

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Agraria

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie



Caratterizzazione morfologica, biochimica e
molecolare di accessioni di pompia (*Citrus spp.*),
agrumi della Sardegna

Relatore: Prof. Ilaria MIGNANI

Correlatore: Prof. Daniele BASSI

Tesi di Laurea di:
Nadia LOVIGU
Matr. 565831

Anno Accademico 2006 / 2007

*A mio padre, che è sempre nel mio cuore
e a mia madre, di cui avrò sempre bisogno.*

1. Introduzione	1
1.1 Gli Agrumi	1
1.1.1 Origine e produzione	1
1.1.2 Tassonomia	2
1.1.3 Miglioramento genetico.....	5
1.1.4 Varietà della Sardegna.....	6
1.2 La pompia.....	9
1.2.1 Storia e diffusione	9
1.2.2 Caratterizzazione di pianta e frutti	13
1.2.3 Utilizzi e interessi commerciali	14
1.2.4 Insetti dannosi	16
1.3 Marcatori molecolari basati sulla tecnica di reazione a catena della polimerasi.....	17
1.3.1 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	19
1.3.2 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	19
1.3.3 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions).....	20
2. Scopo del lavoro.....	22
3. Materiali e metodi	23
3.1 Raccolta del materiale.....	23
3.2 Analisi dei campioni	24
3.2.1 Materiale vegetale e siti di campionamento	24
3.2.2 Morfologia accessioni	25
3.2.3 Morfologia foglie	26
3.2.4 Morfologia frutti	27
3.2.5 Acidità	31
3.2.6 Pectine	31
3.3 Estrazione del DNA	34
3.4 La tecnica AFLP	36

3.5 Analisi RAPD	43
3.6 Analisi SCAR	45
4. Risultati e discussione	46
4.1 Caratteristiche morfologiche	46
4.2 Pectine	50
4.3 AFLP	51
4.4 RAPD	53
4.5 SCAR	56
5. Conclusioni	58
6. Ringraziamenti	60
7. Bibliografia	62

1. Introduzione

1.1 *Gli Agrumi*

1.1.1 Origine e produzione

Con Agrumi si indica un insieme di specie, tutte appartenenti alla famiglia delle Rutacee, i cui centri di origine si possono localizzare in Medio ed Estremo Oriente: Persia, India, Cina. In questi paesi circa tre millenni fa si è sviluppata la coltura degli agrumi per scopi per lo più ornamentali o per ottenere profumi, e per molto tempo questo ne è stato l'unico impiego.

Nel X secolo grazie agli Arabi, ai Portoghesi e ai Crociati vennero introdotti nel Bacino del Mediterraneo il limone e l'arancio amaro, mentre il cedro era già conosciuto da tempo, introdotto ad opera di mercanti ebrei che vennero a contatto con questo cultivar a Babilonia, dov'era diffuso grazie alle campagne di espansione di Alessandro di Macedonia nel 330 a.c.

La coltura degli Agrumi è diventata importante economicamente a partire dai primi del 1900, quando lo sviluppo del settore dei trasporti ne ha permesso la commercializzazione, praticamente in tutto il mondo e in tutti i momenti dell'anno [Valli R.,1996].

Attualmente gli agrumi sono coltivati in tutto il mondo, in oltre 100 Paesi, dislocati in una fascia che si estende fra il 40° parallelo Nord ed il 40° parallelo Sud, in ambienti pedoclimatici assai variabili. La superficie adibita alla loro coltivazione è di oltre 3 milioni di ettari, con una produzione di circa ottocento cinquanta milioni di quintali. La produzione, oltre a soddisfare il consumo dei Paesi produttori, implica un forte movimento di esportazione in quasi tutti i mesi dell'anno, sia come prodotto fresco che come prodotto trasformato. I Paesi mediterranei maggiori produttori di agrumi sono, in ordine di importanza: Spagna, Italia, Egitto, Turchia, Marocco, Israele, Grecia, Algeria, Tunisia, Cipro, Libano, Portogallo [Davies e Albrigo, 1994].

La produzione mondiale di agrumi si è attestata, nel 2005, su un valore che si aggira intorno a 105 milioni di tonnellate, con un leggero incremento rispetto al 2000. La specie più coltivata risulta sempre l'arancio, ma con un calo rispetto al 2000. La

flessione più consistente della produzione è quella dei pompelmi che dal 2000 al 2004 hanno subito un calo del 30% circa.

L'evoluzione della superficie agrumetata è, invece, positiva. Anche in questo caso sono gli aranceti ad occupare la maggior parte della superficie investita ad agrumi, ma sono i piccoli agrumi quelli che hanno registrato un aumento maggiore della stessa. [dati Ismea].

1.1.2 Tassonomia

Diverse ipotesi sono state fatte sulle origini degli agrumi, infatti la loro tassonomia e filogenia è molto complicata, controversa e confusa, questo è dovuto soprattutto alla compatibilità sessuale tra gli agrumi e i suoi generi, all'alta frequenza delle mutazioni delle gemme, alla loro lunga storia di coltivazione e all'enorme diffusione.

Sono stati formulati numerosi sistemi di classificazione e tra questi quelli di Swingle (1943) e Tanaka (1977) sono stati largamente accettati [Swingle, 1943]. Swingle include nel genere *Citrus* solo 16 specie, mentre Tanaka 162 [Tanaka, 1977]. Più avanti Scora (1975) e Barret e Rhodes (1976) affermano che tra gli agrumi coltivati ci sono solo 3 vere specie e cioè il cedro (*C.medica*), il mandarino (*C.reticulata*) e il pummelo (*C.grandis*), mentre tutti gli altri genotipi derivano da ibridazioni tra queste specie originarie [Barret e Rhodes, 1976]. Recentemente questa teoria ha avuto conferme dai vari studi fatti con marcatori molecolari [Nicolosi *et al.*, 2000].

Riferendoci alla teoria di Swingle e Reece (1967) gli agrumi appartengono alla famiglia delle Rutaceae, sottofamiglia Aurantioideae [Swingle e Reece, 1967]. In questa sottofamiglia sono presenti sei generi, ma quelli che interessano in modo particolare le specie coltivate sono i seguenti:

- *Poncirus*: è una specie che ha origine in Cina, è di piccole dimensioni, spinescente, le foglie sono caduche, trifogliate e i fiori sono bianchi, i frutti sono piccoli e non commestibili. Il suo uso è ornamentale, ma *Poncirus trifoliata* è anche molto usato come portainnesto, infatti si possono produrre ibridi molto resistenti al freddo e alla virosi "tristezza degli agrumi" [Davies e Albrigo, 1994].

- *Fortunella*: include quattro specie che hanno origine in Cina meridionale con foglie persistenti, rami spinescenti e fiori bianchi, il frutto è una bacca rotondeggiante, edule. Per lo più è una pianta ornamentale, in Italia poco conosciuta [Davies e Albrigo, 1994].
- *Citrus*: comprende sedici specie che hanno origine in Cina, nell'arcipelago Malese e in India. Di questo genere fanno parte degli alberi o arbusti con foglie sempreverdi, intere, coriacee, ovali-ellittiche, intorno al peduncolo possono esserci delle stipole o alette che sono un carattere sistematico. I rami si presentano angolosi con spine; le radici si presentano fittonanti, il tronco è dritto, con corteccia verdastra. I fiori, molto profumati, si trovano su rami di un anno, in posizione ascellare, possono essere solitari o a grappoli, bianchi o rossicci, il calice presenta 5 sepali saldati, la corolla è formata da 5 petali liberi, gli stami possono essere da 15 a 60, l'ovario è diviso in 8-15 logge, ognuna con 4-8 ovuli. La fioritura avviene in maggio e la fruttificazione si ha in autunno.

Il frutto (vedi Figura 1) è una bacca, pluriloculare, con polpa succosa ed è chiamata esperidio, può essere più o meno globosa e a volte è provvista di un umbone.

L'esperidio è così costituito partendo dalla parte esterna:

- esocarpo o *flavedo*, che può essere giallo, arancione o rossastro, al suo interno troviamo delle cellule chiamate otricelli che contengono gli oli essenziali.
- mesocarpo o *albedo*, è bianco, membranoso, di consistenza spugnosa, contiene pectine.
- l'endocarpo è suddiviso in 8-12 logge (volgarmente detti spicchi) delimitate da sottili pareti membranose che contengono vescicole succose e i semi. I semi si presentano biancastri, ovali e contengono più embrioni, solo uno di questi embrioni deriva dalla fecondazione dell'oosfera, gli altri sono partenocarpici e derivano dalle cellule della nocella stimulate dall'embrione fecondato.

Gli agrumi hanno gemme nude che iniziano la differenziazione a fiore a novembre-dicembre. L'impollinazione negli agrumi può essere entomofila (i pronubi visitano volentieri i fiori perché sono molto profumati e ricchi di nettare e polline) ed anemofila oppure si può avere autoimpollinazione.

Negli agrumi si ha il fenomeno della partenocarpia, cioè la formazione dei frutti senza atto fecondativo e i frutti che ne derivano sono senza semi, e vengono chiamati apireni, carattere oggi molto richiesto dai consumatori.

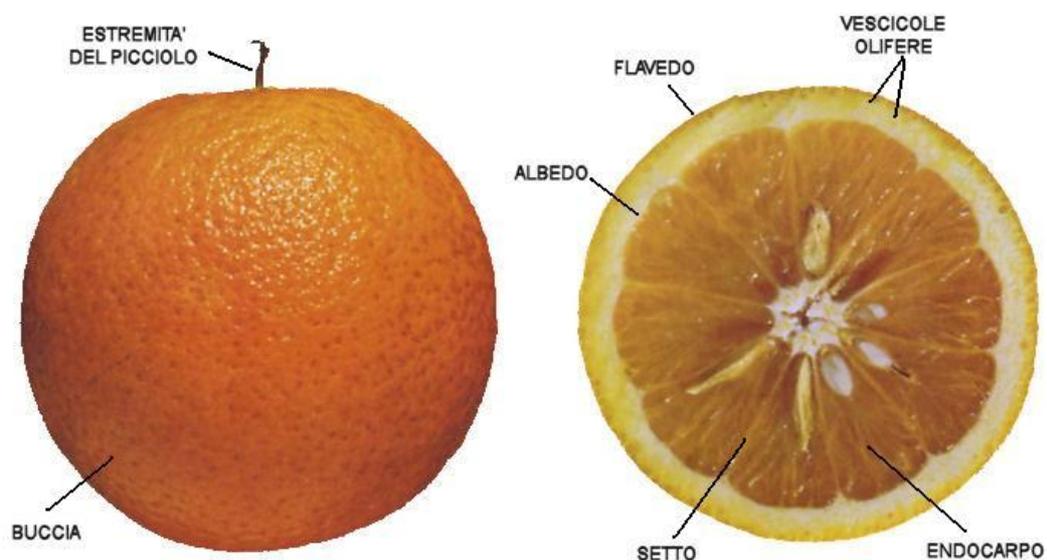


Figura 1 Anatomia di un'arancia in sezione trasversale

Altro fenomeno tipico degli agrumi è la poliembrionia: in un seme si hanno più embrioni, uno solo è prodotto dalla cellula uovo fecondata e gli altri derivano da cellule somatiche (embrioni nucellari), le piantine che si svilupperanno dagli embrioni nucellari avranno quindi costituzione genetica uguale alla pianta madre e di solito hanno caratteristiche (per esempio esenzione da virus) sfruttabili con il miglioramento genetico.

Gli agrumi sono piante tipicamente subtropicali, hanno bisogno quindi di climi caldi e inverni miti affinché le caratteristiche organolettiche siano migliori e si sviluppino anche l'acidità del frutto oltre al dolce.

Gli agrumi coltivati per lo più fanno parte del genere *Citrus*, sottogenere *Eucitrus*, la classificazione di Swingle (1967) comprende due sottogeneri e 16 specie:

- Sottogenere *Papeda*: frutti non eduli, goccioline di oli essenziali acri ed amare.
- Sottogenere *Eucitrus*: sono frutti eduli e goccioline di oli essenziali nella polpa sono rare o assenti, le specie che vi appartengono sono:
- *C. medica* (cedro)

- *C. limon* (limone)
- *C. aurantifolia* (limetta)
- *C. aurantium* (arancio amaro)
- *C. sinensis* (arancio dolce)
- *C. reticulata* Blanco (mandarino)
- *C. paradisi* (pompelmo)
- *C. grandis* (pummelo)

1.1.3 Miglioramento genetico

Individui di specie diverse di *Citrus* possono frequentemente, più che in altri gruppi botanici, incrociarsi tra loro, dando così origine ad ibridi fertili che, a loro volta, creano nuovi individui per impollinazione incrociata. In base a questa teoria quindi potremmo dire che tutte le specie tradizionali costituiscono un gruppo botanico di ibridi derivanti da 3 o 4 specie rappresentanti i veri esemplari del genere *Citrus* [D'Aquino *et al.*, 2005].

Per ottenere cultivar con caratteristiche di alta qualità, che vadano a soddisfare sia il produttore che il consumatore, si usa il miglioramento genetico, esso sfrutta diverse tecniche, quali:

- l'incrocio o ibridazione, è un metodo di miglioramento genetico tradizionale. Questo metodo prevede l'incrocio tra genitori, che non appartengono alla stessa specie, in modo da ottenere una pianta eterozigote o ibrido; a volte può esserci incompatibilità tra i genitori oppure si può ottenere un ibrido sterile, ma questo non è il caso degli agrumi. Per esempio *Citrus volkameriana*, varietà usata in questo lavoro, è stato ottenuto con l'incrocio tra arancio amaro (*C. aurantium*) e Cedro "Etrog" (*Citrus medica*) [Deng *et al.*, 1996].
- selezione clonale: si selezionano le mutazioni vegetative migliorative grazie al fatto che gli agrumi, a causa della loro eterozigosi, sono facilmente soggetti a mutazioni spontanee, le quali interessano caratteri come: vigoria ed habitus vegetativo, produttività, epoca di maturazione, caratteri del frutto quali il colore, pezzatura, succosità, numero di semi. Lo scopo è quello di eliminare

mutazioni degenerative, molto frequenti, per mantenere un buono standard varietale [Spina e Di Martino 1991].

- selezione nucellare: si fa una selezione accurata delle piante madri e degli impollinatori. Per fare una selezione sulle piantine ottenute si sfrutta il fenomeno della poliembrionia, quindi si incrocia la cultivar da cui si vuole ottenere il clone nucellare con *Poncirus trifoliata*, dai semi si avranno sia piantine con foglie con forma normale, originatesi da embrioni della nucella, sia piantine con foglie trifogliate, che deriveranno da embrioni fecondati con polline di *Poncirus*, che verranno scartate in vivaio. I nuovi cloni di origine nucellare sono di solito più vigorosi, con alti requisiti di produttività, ed esenti da virosi [Spina e Di Martino, 1991];
- coltura in vitro: con tecniche come micropropagazione e microinnesti, si stanno avendo ottimi risultati anche per il miglioramento genetico [Valli R.,1996].

L'approfondimento delle conoscenze di biologia molecolare ha dato un nuovo e rilevante impulso agli studi di genetica e di tassonomia delle piante e tra queste anche degli agrumi. In particolare, le tecniche biomolecolari di caratterizzazione genetica, basate sull'analisi del DNA, sono state impiegate ampiamente in diversi campi.

1.1.4 Varietà della Sardegna

Il germoplasma agrumicolo in Sardegna deriva per lo più da cultivar anticamente introdotti da altre aree agrumicole. Le prime tracce di cedro in Sardegna risalgono al periodo della dominazione romana, mentre, per limone e arancio, dobbiamo arrivare sino al XIV secolo [Agabbio, 1994].

Nel 1700 l'agrumicoltura in Sardegna occupa un posto importante, con il cedro che prevale su arancio e limone, ma cominciano ad essere coltivati anche questi ultimi. Già in quegli anni si affiancava al consumo fresco l'uso del cedro e del limone nella preparazione dei dolci [Agabbio, 1994]. Il mandarino risulta introdotto nell'isola a partire dalla fine del XIX secolo.

Possiamo quindi affermare che l'introduzione continua in coltura di cultivar che provengono da diverse aree agrumicole ha da un lato migliorato lo standard varietale,

ma dall'altro ha provocato una sostituzione delle vecchie varietà. Sul territorio regionale sono quindi presenti individui probabilmente cloni delle varietà più antiche, insieme a tipi appartenenti a cultivar di introduzione più recente [Agabbio,1994].

Le principali vecchie varietà diffuse in Sardegna sono:

- *arancio comune*: è una cultivar presente solo in vecchi impianti, la sua origine non è nota e viene descritto da Milella (1960) come “Aranzu Sardu”, i suoi pregi sono la maturazione tardiva e l'alto contenuto in succo [Agabbio, 1994].
- *arancio dolce a buccia sottile*: è una cultivar di cui esistono pochi esemplari, individuati nella zona di Posada (Nu), che hanno un'età di circa 60-70 anni, ha una buona resa in succo, buccia sottile, ridotto numero di semi, ma è difficilmente commerciabile [Agabbio, 1994].
- *miele*: è una cultivar di arancio scarsamente diffusa, la si ritiene utile per la selezione per la precocità di maturazione e l'assenza di semi [Agabbio, 1994].
- *ovale corda*: è una cultivar di arancio probabile clone originato in ambito locale da varietà introdotte da antica data, ha scarse qualità come la bassa resa in succo, ma interessanti caratteri sono la buona pezzatura e l'assenza semi interessanti per il miglioramento genetico [Agabbio, 1994].
- *pisu*: più che una varietà di arancio, si tratta di un insieme di biotipi che costituiscono una popolazione clonale derivante probabilmente dal più diffuso e noto “biondo comune” [Agabbio, 1994].
- *sanguinello*: è una cultivar di arancio pigmentata di origine sconosciuta;
- *tardivo di Cabras*: è una cultivar di arancio che non presenta soddisfacenti caratteristiche organolettiche e merceologiche [Agabbio, 1994].
- *tardivo di San Vito*: è una cultivar di arancio con modesta diffusione, ha però produttività elevata e si apprezza la sua tardiva maturazione, l'esiguo numero di semi e l'alta resa in succo [Agabbio, 1994].
- *vaniglia comune*: è una cultivar di arancio che ha molto spazio sul mercato, è considerata una delle più antiche varietà italiane, originatasi in Sicilia [Agabbio, 1994].
- *vaniglia rosato*: è una cultivar di arancio scarsamente diffusa, rappresenta l'unica varietà pigmentata del gruppo delle arance dolci [Agabbio, 1994].

- *dolce di Muravera*: è una varietà di limone che ha basso contenuto di acidità, è scarsamente succosa ed è di pezzatura modesta [Agabbio, 1994].
- *limone de “Santu Ghironi”*: è una varietà di limone presente in Sardegna già da antica data, citato da Manca dell’Arca (1780), è una varietà che merita attenzione per assenza di semi, alta resa in succo e grandi dimensioni del frutto [Agabbio, 1994].
- *pompia*

Di fronte a questo scenario sembra doveroso salvaguardare questo patrimonio genetico, altrimenti destinato alla scomparsa, infatti per soddisfare le esigenze di mercato c’è stato un abbandono delle vecchie varietà che costituivano un patrimonio genetico ben adattato alle condizioni ecologiche locali.

1.2 La pompia

1.2.1 Storia e diffusione

Citata già da Manca dell'Arca in un testo del 1780, troviamo tracce della produzione di pompia (vedi Figura 2) in una statistica redatta a Milis nel 1760 per ordine dell'allora Vicerè [Cherchi Paba 1974,1977].



Figura 2 Albero di pompia, sito di Torpè

Viene da molti ritenuto un cedro, è però diverso per alcuni caratteri sia dell'albero che del frutto e potrebbe essere un ibrido naturale originatosi nell'ambito della popolazione agrumicola locale. Le uniche specie che si potrebbero associare alla pompia sono alcune descritte nei quadri di Bartolomeo Bimbi (fine del XVII secolo) dove abbiamo un assortimento di tipi di cedro, o di frutti simili al cedro; oggi sappiamo che gli agrumi descritti e raffigurati erano ibridi di cedro. Molti di questi agrumi descritti, sono andati perduti, non fanno quindi parte delle moderne collezioni di germoplasma, considerate oggi essenziali per le attività di miglioramento. Negli studi filogenetici degli agrumi il cedro assume notevole importanza, in quanto viene

considerato una specie originaria o specie vera, insieme al pummelo e al mandarino [Barrett e Rhodes, 1976].

Nel 1713 Volkamer nel suo “*Hesperidium Norimbergensium*” presenta il Pomo D’Adamo e lo descrive come: “del tutto incommestibile per l’ingrato sapore dell’albedo e per l’acidità della polpa” riportandone una fedele raffigurazione che ci può far pensare alla pompia [Volkamer, 1713]. Galesio suppose che il Pomo d’Adamo fosse un ibrido tra cedro ed arancio amaro, mentre oggi si sa, grazie ai marcatori RAPD, che esso è il risultato di un ibrido di limone, pummelo, cedro [Deng *et al.*, 1996].

Abbiamo poi il Pomo D’Adamo Cedrato descritto minuziosamente da Ferrari per primo che lo raffigura come: “*alia lima citrata oblunga sive scabiosa et monstrosa*”; in seguito Volkamer citava e rappresentava un *Pomum Adami Citratum*, ma poi con Galesio (1811) si capisce che l’agrume in oggetto si può riferire più alla *Lima verrucosa monstrosa* che viene sempre descritta da Volkamer (1714).

Galesio nel 1811 si occupa accuratamente del Pomo D’Adamo Cedrato (e lo descrive come un semi-ibrido di cedro con la denominazione volgare di cedro mostruoso o cedro della Cina o cedro aranciato o meglio: “*Citrus medica cedra fructu mostruoso aurantiato, cortice crasso mucronato, medulla exigua, seminibus carente*”) [Galesio, 1811]. Il fatto che il cedro sia uno dei genitori è stato confermato dall’analisi RAPD, che ha consentito di individuare nell’arancio amaro l’altro genitore, come adombrato anche da Galesio [Deng *et al.*, 1996]. Altre simili alla pompia potrebbero essere *Lima romana* e *Aranzo Gigante Verrucoso*, raffigurati sempre da Volkamer [Volkamer 1714].

L’origine antichissima della pompia e le poche conoscenze sia sulla posizione tassonomica che sulle caratteristiche bio-agronomiche, la rendono particolarmente interessante per caratteri utili nel miglioramento genetico.

Conosciuta ed apprezzata solo da un mercato di nicchia nelle zone della Baronia, che vanno da Posada, a Siniscola, a Torpè, fino ad Orosei alcuni esemplari sono stati anche individuati a Limpiddu (Budoni). La pompia è coltivata sporadicamente negli agrumeti di queste località ed è sopravvissuta nei secoli grazie al suo uso nei dolci tipici del luogo, infatti il frutto non è commestibile perché è molto amaro.

Per svolgere questo lavoro non è stato facile riuscire ad individuare le varie accessioni, ma durante la ricerca è stata rilevata anche la presenza a Orosei (prov. Nuoro) di un vivaio florovivaistico (vedi figura 3), che riproduce per talea e vende piantine di pompia (al prezzo di circa sei euro l'una). In questi anni c'è stato un incremento delle vendite, infatti circa sei anni fa si vendevano circa 30-40 piantine all'anno, mentre nel 2007 si sono vendute circa 1000 piantine.



Figura 3 Vivaio di Orosei

Durante le visite agli agrumeti si è constatato che la pompia era quasi sempre coltivata in modo amatoriale e l'età delle accessioni è variabile. Le più antiche, per esempio, sono quelle di Torpè, che hanno circa venti anni, quelle presenti in altri siti hanno invece circa dieci anni, la maggior parte risulta innestata su *Citrus aurantium* (Arancio amaro). Le accessioni comunque presentano variabilità, infatti si presentano più o meno spinose, più o meno vigorose.

Attualmente a Siniscola (Nu) sono presenti:

un impianto di circa tre ettari con accessioni dell'età di 2-3 anni;

un impianto di circa un ettaro con accessioni che hanno 7-8 anni; è prevista anche la costruzione di una struttura in cui si avrà la trasformazione del prodotto nei dolci tipici del luogo.

Nell'ottobre del 2004 la pompia è stata presentata da Slow Food con il presidio denominato "Sa Pompia". La fondazione "Slow food per la biodiversità – Onlus" ha voluto sostenere questo progetto per diffondere la cultura della biodiversità.

In estate nel mese di Agosto, inoltre, vista la vocazione al turismo della costa nord-orientale, si svolge a Siniscola una sagra della pompia per promuovere i prodotti derivati dalla lavorazione del frutto ai turisti che passano le vacanze in zona.

1.2.2 Caratterizzazione di pianta e frutti

L'albero di pompia si presenta di dimensioni medie, con un portamento assurgente, vigoroso, con rami provvisti di spine appuntite, le foglie sono grandi ovoidali a possono presentare alette (stipole). I fiori (vedi Figura 4) sono di solito raggruppati in infiorescenze, raramente isolati, e il colore dei petali è bianco.



Figura 4 Fiori di pompia

La maturazione dei frutti avviene da novembre fino a Febbraio-Marzo. I frutti hanno forma oblata (sub-globosa) appiattita ai poli e dimensioni elevate; il frutto può raggiungere anche un peso di 600-700g. La base è appiattita, profondamente solcata con calice piccolo regolarmente diviso e peduncolo difficilmente staccabile. L'apice è piano, leggermente incavato circondato da un'areola molto evidente, la cicatrice stilare è piccola [Agabbio, 1994].

L'epicarpo vira da un colore verde al giallo, più intenso in frutti a maturità avanzata, si presenta molto rugoso con costole longitudinali e grosso spessore, comunque alcuni frutti possono anche presentarsi lisci. L'epicarpo è ricco di oli essenziali che ricordano quelli del limone, ma con una fragranza molto più delicata. L'albedo si presenta molto spesso e le logge sono di solito circa 13-14, con colore giallo chiaro, le vescicole sono grandi e tozze. La quantità di succo è scarsa, la sua acidità è alta, invece è basso il tenore zuccherino. Il numero di semi è medio.

1.2.3 Utilizzi e interessi commerciali

I principali utilizzi della pompia sono legati all'industria dolciaria e in particolare alla preparazione di due dolci tipici della zona:

“*Sa pompia intrea*”: il frutto privato della scorza (flavedo) viene svuotato (rimarrà solo l'albedo), poi viene fatto bollire in acqua e, una volta raffreddato, viene candito nel miele (a volte viene riempito all'interno con delle mandorle); la lavorazione è molto laboriosa e richiede ore (vedi Figura 5).

“*S'aranzada*”: la pompia viene anche in questo caso fatta bollire, dopodichè la scorza viene tagliata grossolanamente e fatta cuocere con miele e mandorle; anche in questo caso la lavorazione è molto lunga, alla fine si ottengono dei dolci a forma di rombi (vedi Figura 6).

Tradizionalmente questi dolci venivano prodotti in occasioni speciali, come matrimoni e battesimi, per essere donati quindi ai testimoni o ai padrini oppure venivano offerti a personalità importanti. Anche per questo motivo si sa dell'esistenza della pompia nei secoli scorsi.



Figura 5 Dolce “*Sa pompia intrea*”



Figura 6 Dolce “*S'Aranzada*”

Parlando con gli agricoltori è stato rilevato che la domanda di pompia è maggiore della sua offerta, infatti il suo utilizzo sta avendo, in questi ultimi anni, una spinta notevole grazie alla valorizzazione dei prodotti tipici e del territorio.

In questi anni c'è stato un incremento delle vendite, rilevato grazie all'attività del vivaio di Orosei. Se infatti sei anni fa si vendevano circa 30-40 piantine all'anno, nel 2007 si sono vendute circa 1000 piantine a 6 euro/cad.

Questo mercato molto ristretto rende la pompia quasi introvabile e il prezzo al kg molto alto, può arrivare anche fino a 30 euro, perché viene richiesta anche da pasticcerie della zona di Oliena, in cui non viene invece coltivata. Negli ultimi anni, inoltre, c'è stata una rivalutazione del prodotto e si stanno attualmente producendo anche dei liquori digestivi dal sapore molto strutturato, simili al limoncello ma con più carattere.

Un primo tentativo di sfruttamento di questo agrume lo ritroviamo a Siniscola (Nu) dove sono presenti un impianto di circa tre ettari con accessioni dell'età di 2-3 anni e un impianto di circa un ettaro con accessioni che hanno 7-8 anni.

La realizzazione di impianti specializzati consentirebbe di:

- dare un impulso alla coltivazione di pompia nelle aree irrigue dei comuni che risultano sottoutilizzate;
- aumentare i redditi degli agrumicoltori;
- favorire nuova occupazione nel settore agrumicolo e dell'apicoltura (considerato che nella lavorazione dei dolci è richiesta grande quantità di miele) e di quello della trasformazione dei frutti in candito;
- mettere sul mercato un prodotto tipico dalle proprietà organolettiche ineguagliabili;
- e ultimo, ma non per importanza, evitare l'estinzione di questo agrume.

1.2.4 Insetti dannosi

Grazie alla presenza sul territorio dell'ERSAT (Ente Regionale per lo Sviluppo e assistenza tecnica in Agricoltura di Siniscola), che affianca gli agricoltori locali, è stata attuata una lotta integrata negli agrumeti della zona in cui è presente la pompia.

Le prove effettuate (fonte ERSAT) hanno dimostrato che si riescono a contenere gli attacchi di insetti dannosi, tra i quali abbiamo rilevato la presenza di:

- mosca mediterranea della frutta (*Ceratitis capitata*) per la quale si è intervenuti con esche proteiche;
- acaro delle meraviglie (*Aceria sheldoni*), i fiori colpiti appaiono deformati, mentre i frutti assumono aspetto tentacolato (“meraviglie”) in conseguenza dell'abnorme sviluppo dei carpelli che crescono separati [Pollini, 2002].
- cocciniglia cotonosa solcata degli agrumi (*Pericerya purchasi*), che come conseguenza porta anche attacchi di Fumaggine (*Capnodium citri*) agente fungino che si sviluppa saprofiticamente sulla melata emessa da cocciniglie e afidi, che infestano la pianta [Pollini, 2002].

1.3 Marcatori molecolari basati sulla tecnica di reazione a catena della polimerasi

Kary Mullis nel 1985 sviluppò la tecnica di reazione a catena della polimerasi PCR (Polimerase Chain reaction) e nel 1993 ricevette il nobel per la sua scoperta.

La metodica della PCR, anche se piuttosto semplice, è stata rivoluzionaria per la ricerca biologica. La PCR è un metodo per produrre un numero estremamente grande di copie di una specifica sequenza di DNA mediante un processo chiamato amplificazione (vedi Figura 7) [Dale e Von Schantz, 2002].

Il procedimento di amplificazione può essere sintetizzato in tre punti:

1. *Denaturazione del DNA*: il DNA viene portato a 94°C, la temperatura che ne causa la denaturazione, ossia la separazione delle due eliche, in tal modo ogni singola elica può fungere da stampo;
2. *Appaiamento primer*: gli oligonucleotidi si appaiano nei siti del Dna stampo aventi sequenze complementari. Ciò avviene ad una temperatura specifica per ogni coppia di primer detta *temperatura di annealing* (T_a) che può essere calcolata secondo la formula: $T_a = (T_{m1} + T_{m2} / 2) - 5^\circ\text{C}$, dove T_{m1} T_{m2} sono le temperature di melting dei due primer calcolate secondo la formula: $T_m = 4x(n^\circ\text{C} + n^\circ\text{G}) + 2x(n^\circ\text{A} + n^\circ\text{T})$.
3. *Sintesi*: l'enzima DNA polimerasi, alla temperatura di 72°C, catalizza la sintesi di un nuovo filamentoso DNA complementare a quello di stampo partendo dagli inneschi.

L'enzima usato è la *Taq polimerasi*, che determina l'allungamento dell'innesco oligonucleotidico. Questo enzima è resistente al calore ed è estratto dal batterio *Thermos aquaticus* che vive a temperature di 75°C.

Il procedimento viene ripetuto ciclicamente in modo che i prodotti di un ciclo di amplificazione fungano da stampo per quello successivo, la quantità di DNA amplificato cresce in modo esponenziale 2^n , dove n indica il numero di cicli. Dopo 35 cicli termici, il frammento di DNA compreso tra i siti di appaiamento dei primer raggiunge un numero teorico di copie pari a 2^{35} . La procedura è rapida poiché ogni ciclo dura solo pochi minuti usando un ciclatore termico.

Vi sono molte applicazioni per la PCR, tra le quali:

- Amplificazione a scopo di clonaggio
- Amplificazione per sequenziamento genomico
- Mappatura
- Diagnosi di malattie
- Studi di evoluzione molecolare

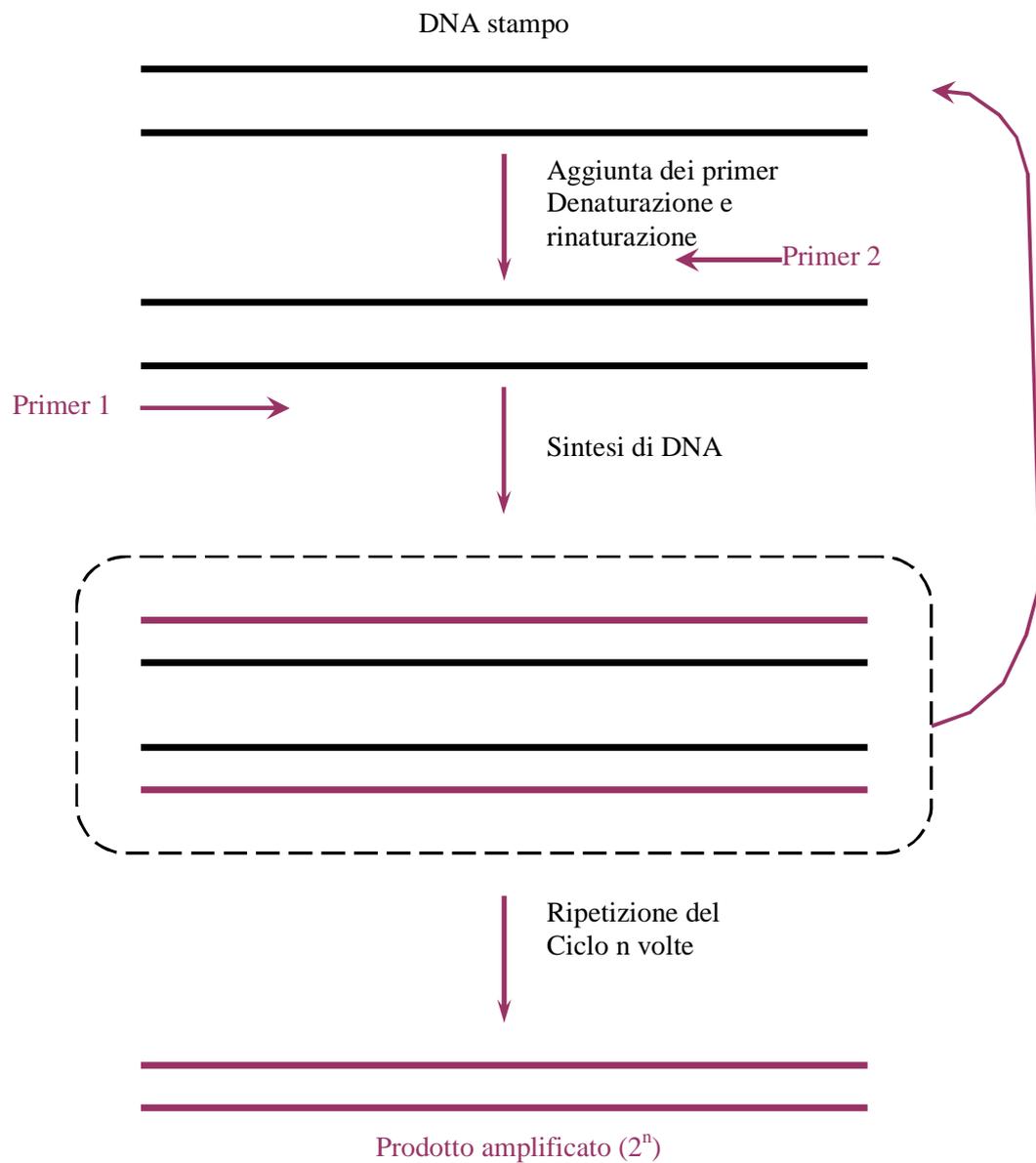


Figura 7 Reazione a catena delle DNA polimerasi

1.3.1 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Questa tecnica unisce le procedure della PCR e degli enzimi di restrizione [Vos *et al.*, 1995].

Il DNA viene digerito con due diversi enzimi di restrizione, formando frammenti di restrizione con estremità adesive, cioè a singola elica; alle estremità dei frammenti di restrizione vengono legati degli adattatori oligonucleotidici di sequenza nota, che hanno estremità complementare a quelle adesive dei frammenti.

Si procede poi con la preamplificazione utilizzando primer oligonucleotidici complementari alle sequenze degli adattatori, ma con una base selettiva in 3'. La preamplificazione permette di selezionare con una buona accuratezza un numero desiderato di frammenti da amplificare.

Si prosegue poi con l'amplificazione di questi frammenti che viene innescata con due primer complementari alle estremità dei frammenti stessi, uno dei due primer è marcato con sostanze radioattive, generalmente ^{33}P .

La separazione dei frammenti ristretti ed amplificati viene fatta su gel verticale di poliacrilammide denaturante che viene poi esposto su lastra autoradiografica, si ottengono così una serie di bande.

Confrontando i risultati di individui diversi è possibile osservare polimorfismi per la presenza o assenza di bande di un dato peso.

L'origine del polimorfismo AFLP può essere dovuto a riarrangiamento del DNA (perdita o creazione di siti di restrizione), a cambiamenti nella sequenza interna, alla lunghezza totale del frammento ristretto e amplificato.

Gli AFLP sono marcatori di tipo dominante, ad ogni locus cioè si può riscontrare la presenza o assenza della banda, ma non è possibile riconoscere per l'allele marcatore l'eterozigosi o l'omozigosi; sono marcatori "multi-locus", basati sull'analisi simultanea di molti loci genomici.

1.3.2 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Questa classe di marcatori prevede l'uso di un solo primer 10-mer, cioè un oligonucleotide decamerico con sequenza casuale, che essendo breve è in grado di trovare molti siti complementari di appaiamento.

Il numero di polimorfismi RAPD ottenibili per singolo primer varia mediamente da 6 a 12, con un massimo di 20 in funzione della complessità del genoma analizzato.

I prodotti dell'amplificazione sono separati tramite elettroforesi su gel di agarosio e colorati con colorante DNA-specifico come il bromuro di etidio; la dimensione dei frammenti dipende dalla frequenza dei siti di ibridazione dei primer [Barcaccia e Falcinelli, 2006].

I polimorfismi possono essere dovuti a mutazioni del sito di ibridazione, oppure a delezioni o inserzioni tra due siti di ibridazione.

Il limite maggiore dei RAPD è la scarsa ripetibilità della tecnica.

La tecnica RAPD ha dimostrato di possedere una grande potenzialità nell'individuare un elevato grado di polimorfismo anche tra genotipi poco distanti da un punto di vista sistematico [Deng *et al.*, 1996].

La tecnica RAPD, è stata già impiegata ampiamente e con successo negli studi tassonomici e filogenetici di diverse piante coltivate. Inoltre essa si è dimostrata valida anche nella ricerca della ascendenza tramite studi sulle progenie ottenute da incroci [Welsch *et al.*, 1991; Scott *et al.*, 1992].

Nel melo, tramite i marcatori RAPD, è stato possibile individuare il genitore maschile di una progenie della quale si conosceva solo quello femminile [Harada *et al.*, 1993].

Gli agrumi sono caratterizzati da un alto grado di eterozigosi che determina una alta frequenza negli ibridi di alleli recessivi che non possono essere individuati dal momento che i marcatori RAPD sono dominanti [Deng *et al.*, 1996].

1.3.3 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions)

Per l'analisi SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions, regioni amplificate caratterizzate dalla sequenza) è stata seguita la procedura di amplificazione descritta da Paran e Michelmore (1993). Essi hanno sviluppato questa tecnica chiamata SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), che trasforma delle bande RAPD, in sequenze target e i cui prodotti sono più affidabili della tecnica RAPD [Nicolosi *et al.*, 2000].

I passaggi per ottenere i marcatori SCAR sono i seguenti:

- una banda di interesse viene individuata in un gel RAPD o AFLP
- la banda viene tagliata dal gel
- i frammenti di DNA vengono clonati in un vettore e sequenziati
- vengono disegnati primer specifici (lunghi 16-24 bp) per quel frammento di DNA
- la riamplicazione del DNA con i nuovi primer mostrerà un nuovo e semplice pattern PCR.

I vantaggi degli SCAR sono i seguenti: producono un pattern più semplice rispetto ai RAPD o agli AFLP, sono un saggio robusto perché vengono disegnati dei primer più lunghi rispetto a quelli utilizzati per esempio nell'amplificazione degli AFLP, sono marcatori dominanti, ma possono essere convertiti in marcatori codominanti digerendoli con enzimi di restrizione e ottenendo il polimorfismo mediante elettroforesi su gel.

Come gli AFLP impiegano la PCR per ottenere i dati e richiedono piccole quantità di DNA.

I marcatori SCAR sono stati impiegati con successo nella MAS per l'identificazione del gene *Ma1* per la resistenza al root-knot nematode in *Prunus cerasifera* Ehr. e l'identificazione di genotipi fondenti (*melting flesh*) in pesco [Jun J.H. *et al.*, 2002].

2. Scopo del lavoro

Il presente lavoro ha come scopo quello di approfondire le conoscenze sulla pompia, un agrume diffuso sporadicamente nella Sardegna nord orientale, dalle origini antiche e misteriose.

L'agrume pompia riveste interesse per la sua peculiarità, per il suo utilizzo sia nella tradizionale industria dolciaria locale e come fonte di materiale per il miglioramento genetico. Infatti l'interesse alla tutela da parte della Comunità Europea per i prodotti tipici locali, ha spinto l'attenzione verso questo frutto, utilizzato in Sardegna orientale per la produzione di dolci tipici, che può dare un contributo importante all'economia locale anche in funzione della vocazione al turismo della zona. Inoltre la pompia rientra già da tempo nei programmi di valorizzazione del germoplasma frutticolo sardo, che vuole salvaguardare un patrimonio genetico destinato altrimenti alla scomparsa.

Per soddisfare le esigenze di mercato, infatti, c'è stato un abbandono delle vecchie varietà, che costituiscono un patrimonio genetico ben adattato a condizioni ecologiche locali e che vale la pena di essere ripreso e valorizzato.

In questo scenario si è indagato sulla presenza della pompia sul territorio, sull'interesse alla sua espansione da parte degli enti locali, dei vivaisti e degli agricoltori e si sono studiate le relazioni genetiche esistenti tra la pompia e i possibili genitori appartenenti al genere *Citrus*, basandosi su rilievi morfologici, biochimici e genetici effettuati su foglie e frutti oltre che utilizzando strumenti moderni, quali l'analisi del DNA, con tecniche AFLP, RAPD, SCAR.

zuccherino al rifrattometro (gradi Brix) e l'acidità per titolazione. Poiché per la produzione dei dolci tipici viene utilizzato l'albedo, su di esso è stato quantificato il contenuto di pectine.

Il prelievo delle foglie per l'estrazione del DNA è avvenuta nel marzo 2003, ed in collaborazione con il Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Milano, si è fatto uno studio sulle origini della pompia con la tecnica AFLP.

Sempre nel Marzo 2003 sono state prelevate, da ogni accessione, delle marze innestate poi su a.amaro. E' stata creata quindi una collezione, a Villasor (prov.Ca), dei campioni da analizzare, in collaborazione con il Dipartimento di Economia e Sistemi Arborei dell'Università degli Studi di Sassari. Attualmente le accessioni sono in produzione e sono presenti cloni di: Lim1, Lim2, Sin1, Sin2, Tor1, Tor2, Oro1, Oro2.

3.2 *Analisi dei campioni*

3.2.1 Materiale vegetale e siti di campionamento

I siti considerati sono cinque: Limpinu, Posada, Siniscola, Torpè, Orosei.

Le accessioni totali prese in considerazione sono nove e si trovano a:

- Limpinu: in campo erano presenti due accessioni che sono state cartellate come Lim1 e Lim2, sono piantine giovani, di circa dieci anni, innestate su a.amaro;
- Posada: è stata considerata solo un'accessione cartellata come Pos1;
- Siniscola: in campo erano presenti sei accessioni di pompia, molto vigorose e altre due accessioni meno vigorose, ma sono state prese in considerazione due accessioni, tra le più vigorose e sono state cartellate come Sin1 e Sin2, sono piante di età di circa 15 anni, provengono da Orosei e non sono innestate, ma sono state ottenute con seme, e hanno circa dieci anni d'età. Le accessioni considerate presentano delle differenze, infatti abbiamo notato che: Sin1 è decisamente meno spinescente di tutte le accessioni, comprese quelle delle altre zone, mentre Sin2 è poco spinescente, ma più di Sin1;

- Torpè: in campo erano presenti quattro accessioni di pompia, ma sono state prese in considerazione due accessioni, sono state cartellate come Tor1 e Tor2, hanno un'età di circa venti anni sono le più vecchie, innestate su a.amaro;
- Orosei: in campo sono presenti cinque accessioni di pompia, ma sono state considerate due accessioni, cartellate come Oro1 e Oro2, sono piante di età di circa 15 anni, innestate su a.amaro, sono alte circa 3,5 m;

3.2.2 Morfologia accessioni

L'accessione Lim1 ha le seguenti caratteristiche: portamento assurgente, vigore medio, dimensioni piccole (circa 2m), età dieci anni circa, spinescente, innestata su a.amaro.

L'accessione Lim2 ha le seguenti caratteristiche: portamento assurgente, vigore medio, dimensioni piccole (circa 2m), età dieci anni circa, spinescente, innestata su a.amaro.

L'accessione Pos1 ha le seguenti caratteristiche: portamento assurgente, vigore medio, dimensioni piccole, età dieci anni circa, spinescente, innestata su a.amaro.

L'accessione Sin1 ha le seguenti caratteristiche: portamento assurgente, vigore medio, dimensioni medie (circa 3,5m), età quindici anni circa, poco spinescente, propagata per seme.

L'accessione Sin2 ha le seguenti caratteristiche: portamento assurgente, vigore medio, dimensioni medie (circa 4m), età quindici anni circa, più spinescente di Sin1 ma in generale poco spinescente, propagata per seme.

L'accessione Tor1 ha le seguenti caratteristiche: portamento assurgente, vigore medio, dimensioni medie, età venti anni circa, spinescente, innestata su a.amaro.

L'accessione Tor2 ha le seguenti caratteristiche: portamento assurgente, vigore medio, dimensioni medie, età venti anni circa, spinescente, innestata su a.amaro.



Figura 8 Albero di pompia, sito Orosei

L'accessione Oro1 ha le seguenti caratteristiche: portamento assurgente, vigore medio, dimensioni medie, età circa quindici anni, spinescente, innestate su a.amaro.

L'accessione Oro2 (vedi Figura 8) ha le seguenti caratteristiche: portamento assurgente, vigore medio, dimensioni medie, età circa quindici anni, spinescente, innestate su a.amaro.

3.2.3 Morfologia foglie

Le foglie (vedi Figura 9) in tutte le accessioni considerate si presentano: larghe, semplici, di forma ovoidale, con margine intero.

In alcune accessioni abbiamo rilevato la presenza di stipole (o alette) sviluppate, a volte soltanto accennate, o del tutto assenti.



Figura 9 Foglie di pompia

3.2.4 Morfologia frutti

Usando le schede pomologiche per il germoplasma degli agrumi, sono stati catalogati, per ogni accessione, due frutti, qui di seguito riportiamo le descrizioni:

Lim1A: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso (vedi figura 10); forma frutto: oblata; peso frutto 139,57 g; diametro 7,5 cm; altezza 4,6 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 14; numero semi 21; % succo 57,84 g; gusto: 7,8 brix;

Lim1B: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso; forma frutto: oblata; peso frutto 321,36 g; diametro 11,2 cm; altezza 7,5 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 14; numero semi 33; % succo 88,19 g; gusto: 8,3 brix ;



Figura 10 Frutto di pompia, sito Limpiddu

Lim2A: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso; forma frutto: oblata; peso frutto: 221,15 g; diametro 8,7 cm; altezza 6,5 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 15; numero semi 24; % succo 93,98 g; gusto: 8,0 brix;

Lim2B: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso; forma frutto: oblata; peso frutto: 187,09 g; diametro 8,2 cm; altezza 6,5 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 14; numero semi 17; % succo 75,93 g; gusto: 8,0 brix;

Pos1A: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso; forma frutto: oblata; peso frutto: 224,52 g; diametro 8,7 cm; altezza 8,5 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 14; numero semi 25; % succo 77,98 g; gusto: 7,5 brix;

Pos1B: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso; forma frutto: oblata; peso frutto: 173,67 g; diametro 7,5 cm; altezza 6,0 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 14; numero semi 22; % succo 71,20 g; gusto: 7,7 brix;

Sin1A: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso (vedi Figura 11); forma frutto: oblata; peso frutto: 204,73 g; diametro 9,2; altezza 8,0 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 12; numero semi 13; % succo 59,74 g; gusto: 8,2 brix;



Figura 11 Frutto di pompia, sito Siniscola

Sin1B: colore buccia: giallo; endocarpo molto rugoso (vedi figura 12); forma frutto: oblata; peso frutto: 218,70 g; diametro 9,2 cm; altezza 6,2 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 13; numero semi 28; % succo 73,236 g, gusto: 7,6 brix;

Sin2A: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso; forma frutto: oblata; peso frutto: 490,0 g; diametro 13,5 cm; altezza 8,3 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 17; numero semi 33; % succo 108,16 g; gusto: 7,9 brix;

Sin2B: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso; forma frutto: oblata; peso frutto: 330,52 g; diametro 11,4 cm; altezza 10,0 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 12; numero semi 15; % succo 80,8 g; gusto: 8,0 brix ;



Figura 12 Frutto di pompia

Tor1A: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso; forma frutto: oblata; peso frutto: 339,44 g; diametro 10,6 cm; altezza 7,8 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 11; numero semi 25; % succo 88,62 g ; gusto: 7 brix;

Tor1B: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso; forma frutto: oblata; peso frutto: 390,88 g; diametro 11,0 cm; altezza 9,0 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 11; numero semi 22; % succo 109,31 g; gusto: 7;



Figura 13 Frutto di pompia, sito Torpè

Tor2A: colore buccia: giallo; endocarpo poco rugoso; forma frutto: oblata; peso frutto: 302,86 g; diametro 9,1 cm; altezza 8,5 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 12 (vedi figura 13); numero semi 26; % succo 53,43 g; gusto: 8,0 brix;

Tor2B: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso; forma frutto: oblata; peso frutto: 392,61 g; diametro 11,2 cm; altezza 8,0 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 12; numero semi 29; % succo 90,45 g; gusto: 6,4 brix;

Oro1A: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso; forma frutto: oblata; peso frutto: 321,38 g; diametro 11,0 cm; altezza 7,6 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 12; numero semi 20; % succo 84,52 g; gusto: 8,0 brix;

Oro1B: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso; forma frutto: oblata; peso frutto: 310,20 g; diametro 10,4 cm; altezza 7,4 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 17; numero semi 15; % succo 79,42 g; gusto: 8,1 brix;

Oro2A: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso; forma frutto: oblata; peso frutto: 386,18 g; diametro 10,9 cm; altezza 8,1 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 13; numero semi 23; % succo 103,46 g; gusto: 8,0 brix;

Oro2B: colore buccia: giallo; endocarpo rugoso; forma frutto: oblata; peso frutto: 305,62 g; diametro 9,8 cm; altezza 7,5 cm; base solcata; apice piano-incavato; navel assente; consistenza buccia: soffice; segmenti 14; numero semi 22; % succo 96,86 g; gusto: 7,9 brix;

Sul succo sono stati determinati contenuto zuccherino al rifrattometro (Atago) espresso in gradi Brix.

3.2.5 Acidità

L'acidità è stata determinata per titolazione con NaHO 0.1 N (Crison Compact Titrator).

3.2.6 Pectine

Estrazione della parete cellulare

(AIS = Alcohol Insoluble solids, CWM = Cell Wall Material) [Labavitch,1977]

Dai tessuti congelati collezionati nel corso della prima fase dell'esperimento vengono prelevati 2-5g di materiale.

I 2-5g vengono fatti bollire in beaker da 500 ml con 300 ml di Etanolo (95%) e 15 ml di acqua distillata.

La polpa viene aggiunta quando l'etanolo si trova già in bollitura e viene fatta così bollire per 20'.

Una volta raffreddatosi e riposto in contenitore di plastica il materiale viene omogeneizzato utilizzando l'omogeneizzatore Polytron PT 10-35 (Kinematica, Svizzera) per 2' - 3'.

Sotto pressione (vacuum) il materiale viene filtrato con filtri di modello GF/C (125mm diametro) – Glass Microfibre Filters, Whatman –

Sempre sotto pressione e sul filtro seguono una serie di lavaggi con Methanol Chlorophorm 1:1 (x3) e con Acetone (x3) fino a che il materiale non risulta completamente bianco.

Il numero di lavaggi è variabile.

Il materiale viene prelevato dal filtro e lasciato a temperatura ambiente nel corso della notte.

AIS viene pesato e riposto in contenitori di plastica.

Metodo per la determinazione del contenuto in acidi uronici nella parete cellulare [Blumenkrantz *et al.*, 1973] [Labavitch,1977].

Da ciascun campione di CWM vengono presi due duplicati di 2mg ciascuno.

Il materiale viene riposto in provette da 15ml alle quali viene aggiunto 1ml di acido solforico.

A ciascuna provetta viene aggiunto un magnete e vengono così lasciate su stirrer per 30'.

Vengono aggiunti 0.5 ml acqua distillata e lasciate su stirrer 5'.

Viene aggiunto 1 ml di acido solforico e nuovamente stirrer 30'.

Volendo avere un volume finale di 10 ml vengono aggiunti 7.5 ml di acqua distillata.

Stirrer 1h

Preparazione degli standard (GalUA)

Tre replicati per ogni concentrazione

Soluzione di acido galatturonico 200µg/ml conservata a 3°C

In modo tale da avere volumi di 200µl:

GalUA	[µg]	0	5	10	20	30	40
GalUA	[µl]	0	25	50	100	150	200
(200µg/ml)							
H20 dd	[µl]	200	175	150	100	50	0

Tabella 1 Valori per la preparazione degli standard

Preparazione dei campioni da analizzare:

Quattro replicati per ogni campione (3+1 blank che permette di sottrarre il colore prodotto dai neutral sugars che interferiscono).

Sia gli standard che i campioni vengono riposti in ghiaccio e a ciascuno viene aggiunto 1.2 ml di Borato di Sodio (12.5 mM) in acido solforico concentrato (4.767g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ per litro), vortex immediatamente e nuovamente in ghiaccio.

In acqua bollente per 5'

Nuovamente in ghiaccio

Vengono aggiunti a tutti (ad eccezione dei blank): 20 μl *meta*-Phenyl phenol (0.15% w/v) in 0.5 % (w/v) NaOH (da conservare al buio a 4°C)

Ai blank: 20 μl NaOH (0.5% w/v)

Vortex e si aspetta 10 – 20' perché il colore si sviluppi completamente

Spettrofotometro: lettura dell'assorbimento a 520 nm (sottraendo i blank)

Calcolo della concentrazione $\mu\text{g}/\text{mg}$: lo spettrofotometro dà il risultato in μg sui 200 μl dei campioni, si deve riportare tale valore ai 10 ml di soluzione iniziale (dopo digestione in H_2SO_4) e nuovamente riferirli alla massa di cwm prelevata inizialmente.

3.3 Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto, partendo da 100mg di tessuto fogliare, utilizzando il kit GenElute Plant Genomic DNA della Sigma.

Protocollo di estrazione:

1. Frammentare le foglie, precedentemente messe in azoto liquido, utilizzando un dismembrator;
2. Aggiungere 350µl di soluzione di lisi parte A e 50 µl di soluzione di lisi parte B, agitare e incubare per 10 minuti in un termostato a 65°C;
3. Aggiungere 130µl di soluzione di precipitazione alla miscela, agitare e incubare in ghiaccio per 5 minuti. Questo passaggio permette di far precipitare i grassi, le proteine e i polisaccaridi;
4. Pipettare il surnattante in una colonna di filtrazione, inserita in una provetta da 2 ml. Centrifugare alla massima velocità per 1 minuto, questo trattamento rimuove i frammenti cellulari non rimossi nel passaggio precedente. Scartare la colonna di filtrazione.
5. Aggiungere 700µl di soluzione Bind direttamente nel filtrato del passaggio 4. Miscelare invertendo la provetta;
6. Prelevare 500µl di column preparation solution e inserirlo in una nuova colonna filtrante (posta in una provetta da 2ml), centrifugare per 45 secondi a 12000 giri/minuto. Scartare il liquido;
7. Pipettare 700µl della miscela ottenuta al passaggio 5, in una colonna di bind per DNA (inserita in una provetta da 2 ml). Centrifugare alla massima velocità per 1 minuto. Scartare la parte liquida, conservare la colonna di bind e aggiungervi il restante campione. Centrifugare alla massima velocità per 1 minuto, eliminare la frazione liquida e tenere la colonna;
8. Porre la colonna bind in una nuova provetta da 2 ml, aggiungere 500µl di soluzione di lavaggio e centrifugare alla massima velocità per 1 minuto. Scartare la porzione liquida, tenere la colonna bind e aggiungervi nuovamente 500µl di soluzione di lavaggio. Centrifugare alla massima velocità per 3 minuti;

9. Trasferire la colonna di bind in una nuova provetta da 2 ml. Aggiungere 100µl di soluzione di eluzione preriscaldata a 65°C. Centrifugare alla massima velocità per 1 minuto. L'eluito può essere conservato nella stessa provetta a -20°C.

Si ottiene così una soluzione contenente il DNA di ogni campione.

La concentrazione del DNA viene determinata tramite spettrofotometro, che fornisce la misura della densità ottica (OD).

Dalla densità ottica si ricava la concentrazione di ogni campione utilizzando la formula di Lambert-Beer: $C = OD \times 50 \times \text{diluizione} \times 1/1000$, dove 50 rappresentano i ng/µl di DNA a doppio filamento se OD è uguale a 1.

3.4 La tecnica AFLP

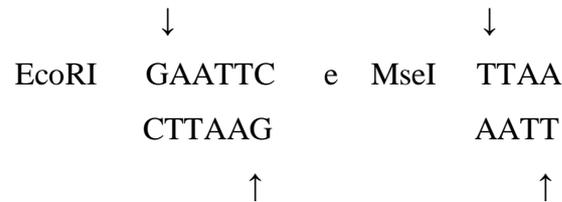
I marcatori molecolari rilevano la diversità (polimorfismi) dovuta a mutazioni di regioni di DNA omologhe in individui diversi appartenente alla stessa specie o a specie diverse. Un marcatore molecolare può essere definito come quel locus genomico rilevabile con sonde o inneschi specifici (primer) che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico ed inequivocabile il tratto cromosomico con il quale si identifica, e le regioni che lo circondano alle estremità 5' e 3' [Barcaccia e Falcinelli, 2006].

Attualmente esistono diversi tipi di marcatori molecolari, ma si differenziano tra di loro per il tipo di sequenze analizzate o per il tipo di tecnica impiegata.

I marcatori AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione amplificati) si basano sull'amplificazione selettiva mediante PCR di frammenti di DNA genomico ottenuti con specifici enzimi di restrizione.

Il procedimento prevede:

1. Digestione del DNA genomico con due differenti frammenti di restrizione: un 6-base cutter e un 4-base cutter. I relativi siti di taglio sono:



Sono digeriti 0,5 µg di DNA per ogni campione.

Si prepara una miscela di reazione contenente:

0,125 µl EcoRI (20U/µl).....2,5 unità

0,25 µl MseI (10U/ µl).....2,5 unità

2,5 µl RL buffer 10x

H₂O fino a 25 µl

Si procede incubando a 37°C per 3 ore.

2. Ligazione di adattatori oligonucleotidi ai frammenti di restrizione.

Gli adattatori sono costituiti da una sequenza core e da una sequenza enzima specifica complementare alle estremità adesive dei frammenti di restrizione. Quelli utilizzati in questo lavoro sono:

EcoRI-adapter 5'-CTCGTAGACTGCGTACC
CTGACGCATGGTTAA-5'

MseI-adapter 5'-GACGATGAGTCCTGAG
TACTCAGGACTCAT -5'

Preparazione di EcoRI-adapter (5 pmoli/μl)

4,25 μg (715pmoli) di filamento di 17 nucleotidi

3,75 μg (715pmoli) di filamento di 15 nucleotidi

H₂O fino a 143 μl

Preparazione di MseI-adapter (50 pmoli/μl)

8 μg (1430 pmoli) di filamento di 16 nucleotidi

7 μg (1430 pmoli) di filamento di 14 nucleotidi

H₂O fino a 28,6 μl

Per la ligazione si aggiungono al DNA digerito 5 μl per ogni campione di una miscela contenente:

0,5 μl EcoRI adapter (5 pmoli/μl)

0,5 μl MseI adapter (5 pmoli/μl)

0,5 μl RL-buffer 10x

0,5 μl T4 DNA ligasi (1U/μl)

0,5 μl 10 mM ATP

0,5 μl H₂O

Si incuba per 6 ore a 37°C

3. Pre-amplificazione mediante primers oligonucleotidici complementari alle sequenze nucleotidiche degli adattatori, ma con una base selettiva in 3'. I primers sono di due tipi, uno specifico per l'adattatore rare cutter e uno specifico per quello frequent cutter:

primer EcoRI +1 5'-GACTGCGTACCAATTC | A-3'

primer MseI +1 5'-GATGAGTCCTGAGTAA | C-3'

A 2,5 µl di DNA digerito e ligato, di ogni campione, viene aggiunta una miscela di reazione così composta:

0,75 µl primer EcoRI +1 (50 ng/µl= 37,5 ng)

0,75 µl primer MseI +1 (50 ng/µl= 37,5 ng)

2,5 µl dNTP 2mM

0,6 µl Taq-polimerasi (2U/µl)

2,5 µl PCR-buffer

H₂O fino a 25 µl

I campioni vengono successivamente sottoposti a cicli di temperatura variabili. A tale scopo è stato utilizzato un termociclatore impostato con il seguente programma:

92°C	60 secondi	denaturazione DNA
60°C	30 secondi	appaiamento primers
72°C	60 secondi	reazione di polimerizzazione del DNA

eseguito per 20 cicli

La preamplificazione permette di ridurre con buona accuratezza il numero di frammenti da amplificare.

Successivamente i preamplificati vengono controllati caricando un'aliquota su gel d'agarosio 1% e poi diluiti 1:20 (1 µl preamplificato, 19 µl di H₂O)

4. Amplificazione con primers aventi tre basi selettive. Un primer è specifico per l'adattatore rare cutter e un primer è specifico per il frequent cutter. Uno dei due primer è marcato in 5' con P-γATP.

Per la marcatura si prepara una miscela contenente:

1 µl ³³P-γATP

1 µl 5x buffer exange

1 µl T4-kinasi 10U/µl
1,9 µl H₂O
1 µl EcoRI +3 (50ng/µl)

Si incuba per 60 minuti a 37°C e poi per 10 minuti a 70°C.

Il risultato è un primer marcato ad una concentrazione di 12,5 ng/µl.

I primers usati per l'amplificazione selettiva +3/+3 hanno 3 basi selettive; la sequenza dei primer +3 coincide con quella dei primer +1 tranne che per le due ultime basi all'estremità 3'.

Le sequenze dei primers utilizzati in questo caso sono:

Primer EcoRI+3	5'-GACTGCGTACCAATTC ACA-3'	E35
	5'-GACTGCGTACCAATTC ACT-3'	E38
	5'-GACTGCGTACCAATTC ATC-3'	E44
Primer MseI+3	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CAG-3'	M49
	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CCC-3'	M52
	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CCG-3'	M53
	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CGT-3'	M58
	5'-GATGAGTCCTGAGTAA CTG-3'	M61

Le combinazioni di primers scelte sono:

E35- M49
E35- M61
E38- M52
E35- M52
E35- M53
E38- M58
E38- M61
E44- M61

Per l'amplificazione ad ogni campione di 2,5 µl di DNA preamplificato e diluito 1:20 viene aggiunta una mix così composta:

0,25 µl primer EcoRI+3 marcato (12,5 ng/µl)

0,3 primer MseI+3 (50 ng/µl)

1 µl dNTP 2mM ciascuno

1 µl 10xPCR-buffer

0,2 µl Taq-polimerasi (2U/µl)

H₂O fino a 7,5 µl.

Si utilizza il seguente programma di amplificazione:

1° ciclo 94°C 30 secondi (melting)

65°C 30 secondi (annealing)

72°C 60 secondi (extension)

Per gli 11 successivi cicli la temperatura di annealing viene abbassata di 0,7°C ogni ciclo.

Per gli ultimi 24 cicli il profilo è:

94°C 30 secondi (melting)

56°C 30 secondi (annealing)

72°C 60 secondi (extension)

5. Separazione dei frammenti amplificati in gel di poliacrilammide denaturante. A fine corsa ogni frammento di DNA avrà raggiunto una posizione nel gel in funzione del suo peso.
6. Essiccazione in stufa ed esposizione del gel su lastra autoradiografica. I frammenti amplificati risulteranno visibili sulle lastre grazie alla radioattività dei primers. Il polimorfismo è espresso come presenza/assenza di banda.

E' necessario individuare quelle polimorfiche al fine di costruire una matrice binaria rettangolare.

Quest'ultima avrà un numero di colonne pari al numero degli oggetti analizzati (nel nostro caso, cultivar di agrumi) e con un numero di righe pari al numero di marcatori AFLP ottenuti. La compilazione di tale matrice procede inserendo il valore 1 in caso di presenza della banda, il valore 0 in caso di assenza, il valore 9 nel caso in cui la lettura non sia chiara. L'elaborazione di questa matrice verrà

effettuata mediante software specifici per analisi della similarità e del polimorfismo.

I dati ottenuti mediante la tecnica AFLP, vengono successivamente usati per stimare i seguenti parametri:

- MR (Multiplex Ratio): il numero di loci polimorfici analizzati con una singola reazione
- La percentuale di loci polimorfici sul totale dei loci identificati con una singola reazione
- PIC (Polymorphism Information Content): l'indice del polimorfismo che stima il livello di eterozigosi individuando la probabilità che due individui scelti a caso presentino alleli diversi allo stesso locus.

I marcatori AFLP, essendo dominanti, non permettono di rilevare tutta la variabilità allelica per ogni locus, ma solo di discriminare un allele amplificato da uno non amplificato.

La formula del PIC è:

$$PIC = FAA^2 - FAN^2$$

Dove:

FAA = frequenza dell'allele amplificato

FAN = frequenza dell'allele non amplificato

Trattandosi di due soli alleli il PIC avrà valori compresi tra 0 e 0,5.

La formula per calcolare il PIC medio per m loci è:

$$\overline{PIC} = \frac{\sum_{j=1}^n 1 - FAA^2 - FAN^2}{m}$$

La matrice di similarità indica la similarità genetica di tutte le varietà tra di loro prese a coppie. Questa elaborazione è stata effettuata grazie al programma NTSYS-pc.

Per ogni coppia di varietà esistono quattro situazioni possibili:

		i	
		1	0
j	1	a	b
	0	c	d

“a” e “d” rappresentano i matches, mentre “b” e “c” gli unmatches.

Il coefficiente di similarità utilizzato è stato quello di jaccard

$$\text{JACCARD} = \frac{a}{a+b+c}$$

Il coefficiente di jaccard è definito come il numero totale di matches positivi rispetto al numero di caratteri analizzati, esclusi quelli negativi (“d”).

Un valore di similarità pari a 1 indica completa identità, mentre un valore uguale a 0 completa diversità [Barcaccia e Falcinelli, 2006].

E’ possibile rappresentare graficamente i rapporti di similarità genetica attraverso un dendogramma. Il programma usato per eseguire la cluster analysis è stato NTSYS-pc con il metodo UPGMA.

Tale metodo individua nella matrice di similarità la coppia di varietà con valore di similarità genetica più elevata. Tale coppia sarà considerata come singolo oggetto determinando una nuova matrice costituita da un elemento in meno. La stessa analisi viene ripetuta su tutte le nuove matrici fino a che non rimangano solo due oggetti.

Alla fine si ottiene un albero in cui le varietà geneticamente più vicine sono raggruppate in cluster. Sui nodi dell’asse orizzontali viene, inoltre, indicato il valore del coefficiente di similarità.

3.5 Analisi RAPD

Per l'analisi RAPD sono stati utilizzati i primer della Operon Technologies Inc. (Alameda CA). Questi sono identificati con la sigla OP seguita da una o due lettere e da un numero di due cifre, inoltre la loro lunghezza è sempre di 10-mer.

La miscela della reazione PCR è:

- Tampone PCR10x 2,5 µl
- dNTPs 100 µM ciascuno
- Primer 5 pmol
- DNA genomico 15 ng
- Taq polimerasi (Boehringer) 0,5 unità

Il volume di reazione è di 25 µl, si porta a volume con acqua millipore sterile.

Le reazioni di amplificazione sono state fatte con il termociclatore: Thermal Cycler 9600 (Cetus Perkin Elmer), che viene programmato per eseguire 45 cicli di amplificazione di:

- | | |
|-----------------|---------------------------------|
| 1 minuto a 94°C | denaturazione del DNA |
| 1 minuto a 36°C | aggancio del primer (annealing) |
| 2 minuti a 72°C | sintesi del DNA (extension) |

seguiti da un'estensione finale di 5 minuti a 72°C.

I prodotti dell'amplificazione vengono analizzati su gel di agarosio all'1,5% contenente EtBr alla concentrazione finale di 0,1 µg/ml; l'elettroforesi viene eseguita nell'apparato per elettroforesi orizzontale GNA-200 (Pharmacia), usando come tampone di corsa TAE 1x.

Ad ogni campione viene aggiunto un marcatore di migrazione (Blu di bromofenolo e xylene cianolo sciolti in glicerolo 10%) nella proporzione di 1 µl per 6 µl di campione, con una durata di 2 ore ad un voltaggio costante di 100V.

Per l'analisi RAPD sono stati usati dei primer:

H01-450 bp	}	Marcatori RAPD dominanti per il cedro
H12-400bp		
U11-1000bp		
S07-600bp		
S07-500 bp	}	Marcatori RAPD dominanti per il mandarino
A18-1100 bp		
H14-450 bp	}	Marcatore RAPD dominanti per pummelo ed arancio amaro
K10-900bp		

Sequenze dei primer:

A18 AGG TGA CCC T
U11 AGA CCC AGA G
G04 AGC GTG TCT G
H01 GGT CGG AGA A
H12 ACG CGC ATG T
H14 ACC AGG TTG G
S07 TCC GAT GCT G
K10 GTG CAA CGT G

3.6 Analisi SCAR

Per le analisi SCAR vengono usate le seguenti coppie di primer:

1. SC2A ACC AGG TTG GGA GTA TTA TA
SC2B ACC AGG TTG GCG TCT TGC CG
2. SC3A TCC GAT GCT GTT GAG TTG GCT AAT
SC3B TCC GAT GCT GCA GTT GTA GCT TCC
3. SC7A AGA CCC AGA GTG AAG ATG AG
SC7B AGA CCC AGA GAG CAC ACA AA

SC2-1500 bp }
SC3-600 bp } Marcatori dominanti per il cedro
SC7-1000 bp }

SC2-250 bp }
SC3-500 bp } Marcatori dominanti per il mandarino

SC2-450 bp } Marcatore dominanti per pummelo

Programma PCR:

- 1 ciclo 5 minuti 94°C
30 cicli 12 secondi 94°C
12 secondi 60°C (per SC2) o 65°C (per SC3) o 62°C (per SC7)
1 minuto 72°C
1 ciclo 7 minuti 72°C

4. Risultati e discussione

4.1 Caratteristiche morfologiche

Le caratteristiche delle accessioni considerate sono riportate in Tabella 2 e si può notare che in generale si presentano con un vigore medio, portamento assurgente e sono molto spinescenti.

Le accessioni considerate presentano tuttavia delle differenze, infatti è stato rilevato che: Sin1 è decisamente meno spinescente di tutte le accessioni, comprese quelle delle altre zone, mentre Sin2 è poco spinescente, ma più di Sin1. Esiste insomma variabilità.

Principali caratteristiche delle accessioni	Descrizione
Portamento	Assurgente
Dimensioni	Medie
Rami	Spinescenti
Ciclo vegetativo	Sempreverde
Tipo di foglia	Semplice
Colore foglia	Verde
Lunghezza del picciolo	Breve
Forma della foglia	Ovoidale
Margine della foglia	Intero
Presenza di alette	Variabile
Tipo di fiori	Riuniti in infiorescenze, raramente solitari
Colore dei fiori	Bianchi

Tabella 2 Caratteristiche principali della pianta di pompia

Confrontando i risultati con i possibili ascendenti della pompia, come per esempio il cedro, è stato rilevato che anch'esso è molto spinescente ed ha spine molto lunghe.

I fiori sono di solito riuniti in infiorescenze e raramente solitari, di colore bianco. Le caratteristiche delle foglie sono anch'esse riportate in Tabella 3 si presentano: larghe, semplici, di forma ovoidale, con margine intero.

In alcune accessioni è stata rilevata la presenza di alette (vedi Tabella 3). Le dimensioni delle foglie non sono diverse fra le piante della stessa zona, ma talvolta lo sono fra le zone di provenienza; in particolare le foglie delle piante di Siniscola sono più grandi delle altre, sia in larghezza che in lunghezza; solo le foglie di una pianta di Orosei ha lunghezza simile. La presenza di alette sviluppate è tipica della pianta di Posada e sporadica in una delle due piante di Siniscola, mentre più frequente è la

comparsa di un accenno di esse, con percentuali di presenza variabili da pianta a pianta.

E' evidente per esempio che l'accessione Sin1 ha le foglie più grandi, mentre l'accessione Pos1 ha alette sviluppate.

Possiamo dire che in media le foglie hanno le stesse dimensioni e per la maggior parte delle accessioni le alette non sono sviluppate, molto spesso sono comunque accennate. Confrontando con i possibili genitori si nota che né il limone né il cedro hanno questa caratteristica, è una caratteristica ad esempio, dell'arancio amaro, del pummelo e del pompelmo [Chapot, 1975].

Sito	Pianta	Lunghezza (mm)	Larghezza (mm)	Alette fogliari (%)		
				assenti	accennate	presenti
LIMPIDDU	1	81 a	43 ab	89 bc	11 ab	0 a
LIMPIDDU	2	82 ab	42 a	78 b	22 c	0 a
OROSEI	1	88 bc	46 bc	98 c	2 ab	0 a
OROSEI	2	89 c	44 ab	95 bc	5 abc	0 a
POSADA	1	86 abc	44 ab	53 a	19 bc	28 b
SINISCOLA	1	89 c	49 c	94 bc	6 abc	0 a
SINISCOLA	2	89 c	49 cd	87 bc	11 abc	2 a
TORPE'	1	86 abc	49 c	100 c	0 a	0 a
TORPE'	2	91 c	48 c	100 c	0 a	0 a

Tabella 3 Caratteristiche delle foglie delle diverse accessioni di Pompia (dati medi±SE). A lettere diverse corrispondono differenze significativamente diverse per $P<0.05$ secondo Tukey.

Le caratteristiche dei frutti sono riassunte nella Tabella 4. I frutti presentano un colore che durante la maturazione vira dal verde al giallo, hanno superficie dell'epicarpo di solito molto rugosa, solcata da costolature longitudinali.

La superficie rugosa è una delle caratteristiche che colpiscono maggiormente, può capitare di trovare, anche nella stessa accessione, dei frutti completamente lisci o quasi. La forma del frutto è oblata, con base solcata, apice piano-incavato, e navel assente, ma spesso il frutto assume un aspetto deforme che può essere causato dall'acaro delle meraviglie (*Aceria sheldoni*), infatti è stata rilevata la sua presenza.

Confrontando i risultati morfologici è stato osservato che la pompia è simile al cedro per l'alto peso del frutto, per il grosso spessore dell'albedo, e per l'aspetto bitorzolato del frutto, ma anche per la presenza di particolari oli essenziali. E' simile

al limone invece per l'acidità del succo, ma la forma della pompia ricorda più quella di un pompelmo. Il numero dei segmenti è invece medio come nel cedro (12-15) e nel limone (8-12).

Caratteristiche qualitative	Descrizione
Colore del frutto	Giallo
Forma del frutto	Oblata
Apice	Piano-Incavato
Base	Solcata
Navel	Assente
Superficie dell'epicarpo	Rugosa, a volte liscia
Consistenza mesocarpo	Soffice
Peso frutto	Elevato
Numero medio segmenti	13
Numero medio semi	22
Tenore zuccherino	Scarso
Acidità succo	Alta
Quantità succo	Scarsa
Colore del succo	Giallo chiaro
Aroma del frutto	Forte

Tabella 4 Caratteristiche qualitative dei frutti di pompia

Le caratteristiche dei frutti delle diverse accessioni di pompia sono riportate in Tabella 5 e in Tabella 6. I dati, ad esclusione del contenuto di solidi solubili totali (SST), dell'acidità titolabile e del numero di segmenti, sono caratterizzati da variabilità sia all'interno dell'accessione che fra le zone di provenienza. E' da notare che i frutti provenienti da Torpè hanno i valori che più si discostano da quelli delle altre località: maggiore dimensione e numero di semi, ma minor contenuto di SST, acidità, percentuale di succo, numero di segmenti e la forma più tondeggianti, superati in questo carattere solo dai frutti di Posada.

SITO	SST (°Brix)	Acidità(g/100ml ac. citrico)	Succo (%)	Peso frutto (g)	Ind. forma (Æ/h)	N° Semi	N° Segmenti
OROSEI	8,00±0,04	b 5,4±0,1	27,5±1,3	ab 330,8±18,7	1,37±0,03	20,0±1,7	14,0±1,0
SINISCOLA	7,93±0,12	b 5,6±0,1	27,3±2,5	ab 310,8±65,9	1,35±0,12	22,2±4,8	13,5±1,1
POSADA	7,60±0,05	ab 5,6±0,1	37,7±1,8	B 199,0±14,6	1,13±0,06	23,5±0,8	14,0±0,0
TORPE'	7,10±0,33	a 5,1±0,2	23,6±2,2	a 356,4±21,7	1,26±0,07	25,5±1,4	11,5±0,3
LIMPIDDU	8,03±0,10	b 5,5±0,2	37,9±3,5	b 217,2±38,5	1,43±0,08	23,7±3,4	14,2±0,2
MEDIA	7,74±0,11	5,4±0,1	30,5±1,6	287,3±21,1	1,31±0,04	22,9±1,3	13,4±0,4

Tabella 5 Caratteristiche dei frutti delle diverse accessioni di Pompia (dati medi±ES). A lettere diverse corrispondono differenze significativamente diverse per $P \leq 0.05$ secondo Tukey

SITO	PIANTA	FRUTTO	ACIDITA'	BRUX	PESO FRUTTO	SUCCO (g)	% SUCCO	DIAMET RO	ALTEZZ A	INDICE FORMA	# SEMI	SEGMENTI
OROSEI	1	A	5,4	8	321,38	84,52	26,3	110	76	1,45	20	12
OROSEI	1	B	5,7	8,1	310,2	79,42	25,6	104	74	1,41	15	17
OROSEI	2	A	5,3	8	386,18	103,46	26,79	109	81	1,35	23	13
OROSEI	2	B	5,1	7,9	305,62	96,86	31,69	98	75	1,31	22	14
SINISCOLA	1	A	5,8	8,2	204,73	59,74	29,18	92	80	1,15	13	12
SINISCOLA	1	B	5,8	7,6	218,7	73,23	33,48	92	62	1,48	28	13
SINISCOLA	2	A	5,6	7,9	490	108,16	22,07	135	83	1,63	33	17
SINISCOLA	2	B	5,3	8	330	80,8	24,48	114	100	1,14	15	12
POSADA	1	A	5,5	7,5	224,52	78	34,74	87	85	1,02	25	14
POSADA	1	B	5,6	7,7	173,67	71,2	41	75	60	1,25	22	14
TORPE'	1	A	5,3	7	339,44	88,62	26,11	106	78	1,36	25	11
TORPE'	1	B	5,1	7	390,88	109,31	27,97	110	90	1,22	22	11
TORPE'	2	A	5,6	8	302,86	53,43	17,64	91	85	1,07	26	12
TORPE'	2	B	4,6	6,4	392,61	90,45	23,04	112	80	1,4	29	12
LIMPIDDU	1	A	5,3	7,8	139,57	57,84	41,44	75	46	1,63	21	14
LIMPIDDU	1	B	5,9	8,3	321,36	88,19	27,44	112	75	1,49	33	14
LIMPIDDU	2	A	5,2	8	221,15	93,98	42,5	87	65	1,34	24	15
LIMPIDDU	2	B	5,6	8	187,09	75,93	40,58	82	65	1,26	17	14

Tabella 6 Caratteristiche dei frutti delle diverse accessioni di pompia

4.2 Pectine

In Tabella 7 vengono riportati i risultati relativi alle pectine analizzate, che non sono significativi a causa dell'alta variabilità fra i campioni.

pianta	ug/mg cw	
lim1	23,60647	ns
lim2	27,45969	ns
oro1	23,07466	ns
oro2	29,25099	ns
pos1	57,76604	ns
sin1	52,8757	ns
sin2	28,19853	ns
tor1	30,20547	ns
tor2	18,64774	ns

Tabella 7 Risultati dell'analisi delle pectine

4.3 AFLP

In collaborazione con il Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Milano è stata usata la tecnica AFLP per scoprire le relazioni genetiche tra pompia e 5 specie del genere *Citrus*.

Con l'utilizzo di 8 combinazioni di primer (vedi Tabella 8), sono state ottenute 157 bande di cui 89 polimorfiche, con una percentuale di polimorfismo del 56.7%. Si è poi calcolato il PIC (Polymorfism Information Content), ovvero l'indice del polimorfismo che stima il livello di eterozigosità riferendosi a uno o più loci, i cui valori variano da un minimo di 0.166 ad un massimo di 0.263 con valore medio pari a 0.218.

Combinazione di primers e ultime 3 basi	MR	Marcatori monomorfici	Marcatori		Pic medio
			Totali	% marcatori polimorfici	
E35-M49 ACA/ CAG	15	8	23	65	0,244
E35-M61 ACA/ CTG	9	18	27	33	0,183
E38-M52 ACT/ CCC	5	6	11	45	0,207
E35-M52 ACA/ CCC	10	8	18	44	0,251
E35-M53 ACA/ CCG	13	2	15	87	0,263
E38-M58 ACT/ CGT	10	6	16	63	0,246
E38-M61 ACT/ CTG	17	4	21	77	0,185
E44-M61 ATC/ CTG	10	16	26	38	0,166
TOTALE	89	68	157		
MEDIA	11,13	9	20	57	0,218

Tabella 8 Combinazioni di primer utilizzate in questo studio. Multiplex Ratio(MR), percentuale di marcatori polimorfici e valori di PIC medio.

I dati ottenuti sono stati elaborati utilizzando il programma NTSYS-pc e il metodo UPGMA. Questa elaborazione ha consentito la costruzione di un dendrogramma (vedi Figura 14) in cui si può notare:

- un gruppo principale, costituito da 7 delle 9 piante di pompia, con un valore di similarità pari a 1.
- i genomi di Torpè 1 e 2 si discostano leggermente da quelli delle altre piante di pompia analizzate, con un valore di similarità di 0,97.
- Il genoma di Limone “Zagara Bianca” risulta più simile a quello di pompia. Anche il Cedro “Etrog” presenta alta similarità genetica con la pompia. E' pertanto probabile una parentela tra Limone “Zagara Bianca” e Cedro “Etrog” e la varietà da noi esaminata.

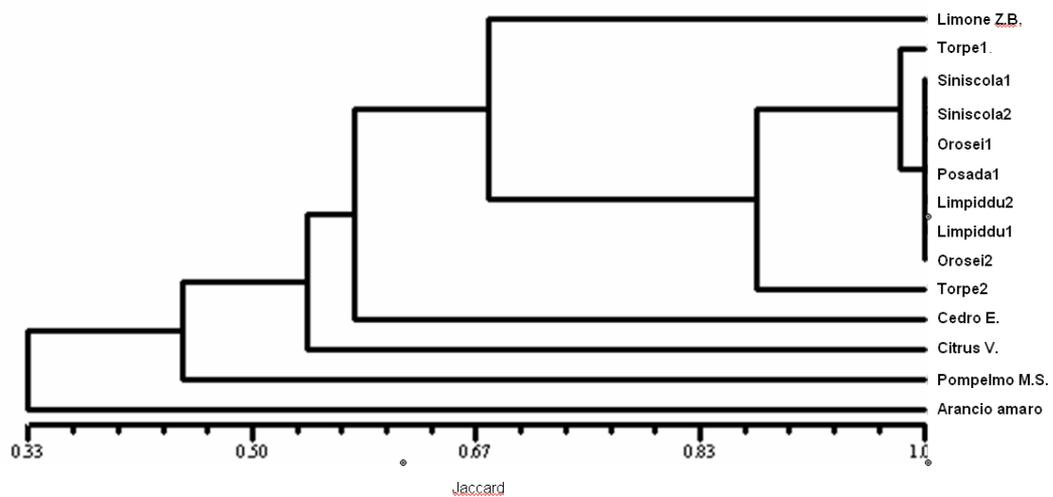


Figura 14 Dendrogramma delle varietà di agrumi considerati

4.4 RAPD

La tecnica RAPD, è stata già impiegata ampiamente e con successo negli studi tassonomici e filogenetici di diverse piante coltivate. Inoltre essa si è dimostrata valida anche nella ricerca dell'ascendenza tramite studi sulle progenie ottenute da incroci [Welsch *et al.*, 1991; Scott *et al.*, 1992].

Nel melo, tramite i marcatori RAPD, è stato possibile individuare il genitori maschile di una progenie della quale si conosceva solo quello femminile [Harada *et al.*, 1993].

Gli agrumi sono caratterizzati da un alto grado di eterozigosi che determina una alta frequenza negli ibridi di alleli recessivi, che non possono essere individuati dal momento che i marcatori RAPD sono dominanti [Deng *et al.*, 1996].

Con la tecnica RAPD sono stati analizzati 18 campioni di cui 9 sono le accessioni di pompia:

1. Cedro "Etrog" (*Citrus medica*)
2. Limone volkameriano (*Citrus volkameriana*)
3. Arancio amaro "A44" (*Citrus aurantium*)
4. Limone "Zagara Bianca" (*Citrus limon*)
5. Orosei 2 (pompia)
6. Torpè 1 (pompia)
7. Pompelmo "Marsh seedless" (*Citrus paradisi*)
8. Torpè 2 (pompia)
9. Limpiddu 1 (pompia)
10. Orosei 1 (pompia)
11. Posada 1 (pompia)
12. Siniscola 1 (pompia)
13. Siniscola 2 (pompia)
14. Limpiddu 2 (pompia)
15. Pummelo (*Citrus grandis*)
16. Mandarino "Avana" (*Citrus deliciosa*)
17. Arancio amaro (*Citrus aurantium*)

18. Limone “Femminello siracusano” (*Citrus limon*)

Con 8 primer RAPD: H01-450 bp, H12-400 bp, U11-1000 bp, S07-600 bp, S07-500 bp, A18-1100 bp, H14-450 bp, K10-900 bp.

Non tutte le amplificazioni eseguite con i primer hanno dato un amplificato, infatti per i primer H01 e H14, non sono state ottenute bande nelle specie.

Per tutti gli altri primer le specie indagate hanno mostrato un buon profilo di amplificazione con un numero medio di bande pari a 3.

Nel caso del primer H12 siamo stati in grado di evidenziare una banda 400bp presente nel cedro e in tutte le accessioni di pompia, ottenuta con il primer H12 (vedi Figura 15).

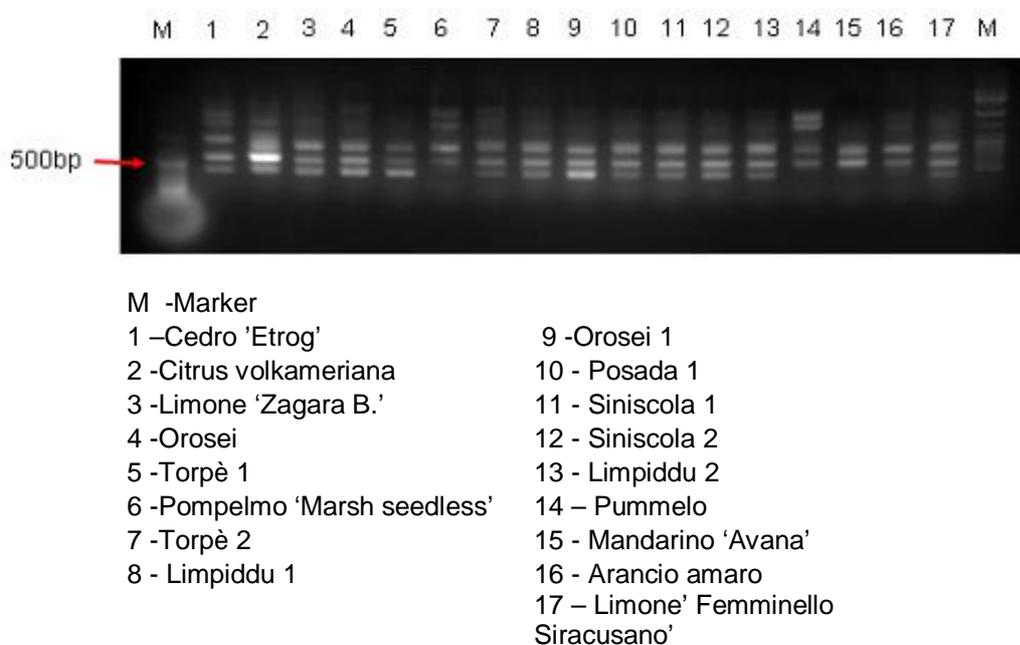


Figura 15 Foto elettroforesi su gel di RAPD

Nel caso del primer K10 siamo stati in grado di evidenziare una banda 900bp presente nel pummelo e nell'arancio amaro e in tutte le accessioni di pompia, ottenuta con il primer K10 (vedi Figura 16).

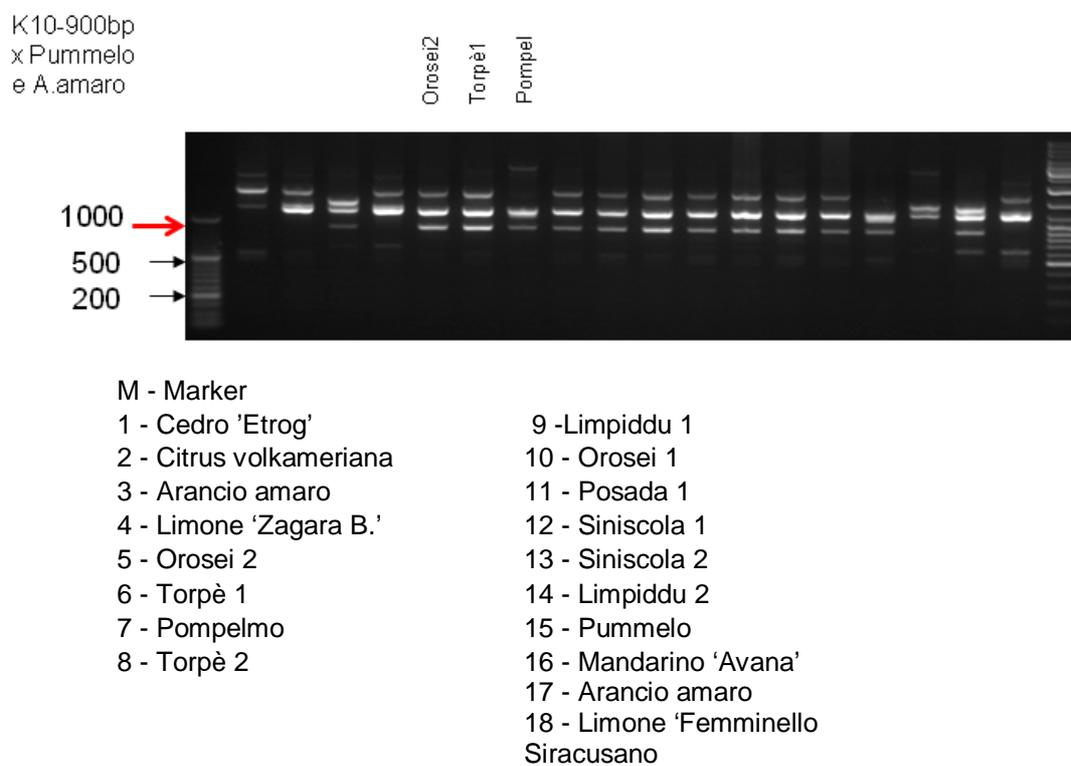


Figura 16 Foto elettroforesi su gel di RAPD

4.5 SCAR

La tecnica SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions, regioni amplificate caratterizzate dalla sequenza) trasforma delle bande RAPD, di interesse, in sequenze target che poi vengono usate per disegnare dei primer specifici (22-24 nucleotidi).

Sono stati analizzati 18 campioni di cui 9 sono le accessioni di pompia:

1. Cedro “Etrog” (*Citrus medica*)
2. Limone volkameriano (*Citrus volkameriana*)
3. Arancio amaro” A44” (*Citrus aurantium*)
4. Limone “Zagara Bianca” (*Citrus limon*)
5. Orosei 2 (pompia)
6. Torpè 1 (pompia)
7. Pompelmo “Marsh seedless” (*Citrus paradisi*)
8. Torpè 2 (pompia)
9. Limpinu 1 (pompia)
10. Orosei 1 (pompia)
11. Posada 1 (pompia)
12. Siniscola 1 (pompia)
13. Siniscola 2 (pompia)
14. Limpinu 2 (pompia)
15. Pummelo (*Citrus grandis*)
16. Mandarino “Avana” (*Citrus deliciosa*)
17. Arancio amaro (*Citrus aurantium*)
18. Limone “Femminello siracusano” (*Citrus limon*)

Sono state ottenute delle bande polimorfiche con 3 primer SCAR (SC2, SC3, SC7).

Nell’analisi SCAR tutte le accessioni utilizzate hanno dato un amplificato leggibile, evidenziando la maggior robustezza del metodo.

Con la coppia di primer SC7a ed SC7b, si è potuto evidenziare una banda di 1000 bp, che presenta un marcatore dominante sia per il cedro che in tutte le accessioni di pompia (vedi Figura 17).

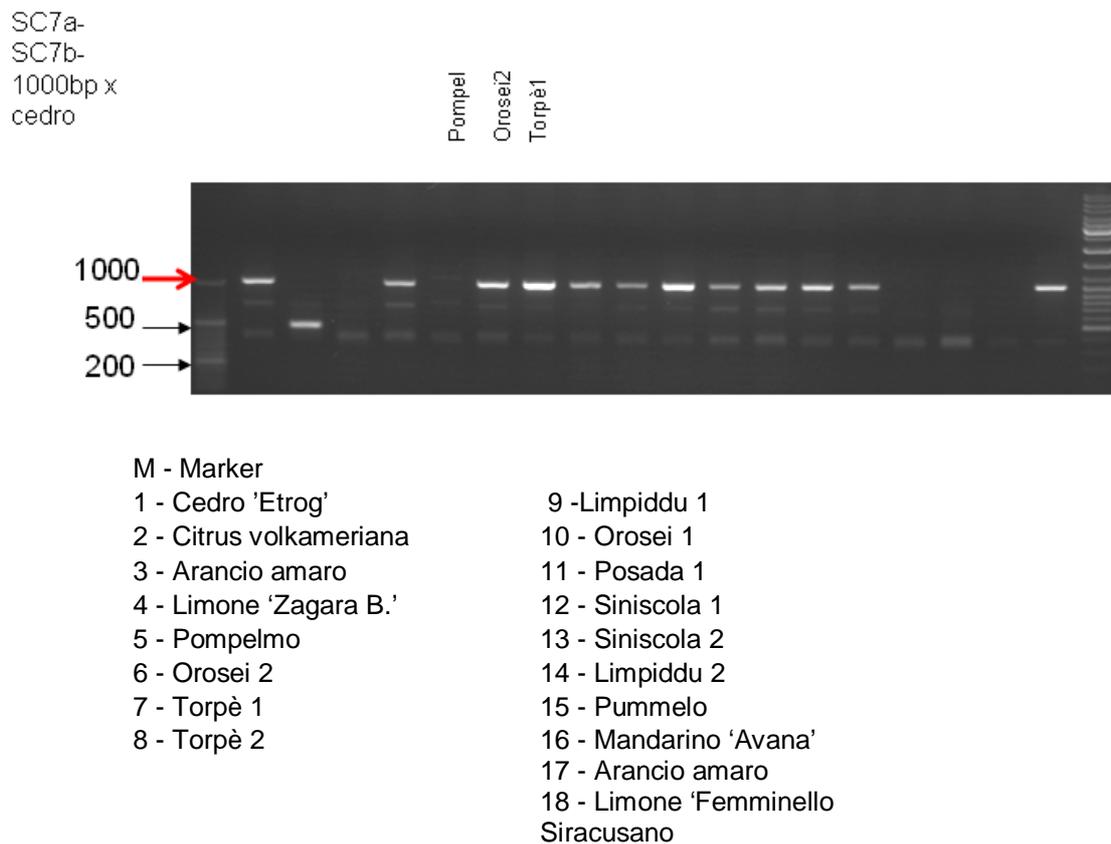


Figura 17 Foto elettroforesi su gel di SCAR

5. Conclusioni

Diverse ipotesi sono state fatte sulle origini degli agrumi, la loro tassonomia e filogenia è molto complicata, controversa e confusa, questo è dovuto soprattutto alla compatibilità sessuale tra gli agrumi e i suoi generi, all'alta frequenza delle mutazioni delle gemme, alla loro lunga storia di coltivazione e all'enorme diffusione. E' molto difficile basarsi solo sulle differenze morfologiche e in passato si è tentato di formulare classificazioni usando questo metodo.

Da questo lavoro è emerso che le accessioni di pompia considerate presentano similarità di caratteri morfologici, quali spinescenza e dimensione e colore del frutto a maturità, rispetto al cedro e al limone, sebbene la forma ricordi più quella di un pompelmo. La presenza di alette, alla base delle foglie, è significativa solo nell'accessione Posada, e questo carattere non è presente in cedro e limone, è invece una caratteristica dell'arancio amaro, del pummelo e del pompelmo.

Le analisi con tecniche AFLP, RAPD e SCAR hanno reso possibile stabilire il grado di similarità tra pompia e cinque specie appartenenti al genere *Citrus*. In particolare è stato evidenziato che il genoma di limone 'Zagara Bianca' (*Citrus limon*) e di cedro 'Etrog' (*Citrus medica*) sono più simili a quello di pompia.

E' pertanto ipotizzabile una parentela tra limone 'Zagara bianca', cedro e pompia.

Inoltre l'elaborazione delle informazioni disponibili (fenotipiche e di marcatori molecolari) ha permesso di evidenziare la stretta base genetica delle accessioni di pompia, al cui interno sette sono geneticamente identiche facendo supporre una loro origine clonale.

Il lavoro svolto è la base per ulteriori indagini volte a capire quali specie bisognerà prendere in considerazione, in un lavoro futuro, per scoprire le origini della pompia. Infatti si potranno escludere tutte le specie che non mostrano un elevato grado di similarità genetica con la specie in questione per concentrarsi all'interno delle specie più vicine quali il cedro e il limone.

In particolare si concentrerà l'attenzione sulle possibili varietà presenti all'interno delle due specie.

Una volta trovate le specie parentali, sarà interessante inserire la pompia all'interno di un albero filogenetico che potrà spiegare le reali relazioni di questa specie all'interno del genere *Citrus*.

6. Ringraziamenti

Desidero ringraziare innanzitutto la cara prof.ssa Mignani per il suo aiuto e supporto durante lo svolgimento di questo lavoro, anche nei momenti più difficili mi ha spronata a non mollare, e il prof. Bassi per la cortese collaborazione.

Il prof. Mulas del Dipartimento di Economia e Sistemi Arborei dell'Università degli Studi di Sassari per la parte svolta in Sardegna e gli utili consigli, il prof. Spada e la dott.ssa Mantegazza per il lavoro svolto nel Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Milano e il periodo passato nel loro laboratorio.

Ringrazio il personale dell'ERSAT, Franco Fronteddu e soprattutto Paolo Basoni per il suo prezioso aiuto e gli utili consigli.

Un grosso grazie, poi, ai proprietari degli agrumeti: signori Ruiu B. (Torpè), Casaleggio N. (Siniscola), Allegria D. (Limpiddu), Vardeu G. (Orosei), Bomboi P. (Posada) per la loro gentile disponibilità e il tempo dedicatomi.

Ringrazio inoltre la dott.ssa Nicolosi del Dipartimento di Orto-Floro-Arbicoltura e Tecnologie Agroalimentari dell'Università di Catania, per la costruttiva collaborazione e la gentile concessione dei DNA di arancio amaro, limone 'Femminello Siracusano', mandarino 'Avana', pummelo e per i primer da utilizzarsi sia per RAPD che SCAR.

Un grosso grazie va anche a tutti i miei compagni di università che hanno condiviso con me risate, pause caffè e anche la paura di non farcela: Roberta, Roberto, Ale, Chiara, Sara, Pighi, Manu.

Per questi ultimi anni, che forse sono stati i più duri, ringrazio con tutto il cuore Francesca e Viviana, due tesori che non pensavo di incontrare, con loro ho condiviso i momenti più difficili di questa lunga esperienza, le giornate passate sui libri per gli ultimi esami, i pianti quando le cose andavano male, ma anche le risate, tutto insomma, le cose belle e quelle meno belle, loro mi hanno aiutata a non mollare e a credere che un giorno questo momento sarebbe arrivato e che ce l'avremmo fatta tutte e tre insieme, grazie, vi voglio bene.

Non ho parole per ringraziare con tutto il cuore tutta la mia numerosissima e chiassosa famiglia, in questi anni passati a Milano mi è mancata un sacco, elencare tutti i nomi sarebbe un po' lungo, comunque grazie a tutti, vi voglio tanto bene.

Ringrazio con tutto il cuore tutti i miei nipoti: Tore, Maria, Fede, Alessio, Giorgia, Enrico, Valeria, Stefania, Sara, Francesca, Fabio, Alessandra, Giada, quando le cose andavano male pensavo a loro, ai 'perché' dei più piccoli e ai loro sorrisi che mi tenevano compagnia e mi scaldavano il cuore, anche se non erano con me fisicamente.

Dulcis in fundo... il ringraziamento più importante va ai miei genitori innanzitutto perché mi hanno dato la vita, poi perché mi hanno dato la possibilità di studiare e soprattutto per tutto quello che mi hanno insegnato e che non avrei mai potuto imparare sui libri. So che mio padre mi è sempre rimasto accanto, lo immagino sorridere, ovunque si trovi, perché non soffre più, spero sia orgoglioso di me, di quello che ho fatto e spero di averlo reso felice. Grazie di tutto mamma, grazie di esistere, mi basta sapere che ci sei e tutto va bene, il resto non conta, senza la tua forza, i tuoi consigli non ce l'avrei fatta, non potevo desiderare una mamma migliore, spero tanto di renderti felice e orgogliosa, perché io lo sono di te, ti voglio tanto bene.

Ste, tu sei l'ultimo, ma in realtà il primo da ringraziare, il primo che ha creduto in me e in questo progetto, tu mi hai accompagnata ad iscrivermi, tu mi hai aiutata con gli esami, tu mi hai sostenuta quando andavo in crisi e mi hai costretta a rialzarmi anche quando sembrava impossibile ricominciare, quando il dolore e la tristezza non mi lasciavano respirare, né dormire, quando non vedevo via d'uscita, c'eri tu vicino a me. Grazie di tutto, non ci sono parole per dirti quanto ti ringrazio e quanto è stato bello poter avere qualcuno su cui contare sempre.

7. Bibliografia

- Agabbio M. 1994. Patrimonio genetico di specie arboree da frutto 'Le vecchie varietà della Sardegna'. Carlo Delfino editore, Sassari.
- Barcaccia e Falcinelli. 2006. 'Genetica e genomica' Liguori editore, Napoli.
- Barret H.C. e Rhodes A.M. 1976. A Numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Systematic Botany* 1:105-136.
- Blumenkrantz N. e Asboe-Hansen G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*. 54: 484-489.
- Cerchi Paba 1974, 1977. Evoluzione storica dell'attività agricola, caccia e pesca in Sardegna. Regione Sarda, Assessorato Industria e Commercio, Ed Fossataro, Cagliari.
- Chapot H. 1975. Citrus. Ciba-Geigy Agrochemicals, pp 6-13.
- Dale J.W. e Von Schantz M. 2002. Dai geni ai genomi. *Principi e applicazioni della tecnologia del DNA ricombinante*. EdiSES. Napoli.
- D'Aquino S., Fronteddu F., Usai M. e Palma A. 2005. Qualitative and physiological properties of 'Pompia', a citron-like fruit. *Plant Genetic Resources Newsletter* 143: 40-45.
- Davies F. S. e Albrigo L.G. 1994. Citrus. "Crop Production Science in Horticulture". Ed. CAB International, UK.
- Deng Z.N., Gentile A., Nicolosi E., Continella G. e Tribulato E. 1996. Parentage determination of some citrus hybrids by molecular markers. *Proc. Int. Soc. Citreul.* 2: 849-854.
- El Rayah A. e Labavitch J.M. 1977. A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *Journal of Food Biochemistry*. 1: 361-365.
- Gallesio G. 1811. *Traité du Citrus*. Libr. L. Fantin, Paris.
- Harada T., Matsukawa K., Sato T., Ishikawa R., Niikezi M. e Saito K. 1993. DNA RAPDs detect genetic variation and paternity in *Malus*. *Euphitica*. 65: 87-91.

- Jun J.H., Chung K.H., Jeong S.B. e Lee H.J. 2002. Development of RAPD and SCAR markers linked to flesh adhesion gene in peach. XXVI International Horticultural Congress. Toronto, Canada, p 335.
- Nicolosi E., Deng Z.N., Gentile A., La Malfa S., Continella G. e Tribulato E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers Theor. Appl. Genet. 100: 1155-1166.
- Pollini A. 2002. 'La difesa delle piante da frutto'. Ed agricole Bologna.
- Scott M.P., Haymes K.M. e Williams S.M. 1992. Parentage analysis using RAPD PCR. Nucleic Acids Research, 20 (20): 5493.
- Spina P. e Di Martino E. 1991. 'Gli Agrumi'. Edagricole, Bologna.
- Swingle W.T. 1948. Botany of *Citrus* and its wild relatives in the orange subfamily. In: Webber H.J. e Batchelor L.D. (eds), *The citrus industry*. University of California Press, California, pp 128-474.
- Swingle W.T. e Reece P.C 1967. The botany of citrus and its wild relatives. In: Reuther W., Batchelor L.D. e Webber H.J. (eds), *The citrus industry*. University of California Press, California, pp 190-340.
- Tanaka T. 1977. Fundamental discussion of *Citrus* classification. Stud. Citrol. 14: 1-6.
- Valli R. 1996. Arboricoltura generale e speciale. Edagricole, Bologna.
- Volkamer J.C. 1708-1714. Nurnbergische Hesperides, oder grundeliche Beschreibung der Edlen Citronat, Citronen, und Pomerantzen-Fruchtche. Bei Johnn Andrea End –ters feel. Sonn und Erben, 2 vol., Nurnberg.
- Volkamer J.C. 1713. Hesperidium Norimbergensium sive de malorum citreorum, limonum aurantiorum que cultura et usu libri quatuor... Apud Io. Andr. Endteri p.m. filium et heredes, Norimbergae.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van De lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. e Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprint. Nucleic acids Research, (23) 21: 4407-4414.
- Welsch J., Honeycutt R.J., McClelland M. e Sobral B.W.S. 1991. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). Theor. Appl. Genet. 82: 473-476.