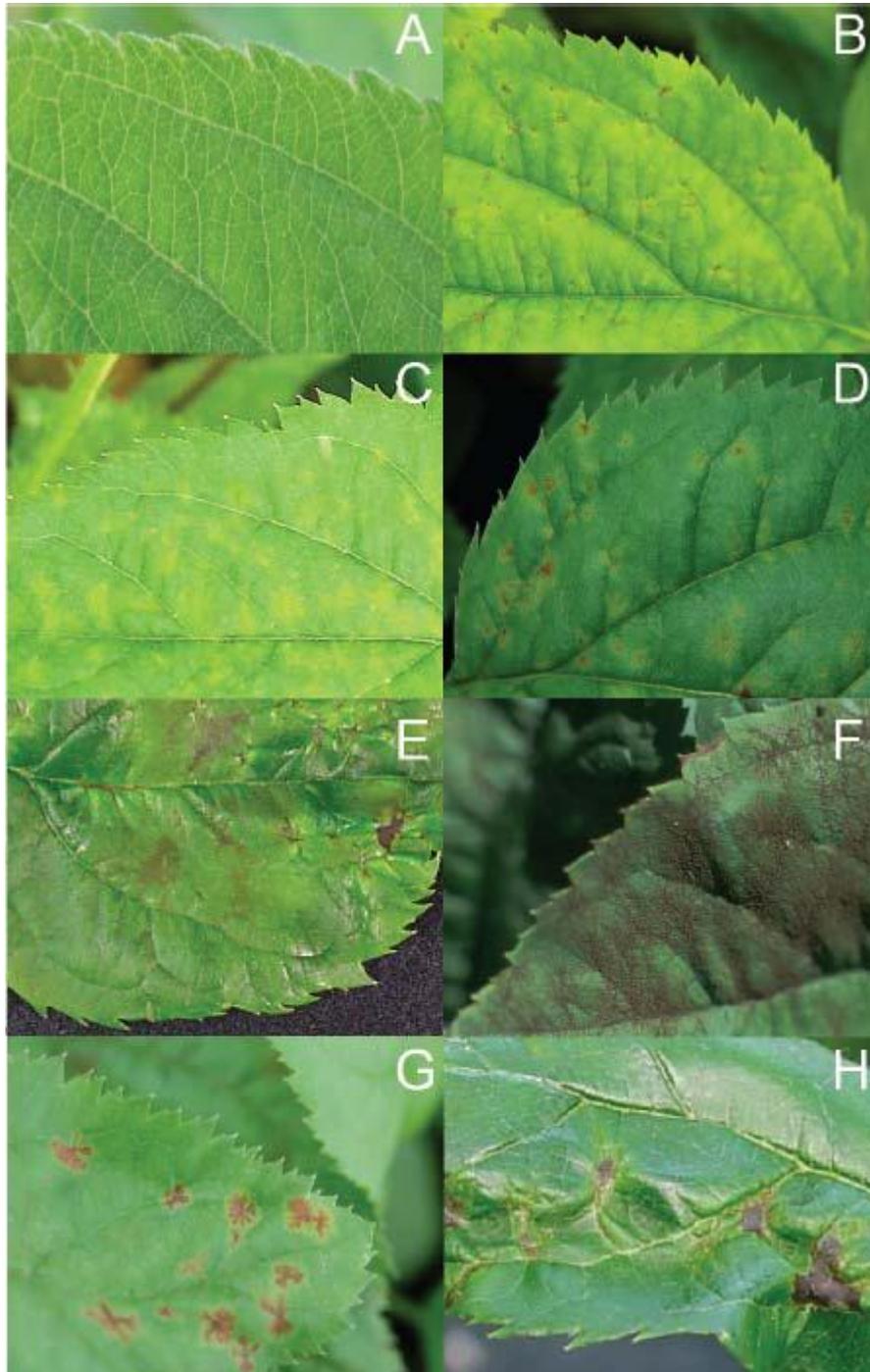
- classe 2: macchie o lesioni clorotiche e necrotiche ma senza sporulazione;
- classe 3: macchie o lesioni clorotiche e necrotiche con presenza di una ristretta sporulazione;
- classe 4: interazione suscettibile con abbondante sporulazione, equivalente alla classe 3 a inserita tra la 2 e la 3b (Figura 2.7.2).



**Figura 2.7.2** Abbattimento della resistenza a ticchiolatura nel clone 9AR2T196 da parte della razza 5 di *V. inaequalis*: il micelio sub cuticolare (M) è abbondante come anche la sporulazione. In tal caso la sintomatologia è riferibile ad una classe 4 di Chevalier (et al., 1991).  
Fonte: Guillaumès et al 1995.

La classe 3b di Chevalier indica la presenza di stroma del fungo subcuticolare, mentre l'epidermide e il tessuto a palizzata mostrano significativi cambiamenti se comparati ad un tessuto sano. Le differenze tra le classi 2, 3a e 3b sono puramente quantitative. La variabilità dei sintomi associata alla resistenza del gene Vf è ascrivibile all'ambiente genetico in cui il Vf è posizionato (Rouselle et al., 1975; Gessler, 1989). Le progenie che portano il cluster di geni Vf si dividono, infatti, tra le classi 0, 2, 3a and 3b, con alcuni individui anche in classe 4 (Gianfranceschi et al., 1996).

La presenza di altri geni di resistenza determina la manifestazione di sintomi specifici, come ad esempio il gene Vh2 che è associato con una necrosi stellare dopo circa 4-6 giorni dall'infezione, come anche la resistenza effimera recentemente descritta per il gene Vh8 a seguito di infezione con la razza fisiologica 8. La caratteristica forma a stella deriva dal collasso e necrosi del tessuto a palizzata sotto lo stroma fungino, che si sviluppa radialmente dal punto di penetrazione del fungo, e coincide con la morte di un'estesa area di epidermide che assume aspetto clorotico/necrotico. I geni Vh4 e Vm sono associati alla classica risposta ipersensibile, Vfh causa anch'esso una risposta ipersensibile ma ritardata; Vb, Vbj e le altre varie resistenze sconosciute presenti in *M. × domestica* elicitano macchie che vanno dal giallo alla necrosi e anche alla necrosi con sporulazione sparsa simile a quella trovata nelle selezioni con il gene Vf . Questo interessante approccio ha determinato l'introduzione della classe M (lesioni necrotiche, alcune con sporulazione) tra le classi 2 e 3 (Figura 2.7.3) (Cova, 2008).



**Figura 2.7.3** Foto di alcune classi di reazioni a seguito di inoculo con *V. inaequalis* (circa 21 giorni dopo l'inoculo): A. Classe 0 o mancanza di sintomi; B. Classe 1 o 'pin point pits' (Vm e Vh4); C. Classe 2; D. Classe 3a; E. Classe 3b; F. Classe 4 o completa suscettibilità; G. Necrosi stellata (Vh2 and Vh8); H. Vg-necrosi (Fonte: Gessler et al., 2006).

### 3. LA RESISTENZA ALL'INFEZIONE

#### 3.1 MECCANISMI DI DIFESA

Lo stato di malattia rappresenta più l'eccezione che la regola nell'arco della vita della pianta, in termini di co-evoluzione la pressione esercitata dal patogeno ha determinato la selezione di ospiti in grado di opporsi all'infezione, d'altro canto la resistenza dell'ospite ha imposto pressione selettiva sul patogeno.

La pianta ha evoluto due meccanismi di difesa: difese passive e difese attive, che a loro volta si dividono in chimiche e strutturali.

Col termine difese passive strutturali si intendono tessuti e strutture cellulari (cuticola e parete) che si oppongono fisicamente al patogeno. Le difese attive strutturali sono neo appositioni di materiale di varia natura (lignina e callosio) presso sito di infezione (Belli 2006).

##### 3.1.1 Difese chimiche passive

Le difese chimiche passive sono caratterizzate da composti di natura antibiotica prodotti in maniera costitutiva e sempre presenti in tutte le cellule dell'organismo anche in assenza di infezione (fitoanticipine e proteine). Le fitoanticipine sono presenti nelle cellule in forma attiva o attivabile, sono compartimentalizzate in vacuoli e rilasciate al momento della rottura della struttura cellulare (es: penetrazione fungina). Le proteina di difesa costitutive sono principalmente inibitori di proteasi e amilasi, e sono tessuto specifiche, trovandosi quasi solo in semi e frutti (Belli, 2006).

##### 3.1.2 Difese chimiche attive

Le difese chimiche attive (fitoalessine e proteine PR) sono composti sintetizzati nei tessuti dell'ospite al momento del riconoscimento dell'infezione. Esse non sono normalmente presenti nella cellula vegetale, hanno basso peso molecolare e sono prodotte in seguito a riconoscimento dei microorganismi. Hanno lo scopo particolare di

inibire la crescita microbica, sono attive solo nei primi stadi dell'infezione. Le proteine PR sono invece un gruppo di proteine non correlate fra loro facenti parte del sistema difensivo della pianta, vengono prodotte in caso di stress abiotico e biotico. Sono raggruppate in 17 famiglie, ognuna con specifica attività enzimatica (Belli, 2006).

### 3.1.3 La risposta ipersensibile

Un'altra forma di difesa chimica attiva è la cosiddetta reazione ipersensibile (HR), questa è una forma di morte cellulare programmata, per bloccare il patogeno e preservare la pianta dall'infezione. HR si può manifestare con tutti i tipi di patogeni e conferisce un alto grado di resistenza all'ospite, è la forma di resistenza più diffusa ed efficace, contro i patogeni biotrofici ed emibiotrofici.

Al momento del riconoscimento del prodotto di un patogeno (elicitore) da parte dell'ospite viene indotta la formazione di ROS (specie reattive all'ossigeno) entro la cellula, con conseguente morte e lignificazione delle pareti. Il segnale di HR viene inviato alle cellule adiacenti che si comportano alla stessa maniera. Il patogeno si trova così murato tra cellule con parete lignificata, privo di rapporto biotrofico e avvelenato dalle fitoalessine e dalle altre sostanze tossiche. Più è rapido il riconoscimento patogeno - ospite e più veloce è la HR (Belli, 2006).

## 3.2 IL RICONOSCIMENTO DEL PATOGENO

La resistenza della pianta ospite nei confronti del patogeno si manifesta unicamente in seguito al suo riconoscimento. La forma di resistenza più diffusa in natura (resistenza non ospite specifica) è quella indotta dal riconoscimento di strutture molecolari associate ai patogeni, mentre negli altri casi la resistenza è esplicata in seguito al riconoscimento di prodotti genici (elicitori) prodotti da specifiche razze del patogeno (resistenza ospite specifica).

Per elicitore si intende qualsiasi segnale molecolare prodotto direttamente o indirettamente dal patogeno, in grado di essere variamente riconosciuto dall'ospite e

di stimolarne una risposta attiva di difesa. Gli elicitori si suddividono in aspecifici (es: frammenti di parete o membrana, flagelli, steroli, chitina e chitosano) che inducono una resistenza non ospite specifica, mentre gli elicitori specifici inducono una reazione ospite specifica.

Gli elicitori specifici, quelli coinvolti nella resistenza del melo verso *V. inaequalis*, sono molecole prodotte esclusivamente da singole razze o ceppi del patogeno e attive solo verso determinate cultivar dell'ospite. Essi rappresentano i prodotti di geni di avirulenza (avr), inducono resistenza ospite specifica in seguito all'interazione con recettori codificati dai geni di resistenza (R), interazione che viene detta gene per gene. In altre parole, la resistenza si manifesta esclusivamente in seguito al riconoscimento degli elicitori, mentre in assenza di uno dei fattori citati o di entrambi contemporaneamente (avr e R), potrebbe non verificarsi. Questa teoria, del gene per gene, è stata postulata da Flor nel 1955 e si applica a tutte le interazioni tra pianta e patogeno dove la resistenza è regolata da singoli geni. La resistenza ospite specifica conferisce un alto grado di resistenza con un unico grave inconveniente, ovvero che può essere facilmente aggirata in seguito alla mutazione di uno dei geni coinvolti nel riconoscimento (Belli, 2006).

### 3.3 LE BASI DELLA RESISTENZA GENETICA

La resistenza genetica è dovuta a uno o più geni che determinano la presenza di barriere strutturali o sostanze chimiche che si oppongono all'attacco del patogeno o attivano la sintesi di composti attivi in caso di infezione.

#### 3.3.1 Resistenza monogenica

Si parla di resistenza monogenica o verticale quando il fattore di resistenza a un patogeno è codificato da uno o pochi geni, di solito recettori, coinvolti nel riconoscimento di elicitori specifici prodotti da una o poche razze del patogeno. Nel caso di riconoscimento positivo viene dato il via a una catena di segnali biochimici che culminano con la risposta ipersensibile da parte dell'ospite. Si tratta di una forma di

resistenza estremamente efficace, ma provoca una fortissima pressione evolutiva sulla popolazione del patogeno, nella quale si differenziano razze in grado di superarla.

Nel sistema Venturia-melo molto geni di resistenza R sono stati isolati in diverse cultivar di melo e numerosi sforzi sono stati compiuti per caratterizzare i geni di avirulenza (avr) di Venturia (MacHardy, 1996). In accordo con la nomenclatura proposta da Bus et al. (2009) i geni di resistenza alla ticchiolatura sono chiamati Rvik e i rispettivi geni di avirulenza sono chiamati avrRvik. La vecchia e nuova nomenclatura per i geni di resistenza con i rispettivi ospiti è riportata in Tabella 3.3.1, insieme alla sintomatologia specifica della loro azione (Gopaljee et al. 2009).

**Tabella 3.3.1 : Fattori di resistenza isolati fino ad oggi in diverse cultivar di melo, e loro posizione nel genoma. Gopaljee et al. 2009**

S.N.	R-Gene		Source <sup>a</sup> /host	Linkage group	Resistance response <sup>b</sup>	Molecular marker (~Distance from the gene in cM)
	Old name	New name				
1	V <sub>a</sub>	Rvi10	Antonovka Type PI 172623 Differential host: h10	LG-1	Class 1	B398480 (16)
2	V <sub>b</sub>	Rvi12	Hansen's baccata #2 Differential host: h12	LG-12 (Distal end)	Class 2 to 3b	H102d05 (7.8) H107f01(13.7)
3	V <sub>bj</sub>	Rvi11	Malus baccata JackII Differential host: h11	LG-2 (Distal end)	Class 0 to 3b	CH05e03 (0.6) T6 (3.9)
4	V <sub>d</sub>	Rvi13	Durello di Forlì Differential host: h13	LG-10 (Proximal end)	Class 2	OPAF07-880 (2.0) CH2b07 (9.0)
5	V <sub>d5</sub>		1980-015-025	LG1	—	CH-Vf1 (1) 67005F17 (7)
6	V <sub>dg</sub>	Rvi9	J34; Differential host: h9	—	—	
7	—	Rvi14	Dülmener Rosenapfel Differential host: h14	LG-6 (Proximal end)	Class 2	HB09TC (5)
8	V <sub>f</sub>	Rvi6	"Priscilla" Differential host: h6	LG-1 (Distal end)	Class 0 to 3b	M18 (0.2) CH-Vf1 (0.0) AL07 (0.9)
9	V <sub>fb</sub>	Rvi7	Malus floribunda 821 Differential host: h7	LG-8	Class 1	
10	V <sub>g</sub>	Rvi1	Golden Delicious Differential host: h1	LG-12 (Distal end)	Class 2	MC105 (3.0) CH01D03 (0.5)
11	V <sub>h2</sub>	Rvi2	Malus pumila R12740-7A (TSR34T15) Differential host: h2	LG-2 (Distal end)	Class 2	OPL 19 433(1) Ch02b10 (8)
12	V <sub>h3.1</sub>	Rvi3	Q71; Differential host: h3	—	—	
13	V <sub>h4/Vr1</sub>	Rvi4	Malus pumila R12740-7A (TSR33T239) Differential host: 4	LG-2 (Distal end)	Class 1	S22 (4) CH02c02 (5)
14	V <sub>h8</sub>	Rvi8	Malus sieversii W193B Differential host: 8	LG-2 (Distal end)	Class 2	OPL19 (1.3)
15	V <sub>m</sub>	Rvi5	Malus micromalus 245-38, Malus atrosanguinea 840 Differential host: h5	LG-17 (Distal end)	Class1	OPB12 (6)
16	V <sub>r2</sub>	Rvi15	GMAL 2473 Differential host: h15	LG-2 (Proximal end)	Class 0 to 2	CH02c02a (0.0)

### 3.3.1.1 I geni di resistenza

Il gene *Va* è stato isolato dall'accessione PI172623 derivata dalla cultivar Russa 'Antonovka' ed induce una risposta ipersensibile di tipo 'pit' (Dayton and Williams, 1968). È stato recentemente mappato nel linkage group 1 (Hemmat et al., 2003) a circa 25 cM dal gene *Vf* in trans ma non si sa ancora da quale parte del cromosoma rispetto al gene *Vf* (Zini 2005).

Il gene *Vb* da Hansen's baccata #2 fu putativamente posizionato da Hemmat et al. (2003) nel linkage group 1 a 25 cM dalla regione del *Vf*. Finora non si riportano superamenti della resistenza recata dal gene *Vb*.

Il gene *Vbj* da *Malus baccata jackii* è stato mappato nella parte distale del LG 2 e il marcatore molecolare più strettamente associato al gene di resistenza è il microsatellite CH05e03, localizzato a circa 0,6 cM (Gygax et al., 2004). Anche per questo gene non si segnalano per ora superamenti della resistenza da parte di nuove razze di *V. inaequalis*.

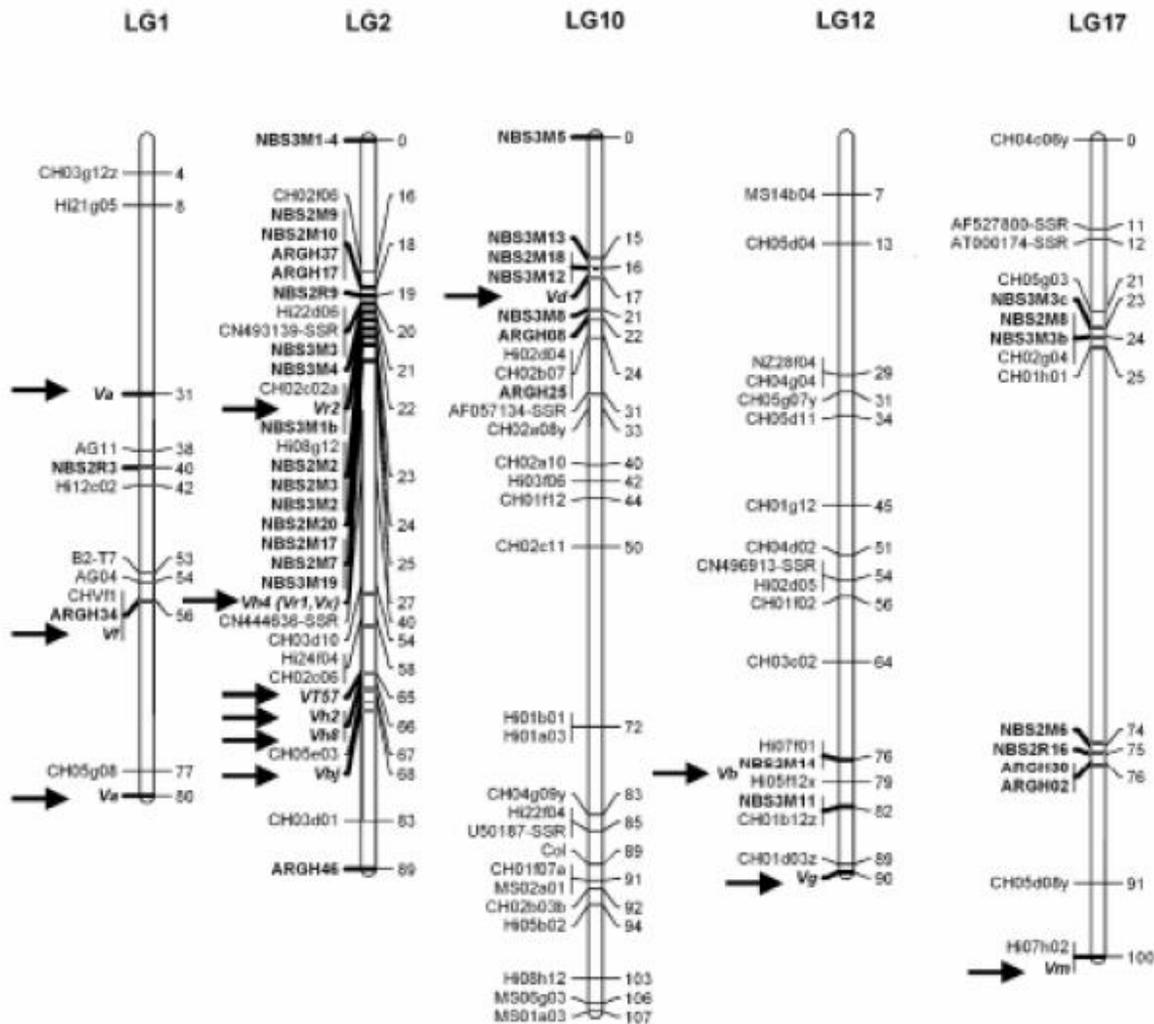
Il gene *Vd* da 'Durello di Forlì' conferisce resistenza contro la razza 6 di *V. inaequalis* (Tartarini et al., 2004) ed è stato posizionato nel LG10 vicino ad alcuni geni NBS (Nucleotide Binding Site).

Il gene *Vg* da 'Golden Delicious', che conferisce una resistenza verticale alla razza 7 di *V. inaequalis*, fu identificato da Bènaouf et al. (2000). La resistenza conferita dal gene *Vg* si manifesta con grandi lesioni necrotiche con increspamento della foglia già a 10 giorni dall'inoculo con la razza 7. Degno di nota è il fatto che questa razza è virulenta *Malus floribunda* 821 ma non 'Golden Delicious' che pur risulta sensibile a tutte le razze fisiologiche di *V. inaequalis*.

I geni *Vh2* e *Vh4* sono localizzati nel linkage group 2.

Il gene *Vh8* (Bus et al., 2005b), che deriva da *M. sieversii* W193B e conferisce una resistenza effimera già superata dalla razza 8 di *V. inaequalis*, è stato mappato sempre nel LG2 vicino ad altri loci di resistenza tra cui il *Vbj* e *Vh2* che conferisce anch'esso resistenza effimera.

Il gene *Vr2* da 'GMAL 2473' è stato mappato anch'esso nel LG2 vicino al gene *Vh4*.



**Localizzazione genomica dei principali geni di resistenza alla ticchiolatura in melo: nel LG1 sono localizzati i geni Vf e Va; nel LG2 sono mappati i geni Vr2, Vh2, Vh8, Vbj; nel LG10 c'è il gene Vd; nel LG12 sono localizzati i geni Vb e il gene Vg; mentre nel LG17 è mappato nella parte distale del cromosoma il gene Vm (Cova, 2008).**

### 3.3.2 Resistenza poligenica

La resistenza poligenica o orizzontale si basa sull'induzione nell'ospite di una serie di manifestazioni fenotipiche atte a rendere più difficoltosa e meno conveniente la colonizzazione. Essa è difficilmente superabile, è attiva contro tutti i ceppi del patogeno, anche se meno efficace rispetto alla monogenica. La sua efficacia è può essere influenzata dalle condizioni ambientali e dalla quantità di inoculo. Non è codificata da un singolo gene ma dipende da un insieme di caratteri molto diversi e geneticamente molto distanti che, agendo sinergicamente, impediscono l'infezione. È' il caso della cultivar di melo russa Antonovka, che non presenta nessun gene di resistenza specifico per *V. inaequalis*, ma che è considerata comunque resistente per la sua bassa suscettibilità al patogeno (Belli, 2006).

### 3.3.3 Resistenza ontogenetica

La resistenza ontogenetica, o costitutiva, è la forma di resistenza comune a tutte le cultivar di melo, essa è legata all'età e allo stato sanitario della pianta, in questa forma di resistenza l'infezione è soppressa al momento della penetrazione della cuticola. I fattori che regolano questa forma di resistenza non sono chiari, ma si pensa siano legati allo spessore della parete delle cellule e al pH subcuticolare, oltre che a condizioni di crescita e al vigore della pianta. Essa si instaura dopo il superamento della giovanile di foglie e frutti e viene superata dal patogeno con la senescenza fogliare (Belli, 2006).

Nella tabella 3.3.3 sono riportati i fattori genici che regolano la virulenza di *V. inaequalis* (Gopaljee et al. 2009).

Locus/Gene	Associated functions
Avirulence factors	
<i>avrVf</i> ( <i>avrRvi6</i> )	Avirulent on apple cultivars containing <i>Vf</i> ( <i>Rvi6</i> )
<i>avrVg</i> ( <i>avrRvi1</i> )	Avirulent on apple cultivars containing <i>Vg</i> ( <i>Rvi1</i> )
<i>avrVm</i> ( <i>avrRvi5</i> )	Avirulent on apple cultivars containing <i>Vm</i> ( <i>Rvi5</i> )
<i>avrVh2</i> ( <i>avrRvi2</i> )	Avirulent on apple cultivars containing <i>Vh2</i> ( <i>Vr2</i> ; <i>Rvi2</i> )
<i>avrVfh</i> ( <i>avrRvi7</i> )	Avirulent on apple cultivars containing <i>Vfh</i> ( <i>Rvi7</i> )
<i>avrVh8</i> ( <i>avrRvi8</i> )	Avirulent on apple cultivars containing <i>Vh8</i> ( <i>Rvi8</i> )
<i>avrVd</i> ( <i>avrRvi13</i> )	Avirulent on apple cultivars containing <i>Vd</i> ( <i>Rvi13</i> )
Cell Wall Degrading enzymes (CWDEs)	Promote pathogen entry into the host and facilitates nutrients uptake
Cellulase	”
$\beta$ -D-glucosidase	”
Polygalacturonase (endo-PG & Exo-PG)	”
Cutinase	Assists pathogen in cuticle penetration and sub-cuticular growth
Esterase	Assists pathogen in cuticle penetration by softening cutin

**Tabella 3.3.3 Fattori che regolano la virulenza di *Venturia Inaequalis* su melo (Gopaljee et al. 2009).**

#### 4. MIGLIORAMENTO GENETICO DEL MELO

Dagli albori della coltivazione del melo, l'uomo ha imparato a innestare porzioni di rami o gemme, da una particolare pianta su un portainnesto, per mantenere i caratteri distintivi e desiderati, che sarebbero perduti quando il melo è propagato tramite incrocio e seme. Questo fenomeno ha portato all'elevata uniformità genetica che riscontriamo oggi tra le diverse cultivar di melo nei frutteti. Il patogeno che causa la ticchiolatura del melo (*Venturia inaequalis*) è favorito dalla omogeneità genetica dell'ospite, e questa malattia è divenuta ben presto un flagello per i coltivatori, costretti a numerosi e costosi trattamenti antifungini, ad elevato impatto ambientale, per ottenere una produzione sana ed esente da infezione. I coltivatori hanno presto riconosciuto l'importanza di incrociare e selezionare varietà per i caratteri di resistenza a questa malattia, e alcuni breeders hanno notato il potenziale che sarebbe derivato dall'incrocio con specie di melo selvatiche, resistenti a questa infezione.

Questi ultimi erano consapevoli che, dopo l'incrocio di una cultivar commerciale con una specie selvatica, sono necessari un elevato numero di reincroci (backcross) con cultivar di alta qualità per eliminare i caratteri "selvatici" dalla discendenza e ripristinare le caratteristiche qualitative perdute. Per ogni reincrocio, è necessario analizzare i caratteri qualitativi e di resistenza di un elevato numero di discendenti ottenuti da seme pertanto ogni breeder continua il lavoro di selezione del suo predecessore utilizzando le selezioni più avanzate per il suo stesso lavoro di incrocio, con il risultato che singoli geni di resistenza sono stati utilizzati per molteplici programmi di miglioramento. Nell'incrocio per la resistenza alla ticchiolatura, il gene Vf , originato da una pianta di *Malus floribunda* 821 è quello più comunemente introdotto nelle cultivar odierne considerate resistenti alla ticchiolatura (Gessler C. e Pertot I. 2011).

##### 4.1 LA RESISTENZA VF E IL SUO USO NEL MIGLIORAMENTO

All'Università dell'Illinois, nel 1914-15 sono stati incrociati da Crandall (1926), per la prima volta, la cultivar "Rome Beauty" con la pianta di *M.floribunda* n°821 e sono stati prodotti all'incirca 450 semi che sono stati trapiantati e poi incrociati tra loro.

Una parte del materiale è stata propagata e 20 anni dopo due piante, denominate F226829-2-2 e F226830-2 si sono dimostrate resistenti alla ticchiolatura. Esse furono utilizzate per ulteriori incroci e venne analizzata l'ereditarietà del carattere di resistenza alla ticchiolatura, chiamato Vf, acronimo di (Venturia e floribunda) (Williams et al., 1966).

Queste due piante sono state il materiale di partenza per i programmi di miglioramento sviluppati dalla Purdue University, Rutgers University, e University of Illinois che hanno costituito la cultivar "Prima". Questa cultivar è stata la capostipite di una lunga serie di cultivar prodotte dalla collaborazione di questi istituti, portando, oltre i caratteri di resistenza alla ticchiolatura, anche caratteri qualitativi accettabili ma non eccellenti. Tutte le cultivar prodotte hanno mostrato eterozigosi per il gene Vf.

Analizzando la segregazione dei caratteri di resistenza derivanti dalla selezione di genotipi di *M.prunifolia*, *M.astrosanguinea*, *M.baccata* e *M.prunifolia microcarpa*, si è concluso che i geni coinvolti nella resistenza a *V. inaequalis* sono gli stessi, o forme alleliche, di quelli coinvolti nella resistenza mostrata da *M.floribunda*. Oggi si calcola che i programmi che utilizzano il gene Vf per la resistenza alla ticchiolatura siano oltre diciassette, con più di quarantotto cultivar prodotte fino ad ora (Crosby et al. 1992). Negli anni '70 e '80 sono stati fatti numerosi sforzi per introdurre la resistenza alla ticchiolatura in melo, e in alcuni casi si è tentato di diversificare le fonti di geni di resistenza e accumulare resistenze diverse entro lo stesso genotipo.

Il principale ostacolo da superare per l'inserimento di più di un fattore di resistenza alla ticchiolatura, è stata l'assenza di un sistema veloce ed economico per riconoscere la progenie che ha ereditato più di un gene di resistenza dai progenitori, dal momento che non sono fenotipicamente distinguibili. Solo l'analisi della segregazione dei caratteri in F2 permette il riconoscimento di piante omozigoti al locus R (Williams et al. 1966) che daranno una progenie 3:1 di piante resistenti, mentre gli individui che in F2 daranno progenie 1:1 sono eterozigoti per la resistenza. Anche l'utilizzo di una singola razza di patogeno, in grado di superare solo un tipo di resistenza, è un buon indicatore per la selezione di genotipi contenenti più geni (Williams and Kuc, 1969). I programmi di miglioramento occidentali, hanno fatto affidamento al solo gene Vf per

l'inserimento delle resistenze. Oggi l'avvento di tecniche come MAS o basate sull'ingegneria genetica permettono una più rapida selezione e inserimento di resistenze multiple per la resistenza alla ticchiolatura.

#### 4.2 ESPRESSIONE DELLA RESISTENZA VF NELLE DIVERSE CULTIVAR

La resistenza data dal gene Vf in seguito ad inoculo con estratti conidiali di *V. inaequalis* non è uniforme. *M.floribunda 821* e alcuni dei suoi discendenti reagiscono con la formazione di pin-point pits mentre le reazioni delle selezioni di partenza F226829-2-2 e F226830-2 e di tutte le cultivar resistenti derivate da queste piante variano tra nessuna reazione macroscopica visibile fino alla formazione di ristrette aree necrotiche con scarsa sporulazione. Questo suggerisce (Williams and Kuc, 1969) che l'originale resistenza Vf (*M.floribunda 821*) non è dovuta a un singolo gene ereditabile qualitativamente, ma a un gruppo di geni quantitativi strettamente collegati o a un gene qualitativo che da reazione di tipo tre (macchie necrotiche con sporulazione scarsa) collegato con uno o più geni quantitativi. L'esistenza di un secondo gene dominante in *M.floribunda* è stata dimostrata da Parisi e Leptinasse (1999). Questo secondo gene, strettamente collegato a Vf ed ereditato solo da F226830-2, è chiamato Vf<sub>h</sub> perché sembra essere il mediatore della reazione ipersensibile. Vf<sub>h</sub> non è stato ereditato da F226829-2-2 e di conseguenza è assente nei genomi di tutta la sua discendenza.

Questo fatto, però, non è ancora in grado di spiegare perché il gene Vf non dia una reazione di resistenza uniforme in tutte le cultivar di melo selezionate. Rouselle et al. (1974) suggeriscono che l'effetto cumulativo di geni minori ereditati sia dal progenitore resistente, che da quello non resistente, modifica il livello di resistenza espresso da Vf. Un numero diverso di questi geni minori è ereditato dalle piante figlie, modulando in questa maniera il grado di resistenza. Alcuni di questi geni minori sono persi nei reincroci per ripristinare la qualità, e questo spiega perché piante portanti il gene Vf diano reazioni sintomatologiche di tipo 3b, essendo comunque considerate resistenti. Seglias (1997) ha definito i loci che contribuiscono quantitativamente alla resistenza come "loci modificatori" e i loci che contribuiscono sempre alla resistenza,

anche in individui non portatori del gene Vf come “loci di resistenza di sottofondo”. In conclusione la resistenza Vf, da una parte corrisponde alla definizione di resistenza qualitativa (si/no), governata da un singolo gene come nella reazione gene per gene vista prima. D'altra parte la reazione mediata dalla resistenza Vf non è uniforme, ma dipende dall'ambiente genetico in cui è inserita ed ha caratteristiche quantitative (più/meno). Inoltre individui omozigoti per il gene Vf sembrano esprimere una resistenza maggiore di quelli eterozigoti.

#### 4.3 SUPERAMENTO DELLA RESISTENZA VF

Molti breeder hanno avvertito che l'uso del gene Vf per mediare la resistenza alla ticchiolatura, avrebbe portato ad aumentare esponenzialmente il rischio di evoluzione di genotipi del patogeno in grado di superare detta resistenza.

Nella banca del germoplasma presente ad Ahrensburg, in Germania, sintomi di ticchiolatura si sono osservati sulla cultivar resistente “Prima”, fin dal 1984. Dal 1988 si sono iniziate a notare lesioni necrotiche sporulanti su altre cultivar considerate resistenti, presenti nello stessa banca del germoplasma. Studi dettagliati di inoculo, portati avanti dall'INRA (Parisi et al., 1993), hanno mostrato che l'inoculo proveniente da Ahrensburg era in grado di infettare e dare sporulazione su altre cultivar resistenti, mentre *M.floribunda* 821 risultava ancora resistente. Il patotipo di *Venturia inaequalis* isolata a Ahrensburg è denominata “razza 6”. Altri studi (Parisi e Leptinasse, 1996) hanno dimostrato che *M.floribunda* ha una resistenza additiva, rispetto alle normali cultivar Vf, che è stata persa durante i processi di ibridazione. Robert e Crute (1994) hanno testato un mix di spore trovato su un albero di *M.floribunda* infestato da *V. inaequalis* in un giardino di East Malling, e hanno notato la formazione di lesioni sporulanti sull'originale *M.floribunda* 821 e sulle cultivar Vf “Jonafree”, “Liberty”, “Macfree”, “Redfree”, “Priscilla” e “Novamac”, ma non su “Prima”, “Priam” e “Florina”. Questo patotipo, chiamato “razza 7” si è dimostrato avirulento su “Golden Delicious”.

La resistenza di “Florina”, “Priam”, “Prima” e “Sir Prize” alla razza 7 del patogeno può essere spiegata assumendo che essi abbiano ereditato uno gene di resistenza

sconosciuto da uno dei loro antenati suscettibili, il quale è attivo contro questa particolare popolazione di *V. inaequalis* (MacHardy, 2001). La cultivar “Golden Delicious” possiede il suddetto gene di resistenza prima sconosciuto denominato “Vg” che esplica la resistenza alla razza 7 del patogeno, oltre a rendere resistenti allo stesso patotipo altre cultivar che si pensava possedessero solo Vf. “Golden Delicious” è stata infatti ampiamente utilizzata in diversi programmi di miglioramento ed è presente nei pedigree di molte cultivar con resistenza Vf, come ad esempio “Florina” (Benaous and Parisi, 2000).

L’identificazione delle razze 6 e 7 del patogeno hanno mostrato la vulnerabilità di tutti i frutteti Vf alla minaccia rappresentata da *V. inaequalis*. Possiamo trarre alcune conclusioni dal fatto che la razza 6 sia stata trovata in una banca di germoplasma resistente (Vf) e la razza 7 su una pianta ornamentale resistente vicino alla sede di questa banca del germoplasma, e non in un “frutteto trappola” che include cultivar con resistenze specifiche, di solito utilizzato per definire in modo univoco le razze del patogeno. I “frutteti trappola” non possono essere utilizzati come affidabili indicatori per l’individuazione di nuove razze, visto che la distribuzione e la frequenza di razze in grado di superare le resistenze potrebbe essere troppo localizzata e di basso livello per essere riconosciuta come tale. Il luogo del primo avvistamento di una razza virulenta su cultivar Vf suggerisce l’introduzione della stessa attraverso una specifica pianta ospite. La mutazione da avirVf a virVf risulta essere estremamente rara o inesistente, altrimenti questo fenomeno sarebbe apparso in primo luogo in un frutteto con piante con resistenza Vf. Nel caso di Ahrensburg possiamo ipotizzare che la razza 6 sia stata introdotta con materiale utilizzato per il miglioramento. Questa ipotesi è supportata dal fatto che in questa razza mancano la maggior parte dei geni che la renderebbero capace di svilupparsi sulle cultivar commerciali, e solo attraverso numerosi passaggi di reincrocio con razze locali (anni) potrebbe acquisire la fitness necessaria che le permetterebbe di essere virulenta (Gessler e Pertot 2011). In molti frutteti commerciali, in cui i frutticoltori hanno sperimentato cultivar Vf, sono state osservati sintomi di malattia sulle foglie della cultivar “Prima” ma queste osservazioni non erano consecutive negli anni. Si può ipotizzare quindi che in condizioni molto

favorevoli per lo sviluppo della ticchiolatura, la resistenza di “Prima” può essere superata, ma queste razze sono diverse dalla razza 6 del patogeno.

Dal 2004 la distribuzione geografica delle razze 6 e 7 di *V. inaequalis* è divenuta oggetto di studio del progetto europeo EU-DARE (Durable Apple scab REsistance) (Parisi et al. 2004). Questo studio ha mostrato come le razze 6 e 7 sono presenti in tutto il nord Europa (nord Francia, Danimarca, Belgio, Olanda, sud Svezia e nord Germania). In Svizzera la razza 7 è stata trovata su una singola pianta di *M. floribunda*, ma dopo l’eradicazione non sono stati rilevati altri casi nel paese. Dal 2009 sono stati trovati anche in Nord America casi del superamento della resistenza Vf da parte della razza 7. Alla luce dei dati riportati è lecito indagare sul ruolo delle piante di melo ornamentali nella diffusione della razza 7 in una nuova regione geografica, come anche sull’origine della razza stessa (derivante da una mutazione o proveniente da meli importati dal lontano Oriente, luogo di evoluzione del melo) (Gessler e Pertot 2011).

Nelle zone dove la resistenza Vf è stata ampiamente superata, il problema rimane comunque confinato a particolari ambiti produttivi, come frutteti biologici dove non si interviene con alcun trattamento antifungino. La completa perdita di resistenza è associata all’assenza di misure di controllo. Nei frutteti Vf in cui alcune basilari regole sono applicate (assenza di cultivar suscettibili, trattamenti in caso di alto rischio di infezione ed eliminazione in caso di individuazione di inoculo conidiale), le cultivar Vf sono rimaste resistenti alla ticchiolatura, o con un livello di infezione estremamente ridotto (Caffier et al. 2010). Sulla base di queste esperienze si può assumere che, con una gestione appropriata, la resistenza Vf può ancora considerarsi efficace. Sono quindi raccomandati, anche nei frutteti Vf un minimo di 2 - 3 trattamenti nel momento di picco di maturazione delle ascospore, quando vi è un alto rischio di infezione (Hohn et al. 2010).

In conclusione si può affermare che, anche se la resistenza Vf è stata superata, questo evento appare raro e probabilmente dovuto a particolari genotipi di *V. inaequalis* originati al di fuori dell’Europa e del Nord America, che si sono mescolati con le razze locali. Il rischio di diffusione del superamento della resistenza Vf da parte di razze locali di *V. inaequalis* è maggiore in frutteti biologici.

#### 4.4 RISPOSTE ISTOLOGICHE E BIOCHIMICHE DELLE CULTIVAR CONTENENTI IL GENE VF

Il meccanismo di azione della resistenza Vf è ancora sconosciuto. La resistenza presentata da *M.floribunda* 821 è stata originariamente divisa in due tipi di sintomatologia: Vf e Vfh. La resistenza dipendente da Vfh è caratterizzata dalla formazione di “pin-point pits” dovuta a una rapida risposta ipersensibile che caratterizza la morte delle cellule intorno al punto di ingresso (Chevalier e Leptinasse, 1989). Vf invece è caratterizzata dall’assenza di sintomi o da una clorosi o necrosi, a volte con sporulazione sparsa, dipendente dal corredo genetico in cui la resistenza è inserita. Nella reazione provocata da Vf in seguito ad infezione, Chevalier ha descritto estese modificazioni citologiche dello strato superiore dell’epidermide, con manifestazioni necrotiche che si possono estendere fino al parenchima a palizzata. In contrasto, in un tessuto suscettibile il fungo si sviluppa e sporula, e le cellule, prima di dare necrosi, sono più simili a quelle del tessuto non infetto (Chevalier e Leptinasse, 1989).

La cuticola è la prima linea di resistenza contro l’ingresso di patogeni, si è osservato però, che anche nelle cultivar con resistenza Vf, il fungo è in grado di penetrare e formare uno stroma primario sulle foglie giovani. La differenza tra una cultivar suscettibile e una Vf sta nel numero di appressori sotto i quali il suddetto stroma primario può essere osservato e l’estensione di questo fenomeno (Valsangiacomo e Gessler, 1988). Questa forma di resistenza può essere paragonata alla resistenza ontogenetica che interviene anche nelle cultivar suscettibili. In uno studio sull’interazione tra *V. inaequalis* e il melo, è stato interpretato il cambiamento ultrastrutturale nella parete delle cellule della pianta, al di sotto dello stroma fungino, come una degradazione di sostanze pectiche da parte del fungo. Valsangiacomo et al. (1992) sono però stati in grado di escludere qualsiasi correlazione tra la resistenza Vf e l’assenza di degradazione della parete cellulare.

Treutter e Feucht (1990) hanno individuato nelle cultivar che possiedono resistenza Vf una maggiore quantità di flavan-3-oli nelle foglie e nella buccia dei frutti rispetto a cultivar suscettibili.

Un trattamento su foglie con acido L-alfa-amminoossi-beta-fenilpropionico (AOPP), un inibitore dell'enzima fenilalanina-ammonio-liasi ha rotto la resistenza della cultivar "Sir Prize", contenente il gene Vf. Questa osservazione sembra indicare che il gene che conferisce la resistenza alla ticchiolatura regola anche la sintesi di fenoli (Michalek et al. 1999). In generale le cultivar Vf mostrano una maggior quantità e un maggior numero di sostanze fenoliche nei tessuti, rispetto a cultivar suscettibili, anche se la correlazione non è ancora chiara e può essere attribuita agli incroci con specie selvatiche da cui derivano.

#### 4.5 IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEL GENE Vf

Nel 2001 Vinatzer et al. hanno riportato l'identificazione di un cluster di 4 geni putativamente codificanti recettori, con un'alta omologia con la famiglia dei geni di pomodoro associati alla resistenza a *Cladosporium Fulvum*. La struttura tradotta della sequenza amminoacidica codificata dai geni contiene un dominio extracellulare ricco di leucine (LLR) e un dominio transmembrana con un alto livello di sostituzione amminoacidica nella regione LLR. Questi quattro geni sono stati chiamati HcrVf1, HcrVf2, HcrVf3 e HcrVf4. Questi stessi geni sono stati identificati nella regione di genoma codificante la resistenza in *M. floribunda* 821, dove sono chiamati da Vf1 a Vf4 (Xu e Korban 2002). Differenti livelli di espressione sono stati osservati in fasi di sviluppo della foglia; Vf1, Vf2 e Vf3 sono maggiormente espressi nelle foglie giovani, mentre Vf4 è maggiormente espresso in foglie mature.

Dagli studi effettuati, è risultato che dei quattro geni inizialmente identificati, HcrVf3 non è funzionale dal momento che la sua sequenza appare troncata, HcrVf1 e 4 non hanno alcun ruolo nella resistenza alla ticchiolatura, mentre l'utilizzo di HcrVf2 fornisce un diverso grado di resistenza, e questa resistenza è simile allo spettro di sintomi osservabili in una progenie derivante da incroci tra individui Vf (Belfanti et. al 2004). HcrVf2 è anche espresso costitutivamente in piante transgeniche, sotto il controllo del suo stesso promotore e terminatore, come nelle piante Vf ottenute con i classici metodi di breeding.

Le piante trasformate con il gene HcrVf2 riconoscono tutti i genotipi di ticchiolatura ad eccezione della razza 6 (Joshi 2010) e 7 (Silfverberg 2004). E' possibile infine concludere che HcrVf2 funziona in individui suscettibili trasformati, allo stesso modo che in quelli ottenuti con i classici metodi di breeding, e che la cascata di segnali difensivi indotta dal gene Vf, è presente intatta ma inattiva, nelle cultivar suscettibili. Al momento, il meccanismo di resistenza Vf non è ancora compreso, come non sono stati identificati elementi della cascata difensiva, e non è ancora chiaro quali geni influenzino l'efficacia della resistenza Vf (Gessler e Pertot 2011).

## 4.6 METODI DI MIGLIORAMENTO GENETICO

### 4.6.1 Miglioramento genetico classico

Il miglioramento genetico classico per ottenere una cultivar di melo commerciale è molto lungo e costoso. Nel primo passo di questo lungo iter, sul fiore portaseme emasculato (madre) viene posto del polline di origine conosciuta (padre) conosciuto. (Figura 4.6.1.1) La scelta dei due parentali è chiaramente molto importante ed è in funzione dei caratteri che vogliamo selezionare. Il fiore viene poi protetto in un piccolo sacchetto a seguito dell'impollinazione manuale, per evitare contaminazioni con polline indesiderato, e a maturazione il frutto viene raccolto.



**Figura 4.6.1.1 Impollinazione incrociata di fiori di melo**

Durante la stagione seguente i semi estratti dai frutti ottenuti vengono seminati e viene fatta una selezione già sui semenzali. La fase giovanile è lunga e va da 4 anni fino a più di 7-8. Alcune volte il reincrocio con il parentale che porta i caratteri qualitativi d'interesse risulta necessario per ottenere le caratteristiche ricercate, poiché normalmente i caratteri di resistenza derivano da varietà selvatiche che risultano inadatte alle necessità del mercato.

Purtroppo il reincrocio è una strada poco praticabile per le specie arboree a causa soprattutto della lunghezza della fase giovanile, infatti a causa delle limitazioni del miglioramento genetico convenzionale il potenziale del germoplasma del melo rimane tuttora poco esplorato (Hammerschlag, 2000).

In ogni caso se i tratti desiderati sono sotto controllo poligenico può evidenziarsi un 'range' di differenze molto marcato (Janick & Moore, 1996).

Come già detto, nonostante l'alta diversità genetica nel genere *Malus*, la grande maggioranza della produzione mondiale è ottenuta da un numero limitato di cultivar (Way et al., 1991). Le cultivar commerciali più importanti sono incluse in programmi di miglioramento genetico su ampia scala per aumentare la qualità della frutta. La cultivar 'Golden Delicious' e i suoi derivati, come 'Gala', sono i parentali più spesso usati negli incroci. Anche se il breeding convenzionale ha prodotto nuove cultivar con qualità migliorate, un gran numero di piante commercialmente coltivate derivano sia da semenzali ottenuti per caso, come 'Delicious', 'McIntosh' e 'Granny Smith', sia da mutazioni spontanee che si sono originate nel tessuto somatico di alcune importanti varietà coltivate (Korban and Chen 1992).

Ai giorni nostri, le nuove tecniche colturali permettono di soddisfare una grossa domanda di mercato con cultivar altamente produttive, uniformi e che sopportano lunghi tempi di immagazzinamento. Certamente la resistenza a fattori biotici e alle malattie del post-raccolta sono tratti molto ricercati per una produzione di frutta su larga scala.

#### 4.6.2 Selezione assistita da marcatori

Il termine MAS (Marker Assisted Selection) indica un nuovo metodo di selezione che consente di accelerare il trasferimento di un gene di interesse da una specie all'altra in programmi di incrocio mediante l'ausilio di marcatori molecolari associati a tale gene.

In genere l'introggressione di caratteri utili presenti in specie selvatiche porta con sé anche una parte di patrimonio genetico molto diverso rispetto a quello delle varietà coltivate, incluse anche caratteristiche che si vogliono eliminare nella cultivar finale. Con l'ausilio di marcatori molecolari è possibile seguire l'introggressione di tali geni in genotipi coltivati per la costituzione di nuove varietà che portino solo le caratteristiche ricercate. Invece di selezionare per il carattere, che spesso si esprime in fase tardiva di sviluppo della pianta, si può selezionare direttamente sul DNA della pianta, in fase precoce di sviluppo.

Per poter ottenere una buona selezione assistita da marcatori è necessario sviluppare dei 'marker' strettamente associati al gene oggetto di studio, in modo da diminuire o eliminare la probabilità di formazione di ricombinanti non associati con il gene di interesse. Si valuta che i tempi di ottenimento di cultivar migliorate si riduca del 50-80% se si utilizza un approccio di questo tipo (Cova, 2008).

#### 4.6.3 Metodi biotecnologici

A causa dell'alta sensibilità a malattie fungine della maggior parte dei portainnesti e cultivar commerciali, la trasformazione genetica si è rivelata un metodo valido per la produzione di cultivar resistenti. La trasformazione genetica di una pianta è il processo in cui un particolare frammenti di DNA (un gene) è introdotto e integrato nel genoma di una pianta, evitando la riproduzione sessuale, che implica una troppo elevata ricombinazione dei caratteri, con perdita delle caratteristiche di qualità che caratterizzano le cultivar incrociate. L'ingegneria genetica amplia notevolmente le possibilità di utilizzo delle risorse geniche, altrimenti limitata agli incroci

convenzionali, permettendo l'uso di materiale isolato da piante, animali e microorganismi (Brasileiro and Dusi, 1999).

Il metodo più ampiamente utilizzato per la trasformazione delle dicotiledoni, e in particolare del melo, fa uso di *Agrobacterium tumefaciens*. Nel plasmide Ti di questo batterio, vengono inseriti i geni che devono essere trasferiti nel genoma della pianta infettata. Per questa operazione è sufficiente solo un frammento di foglia, o una coltura di callo, in cui indurre la trasformazione. I migliori risultati si sono rilevati utilizzando però tessuti meristemati espuntati delle gemme ascellari (Liu et al. 1998).

I geni utilizzati in questa tecnologia possono derivare da piante di melo o da altri organismi, essi influenzano caratteri fisiologici o morfologici come crescita, fioritura, e autofertilità, oltre i classici geni di resistenza alle principali patologie.

#### 4.6.3.1 Organismi transgenici

Una strada prevede l'uso di materiale genico proveniente da specie diverse dal melo, la cui espressione costitutiva mostra effetti tossici o inibitori sui principali patogeni fungini di questa coltura. Questa strategia prevede l'uso di geni codificanti per chitinasi e glucanasi, isolate dal fungo *Trichoderma* (noto agente di biocontrollo per patogeni fungini), geni codificanti enzimi litici da *Lepidoptera* e alcuni peptidi ad azione antimicrobica prodotti dai fagi.

Nel 1998 diversi studi hanno riportato che l'espressione in maniera costitutiva di enzimi chitinolitici, come endochitinasi e chitobioidasi, derivanti dall'agente di controllo biologico *Trichoderma harzianum*, mostra attività antimicotica e un'augmentata resistenza alla ticchiolatura (Wong et al. 1999). In questo lavoro, due delle tre linee transgeniche di "Royal Gala", trasformate con gene ech42 (endochitinasi) si sono dimostrate più resistenti di quelle delle stesse non trasformate, in seguito a inoculo con *V. inaequalis*. Un altro esempio è l'uso dei geni pinA e pinB, essi codificano per molecole chiamate puroindoline, peptidi a specifica azione antifungina, presenti nel frumento, già utilizzati nella trasformazione delle piante di riso. In un esperimento, condotto per valutare l'efficacia di pinB entro piante di melo

trasformate, si è osservato che la razza 6 di *V. inaequalis* è inibita nel suo sviluppo dalla presenza del prodotto di questo gene (Faize et al. 2004).

Geni provenienti da specie diverse sono stati utilizzati in melo, non solo per aumentare la resistenza a patogeni. Il gene di betulla BpMADS4 è stato inserito nel genoma di melo per diminuire drasticamente il suo lungo periodo giovanile (Flachowsky et al., 2011). Questo non ha un effetto diretto a livello produttivo, ma permette di rendere più rapidi i processi di breeding tradizionale descritti all'inizio del capitolo, e di ottenere, alla fine dei processi di selezione, piante prive di transgeni e con le caratteristiche desiderate (Guerra W., comunicazione personale).

Nonostante i notevoli progressi compiuti nei metodi di trasformazione del melo, l'uso di antibiotici ed erbicidi come marcatori per la selezione è ancora un fattore limitante, nei confronti dell'accettabilità da parte dei consumatori (Penna et al. 2002). I marker di selezione sono geni, inseriti nel plasmide batterico e trasferiti insieme ai geni specifici per il miglioramento. Essi codificano solitamente resistenze a erbicidi o antibiotici. Queste resistenze servono per selezionare, una volta attuata la trasformazione, quali cellule si siano effettivamente trasformate, e in quali il processo non è avvenuto. La selezione avviene in seguito al trattamento con lo specifico erbicida/antibiotico per il quale è stata conferita la resistenza coniugata al gene interessante per il miglioramento. In alternativa all'utilizzo di geni di resistenza a erbicidi, è stato proposto l'uso del gene fosfomannosio isomerasi (PMI) che permette, alle cellule trasformate, l'uso di mannosio come fonte di carbonio, fornendo un altro parametro valido per la selezione. Questa nuova tecnologia permette di ottenere piante transgeniche di melo, prive di marcatori di selezione dannosi, migliorandone l'accettabilità da parte del consumatore (Flachowsky et al. 2004).

#### 4.6.3.2 Organismi cisgenici

Un'altra strategia per migliorare l'accettabilità da parte del consumatore è la cosiddetta "cisgenetica". Questa innovazione della tecnologia di trasformazione consiste nell'uso di geni provenienti dalla stessa specie o da specie molto affini alla

pianta trasformata, insieme all'utilizzo dei loro promotori originali e alla selezione di mutanti senza l'uso di marker transgenici (Schouten et al. 2006).

Alcuni risultati sono stati ottenuti anche in questo senso, l'analisi della trascrizione in piante di melo resistenti o suscettibili a *V. inaequalis* ha dimostrato che i livelli di trascrizione di PR-proteins della cultivar resistente "Remo" è molto superiore in paragone a cultivar suscettibili. Questo ha aperto la strada all'ipotesi di modulare l'espressione dei geni regolanti la sintesi di PR-proteins per aumentare la resistenza a tutti i patogeni (Degenhardt et al. 2005). Interessante è anche l'uso di geni come MpNPRI-1 che regola l'induzione dei segnali di SAR (Systemic Acquired Resistance), una maggior espressione di questo tipo di geni induce un aumento della resistenza a tutte le patologie, di origine batterica o fungina, nelle piante trasformate (Malnoy et al. 2007).

In data odierna, la maggior parte delle leggi che regolano il controllo e la diffusione di piante geneticamente modificate, non differenzia piante "transgeniche" da piante "cisgeniche", questo probabilmente perché, fino ad oggi, il numero di piante cisgeniche prodotte e sottoposte ad approvazione da parte delle autorità competenti è estremamente limitato.

Il Canada è uno dei pochi paesi che possiede una regolamentazione basata sul prodotto finale e non sul processo di produzione, in questa maniera la diffusione e l'utilizzo di piante cisgeniche è regolamentato in maniera meno severa rispetto alle transgeniche (Schouten et al. 2006).

Le piante cisgeniche sono fondamentalmente diverse da quelle transgeniche. Nel caso delle transgeniche, un gene estraneo appartenente ad altra specie o genere è inserito nel genoma della pianta trasformata, è quindi un fatto che una pianta transgenica possieda tratti fenotipici che non appartengono alla specie. Il rischio è che questi ultimi possano influenzare la sua fitness e il suo rapporto con l'ecosistema attraverso la loro stessa espressione, o per il passaggio del trans-gene a specie selvatiche attraverso incrocio con esse. Al contrario, nelle piante cisgeniche, il gene viene introdotto con suo promotore originale già presente nella specie, selvatica o addomesticata, da molti secoli. In questa maniera la cisgenetica non inserisce alcun

carattere aggiuntivo alla specie e non induce alcuna modifica nella fitness della pianta, che non possa già avvenire spontaneamente in natura. La stessa cosa vale per i rischi ambientali, come gli effetti in organismi non obiettivo, derivanti dall'ibridazione interspecifica, e sull'ecosistema del suolo, oltre che nel il suo utilizzo come cibo o mangime. Per tutta questa serie di fattori l'inserimento di piante cisgeniche nell'ambiente naturale, non mostra rischi maggiori dell'inserimento di piante ottenute con breeding tradizionale (Jacobsen and Schouten 2008).

#### 4.7 RESISTENZA DUREVOLE ALLE MALATTIE

Ci sono voluti circa 85 anni, con i metodi di breeding classico, per sviluppare una cultivar come "Santana", che possiede il gene di resistenza Vf alla ticchiolatura. Dopo 4 o 5 anni dalla sua introduzione sul mercato, e successiva coltivazione in campo, sono stati riportati eventi di superamento della resistenza Vf (Parisi et al. 1993). Per evitare un così rapido superamento della resistenza, dovrebbero essere sviluppate nuove strategie per produrre resistenze più durature, impiegando più geni contemporaneamente. Una resistenza durevole alla ticchiolatura può essere ottenuta combinando molti geni indipendenti, rendendo la sua natura poligenica.

Inserire molti geni insieme in una singola cultivar, utilizzando i metodi dell'incrocio sessuale e la selezione sul campo, richiede un tempo molto lungo, a causa del periodo giovanile del melo. L'unica possibilità per ottenere questo risultato in tempo relativamente breve sono i metodi molecolari della cisgenetica. L'identificazione e la disponibilità di marcatori molecolari collegati con i singoli geni di resistenza Va, Vh2, Vh4, Vbj, Vr2, Vd and Vg può aiutare nell'isolamento degli stessi. Una volta isolati, possono essere combinati insieme a Vf per ottenere una resistenza più duratura.

Combinare più geni può essere fatto in due modi. Il primo è attraverso il breeding classico, che richiede tempistiche molto lunghe e rende impossibile mantenere le caratteristiche originali della cultivar di partenza. La seconda possibilità è la modificazione genetica che richiede meno tempo in paragone al primo metodo e permette il mantenimento delle proprietà della cultivar. Combinare più geni attraverso la modificazione genetica può essere fatto a sua volta in due modi. Il primo

consiste nell'inserire tutti i geni di resistenza disponibili dentro la cultivar considerata, in una volta sola, attraverso una sola molecola di T-DNA. Questo metodo sembra far risparmiare molto tempo, ma identificare il mutante contenente tutti i geni di resistenza desiderati, intatti ed espressi al giusto livello, è un lavoro molto difficile e lungo, vista anche la necessità di prove di lungo periodo in campo. L'altro metodo prevede l'inserimento di un gene di resistenza dopo l'altro quando ognuno appare inserito ed espresso dentro il genoma. In questa maniera, i mutanti portanti ed esprimenti il primo gene di resistenza, possono essere selezionati secondo i parametri desiderati, e coltivati fino al momento dell'inserimento del secondo gene. Quando viene effettuata la seconda trasformazione, è quindi possibile selezionare e coltivare il mutante che esprime il secondo gene inserito al livello desiderato, si prosegue alla stessa maniera per i successivi mutanti. Ogni volta che è inserito un nuovo gene è necessario controllare il livello di espressione di tutti i geni inseriti. Attraverso questo metodo, comunque, non è necessario controllare un numero di mutanti elevato come con il primo.

La resistenza alla ticchiolatura può essere ottenuta trasformando le cellule con il gene HcrVf2 munito del suo promotore originale della lunghezza di 288 pb, o utilizzando i promotori della rubisco, espressi in tutti i tessuti fotosintetizzanti, senza l'ausilio di marcatori. Una resistenza più duratura può essere ottenuta combinando i cisgeni di resistenza che sono stati identificati e isolati. Entrambi gli approcci sopra descritti possono essere utilizzati per il miglioramento del melo. (Joshi 2010)

#### 4.8 LE RESISTENZE QUANTITATIVE

Molte cultivar di melo hanno dimostrato possedere forme di resistenza poligenica alla ticchiolatura, nonostante questo ci sono pochi esempi di analisi di QTL riportati nella letteratura esistente. Dopo la scoperta che le razze 6 e 7 erano in grado di superare la resistenza Vf, sono stati rinnovati gli sforzi per identificare le sorgenti di resistenza poligenica, per rafforzare i geni di resistenza maggiori. Tutti i risultati fino ad ora

ottenuti derivano dal progetto D.A.R.E. avviato dall'unione europea (Leptinasse et al. 1999). Cinque popolazioni sono state analizzate per la resistenza parziale alla ticchiolatura, con inoculo naturale e razze singole di *V. inaequalis* per identificare i QTL che forniscono resistenza ad ampio spettro. Le fonti di resistenza poligenica utilizzate in questo esperimento sono "Discovery", un semenzale di Schmidt's Antonovka chiamato "TN 10-8" e la cultivar "Durello di Forlì".

Un incrocio tra le cultivar "TN 10-8" e "Discovery" è stato testato per la resistenza alla ticchiolatura con 8 differenti inoculi. Sei test sono stati effettuati con popolazioni geneticamente omogenee di Venturia, mentre gli altri due con isolati eterogenei (Calenge et. Al. 2004). Sono stati isolati in totale 24 QTL distribuiti in sei regioni genomiche della discendenza di questo incrocio, tutti associati con la resistenza alla ticchiolatura. Undici QTL sono stati identificati usando la mappa genica di "Discovery", mentre altri otto usando quella di "TN 10-8", i restanti cinque QTL usando la mappa della progenie. La variazione fenotipica totale espressa da tutti i QTL per la resistenza a una isolato monogenico di *V. Inaequalis*, varia tra 13 e 84%. La maggior parte dei QTL (19/24) è stata identificata in tre regioni genomiche sui LG1 LG2 e LG17. Gli altri cinque QTL sono stati individuati su LG5, LG12, LG13 e LG15. Una forma di resistenza monogenica più simile alla monogenica è stata individuata su "Discovery", questa mostra sintomi necrotici in seguito a infezione ed è stata posizionata sul LG12. Questo gene è stato chiamato Vg per via dell'analogia con gene di resistenza alla razza 7 portato da "Golden Delicious", ed è inoltre stato ipotizzato che esista un antenato comune tra quest'ultima cultivar e "Discovery".

L'analisi dei QTL per la resistenza a ticchiolatura, su una progenie ottenuta da "Durello di Forlì"x"Fiesta" ha reso possibile identificare tre QTL sui LG10, 11 e 17. Nonostante la resistenza di "Durello di Forlì" è considerata poligenica, è stato identificato un solo QTL molto forte posizionato sul LG10, mentre gli altri derivano dall'altro progenitore "Fiesta". L'inoculo della stessa progenie con un estratto monoconidiale della razza 6 di *V. inaequalis* ha reso inoltre possibile l'identificazione di un altro fattore di resistenza monogenica prima sconosciuto, che induce necrosi stellata, posizionato sul LG10 e chiamato Vd (Tartarini et al. 2004).

## 5. CULTIVAR DI MELO RESISTENTI ALLA TICCHIOLATURA

La rincorsa per accaparrarsi la novità ha contagiato da tempo il mercato frutticolo, e il successo che ottengono i nuovi cloni che apportano perfezionamenti alla colorazione, come nel caso delle Gala, delle Braeburn e delle Fuji, o l'introduzione di novità varietali che differenziano il prodotto per sapore, aspetto o modalità di commercializzazione come nel caso di Pink Lady sono esempi della vivacità del mondo melicolo, quando compare un filone innovativo o nuove opportunità di successo sul mercato. In questo contesto sorprende constatare come una delle più grandi innovazioni ottenute negli ultimi cinquant'anni in campo frutticolo, le cultivar di melo resistenti alla ticchiolatura, non siano ancora riuscite a ritagliarsi il benché minimo spazio nel mercato convenzionale, compreso quello delle produzioni integrate, e siano oltretutto sottoutilizzate nelle stesse produzioni biologiche, che si avvalgono prevalentemente di cultivar di melo tradizionali, come Golden Delicious e Red Delicious. Questo fatto appare ancora più incomprensibile se si considera quanto il consumatore europeo sia attento e sensibile alle tematiche ecologiche e ambientali e quanto sia forte la domanda di prodotti salubri e ambiente pulito, spesso disattesa.

Il "Plus qualitativo" che le cultivar resistenti presentano, al momento si traduce solo in un abbattimento delle spese per la difesa fitosanitaria sia con metodo tradizionale, integrato o biologico, dato che non necessitano di alcun intervento fitoiatrico per il controllo delle malattie per le quali sono resistenti. Il problema è che ciò non è reso visibile al consumatore che non le conosce, non è in grado di premiarle e continua a dare la sua preferenza a mele tradizionali. Non bisogna sottovalutare inoltre i benefici collaterali, consistenti nella riduzione dell'impatto ambientale per la minor immissione di prodotti di sintesi o "naturali", nella riqualificazione e valorizzazione territoriale delle zone turistiche e agrituristiche e nella tutela della salute degli operatori agricoli.

Per molto tempo a livello commerciale non è risultato conveniente promuovere le mele resistenti alla ticchiolatura, perché creavano diffidenza nei confronti del prodotto tradizionale che tutt'oggi rappresenta la quasi totalità delle vendite. Nell'ultimo ventennio la situazione si è evoluta positivamente per la crescente

domanda di prodotto biologico che ha dato un lieve impulso all'impiego delle varietà resistenti, rilanciando la cultivar "Florina", anche in ragione della sua attitudine alla trasformazione industriale. Più recentemente, oltre al consolidarsi della domanda di prodotti biologici, è cresciuta quella della sicurezza igienico sanitaria anche delle produzioni convenzionali, e si stanno affacciando sul mercato nuove linee di produzione certificate a residuo quasi pari a zero. Una ricerca svizzera motiva la ritrosia del mercato nei confronti di questi prodotti, semplicemente perché portano nomi sconosciuti, non appartenenti all'assortimento varietale tradizionale. Per superare questo ostacolo è stata attuata una strategia di marketing che con il semplice uso di etichette colorate abbinante a una caratterizzazione del sapore, ha suddiviso le mele in gruppi riconducibili ad "archetipi" noti, superando così la problematica del nome. In continua crescita è l'impiego di materia prime a residuo controllato e biologiche per la trasformazione industriale, soprattutto per la realizzazione di prodotti per la prima infanzia dove appare irrinunciabile la domanda di sicurezza alimentare. In tutte queste forme di produzioni, sia fresco o trasformato, l'impiego di varietà resistenti rientra in una logica che mira a semplificare le tecniche di difesa, sia di sintesi che naturali, e questo ne avvalorava l'incentivazione pubblica che da alcuni anni è mirata in questo senso. (Bassi, Pellegrino 2001)

## 5.1 SCELTA DELLA VARIETA'

La scelta per il coltivatore che decidesse di avviare un nuovo frutteto improntando la gestione sullo sfruttamento dei vantaggi offerti dalle varietà resistenti, riguarda essenzialmente la cultivar che meglio si presta all'ambiente pedo-climatico e alla destinazione produttiva scelta.

Dagli anni '70 ad oggi sono state rilasciate numerosissime varietà portanti resistenze a uno o più patogeni, e queste possono essere classificate in maniere diverse, secondo la stagionalità, o ordine di maturazione del frutto, o venendo suddivise in generazioni a seconda dell'epoca di sviluppo e delle caratteristiche intrinseche.

La suddivisione in generazioni avviene in questa maniera:

1. Generazione: Florina, Delorina, Maripa, Topaz, Goldrush ecc

Esse mostrano una qualità merceologica minore rispetto alle cultivar tradizionali (scarsa colorazione della polpa, sapore non distintivo, no servebolezza) e sono quasi scomparse ad eccezione dei marchi Topaz e Goldrush che rimangono legati alla tradizione biologica e particolarità organolettiche permettono “sopravvivenza commerciale”.

2. Generazione Isaac, Modì, Juliet, Crimson Crisp ecc.

Si tratta di cultivar presentate sul mercato in un periodo posteriore a quelle di prima generazione. Esse mostrano, oltre alla resistenza alla ticchiolatura, caratteristiche qualitative e merceologiche paragonabili con le cultivar commerciali. Sono frutto di un ulteriore reincrocio di varietà resistenti con cultivar commerciali, e successiva selezione per i caratteri qualitativi.

3. Generazione. Si parla di cultivar ancora in fase di sperimentazione e non presenti sul mercato, esse porteranno resistenze piramidalizzate a più patologie, oltre che miglioramenti qualitativi. Tra esse è possibile citare Ariwa pur con alcune riserve. (Guerra W. Comunicazione personale)

## 5.2 DESCRIZIONE DI CULTIVAR COMMERCIALI RESISTENTI.

### 5.2.1 Florina (Querina)

(Figura 5.2.1.1)

Luogo e anni: Francia - 1977

Costitutore: INRA Malus Floribunda 821 x Rome Beauty e reincrociato con Golden Delicious, Starking Simpson's e Jonathan.



**Figura 5.2.1.1 Florina**

Giudizio riassuntivo: Ha rappresentato a suo tempo una svolta nell'ambito delle resistenti a ticchiolatura. Appare superata, sia per il consumo fresco (frutto poco attraente, grosso, oblato-appiattito e di qualità non eccesa), sia dal punto di vista dell'utilizzo industriale (la produzione attuale è in gran parte destinata alla

trasformazione in purea). Oltre alla colorazione violaceo-pruinosa, con larga presenza del fondo verde, le caratteristiche della polpa, ed il sapore in particolare, e relegano purtroppo in una posizione di "commodity", cioè di prodotto industriale. Sul piano agronomico occorre gestire attentamente il carico produttivo, per contrastare la predisposizione all'alternanza di produzione. L'albero inoltre è difficile da gestire, anche per le potature. E' ancora la mela tardiva più diffusa, presente sia nella melicoltura di pianura che, con migliori risultati, in quella di montagna. Si raccoglie da 5 a 10 giorni dopo Golden Delicious e si può consumare da Novembre a Marzo. (plantgest 2010)

### 5.2.2 Modi

(Figura 5.2.2.1)

Luogo e anno: Italia - 1992

Costitutore: CIV (Consorzio italiano vivaisti) - incrocio di Gala e Libery

Giudizio riassuntivo: Varietà che matura qualche giorno prima di Golden Delicious, con albero di media vigoria, portamento assurgente e di precoce entrata in produzione. La produttività è elevata e costante. Fioritura regolare ed

abbondante, non presenta alternanza, richiede un attento



**Figura 5.2.2.1 Modi**

diradamento per evitare eccessi di produzione. Presenta resistenza alla ticchiolatura, fogliame rustico poco attaccato da insetti e poco sensibile ad oidio. Il frutto è tronco-conico allungato, di ottimo calibro e di colore rosso porpora molto brillante su quasi la totalità della superficie. La polpa è molto consistente, croccante e succosa di colore giallo con elevato tenore di zuccheri e di acidi. Caratteristiche organolettiche elevate. (plantgest 2010)

### 5.2.3 Juliet

(Figura 5.2.3.1)

Luogo e anno: Stati Uniti

Costitutore: Rutgers New Jersey Agricultural Experiment Station  
- The State University of New Jersey

Giudizio riassuntivo: Cultivar con epoca di maturazione simile a Fuji (seconda decade di ottobre) e pianta di medio vigore, portamento compatto, buona produttività e rapida messa a frutto. Il frutto è di forma rotonda (e leggermente oblata), buona pezzatura, colore di fondo giallo e sovraccolore rosso striato e molto luminoso esteso sul 70-80% della superficie. La polpa è di colore bianco, succosa, soda, croccante e con buon sapore dolce e aromatico. La buccia è resistente alle manipolazioni. La conservabilità è ottima. (plantgest 2010)



**Figura 5.2.3.1 Juliet**

### 5.2.4 Ariwa

(Figura 5.2.4.1)

Luogo e anno: Svizzera - 1998

Costitutore: Faw Eidgenossische Forschungsanstalt - Golden Delicious x Sel. A849-5

Giudizio riassuntivo: Mela multiresistente. E' la prima mela creata dal FAW di Wadenswil coniugando varie resistenze Vf (ticchiolatura) e PL2 (oidio), al colpo di fuoco batterico, oltre che al cancro rameale. Albero vigoroso, la fruttificazione è di tipo IV (Morgenduft), produttivo ma predisposto all'alternanza. Si segnala la sensibilità a colpi di sole. Frutto di media pezzatura, un pò polimorfo da oblato a subcilindrico, coperto di rosso arancio striato per buona parte della buccia e peduncolo molto lungo. La polpa è fine, succosa, di buon sapore (alto contenuto di zuccheri e acidi) equilibrata ed aromatica. Non è una mela attraente, ma è una mela di buona qualità fra quelle dotate di resistenze multiple. La sua rapida perdita in qualità dopo la raccolta non permette una conservazione superiore ai 3-4 mesi. (plantgest 2010)



**Figura 5.2.4.1 Ariwa**

Vignola pianta	Bailede <sup>a</sup>	Bina <sup>a</sup>	Harmonie <sup>a</sup> Delonha <sup>a</sup>	Enterprise <sup>a</sup>	Enova <sup>a</sup>	Querna <sup>a</sup> Florha <sup>a</sup>	Freedom	Sir Prize	Golden Orange <sup>a</sup>	Golden Lasa <sup>a</sup>	Golden Mira <sup>a</sup>	Gold Rush <sup>a</sup>	Primiera <sup>a</sup>	Summer- free <sup>a</sup>	Topaz <sup>a</sup>
Epoca di fioritura	tardiva	medio-tardiva	tardiva	media	medio-tardiva	media	media	media	tardiva	medio-tardiva	elevata	medio- scarsa	medio- elevata	medio- scarsa	media
Produttività	medio-elevata	medio- elevata	medio- elevata	medio-elevata	medio- elevata	medio-elevata	medio- elevata	media	medio- elevata	medio- elevata	medio- elevata	medio- elevata	medio- elevata	medio- elevata	medio- elevata
Data raccolta (°)	33	7	12	0	-2	4	-17	-20	8	0	3	30	7	-30	7
Starchi (n)	1	10,2	1	2	10,2	10,2	2	2,03	1	1	1	1	1	1	2,03
RSR (%n)	12,4	15,6	13	13,7	15,2	15,3	13	14,2	13	13,9	13,6	14,5	12,9	14,8	13,2
Acidità (meq/100 cc)	11,2	6,7	7,2	8,9	4,9	6,5	8,5	7,5	8,4	7,3	4,9	12,4	7,2	7,2	11,6
Durezza (kg/cm <sup>2</sup> )	9,8	7,5	7,6	7,3	9	7,5	7,5	6,1	8,1	9	8	9	8,7	7,6	9
Peso medio (g)	232	196	205	271	215	225	237	270	216	242	234	224	248	190	210
Forma frutto	sferoidale/piatta, distorme	tronco-conica breve	cilindrica uniforme	tronco-conica breve, distorme	tronco-conica oblunga	tronco-conica breve, distorme	piatta	ellissoidale	cilindrico-ellissoidale	tronco-conica breve distorme	tronco-conica oblunga	tronco-conica oblunga	tronco-conica oblunga	tronco-conica oblunga	piatta, distorme
Colore	verde	verde chiaro	giallo-verde	verde	giallo	verde chiaro	verde	verde chiaro	giallo-verde	giallo-verde	giallo	giallo-verde	giallo-verde	verde	verde
Sovracolore	assente	rosso brillante	rosso brillante	rosso cupo	rosso- aranciato	rosso, presenza di prugna	rosso- aranciato	assente	aranciato	aranciato	rosa	assente	arandone	rosso	rosso
Estensione (%)	-	80	75	70	70	70	45	5	5	5	14	-	3	70	65
Tipo sovracolore	scarsa peduncolo e calice	uniforme	scarsa	scarsa	uniforme	scarsa	scarsa	sfaccettato	sfaccettato	sfaccettato	sfaccettato	scarsa	sfaccettato	scarsa	sfaccettato
Rugiosità	al peduncolo	al peduncolo	al peduncolo	al peduncolo	al peduncolo	al peduncolo	al peduncolo	al peduncolo	al peduncolo	al peduncolo	al peduncolo	al peduncolo	al peduncolo	al peduncolo	al peduncolo
Caratteristiche della polpa alla raccolta	tessitura fine, soda, di media succosità	fine, abbastanza consistente, fondente, succosa	tessitura fine, soda, fine, soda	tessitura fine, soda	tessitura fine, soda	tessitura fine, soda, croccante e succosa	fondente, farinosa	fondente, farinosa	tessitura fine, soda, croccante, succosa	tessitura media, soda, croccante e succosa	tessitura media, soda, abbastanza succosa, soda e croccante	tessitura fine, soda, soda, consistente, croccante			
Sapore	discreto, abbastanza dolce	buono, dolce-aromatico	buono, dolce-aromatico	discreto, aromatico	buono, poco acido, molto aromatico	buono, equilibrato, succoso	discreto, poco spiccato	discreto, poco spiccato	buono, dolce-acidulo, poco aromatico	discreta, dolce-acidulo, poco aromatico	discreto, ottimo, intenso, dolce e acidulo	ottimo, dolce e aromatico	buono, dolce e aromatico	buono, dolce e aromatico	buono, prevalenza acido, aromatico
Periodo di consumo	autumnale (invernale)	autumnale (invernale)	autumnale (invernale)	autumnale	autumnale	autumnale	autumnale	autumnale	autumnale	autumnale	autumnale	autumnale	autumnale	autumnale	autumnale
Note	simile a Granny Smith di aspetto ma non di sapore	buona tenuta di pezzatura	diffeta e buttratura	particolare aroma antico	alternanza e presenza di prugna	aspetto serbovolezza scarsa	ideonea a trasformazione Industriale	ideonea a trasformazione Industriale	ideonea a trasformazione Industriale	aspetto migliore di sapore e frutti	lenticellosi, spaccature a mezzogiorno scottature da sole	ideonea a trasformazioni scottature da sole	cascola colorazione scarsa	ideonea a trasformazioni scottature da sole	ideonea a trasformazioni scottature da sole

Figura 5.2 Principali varietà resistenti presenti sul mercato italiano e caratteristiche. Bassi, Pellegrino 2001

### 5.3 PROVE VARIETALI DI DIVERSE CULTIVAR RESISTENTI ALLA TICCHIOLATURA

Di seguito sono riportati i risultati di prove varietali svolte da enti diversi, in periodi diversi, per testare l'efficacia e la qualità di cultivar portanti i geni di resistenza alla ticchiolatura. Sono esaminate cultivar ottenute tramite miglioramento genetico, sfruttando la resistenza Vf di *Malus floribunda* 821 e cultivar che sono coevolute con il patogeno e hanno sviluppato forme di resistenza non meglio identificate. Si valuteranno, oltre all'effettiva efficacia della resistenza, i parametri merceologici dei frutti e la capacità produttiva delle diverse cultivar, supponendo uguali condizioni di allevamento.

#### 5.3.1 CULTIVAR RESISTENTI: PROVE SUI CARATTERI QUALITATIVI

Tutte le prove riportate sono state condotte da Michal Szklarz, ricercatore del Dipartimento di Pomologia dell'Università di Agraria di Poznan, Polonia (Tabelle: 5.3.1.1 - 5.3.1.2 - 5.3.1.3).

Tutte le cultivar testate sono state innestate su portainnesto nanizzante M9. Gli alberi erano disposti con la distanza di 1 metro sulla fila e di 4,5m tra le file(1667 piante/ha), e nessuna forma di trattamento chimico anti-ticchiolatura è stata usata per tutta la durata dell'esperimento. Le tecniche agronomiche applicate nella prova corrispondono alle classiche tecniche applicate nei frutteti commerciali.

La prima è durata 10 anni, dal 1995 al 2005 con le cultivar “Novamac”, “Sawa”, “Odra”, “Freedom”, “Florina”, “Free Redstar”, “Melfree”(Szlarck, 2006).

	suscettibilità	Vigore della pianta	Raccolto	Peso dei frutti	Dimensione dei frutti	Colorazione
Novamac	<b>R</b>	-	-	<b>0</b>	-	<b>0</b>
Sawa	<b>R</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>0</b>
Odra	<b>R</b>	<b>+</b>	<b>0</b>	-	<b>0</b>	<b>+</b>
Freedom	<b>R</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Florina	<b>R</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
U 1165	<b>R</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	-
Free Redstar	<b>R</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Melfree	<b>R</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**Tabella 5.3.1.1 prova di caratteri qualitativi di cultivar di melo resistenti alla ticchiolatura**

La seconda prova è durata 8 anni, dal 1996 al 2003 con le cultivar “Redkroft”, “Egeria”, “Medea”, “Ligol”, “Lodel”, “Pilot” e “Pinova”(Szklarz, 2003).

	Suscettibilità	Vigore della pianta	Raccolto	Peso dei frutti	Dimensione dei frutti	Colorazione
Redkroft	<b>R</b>	<b>+</b>	-	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Egeria	<b>R</b>	-	-	-	<b>0</b>	<b>0</b>
Medea	<b>R</b>	-	-	<b>0</b>	-	<b>0</b>
Ligol	<b>S</b>	<b>+</b>	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>0</b>
Lodel	<b>R</b>	<b>0</b>	<b>+</b>	-	<b>0</b>	<b>0</b>
Pilot	<b>S</b>	-	<b>+</b>	-	-	<b>+</b>
Pinova	<b>S</b>	<b>+</b>	-	-	-	-

**Tabella 5.3.1.2 prova di caratteri qualitativi di cultivar di melo resistenti alla ticchiolatura**

La terza prova è durata 10 anni, dal 1998 al 2008 con le cultivar “Goldstar”, “Topaz”, “Rajka”, “Rubinola”, “Rosana”, “Odra” e “Sampion” (Szklarz, 2008 ).

	Suscettibilità	Vigore della pianta	Raccolto	Peso dei frutti	Dimensione dei frutti	Colorazione
Goldstar	<b>R</b>	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
Topaz	<b>R</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Rajka	<b>R</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>0</b>
Rubinola	<b>R</b>	<b>+</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Rosana	<b>R</b>	<b>0</b>	<b>+</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Odra	<b>R</b>	<b>-</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>0</b>	<b>+</b>
Sampion	<b>S</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**Tabella 5.3.1.3 prova di caratteri qualitativi di cultivar di melo resistenti alla ticchiolatura**

Legenda:

S/N S = suscettibile R = resistente

Il segno “+” rappresenta il valore massimo tra quelli confrontati, mentre il segno “-“ il valore minimo. Il segno “0” rappresenta valori intermedi tra i due estremi, non significativi dal punto di vista degli estremi della distribuzione. Per i dati completi consultare la pubblicazioni riportate in bibliografia.

### 5.3.2 Cultivar tradizionali italiane

La prova descritta in seguito è stata messa in pratica per testare la resistenza in campo alla ticchiolatura di vecchie cultivar tradizionali di melo, raccolte in centro Italia, e trapiantate nei terreni dell’azienda agricola sperimentale della Facoltà di Agraria dell’Università della Tuscia. Lo scopo è selezionare cultivar adattate per un tipo di agricoltura a low input e per fornire nuove fonti di resistenza ai breeders.

I vecchi germoplasmi locali mostrano un buon potenziale come fonti di tolleranza e

adattamento a diversi stress biotici e abiotici. Studi sul comportamento varietale in risposta alle infezioni di ticchiolatura sono stati compiuti in campo, e i genotipi tolleranti/resistenti sono stati selezionati per questa prova.

La prova è stata compiuta tra il 1997 e il 1999. Sono state esaminate 54 cultivar. Due cultivar moderne sono state usate come controllo “Golden Delicious” e “Ozark Gold”, la cultivar “Florina”, è stata usata come controllo resistente. Tutte le piante osservate sono state innestate su portainnesto M26 e piantate tra il 1987 e il 1993. Dal 1996 fino alla fine dell’esperimento non è stato effettuato alcun trattamento fungicida contro la ticchiolatura. I sintomi sono stati esaminati una volta al mese, da giugno a settembre sulle foglie, e su tutti i frutti al momento del raccolto. L’intensità dei sintomi è stata divisa in 8 classi, sulla base della superficie foglia coperta da lesioni clorotiche, necrotiche o sporulanti: 0 = nessun sintomo, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 45% della superficie della foglia con lesioni. I sintomi sui frutti sono stati divisi in 5 classi, sulla percentuale di buccia coperta da lesioni 0 = nessuna lesione, 5%, 20%, 40%, 50%.

L’indice di malattia è stato calcolato con la formula di McKinney:

$$\text{indice malattia} = (\sum vn) / (NV) \times 100$$

dove v rappresenta il valore numerico della classe, n il numero di foglie e frutti assegnati alla classe, N il numero totale di foglie e frutti della replicazione e V il valore numerico della classe più alta.

Le varietà sono classificate in base all’indice di malattia in 3 classi:

1. resistente: indice > 0 e <=2
2. tollerante: indice >2 e <=6
3. suscettibile: indice >6

I risultati sono riportati in Tabella 5.3.3.1

**Tables**

**Table 1. Incidence of scab on leaves at the end of the growing season and on fruits at harvest of old Italian apple cultivars (1999).**

Cultivar	Geographical origin	Leaves -September	Fruits - Harvest
Agre		0.08	1.07
Agre (LT)		1.63	3.56
Appia	Lazio	0.12	11.00
Brusciano		0.36	3.89
Capo d'asino		0.28	1.98
Capo d'asino 1		16.30	15.89
Cedra		1.02	9.26
Cocoine		9.64	2.81
Dolce		0.73	12.04
Francesca		9.30	14.14
Francese		9.18	7.14
Gaetana		0.86	8.82
Maiolina		5.45	8.17
Mela Fragola (VT)		0	0
Mela Fragola (LT)		0	0
Mela nana		1.53	3.09
Muso di Bove		1.34	4.32
Paoluccia		2.20	3.94
Paradisa		0.31	7.24
Pontella		1.64	6.50
Prata		1.95	4.13
Rosa		0.18	0.34
Rosa 8		1.51	0.45
Rosa 12		1.66	1.08
Rosa Mantovana		1.01	3.53
Rosa Sezze		9.38	12.08
Rosetta (RI)		6.13	0.91
Rosetta		4.07	5.00
Rosone		8.36	2.77
Sanguinella		1.70	5.57
S. Agostino		0	0.77
Sconosciuta		0	4.95
Tonnorella		4.28	5.04
Zuccherina		13.48	19.36
Agostina	Molise	0.28	7.20
Appia (IS)		0.28	12.63
Dolce		0.77	7.41
Eppia bianca		0.53	8.35
Eppia		3.72	2.73
Iaccia		7.95	8.44
Mela rosa		1.15	4.77
Ranettone		9.40	6.95
Rotella		0.90	3.97
Tosta		0.99	4.19
Zitella		11.37	17.01
Ruzza	Umbria	1.09	1.45
Sona		2.84	14.21
Musella	Emilia Romagna	0	0
Rosa romana		0.13	0.79
Melo rosso	Calabria	0	5.45
Cocciolo		3.01	-
Florina	Control	0	0
Golden Delicious	Control	17.51	6.86
Ozark Gold	Control	17.40	11.06
L.S.D. (P=0.05)		0.75 **	1.29 **

**Tabella 5.3.3.1 Risultati dell'incidenza della ticchiolatura sulle cultivar su cultivar di melo italiane. Prova sperimentale eseguita nel 1999 presso Azienda Agricola Sperimentale dell'Università della Tuscia**

Il germoplasma locale di melo in Italia centrale rappresenta una buona fonte di tratti genetici di tolleranza alla ticchialatura. Molte cultivar hanno mostrato bassa incidenza di sintomi su foglie e frutti. Questo sembra dimostrare la presenza di una resistenza poligenica, che è una caratteristica sempre ricercata dai breeders, e un'alternativa alle forme di resistenza monogenica. Alcune cultivar non hanno mostrato sintomi, come la cultivar resistente "Florina", ma sono necessari ulteriori studi per approfondire la loro forma di resistenza.

Queste caratteristiche appaiono degne di sfruttamento nell'attività di miglioramento. Esse rappresentano un valore aggiunto per quelle cultivar che hanno mostrato buon sapore e qualità produttive nei test chimici e sensoriali. Le cultivar resistenti o tolleranti si adattano bene nei sistemi agricoli a bassi input di fattori di crescita (biologico o integrato) per ottenere prodotti sani adatti al gusto del consumatore che ricerca la qualità intrinseca del prodotto più della bellezza commerciale dello stesso. (Bignami et al. 2003)

## 6. MESCOLANZE DI CULTIVAR (Castro 2001)

Il raggiungimento del massimo della produttività da una coltura è il principale obiettivo dell'agricoltura moderna. Il miglioramento genetico è uno dei mezzi che ha reso possibile il raggiungimento di questo obiettivo, attraverso l'incrocio e la selezione di genotipi superiori per i caratteri desiderati. Queste piante "superiori" sono spesso coltivate, però, in forma di monocoltura, dove ogni pianta è geneticamente identica (clone) alla sua vicina. L'uniformità genetica delle piante, per caratteri come altezza, maturità e qualità rende inoltre più agevole il raccolto, la commercializzazione e in generale tutte le operazioni che devono essere effettuate in campo. Il melo è una tipica coltivazione a cui viene applicata la monocoltura.

Una conseguenza negativa dell'uniformità genetica, è un incremento considerevole della suscettibilità a patogeni, che possono provocare gravi perdite nel raccolto e il cui controllo è molto gravoso per il bilancio aziendale.

Se l'uniformità genetica rende un frutteto più vulnerabile alle malattie, una strategia di prevenzione è aumentare la diversità genetica della coltura considerata. Un metodo semplice per migliorare la diversità genetica è utilizzare semi di cultivar diverse della stessa pianta, con diverse resistenze al patogeno specifico.

Questo metodo assicura un miglioramento della diversità genetica, con il vantaggio che può essere usato insieme ai metodi classici di prevenzione della malattia.

Le cultivar usate nella miscela devono possedere buone caratteristiche agronomiche e devono essere fenotipicamente simili l'una all'altra per caratteri importanti come la maturazione, altezza, qualità e periodo di fioritura, in relazione alle principali operazioni colturali che devono essere fatte sulla coltura.

### 6.1 MECCANISMI DI SOPPRESSIONE DELLA MALATTIA

Le miscele di cultivar non eradicano definitivamente la malattia, ma ne riducono l'incidenza grazie all'eliminazione di un largo numero di spore ad ogni ciclo riproduttivo del patogeno. L'azione delle spore è limitata nel processo epidemico dal momento in cui si depositano e germinano su un individuo resistente senza dare

malattia, e per la situazione di diluizione in cui si ritrovano, a causa dell'aumentata distanza tra individui dello stesso genotipo. Il processo infettivo è inoltre rallentato dall'induzione di risposte difensive (SAR) in piante suscettibili a una particolare razza del patogeno. Il risultato della combinazione di tutti questi fattori è una riduzione dell'incidenza della malattia dovuta a meccanismi fisiologici e epidemiologici.

#### 6.1.1 Effetto barriera e diluizione dell'inoculo

Una diminuzione della densità di cultivar suscettibili rallenta lo sviluppo della malattia. Se le piante entro la popolazione considerata possiedono specifici geni di resistenza a una particolare razza del patogeno, la capacità dello stesso di diffondersi da una pianta suscettibile all'altra è diminuita a causa della distanza fisica tra esse. L'efficacia di questo meccanismo diminuisce con l'aumentare delle dimensioni dell'ospite.

#### 6.1.2 Resistenza indotta

La resistenza indotta avviene quando spore di una razza avirulenta atterrano e innescano una risposta biochimica di difesa su un ospite incompatibile. Questa induzione di risposta difensiva riduce parzialmente la suscettibilità della pianta ospite anche alle razze virulente del patogeno, e riduce la virulenza delle spore dello stesso che vengono prodotte in seguito a un'infezione. La resistenza indotta è un meccanismo non specifico tipico di numerosi pathosystem ed è tipico di numerose malattie, anche se la risposta varia da patogeno a patogeno. Alcuni meccanismi di resistenza indotta sono tipici solo del tessuto circostante alla zona di infezione, mentre altri coinvolgono l'intera pianta riducendone la suscettibilità.

Studi sperimentali indicano che la resistenza indotta può ridurre dal 20 al 40% la suscettibilità della pianta, e questo ha effetto su tutti i patogeni presenti nel sistema, e non solo su quello che ha indotto l'aumento di resistenza.

### 6.1.3 Modificazioni del microclima

La presenza nelle cultivar che compongono la miscela di piante con attributi ( altezza, densità fogliare ecc) che modificano il microclima verso condizioni che rendono meno favorevole lo sviluppo della malattia possono aiutare a ridurre l'epidemia.

## 6.2 EFFETTI DELLE MISCELE DI CULTIVAR NELL'EVOLUZIONE DELLE RAZZE DEL PATOGENO

L'effetto delle miscele di cultivar sull'evoluzione di nuove razze del patogeno può essere analizzata basandosi su due questioni chiave:

- la minor esposizione del patogeno a geni di resistenza dell'ospite, nelle miscele di cultivar rispetto alla monocoltura, riduce la pressione selettiva sulla popolazione del patogeno e aumenta la durevolezza della resistenza monogenica.
- Considerando una serie di geni di resistenza a uno stesso patogeno, o a più razze dello stesso patogeno, la resistenza introdotta attraverso essi sarà più duratura se vengono utilizzati singolarmente su ospiti diversi, rispetto a venir inseriti tutti sullo stesso ospite. L'inserimento di più geni di resistenza su uno stesso ospite può portare alla selezione di razze patogene in grado di superare più geni di resistenza.

L'efficacia e la durata dei geni di resistenza utilizzati per il controllo del patogeno, confrontata nelle due ipotesi appena elencate, dipende inoltre dal tasso di evoluzione delle razze, che dipende da molti fattori:

- diversità entro il patogeno: l'incremento di diversità genetica entro il patogeno, e la riproduzione sessuale dello stesso, riducono il tasso di sviluppo di razze complesse in grado di superare più resistenze.
- L'abilità di razze complesse di attaccare genotipi multipli è condizionata da una

riduzione della fitness dovuta alla mancanza dei geni di avirulenza che la renderebbero più competitiva, ma riconoscibile

- Adattamento differenziale: razze complesse possono attaccare più genotipi, ma mostrano una riduzione dell'efficienza infettiva se paragonate alla razza ospite-specifica di ogni componente della miscela, riducendo in questo modo il tasso di crescita dell'epidemia.
- dipendenza dalla densità: è la diminuzione del tasso di moltiplicazione di un patogeno associata con l'incremento della densità delle lesioni. Questo fenomeno interessa razze specifiche e complesse durante l'epidemia, riducendo lo sviluppo di razze complesse.

Il progresso evolutivo che porta allo sviluppo di razze complesse è piuttosto lento. Le razze specifiche, in grado di superare una resistenza monogenica si evolvono molto più rapidamente di quelle complesse, in grado di superare più resistenze, escludendo in questo modo un fenomeno di dominanza delle razze complesse.

### 6.3 CONSIDERAZIONI AGRONOMICHE

Considerando le miscele di cultivar, una questione basilare è se l'incremento di diversità genetica all'interno di uno stesso campo coltivato, è compatibile con i moderni metodi di produzione e obiettivi di marketing del sistema produttivo. La miscela di specie e genotipi è comune nell'agricoltura tradizionale, ma mostra delle limitazioni se trasposta nell'attuale sistema produttivo.

Le miscele di cultivar sono spesso state utilizzate per scopi che superano il semplice controllo delle malattie, quali ad esempio stabilità del raccolto, data dall'effetto di combinazione di diversi genotipi con l'ambiente di coltivazione variabile. Un altro effetto è la compensazione, il fatto che una varietà forte e produttiva compensa la mancanza di produttività di un'altra varietà più debole in determinate annate, oltre al sopracitato effetto di controllo delle malattie.

Per ottenere un quadro completo, però, è necessario elencare anche i potenziali svantaggi delle miscele di cultivar. Il primo è l'incompatibilità dei componenti

varietali, in particolare riguardo a caratteristiche della pianta come altezza, periodo di fioritura e maturazione. Questi problemi restringono le opzioni di scelta di varietà nella miscela, a cultivar con uguale altezza, periodo di maturazione e fioritura della pianta. Un altro inevitabile problema agronomico è la differenzialità delle diverse cultivar mescolate, di necessità di interventi agronomici, che implica una maggior laboriosità e ripetizione delle stesse operazioni colturali, come fertilizzazione, trattamenti fitosanitari e raccolta. Le restrizioni imposte dal marketing e la qualità dei processi risultano comunque essere le principali limitazioni all'uso di miscele di cultivar.

Per un particolare sistema ospite-patogeno è molto importante essere in grado di valutare in anticipo se le miscele possono essere utili per la riduzione dell'incidenza di malattie e per stabilizzare il raccolto. Sperimentazioni con semplici miscele di genotipi resistenti e suscettibili a un particolare patogeno possono essere molto utili per testare se i tre meccanismi elencati (diluizione, barriere e resistenza indotta) sono attivi per quel particolare sistema. I benefici ottenuti dalle miscele di cultivar devono essere molto ben soppesati, in particolare in relazione agli svantaggi di tipo agronomico che comportano, e alle richieste del sistema produttivo. (Castro 2001)

#### 6.4 EFFICACIA DI MISCELE DI CULTIVAR NEL RIDURRE L'INCIDENZA DELLA TICCHIOLATURA

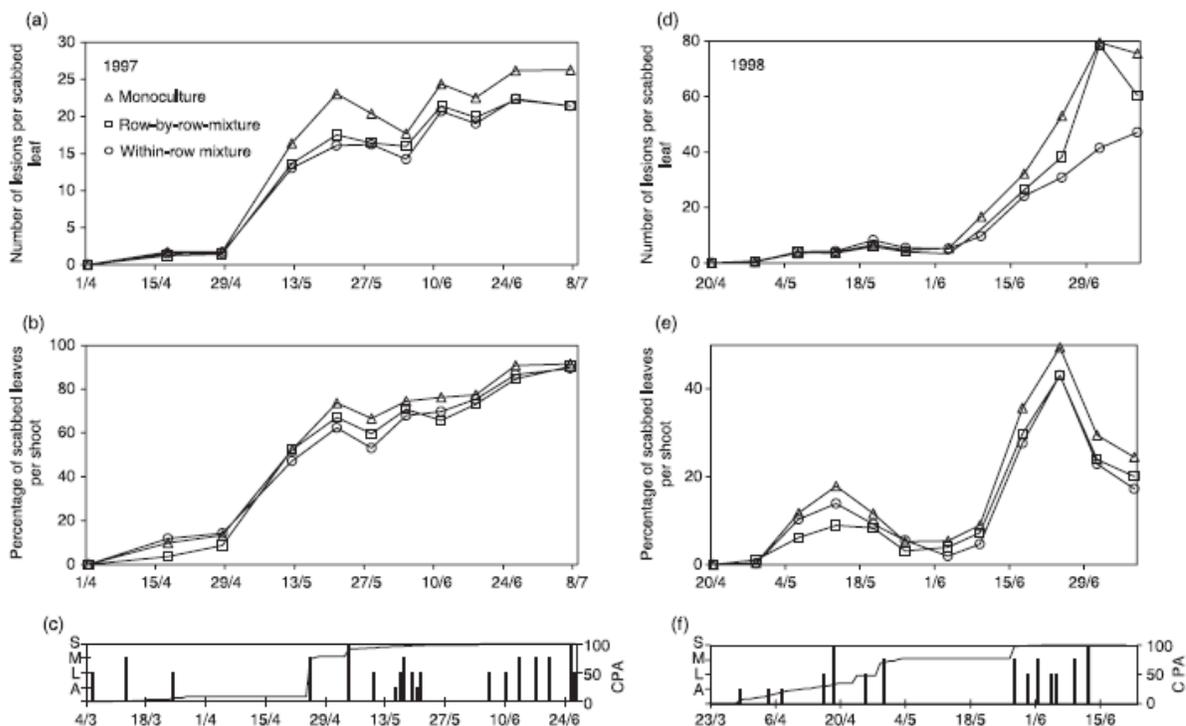
Di seguito sono riportati in sunto i risultati di una prova in campo per valutare l'incidenza e la gravità della ticchiolatura in frutteti dove sono state piantate cultivar di melo resistenti e non, con diversa gestione agronomica negli anni.

Le cultivar utilizzate sono Smoothee, un clone mutante di Golden Delicious considerato suscettibile all'inoculo locale di *V. inaequalis*, e Baujade, una selezione resistente portante il gene Vf. Ogni cultivar è stata piantata in numero di 900 alberi per frutteto, in monocoltura, suddividendo le cultivar sulla fila, e dividendo le cultivar tra le file. La distanza tra gli alberi è di 1 metro e la distanza tra le file di 4 metri. La gestione del frutteto è di tipo commerciale, eccetto che per i trattamenti fungicidi,

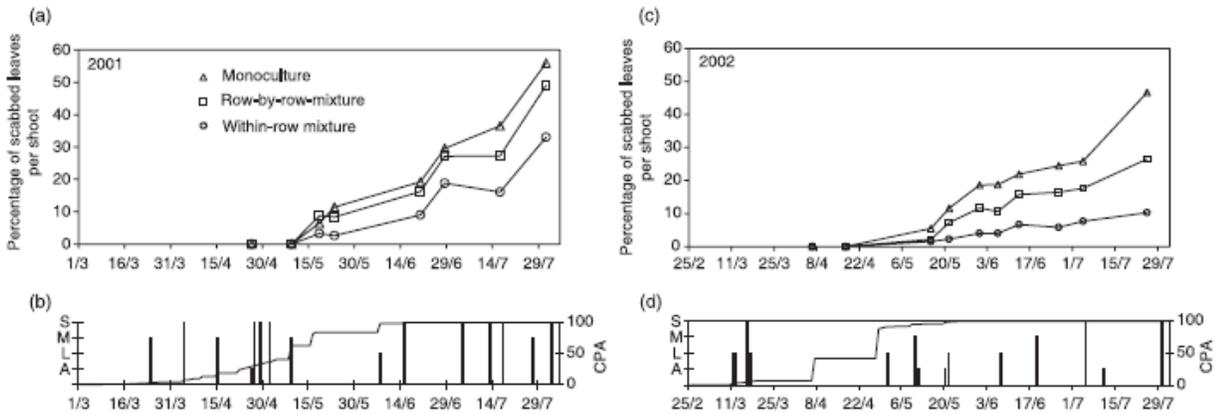
studiati per colpire tutte le patologie del melo eccetto *Venturia inaequalis*.

Le analisi di incidenza e gravità sono fatte in due periodi diversi, nel primo periodo senza alcun controllo della ticchiolatura con fungicidi, mentre nel secondo periodo sono stati fatti trattamenti anticchiolatura nei periodi più critici di infezione del patogeno.

Lo scopo di questa prova in campo è valutare quale organizzazione del frutteto fornisce i migliori risultati in termini di riduzione dell'incidenza e della gravità dell'infezione. I grafici sotto riportati riassumono i dati ottenuti.



**Evoluzione della gravità (a,d) e dell'incidenza (b,e) sulla cultivar di melo Smoothie in monocoltura e in miscela di cultivar, e (c,f) periodi di infezione (barre nere) e percentuale di emissione delle ascospore (CPA). Nel (a,c) 1997 e (d,f) 1998 A, M, L, S sono i differenti livelli dei periodi di infezione. A: angers M: moderate L:light S: severe**



**Progressione (a,c) dell'incidenza della ticchiolatura su cultivar Smoothee in monocoltura e in miscela di cultivar che han ricevuto trattamenti fungicidi e (b,d) periodi d'infezione (barre nere) e percentuale di emissione delle ascospore (CPA). Nel (a,b) 2001 e nel(c,d) 2002 A, M, L, S sono i differenti livelli dei periodi di infezione. A: angers M: moderate L:light S: severe**

Senza trattamenti fungicidi, i risultati mostrano una significativa riduzione dell'incidenza della malattia in entrambi gli anni (7,3 fino a 21,3%), e della gravità nel secondo anno (35,4%) nella mescolanza tra le file, se paragonata a una monocoltura di cultivar suscettibile. I migliori risultati si sono ottenuti quando la miscela tra le file è stata associata a moderati trattamenti fungicidi , in questo caso la riduzione dell'incidenza della malattia ha raggiunto il 75,1% sulle foglie e il 69,7% sui frutti durante la fasi di crescita. Le caratteristiche del sistema *V. inaequalis* - melo e i risultati ottenuti da questo esperimento hanno suggerito una moderata ma non trascurabile capacità delle miscele di cultivar di ridurre l'epidemia della malattia (Didelot et al. 2007).

## 7. CONSIDERAZIONI FINALI

La coltivazione del melo con pochi interventi fitoiatrici non è più un'utopia, grazie all'impiego di varietà resistenti alla ticchiolatura. Bisogna però prendere atto che , nonostante i notevoli vantaggi tecnici, ecologici, salutistici ed economici, a portata di mano con queste cultivar, esse stentano a decollare e attualmente sono solo una nicchia, nella nicchia delle coltivazioni biologiche. D'altro canto bisogna valutare che, se le mele resistenti hanno raggiunto standard paragonabili a quelle tradizionali per qualità, produttività, aspetto esteriore, colorazione e pezzatura e in molti casi sapore e consistenza dei frutti, molte difettano ancora di serbevolezza, requisito sempre più importante per proporre o imporre qualsiasi mela. Dopo anni di consumi di massa in cui il prezzo è stato l'elemento decisivo per la scelta del prodotto, ci si sta avviando a una nuova fase di consumi intelligenti, dove la differenziazione, la diffusione, la tracciabilità, la garanzia del prodotto e del processo sono caratteristiche determinanti sulla scelta e sulla fidelizzazione del consumatore. Quest'ultimo è pronto a recepire l'innovazione insita in queste mele ed è disponibile a cedere sull'aspetto estetico, pur di ottenere in cambio garanzie igienico sanitarie, gustative e dietetiche. Si rende necessario, però, che questo plus qualitativo sia fatto conoscere con strategie mirate di informazione e promozione, sono inoltre necessari volumi di prodotto sufficienti, la cosiddetta massa critica, a supportare tale attività di comunicazione. Al momento siamo ancora lontani da queste minime basi di partenza, anzi sono molte le ritrosie dei coltivatori e le resistenze degli operatori commerciali della media e grande distribuzione. Ciò rallenta il processo di collaborazione, programmazione e coordinamento, che appare indispensabile per questo nuovo filone, che può contribuire al rafforzamento, alla diversificazione e alla specializzazione delle più tipiche aree melicole del nostro paese, dove la difesa dalle avversità comporta un sempre più indesiderato ricorso ai prodotti fitosanitari.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Bassi, Pellegrino 2001. Cultivar di melo resistenti alla ticchiolatura. L'informatore agrario 38: 69-76

Belfanti, E.a , Silfverberg-Dilworth, E.b , Tartarini, S.a , Patocchi, A.b , Barbieri, M.a , Zhu, J.a c , Vinatzer, B.A.a d , Gianfranceschi, L.b e , Gessler, C.b , Sansavini, S.a f . 2004. The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101: pp. 886-890

Belli G. 2006. Elementi di Patologia Vegetale Piccin editore

Bènaouf, G., and Parisi, L. 2000 Genetics of the host-pathogen relationship between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species. Phytopathology 90: 236-242.

Bignami C., Vagnoni G., Magro P. 2003. Field evaluation of old italian apple cultivars for scab susceptibility. Proc. IS on Sust. Use of Plant Biodiv. Acta Horticulturae 598

Brasileiro, A.C.M., and D.M.A. Dusi. 1999. Transformação genética de plantas. In Torres, A.C., I.S. Caldas, and J.A. Buso (eds.) Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. EMBRAPA, SPI, Brasilia. Embrapa Hortaliças 2:679-735.

Bus, V. G. M., Rikkerink, E. H. A., van de Weg, W. E., Rusholme, R. L., Gardiner, S. E., Bassett, H. C. M., Kodde, L. P., Parisi, L., Laurens, F. N. D., Meulenbroek, E. J., and Plummer, K. M. 2005a. The Vh2 and Vh4 scab resistance genes in two differential hosts derived from Russian apple R12740-7A map to the same linkage group of apple. Mol. Breed. 15: 103-116.

Bus, V. G. M., Laurens, F. N. D., Van deWeg, W. E., Rusholme, R. L., Rikkerink, E. H. A., Gardiner, S. E., Bassett, H. C. M., and Plummer, K. M. 2005b. The Vh8 locus of a new gene-for-gene interaction between *Venturia inaequalis* and the wild apple *Malus sieversii* is closely linked to the Vh2 locus in *Malus pumila* R12740-7A. New Phytol. 166: 1035-1049.

Bus, Rikkerink, Aldwinckle. 2009. "A proposal for the nomenclature of *Venturia inaequalis* races" Acta Horticulturae, vol. 814: pp 739-746

Caffier. 2010. Efficiency of association of scab control methods on resistance durability on apple: the case study of cv. Ariane IOBC/WPRS Bull 54:327-330

Calenge. 2004. Quantitative Trait Loci (QTL) analysis reveals both broad spectrum and isolate specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *V. inaequalis*. Phytopathology 94: 370-379

Chevalier, M. 1988. Contribution a l'étude des relations hôte-parasite dans le cas du couple *Malus × domestica* - *Venturia inaequalis*: étude histologique et cytologique de deux cas de résistance dépendant des gènes Vf et Vm. PhD dissertation, Université de Nantes, France.

Chevalier, Leptinasse. 1989. Apple scab: studies of sensitivity and resistance using scanning electron microscopy. *Phytoma* 408:47-49

Cova V. 2008. ISOLAMENTO DI MARCATORI MICROSATELLITI STRETTAMENTE ASSOCIATI AL GENE DI RESISTENZA A TICCHIOLATURA Vm IN MELO

Dottorato di Ricerca in Colture Arboree ed Agrosistemi Forestali Ornamentali e Paesaggistici XX ciclo Università degli Studi di Bologna

Crosby, Janick, Pecknold, Korban, O'Connor, Ries, Goffreda, Voorderckers. 1992. Breeding apples for scab resistance: 1945-1990. *Fruit varieties* 46:145-166

Dayton, D. F., Williams, E. B. 1968. Independent genes in *Malus* for resistance to *Venturia inaequalis*. *American Society for Horticultural Science* 92: 89-93.

Didelot, Brun, Parisi. 2007. Effect of cultivar mixtures on scab control in apple orchards. *Plant Pathology* 56:1014-1022.

Durel, Parisi, Laurents, van de Weg. 2003. Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia Inaequalis* in apple. *Genome* 46: 224-234

Faize, M., S. Sourice, F. Dupuis, L. Parisi, M.F. Gautier, and E. Chevreau. 2004. Expression of wheat Puroindoline-b reduces scab susceptibility in transgenic apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant Sci.* 167:347-354.

FAO food and agriculture organization

(<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>)

Fitzgerald, van Kan, Plummer. 2004. Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus..." *Fungal Genetics and Biology*, vol. 41: 963-971.

Flachowsky, H., T. Birk, V. Hanke. 2004. Preliminary results to establish an alternative selection system for apple transformation. *Acta Hort.* (ISHS) 663:425-430.

Castro A. 2001 Dept. of Crop and Soil Sciences, Oregon State University and Dept. de Produccion Vegetal, Facultad de Agronomia, Universidad de la Republica, Uruguay  
<http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/cultivarmixes/Pages/default.aspx>

Flachowsky, H., Le Roux, P.-M., Peil, A., Patocchi, A., Richter, K., Hanke, M.-V. 2011. Application of a high-speed breeding technology to apple (*Malus × domestica*) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection. *New Phytologist*, 192: 364-377.

Flor, H. H. 1971 Current status of gene for gene concept Annu. Rev. Phytopatol. 9: 275-296.

Gadoury and MacHardy "Negative geotropism in *Venturia Inaequalis*", Phytopatology, vol. 75, pp. 856-859

Gessler, C. 1989 Genetics of the interaction *Venturia inaequalis*-Malus: The conflict between theory and reality. IOBC/WPRS-Bull. 12:168-190.

Gessler C., and Pertot I. 2011 Vf scab resistance of Malus. Trees 26:95-108

Gianfranceschi, L., Koller, B., Seglias, N., Kellerhals, M., and Gessler, C. 1996. Molecular selection in apple for resistance to scab caused by *Venturia inaequalis*. Theor. Appl. Genet. 93: 199-204.

GIAS Global Informatios Agricultural System  
(<http://gias.regione.emiliaromagna.it/costidiproduzione/costodiproduzione.aspx> )

Gygax, M., Gianfranceschi, L., Liebhard, R., Kellerhals, M., Gessler, C., Patocchi, A. 2004. Molecular markers linked to the apple scab resistance gene Vbj derived from *Malus baccata* jackii. Theoretical and Applied Genetics 109: 1702- 1709.

Gopaljee, Karnika, Priyanka. 2009. "The *Venturia* Apple Pathosystem: Pathogenicity Mechanism and Plant Defense Responses" Journal of Biomedicine and Biotechnology

Hammerschlag, F. A. 2000 Resistant responses of peach somaclone 122-1 to *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* and to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. HortScience 35: 141-143.

Guillaumès, J., Chevalier, M., and Parisi, L., 1995. Etude des relations *Venturia inaequalis* -*Malus x domestica* sur vitroplantes. *Can J Plant Pathol* 17: 305-311.

Hemmat, M., Brown, S. K., Aldwinckle, H. S., Mehlenbacher, S. A., Weeden, N. F. 2003 Identification and mapping of markers for resistance to apple scab from 'Antonovka' and 'Hansen's baccata #2'. *Acta Horticulturae* 622: 153-161.

Hohn. 2010. Pflanzenschutzempfehlungen für den Erwerbsobstbau. Flugschrift Agroscope 11

ISMEA Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare, [www.ismea.it](http://www.ismea.it)

Joshi 2010 Towards durable resistance to apple scab using cisgenes. Ph.D thesis Wageningen University NL

Korban, S.S., and H. Skirvin. 1984. Nomenclature of the cultivate apple. *HortScience* 19:177-180.

- Korban, S. S, Chen, H. 1992. In: Hammerschlag, F. A., Litz, R. E (eds) Biotechnology of perennial fruit crops. CAB, Wallingford, pp 203-227.
- Lespinasse, Parisi, Pinet, Laurent, Durel. 1999. Resistance du pommier à la tavelure et à l'oidium. *Phytoma* 154 23-26.
- Liu Q., S. Salih, and F. Hammerschlag. 1998. Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots promotes high-frequency shoot organogenesis and enhanced  $\beta$ -glucuronidase expression from stem internodes. *Plant Cell Rep.* 18:32-36.
- MacHardy. 1996. Apple scab, Biology, Epidemiology, and Management, APS, St. Paul, Minn, USA
- MacHardy, Gadoury, Gessler. 2001. "Parasitic and biological fitness in *Venturia Inaequalis*: relationship to disease management strategies" *Plant Disease*, vol.85:1036-1051,
- Mancini, Cotroneo, Galliano. 1999. Evaluation of two models for predicting ascospore maturation of *Venturia inaequalis* in Piedmont (NW Italy) *Rivista di Patologia Vegetale*
- Michalek . Role of the flavan-3-ols in resistance of apple trees to *Venturia Inaequalis*. *Acta Horti* 484:535-539
- Nicholson, Kuc, Williams, "Histochemical demonstration of transitory esterase activity in *Venturia Inaequalis* " *Phytopathology*, vol. 62, pp.1242-1247, 1972
- Parisi, L., Lespinasse, Y., Guillaumes, J., and Krüger, J. 1993. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the Vf gene. *Phytopathology* 83:533-537.
- Parisi, L, Lespinasse, Y. 1996. Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains of race 6 on apple clones (*Malus* sp.). *Plant Disease* 80: 1179-1183.
- Parisi, Leptinasse. 1999. Pathogenicity of *Venturia Inaequalis* strains of race 6 on apple clones (*Malus* spp). *Acta Horti* 484:443-447
- Parisi, Durel, Laurent. 2000. First report of the presence of *Venturia Inaequalis* race 7 in French apple orchard. *IOBC/WPRS Bull* 23:99-104
- Parisi. 2004. Variability of the pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. *Acta Horticulturae* 663: 107-113
- Penna, S., L. Sági, and R. Swennen. 2002. Positive selectable marker genes for routine plant transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38:125-128.
- Plantgest <http://plantgest.imagelinenetwork.com/varietal.cfm>

- Roberts, A. L., Crute, I. R. 1994. Apple scab resistance from *Malus floribunda* 821 (Vf) is rendered ineffective by isolates of *Venturia inaequalis* from *Malus floribunda*. *Norw J Agr Sci, Suppl No 17*: 403-406.
- Rouselle, Williams, Hough. 1974. Modification of the level of resistance to apple scab from the Vf. XIXth International Horticultural Congress Warszawa, 19-26
- Schumacher, Steiner, Dehne, Oerke. 2008 . “Localized adhesion of nongerminated *Venturia Inaequalis* conidia to leaves and artificial surfaces” *Phytopatology*, vol. 98:760.768.
- Seglias, Hodel. 1997. Genetische Kartierung quantitativer Merk-male beim Apfel. Ph.D Thesis no 12204 Swiss Fed Inst Technol ETH Zurich, p. 75
- Silfverberg. 2004. Identification of the HcrVf2 as an apple scab resistance genes and characterization of HcrVf control sequences. PhD thesis ETH-Zurich: 109pp
- Tartarini, S., Gennari, F., Pratesi, D., Palazzetti, C., Sansavini, S., Parisi, L., Fouillet, A., Fouillet, V., and Durel, C. E. 2004b Characterisation of a race 6 scab resistance gene from Italian germplasm. *ISHS. Acta Hort.* 663: 129-133.
- Szklarz M. 2003,. Evaluation of apple cultivars with different susceptibility to scab. *Dati non pubblicati*
- Szklarz M. 2006. Evaluation of apple cultivars resistance to apple scab. *Journal of fruit and ornamental plant research* 14,183-188
- Szklarz M. 2008 Productive value of seven apple cultivars with different susceptibility to apple scab. *Journal of fruit and ornamental plant research* 16
- Treutter, Feucht. 1990. The pattern of the flavan-3-ols in relation to scab resistance of apple cultivars. *J Hort Sci* 65:511-517
- Tartarini, Sansevini, Vinatzer, Gennari, Domizi. 2004. Efficiency of MAS for the Vf scab resistance gene. *ISHS Acta Hort* 538: 549-552
- Valli R. 1997. *Arboricoltura generale e speciale*. Edizioni Edagricole, Bologna, pp. 519-534.
- Valsangiacomo, Gessler. 1988. Role of the cuticular membrane in ontogenetic and Vf resistance on apple leaves against *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 78:1066-1069
- Valsangiacomo. In vitro degradation of cell wall of apple leaves .... *J Phytopathology* 135:20-27
- Vinatzer. 2001. Apple contains receptor like genes homologous to..... *Mol Plant Microbe Interact* 14:508:515

Way, R. D., Aldwinckle, H. S., Lamb, R. C., Rejman, A., Sansavini, S., Shen, T., Watkins, R., Westwood, M. N., and Yoshida, Y. 1991 Apples (*Malus*), in J. N. Moore and J. R. Ballington (eds.), Genetic resources of temperate fruit and nut crops, Intl. Soc. Wageningen, Acta Hort 290:1-62

Wikipedia ([http://it.wikipedia.org/wiki/Venturia\\_inaequalis](http://it.wikipedia.org/wiki/Venturia_inaequalis))

Williams EB, Dayton DF, Shay JR. 1966. Allelic genes in *Malus* for resistance to *Vneturia Inaequalis*. Proc Am Soc Hort Schi 88:52-56

Williams, E. B., and Kuç, J. 1969. Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. Annu. Rev. Phytopathol. 7:223-246.

Williams, E. B., and Brown, A. G. 1968. A new physiologic race of *Venturia inaequalis*, incitant of apple scab. Plant Dis. Rep. 52:799-801.

Wong, K.W., G.E. Harman, J.L. Norelli, H.L. Gustafson, and H.S. Aldwinckle. 1999. Chitinase-transgenic lines of 'Royal Gala' apple showing enhanced resistance to apple scab. Acta Hort. (ISHS) 484:595-599.

Xu and Korban. 2002. A cluster of four receptor like genes resides in the Vf locus that confers resistance to apple scab disease. Genetics 162:1995-2006

Zini, E. 2005 Costruzione di una mappa di associazione della popolazione di melo 'Golden Delicious' × 'Freedom' e caratterizzazione del gene di resistenza Va a ticchiolatura. PhD thesis, DCA-BO, Italy: 126 p.