

La lunga e strana storia della resistenza alla ticchiolatura del melo

STEFANO TARTARINI

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari
Alma Mater Studiorum Università di Bologna

*La ticchiolatura, prodotta dal patogeno fungino *Venturia inaequalis*, è una delle principali malattie del melo. Numerosi geni di resistenza alla ticchiolatura (geni Rvi 1-18) sono stati scoperti in specie selvatiche (come *Malus floribunda*) e introdotti nei meli coltivati con metodi genetici classici; nonostante i lunghi periodi richiesti per la selezione, le varietà resistenti consentirebbero un notevole risparmio di pesticidi. Più di recente sono stati fatti rilevanti progressi nella modificazione del melo con tecniche di ingegneria genetica, comprese le innovative tecnologie cisgeniche che permettono l'inserimento del solo gene di resistenza evitando eventuali effetti indesiderati. La legislazione italiana, che asseconda l'orientamento diffidente dei consumatori, ha però bloccato ogni tipo di sperimentazione. L'autore si chiede se tale atteggiamento non sia da riconsiderare alla luce dei vantaggi ecologici e sanitari che potrebbero derivare dal consumo di prodotti OGM di nuova concezione.*

La ticchiolatura è una delle principali malattie del melo in tutti i Paesi con clima temperato, soprattutto quando le primavere sono miti e piovose come quelle delle nostre regioni produttrici di mele. Il fungo responsabile, l'ascomicete *Venturia inaequalis*, attacca tutti gli organi giovani della pianta (foglie, germogli e frutti) quando si verificano le condizioni ambientali ideali per lo sviluppo dell'infezione (temperatura di circa 18-20°C, elevata umidità relativa e bagnatura degli organi giovani della pianta). Il danno sulle foglie si manifesta con macchie vellutate di colore scuro che

possono interessare anche tutta la foglia con conseguente perdita di efficienza fotosintetica e defogliazioni precoci più o meno pronunciate a seconda della suscettibilità varietale. Sui frutti i danni sono molto più marcati in caso di attacchi precoci, che ne determinano la completa deformazione, ma in ogni caso i frutti con macchie di ticchiolatura non possono essere commercializzati. Proprio per questo, la ticchiolatura è in grado di causare ingenti danni se non debitamente controllata con l'utilizzo massiccio di fungicidi. Nelle annate con elevata piovosità primaveri-

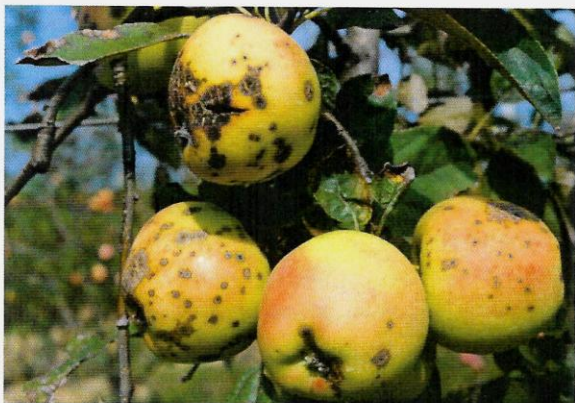


Fig. 1 – Gravi danni causati da *Venturia inaequalis* su frutti di una varietà di mela molto suscettibile a ticchiolatura.

le-estiva sono necessari anche più di 20 interventi con prodotti chimici nel corso della stagione vegetativa e produttiva, principalmente da aprile a settembre. A questo riguardo, però, mi preme sottolineare che il numero di trattamenti antifungini è simile anche quando si adottino i protocolli di difesa biologica. La differenza fra i due sistemi di coltivazione non sta tanto nel numero di interventi di difesa per il controllo della malattia ma piuttosto nel tipo di prodotti chimici utilizzati. In particolare, nel caso della difesa convenzionale possono essere utilizzate sostanze di sintesi mentre nel biologico si possono utilizzare solo sostanze cosiddette 'tradizionali' (composti a base di rame) ammesse dal loro disciplinare di produzione. Questi ultimi interventi, seppur tradizionali, sono sempre a base di composti potenzialmente tossici che devono essere distribuiti con regolarità per proteggere le produzioni. La tossicità dei prodotti a base di rame è oggetto di continui approfondimenti che non ne escludono la pericolosità (<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2018.5152>). Fortunatamente, negli ultimi anni è notevolmente aumentata la sensibilità verso una maggiore sostenibilità delle produzioni e in particolare è emersa una maggiore consapevolezza nei riguardi della salvaguardia dell'ambiente e della salute da parte non solo dei cittadini ma anche delle istituzioni pubbliche. Un esempio è dato dal Trentino-Alto Adige in cui è stata emanata una apposita normativa al fine di regolamentare i trattamenti fitosanitari nelle vi-

cinanze di alcuni siti 'sensibili' (<https://www.ufficiostampa.provincia.tn.it/Comunicati/FITOSANITARI-ECCO-LE-DISTANZE-MINIME-DEI-TRATTAMENTI>). Queste limitazioni stanno finalmente aprendo la strada alla diffusione delle varietà geneticamente resistenti alla ticchiolatura in quanto la selezione di nuove varietà di pregio resistenti alla malattia rappresenta sicuramente una delle strade più valide per diminuire l'impatto ambientale della melicoltura. Proprio da queste premesse parte la lunga e strana storia della resistenza genetica alla ticchiolatura.

Dovete sapere che la storia della resistenza alla ticchiolatura ha origini molto antiche e tutto iniziò più di un secolo fa, per la precisione nel 1914, quando negli Stati Uniti fu effettuato, abbastanza casualmente, il primo incrocio fra una specie selvatica di melo (*Malus floribunda* 821) e una varietà commerciale (Rome Beauty) con lo scopo di studiare la trasmissione del carattere dimensione del frutto (Crandall, 1926). Solo diversi anni dopo, nel 1944, fu osservato che alcune delle piante derivate da questo incrocio erano immuni dalla malattia e da lì sono partiti gli studi e i programmi di miglioramento genetico per la resistenza a *Venturia inaequalis* in tutto il mondo (Gessler *et al.*, 2006; Gessler & Pertot, 2012).

Il miglioramento genetico per la resistenza a ticchiolatura è risultato però un lavoro particolarmente lungo e complesso perché, anche se la resistenza è facilmente trasmissibile alle piante figlie in quanto controllata da un singolo gene, non è altrettanto facile mantenere tutte le altre caratteristiche produttive e di qualità del frutto che sono fondamentali in una nuova varietà commerciale. Inoltre, partendo da specie selvatiche come piante donatrici della resistenza, sono necessarie diverse generazioni di incrocio, ognuna delle quali richiede almeno 10-15 anni, per ottenere delle nuove varietà che possano competere con le caratteristiche standard delle mele conosciute ed apprezzate dai consumatori. Le prime varietà resistenti alla ticchiolatura risalgono ormai agli anni '70-'80 del novecento (ad esempio Prima e Florina) ma queste varietà non hanno mai suscitato un grande interesse commerciale, neanche presso i melicoltori biologici che avrebbero potuto trarre i maggiori vantaggi dalla massic-

cia riduzione dei trattamenti fungicidi consentita dalla coltivazione di varietà resistenti. Le ragioni di questo parziale insuccesso risiedono principalmente nel fatto che le mele delle prime varietà resistenti alla ticchiolatura non erano buone come quelle tradizionali coltivate secondo il disciplinare biologico. Finalmente, dopo circa 30-40 anni dall'introduzione delle prime mele resistenti alla ticchiolatura, il miglioramento genetico tradizionale ha prodotto nuove varietà di mele con buone caratteristiche produttive e qualitative dei frutti che sono in grado di competere sul mercato con le mele che dominano il mercato mondiale (ad esempio Golden Delicious, Gala e Fuji). Nonostante gli indubbi vantaggi offerti dalle nuove varietà resistenti, queste mele fanno una gran fatica ad affermarsi essendo per molti aspetti qualitativi diverse da quelle conosciute ed apprezzate dai consumatori. Purtroppo nel melo, come in tutte le piante da frutto, è impossibile inserire un singolo carattere mediante incrocio mantenendo allo stesso tempo inalterate tutte le altre caratteristiche agronomiche e pomologiche, a meno che non si utilizzino le moderne tecniche di ingegneria genetica. L'approccio di ingegneria genetica però apre una serie di problematiche legate non solo al-

la disponibilità di geni utilizzabili per conferire la resistenza ad una determinata malattia, ma anche all'attuale impossibilità di piantare in campo aperto le piante geneticamente modificate. A questi limiti si aggiunge poi l'avversione, più o meno motivata, della maggior parte dei consumatori verso questi prodotti *high-tech*. Per quanto riguarda il primo aspetto, ossia quello della identificazione di geni di resistenza alla ticchiolatura, è stata fatta tanta strada da quando sono state costituite le prime piante resistenti e sono stati effettuati i primi studi di genetica del carattere. Da allora, grazie alle ricerche condotte in tutto il mondo da decine di ricercatori è stato possibile fare luce su molti aspetti legati alla resistenza alla ticchiolatura, tanto che sono state identificate numerose fonti di resistenza alla malattia nel genere *Malus* e sono stati pubblicati centinaia di articoli sull'argomento. In particolare, sono stati identificati ben 18 diversi geni di resistenza alla malattia, denominati con le sigle *Rvi1-Rvi18*. Inoltre, sono state individuate anche diverse razze del patogeno in grado di superare uno o più dei geni di resistenza (ne esistono almeno 8 razze). Questi risultati confermano la complessità del sistema di interazione fra pianta e patogeno. In particola-

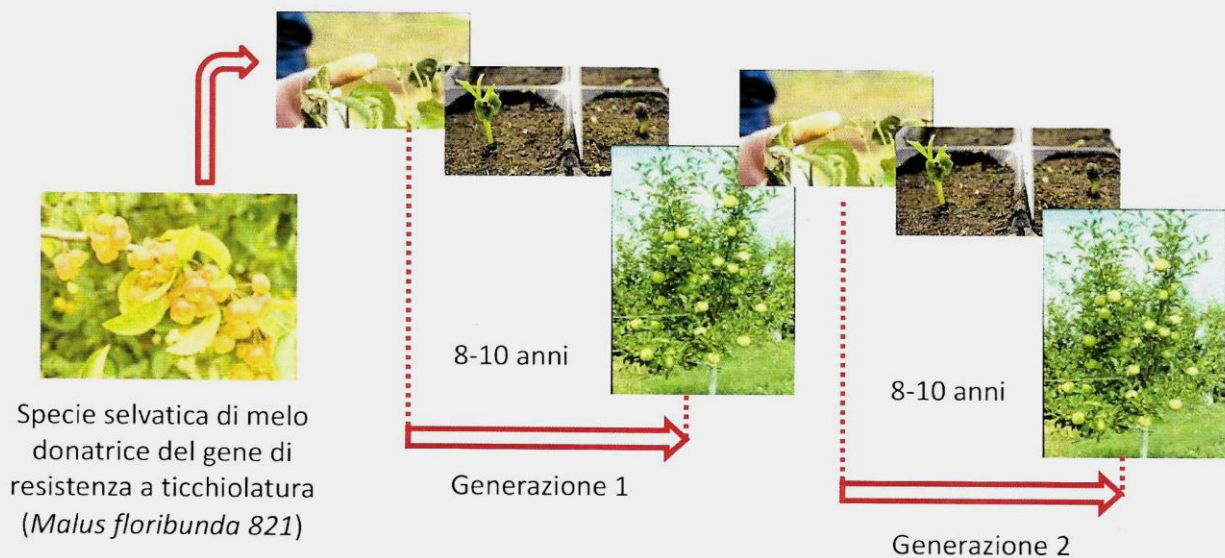


Fig. 2 – Schema generale di miglioramento genetico del melo per la resistenza a ticchiolatura mediante incrocio. Il polline della specie selvatica viene utilizzato per fecondare fiori di varietà di melo coltivato. Alcune piante figlie resistenti vengono poi utilizzate come genitori nella successiva generazione d'incrocio. Ogni generazione dura almeno 8-10 anni e per produrre una nuova varietà resistente partendo da una specie selvatica servono almeno 5-6 generazioni.



Fig. 3 – Risultato dell’infezione con *Venturia inaequalis* su piante di Gala e su linee geneticamente modificate contenenti il gene identificato nella specie selvatica *Malus floribunda* 821. Si noti che le foglie delle linee geneticamente modificate sono completamente resistenti all’attacco del patogeno.

re, secondo l’accettata teoria del “Gene-for-Gene” (Flor, 1971), la risposta di resistenza di una pianta si verifica a seguito di un riconoscimento fra sostanze prodotte e/o rilasciate dal patogeno (prodotte dal gene *avr* di “avirulenza” del patogeno) che sono riconosciute in qualche modo dal gene di resistenza presente nella pianta (prodotto dal gene *R* di resistenza). Ad oggi sono stati identificati geni di resistenza a ticchiolatura in ben 10 diversi cromosomi del melo, a conferma della variabilità genetica del carattere.

Negli ultimi anni, queste ricerche hanno messo a disposizione dell’ingegneria genetica alcuni di questi geni di resistenza e ciò ha anche permesso di dimostrare che questi geni sono effettivamente in grado di conferire la resistenza alla malattia qualora vengano opportunamente inseriti nel genoma di varietà commerciali suscettibili al patogeno. Il primo gene di resistenza a ticchiolatura identificato e clonato in melo è scaturito dalle ricerche coordinate dal prof. Silvano Sansavini dell’Università di Bologna e dal prof. Cesare Gessler del Politecnico di Zurigo che nel lontano 1996, dopo i primi anni di studi indipendenti sul carattere, hanno pensato di unire le forze e collaborare per raggiungere l’obiettivo comune di isolare e utilizzare il primo gene di resistenza ad una malattia in una pianta da frutto. Dopo 8 anni di ricerche è stato pubblicato il lavoro chiave (Belfanti *et al.*, 2004) in cui si dimostrava che il gene inizialmente denominato *HcrVf2* (isolato dalla specie selvatica *Malus floribunda* 821) era in grado di conferire una resistenza

completa a piante geneticamente modificate di Gala, ossia una varietà commerciale tipicamente molto suscettibile a questa malattia. L’indagine istologica ha dimostrato che sulle foglie delle linee transgeniche resistenti, i conidi germinano ma non riescono a completare il processo infettivo. Questo gene (oggi rinominato *Rvi6*, vedi Bus *et al.*, 2011) codifica per un recettore transmembrana (‘Receptor-like protein’ o ‘RLP’) con un dominio proteico di tipo ‘Leucine Rich Repeat’ (LRR) extracellulare (Jansch *et al.*, 2014; Vanblaere *et al.*, 2014). In parole più semplici, il gene di resistenza dà una proteina la cui parte sporge all’esterno delle membrane plasmatiche delle cellule che funziona come un’antenna in grado di percepire la presenza del patogeno. È proprio in seguito a questa percezione di un segnale mandato dal patogeno che le cellule attaccate sono in grado di mettere in atto i meccanismi di difesa in grado di bloccare lo sviluppo della malattia. Si tratta di un meccanismo perfetto che funziona solo se c’è il riconoscimento fra pianta e patogeno: tanto è vero che se sulla foglia di una pianta resistente arriva una razza del patogeno che non si fa riconoscere dal gene di resistenza, la pianta diventa suscettibile. Questo è quanto accade oggi nel Nord Europa dove si sono sviluppate delle nuove razze di *Venturia inaequalis* (razze 6 e 7) che sono in grado di superare la resistenza conferita dal gene *HcrVf2* (o *Rvi6*). Per fortuna le Alpi hanno finora bloccato l’arrivo sul nostro territorio di queste nuove razze e quindi in Italia la resistenza derivata da *Malus floribunda* 821 è

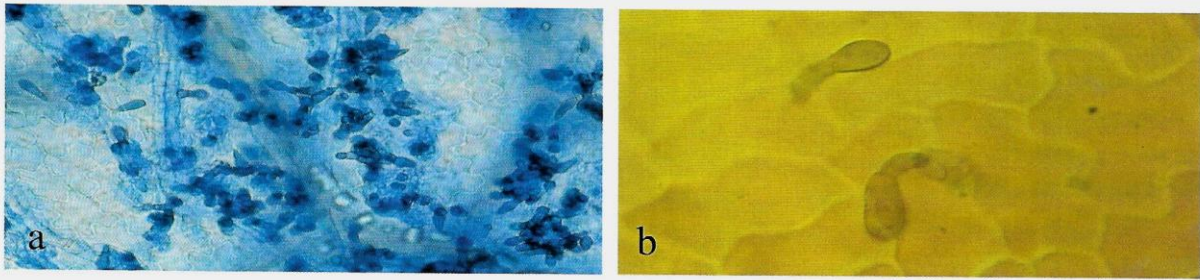


Fig. 4 – Analisi al microscopio ottico di foglie infettate con *Venturia inaequalis*: a. foglie di Gala con sporulazione abbondante; b. foglie di una linea geneticamente modificata di Gala in cui si vede che la crescita del fungo si arresta precocemente e quindi non si completa il processo infettivo.

ancora efficace. Per monitorare la diffusione delle virulenze di *Venturia inaequalis* è stata lanciata un'iniziativa internazionale che ha previsto la replica di un frutteto sperimentale che raccoglie varietà di melo che contengono resistenze diverse (ospiti differenziali), per un totale di 35 frutteti sperimentali distribuiti in 18 Stati (<http://www.vinquest.ch/>). In questi frutteti non vengono effettuati trattamenti fungicidi in modo da riuscire a capire le razze del patogeno presenti nei diversi ambienti. Mettendo da parte l'orgoglio scientifico per questo successo frutto di circa un decennio di ricerche comuni fra Bologna e Zurigo, alle quali ho avuto la fortuna e l'onore di partecipare, vorrei stimolare la riflessione su un aspetto che per me è particolarmente importante. Nel lontano 2004 la ricerca pubblica aveva già messo a punto gli strumenti per rendere qualunque mela conosciuta resistente alla ticchiolatura, semplicemente introducendo quel gene di resistenza in tutte le varietà commerciali. Purtroppo però le normative esistenti in Italia sugli OGM non hanno reso possibile la coltivazione in pieno campo di questa prima mela 'biotech' resistente. Non si è quindi verificata l'effettiva resistenza alla malattia in condizioni naturali né l'eventuale modifica di altri caratteri a seguito dell'intervento di ingegneria genetica e soprattutto la valutazione della sua eventuale pericolosità e tossicità. A questo riguardo, anche la legislazione americana richiede tutta una serie di verifiche e accurate valutazioni del rischio prima che venga rilasciata un'autorizzazione alla coltivazione e al consumo di una pianta OGM.

Dai primi meli OGM resistenti alla ticchiolatura del 2004 ad oggi, la ricerca pubblica inter-

nazionale ha ottenuto risultati ancora più significativi. In particolare, la tecnologia OGM è stata ulteriormente migliorata ed oggi è possibile ottenere delle piante geneticamente modificate che contengono al loro interno solo geni derivanti dalla stessa specie oggetto della modificazione genetica. Si tratta delle cosiddette piante "cisgeniche" che riproducono fedelmente le caratteristiche delle varietà tradizionali conosciute dal consumatore, ma sono resistenti alla ticchiolatura grazie all'inserimento di un gene di melo e nulla più. La caratterizzazione biochimica e molecolare di una linea cisgenica contenente il gene *Rvi6* ha evidenziato che questa pianta non si discosta in maniera sostanziale dalle piante non trasformate, dalle quali ha avuto origine (Chizzali *et al.*, 2016). In Europa, sono almeno due i frutteti sperimentali in pieno campo dove vengono coltivati in condizioni controllate dei meli cisgenici per la resistenza a ticchiolatura. Questi frutteti OGM sono situati in Olanda e Svizzera, due Paesi che oggi sono sicuramente all'avanguardia della ricerca europea e internazionale; mentre dal 2004 la ricerca italiana sui meli OGM si è praticamente interrotta per la mancanza di fondi e di prospettive future. Nel frattempo la "povera" ricerca italiana ha contribuito a identificare altri geni di resistenza a ticchiolatura, con struttura e funzionalità diverse dal primo gene clonato (*Rvi6*), che offrono nuove prospettive sia per il miglioramento tradizionale sia per quello biotecnologico. Infatti, oggi una priorità del miglioramento genetico è quella di rendere durevole nel tempo le resistenze e per fare questo si combinano diversi geni di resistenza in uno stesso individuo. Proprio attraverso la combi-

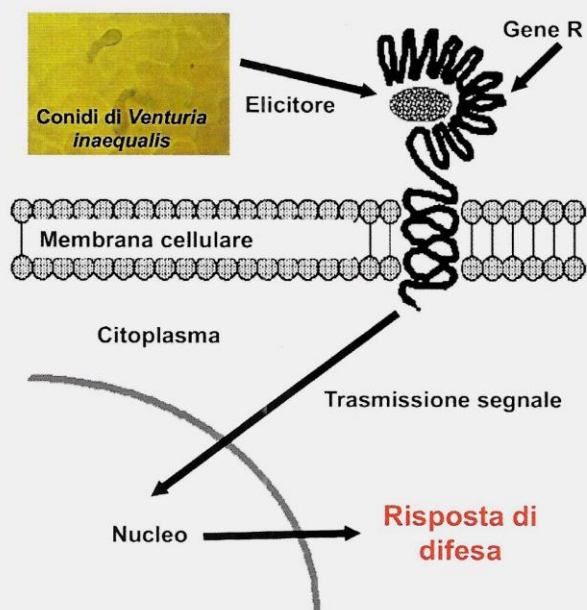


Fig. 5 – Interazione fra melo e *Venturia inaequalis*, del tipo “gene per gene”. Il fungo produce una sostanza (elicitore) che viene riconosciuto dalla proteina di riconoscimento LRR del patogeno (prodotto del gene di resistenza R); questo riconoscimento attiva la risposta di difesa della pianta.

nazione di geni di resistenza strutturalmente diversi si può evitare che una semplice mutazione nella popolazione naturale del patogeno permetta il superamento della resistenza per mancata attivazione dei meccanismi di difesa della pianta che non riconosce più il patogeno. Purtroppo i tempi per riuscire ad ottenere delle nuove mele di qualità con resistenza multipla sono estremamente lunghi e permane il problema che le nuove varietà sono diverse da quelle conosciute e apprezzate dai consumatori. Un risultato simile potrebbe essere ottenuto con l'ingegneria genetica attraverso l'inserimento simultaneo di più geni di resistenza (anche contro patogeni diversi). Questo approccio avrebbe il vantaggio del sostanziale mantenimento delle caratteristiche delle cultivar commerciali utilizzate per la trasformazione genetica.

In conclusione della lunga e strana storia delle mele resistenti alla ticchiolatura, vorrei provocare voi lettori proponendovi questa riflessione: è più ecologicamente sostenibile la coltivazione di una mela resistente o multi-resistente (non necessariamente OGM) che richiede solo

qualche intervento a stagione per il controllo delle malattie, o una coltivazione “biologica” di varietà commerciali che subiscono tanti trattamenti a base di sostanze tradizionali come il verderame? Sempre più consumatori scelgono la via “biologica” per l'idea di “naturalità” di questo metodo di produzione mentre sull'altro piatto della bilancia ci sarebbe la “diversità” delle nuove mele resistenti ottenute per incrocio, o la “innaturalità” delle mele OGM. Queste ultime sono considerate dai più come potenzialmente pericolose per l'ambiente ed i consumatori, ma come si fa a dimostrare che una mela OGM non è pericolosa se in Italia è praticamente impossibile svolgere prove in pieno campo? L'unico sito italiano in cui questi esperimenti erano consentiti è stato chiuso per decreto nel 2012 (<https://www.freshplaza.it/article/4048131/universita-della-tuscia-finisce-in-fumo-una-ricerca-pubblica-pluriennale-su-piante-arboree-geneticamente-modificate/>). Quel campo non conteneva meli OGM ma olivi, ciliegi e actinidie OGM (Cardi *et al.*, 2017) che erano frutto della ricerca pubblica italiana!

Spero di essere riuscito in queste poche pagine a dare degli spunti di riflessione su problemi complessi e in un certo qual modo controversi che solo la ricerca libera e pubblica può contribuire a risolvere (Bressanini & Mautino, 2015).

Lectures consigliate

- BELFANTI E., SILVERBERG-DILWORTH E., TARTARINI S., PATOCCHI A., BARBIERI M., ZHU J., VINATZER B.A., GIANFRANCESCHI L., GESSLER C., SANSAVINI S. (2004) – The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 886-890.
- BRESSANINI D., MAUTINO B. (2015) – *Contro natura*. Rizzoli editore.
- BUS V.G.M., RIKKERINK E., CAFFIER V., DUREL C.-E., and PLUMMER K. (2011) – Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and *Malus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49: 391-413.
- CARDI T., GENTILE A., LA MALFA S., MEZZETTI B., ROTINO G.L., SABBADINI S., TARTARINI S. (2017) – Breeding di specie ortofrutticole. In: *Biotecnologie Sostenibili. Scienza e innovazione in agricoltura per affrontare le*

sfide della sicurezza alimentare e della sostenibilità ambientale. A cura di M. Galbiati, A. Gentile, S. La Malfa, C. Tonelli, Edagricole, pp. 37-62.

- CHIZZALI C., GUSBERTI M., SCHOUTEN H.J., GESSLER C., BROGGINI G.A.L. (2016) – Cisgenic *Rvi6* scab-resistant apple lines show no differences in *Rvi6* transcription when compared with conventionally bred cultivars. *Planta* 243: 635-644.
- CRANDALL C. S. (1926) – Apple breeding at the University of Illinois. *Illinois Agr. Expt. Sta. Bull.* 275: 341-600.
- FLOR H.H. (1971) – Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.
- GESSLER C., PERTOT I. (2012) *Vf*scab resistance of *Malus*. *Trees* 26: 95-108.
- GESSLER C., PATOCCHI A., SANSAVINI S., TARTARINI S., GIANFRANCESCO L. (2006) – *Venturia inaequalis* resistance in apple. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25: 473–503.
- JÄNSCH M., PARIS R., AMOAKO-ANDOH F., KEULEMANS W., DAVEY M.W., PAGLIARANI G., TARTARINI S., PATOCCHI A. (2014) – A phenotypic, molecular and biochemical characterization of the first cisgenic scab-resistant apple variety ‘Gala’. *Plant Mol. Biol. Rep.* 32: 679-690.
- VANBLAERE T., FLACHOWSKY H., GESSLER C., BROGGINI G.A.L. (2014) – Molecular characterization of cisgenic lines of apple ‘Gala’ carrying the *Rvi6* scab resistance gene. *Plant Biotechnol. J.* 12: 2-9.

Contatto autore: stefano.tartarini@unibo.it