

La presente deliberazione viene affissa il 20 DIC. 2007 all'Albo Pretorio per rimanervi 15 giorni

PROVINCIA di BENEVENTO

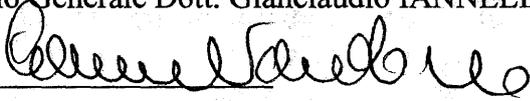
Deliberazione della Giunta Provinciale di Benevento n. 827 del 14 DIC. 2007

OGGETTO: PROGETTO DI RICERCA DI RECUPERO, ANALISI E VALORIZZAZIONE DELLA DIVERSITÀ GENETICA DEL MELO DELLA PROVINCIA DI BENEVENTO - PROVVEDIMENTI.

L'anno duemilasette, il giorno quattordici del mese di DICEMBRE presso la Rocca dei Rettori si è riunita la Giunta Provinciale con l'intervento dei Signori:

- | | | | |
|-----------------------------|----------------------|------------------------|----------------|
| 1) On.le Carmine | NARDONE | - Presidente | _____ |
| 2) Dott. Pasquale | GRIMALDI | - Vice Presidente | _____ |
| 3) Rag. Alfonso | CIERVO | - Assessore | <u>ASSENTE</u> |
| 4) Ing. Pompilio | FORGIONE | - Assessore | <u>ASSENTE</u> |
| 5) Dott. Pietro | GIALONARDO | - Assessore | <u>ASSENTE</u> |
| 6) Dott. Giorgio Carlo | NISTA | - Assessore | _____ |
| 7) Dott. Carlo | PETRIELLA | - Assessore | _____ |
| 8) Dott. Rosario | SPATAFORA | - Assessore | _____ |
| 9) Geom. Carmine | VALENTINO | - Assessore | _____ |

Con la partecipazione del Segretario Generale Dott. Gianclaudio IANNELLA

L'ASSESSORE PROPONENTE 

LA GIUNTA

Letta la proposta del Settore Edilizia e Patrimonio che di seguito si trascrive integralmente:

Premesso che:

- questo Ente, in ossequio agli indirizzi di Governo approvati con delibera del Consiglio Provinciale n. 69 del 16.06.03, ai fini del conseguimento dell'eccellenza e della valorizzazione delle qualità territoriali originali, è particolarmente impegnato a favorire e sostenere lo sviluppo dell'innovazione e la ricerca scientifica;
- la Provincia ha, infatti, attivato autonomamente od in cooperazione con altri Soggetti istituzionali Pubblici e/o privati, con Centri di ricerca italiani ed internazionali, alcuni progetti ad elevato valore aggiunto nei settori della qualità e della sicurezza alimentare per il conseguimento del benessere del consumatore, della tutela dell'ambiente e del territorio, delle nuove tecnologie, della sanità.

Considerato che:

- con nota prot. n. 1487/07 Posiz. 002.1.6 del 15.11.2006, il Prof. Guarino Carmine del Dipartimento di Scienze Biologiche ed Ambientali dell'Università degli Studi del Sannio chiede un contributo di € 40.000,00 per sostenere l'iniziativa, di non trascurabile interesse scientifico, il cui costo complessivo è stimato in circa € 206.000,00 e le cui attività sono riportate in un quadro di sintesi nella copia del progetto allegata alla suddetta richiesta;
- lo studio permetterà di raggiungere semantici risultati ampiamente trasferibili all'allestimento di una nuova banca del germoplasma di melo, che comprende da una parte le specie selvatiche con un *pool* di accessioni sufficientemente rappresentativo almeno per le specie più importanti e dall'altra una collezione di varietà che, recuperando materiale antico e moderno e di varia provenienza geografica, rappresenti la più ampia base genetica del melo coltivato nel mondo, per cui studiosi di tutto il mondo sarebbero interessati a far visita alle collezioni per eventuali collaborazioni;
- l'identificazione di una *core collection* di genotipi idonei per un programma a lungo termine di miglioramento delle linee parentali da destinare alla produzione di cultivar commerciali che portano caratteri di interesse agronomico, come la resistenza a malattie, quindi un uso biotecnologico del materiale a 360°;
- la valutazione del materiale raccolto con un approccio scientifico aggiornato, basato sull'analisi di sequenze di DNA, esplorando le relazioni filogenetiche tra le specie e le relazioni di parentela e somiglianza tra le varietà e creando in tal modo una base di dati di riferimento internazionale;
- l'obiettivo dello studio, sostanzialmente, si concretizza nel *“fare emergere la notevole potenzialità produttiva delle risorse endogene del bioterritorio sannita, perseguendo criteri operativi originali e, quindi, non imitativi”*;

Tenuto conto dell'importanza del suddetto progetto di ricerca e dei connessi costi, non completamente sostenibili, derivanti dall'articolazione del suo sviluppo, dei tempi necessari, del numero e livello delle specifiche professionalità previste da utilizzare, dei materiali speciali di consumo per tutte le analisi di laboratorio da effettuare, dalle necessarie assistenze e contributi specialistici per l'utilizzo di attrezzature ed apparecchiature scientifiche, oltre che da tutti gli altri connessi oneri e spese richieste per pervenire a risultati ottimali della ricerca;

Ritenuto che l'iniziativa è pienamente coerente con gli indirizzi ed obiettivi strategici di questo Ente;

Ravvisata, pertanto, l'opportunità di sostenere l'iniziativa attraverso il cofinanziamento del suddetto progetto di ricerca del Dipartimento di Scienze Biologiche ed Ambientali dell'Università degli Studi del Sannio, nei limiti dell'importo di € 40.000,00, disponibile sul capitolo n. 15921/3 “TRASFERIMENTI DI CAPITALE PER LA RICERCA SCIENTIFICA” del bilancio di previsione relativo al corrente anno;

Ritenuto, altresì, doversi regolamentare le modalità ed i tempi di erogazione del finanziamento, attraverso specifica convenzione,

Per tutte le motivazioni sopra esposte, si propone:

- di approvare la spesa di € 40.000,00 quale contributo per la realizzazione del progetto di ricerca, da attuarsi da parte del prof. Carmine Guarino del Dipartimento di Scienze Biologiche ed Ambientali, Università degli Studi del Sannio avente per oggetto: ***“RECUPERO, ANALISI E VALORIZZAZIONE DELLA DIVERSITÀ GENETICA DEL MELO DELLA PROVINCIA DI***

BENEVENTO", secondo le specifiche tecniche riportate nella copia delle attività allegata alla nota dell'11.12.2007 acquisita al prot. gen.dell'Ente al n. 29637 dell'11.12.2007 (che si allega);

- di far gravare la spesa di € 40.000,00 sul cap. 15921/3 del bilancio 2007.

RITENUTO doversi procedere all'approvazione della suesposta proposta;

Esprime parere favorevole circa la regolarità tecnica della proposta.

li _____

Il Dirigente S.E.P.
(dott. ing. Valentino MELILLO)



Esprime parere favorevole circa la regolarità contabile della proposta,

Li _____

Il Dirigente del Settore FINANZE
E CONTROLLO ECONOMICO
(dott. Sergio MUOLLO)

4

UFFICIO INTERNO
15921/3
28/12/07

LA GIUNTA

Su relazione dell'Assessore al ramo
A voti unanimi

DELIBERA

le premesse formano parte integrante e sostanziale del presente dispositivo;

- di approvare la spesa di € 40.000,00 quale contributo alla spesa necessaria per il progetto di ricerca, da attuarsi da parte del prof. Carmine Guarino del Dipartimento di Scienze Biologiche ed Ambientali, Università degli Studi del Sannio avente per oggetto: **"RECUPERO, ANALISI E VALORIZZAZIONE DELLA DIVERSITÀ GENETICA DEL MELO DELLA PROVINCIA DI BENEVENTO"**, secondo le specifiche tecniche riportate nella copia delle attività allegata alla nota dell'11.12.2007 acquisita al prot. gen.dell'Ente al n. 29637 dell'11.12.2007 (che si allega);
- di far gravare la spesa di € 40.000,00 sul cap. 15921/3 del bilancio 2007;
- di onerare il Dirigente del Settore Edilizia e Patrimonio dei successivi adempimenti di competenza, ivi inclusa la predisposizione dello schema di convenzione regolante i rapporti tra questo Ente ed il Dipartimento di Scienze Biologiche ed Ambientali, Università degli Studi del Sannio ed in particolare tempi e modalità di erogazione del contributo;
- di dichiarare il presente atto immediatamente esecutivo.

Verbale letto, confermato e sottoscritto
IL SEGRETARIO GENERALE
(Dr. Gianclaudio IANNELLA)

IL PRESIDENTE
(dr. Carmine NARDONE)

N. 983 **Registro Pubblicazione**

Si certifica che la presente deliberazione è stata affissa all'Albo in data odierna, per rimanervi per 15 giorni consecutivi a norma dell'art. 124 del T.U. - D. Lgs. 18.8.2000, n. 267.

BENEVENTO 20 DIC. 2007

IL MESSO

IL SEGRETARIO GENERALE
Dott. Gianclaudio IANNELLA

La suetesa deliberazione è stata affissa all'Albo Pretorio in data 20 DIC. 2007 e contestualmente comunicata ai Capigruppo ai sensi dell'art. 125 del T.U. - D. Lgs. vo 18/8/2000, n. 267.

SI ATTESTA, che la presente deliberazione è divenuta esecutiva a norma n. 124 del T.U. - D. Lgs. 18.8.2000, n. 267 e avverso la stessa non sono stati sollevati rilievi nei termini di legge.

il 11 GEN. 2008

IL RESPONSABILE DELL'UFFICIO

IL SEGRETARIO GENERALE
IL SEGRETARIO GENERALE
Dott. Gianclaudio IANNELLA

Si certifica che la presente deliberazione è divenuta esecutiva ai sensi del T.U. - D. Lgs. 18.8.2000, n. 267 il giorno 11 GEN. 2008

- Dichiarata immediatamente eseguibile (art. 134, comma 4, D. Lgs. vo 18/8/2000, n. 267)
- Decorsi 10 giorni dalla sua pubblicazione (art. 134, comma 3, D. Lgs. vo 18/8/2000, n. 267)
- E' stata revocata con atto n. _____ del _____.

BENEVENTO, il 11 GEN. 2008

IL SEGRETARIO GENERALE
IL SEGRETARIO GENERALE
Dott. Gianclaudio IANNELLA

Copia per
2 SETTORE SEP il 1 prot. n. ES 337
SETTORE FINANZA il 8630 prot. n. 15.1.08
SETTORE _____ il _____ prot. n. _____
Revisori dei Conti il 27.12.07 prot. n. _____
Nucleo di Valutazione il _____ prot. n. _____
Conf. Capigruppo

SETTORE PATRIMONIO
N. 10336
DEL 1 DIC. 2007



Dipartimento Scienze Biologiche ed Ambientali
Università degli Studi del Sannio

X Prof. Mella
Mella

PROT. INTERNO

LABORATORIO DI TUTELA E GESTIONE DEI SISTEMI INTEGRATI
ANIMALI E VEGETALI

Dr. De Bellis
Vella



Provincia di Benevento

AOO: Prot. Generale

Registro Protocollo Entrata

Nr. Prot. 0029637

Data 11/12/2007

Oggetto TRASMISSIONE PROGETTO I

RICERCA - PROGETTO DI

Dest. Presidente Provincia

PROVINCIA DI BENEVENTO

11 DIC 2007

Al Presidente della Provincia di Benevento
On. Carmine Nardone

OGGETTO: Trasmissione progetto di ricerca "**Progetto di Recupero, Analisi e Valorizzazione della diversità genetica del Melo**"

Egregio Presidente,

in virtù del particolare interesse che la Provincia ha mostrato e mostra per le problematiche inerenti l'eccellenza e la sicurezza alimentare, Le sottopongo un progetto di ricerca "**Progetto di Recupero, Analisi e Valorizzazione della diversità genetica del Melo**", inerente le risorse genetiche del melo, che secondo il nostro punto di vista potrà contribuire in maniera notevole alla conservazione della biodiversità del melo e a sviluppare programmi di ricerca sulla mela con particolare riferimento alle risorse locali quali ad esempio la mela Annurca di S. Agata dei Goti.

Le proponiamo tale progetto poiché riteniamo che impostare una ricerca applicata alla qualità alimentare sia un obiettivo che la Provincia in questi anni ha inteso sviluppare e potenziare e che noi condividiamo.

In allegato si trasmette copia del progetto completo in tutte le sue fasi compreso il piano finanziario. Il progetto si intende svolgersi in due anni, il costo previsto del primo anno è di € 68.000,00 mentre quello del secondo anno è di € 138.000,00.

Sicuro di un Suo interessamento, Le porgo i più cordiali Saluti

Benevento, 11/12 /2007

Carmine Guarino



*Dipartimento Scienze Biologiche ed Ambientali
Università degli Studi del Sannio*

'kent olma'

All'origine della pianta coltivata

IL MELO

Responsabile Scientifico : Dott. Carmine Guarino

*Progetto di Recupero, Analisi e Valorizzazione
della
diversità genetica del Melo*

	Riassunto	pag. 4
1	Le ragioni del progetto	5
2	Gli obiettivi del progetto	5
3	Piano di lavoro	6
4	4.1.1 Allestimento di una collezione di germoplasma di melo	6
4.1.2	Recupero di accessioni di <i>Malus</i> spp. dalle collezioni mondiali	6
4.1.3	Recupero di varietà coltivate antiche e moderne di melo	6
4.1.4	Ricostruzioni filogenetiche ed evolutive	6
4.2	Revisione tassonomica del genera <i>Malus</i>	6
4.2.1	Analisi molecolare della accessioni del genere <i>Malus</i>	7
4.2.2	Ricostruzioni filogenetiche ed evolutive	7
4.3	Caratterizzazione molecolare delle varietà di melo	8
4.3.1	<i>Fingerprinting</i> delle varietà di melo	8
4.3.2	Identificazioni di omonimie e sinonimie e analisi di <i>pedigree</i>	9
4.4		10
4.4.1	Costruzione di un dbase referenziale per il melo accessibile da Web	10
5.	Le Istituzioni proponenti	13
5.1	Consulenti scientifici	12
6.	Diagramma temporale delle attività	13
7.	Piano finanziario	14
8.	Benefici attesi	15

1. Riassunto

Il melo, con una produzione mondiale di 59 milioni di ton (FAOSTAT 2004), rappresenta la terza specie da frutto più coltivata nel mondo. Le varietà maggiormente utilizzate in occidente per l'alimentazione umana appartengono tutte ad un'unica specie (*M. x domestica*), sono poche e hanno una base genetica molto ristretta. Sei varietà, per di più imparentate tra loro, rappresentano da sole oltre il 60 % del mercato mondiale delle mele. La restrizione della base genetica operata dalla selezione ha reso la specie vulnerabile ad alcuni patogeni (funghi, batteri e micoplasm) e parassiti, che costringono i frutticoltori ad un massiccio ricorso a presidi fitosanitari.

Il progetto intende recuperare materiale vecchio e nuovo delle 33 specie principali del genere *Malus*, con una rappresentazione più significativa per le accessioni di melo coltivato (*Malus x domestica* e *M. sieversii*), di alcune specie selvatiche che hanno presumibilmente contribuito alla sua formazione e di alcune specie che portano caratteri di interesse agronomico, come la resistenza a malattie.

Il recupero verrà fatto raccogliendo materiale dalle principali collezioni mondiali di germoplasma e realizzando alcune esplorazioni nei centri di origine (repubbliche dell'Asia centrale, Cina). Il materiale raccolto verrà moltiplicato e duplicato per problemi di sicurezza in due collezioni (Udine e Benevento).

Sulle specie botaniche verrà condotto uno studio di tassonomia molecolare, basato sul confronto di sequenze di DNA, per capire l'origine del complesso *M x domestica* / *M. sieversii*. e per capire in generale le relazioni evolutive tra le specie del genere *Malus*. Ciò servirà da una parte per una revisione moderna della sistematica del genere *Malus* e dall'altra per valutare il grado di sintenia con il melo coltivato delle specie portanti caratteri di interesse agronomico potenzialmente interessanti per i futuri programmi di miglioramento genetico.

Le accessioni di melo coltivato e alcune accessioni di *M. sieversii* verranno sottoposte a caratterizzazione fenotipica e molecolare (*plant genotyping*), che permetterà di identificare sinonimie, omonimie e relazioni di parentela utili alla ricostruzione dei *pedigree*. Il lavoro permetterà di indagare l'origine e la diffusione in Europa di alcune varietà di interesse storico e di confermare i *pedigree* dichiarati per alcune varietà presenti sul mercato attuale. L'analisi permetterà, in secondo luogo, la creazione di una banca dati di riferimento per l'intera comunità scientifica.

Infine l'analisi della variabilità genetica in melo permetterà di preparare un *pool* di linee caratterizzate da un'ampia variabilità genetica che serviranno per l'avvio di un programma di miglioramento genetico di lungo termine in grado di rinnovare la piattaforma varietale attuale, adattandola alle nuove esigenze dell'agricoltura sia per quanto riguarda le tipologie di frutto sia per quanto riguarda l'adeguamento delle coltivazioni alle raccomandazioni della UE per quanto riguarda l'impatto ambientale.

2. *Le ragioni del progetto*

Il melo è una delle specie da frutto più coltivate nei climi temperati.

Le varietà utilizzate per l'alimentazione umana appartengono quasi esclusivamente a un'unica specie (*Malus x domestica*) e, nonostante siano descritte oltre 10.000 varietà (Way et al 1990), la base genetica è molto ristretta. Sei varietà, per di più imparentate tra di loro, rappresentano da sole oltre il 60% dell'intero mercato mondiale (Noiton e Alspach 1996, O'Rourke et al 2003).

La base genetica ristretta ha reso vulnerabile la specie e attualmente questa può essere coltivata solamente con un massiccio ricorso a presidi fitosanitari.

Verso la metà del secolo scorso, nel tentativo di recuperare caratteri di interesse agronomico sono state utilizzate alcune specie selvatiche (*M. floribunda*, *M. micromalus*, *M. atrosanguinea*, *M. baccata jackii*, *M. sargentii*) in programmi di incrocio a lungo termine (Janick et al 1996), ma l'uso di germoplasma selvatico è stato piuttosto sporadico e limitato ad acquisire alcune resistenze a patogeni.

Lo scarso uso di germoplasma selvatico è dovuto al limitato numero di accessioni presenti nelle collezioni. Si pensi che alcune specie tassonomicamente più vicine al melo coltivato e potenzialmente importanti come fonte di caratteri, come *M. sieversii*, sono presenti solo sporadicamente e con pochi genotipi nelle principali collezioni mondiali (Geneva-USA, Pillnitz/Dresden-Germania, Angers-Francia, Meise-Belgio, East Malling-UK, Skierniewice-Polonia, Gong-zuling-China ecc.).

In Italia esistono alcune collezioni significative di melo presso l'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura di Roma, in particolare presso la sezione di Pergine (TN), l'Università di Bologna, l'ESAV di Porto Tolle (RO), la stazione di Laimburg (BZ) e altre, ma tali collezioni hanno molto materiale moderno, derivante soprattutto dai programmi di miglioramento genetico condotti negli USA nel secolo scorso, mentre mancano collezioni significative di specie selvatiche e di varietà antiche, che contribuirebbero sicuramente ad allargare la base genetica disponibile per i *breeders*.

3. *Obiettivi del progetto*

Il progetto prevede la raccolta e l'analisi di germoplasma selvatico e coltivato di melo per raggiungere i tre obiettivi qui riportati:

- l'allestimento di una nuova banca del germoplasma di melo, che comprenda da una parte le specie selvatiche con un *pool* di accessioni sufficientemente rappresentativo almeno per le specie più importanti e dall'altra una collezione di varietà che, recuperando materiale antico e moderno e di varia provenienza geografica, rappresenti la più ampia base genetica del melo coltivato nel mondo.
- la valutazione del materiale raccolto con un approccio scientifico aggiornato, basato sull'analisi di sequenze di DNA, esplorando le relazioni filogenetiche tra le specie e le relazioni di parentela e somiglianza tra le varietà e creando in tal modo una base di dati di riferimento internazionale.
- l'identificazione di una *core collection* di genotipi idonei per un programma a lungo termine di miglioramento delle linee parentali da destinare alla produzione di cultivar commerciali.

4. Piano di lavoro

Il piano si svolge in due fasi: una prima fase prevede la raccolta del materiale esistente presso istituzioni nazionali e internazionali, una seconda fase prevede l'analisi con moderni metodi molecolari del materiale raccolto.

4.1.1 Allestimento di una collezione di germoplasma di melo

La collezione di germoplasma sarà costituita da accessioni delle principali specie del genere *Malus* e generi affini, dalle principali varietà commerciali di *M. x domestica* e dalle vecchie varietà europee non più utilizzate commercialmente.

4.1.2 Recupero di accessioni di *Malus* spp. dalle collezioni mondiali

Verranno seguite la seguente strategia:

- (a) l'introduzione da *repositories* internazionali e da orti botanici di materiale appartenente alle principali specie del genere *Malus* e alcuni generi affini, come *Aronia*, *Sorbus*, *Crataegus*, *Cydonia*. La collezione dovrebbe comprendere tutte le specie primarie che secondo l'ultima revisione potrebbero essere 33 (Way et al 1990) e possibilmente i principali ibridi naturali noti. Le specie 'selvatiche' più interessanti dal punto di vista genetico e/o agronomico, come *M. sylvestris*, *M. sieversii*, *M. baccata*, *M. prunifolia*, *M. pumila*, *M. robusta* e altre, dovrebbero essere ben rappresentate per quanto riguarda la loro variabilità genetica. A tale scopo, mentre accessioni di *M. sylvestris* potranno essere facilmente acquisite da alcune Istituzioni scientifiche europee, per l'acquisizione di accessioni appartenenti alle altre specie ricordate risulta particolarmente importante il punto successivo

4.1.3 Recupero di varietà coltivate antiche e moderne di melo

La creazione di un *repository* per il melo di valore internazionale prevede le seguenti attività:

- (a) la raccolta delle principali varietà commerciali di melo, limitando i gruppi rappresentati da numerose varietà derivanti da mutazione (es. Delicious rosse) ad uno o pochi esemplari per gruppo di mutazioni
- (b) la raccolta di vecchie varietà di melo note internazionalmente e riportate nelle principali pomone dei secoli XVI°-XIX°. La collezione può essere completata con alcune vecchie varietà locali di identità accertata e non omonime di varietà più note.

4.2 Revisione tassonomica del genera *Malus*

Il melo coltivato, *Malus x domestica*, ha una storia controversa. Secondo alcuni studiosi, è un ibrido naturale complesso al quale hanno contribuito un melo europeo, *Malus sylvestris*, e specie asiatiche come *M. baccata* e *M. prunifolia*, che si sono ibridate naturalmente nelle valli che congiungono l'Europa all'Estremo oriente.

Secondo altri, l'ancestrale del melo coltivato è una specie, *M. sieversii*, che si trova spontanea in un'area che comprende alcune delle ex-repubbliche sovietiche dell'Asia centrale.

In quelle zone il melo sarebbe arrivato dalla Cina centrale 4,5 milioni di anni fa e sarebbe rimasto ad un certo punto isolato geneticamente a seguito della formazione dei deserti del Gobi e del Taklimakan. L'isolamento genetico e i mutamenti climatici avvenuti in quelle valli avrebbero portato alla evoluzione

verso le forme attualmente note e coltivate. Nel Kazakistan e nelle valli che portano verso la Cina settentrionale (Valle dell'Ili e valli circostanti), il *M. sieversii* presenta tutte le tipologie di frutto del melo coltivato per quanto riguarda dimensioni, forma e colore della buccia.

Il trasferimento del melo dalle valli di confine tra la Cina nord-occidentale e il Kazakistan verso l'Asia minore e l'Europa risalirebbe al Neolitico, all'incirca 6.000 anni fa.

Uno studio tassonomico, condotto con i metodi molecolari attualmente disponibili, permetterà di identificare:

- (a) le relazioni tra *M. domestica* e *M. sieversii*
- (b) le specie selvatiche che hanno dato origine alle due specie precedenti
- (c) le altre specie tassonomicamente più affini alle due specie di melo coltivato.

Tali specie potrebbero rappresentare le fonti principali a cui attingere *pools* genici utili per programmi a lungo termine di miglioramento genetico.

4.2.1 *Analisi molecolare della accessioni del genere Malus*

Gli studi filogenetici verranno svolti secondo il programma di massima che segue:

- (a) identificazione su base bibliografica delle principali sequenze di DNA cloroplastico (ctDNA), mitocondriale (mtDNA) e nucleare utilizzate a fini tassonomici per la risoluzione di *taxa* a livello di genere botanico. Nel melo il DNA cloroplastico e quello mitocondriale vengono ereditati per via materna, quello nucleare da entrambi i genitori. Analizzando sequenze ad eredità uniparentale (ct- ed mt-DNA) e sequenze che vanno incontro a ricombinazione (DNA nucleare), sarà possibile identificare con maggior certezza le specie primarie, quelle che hanno avuto origine per mutazione e quelle per ibridazione interspecifica e ricostruire entrambe le linee parentali delle specie originate per ibridazione.
- (b) ricerca in banca dati delle sequenze scelte e disegno di primers di consenso o degenerati per l'amplificazione mediante PCR delle stesse sequenze in melo.
- (c) amplificazione in PCR delle sequenze scelte e sequenziamento diretto dei prodotti di amplificazione. L'analisi sarà estesa a tutte le specie di melo e nei limiti delle disponibilità finanziarie a più genotipi per specie, almeno per le specie più rappresentative per gli obiettivi che si propone la ricerca, quali *M. x domestica*, *M. sylvestris*, *M. sieversii*, *M. baccata* e *M. prunifolia*. I campioni saranno raccolti dalla nuova collezione; i campioni mancanti saranno richiesti a *repositories* di germoplasma

4.2.2 *Ricostruzioni filogenetiche ed evolutive*

L'allineamento delle sequenze e la costruzione ricorsiva di alberi filogenetici verranno eseguite mediante software dedicati (PAUP, MEGA ecc.). Dal confronto tra le ricostruzioni basate su sequenze dei diversi genomi, saranno identificate le specie primarie, le specie derivate per mutazione e gli ibridi interspecifici.

Una volta isolate le specie non derivate per ibridazione interspecifica, l'analisi condotta su queste ultime permetterà di stimare il grado di diversificazione delle specie e la loro vicinanza genetica con quelle coltivate e principalmente con *M. sieversii*.

4.3 Caratterizzazione molecolare delle varietà di melo

Al presente sono state inventariate oltre 10.000 varietà di melo (Way et al 1990), ma è possibile che il numero sia sensibilmente superiore, dato che alcune accessioni pur presenti nelle collezioni non sono mai state formalmente descritte. D'altra parte un certo numero di accessioni descritte in letteratura non sono presenti nelle collezioni ufficiali e sono forse andate perdute.

Delle accessioni presenti nelle collezioni, l'attività di identificazione è stata basata principalmente sull'uso di descrittori fenotipici (Maggioni et al 2004), mentre l'identificazione genetica è stata finora molto limitata.

Ciò comporta la presenza nelle collezioni di molte sinonimie ed omonimie, dovute da una parte agli scambi frequenti di materiale avvenuti ad opera di esploratori, colonizzatori, emigranti ecc. e dall'altra al vezzo durato fino agli inizi del XX° secolo di cambiare nome al materiale importato da altri luoghi. E' necessario aggiungere anche che molte sinonimie ed omonimie, che potrebbero essere identificate anche fenotipicamente, non vengono verificate perché il materiale da confrontare si trova in collezioni e luoghi diversi.

La nuova collezione potrebbe, almeno in parte, risolvere il problema.

Le collezioni sono molto costose da mantenere e un'analisi genetica che identifichi una *core collection*, cioè un nucleo di varietà geneticamente ben diversificate risulterebbe di grande utilità.

Il lavoro permetterà di:

- identificare sinonimie ed omonimie
- identificare le varietà principali, distinguendole da altre varietà secondarie rappresentate da mutazioni somatiche (*sport mutations*)
- verificare i *pedigrees* delle varietà storiche di melo per le quali siano riportate le linee parentali e identificare nuove relazioni di parentela
- monitorare i flussi di materiale genetico tra le diverse aree geografiche
- identificare i principali *pools* genici che contribuiscono a creare la diversità genetica in melo
- creare una *ranking list* che identifichi i genotipi che rappresentano la maggior diversità genetica e quelli che contribuiscono a frazioni di variabilità genetica via via minori.

4.3.1 Fingerprinting delle varietà di melo

Il *fingerprinting*, cioè l'identificazione degli individui basata sull'analisi del DNA, utilizza differenze esistenti a livello di sequenze di DNA tra gli individui. Questi polimorfismi del DNA che possono essere utilizzati per differenziare un individuo dal un altro sono di molti tipi e riflettono da una parte le caratteristiche delle sequenze del DNA e dall'altra gli strumenti a disposizione per la rilevazione delle diverse varianti di una determinata sequenza. Questa combinazione tipi di mutazione/tecniche di rilevamento ha dato origine a diverse classi di marcatori molecolari (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RAPD *Random amplified polymorphic DNA*, AFLP *Amplified Fragment Length Polymorphism*, VNTR *Variable Number Tandem Repeat*, rappresentate da mini- e micro-satelliti, ISSR *Inter Simple Sequence Repeats*, SNP *Single Nucleotide Polymorphism* ecc.).

La scelta è caduta sui microsatelliti o SSR perché verso di loro si sta orientando il consenso dell'intera comunità scientifica a causa dell'elevato polimorfismo e della loro capacità discriminante, la riproducibilità e la consistenza dei risultati, i costi contenuti, il livello di automazione delle analisi e il valore delle stesse in sede legale (Schlötterer 2004).

Circa 30-40 regioni di DNA microsatellite (SSR, *Simple Sequence Repeats*), scelte a copertura dell'intero genoma del melo sulla base di dati di mappa bibliografici, saranno analizzate su un panel ristretto di cultivar di melo (6-12 cultivar).

L'analisi verrà condotta mediante amplificazione in PCR con *primers* fluoresciniti, separazione elettroforetica al sequenziatore capillare e *sizing* degli alleli mediante standard interni di riferimento e software dedicato. Per ogni coppia di *primers* verranno messe a punto le condizioni ottimali di PCR, in particolare verrà ottimizzata la temperatura di *annealing*.

Questa prima parte dell'attività servirà inoltre per selezionare e preparare una *ranking list* di 18 marcatori SSR scelti per l'indipendenza della segregazione (= assenza di *linkage*), l'elevato polimorfismo e la buona risoluzione degli alleli. La *ranking list* verrà preparata sulla base dei risultati dello *screening* e delle informazioni bibliografiche per quanto riguarda polimorfismo e posizione di mappa.

Circa 400-600 accessioni di melo, provenienti dalla nuova collezione e integrate con campioni richiesti alle principali collezioni mondiali (Bologna-Italia, Pillnitz-Germania, Angers-Francia, Geneva-USA, ecc.) e locali e scelte a rappresentare la più ampia variabilità genetica sulla base delle osservazioni fenotipiche, delle informazioni storiche e quelle relative al *pedigree*, saranno analizzate con l'intero set di SSR scelti nello *screening* precedente.

Per alcune varietà, saranno raccolti campioni di piante di età diversa (se possibile arrivando ad esemplari di 100 anni ed oltre) come pure campioni da parti diverse della stessa pianta per analizzare in dettaglio i tassi di mutazione del DNA microsatellite e i fenomeni di chimerismo.

4.3.2 Identificazione di omonimie sinonimie e analisi di pedigree

I risultati attesi saranno:

- identificazione di un set di 12-18 SSR utili per il *fingerprinting* nel melo da proporre alla comunità scientifica assieme ai protocolli di lavoro
- identificazione di sinonimie, omonimie e relazioni di parentela tra le diverse cultivar e verifica/validazione dei *pedigree* riportati in letteratura
- analisi della diversità genetica del melo e identificazione di un set di genotipi, non ridondante e rappresentante la massima variabilità genetica, utile per un programma a lungo termine di miglioramento genetico delle linee parentali da utilizzare nei programmi destinati alla produzione di cultivar commerciali di melo
- identificazione dei tassi di mutazione dei microsatelliti in melo, assunta come specie modello in campo vegetale
- valutazione della diffusione di fenomeni di chimerismo in melo, scelta come specie modello di piante arboree a lunga propagazione vegetativa.

Per quanto riguarda il terzo punto sarà necessaria la messa a punto di algoritmi e software per la valutazione della diversità genetica in funzione della creazione della *ranking list* delle accessioni e della scelta dei genotipi per la *core collection*, descritta negli obiettivi del progetto.

Il programma potrebbe essere completato, qualora sussistano le disponibilità finanziarie, con osservazioni fenotipiche (caratteri morfologici, resistenze ecc.) e biochimiche. In tal caso, il programma potrebbe includere una analisi di *linkage disequilibrium* in melo e completarsi nell'identificazione di marcatori legati a caratteri di interesse per il *breeding*.

4.1 Diffusione dei risultati

Il progetto curerà con particolare attenzione la comunicazione attraverso i *media* nell'intento di dare il massimo risalto all'importanza del progetto sotto il profilo scientifico, culturale e delle ricadute economiche. In particolare:

I risultati del progetto, mano a mano che verranno acquisiti verranno portati a conoscenza della comunità scientifica internazionale attraverso pubblicazioni su riviste specializzate e partecipazioni a convegni (*Eucarpia-Fruit Breeding*, *International Society for the Horticultural Science*, Convegno nazionale sulla biodiversità ecc.)

I partecipanti al progetto promuoveranno, anche attraverso agenzie operanti nel settore, la propria partecipazione ad eventi culturali (trasmissioni TV, premi, tavole rotonde, fiere ecc.) in modo da dare il giusto risalto al progetto, ai ricercatori che vi hanno partecipato e agli Enti finanziatori dell'iniziativa.

Il progetto promuoverà degli *workshops* specifici sull'iniziativa, chiamando esperti di livello mondiale sulla conservazione della diversità genetica a dibattere sull'argomento e a portare le proprie esperienze

Ove possibile, si cercherà di favorire lo sfruttamento dei risultati acquisiti, incoraggiando i ricercatori a partecipare ad altri progetti, che rappresentino il logico sviluppo del progetto attuale o che rappresentino campi di ricerca correlati.

4.1 Costruzione di un dbase referenziale per il melo accessibile da Web

È prevista la creazione di una base di dati, interrogabile da rete, in cui le accessioni vengono descritte con i principali caratteri morfologici (descrittori UPOV), agronomici e molecolari. Il data base sarà integrato con immagini dei tratti più rilevanti e discriminanti di ciascuna accessione.

Il database sarà creato su piattaforma SQL server Microsoft® o SQL Oracle® e implementato con software che permettano la consultazione in rete delle informazioni prodotte dal progetto.

4.2 Altre attività

Verranno invitati studiosi di chiara fama internazionale presso le istituzioni proponenti per tenere lezioni e seminari inerenti l'oggetto di questo progetto.

Bibliografia di riferimento

- Stencourt EJ, Konopka J (1989) Directory of germplasm collections. 6.2 Temperate fruits and tree nuts. FAO/IBPGR, Roma: 296 pp
- Forsline PL, Aldwinckle HS (2004) Evaluation of *Malus sieversii* seedling populations for disease-resistance and horticultural traits. *Acta horticulturae* xxx: in press
- Olson SC, McFerson JR, Forsline PL, Lamboy WF, Luby JJ, Djangaliev AD, Aldwinckle HS (1997) Collecting and managing wild *Malus* germplasm in its center of diversity. *HortSci* 32 (2): 173-176
- Janick J, Cummins JN, Brown SK, Hemmat M (1996) Apples: 1-77. In Janick J, Moore JN (eds) *Fruit breeding*. Vol 1. tree and tropical fruits. J Wiley & Sons, New York
- Aggioni L, Fischer M, Lateur M, Lamont EJ, Lipman (2004) Report of a working group on *Malus/Pyrus*. Second Meeting, 2-4 May 2002. Dresden-Pillnitz, Germany. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy: 97 pp
- Olson SC, Alspach PA (1996) Founding clones, inbreeding, coancestry, and status number of modern apple cultivars. *J Amer Soc Hort Sci* 121 (5): 773-782

- O'Rourke D, Janick J, Sansavini S (2003) World apple cultivar dynamics. *Chronica horticultrae* 43 (3): 10-13
- Price E (2001) East of Eden. *The Garden* 126 (6): 456-459
- Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5 (1): 63-69
- Way RD, Aldwinkle HS, Lamb RC, Rejman A, Sansavini S, Shen T, Watkins R, Westwood MN, Yoshida Y (1990) Apple (*Malus*): 1-62. In Moore JN and Ballington Jr JR (eds). *Genetic resources of temperate fruit and nut crops*. Vol 1. ISHS, Wageningen

5. Le Istituzioni proponenti

Università del Sannio
Dipartimento di Scienze Biologiche ed Ambientali
Via Port'Arsa, 11, 82100 Benevento

Prof. C. Guarino
Prof. R. Sciarrillo
Dott. L. De Simone
Dott. S. Santoro

5.1 Consulenti scientifici

- Prof. **Carlo Fideghelli**, Direttore dell'Istituto sperimentale della frutticoltura del MIPAF di Roma, responsabile nazionale del progetto "Risorse genetiche", responsabile nazionale del progetto "Liste varietali" del MIPAF, consulente del Ministero dell'Agricoltura e degli Esteri
- Prof. **Silvio Sansavini**, direttore del Dipartimento di Coltivazioni arboree dell'Università di Bologna, responsabile del progetto nazionale "Liste varietali del Melo", consulente di vari Ministeri ed Organismi Internazionali e Nazionali
- Dr. **Manfred Fisher**, ricercatore del BAZ e curatore della collezione nazionale del melo di Pillnitz-Dresden (Germania)
- Dr. **Ives Lespinasse**, ricercatore dell'INRA di Angers (Francia) e coordinatore del progetto di miglioramento genetico del melo francese, consulente del governo francese
- Prof. **Francesco Maria Raimondo**, preside della Facoltà di Scienze MM.FF.NN. dell'Università di Palermo.
- Prof. **Giuseppe Pugliano**, ordinario di arboricoltura e olivicoltura del Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale, Facoltà di Agraria di Portici.
- Dr. **Tod Stuessy**, Department of Higher Plant Systematics and Evolution, Institute of Botany, University of Vienna, Vienna A-1030, Austria.

6. Diagramma temporale delle attività

Il diagramma dimostra lo sviluppo temporale previsto per le varie attività del progetto. La valutazione *in itinere* del progetto può essere fatta a scadenze (per esempio annuali) e può essere integrata da *audits* estemporanei su richiesta dei *referees*, rappresentati dai consulenti scientifici del progetto o da esperti indicati dal panel dei consulenti.

Attività/mesi	0-5	6-10	11-15	16-18	19-24
Piano di lavoro, pianificazione delle attività ecc.	■				
Recupero delle accessioni dalle collezioni mondiali di melo	■	■	■		
Recupero di varietà antiche e moderne di melo	■	■			
Descrizione fenotipica e analisi molecolari delle accessioni di melo		■	■	■	■
Ricostruzioni filogenetiche ed evolutive, analisi di distanza			■	■	■
Caratterizzazione molecolare (<i>genotyping</i>) delle varietà di melo		■	■	■	■
Analisi dei dati, analisi di sinonimie, pedigree ecc.			■	■	■
Costruzione di d-base referenziali per il melo con accesso da web			■	■	■
Attività di informazione sul progetto e diffusione dei risultati	■	■	■	■	■

Piano finanziario

Voci di spesa	Costi (€)
----------------------	------------------

	I ANNO	II ANNO
Personale a contratto	€ 10.000,00	€ 20.000,00
Collaborazioni	€ 13.000,00	€ 26.000,00
Materiale a consumo	€ 25.000,00	€ 50.000,00
Missioni, partecipazioni a convegni	€ 2.000,00	€ 4.000,00
Spese funzionamento Dipartimento (10%)	€ 5.000,00	€ 10.000,00
Spese fondo comune di Ateneo	€ 2.500,00	€ 5.000,00
Totale	€ 57.500,00	€ 115.000,00
IVA	€ 11.500,00	€ 23.000,00
Totale	€ 68.000,00	€ 138.000,00

8. *Benefici attesi*

Un progetto di tale entità per l'ente proponente significa:

- porsi come punto di riferimento mondiale nell'ambito della ricerca genetica delle piante coltivate.
- creare una tradizione scientifico-culturale di richiamo internazionale.
- offrire alla ricerca scientifica nuove frontiere e approcci al miglioramento genetico.
- sperimentare "nuovi sapori" sostenibili ed ecocompatibili.

Pertanto,

- l'allestimento di una nuova banca del germoplasma di melo, che comprende da una parte le specie selvatiche con un *pool* di accessioni sufficientemente rappresentativo almeno per le specie più importanti e dall'altra una collezione di varietà che, recuperando materiale antico e moderno e di varia provenienza geografica, rappresenti la più ampia base genetica del melo coltivato nel mondo; pertanto, studiosi di tutto il mondo sarebbero interessati a far visita alle collezioni per eventuali collaborazioni.
- l'identificazione di una *core collection* di genotipi idonei per un programma a lungo termine di miglioramento delle linee parentali da destinare alla produzione di cultivar commerciali che portano caratteri di interesse agronomico, come la resistenza a malattie, quindi un uso biotecnologico del materiale a 360°.
- la valutazione del materiale raccolto con un approccio scientifico aggiornato, basato sull'analisi di sequenze di DNA, esplorando le relazioni filogenetiche tra le specie e le relazioni di parentela e somiglianza tra le varietà e creando in tal modo una base di dati di riferimento internazionale.