



A.D. MDLXII

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI
Dipartimento di Agraria

Caratterizzazione di *Citrus monstruosa* mediante analisi filogenetica

Relatore:

Prof. Grazia Maria Scarpa

Correlatori:

Dott. Emma Rapposelli

Prof. Maria Stella Zedde

Tesi di Laurea di:

Grazia Viglietti

Anno accademico 2011/2012

Alla mia famiglia

Indice

1. Introduzione	4
1.1 Gli agrumi: origine e diffusione	4
1.2 Tassonomia degli agrumi	5
1.3 Caratteristiche fenotipiche dei <i>Citrus</i>	8
1.4 La genomica del <i>Citrus</i>	13
1.5. Comparto varietale agrumicolo della Sardegna	18
1.6. La Pompia	20
1.6.1 Cenni storici.....	20
1.6.2 Morfologia della pianta e del frutto	21
1.6.3 Principali avversità	22
1.6.4 Diffusione della Pompia nel comprensorio della Baronia.....	22
1.6.5 L'RNA ribosomiale nelle piante.....	25
2. Obiettivi del lavoro	27
3. Materiali e metodi	28
3.1 Materiale vegetale	28
3.2 Amplificazione del DNA mediante PCR.	28
3.3 Analisi delle sequenze	31
4. Risultati	34
5. Conclusioni	42
6. Ringraziamenti	43
7. Bibliografia	44

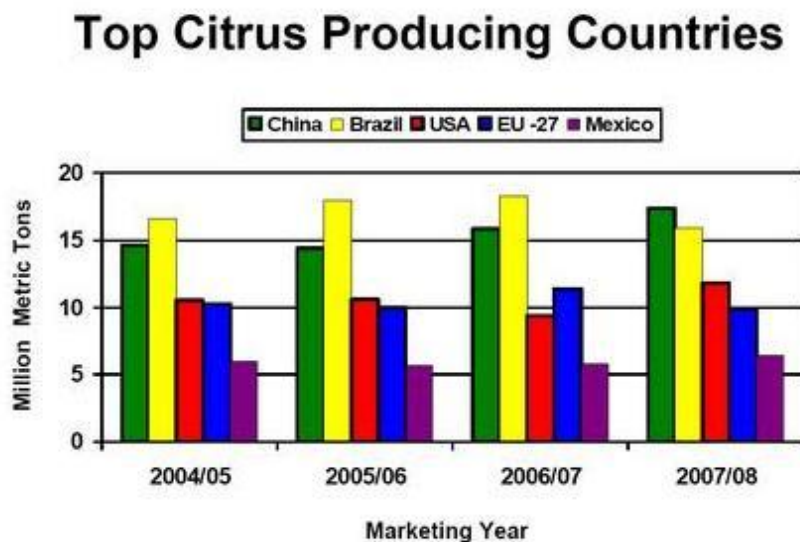
1. Introduzione

1.1 Gli agrumi: origine e diffusione

Col termine “agrumi” si comprendono tutte le specie appartenenti alla famiglia delle *Rutaceae*, originarie del Medio ed Estremo Oriente e, più precisamente, della Persia, dell’India e della Cina. Inizialmente la coltura degli agrumi aveva scopi prettamente ornamentali o legati all’ottenimento di profumi. La sua importanza a livello economico crebbe a partire dai primi anni del ‘900, quando lo sviluppo del settore dei trasporti permise la commercializzazione dei frutti in tutto il mondo e in tutti i momenti dell’anno (Valli, 1996).

Attualmente gli agrumi sono coltivati in tutto il mondo, in oltre 100 Paesi, in ambienti pedoclimatici assai variabili su una superficie di oltre 3 milioni di ettari e la loro produzione si è attestata intorno ai 51,1 milioni di tonnellate a luglio 2012, un dato in calo rispetto al biennio precedente a causa del calo della produzione del Brasile, Messico ed Unione Europea, mediamente del 12% in meno (USDA, Dipartimento dell’Agricoltura degli Stati Uniti, 2012).

Gli agrumi vengono commercializzati ed esportati non solo come prodotto fresco, ma anche come prodotto trasformato.



Source: U.S. Agricultural Attaché Reports; NASS for U.S. Production

I Paesi maggiori produttori di agrumi nel Bacino del Mediterraneo sono in ordine di importanza: Spagna, Italia, Egitto, Turchia, Marocco, Israele, Grecia, Algeria, Tunisia, Cipro, Libano, Portogallo. La produzione agrumicola italiana si è attestata nel 2005 intorno ai 3,81 milioni di tonnellate ricavate da 1682 mila ettari. Dal confronto con gli ultimi anni emerge che, a fronte di una sostanziale stazionarietà degli investimenti, i volumi prodotti sono cresciuti. La maggior parte della produzione è concentrata in Calabria e Sicilia e negli ultimi anni è calata la produzione degli agrumi più noti, come le arance, a fronte di un aumento della produzione di agrumi minori.

1.2 Tassonomia degli agrumi

Diverse sono le ipotesi sulle origini e la classificazione degli agrumi: la loro tassonomia e filogenesi è molto complicata e controversa e questo a causa delle loro caratteristiche legate alla compatibilità sessuale intergenerica, all'alta frequenza delle mutazioni delle gemme e alla lunga storia di coltivazione e diffusione (Nicolosi *et al.*, 2000).

Esistono vari sistemi di classificazione, ma quelli più largamente accettati sono quelli di Swingle (1943) e Tanaka (1977). Il primo include nel genere *Citrus* 16 specie divise in 2 sottogeneri: *Ericitrus* e *Papeda*, mentre il secondo ne include 162 in una minuziosa suddivisione in sottogeneri, sezioni e sottosezioni. Di queste, 55 si riferiscono ad agrumi di interesse economico, 20 sono estinti e 19 sono di scarsa precisazione (Vacante e Calabrese, 2009). Scora nel 1975 e Barret e Rhodes nel 1976 affermano che tra gli agrumi coltivati esistono solo 3 specie vere ovvero il cedro (*C. medica* L.), il mandarino (*C. reticulata* Blanco) e il pomelo (*C. grandis* (L.) Osb.). Nel 1988 Scora ha aggiunto un'altra vera specie: *C. halimii* Stone. Scora *et al* (1976) la classificarono come cedro, ma sulla base delle analisi morfologiche e fitochimiche si presupponeva fosse un ibrido tra un cedro e il kumquat. Questa varietà mostrava un miscuglio tra il kumquat e il gruppo del cedro con la maggior parte del patrimonio genetico derivato dal kumquat. Dal momento che *C. halimii* non ha alleli unici, ciò suggerisce che esso può non essere una specie valida, ma un ibrido selvatico (Barkley *et al*, 2006).

L'ibridazione naturale o artificiale, ha probabilmente giocato un ruolo importante nello sviluppo di molte, o della maggior parte delle specie di *Citrus*. Scora (1975) e Barrett e Rhodes (1976) sostengono che ci siano solo 3 specie di *Citrus* all'interno del sottogenere *Citrus*: *C. medica*, *C. reticulata* e *C. maxima*. Essi consideravano che tutte le altre specie del sottogenere *Citrus* potessero essere derivate dall'ibridazione tra queste 3 specie o tra questi e le specie del sottogenere *Papeda* o dei generi strettamente correlati. Blondel (1978) ha suggerito che anche all'interno di *C. medica*, le cultivar Ethrog e Mano di Buddha potessero avere avuto origine da ibridazione con altre specie del genere *Citrus* (Federici *et al.*, 1998).

La classificazione sulla base dei criteri morfologici venne confermata nel 2000 in seguito a studi effettuati con marcatori molecolari. Gli altri genotipi derivano da ibridazione tra queste tre specie vere (Nicolosi *et al.*, 2000).

Secondo Swingle e Reece (1967) gli agrumi appartengono alla famiglia delle *Rutaceae*, sottofamiglia *Aurantioideae* con all'interno sei generi tra cui i più importanti per le specie coltivate sono:

- *Poncirus*: genere originario della Cina; piante di piccole dimensioni, spinescenti, con foglie caduche, trifogliate e fiori bianchi, i frutti sono piccoli e non commestibili. È utilizzata prevalentemente come specie ornamentale o nel caso del *Poncirus trifoliata*, come innesto per produrre ibridi resistenti al freddo e alla “tristeza degli agrumi”; (Davies e Albrigo, 1994)
- *Fortunella*: genere anch'esso originario della Cina, include quattro specie con foglie persistenti, spinescenti, fiori bianchi e frutto tondeggianti, edule. Pianta poco conosciuta in Italia anch'essa utilizzata prevalentemente per scopi ornamentali; (Davies e Albrigo, 1994)
- *Citrus*: appartengono a questo genere 16 specie originarie della Cina, dell'arcipelago Malese e dell'India. Di questo genere fanno parte alberi o arbusti con foglie sempreverdi, coriacee, ovali-ellittiche, con eventuali stipole, importanti ai fini della sistematica.

Gli agrumi coltivati a livello mondiale appartengono per lo più al genere *Citrus*, sottogenere *Eucitrus*; la classificazione di Swingle (1967) comprende due sottogeneri e 16 specie:

- Sottogenere *Papeda*: frutti non eduli con goccioline di oli essenziali acri ed amare
- Sottogenere *Eucitrus*: frutti eduli con goccioline di oli essenziali nella polpa rari o assenti, le specie che vi appartengono sono:
 - *C. medica* L.(cedro)
 - *C. limon* (L.) Burm. f (limone)
 - *C. aurantifolia* (Christm.) Swin. (limetta)
 - *C. aurantium* L. (arancio amaro)
 - *C. sinensis* (L.) Osbeck (arancio dolce)
 - *C. reticulata* Blanco (mandarino)
 - *C. paradisi* Macf. (pompelmo)
 - *C. grandis* (L.) Osbeck (pomelo)

Molti sono stati, nel corso dei secoli, i casi di impollinazione incrociata che hanno dato vita a ibridi fertili con caratteristiche nuove ed esclusive. In base a quanto detto si può affermare, quindi, che tutte le specie tradizionali costituiscono un gruppo botanico di ibridi derivanti tutti da 3 o 4 specie rappresentanti i veri e più antichi esemplari del genere *Citrus* (D'Aquino *et al.*, 2005).

Grazie ad analisi effettuate mediante marcatori RAPD, SCAR e cpDNA si è dimostrato che le ipotesi fatte da Barrett e Rhodes (1976), circa la presenza di sole tre specie vere sono esatte, ed infatti, cedro, pomelo e mandarino possono essere collocate in tre gruppi distinti e le altre specie fatte risalire come origine ad incroci o mutazioni delle tre originarie.

L'origine degli agrumi ha interessato tantissimi ricercatori che hanno formulato diverse ipotesi utilizzando una grande varietà di metodi. Per arancio dolce e pompelmo è stato raggiunto tra i vari ricercatori pieno accordo sul fatto che essi siano ibridi originati dall'incrocio tra pomelo e mandarino. Le ipotesi sull'origine del limone sono invece contrastanti: in base alle caratteristiche morfologiche Swingle (1943) e Malik e collaboratori (1974) hanno ritenuto fosse un ibrido di

cedro e lime. Barret e Rhodes (1976) hanno suggerito che il limone fosse in triibrido di cedro, pomelo e una specie appartenente al genere *Microcitrus*, alcuni invece sostengono che il limone può essere un ibrido tra cedro e arancio amaro. Per ciò che riguarda l'origine della limetta messicana essa era considerata da Barrett e Rhodes un triibrido. Torres e collaboratori (1978) ipotizzarono che il lime potesse essere un ibrido tra cedro e un Papeda. Per ciò che riguarda il lime dolce della Palestina potrebbe essere un ibrido di lime messicano e un limone dolce o un cedro dolce. Barrett e Rhodes (1976) ritengono che questo lime, probabilmente, sia nato da un incrocio di limetta messicana ed arancio dolce (Nicolosi *et al.*, 2000). Il Clementine si suppose fosse un ibrido tra mandarino e arancio dolce (Deng *et al.*, 1996) ed è stata dimostrata l'attendibilità di questa ipotesi. Il cedro, specie vera, ha partecipato all'origine della specie di molti agrumi rappresentando sempre la specie impollinante. Ne sono esempi il limone Rugoso e il limone Volkamer, ibridi di cedro e mandarino (Nicolosi *et al.*, 2000).

L'uso di marcatori molecolari ha dato un notevole contributo alla creazione di alberi filogenetici che potessero chiarire gli intricati rapporti tassonomici tra le varie specie di agrumi, notevoli studi devono essere ancora fatti in questo senso per avere un quadro chiaro e univoco sulla tassonomia degli agrumi.

1.3 Caratteristiche fenotipiche dei *Citrus*

Lo studio dell'anatomia e della morfologia del genere *Citrus* è molto importante non solo per una corretta conoscenza delle tecniche di coltivazione delle piante, ma anche perché i metodi di classificazione erano basati, almeno fino a poco tempo fa, essenzialmente sulle caratteristiche fenotipiche degli stessi.

L'albero degli agrumi presenta un *fusto* ramificato, generalmente in 3-4 branche principali; a partire da esse i rami, angolosi e spinescenti, che si sviluppano costituiscono il cosiddetto globo, la cui densità e il ritmo di crescita variano da specie a specie. La vegetazione è più fitta nell'arancio, nel clementine e nel pompelmo, meno nel limone e nel mandarino Satsuma (Vacante e Calabrese, 2009).

La pianta presenta gemme ascellari ricoperte da squame e gemme apicali, poste all'estremità dei rami, che constano di un meristema circondato da vari primordi fogliari. In generale, insieme ad una gemma principale, più sviluppata, vi sono varie gemme secondarie all'ascella delle foglie. Il complesso prende il nome di nodo, si completa con una spina che è situata in posizione opposta rispetto alle bratteole che ricoprono la gemma. I germogli crescono per azione di un meristema apicale e i primordi fogliari compaiono quando lo stesso inizia a progredire. Essi si sviluppano a spirale intorno all'asse del germoglio, con una fillotassi di $3/8$, eccetto in *C. grandis* e *C. paradisi* in cui è di $2/5$; con il tempo si differenziano il lembo e il picciolo dando luogo alle foglie vere e proprie. Esse posseggono nervature reticolari. In molte specie i piccioli sono alati. Nell'arancio amaro, pompelmo e pomelo le ali sono molto prominenti, nell'arancio dolce e nei mandarini sono piccole, mentre nel limone e nel mandarino Satsuma sono appena visibili (Vacante e Calabrese, 2009). Il lembo è ovale e oblungho, di color verde scuro nell'asse e verde chiaro nella pagina inferiore. La sua durata è di due periodi vegetativi.

La *radice* è fittonante, solida e bianca. In condizioni di coltivazione, normalmente, si taglia al momento del trapianto per facilitare lo sviluppo di un'adeguata radice fascicolata. Dalla principale si dipartono, dunque, una serie di radici secondarie di due tipi: alcune sottili, altre fibrose e altre lunghe e consistenti. Le successive ramificazioni formano, insieme con la radice primaria, lo scheletro del sistema radicale (Vacante e Calabrese, 2009).

Negli agrumi, ad eccezione del limone, dopo il riposo invernale o dopo un periodo di siccità, inizia la formazione dei fiori a partire dalle gemme ascellari delle foglie. La differenziazione a fiore ha inizio nello stesso momento nel quale inizia il germogliamento, in modo che le gemme, diano luogo a germogli vegetativi, mentre in alcuni casi il meristema apicale si trasforma in un fiore terminale. In alcuni casi le gemme vegetative possono, a loro volta, germogliare. Quando ciò accade queste gemme germogliano sempre dopo la gemma terminale e producono solamente fiori. La presenza o assenza di foglie, in combinazione con la presenza o assenza di fiori, dà luogo a vari tipi di germoglio. Il germogliamento primaverile è quello che dà origine a molti fiori. Nei Paesi mediterranei si

producono almeno altri due germogliamenti: uno in estate e l'altro in autunno. Differiscono da quello primaverile non solo per l'assenza o la scarsa presenza di fiori, ma anche per la maggior dimensione delle foglie, la maggior lunghezza dei germogli e il loro numero ridotto.

I fiori, molto profumati, si trovano su rami di un anno, possono trovarsi solitari o in racemi. Si formano, inizialmente, i sepalì che sono di colore verde e alla base si uniscono a formare un calice denso. Più tardi si forma la corolla concentrica rispetto al calice e interna rispetto all'asse florale. È formata da 5 petali, bianchi o rosati e leggermente sovrapposti. Gli stami degli agrumi presentano antere gialle o bianche e filamenti bianchi, che si trovano saldati alla base e il loro numero per fiore oscilla tra 20 e 40, a seconda della specie. Infine, nella parte interna del verticillo degli stami, si forma il pistillo, con un ovario formato da un verticillo di 10 carpelli, uno stilo e uno stigma. Esso è diviso in 8-15 logge con 4-8 ovuli ciascuna. Tra i carpelli e gli stami vi è un disco, che produce nettare, sul quale si appoggia l'ovario (Vacante e Calabrese, 2009).

La fioritura si ha in maggio e la fruttificazione si ha in autunno. Le gemme nude iniziano la differenziazione a fiore a novembre-dicembre e l'impollinazione può essere sia entomofila che anemofila, oppure si può avere anche autoimpollinazione.

Il frutto è una bacca pluriloculare, con polpa succosa ed è chiamata esperidio. Deriva dalla crescita dell'ovario ed è formato da dieci unità carpellari, approssimativamente unite intorno all'asse centrale, formando così spicchi al cui interno si formano i semi e le vescicole di succo. Il pericarpo si divide in tre parti:

- esocarpo o *flavedo* è la parte più esterna, che può essere giallo, arancione o rossastro; è formato da una epidermide coperta da una cuticola unita a varie cellule a formare un parenchima compatto. Sotto l'epidermide si trovano gli otricelli, cellule contenenti gli oli essenziali
- mesocarpo o *albedo*, bianco, membranoso e di consistenza spugnosa;
- endocarpo o *polpa*, è la parte più interna del pericarpo. È suddiviso in 8-12 logge delimitate da sottili pareti membranose ospitanti vescicole succose e i semi. Questi si presentano biancastri, ovali e contengono più embrioni di cui

solo uno deriva da un processo di fecondazione sessuata, gli altri vengono prodotti per partenogenesi.

Le differenze maggiori fra le specie e le cultivar sono nei frutti, che sono molto grossi, (pomelo e cedro) o molto piccoli (in alcune limette), nella buccia che è molto rugosa e spessa nell'arancio amaro, liscia e sottile nell'arancio dolce e che è soffice e distaccabile dagli spicchi nei mandarini (Clementine, tangelo, ecc.) (Spina e Di Martino, 1991).



Molto frequente negli agrumi è il fenomeno della partenocarpia, cioè la formazione dei frutti senza che sia avvenuta la fecondazione; i frutti che ne derivano sono apireni, carattere oggi molto richiesto dai consumatori. La sterilità gametica e l'incompatibilità contribuiscono notevolmente alla formazione di frutti senza semi e sono regolati da fattori genetici, come il contenuto endogeno di gibberelline, e ambientali, come alte temperature e umidità relativa elevata. L'attitudine alla partenocarpia varia con la specie e tra le varietà della stessa specie ed è abituale nelle specie tropicali (banano, ananas), frequente nelle specie subtropicali (agrumi) e rara nelle altre.

Altro fenomeno caratteristico degli agrumi è la poliembrionia, cioè la presenza nello stesso seme di più embrioni di cui solo uno è prodotto dalla cellula uovo fecondata, ed ha il corredo cromosomico dei due parentali, gli altri embrioni derivano dalla moltiplicazione di particolari cellule della *nucella* costituenti il tessuto somatico materno. Le piante che ne derivano sono geneticamente identiche fra loro e alla pianta madre se non intervengono mutazioni. Gli embrioni nucellari, di norma si sviluppano meglio di quello sessuato, per cui spesso si hanno solo embrioni nucellari e le piante che ne derivano sono di origine nucellare. Quasi tutte le piante di agrumi coltivati sono poliembrioniche, fanno eccezione il pomelo, il cedro, il bergamotto ed il limone “Meyer” (Spina e Di Martino, 1991).

Per ciò che riguarda le caratteristiche pedo-climatiche, gli agrumi sono piante tipicamente sub-tropicali per cui esigono climi caldi e inverni miti, questo fa sì che i loro frutti possano esaltare al meglio le loro caratteristiche organolettiche legate sia all'acidità che al tenore zuccherino del frutto.

1.4 La genomica del *Citrus*.

Per la caratterizzazione del germoplasma agrumicolo sono stati storicamente utilizzati criteri basati sulla descrizione dei caratteri morfologici. Fin dall'antichità numerosi sono gli esempi di descrizione della variabilità presente nel materiale agrumicolo di cui venivano dettagliatamente riportate le principali caratteristiche morfologiche e agronomiche. In tempi più recenti, oltre ai caratteri morfologici, sono stati utilizzati altri parametri biochimici e, in particolare, l'analisi isoenzimatica, l'utilizzo dei composti fenolici, dei flavonoidi e degli oli essenziali (Malik *et al.*, 1974; Tatum *et al.*, 1974; Esen e Soost, 1978; Torres *et al.*, 1978; Torres *et al.*, 1982).

In particolare per alcuni ibridi è stata utilizzata l'analisi isoenzimatica che ha consentito di individuare zimogrammi differenti da quelli del limone: nel Limone Cardinale (Pomo d'Adamo), nell'Incomparabile (Pomo d'Adamo cedrato) e nel limone cedrato Piretto (Reforgiato Recupero *et al.*, 1988). Nel complesso, le analisi dei caratteri morfologici e biochimici, pur conservando la loro validità, presentano dei limiti dovuti al fatto che con esse viene preso in esame soltanto il fenotipo e non le differenze genotipiche reali. L'approfondimento di conoscenze di biologia molecolare ha dato un nuovo e rilevante impulso agli studi di genetica e tassonomia delle piante e, tra queste, anche degli agrumi. In particolare le tecniche molecolari di caratterizzazione genetica, basate sull'analisi del DNA, sono state impiegate ampiamente in diversi campi.; quelle utilizzate per gli agrumi sono: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), PCR (Polymerase Chain Reaction), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) e microsatelliti (Nicolosi *et al.*, 1998).

Gli RFLP sono stati usati per costruire mappe genetiche (Durham *et al.*, 1992; Jarrell *et al.*, 1992), per identificare gruppi di *Poncirus trifoliata* (Komatsu *et al.*, 1993), per studiare le relazioni filogenetiche tra diverse specie di agrumi (Yamamoto *et al.*, 1993) e per tentare di identificare alcune cultivar di limone (Albanese *et al.*, 1992). Tuttavia, nonostante gli RFLP abbiano una maggiore sensibilità e consentano di esaminare una porzione del genoma più ampia di quella analizzata con gli isoenzimi, non risulta fino a oggi che essi siano stati utilizzati per studiare l'origine degli agrumi ibridi e per discriminare con successo le

cultivar. Questa tecnica può essere di aiuto negli studi di tassonomia perché riesce ad evidenziare piccoli cambiamenti nel materiale ereditario. Nel complesso, però, l'uso degli RFLP risulta alquanto complicato sia per le difficoltà della procedura, sia perché richiede un notevole impiego di tempo e di risorse (Deng *et al.*, 1995).

Un altro metodo utilizzato per studiare il DNA degli agrumi è la PCR. Impiegando i primer sintetizzati sulla base della sequenza del microsatellite M13 sono stati generati dei polimorfismi che hanno consentito finora di verificare l'origine ibrida e di differenziare alcuni genotipi di mandarini (Matsuyama *et al.*, 1993). Tale tecnica è più semplice rispetto agli RFLP, ma necessita di informazioni molto dettagliate, generalmente non disponibili per gli agrumi, sulla sequenza del DNA che si vuole amplificare.

Derivata dalla PCR è la tecnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) che è semplice da eseguire e negli agrumi ha già permesso non solo di distinguere le specie (Luro *et al.*, 1992), ma ha anche consentito di identificare cultivar di limone originate da mutazioni insorte sia *in vivo* che *in vitro* (Deng *et al.*, 1995). Essa ha mostrato pertanto di possedere una grande potenzialità nell'individuare un elevato grado di polimorfismo anche tra genotipi poco distanti da un punto di vista sistematico. Sulla base dei risultati positivi ottenuti tramite l'impiego della tecnica RAPD, è stato svolto in tutti questi anni un lavoro basato sullo studio del DNA degli ibridi allo scopo di conoscerne l'origine e quindi di verificare le varie ipotesi tassonomiche fatte nella lunga storia di coltivazione degli agrumi (Deng *et al.*, 1995).

Da diversi anni vengono utilizzati marcatori molecolari RAPD e SCAR, derivati dalla PCR, per analizzare il genoma e il DNA cloroplastico ai fini di identificare specie e varietà di agrumi coltivati, di caratterizzare il germoplasma agrumicolo non più presente in coltivazione e per studi sulla filogenesi.

Da studi effettuati recentemente anche in campo nazionale nell'Istituto di Coltivazioni arboree dell'Università di Catania, utilizzando marcatori molecolari RAPD e SCAR su 14 genotipi di agrumi, di cui 11 importanti a livello agronomico in quanto presenti in coltivazione e utilizzati come portinnesti, e 3, invece, ampiamente coltivati in passato e ora presenti solo in collezione, è emerso che il bergamotto dovrebbe essere un ibrido tra cedro e arancio amaro; l'arancio amaro e

dolce derivano dal pomelo e dal mandarino; origine diversa pare abbia avuto la lima messicana e *C. macrophylla* derivanti dal cedro e dal *C. micrantha* (Papeda). I marcatori individuati per il clementine, il King, il Satsuma e il Murcott sono stati riscontrati per la maggior parte nel mandarino e in minor misura nell'arancio dolce consentendo di affermare che tali genotipi possono essere considerati dei tangor (ibridi tra mandarino e arancio) (Nicolosi *et al.*, 1998). Lo studio è risultato concorde alle ipotesi filogenetiche basate sulle caratteristiche morfologiche e biochimiche, effettuate in passato, ma ha anche consentito di approfondire le conoscenze sull'origine di diverse specie di agrumi in tempi relativamente brevi ed in maniera più precisa e diretta e di apportare contributi originali relativamente ad alcuni genotipi analizzati (Nicolosi *et al.*, 1998).

Nel genere *Citrus*, la diploidia è la regola generale con un numero cromosomico base $x=9$ (Krug, 1943). Dal punto di vista sessuale il genere *Citrus* e i generi strettamente correlati, risultano tra loro parzialmente compatibili, con pochi triploidi conosciuti ed occasionalmente anche con forme tetraploidi e possiedono genomi relativamente piccoli (Talon e Gmitter, 2008). La dimensione del genoma aploide di *Citrus sinensis* è di 372 Mb (Arumuganathan e Earle, 1991). In un lavoro precedente, Ollitrault e collaboratori (1994) trovarono significativa la variazione dimensionale del genoma tra le varie specie di agrumi. I più grandi e i più piccoli genomi sono rispettivamente quelli di *C. medica* (il cedro, con un valore medio di 398 Mb/genoma aploide) e *C. reticulata* (il mandarino, con un valore medio di 360 Mb/genoma aploide). *C. maxima* (il pomelo) è risultato essere intermedio con una media di 383 Mb/genoma aploide. È interessante notare che le specie secondarie presentano valori intermedi tra i loro parentali ancestrali: *C. sinensis* 370 Mb, *C. aurantium* 368 Mb, *C. paradisi* 381 Mb e *C. limon* 380 Mb (Gmitter *et al.* 2012).

Come tali, gli agrumi sono suscettibili a molte delle tecniche comunemente utilizzate, tra cui la mappatura genetica e fisica, il sequenziamento del genoma completo e studi di genomica funzionali volti a svelare la complessità delle caratteristiche biologiche chiave della coltura di interesse. I coltivatori e i genetisti hanno a lungo desiderato di poter disporre di mappe di linkage che consentissero loro di ottenere schemi di selezione basati su marcatori molecolari piuttosto che su

approcci basati sulle caratteristiche fenotipiche spesso difficili e inefficienti. In effetti, a partire dal 1998, sono state prodotte mappe di linkage con valore e risoluzione sempre crescente grazie ai nuovi sistemi di marcatori e nuove tecniche di sequenziamento (Talon e Gmitter, 2008).

A livello mondiale, ancora oggi, il sequenziamento dell'intero genoma degli agrumi è ritenuto di notevole interesse. Questo perché al genere *Citrus* appartengono colture che rivestono particolare importanza a livello mondiale, sia perché rivestono un ruolo fondamentale nell'alimentazione umana, sia perché possiedono caratteristiche biologiche uniche e di grande interesse come l'apomissia, l'autoregolamentazione gametofitica, compatibilità di incrocio, dormienza, fogliame sempreverde ecc. (Talon e Gmitter, 2008).

Il primo studio del genoma, basato esclusivamente sul metodo Sanger, venne effettuato dal ICGC (International *Citrus* Genome Consortium), istituito nel 2003, utilizzando per il sequenziamento un clone diploide di arancio dolce, "Ridge Pineapple". Venne scelto l'arancio dolce perché è il tipo di agrume più coltivato al mondo e il clone "Ridge Pineapple" fu scelto perché produceva frutti con la presenza di semi, e come tale dunque presentava scarsa possibilità di riarrangiamento cromosomico con tipi apireni (Gmitter *et al.*, 1992). Il progetto partì nel 2008 e i risultati ottenuti furono inizialmente confusi, per questo si preferì ridurre al minimo le complicanze dovute alla elevata eterozigosità del genoma diploide, selezionando per il sequenziamento candidati aploidi. L'ICGC utilizzò tre linee aploidi, derivanti dal Clementine (*Citrus clementina* cv. *Nules*), nelle quali venne accertata l'alta percentuale di omozigosi e l'integrità del genoma aploide selezionato (Gmitter *et al.* Dati non pubblicati). La sequenza del genoma Clementine servirà, in seguito, come punto di riferimento per tutti gli altri progetti che porteranno al sequenziamento del genoma completo degli agrumi. Un secondo sviluppo significativo si ebbe con l'avvento di metodi di sequenziamento di nuova generazione, tra questi in particolar modo la tecnica di pirosequenziamento 454. Per questo motivo accanto al progetto aploide dell'ICGC, fu intrapreso un secondo progetto basato sul sequenziamento, con metodo di pirosequenziamento 454, del diploide di arancio dolce "Ridge Pineapple". I confronti preliminari delle sequenze del diploide rispetto a quelle dell'aploide evidenziarono una sequenza di arancio

dolce più frammentata rispetto a quelle aploidi di Clementine e questo potrebbe essere causato dalla maggiore complessità del genoma diploide e dalle differenze delle due tecniche di sequenziamento. Tuttavia, il numero di geni all'interno di ciascun genoma è molto simile (Gmitter *et al.*, 2012).

Gli studi genetici relativi ai *Citrus* sono numerosi e hanno portato ad una maggiore conoscenza del genoma complesso e notevolmente riarrangiato di questo grande gruppo. I risultati ottenuti sono stati pubblicati e sono a disposizione della comunità scientifica, che può utilizzarli per una grande varietà di interessi di ricerca, includendo studi sui meccanismi di resistenza alle malattie, alle caratteristiche organolettiche del prodotto, tolleranza agli stress abiotici e così via. Tuttavia, il lavoro per aumentare il numero e la qualità dei dati continuerà e sarà incentrato sull'esplorazione dell'evoluzione del genoma dei *Citrus* e la duplicazione, le origini dell'arancio dolce, analisi di elementi trasponibili nei genomi e, nel lungo termine, studio dei geni e contenuti allelici responsabili dell'espressione di alcune caratteristiche metaboliche, fisiologiche e biochimiche esclusive degli agrumi. Una maggiore comprensione di tali fenomeni porterà allo sviluppo di strumenti capaci di manipolare e gestire le piante, al meglio, rispetto alle interazioni con i fattori biotici e abiotici (Gmitter *et al.*, 2012).

1.5. Comparto varietale agrumicolo della Sardegna

Il germoplasma agrumicolo della Sardegna deriva da cultivar introdotte anticamente da altre aree agrumicole. Le prime notizie sulla presenza del cedro in Sardegna risalgono ai Romani, mentre il limone e l'arancio arrivano solo nel XVI secolo.

Inizialmente anche in Sardegna gli agrumi occupavano un ruolo prettamente decorativo negli orti, è solo nel 1700, infatti, che cedro, arancio e limone iniziano ad essere coltivati per scopi alimentari soprattutto legati all'utilizzo dei frutti per la preparazione di dolci tradizionali. Il mandarino, invece, arriva ancora più tardi, attorno al XIX secolo.

L'introduzione continua di cultivar provenienti da diverse aree agrumicole ha da un lato migliorato lo standard varietale, ma dall'altro ha provocato una sostituzione delle vecchie varietà locali. In Sardegna sono presenti individui che sono probabili cloni delle varietà più antiche e individui appartenenti a cultivar introdotte in tempi meno remoti (Agabbio, 1994). Il comparto regionale è articolato in un germoplasma molto vasto e ricco da tutelare in quanto destinato all'estinzione. Sono poche ora, infatti, le vecchie varietà che ancora abitano il territorio sardo e che rappresentano un patrimonio genetico ben adattato alle condizioni ecologiche locali e fortemente legato al territorio e alle sue tradizioni.

Le principali vecchie varietà diffuse in Sardegna sono:

- *arancio comune*: cultivar presente solo nei vecchi impianti, la sua origine ancora non è nota e viene descritto da Milella (1960) come "Aranzu sardu". I pregi di questo frutto sono l'alto contenuto in succo e la sua maturazione tardiva (Agabbio, 1994);
- *arancio dolce a buccia sottile*: cultivar di cui esistono pochi individui presenti nella zona di Posada e aventi circa 60-70 anni. Possiede un frutto con una buona resa in succo, buccia sottile, pochi semi (Agabbio, 1994);
- *miele*: cultivar di arancio poco diffusa, potrebbe essere utile negli incroci per la sua precocità di maturazione e l'assenza di semi (Agabbio, 1994);
- *ovale corda*: probabile clone locale di arancio originato da antiche varietà, potrebbe essere utile in programmi di miglioramento genetico per l'assenza di semi e la buona pezzatura (Agabbio, 1994);

- *pisu*: costituito da un insieme di biotipi costituenti una popolazione clonale derivante da una varietà di arancio “biondo comune” (Agabbio, 1994);
- *tardivo di Cabras*: cultivar di arancio che non ha interessanti qualità merceologiche e organolettiche (Agabbio, 1994);
- *tardivo di San Vito*: cultivar di arancio mediamente diffusa, ha interessanti caratteristiche quali l’esiguo numero di semi, la tardività nella maturazione, l’alta resa in succo e l’elevata produttività (Agabbio, 1994);
- *vaniglia comune*: cultivar di arancio molto apprezzata sul mercato, è una delle più antiche varietà italiane originatesi in Sicilia (Agabbio, 1994);
- *vaniglia rosato*: cultivar di arancio poco diffusa, rappresenta l’unica varietà pigmentata del gruppo delle arance dolci (Agabbio, 1994);
- *dolce di Muravera*: varietà di limone con bassa acidità, poco succosa e di media pezzatura (Agabbio, 1994);
- *limone di “Santu Ghironi”*: antica varietà di limone sarda molto importante per l’assenza di semi, alta resa in succo e buona pezzatura del frutto (Agabbio, 1994);
- *pompia*.

1.6. La Pompia

1.6.1 Cenni storici

La Pompia (*Citrus mostruosa*, non classificata) è un agrume tipico della Sardegna, alcuni studiosi collocano la sua coltivazione in diversi paesi: Villacidro, San Sperate, Oliena, Milis e Siniscola. Le prime notizie certe della sua esistenza risalgono al Settecento all'interno di un saggio sulla biodiversità vegetale e animale della Sardegna, del botanico sassarese Andrea Manca Dell'Arca, pubblicato nel 1780, e in una statistica redatta per ordine del Vicerè che registra alcune coltivazioni a Milis, in provincia di Oristano. Del secolo precedente in alcune fonti iconografiche provenienti dalla corte medicea, si trovano raffigurazioni di varie tipologie di frutti a grandezza naturale, che individuano alcuni esemplari di *Citrus mostruosa*. (Lovigu, 2007)

Tra le citazioni storiche (Fancello, 2012) viene riportata una descrizione della pompia attribuita a Teostrato di Ereso, che la descrive come una *Citrus spinosa* (*Citrus medica cetra*). Palladio, inoltre, segnala la coltivazione del cedro in Sardegna e Dioscoride descrive la cottura di un frutto bislungo e rugoso nel vino o nel miele, affermando che è mangiabile solo se trasformato.

Potrebbe trattarsi di un ibrido tra cedro e pompelmo (Fancello, 2012), da altri è ritenuto un cedro, o un ibrido tra cedro e limone (Secchi, 2008). È però diverso da entrambi per 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.

Oltre a questi cenni non si dispone di altri documenti storici, non è possibile dire con certezza né da quanto tempo esista questa pianta, né tanto meno come si sia originata in Sardegna e di conseguenza se è un agrume endemico della Sardegna o sia arrivato nel territorio sardo da qualche altro luogo. Prendendo spunto dalle fonti storiche è probabile che la Pompia arrivi da Milis, visto che si

testimonia la sua presenza in quel territorio nel 1760, e che poi da Milis si sia spostata verso il centro e la costa orientale.

La sua origine antichissima e le poche conoscenze sia sulla posizione tassonomica che sulle caratteristiche bio-agronomiche, la rendono una specie particolarmente interessante da studiare e conoscere. È conosciuta e apprezzata solo da un mercato di nicchia in espansione. Ad oggi tale coltivazione viene valorizzata principalmente nelle zone che vanno da Posada, a Siniscola, a Torpè, fino ad Orosei anche se alcuni esemplari sono stati individuati a Limpiddu (Budoni) (Lovigu 2007).

La Pompia è quasi sempre coltivata in coltura promiscua e l'età delle accessioni è variabile. Le più antiche sono quelle di Torpè, che hanno circa una ventina di anni, le altre hanno circa una decina di anni, sono stati segnalati anche impianti recenti ancora non in produzione.

La pompia dal 2004 è stata accolta da Slow food con il presidio denominato “*Sa Pompia*” e la motivazione è legata al sostegno della diffusione della cultura della Biodiversità.

1.6.2 Morfologia della pianta e del frutto

L'albero di Pompia si presenta di medie dimensioni, ha portamento assurgente, vigoroso, i rami sono spinescenti, le foglie sono grandi, ovoidali con apice convesso e possono presentare stipole. I fiori sono, normalmente, raggruppati in infiorescenze e il colore dei petali è bianco. La maturazione dei frutti avviene da novembre a febbraio-marzo. Hanno forma sub-globosa, appiattita ai poli e elevate dimensioni: il frutto può raggiungere anche un peso di 600-700 g. La base è appiattita e profondamente solcata con calice piccolo regolarmente diviso e peduncolo difficilmente distaccabile. L'apice è piano, leggermente incavato circondato da un'aureola molto evidente, la cicatrice stilare è piccola (Agabbio, 1994).

L'epicarpo presenta un colore che vira dal verde al giallo in base al grado di maturità del frutto, si presenta rugoso con costole longitudinali accentuate e spessore elevato, anche se non mancano casi nei quali l'epicarpo si presenta liscio.

È ricco di oli essenziali che ricordano quelli del limone, ma con fragranza più delicata. L'albedo è molto spesso e le logge sono, di solito, 13-14 di color giallo chiaro, con vescicole grandi e tozze. La quantità di succo è bassa così come il suo tenore zuccherino, mentre l'acidità è elevata. I semi sono di solito 10-14, di medie dimensioni (Lovigu, 2007).

1.6.3 Principali avversità

Come tutti gli agrumi, anche la Pompia è soggetta ad attacchi di agenti patogeni che si riescono a contenere agevolmente attraverso programmi di lotta integrata sperimentati dall'Ersat (Ente Regionale di Sviluppo e l'Assistenza Tecnica in agricoltura).

Tra i patogeni più importanti si trovano:

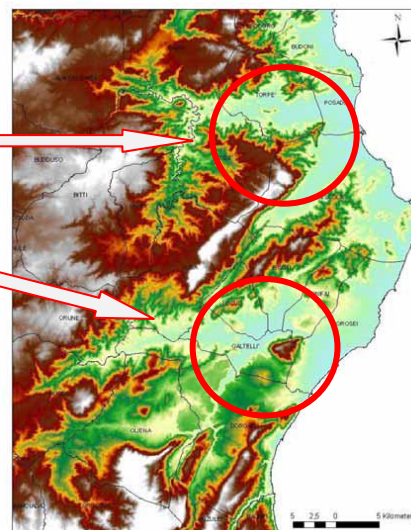
- *Ceratitis capitata* (mosca mediterranea della frutta) per la quale si è intervenuti con esche proteiche;
- *Aceria scheldoni* (acaro delle meraviglie) i fiori colpiti appaiono deformi mentre i frutti assumono aspetto tentacolato in conseguenza dell'abnorme sviluppo dei carpelli che crescono separati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

1.6.4 Diffusione della Pompia nel comprensorio della Baronia

La diffusione della Pompia in Sardegna è identificata in un'area ben delimitata individuata sotto il nome di Baronia. La Baronia comprende un territorio irriguo di circa 7000 ettari con peculiari caratteristiche pedoclimatiche che lo rendono un territorio particolarmente vocato alle coltivazioni ortive ed arboree.

In tale ambito la coltura degli agrumi è localizzata in due distinti areali di coltivazione distanti tra loro 40 km nelle piane alluvionali dei comuni di:

- Siniscola, Posada e Torpè (areale di Siniscola);
- Orosei, Galtellì, Onifai e Irgoli (areale di Orosei).



In questi siti la superficie impiegata ad agrumi è di 281 ha ripartiti in 751 aziende, le quali coltivano in media 278 piante di agrumi ha^{-1} , per una produzione totale di $10,4 \text{ t ha}^{-1}$. Il 71% del totale è coltivato ad arance, l'11% a mandarino, il 13% a mandarancio e il restante 5% è destinato alla coltivazione di limone, Pompia e altri agrumi minori (Dati Istat, 2007 e Fronteddu, 2010).

Da un'indagine svolta nel comprensorio di Siniscola dall'Agenzia Laore nel 2009 (Fronteddu, 2010), è risultato che la Pompia è coltivata sia in coltura specializzata, che in coltura promiscua. In coltura specializzata risultano tre campi di coltivazione siti tutti in agro di Siniscola: in località "Su manganu" è coltivato a Pompia un ettaro con 278 piante impiantate nel 2000 con sesti di impianto $6 \times 6 \text{ m}$; il secondo si trova in località "Jann'e frores" dove risultano coltivati a Pompia tre ettari impiantati nel 2004 con 833 esemplari impiantati con lo stesso sesto d'impianto e il terzo sito si trova in località "Ghiliorro", due ettari impiantati nel 2007 e 666 piante con sesto d'impianto $6 \times 5 \text{ m}$. In coltura promiscua invece sono riportati due areali di coltivazione dell'agrumo Pompia. Nell'areale di Siniscola 185 piante, mentre nell'areale di Orosei sarebbero presenti 60 esemplari. Con un totale di circa 2022 piante di Pompia presenti nei territori della Baronia con una produttività media per pianta di 40 kg che danno luogo ad una potenziale produzione annua di circa 80 t. Oggi nel territorio della Baronia si conta una produzione annua di circa 14 t per anno di produzione reale, dunque il solo 17,5% di quella potenziale. Si stima che nei prossimi anni questa produzione tenda ad aumentare (Fronteddu, 2010).

Il principale problema della Pompa è legato al mercato. Infatti, la domanda del prodotto trasformato, in crescita per un ritorno ai prodotti della tradizione e un maggiore sviluppo dell'organizzazione commerciale legata anche ai flussi turistici, è molto più alta dell'offerta, non essendoci stati importanti investimenti nel campo della sua coltivazione. In particolare, negli anni c'è stato un incremento delle vendite non solo dei prodotti ma anche delle piante, rilevato grazie all'attività del vivaio di Orosei. Se infatti sei anni fa si vendevano circa 30-40 piantine all'anno, nel 2007 sono state vendute circa 1000 piantine (Lovigu, 2007).

1.6.5 L'RNA ribosomiale nelle piante

Nell'ambito del genoma tutti gli organismi presentano delle sequenze di DNA che codificano per l'RNA ribosomiale (rRNA), un componente essenziale per la sintesi proteica cellulare (Kollipara *et al.*, 1997). Nelle piante esistono quattro tipi di rRNA identificati per la loro diversa velocità di sedimentazione nella centrifugazione, denominati 5S, 5.8S (circa 5000 nucleotidi), 18S (circa 2000) e 25S (circa 160). Le frazioni 5.8S, 18S e 25S sono codificate da geni raggruppati nella regione dell'organizzatore nucleolare, mentre la frazione 5S è codificata da geni che non fanno parte di esso (Barcaccia e Falcinelli, 2005).

Il DNA localizzato nell'organizzatore nucleolare è formato da sequenze ripetute in serie centinaia di volte e i geni che codificano per i quattro tipi di rRNA rappresentano una delle classi principali di sequenze ripetute nel genoma degli eucarioti. Una unità di ripetizione è costituita dai geni che codificano per i tre tipi di rRNA disposti nell'ordine 18S, 5.8S e 25S in direzione 5'→3': tali geni sono intervallati tra loro da spaziatori trascritti interni (ITS) e delimitati lateralmente da spaziatori trascritti esterni (ETS). Ogni unità di trascrizione è separata dalla successiva da degli spaziatori inter-genici (IGS) come mostrato in figura 1.1.

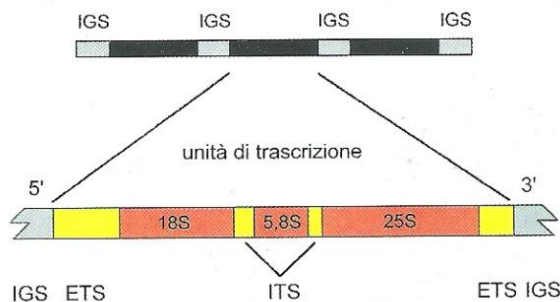


Figura 1.1: Organizzazione dei geni ribosomiali

Le sequenze dei geni ribosomiali presenti negli organizzatori nucleolari sono altamente conservate anche tra specie diverse, mentre quelli degli spaziatori possono variare anche notevolmente (Barcaccia e Falcinelli, 2005). Generalmente il gruppo dei distanziatori intergenici dell'rRNA evolve rapidamente ed è altamente polimorfico ed esso fornisce, dunque, un ottimo strumento per la valutazione della variabilità genetica, tassonomica e studi filogenetici di

popolazione (Singh *et al.*, 2008). L'IGS contiene spesso informazioni sufficienti per consentire l'esame delle variazioni genetiche tra specie strettamente affini o anche popolazioni o cultivar di specie coltivate (Penteado *et al.*, 1996; Polanco e Pèrez de la Vega, 1995, Polanco e Pèrez de la Vega, 1997; Nickrent e Patrick, 1998). La variazione è normalmente il risultato della variazione della lunghezza delle sotto-ripetizioni nel IGS (Penteado *et al.*, 1996; Polanco e Pèrez de la Vega, 1997; Rogers e Benedich, 1987). La variazione della lunghezza del IGS è stata utilizzata come strumento tassonomico per classificare molte specie di *Triticeae* (Dvorak e Appels, 1982), tra cui mais (Zimmer *et al.*, 1988), soia (Doyle e Beachy, 1985), fagioli mungo (Gerstner *et al.*, 1988) e riso (Liu *et al.*, 1996). La regione dell'ITS comprendente ITS1 (compreso tra le sequenze 18S e 5.8S) e ITS2 (compreso tra le sequenze 5.8S e 28S), è, anch'essa, una zona di particolare importanza per la discriminazione a livello di specie. Le sequenze ITS mostrano una divergenza di sequenza maggiore rispetto alle regioni codificanti che le accompagnano (Kollipara *et al.*, 1997) infatti sono excise dall'RNA in un processo di splicing-post-trascrizionale e quindi, non codificando per un prodotto genico, sono soggette ad elevata variabilità di sequenza. Sono, infatti, utilizzate per distinguere specie vegetali correlate e per dedurre relazioni filogenetiche dalle popolazioni fin alle famiglie (Kolchinski *et al.*, 1991). Inoltre, la loro localizzazione tra regioni conservate (18S e 28S) permette l'impiego di primers universali. Pertanto, la conoscenza dell'organizzazione strutturale del gruppo di geni dell'RNA ribosomiale ha portato alla progettazione di molti primer universali (Kirti, 2008) e allo sviluppo di tecniche per una rapida determinazione della sequenza nucleotidica primaria delle molecole di rRNA, molto utili a scopi di ricerche tassonomiche e filogenetiche.

2. Obiettivi del lavoro

Gli agrumi rappresentano la coltura frutticola maggiormente diffusa nel mondo. La lunga storia di coltivazione di queste piante ha contribuito alla differenziazione di un patrimonio genetico che oggi si presenta assai variegato. Aranci, mandarini, limoni e lime, pomeli e pompelmi, sono presenti in coltivazione con numerose cultivar; le quali sono state ottenute nel corso degli anni sia attraverso i processi naturali di fecondazione che di mutagenesi, sia attraverso il lavoro di miglioramento genetico operato dall'uomo.

La pompia, è un agrume tipico della Sardegna di origine molto antica, riveste interesse per le sue peculiarità e per il suo utilizzo nella tradizionale industria dolciaria locale. Il frutto non si consuma allo stato fresco: la polpa e il succo sarebbero troppo acidi, molto più del limone, per questo ha bisogno di una lunga lavorazione. Non abbiamo una fonte storica che riporti con certezza da quando si sia iniziato a trasformare il frutto per la produzione di dolci e liquori tipici, poiché la ricetta è stata tramandata oralmente nel corso dei secoli. Inoltre, Il frutto essendo ricco di oli essenziali viene utilizzato nel campo della cosmesi e dell'erboristeria essendo un ottimo ricostituente e un rimedio naturale per tosse, mal di gola, raffreddori e inappetenze.

Questo agrume non è stato ancora classificato dal punto di vista botanico anche se è riportata in alcuni studi la descrizione morfologia e la sua fenologia ma la denominazione *Citrus mostruosa* o *Citrus x mostruosa* non ha validazione scientifica. Obiettivo del presente lavoro è la caratterizzazione di tale materiale genetico al fine di apportare un contributo alla comprensione della sua origine e alla salvaguardia di individui per la conservazione e il miglioramento di questa specie endemica esclusiva della Sardegna.

3. Materiali e metodi

3.1 Materiale vegetale

Il materiale di partenza (germogli vegetativi) è stato prelevato durante il periodo primaverile, da due agrumeti situati presso Siniscola, uno annesso all'Istituto Professionale per l'Agricoltura e l'Ambiente (I.P.A.A.), un impianto di circa un anno con piante ancora non in produzione, il secondo di proprietà di un privato, con piante adulte in piena produzione. Sono stati prelevati in totale 20 campioni dal primo sito (codificati con S e un numero) e 8 dal secondo (codificati con T e un numero); a questi è stato aggiunto un campione prelevato da una pianta nata da seme situata presso un privato (codificata come Tseme) (fig. 3.1A); come controllo sono state prelevate le foglie giovani di una pianta di arancio amaro micropropagato.



A B
Fig 3.1: a) pianta di pompia derivata da seme; b) campo di pompia in piena produzione.

Il DNA è stato estratto a partire da foglie giovani, macinate finemente in presenza di azoto liquido, mediante il kit di estrazione DNeasy® Plant minikit (QIAGEN).

3.2 Amplificazione del DNA mediante PCR.

Per ottenere informazioni sulla sequenza che codifica la regione ITS che comprende la regione 5.8S dell'rDNA, il Dna genomico estratto è stato amplificato mediante PCR utilizzando i primers ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3')

e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC) come descritto da White *et al.*(1990).

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è un metodo che consente di amplificare in vitro uno o più specifici segmenti di DNA presenti tra due sequenze nucleotidiche note (primer), producendone un numero elevato di copie. Questo sistema utilizza uno strumento chiamato Thermalcycler in grado di effettuare ripetuti cicli termici. La reazione ha luogo in una soluzione tampone in cui sono presenti il DNA stampo, l'enzima DNA polimerasi- termostabile (Taq polimerasi), i dNTPs (nucleotidi trifosfati) e una coppia di primer. Ogni ciclo termico si svolge in tre fasi:

- **Denaturazione.** I filamenti di DNA vengono separati mediante rottura dei ponti idrogeno in seguito a riscaldamento (94°C per 5 minuti). Ognuno fungerà da stampo per la sintesi di un filamento complementare.
- **Appaiamento o innesco.** La temperatura viene abbassata in funzione della coppia di primer utilizzati (temperatura di annealing, T^a, specifica per la coppia di primer), consentendo a questi ultimi di appaiarsi ai nucleotidi complementari all'interno dei filamenti stampo; i primer sono orientati in direzione convergente sui due filamenti: 5'- 3' Forward (F) e 3'- 5'Reverse (R).
- **Estensione o allungamento.** La temperatura viene innalzata a 72°C per attivare l'enzima Taq polimerasi che partendo dai primer catalizza la sintesi di un nuovo filamento di DNA complementare allo stampo procedendo in direzione 5'- 3', utilizzando i dNTP presenti in soluzione.

Ad ogni ciclo di “denaturazione – innesco – estensione” il numero di copie di DNA di interesse raddoppia in modo esponenziale in poche ore (fig 3.2).

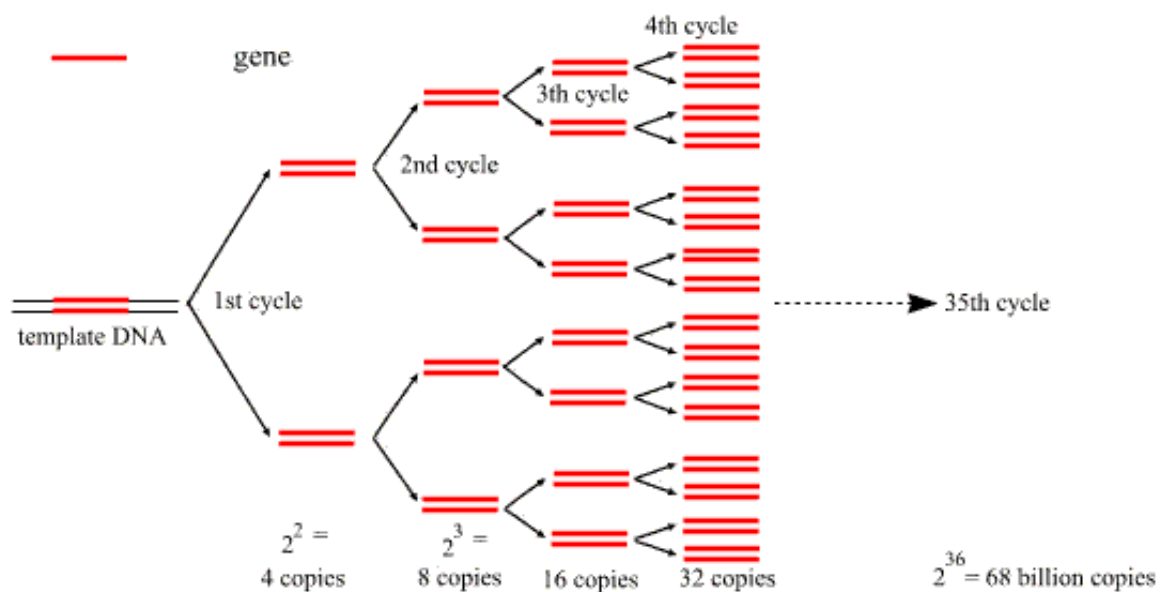


Figura 3.2: Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La miscela della PCR è stata preparata in un volume finale di 25 μ l come riportato in tabella 1.

Tabella 1: Master mix per la reazione di PCR.

	Ci	Vi (μ l)	Cf	Vf(μ l)
Buffer	10X	2,5	1X	25
MgCl₂	50mM	1,25	2,5 mM	25
dNTP	10mM	0,5	0,2 mM	25
Primer ITS1	10 μ M	1,25	0,5 μ M	25
Primer ITS4	10 μ M	1,25	0,5 μ M	25
Taq	5U/ μ l	0,1	1U/ μ l	25
DNA	50 ng/ μ l	2	50 ng/ μ l	

La reazione di amplificazione è stata condotta con il Gene Amp PCR System 9700 Thermal Cyclers (Applied Biosystem) (fig. 3.3), utilizzando il seguente ciclo di amplificazione:

Step 1: 94°C per 90''

Step 2: 95°C per 50''

Step 3: 55°C per 70''

Step 4: 72°C per 90''

} x 30 cicli

Step 5: 72°C per 3 minuti

Step 6: 30° per 1 minuto



Figura 3.3: Gene Amp PCR System 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems)

Il risultato dell'amplificazione è stato controllato attraverso elettroforesi in gel di agarosio all' 1,5 % in TAE 1X (Trizma Base 2M, Acido Acetico 5,7 % EDTA 0,5 M) e colorato con etidio bromuro per permettere la visualizzazione delle bande con luce UV.

3.3 Analisi delle sequenze

I prodotti PCR ottenuti sono stati purificati e sequenziati presso la ditta Macrogen on line sequencing order system, Seoul Corea, che utilizza la metodica di sequenziamento di Sanger (Figura 3.4) basata sulla produzione di frammenti di DNA di varia lunghezza che iniziano in un punto fisso e terminano con nucleotidi specifici. Inizialmente il DNA a singolo filamento viene copiato dalla DNA polimerasi I di *E. coli*; questo enzima ha bisogno di un innesco (primer) che possieda sul gruppo 3' del deossiribosio un OH libero a cui poter attaccare il successivo nucleotide fornendo in questo modo un punto di inizio e andando a formare un frammento di DNA a doppia elica. L'allungamento della catena viene poi arrestato in corrispondenza di basi specifiche, mediante l'aggiunta di 2'-3'-

dideossinucleotidi poiché viene a mancare il gruppo OH libero nella posizione 3' dello zucchero impedendo così l'attacco del nucleotide successivo. Si preparano quattro reazioni, ciascuna contenente uno dei quattro deossinucleotidi (ddATP, ddGTP, ddCTP e ddTTP) e una piccola quantità del fattore che blocca l'allungamento della catena. In questo modo si ottengono frammenti di DNA di varia lunghezza che iniziano nello stesso punto ma terminano con basi specifiche. La sequenza viene quindi letta sottoponendo il risultato delle quattro reazioni ad elettroforesi su gel di poliacrilammide che separi i frammenti radioattivi in base alle loro dimensioni (De Robertis *et al.*, 1987).

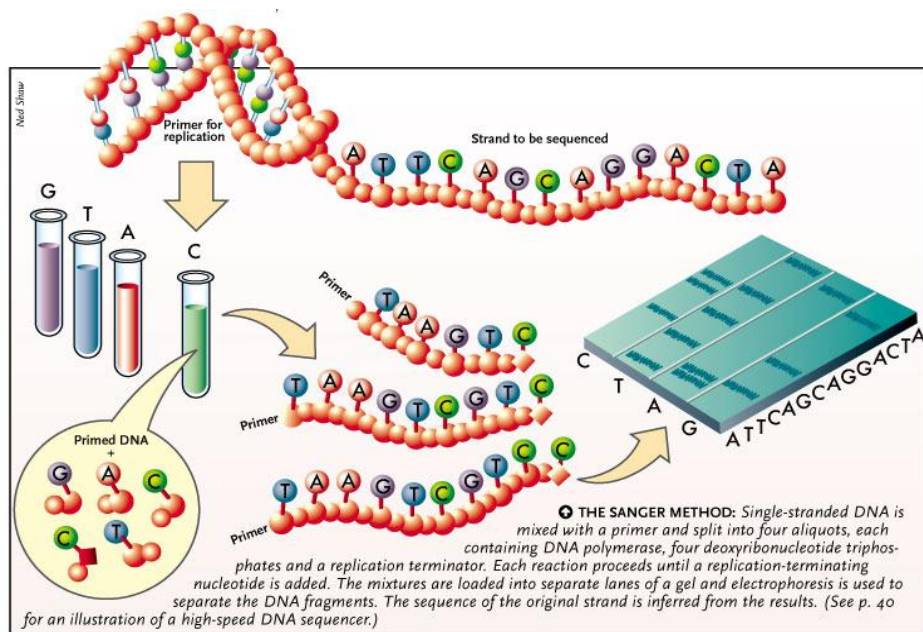


Figura 3.4: Metodica di sequenziamento di Sanger

Per studiare l'omologia a livello nucleotidico, le sequenze sono state confrontate contro l'intero database con il software nucleotide Blast (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). Inoltre, poiché ciascun campione è stato sequenziato in entrambe le direzioni, tali sequenze sono state allineate con il software clustalw (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/), per costruire le sequenze consenso (fig 3.5)


```

S20_ITS1      CGTGAACCAGTTGATATCACCGGCGGCGGGAGGGGGGATGCGTCCGCAGCGGGCGCTCCT 60
S20_ITS4      -----

S20_ITS1      CCTTCCCGCCCCACGCCGCGGGGAGAGGGAAGTCTGCTCCCGGTGGCGAAACAACA 120
S20_ITS4      -----GCTCCCGGTGGCGAAACAACA 22
                      *****

S20_ITS1      AACCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGCGCCT 180
S20_ITS4      AACCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGCGCCT 82
                      *****

S20_ITS1      TCTTTCACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGA 240
S20_ITS4      TCTTTCACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGA 142
                      *****

S20_ITS1      AGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCT 300
S20_ITS4      AGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCT 202
                      *****

S20_ITS1      TTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGCTGCTGGGTGTACGC 360
S20_ITS4      TTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGCTGCTGGGTGTACGC 262
                      *****

S20_ITS1      ATCGTTGCCCCACCCACCCCAACCAAGGCGGGGGCCCGGGGTGCGGGCGGAGAT 420
S20_ITS4      ATCGTTGCCCCACCCACCCCAACCAAGGCGGGGGCCCGGGGTGCGGGCGGAGAT 322
                      *****

S20_ITS1      TGGCCTCCCGTGCCTGACCGCTCGCGGTGGCCCCAAATATGAGTCCTCGGCGACCGAAG 480
S20_ITS4      TGGCCTCCCGTGCCTGACCGCTCGCGGTGGCCCCAAATATGAGTCCTCGGCGACCGAAG 382
                      *****

S20_ITS1      CCGCGGCGATCGGTGGTGAACAAAGCCTCTCGAGCTCCCGCGCGCGCCC----- 531
S20_ITS4      CCGCGGCGATCGGTGGTGAACAAAGCCTCTCGAGCTCCCGCGCGCGCGCCCGGTCTCAA 442
                      *****

S20_ITS1      -----
S20_ITS4      GTGTGGACTTCTGCGACCCTGAAGCTTCCGTTCCAACGGCGCTCGCATC 491

```

Fig. 3.5: Esempio di allineamento multiplo per ricavare la sequenza consenso del campione S20. In giallo la sequenza è ricavata dalla sequenza del primer ITS1, in verde la sequenza derivate dal primer ITS4.

Le sequenze consenso di pompia, così ricavate, sono state quindi allineate tra di loro sempre con lo stesso software Clustalw e l'allineamento multiplo risultante è stato elaborato con il software MEGA utilizzando l'algoritmo Neighbour Joining, matrice di distanza elaborata in base al numero delle differenze di basi tra le sequenze, per produrre un dendrogramma di similarità.

Infine, le sequenze di Pompia sono state allineate con alcune sequenze della regione 5.8S dell'rDNA di alcune specie del genere *Citrus* e correlate presenti in data base, utilizzando il software TreeCon ver. 1.3 (Van de Peer e De Watcher, 1994) per costruire un dendrogramma di similarità con il metodo UPGMA (*Unparied-Group-Mathematical-Average*), la cui consistenza è stata saggiata mediante l'applicazione della tecnica di ricampionamento *bootstrap* (1000 repliche).

4. Risultati

Il DNA genomico dei campioni di pompia è stato amplificato con una coppia di primers specifici per la regione ITS che include la regione 5.8S dell'rDNA:

ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')

ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

come descritto da White *et al.* (1990) e i prodotti dell'amplificazione sono stati visualizzati su gel d'agarosio (fig. 4.1)

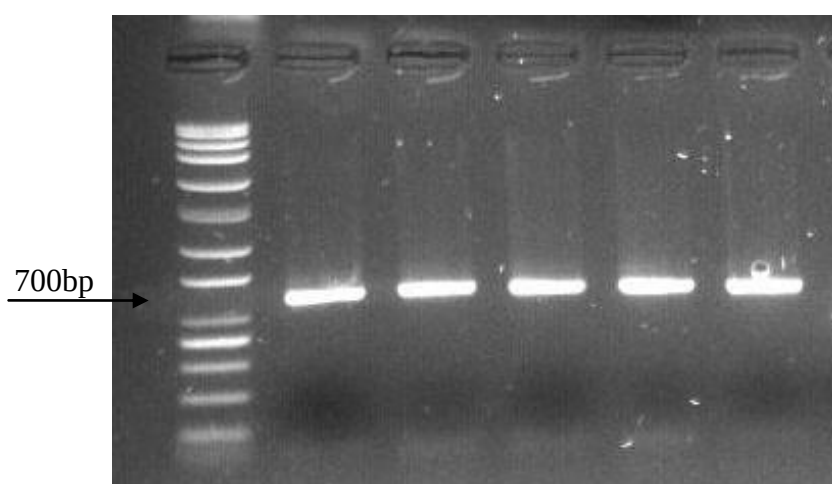


Fig.4.1: Visualizzazione dell'elettroforesi in gel d'agarosio (TAE 1X) dei prodotti di PCR. Da sinistra a destra: marker, 5 accessioni di pompia S7, S12, S13, T1, T2.

Un'aliquota di ciascun prodotto di PCR è stata sequenziata e tutte le sequenze ottenute sono state analizzate con il software Blastn. Questo software confronta la sequenza di interesse (definita query) con tutte le sequenze presenti in banca dati e restituisce un allineamento ed uno score che indicano la bontà dell'allineamento ed un valore di probabilità che è un indice del rischio di sbagliare che si assume nell'affermare che l'allineamento non è dovuto all'effetto del caso. In tabella 2 sono riportate solo le omologie con probabilità inferiore a $8e-176$.

Tab. 2: risultato del blast delle sequenze ITS di pompia con la banca dati

cv	regione ITS rDNA 5.8S	n. rif subject	omologia con la query %	% identità nel tratto omologo
AA	<i>C. aurantium</i>	AB456116	100	99
S1	<i>C. medica var sarcodactylis</i>	JN681157	99	99
S2	<i>C. medica var sarcodactylis</i>	JN681157	100	100
S3	<i>C. medica var sarcodactylis</i>	JN681157	100	100
S4	<i>C. medica var sarcodactylis</i>	JN681157	100	100
S5	<i>C. medica var sarcodactylis</i>	JN681157	100	100
S7	<i>C. medica var sarcodactylis</i>	JN681157	100	100
S12	<i>C. medica var sarcodactylis</i>	JN681157	100	100
S13	<i>C. medica var sarcodactylis</i>	JN681157	100	100
T1	<i>C. medica var sarcodactylis</i>	JN681157	100	100
T3	<i>C. medica var sarcodactylis</i>	JN681157	100	100
T5	<i>C. medica var sarcodactylis</i>	JN681157	100	100
T7	<i>C. medica var sarcodactylis</i>	JN681157	100	100
T8	<i>C. medica var sarcodactylis</i>	JN681157	100	100

Tutte le sequenze sono risultate altamente omologhe alle sequenze della regione dell'rDNA del genere *Citrus*.

Al fine di verificare l'omogeneità dei campioni prelevati dai 2 siti, le sequenze sono state allineate con il software ClustalW2 ver 2.012 per produrre un file di allineamento multiplo (fig.4.2)

```

T7      TTCCCGCCCCACGCCGCGGGGAGAGGGACTCGTTCTGCTCCCGGCTGGCGAAACAACAAA 60
T8      TTCCCGCCCCACGCCGCGGGGAGAGGGACTCGTTCTGCTCCCGGCTGGCGAAACAACAAA 60
T5      TTCCCGCCCCACGCCGCGGGGAGAGGGACTCGTTCTGCTCCCGGCTGGCGAAACAACAAA 60
T3      TTCCCGCCCCACGCCGCGGGGAGAGGGACTCGTTCTGCTCCCGGCTGGCGAAACAACAAA 60
T1      TTCCCGCCCCACGCCGCGGGGAGAGGGACTCGTTCTGCTCCCGGCTGGCGAAACAACAAA 60
S13     TTCCCGCCCCACGCCGCGGGGAGAGGGACTCGTTCTGCTCCCGGCTGGCGAAACAACAAA 60
S12     TTCCCGCCCCACGCCGCGGGGAGAGGGACTCGTTCTGCTCCCGGCTGGCGAAACAACAAA 60
s7      TTCCCGCCCCACGCCGCGGGGAGAGGGACTCGTTCTGCTCCCGGCTGGCGAAACAACAAA 60
s5      TTCCCGCCCCACGCCGCGGGGAGAGGGACTCGTTCTGCTCCCGGCTGGCGAAACAACAAA 60
s4      TTCCCGCCCCACGCCGCGGGGAGAGGGACTCGTTCTGCTCCCGGCTGGCGAAACAACAAA 60
s3      TTCCCGCCCCACGCCGCGGGGAGAGGGACTCGTTCTGCTCCCGGCTGGCGAAACAACAAA 60
s2      TTCCCGCCCCACGCCGCGGGGAGAGGGACTCGTTCTGCTCCCGGCTGGCGAAACAACAAA 60

```

```

s1      TTCCCGCCCCACGCCGCGGGGAGAGGGACTCGTTCTGCTCCCGGTGGCGAAACAACAAA 60
AA      TTCCCGCCCCATGCCGCGGGGAGAGGGACTCGTCCCGCTCCCGGTGGCGAAACAACGAA 60
*****

T7      CCCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGC----- 114
T8      CCCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGC----- 114
T5      CCCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGC----- 114
T3      CCCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGC----- 114
T1      CCCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGC----- 114
S13     CCCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGC----- 114
S12     CCCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGC----- 114
s7      CCCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGC----- 114
s5      CCCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGC----- 114
s4      CCCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGC----- 114
s3      CCCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGC----- 114
s2      CCCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGC----- 114
s1      CCCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGC----- 114
AA      CCCCCGGCGCGGACTGCGCCAAGGAAATCTAACGAGAGAGCACGCTCCCGCGGCCCGGA 120
*****

T7      -----GCCTTCTTTTACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAA 151
T8      -----GCCTTCTTTTACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAA 151
T5      -----GCCTTCTTTTACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAA 151
T3      -----GCCTTCTTTTACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAA 151
T1      -----GCCTTCTTTTACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAA 151
S13     -----GCCTTCTTTTACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAA 151
S12     -----GCCTTCTTTTACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAA 151
s7      -----GCCTTCTTTTACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAA 151
s5      -----GCCTTCTTTTACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAA 151
s4      -----GCCTTCTTTTACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAA 151
s3      -----GCCTTCTTTTACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAA 151
s2      -----GCCTTCTTTTACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAA 151
s1      -----GCCTTCTTTTACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAA 151
AA      GACGGTGCGCCGCGGGGTGCGGCGCCTTCTTTTACATGTATCCAAAACGACTCTCGGCAA 180
*****

T7      CGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT 211
T8      CGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT 211
T5      CGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT 211
T3      CGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT 211
T1      CGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT 211
S13     CGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT 211
S12     CGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT 211
s7      CGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT 211
s5      CGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT 211
s4      CGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT 211
s3      CGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT 211
s2      CGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT 211
s1      CGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTATCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT 211
AA      CGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAAT 240
*****

T7      TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCC 271
T8      TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCC 271
T5      TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCC 271
T3      TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCC 271
T1      TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCC 271
S13     TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCC 271
S12     TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCC 271
s7      TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCC 271
s5      TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCC 271
s4      TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCC 271
s3      TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCC 271
s2      TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCC 271
s1      TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCC 271
AA      TGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCCAAGCCATTAGGCC 300
*****

```

```

T7      GAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCATCGTTGCCCCACCCACCCCCCAAACCAAGG 331
T8      GAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCATCGTTGCCCCACCCACCCCCCAAACCAAGG 331
T5      GAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCATCGTTGCCCCACCCACCCCCCAAACCAAGG 331
T3      GAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCATCGTTGCCCCACCCACCCCCCAAACCAAGG 331
T1      GAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCATCGTTGCCCCACCCACCCCCCAAACCAAGG 331
S13     GAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCATCGTTGCCCCACCCACCCCCCAAACCAAGG 331
S12     GAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCATCGTTGCCCCACCCACCCCCCAAACCAAGG 331
s7      GAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCATCGTTGCCCCACCCACCCCCCAAACCAAGG 331
s5      GAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCATCGTTGCCCCACCCACCCCCCAAACCAAGG 331
s4      GAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCATCGTTGCCCCACCCACCCCCCAAACCAAGG 331
s3      GAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCATCGTTGCCCCACCCACCCCCCAAACCAAGG 331
s2      GAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCATCGTTGCCCCACCCACCCCCCAAACCAAGG 331
s1      GAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCATCGATGCCCCACCCACCCCCCAAACCAAGG 331
AA      GAGGGCACGTCTGCCTGGGTGTACGCATCGTTGCCCCACCCACCCCCCAAACCAAGG 360
*****

T7      CGGGGGCCCCGGGTGCGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGCGCTGACCGCTCGCGGTTGGC 391
T8      CGGGGGCCCCGGGTGCGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGCGCTGACCGCTCGCGGTTGGC 391
T5      CGGGGGCCCCGGGTGCGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGCGCTGACCGCTCGCGGTTGGC 391
T3      CGGGGGCCCCGGGTGCGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGCGCTGACCGCTCGCGGTTGGC 391
T1      CGGGGGCCCCGGGTGCGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGCGCTGACCGCTCGCGGTTGGC 391
S13     CGGGGGCCCCGGGTGCGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGCGCTGACCGCTCGCGGTTGGC 391
S12     CGGGGGCCCCGGGTGCGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGCGCTGACCGCTCGCGGTTGGC 391
s7      CGGGGGCCCCGGGTGCGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGCGCTGACCGCTCGCGGTTGGC 391
s5      CGGGGGCCCCGGGTGCGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGCGCTGACCGCTCGCGGTTGGC 391
s4      CGGGGGCCCCGGGTGCGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGCGCTGACCGCTCGCGGTTGGC 391
s3      CGGGGGCCCCGGGTGCGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGCGCTGACCGCTCGCGGTTGGC 391
s2      CGGGGGCCCCGGGTGCGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGCGCTGACCGCTCGCGGTTGGC 391
s1      CGGGGGCCCCGGGTGCGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGCGCTGACCGCTCGCGGTTGGC 391
AA      CGGGGGCCCCGGGTGCGGGCGGAGATTGGCTCCCGTGCGCTGACCGCTCGCGGTTGGC 420
*****

T7      CCAAATATGAGTCCTCGGCGACCGAAGCCGCGCGATCGGTGGTGAACAAAGCC-TCTC 450
T8      CCAAATATGAGTCCTCGGCGACCGAAGCCGCGCGATCGGTGGTGAACAAAGCC-TCTC 450
T5      CCAAATATGAGTCCTCGGCGACCGAAGCCGCGCGATCGGTGGTGAACAAAGCC-TCTC 450
T3      CCAAATATGAGTCCTCGGCGACCGAAGCCGCGCGATCGGTGGTGAACAAAGCC-TCTC 450
T1      CCAAATATGAGTCCTCGGCGACCGAAGCCGCGCGATCGGTGGTGAACAAAGCC-TCTC 450
S13     CCAAATATGAGTCCTCGGCGACCGAAGCCGCGCGATCGGTGGTGAACAAAGCC-TCTC 450
S12     CCAAATATGAGTCCTCGGCGACCGAAGCCGCGCGATCGGTGGTGAACAAAGCC-TCTC 450
s7      CCAAATATGAGTCCTCGGCGACCGAAGCCGCGCGATCGGTGGTGAACAAAGCC-TCTC 450
s5      CCAAATATGAGTCCTCGGCGACCGAAGCCGCGCGATCGGTGGTGAACAAAGCC-TCTC 450
s4      CCAAATATGAGTCCTCGGCGACCGAAGCCGCGCGATCGGTGGTGAACAAAGCC-TCTC 450
s3      CCAAATATGAGTCCTCGGCGACCGAAGCCGCGCGATCGGTGGTGAACAAAGCC-TCTC 450
s2      CCAAATATGAGTCCTCGGCGACCGAAGCCGCGCGATCGGTGGTGAACAAAGCC-TCTC 450
s1      CCAAATATGAGTCCTCGGCGACCGAAGCCGCGCGATCGGTGGTGAACAAAGCC-TCTC 450
AA      CCAAATCTGAGTCCTCGGCGACCGAAGCCGCGCGATCGGTGGTGAACAAAACCTCTC 480
*****

T7      GAGCTCCCGCGCGCGCCCCGGTCTCCAAGTGTGGACTC 488
T8      GAGCTCCCGCGCGCGCCCCGGTCTCCAAGTGTGGACTC 488
T5      GAGCTCCCGCGCGCGCCCCGGTCTCCAAGTGTGGACTC 488
T3      GAGCTCCCGCGCGCGCCCCGGTCTCCAAGTGTGGACTC 488
T1      GAGCTCCCGCGCGCGCCCCGGTCTCCAAGTGTGGACTC 488
S13     GAGCTCCCGCGCGCGCCCCGGTCTCCAAGTGTGGACTC 488
S12     GAGCTCCCGCGCGCGCCCCGGTCTCCAAGTGTGGACTC 488
s7      GAGCTCCCGCGCGCGCCCCGGTCTCCAAGTGTGGACTC 488
s5      GAGCTCCCGCGCGCGCCCCGGTCTCCAAGTGTGGACTC 488
s4      GAGCTCCCGCGCGCGCCCCGGTCTCCAAGTGTGGACTC 488
s3      GAGCTCCCGCGCGCGCCCCGGTCTCCAAGTGTGGACTC 488
s2      GAGCTCCCGCGCGCGCCCCGGTCTCCAAGTGTGGACTC 488
s1      GAGCTCCCGCGCGCGCCCCGGTCTCCAAGTGTGGACTC 488
AA      GAGCTCCG----- 488
*****

```

Fig. 4.2: allineamento multiplo delle sequenze di pompa

Il risultato di tale allineamento è stato elaborato con il software MEGA e con l'algoritmo Neighbour Joining (NJ) (matrice di distanza in base al numero delle differenze di nucleotidi tra le due sequenze) per produrre un dendrogramma di similarità (Fig.4.3). La significatività dei rami del dendrogramma è stata calcolata tramite analisi bootstrap, con 1000 ricampionamenti.

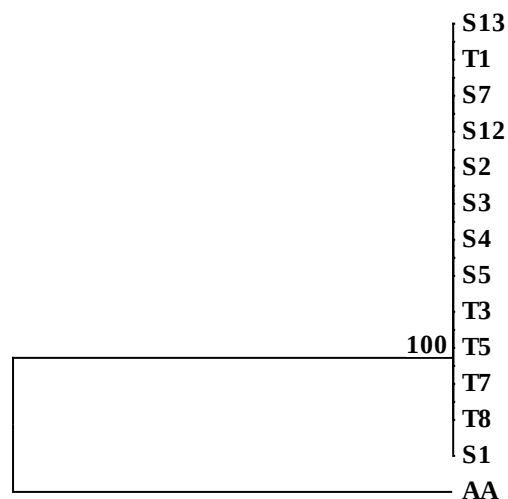


Fig.4.3: albero NJ delle sequenze di pompia oggetto di studio. Il numero rappresenta i valori di bootstrap. AA (Arancio amaro)

Come ci si aspettava, tutti i campioni prelevati dai due siti di Siniscola risultano praticamente identici. Il campione di arancio amaro, come atteso, si separa in modo chiaro dagli altri.

Tutti i campioni di pompia sono stati quindi allineati con 18 sequenze della regione ITS dell'rDNA 5.8S del genere *Citrus* e dei generi correlati quali *Fortunella* e *Poncirus trifoliata* presenti in banca dati.

Le sequenze sono state elaborate attraverso il software di analisi TreeCon ver. 1.3 (Van de Peer e De Wachter, 1994) utilizzando per la stima delle distanze l'algoritmo di Tajima and Nei (1984) al fine di costruire un dendrogramma con il metodo UPGMA (*Unparied-Group-Mathematical-Average*), la cui consistenza è stata saggiata mediante l'applicazione della tecnica di ricampionamento *bootstrap* (1000 repliche). In corrispondenza dei nodi del dendrogramma (fig.4.4) sono stati

riportati i valori di *bootstrap* (superiori al 50%), che rappresentano la percentuale di similarità fra le sequenze prese in esame.

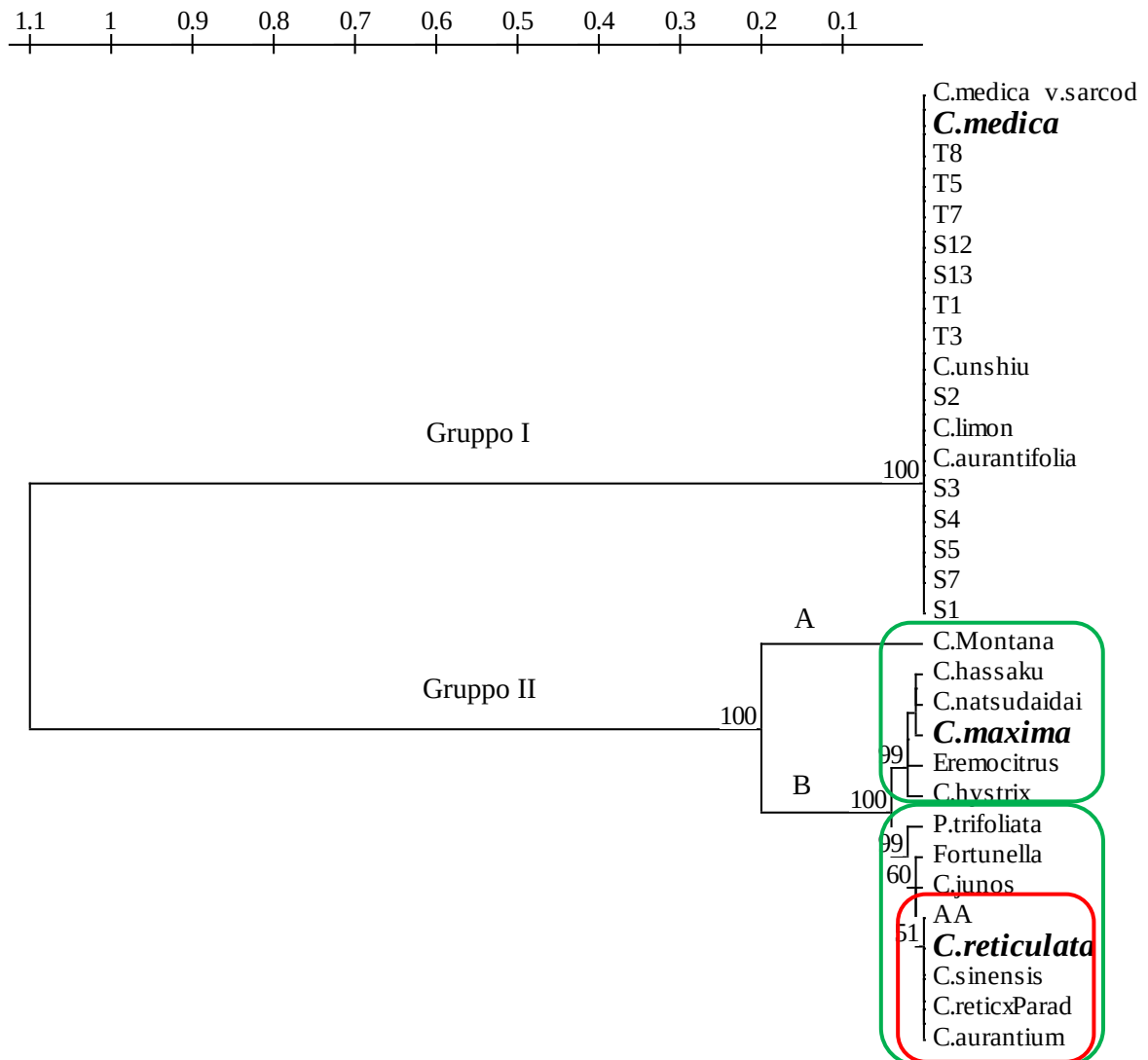


Fig. 4.4: Rappresentazione della distanza genetica fra le sequenze di pompia (rappresentate con le lettere S e T) e le sequenze delle altre specie del genere e sub generi presenti in banca dati. In grassetto sono rappresentate le 3 specie vere.

La disponibilità di sequenze di specie che appartengono allo stesso genere, ha consentito di analizzare le relazioni che intercorrono tra clusters di sequenze all'interno del genere. Come si può notare dalla fig 4.4, si possono distinguere 2 cluster ben definiti con un buon supporto di bootstrap >99%.

Il primo gruppo (Gruppo I) comprende tutti campioni di pompia e le specie ibride appartenenti alla specie vera *C. medica* (cedro), *C. x limon* (limone) e *C. x aurantiifolia*, che è coerente con l'ipotesi che il cedro sia l'antenato paterno di diversi ibridi in *Citrus* (Federici *et al* 1998; Nicolosi *et al.*, 2000). In particolare, la pompia risulta affine alla varietà *C. medica sarcodactylis*, definita anche come mano di budda, per la strana conformazione segmentata del frutto. Questa particolare varietà di cedro risulta essere altamente omologa alla pompia come mostrato nella tabella (tabella 2).



Il secondo (Gruppo II) comprende le altre specie ed ibridi della famiglia. In particolare il secondo gruppo comprende *C. montana* (Gruppo II A) da solo, il che potrebbe far presupporre una evoluzione diversa rispetto agli incroci tra ibridi e specie vere, ed il resto delle varietà ed ibridi delle 2 specie vere *C. maxima* e *reticulata* (Gruppo II B), il quale a sua volta si separa ulteriormente in 2 sotto gruppi (riquadri verdi) uno comprendente la specie vera *C. maxima* (pomelo), con l'arancio hassaku, il pompelmo (natsudaïdai), *Eremocitrus* (lime del deserto) ed *C. hystrix* (lime kafir) e l'altro comprendente la specie vera *C. reticulata* (mandarino), che insieme all'arancio amaro, all'arancio dolce e al mapo (*C. reticulata* x *paradisi*) costituiscono un ulteriore sottogruppo evidenziato con un riquadro rosso nella figura 4.4.

Analisi della regione ITS evidenziano una stretta relazione tra *Fortunella* e *Citrus*, sebbene siano morfologicamente diversi. Queste osservazioni concordano con studi molecolari precedenti (Green *et al.*, 1986, Pang *et al.*, 2007). Anche nelle nostre analisi, *Fortunella* clusterizza all'interno dei *Citrus*, in particolare è più vicina al gruppo dei *C. reticulata*, confermando la sua recente riclassificazione in *Citrus japonica* (Mabbelerey 2008 a, b). Lo stesso vale anche per *Poncirus trifoliata*, che clusterizza anche lui all'interno di *Citrus*, e che ora viene denominato *C. trifoliata* (Mabbelerey 2008 a, b).

Inoltre, come suggerito da Barret e Rhodes (1976) secondo il quale quasi tutte le specie coltivate appartengono al genere *Citrus*, e che esse deriverebbero solamente da 3 specie vere, anche i nostri risultati supportano tale ipotesi dal momento che cedro, pomelo e mandarino si posizionano in 3 cluster distinti e confermando i risultati di Kyndt *et al.* (2010) in uno studio sulle regioni ITS in accessioni di *Citrus* del Vietnam.

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 i generi, all'alta frequenza delle mutazioni delle gemme, alla loro lunga storia di coltivazione e all'enorme diffusione.

Per la caratterizzazione di tale germoplasma sono stati generalmente utilizzati criteri basati sulla descrizione di caratteri morfologici. Importanti riferimenti sono quelli del Ferrari, del Volkamer, del Gallesio, del Torgioni Tozzetti e così via. In tempi più recenti, oltre ai caratteri morfologici, anche parametri biochimici sono stati utilizzati per la caratterizzazione del germoplasma agrumicolo, in particolare, l'analisi isoenzimatica, l'utilizzo dei composti fenolici, dei flavonoidi, degli oli essenziali (Malik *et al.*, 1974, Tatum *et al.*, 1974; Esen and Sost, 1977; Torres *et al.*, 1978). Oggi le tecniche biomolecolari permettono di ampliare lo spettro delle tecniche utilizzabili ai fini della caratterizzazione genetica consentendo di superare alcuni problemi legati all'utilizzo delle tecniche prima citate.

Dal presente lavoro è emerso che, seppur l'analisi della regione ITS che codifica per la regione del DNA ribosomiale 5.8S, non sembra essere così sensibile da permettere di poter distinguere tra diversi ibridi e cv all'interno delle 3 specie vere, la parte del genoma delle accessioni di pompia, presa in considerazione, risulta essere molto vicina alla specie vera *C. medica*. In particolare, tutti gli individui di pompia analizzati in questa tesi sono risultati particolarmente vicini ad una varietà di cedro *C. medica* var. *sarcodactylis*. Pertanto è plausibile ipotizzare una stretta parentela tra cedro e pompia e sbilanciarsi nell'ipotizzare tale specie come possibile antenato paterno, dal momento che è stato dimostrato in studi precedenti che questa specie fosse l'antenato paterno di alcuni ibridi (Nicolosi *et al.*, 2000).

Il lavoro svolto è la base per ulteriori indagini volte a capire quali ibridi o genotipi bisognerà prendere in considerazione, in un lavoro futuro, al fine di chiarire le origini della pompia.

6. Ringraziamenti

Desidero ringraziare il personale dell'Istituto Professionale per l'Agricoltura e l'Ambiente (I.P.A.A.) e dell'Azienda Tholoi di Siniscola per averci messo a disposizione le piante per i prelievi del materiale vegetale.

Ringrazio inoltre il Prof. Andrea Porceddu per gli scambi di opinione e per i preziosi consigli che hanno permesso una migliore realizzazione del lavoro.

7. Bibliografia

- Agabbio M., 1994. *Patrimonio genetico di specie arboree da frutto 'Le vecchie varietà della Sardegna'*. Carlo Delfino editore.
- Albanese G., Renis M., Reforgiato Recupero G., 1992. *RFLP analysis of different lemon cultivars*. Proc Int Soc Citriculture (1): 208-209.
- Arumuganathan K., Earle E. D., 1991. *Nuclear DNA content of some important plant species*. Plant Mol Biol Rep (9): 208-218.
- Barcaccia G., Falcinelli M., 2005. *Genetica e genomica*. Ed. Liguori (1): 152-153, 200-202.
- Barkley N.A., Roose M.L., Krueger R.R., Federici C.T., 2006. *Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs)*. Theor. Appl. Genet., 112: 1519-1531
- Barrett H. C., Rhodes A. M., 1976. *A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives*. Syst. Bot. (1): 105-136.
- Blondel L., 1978. *Classification botanique des espèces du genre Citrus*. Fruits, 33:695-720
- D'Aquino S., Fronteddu F., Usai M., Palma A., 2005. *Qualitative and physiological properties of 'Pompia', a citron-like fruit*. Plant Genetic Resources Newsletter (143): 40-45.
- Davies F. S., Albrigo L.G., 1994. *Citrus. "Crop Production Science in Horticulture"*. Ed. CAB International.
- De Robertis D. P. Eduardo, De Robertis M. F. Eduardo Jr., 1987. *Biologia della cellula e molecolare*. Zanichelli.

- Deng Z. N., Gentile A., Nicolosi E., Continella G., Tribulato E., 1995. *Caratterizzazione del germoplasma di agrumi: dalle descrizioni degli antichi citrologi all'analisi del DNA*. In: *Italus Hortus* (2) n. 5-6: 68-79.
- Deng Z. N., Gentile A., Nicolosi E., Continella G., Tribulato E., 1996. *Parentage determination of some citrus hybrids by molecular markers*. *Proc Int Soc Citriculture* (2): 849-854.
- Deng Z. N., Gentile A., Nicolosi F., Domina F., Vardi A., Tribulato E., 1995. *Identification of in vivo and in vitro lemon mutants by RAPD markers*. *J. Hort. Sci.* 70 (1): 117-125.
- Doyle J. J., Beachy R. N., 1985. *Ribosomal gene variation in the soybean (Glycine) and its relatives*. *Theor. Appl. Genet.* (70): 369-376.
- Durham R. E., Lion P. C., Gmitter F. G. Jr., Moore G. A., 1992. *Linkage of restrintion fragment length polymorphisms and isozymes in Citrus*. *Theor Appl Genet* (84): 39-48.
- Dvorak J., Appels R., 1982. *Chromosome and nucleotide sequence differentiation in genomes of polyploid Triticum species*. *Theor. Appl. Genet.* (63): 349-360.
- Esen A., Soost R. K., 1978. *Separation of nucellar and zygotic citrus seedling by use of polyphenol oxidase-catalyzed browining*. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1977 (2): 616-618.
- Fancello G. 2012. *Pompia*. <http://www.taccuinistorici.it/ita/news/moderna/prodotti-tradizionali-italiani/Pompia.html>
- Federici C.T., Fang D.Q., Scora R.W., Roose M.L., 1998. *Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis*. *Theor. Appl. Genet.*, (96):812-822
- Fronteddu F., 2010. *La coltivazione dell'agrumo pompia nel comprensorio delle baronie*. Convegno: *Sa pompia-coltivazione, tradizione, innovazione e prospettive di sviluppo*". Siniscola 20 marzo 2010.

- Gerstner J. K., Schiebel, von Waldberg G., Hemleben V., 1988. *Complex organisation of the length heterogeneous external spacer of mug bean (Vigna radiata) ribosomal DNA*. Genome (30): 723-733.
- Gmitter F. G. Jr., Chen C., Machado M. A., Alves de Souza A., Ollitrault P., Froehlicher Y., Shimizu T., 2012. *Citrus genomics*. Tree Genetics and Genomes (8): 611-626.
- Gmitter F. G. Jr., Deng X., Hearn C. J., 1992. *Cytogenetic mechanism underlying reduced fertility and seedlessness in Citrus*. Proc Int Soc Citriculture (1): 125-129.
- Green R.M., Vardi A., Galune E., 1986. *The plastome of Citrus. Physical map, variation among Citrus cultivars and species and comparison with related genera*. Theor Appl Genet 72:170–177
- Jarrell D. C., Roose M. L., Traugh S. N., Kupper R. S., 1992. *A genetic map of Citrus based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross*. Theor Appl Genet (84): 49-56.
- Kirti P. B., 2008. *Handbook of new technologies for genetic improvements of legumes. Technology and Engineering*. CRC Press, United Kingdom.
- Kolchinski A., Kolesnikova M., Ananiev E., 1991. *“Potraying” of plant genomes using polymerase chain reaction amplification of ribosomal 5S genes*. Genome (34): 1028-1031.
- Kollipara K. P., Singh R. J., Hymowitz T., 1997. *Phylogenetic and genomic relationships in the genus Glycine Willd, based on sequences from the ITS region of nuclear rDNA*. Genome (49): 57-68.
- Komatsu A., Akihama T., Hidaka T., Omura A., 1993. *Identification of Poncirus strains by DNA fingerprinting*. In: *Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit trees*. Ed. T. Hayashi. Fruit Tree Research Station, Japan: 88-95.

- Krug C.A. 1943. *Chromosome numbers in the subfamily Aurantioideae with special reference to the genus Citrus*. Bot. Gaz. 48:602-611.
- Liu K. D., Yang G., Zhu S. H., Zhang Q., Wang X. M., Saghai-Maroo M. A., 1996. *Extraordinarily polymorphic ribosomal DNA in wild and cultivated rice*. Genome (39): 1109-1116.
- Lovigu N., 2007. *Caratterizzazione morfologica, biochimica e molecolare di accessioni di pompia (Citrus spp.), agrume della Sardegna*. Tesi di laurea.
- Luro F., Laigret F., Bovè J. M., Ollitrault P., 1992. *Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to citrus genetics and taxonomy*. Proc Int Soc Citriculture (1): 225-228.
- Mabberley D.J., 2008a-21. *CITRUS Linnaeus*, Sp. Pl. 2: 782. 1753. Flora China (11): 90-96
- Mabberley D.J., 2008b. *Mabberley's plant book: a portable dictionary of plants*, 3rd edn. Cambridge University Press, Avon.
- Malik M. N., Scora R. W., Soost R. K., 1974. *Studies on the origin of the lemon*. Hilgardia (42): 361-382.
- Matsuyama T., Omura M., Akihama T., 1993. *DNA fingerprinting in citrus cultivars*. In: *Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit tree*. Ed. T. Hayashi, Fruit Tree Research Station, Japan: 26-30.
- Nepolo E., Chimwamurombe P. M., Cullis C. A., Kandawa-Schulz M. A., 2010. *Determining genetic diversity based on ribosomal intergenic spacer length variation in Maramba bean (Tylosema esculentum) from the Omipanda area, Eastern Namibia*. African Journal of Plant Science (4): 368-373.
- Nickrent D. L., Patrick J. A., 1998. *The nuclear ribosomal DNA intergenic spacers of wild and cultivated soybean have low variation and cryptic subrepeats*. Genome (41): 183-191.

- Nicolosi E., Deng Z. N., Gentile A., La Malfa S., Continella G., Tribulato E., 2000. *Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers*. Theor Appl Genet (100): 1155-1166.
- Nicolosi E., Deng Z. N., La Malfa S., Gentile A., Tribulato E., 1998. *Caratterizzazione del germoplasma agrumicolo mediante marcatori biomolecolari*. Atti del 4° Convegno nazionale sulla biodiversità: germoplasma locale e sua valorizzazione (Alghero 8-11 Settembre 1998)
- Ollitrault P., Dambier D., Froelicher Y., Luro F., Cottin R. 1994. *Nuclear genome size variation in Citrus*. Fruits 49(5-6):390-393.
- Pang X.M., Hu C.G., Deng X.X., 2007. *Phylogenetic relationships within Citrus and its related genera as inferred from AFLP markers*. Genet Resour Crop Evol (54):429-436
- Penteado M. I., Garcia P., Pérez de la Vega M., 1996. *Genetic variability and mating system in three species of the genus Centrosema*. J. Hered. (87): 124-130.
- Polanco C., Pérez de la Vega M., 1995. *Length polymorphism in the ribosomal DNA intergenic spacer of rye and slender wild oats*. J. Hered. (86): 402-407.
- Polanco C., Pérez de la Vega M., 1997. *Intergenic ribosomal spacer variability in hexaploid oat cultivars and landraces*. Heredity (78): 115-123.
- Pollini A., 2002. *La difesa delle piante da frutto*. Ed. agricole.
- Reforgiato Recupero G., De Leonardis W., Piccione V., Rizza A., 1988. *A study on the identification of some lemon biotypes with leaf isozymes analysis and pollinic morphobiometry*. Proc Int Soc Citriculture (1): 167-174.
- Rogers S. O., Benedich A. J., 1987. *Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy numbers and in the intergenic spacer*. Plant Mol. Biol. (9): 509-520.
- Scora R. W., 1975. *On the history and origin of Citrus*. Bull. Torr. Bot. Club (102): 369-375.

- Scora R.W., Kumamoto J., Esen A., Stone B.C. 1976 *A phytochemical investigation of Citrus halimii*. Biochem Sys and Ecol., 4: 255-258.
- Scora R.W.: "on the history and origin of *Citrus*". Bull Tor Bot Club. 1975, 102:369-375
- Secchi C., 2008. *La valorizzazione di Sa Pompia di Siniscola, come strumento di sviluppo dell'economia rurale del territorio*. Tesi di laurea.
- Singh A., Deverumath R. M., RamaRao S., Singh V. P., Raina S. N., 2008. *Assessment of genetic diversity, and phylogenetic relationships based on ribosomal DNA repeat unit length variation and Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences in chickpea (Cicer arietinum) cultivars and its wild species*. Genet Resour Crop Evol (55): 65-79.
- Spina P., Di Martino E., 1991. *Gli agrumi*. Frutticoltura moderna, Edagricole.
- 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.
- Swingle W.T., 1943. *The 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, Berkeley: 128-474.
- Talon M., Gmitter F. G. Jr., 2008. *Citrus genomics*. International Journal of Plant Genomics (2008).
- Tanaka T. 1977. *Fundamental discussion of Citrus classification*. Stud. Citrol. 14: 1-6.
- Tatum J. H., Berry R. E., Hearn C. J., 1974. *Characterization of citrus cultivars and separation of nucellar and zygotic seedlings by thin-layer chromatography*. Proc. Fla. State Hort. Soc. (87): 75-81.
- Torres A. M., Soost R. K., Diedenhofen U., 1978. *Leaf isozyme as genetic markers in citrus*. Am. J. Bot. (65): 869-881.

- Torres A. M., Soost R. K., Mau-Lastovicka T., 1982. *Citrus isozymes*. J. Hered. (73): 335-339.
- Vacante V., Calabrese F., 2009. *Citrus: Trattato di agrumicoltura*. Edagricole
- Valli R., 1996. *Arboricoltura generale e speciale*. Edagricole, Bologna.
- Yamamoto M., Kobayashi S., Nakamura Y., Yamada Y., 1993. *Phylogenetic relationships of Citrus revealed by diversity of cytoplasmic genomes*. In: *Techniques on gene diagnosis and breeding in fruit tree*. Ed. T. Hayashi, Fruit Tree Research Station, Japan: 39-46.
- Zimmer E. A., Jupe E. R., Walbot V., 1988. *Ribosomal gene structure, variation and inheritance in maize and its ancestors*. Genetics (120): 1125-1136.