



Interreg



UNIONE EUROPEA

MARITTIMO-IT FR-MARITIME

Fondo Europeo di Sviluppo Regionale



Vitamine per l'agricoltura e il turismo.
Vitamines pour l'agriculture et le tourisme.

PROGETTO MARE DI AGRUMI

MARchio turistico e biotEcnologie verDi per lo sviluppo di Imprese su una risorsa comune: gli AGRUMI



Componente T1 "Sviluppo delle imprese tramite biotecnologie verdi, scambi e reti"

Prodotto T.1.1.2 "Documento sulla caratterizzazione morfogenetica delle specie analizzate"

**La cooperazione nel cuore del Mediterraneo
La coopération au coeur de la Méditerranée**

CERSAA (Versione italiana)

CARATTERIZZAZIONE DI *CITRUS MYRTIFOLIA* SEL. "SAVONA"

L'obiettivo del lavoro di CeRSAA svolto in questa componente è stata l'individuazione di possibili mutazioni puntiformi capaci di identificare, anche dal punto di vista genetico, il *Citrus myrtifolia* selezione "Savona", al *C. myrtifolia* di altre selezioni.

Dal punto di vista fenologico – ovvero osservando visivamente le piante di Chinotto di Savona e confrontandole con quelle di chinotto provenienti da altre aree di coltivazione o di conservazione – appare evidente la diversità del Chinotto di Savona rispetto a tutte le altre selezioni rintracciabili in coltivazione o in collezione, al di fuori della Liguria.

In particolare, grandi differenze si osservano a livello dei principali descrittori morfologici. La descrizione dell'aspetto delle piante rappresenta uno dei più importanti strumenti d'indagine della biodiversità. Tale descrizione, basata sul rilievo di caratteri morfofisiologici, consente di caratterizzare, distinguere e identificare le varietà, utilizzando apposite metodologie di confronto. I descrittori si riferiscono generalmente a caratteri altamente ereditabili e stabili e, spesso, costituiscono anche gli elementi di base della classificazione tassonomica delle piante.

Tuttavia, al fine di poter disporre di un metodo rapido di identificazione della diversità tra la selezione "Savona" e tutte le altre, sarebbe molto importante poter disporre di una "sonda" in grado di individuare le differenze anche a livello genetico.

Sulla base di queste considerazioni, è stato sviluppato un lavoro parallelo di misurazione dei parametri morfologici e di indagine sulle possibilità di messa a punto di una sonda molecolare specifica.

L'INDAGINE MORFOLOGICA

Per il presente lavoro, sono stati selezionati e utilizzati alcuni descrittori di caratterizzazione indicati dal sistema internazionale IPGRI/Bioversity. La selezione dei descrittori si è basata sia sull'importanza degli stessi per una immediata percezione delle caratteristiche morfologiche e fisiologiche della specie/selezione, sia sulla destinazione d'uso del presente manuale, in cui convivono aspetti agronomici con altri di tipo storiografico ed economico.

Nella tabella sottostante, si riporta il raffronto tra i principali caratteri morfologici del chinotto "Savona" e del chinotto "Calabria", che può essere ritenuto rappresentativo delle selezioni di chinotto diverse dal chinotto "Savona".

CONFRONTI TRA CHINOTTO "SAVONA" E CHINOTTO "CALABRIA"			
DESCRITTORI			
<i>All observations should be made on plants of the same age (not less than years old)</i>			
	Chinotto "Savona"		Chinotto "Calabria"
Rootstock	<i>Sour orange</i> <i>Other</i>		
Ratio trunk/rootstock diameter	<i>Same</i>		
Scion trunk surface	<i>Smooth</i>		
Tree shape	<i>Spheroid</i>		
Tree growth habit	<i>Spreading</i>		
Density of branches	Dense	Medium	
Branch angle	Medium	Narrow	
Spine density on adult tree (not on suckers)	<i>Absent</i>		
Shoot tip colour	<i>Green</i>		
Shoot tip surface	<i>Glabrous</i>		
Vegetative life cycle	<i>Evergreen</i>		
Leaf division	<i>Simple</i>		
Intensity of green colour of leaf blade	<i>Dark</i>		
Leaf colour variegation	<i>Absent</i>		
Leaf lamina attachment	<i>Brevipetiolate (petiole shorter than leaf lamina)</i>		
Leaf lamina length [mm]	48,5	29,2	
Leaf lamina width [mm]	31,55	19,1	
Ratio leaf lamina length/width	1,54	1,53	
Leaf thickness [mm]	0,34	0,41	
Leaf lamina shape	<i>Lanceolate</i>		
Leaf lamina margin	<i>Entire</i>		
Leaf apex	Acuminate	Acute	
Absence/presence of petiole wings	<i>Absent</i>		
Junction between petiole and lamina	<i>Fused</i>		
Flower			
Pedicel length [mm]	6,97	5,22	
Calyx diameter	<i>Small</i>		
Length of anthers relative to stigma	<i>Shorter</i>		
Flower type	<i>Hermaphrodite</i>		
Colour of open flower	<i>White</i>		
Colour of anthers	<i>White</i>		
Number of petals per flower	5		
Petal length [mm]	11-17		

CONFRONTI TRA CHINOTTO "SAVONA" E CHINOTTO "CALABRIA"
DESCRITTORI

All observations should be made on plants of the same age (not less than years old)

	Chinotto "Savona"	Chinotto "Calabria"
Petal width [mm]	5-6	
Number of stamens	> per petal	
Flowering month		
Start date	March	february
End date	april	march
Fruiting season	Early	Midseason
Fruiting season dates		
Start of fruiting season	Sept/Oct. (green fruits)	-
End of fruiting season	Nov./Dec. (yellow fruits)	Dec/Jan. (yellow fruits)
Fruit weight [g]	43	31
Fruit diameter [mm]	41,5	34,6
Fruit length [mm]	42	35
Fruit shape	<i>Spheroid</i>	
Shape of fruit base	<i>Truncate</i>	
Shape of fruit apex	<i>Truncate</i>	
Fruit skin (epicarp) colour	<i>Light orange</i>	
Epicarp C.C.I. (See Jimenez et al. 1981)	-13 (green fruits)	10 (yellow fruits)
Width of epicarp at equatorial area [mm]	1,2	
Fruit surface texture	<i>Papillate</i>	
Adherence of albedo (mesocarp) to pulp (endocarp)	<i>Medium</i>	
Nature (conspicuousness) of oil glands (8)	<i>Conspicuous</i>	
Density of oil gland on fruit surface	<i>Intermediate (45–65/cm²)</i>	
Oil gland size on fruit surface	<i>Small (<0. mm)</i>	
Albedo colour	<i>White</i>	
Absence/presence of areola	<i>Absent</i>	
Fruit styler end	<i>Closed</i>	
Fruit attachment to stalk	<i>Strong</i>	
Segments		
Number of segments per fruit	5–9	
Adherence of segment walls to each other	<i>Medium</i>	
Segment shape uniformity	<i>Yes</i>	
Thickness of segment walls	<i>Medium</i>	
Fruit axis	<i>Solid</i>	
Cross-section shape of axis	<i>Round</i>	
Diameter of fruit axis [mm]	3,1- 5,2	
Pulp		
Pulp (flesh) colour	<i>Orange</i>	
Pulp colour intensity	<i>Light</i>	
Pulp colour uniformity	<i>Yes</i>	
Pulp firmness	Firm	Intermediate
Pulp texture	<i>Fleshy</i>	
Vesicle length	<i>Short</i>	
Indicate location of determination (stem end, styler end or centre of segment)	<i>centre of segment</i>	
Vesicle thickness	<i>Medium</i>	
Juice content in endocarp (related to total fruit weight)	Medium	Low
Seeds (Average number of seeds per fruit)	- 4	- 9
Seed shape	<i>Fusiform</i>	

CONFRONTI TRA CHINOTTO "SAVONA" E CHINOTTO "CALABRIA"
DESCRITTORI

All observations should be made on plants of the same age (not less than years old)

	Chinotto "Savona"	Chinotto "Calabria"
Seed surface	<i>Smooth</i>	
Seed colour	<i>Cream</i>	
Cotyledon colour	<i>Light yellow-cream</i>	
Chalazal spot colour	<i>White</i>	
Seed embryony	<i>Mixture of both</i>	
Tree age [y]	<i>2anni</i>	
Scion/rootstock compatibility	<i>Good</i>	
Tree vigour (Against tree grafted on Citrus aurantium "comun")	<i>Low</i>	
Tree height [m]	3,5	3,2
Canopy diameter [m]	3,5	3
Leaf		
Number of oil glands (per cm ² , observed on the leaf lower surface, in a 0,5x 0,5 cm window)	<i>> 120</i>	
Oil gland size on fruit surface	<i>Small ($\leq 0. mm$)</i>	
Colour of leaf upper/lower surface	<i>Same</i>	
Nerves on leaf upper surface	<i>Flat</i>	
Angle of leaf bases	<i>Acute</i>	
Angle of leaf apex	<i>Acute</i>	
Petiole attachment to twigs	<i>Straight</i>	
Petiole length	<i>- 1mm</i>	
Flower		
Arrangement of flowers	<i>Solitary</i>	
Stamina length	<i>Medium</i>	
Separation of filament	<i>Partially united</i>	
Anther dehiscence	<i>Moderate</i>	
Style shape	<i>Straight</i>	
Flowering regularity	<i>Yes</i>	
Flowering abundance	<i>Abundant</i>	
Secondary flowering	<i>Present</i>	
Fruit		
Bearing cycle [d]	210-240	210-270
Bearing habit	<i>Outside</i>	
Yield behaviour	<i>Regular</i>	
Alternation	<i>Irregular</i>	
Oil Brix (optical density Bby refractometer) at 20°C	8,16	10,11
Yield per tree [kg/tree]	10	15
Yield efficiency	<i>Yes</i>	

Conclusioni relative all'indagine morfometrica

Come si può notare, le differenze principali, dal punto di vista morfologico, si osservano a livello di forma e dimensione del fogliame, habitus della pianta, quantità di fruttificazione, numero di semi e altri descrittori specifici.

Da tali misurazioni e valutazioni, il Chinotto selezione "Savona" risulta essere significativamente diverso rispetto al Chinotto selezione "Calabria", utilizzato nelle attività di confronto quale rappresentante delle selezioni di chinotto diverse dalla "Savona".

Il Chinotto selezione "Savona" è pertanto facilmente distinguibile da altri chinotti di selezioni differenti sia a livello di pianta, che a livello di frutto. Questo risultato offre la garanzia di un rapido e semplice discernimento a livello di controllo della coltura in atto e della produzione, garantendo le necessarie garanzie per la valorizzazione, la promozione e la certificazione della produzione.

L'INDAGINE GENETICA

Accanto all'indagine morfologica, è stato avviato un complesso lavoro di indagine genetica finalizzato ad individuare possibili differenze a livello genotipico e alla loro possibilità di uso quale "sonda molecolare" rapida per l'identificazione specifica del Chinotto selezione "Savona".

A partire, quindi, dal 2017, è iniziato un lavoro finalizzato all'ottenimento di un profilo di DNA specifico con lo scopo di ottenere la rapida tipizzazione di *Citrus × myrtifolia* ecotipo "Savona", mediante la creazione di un codice genetico identificativo.

Il lavoro è stato condotto in due distinte fasi, di seguito analiticamente descritte.

Fase 1. Definizione del profilo genetico

L'analisi ha previsto la definizione del profilo genetico mediante realizzazione di:

1. Studio INTRA-VARIETALE: campioni (foglie) prelevati da individui diversi appartenenti alla stessa varietà di *Citrus myrtifolia* "Savona"; numero minimo: 12 individui. Si è proceduto al campionamento di n. 13 individui distinti tutti appartenenti al gen. *Citrus × myrtifolia* ecotipo Savona. Tali individui sono stati processati mediante estrazione del DNA, condotta su due repliche analitiche, e successiva analisi TBP® (Tubulin-based polymorphism) e corsa elettroforetica capillare, condotta su quattro repliche analitiche. Questa sotto-fase ha avuto lo scopo di identificare l'esistenza di variabilità (variazione alleliche) all'interno della stessa varietà mediante il metodo TBP®.
2. Studio INTER-VARIETALE: campioni (foglie) prelevati da varietà diverse da *Citrus myrtifolia* "Savona" (esempio: ecotipi provenienti da altre regioni oppure differenti ranghi tassonomici come *Citrus aurantium*); numero minimo: 12 varietà. Si è proceduto al campionamento di n. 23 individui distinti appartenenti a 23 varietà o ecotipi diversi da quella da tipizzare geneticamente (*Citrus × myrtifolia* ecotipo Savona). Tali individui sono stati processati mediante estrazione del DNA, condotta su due repliche analitiche, e successiva analisi TBP® (Tubulin-based polymorphism) e corsa elettroforetica capillare, condotta su quattro repliche analitiche. Questa sotto fase ha lo scopo di identificare l'esistenza di variabilità (variazione alleliche) tra varietà diverse consentendo di definire un profilo unico per la varietà da tipizzare, evidenziato col metodo TBP®.

Sintesi dei risultati della fase 1

L'analisi dei profili TBP garantisce, laddove sia possibile riconoscere profili genetici identificativi, la rapida tipizzazione di qualunque vegetale, utilizzando una sorta di "codice a barre". Nel nostro caso le specie *C. x myrtifolia* e *C. aurantium* presentano profili TBP esattamente identici per cui l'approccio utilizzato si è rivelato non adeguato alla tipizzazione rapida di *Citrus × myrtifolia* ecotipo "Savona". Si è, pertanto, proceduto all'attuazione della Fase 2, finalizzata a trovare un percorso alternativo per la caratterizzazione genetica delle differenze visibili a livello morfologico.

I dettagli sono riportati in Allegato 1.

Fase 2. Identificazione di polimorfismi in sequenza, esclusivi *C. x myrtifolia* ecotipo "Savona"

Poiché lo studio dell'esistenza di mutazioni avvenute a carico della sequenza potrebbe fornire uno strumento utile per la definizione di sonde molecolari altamente specifiche, in grado di identificare in maniera univoca una specie dall'altra, si è deciso di procedere all'identificazione di polimorfismi in sequenza, esclusivi per *C. x myrtifolia* e per *C. x myrtifolia* ecotipo "Savona", attraverso due distinte fasi analitiche, di cui solo la prima è stata per ora portata a termine:

1) Prima parte

- Analisi su Database
- Ricerca in banca dati su sequenze già depositate per Citrus
- Disegno di 4 coppie di primers
- Amplificazione di *C. myrtifolia* 'Savona':
- Sequenziamento di 4 prodotti da *C. myrtifolia* 'Savona'
- Identificazione di polimorfismi utili
- Disegno di sonde specifiche
- Test delle sonde su diversi *C. myrtifolia*

Sintesi dei risultati – Fase 2 (prima parte)

Le sequenze isolate all'interno di questa prima parte di lavoro per *C. x myrtifolia* rappresentano ad oggi la prima risorsa disponibile per tale specie, in particolare relativamente alla famiglia genica delle β -tubuline. In linea generale, l'elevato livello di conservazione tipico di tali sequenze, che codificano per proteine costitutive fondamentali per i processi cellulari, è stato rimarcato dalla natura dei polimorfismi di sequenza riscontrati. Infatti, le uniche variazioni rilevate a carico delle regioni introniche, per definizione non codificanti proteina e quindi putativamente più soggette a variazione, sono state sostanzialmente di carattere puntiforme e costituite da gruppi di SNPs.

I dettagli sono riportati in Allegato 2 e 2a

2) Seconda parte

- De novo CLONING & SEQUENCING
- Analisi TBP di *C. myrtifolia* 'Savona'
- Isolamento e clonaggio manuale di 4 frammenti
- Sequenziamento
- Identificazione di polimorfismi utili
- Disegno di sonde specifiche
- Test delle sonde su diversi *C. myrtifolia*

Sintesi dei risultati – Fase 2 (seconda parte)

Le informazioni disponibili in banca dati si sono rivelate abbastanza limitate, sia in termini di quantità di specie afferenti al genere Citrus che per il numero di sequenze per specie, nonché di qualità, intesa come diponibilità di lunghe sequenze introniche.

Tuttavia i polimorfismi isolati rappresentano un buon punto di dipartenza per lo svolgimento della seconda parte diventando il target per il disegno di putative sonde specifiche per *C. x myrtifolia*. In particolare, la natura e la trasferibilità dei polimorfismi riscontrati viene verificata mediante un'ulteriore indagine condotta esclusivamente tra *C. aurantium* e *C. x myrtifolia* ecotipo Savona partendo dall'isolamento diretto per queste due specie dei prodotti TBP.

I dettagli sono riportati in Allegato 3.

Conclusioni relative all'indagine genetica

Lo strumento utilizzato (TBP) si è dimostrato valido nell'isolamento mirato di frazioni geniche, con particolare riferimento alle regioni introniche.

L'elevato livello di conservazione che caratterizza le sequenze codificanti per le β -tubuline è stato ampiamente confermato anche a livello delle loro regioni non codificanti proteina (intron). A livello di quest'ultimi, l'identità quasi totale, indagata e riscontrata nel corso delle analisi precedenti sotto forma di polimorfismi in lunghezza, all'interno della stessa specie (*C. myrtifolia*), è stata pienamente confermata.

Sono state riscontrate alcune inserzioni o delezioni inter-specifiche in grado di caratterizzare la specie in esame da quelle utilizzate come riferimento (*C. sinensis* e *C. clementina*), ma non dagli ecotipi ad essa afferenti. L'analisi della sequenza nucleotidica delle regioni universalmente considerate più dinamiche dal punto di vista evolutivo come gli introni, ha rivelato la completa staticità di tali sequenze, con trascurabili variazioni tra le specie, e inesistenti polimorfismi anche puntiformi tra ecotipi della stessa specie. La presenza di forme paraloghe delle sequenze target anche nelle specie considerate come riferimento ha, nella maggior parte dei casi, giustificato la scelta di non procedere con ulteriori indagini.

Le sequenze introniche isolate sono sicuramente l'unico esempio universalmente disponibile per *C. myrtifolia*, anche se nessuna inferenza sull'utilizzo di tali sequenze come strumento unico di diagnosi dell'ecotipo "Savona" può purtroppo essere ricavata. L'utilizzo di talune sequenze isolate, come ad esempio CISINE5171 e CISINE54, può al contrario essere considerato per la realizzazione di strumenti di indagine molecolare (sonde) in grado di distinguere *C. myrtifolia* dalle altre specie

Conclusioni generali

Il risultato delle attività di questa componente porta a concludere, almeno allo stato attuale delle conoscenze, che se da un lato l'indagine morfometrica consente di individuare e separare con certezza *Citrus myrtifolia* selezione "Savona" da altre selezioni di *C. myrtifolia*, lo stesso non si può dire dei risultati dell'indagine genetica. Essa, infatti, può individuare e separare *C. myrtifolia* da altre specie appartenenti al gen. *Citrus*, ma nulla può dire sulle diversità intravarietalì.

Il parziale successo di questa indagine, che meriterà, comunque, ulteriori approfondimenti, sottolinea, una volta di più, l'importanza del "territorio" – inteso come insieme di ambiente pedoclimatico, strategie e tecniche di coltivazione, saper-fare, tradizioni e cultura. Esso può fare la differenza tra prodotti che, pur omogenei dal punto di vista genetico, per il solo fatto di essere coltivati in un "ambiente" specifico risultano anche molto diversi gli uni dagli altri.

Esempi di questo tipo possono essere richiamati per molte specie orticole e frutticole; tra queste, l'esempio, forse, più illustre è quello del Basilico Genovese DOP. In questo caso, diverse selezioni varietali di *Ocimum basilicum* selezione "Genovese" manifestano un quadro aromatico (terpenoidico) significativamente differente, quando coltivate in Liguria tra la Lunigiana (a Est) e il confine francese (a Ovest), lungo la fascia costiera che si affaccia sul Mar Mediterraneo. Lo stesso quadro aromatico, indagato sulle medesime selezioni varietali al di fuori del territorio sopra individuato, non si ripete e risulta significativamente diverso, dal punto di vista dell'analisi statistica, da quello delle coltivazioni dell'area DOP.

I risultati del presente lavoro sottolineano, quindi, l'importanza della necessaria azione di branding e di marketing su un prodotto, il *C. myrtifolia* "Savona", che è destinato a diventare, nell'ambito del progetto "Mare di Agrumi" e più in generale nell'ambito della valorizzazione dei prodotti del territorio ligure, un fondamentale strumento e veicolo di sviluppo economico sia agricolo che turistico.

CERSAA (Versione francese)

CARACTÉRISATION DE CITRUS MYRTIFOLIA SEL. "SAVONA"

L'objectif du travail du CeRSAA pour cette composante est l'identification des possibles mutations ponctuelles, capables d'identifier, du point de vue génétique, le *Citrus myrtifolia* sélection «Savona», en le séparant de *C. myrtifolia* d'autres sélections.

Du point de vue phénologique, l'objectif a été l'observation visuelle des plantes de Chinotto de Savone, en les comparant avec celles de chinotto provenant d'autres zones de cultivation ou de conservation, pour vérifier la diversité morphologique du Chinotto de Savone par rapport à toutes les autres sélections de cette agrume cultivées ou conservées ou dehors de la Ligurie.

En particulier, on a observé grandes différences au niveau des principaux descripteurs morphologiques. La description de l'apparence des plantes est l'un des outils les plus importants pour étudier la biodiversité. Cette description, basée sur l'étude des caractères morphophysologiques, permet de caractériser, distinguer et identifier les variétés, en utilisant des méthodes de comparaison appropriées. Les descripteurs se réfèrent généralement à des caractères hautement héritables et stables et constituent souvent les éléments de base de la classification taxonomique des plantes.

Cependant, afin d'avoir une méthode rapide pour identifier la diversité entre la sélection "Savona" et tous les autres, il serait très important d'avoir une "sonde" capable d'identifier les différences, même au niveau génétique.

Sur la base de ces considérations, un travail parallèle de mesure des paramètres morphologiques et d'étude des possibilités de mise en place d'une sonde moléculaire spécifique a été développé.

LE SONDAGE MORPHOLOGIQUE

Pour le présent travail, certains descripteurs de caractérisation indiqués par le système international IPGRI / Bioversity ont été sélectionnés et utilisés. La sélection des descripteurs repose à la fois sur l'importance de la même chose pour une perception immédiate des caractéristiques morphologiques et physiologiques de l'espèce / sélection, que ce soit sur l'utilisation prévue de ce manuel, dans lequel coexistent avec d'autres aspects agronomiques de type historiographique et économique.

Dans le tableau ci-dessous, on montre la comparaison entre les principaux caractères morphologiques du chinotto «Savona» et du chinotto «Calabria», qui peut être considéré comme représentatif des sélections de Chinotto différent du chinotto «Savona».

COMPARAISON DU CHINOTTO "SAVONA" ET CHINOTTO "CALABRIA"			
DESCRIPTEURS			
<i>All observations should be made on plants of the same age (not less than years old)</i>			
	Chinotto "Savona"		Chinotto "Calabria"
Rootstock	<i>Sour orange</i> <i>Other</i>		
Ratio trunk/rootstock diameter	<i>Same</i>		
Scion trunk surface	<i>Smooth</i>		
Tree shape	<i>Spheroid</i>		
Tree growth habit	<i>Spreading</i>		
Density of branches	Dense		Medium
Branch angle	Medium		Narrow
Spine density on adult tree (not on suckers)	<i>Absent</i>		
Shoot tip colour	<i>Green</i>		
Shoot tip surface	<i>Glabrous</i>		
Vegetative life cycle	<i>Evergreen</i>		
Leaf division	<i>Simple</i>		
Intensity of green colour of leaf blade	<i>Dark</i>		
Leaf colour variegation	<i>Absent</i>		
Leaf lamina attachment	<i>Brevipetiolate (petiole shorter than leaf lamina)</i>		
Leaf lamina length [mm]	48,5		29,2
Leaf lamina width [mm]	31,55		19,1
Ratio leaf lamina length/width	1,54		1,53
Leaf thickness [mm]	0,34		0,41
Leaf lamina shape	<i>Lanceolate</i>		
Leaf lamina margin	<i>Entire</i>		
Leaf apex	Acuminate		Acute
Absence/presence of petiole wings	<i>Absent</i>		
Junction between petiole and lamina	<i>Fused</i>		
Flower			
Pedicel length [mm]	6,97		5,22
Calyx diameter	<i>Small</i>		
Length of anthers relative to stigma	<i>Shorter</i>		
Flower type	<i>Hermaphrodite</i>		
Colour of open flower	<i>White</i>		
Colour of anthers	<i>White</i>		
Number of petals per flower	5		

COMPARAISON DU CHINOTTO "SAVONA" ET CHINOTTO "CALABRIA"			
DESCRIPTEURS			
<i>All observations should be made on plants of the same age (not less than years old)</i>			
	Chinotto "Savona"		Chinotto "Calabria"
Petal length [mm]	11-17		
Petal width [mm]	5-6		
Number of stamens	> per petal		
Flowering month			
Start date	March		february
End date	april		march
Fruiting season	Early		Midseason
Fruiting season dates			
Start of fruiting season	Sept/Oct. (green fruits)		-
End of fruiting season	Nov./Dec. (yellow fruits)		Dec/Jan. (yellow fruits)
Fruit weight [g]	43		31
Fruit diameter [mm]	41,5		34,6
Fruit length [mm]	42		35
Fruit shape	<i>Spheroid</i>		
Shape of fruit base	<i>Truncate</i>		
Shape of fruit apex	<i>Truncate</i>		
Fruit skin (epicarp) colour	<i>Light orange</i>		
Epicarp C.C.I. (See Jimenez et al. 1981)	-13 (green fruits)	10 (yellow fruits)	10 (yellow fruits)
Width of epicarp at equatorial area [mm]	1,2		
Fruit surface texture	<i>Papillate</i>		
Adherence of albedo (mesocarp) to pulp (endocarp)	<i>Medium</i>		
Nature (conspicuousness) of oil glands (8)	<i>Conspicuous</i>		
Density of oil gland on fruit surface	<i>Intermediate (45–65/cm²)</i>		
Oil gland size on fruit surface	<i>Small (<0.mm)</i>		
Albedo colour	<i>White</i>		
Absence/presence of areola	<i>Absent</i>		
Fruit stylar end	<i>Closed</i>		
Fruit attachment to stalk	<i>Strong</i>		
Segments			
Number of segments per fruit	5–9		
Adherence of segment walls to each other	<i>Medium</i>		
Segment shape uniformity	<i>Yes</i>		
Thickness of segment walls	<i>Medium</i>		
Fruit axis	<i>Solid</i>		
Cross-section shape of axis	<i>Round</i>		
Diameter of fruit axis [mm]	3,1- 5,2		
Pulp			
Pulp (flesh) colour	<i>Orange</i>		
Pulp colour intensity	<i>Light</i>		
Pulp colour uniformity	<i>Yes</i>		
Pulp firmness	Firm		Intermediate
Pulp texture	<i>Fleshy</i>		
Vesicle length	<i>Short</i>		
Indicate location of determination (stem end, stylar end or centre of segment)	<i>centre of segment</i>		
Vesicle thickness	<i>Medium</i>		
Juice content in endocarp (related to total fruit weight)	Medium		Low
Seeds (Average number of seeds per fruit)	- 4		- 9

COMPARAISON DU CHINOTTO "SAVONA" ET CHINOTTO "CALABRIA"
DESCRIPTEURS

All observations should be made on plants of the same age (not less than years old)

	Chinotto "Savona"	Chinotto "Calabria"
Seed shape	<i>Fusiform</i>	
Seed surface	<i>Smooth</i>	
Seed colour	<i>Cream</i>	
Cotyledon colour	<i>Light yellow–cream</i>	
Chalazal spot colour	<i>White</i>	
Seed embryony	<i>Mixture of both</i>	
Tree age [y]	<i>2anni</i>	
Scion/rootstock compatibility	<i>Good</i>	
Tree vigour (Against tree grafted on Citrus aurantium "comun")	<i>Low</i>	
Tree height [m]	3,5	3,2
Canopy diameter [m]	3,5	3
Leaf		
Number of oil glands (per cm ² , observed on the leaf lower surface, in a 0,5x 0,5 cm window)	<i>> 120</i>	
Oil gland size on fruit surface	<i>Small ($\leq 0. mm$)</i>	
Colour of leaf upper/lower surface	<i>Same</i>	
Nerves on leaf upper surface	<i>Flat</i>	
Angle of leaf bases	<i>Acute</i>	
Angle of leaf apex	<i>Acute</i>	
Petiole attachment to twigs	<i>Straight</i>	
Petiole length	<i>- 1mm</i>	
Flower		
Arrangement of flowers	<i>Solitary</i>	
Stamina length	<i>Medium</i>	
Separation of filament	<i>Partially united</i>	
Anther dehiscence	<i>Moderate</i>	
Style shape	<i>Straight</i>	
Flowering regularity	<i>Yes</i>	
Flowering abundance	<i>Abundant</i>	
Secondary flowering	<i>Present</i>	
Fruit		
Bearing cycle [d]	210-240	210-270
Bearing habit	<i>Outside</i>	
Yield behaviour	<i>Regular</i>	
Alternation	<i>Irregular</i>	
Oil Brix (optical density Bby refractometer) at 20°C	8,16	10,11
Yield per tree [kg/tree]	10	15
Yield efficiency	<i>Yes</i>	

Conclusions relatives à l'analyse morphométrique

Comme on peut le voir, les principales différences, du point de vue morphologique, sont observées en termes de forme et de taille du feuillage, d'habitus de la plante, de quantité de fructification, de nombre de graines et d'autres descripteurs spécifiques. À partir de ces mesures et évaluations, le Chinotto «Savona» se révèle être significativement différent par rapport à la sélection Chinotto «Calabria», utilisé dans la comparaison, en tant que représentant de Chinotto de différentes sélections.

La sélection Chinotto "Savona" se distingue donc facilement des autres Chinotti de différentes sélections tant au niveau des plantes qu'au niveau des fruits. Ce résultat offre la garantie d'un discernement rapide et facile, en assurant les garanties nécessaires à la mise en valeur, la promotion et la certification de la production.

LE SONDAGE GÉNÉTIQUE

Parallèlement à l'investigation morphologique, un travail complexe d'enquête génétique a été initié pour identifier les différences possibles au niveau génotypique et leur possibilité d'utilisation comme "sonde moléculaire" rapide pour l'identification spécifique de la sélection Chinotto "Savona".

À partir de 2017, on a commencé un travail visant à obtenir un profil d'ADN spécifique dans le but d'obtenir le typage rapide de *Citrus myrtifolia* écotype « Savona », par la création d'un système identifiant le code génétique.

Le travail a été mené en deux phases distinctes, décrites ci-dessous analytiquement.

Phase 1. Définition du profil génétique

L'analyse a permis de définir le profil génétique en réalisant:

1. Étude INTRA-VARIETALE: échantillons (feuilles) prélevés sur différents individus appartenant à la même variété de *Citrus myrtifolia* "Savona"; nombre minimum: 12 individus. On a échantillonné n. 13 individus distincts appartenant tous à l'écotype *Citrus* × *myrtifolia* «Savona». Ces individus ont été traités par extraction d'ADN, effectuée sur deux répliques analytiques, puis analysés par TBP® (polymorphisme à base de tubuline) et par électrophorèse capillaire, effectués sur quatre répliques analytiques. Cette sous-phase visait à identifier l'existence d'une variabilité (variation allélique) au sein de la même variété par la méthode TBP®.

2. Etude INTER-VARIETES: échantillons (feuilles) tirées de diverses variétés de *Citrus myrtifolia* «Savona» (exemple: écotypes d'autres régions ou différentes espèces comme *Citrus aurantium*); nombre minimum: 12 variétés. On a échantillonné n. 23 individus distincts appartenant à 23 variétés ou écotypes différents de celui à typer génétiquement (écotype *Citrus* × *myrtifolia* Savona). Ces individus ont été traités par extraction d'ADN, effectuée sur deux répliques analytiques, puis analysés par TBP® (polymorphisme à base de tubuline) et par électrophorèse capillaire, effectués sur quatre répliques analytiques. Cette sous-phase vise à identifier l'existence d'une variabilité (variation allélique) entre différentes variétés permettant de définir un profil unique pour la variété à typer, mis en évidence par la méthode TBP®.

Résumé des résultats de la phase 1

L'analyse des profils TBP garantit, lorsqu'il est possible de reconnaître les profils d'identification génétique, le typage rapide de tout légume, en utilisant une sorte de "code à barres". Dans notre cas, l'espèce *C. x myrtifolia* et *C. aurantium* présentent des profils de TBP donc l'approche exactement identiques utilisés a prouvé ne convient pas pour le typage rapide de *Citrus myrtifolia* écotype « Savona ». Nous avons donc procédé à la mise en œuvre de la phase 2 visant à trouver une voie alternative pour la caractérisation génétique des différences visibles au niveau morphologique.

Les détails figurent à l'annexe 1.

Phase 2. Identification des polymorphismes séquentiels, écotype exclusif de *C. x myrtifolia* "Savona"

Depuis l'étude de l'existence de mutations qui se produisent dans la charge de la séquence pourrait fournir un outil utile pour la définition de sondes moléculaires très spécifiques, capables d'identifier sans ambiguïté une espèce d'autre part, il a été décidé de procéder à l'identification des polymorphismes en séquence, exclusive pour *C. x myrtifolia* et pour *C. x myrtifolia* écotype "Savona", à travers deux étapes analytiques distinctes, dont seule la première a été complétée:

1) première partie

- Analyse de la base de données
- Recherche de base de données sur des séquences déjà déposées pour Citrus
- Dessin de 4 paires d'amorces
- Amplification de *C. myrtifolia* 'Savona':
- Séquençage de 4 produits de *C. myrtifolia* 'Savona'
- Identification de polymorphismes utiles
- Dessin de sondes spécifiques
- Test de sondes sur différents *C. myrtifolia*

Résumé des résultats - Phase 2 (première partie)

Les séquences isolées à l'intérieur de cette première partie de l'ouvrage de *C. x myrtifolia* représentent aujourd'hui la première ressource disponible pour cette espèce, en particulier en relation avec la famille de gènes de la β -tubuline. En général, le niveau élevé de conservation typique de ces séquences, qui codent pour des protéines constitutives fondamentales pour les processus cellulaires, a été souligné par la nature des polymorphismes de séquences trouvés. En fait, les seuls changements constatés dans la charge des régions introniques, par définition de la protéine non codante putative et donc plus sujettes à des variations, ont été le caractère essentiellement punctiformes et se composent de groupes de SNPs.

Les détails sont indiqués dans les annexes 2 et 2b.

2) Deuxième partie

- De novo CLONING & SEQUENCING
- Analyse TBP de *C. myrtifolia* 'Savona'
- Isolement et clonage manuel de 4 fragments
- Le séquençage
- Identification de polymorphismes utiles
- Dessin de sondes spécifiques
- Test de sondes sur différents *C. myrtifolia*

Résumé des résultats - Phase 2 (deuxième partie)

Les informations disponibles dans la base de données se sont révélés être très limitée, tant en termes de nombre d'espèces appartenant au genre *Citrus* que par le nombre de séquences par espèces, ainsi que la qualité, comprise comme la non-disponibilité des longues séquences d'introns.

Cependant, les polymorphismes isolés représentent un bon point de départ pour le développement de la deuxième partie, devenant la cible pour la conception de sondes putatives spécifiques à *C. x myrtifolia*. En particulier, la nature et la transférabilité des polymorphismes observés est vérifiée par une autre enquête menée uniquement entre *C. aurantium* et *C. x myrtifolia* écotype Savona, isolement direct à partir de ces deux espèces de produits de TBP.

Les détails sont indiqués à l'annexe 3.

Conclusions concernant la recherche génétique

L'instrument utilisé (TBP) s'est avéré valable pour l'isolement ciblé des fractions de gènes, avec une référence particulière aux régions introniques.

Le haut niveau de conservation qui caractérise les séquences codantes pour les β -tubulines a également été largement confirmé au niveau de leurs régions protéiques non intrusives (introns). Un niveau de celui-ci, l'identité presque totale, étudié et trouvé dans le cadre de l'analyse qui précède, sous la forme de polymorphismes de longueur, à l'intérieur de la même espèce (*C. Myrtifolia*), a été pleinement confirmé.

Certaines insertions ou délétions interspécifiques ont permis de caractériser les espèces examinées par rapport à celles utilisées comme référence (*C. sinensis* et *C. clémentine*), mais pas par les écotypes associés. L'analyse de la séquence nucléotidique des régions universellement considérées du point de vue de l'évolution que introns les plus dynamiques, a révélé l'immobilité complète de ces séquences, avec des variations négligeables entre les espèces, ainsi que des polymorphismes punctiformes inexistantes entre écotypes de la même espèce. La présence de formes paralogues des séquences cibles, même chez les espèces considérées comme des références, justifie, dans la plupart des cas, le choix de ne pas poursuivre les investigations.

Les séquences isolées introns sont certainement le seul exemple universellement disponible pour *C. myrtifolia*, même si aucune conclusion sur l'utilisation de ces séquences comme un instrument unique pour le diagnostic écotype «Savona» ne peut malheureusement être obtenue. L'utilisation de certaines séquences isolées, comme CISINE5171 et CISINE54, peut au contraire être envisagée pour la réalisation d'instruments de sondage moléculaire (sondes) apte à distinguer des autres espèces *C. Myrtifolia*

Conclusions générales

Le résultat de l'activité de cette composante conduit à la conclusion, au moins dans l'état actuel des connaissances, que si d'une part l'enquête morphométrique permet d'identifier et de séparer avec certitude agrumes sélection *myrtifolia* «Savona» par d'autres sélections de *C. myrtifolia*, le même les résultats de l'enquête génétique ne peuvent pas être dit. En fait, il peut identifier et séparer *C. myrtifolia* d'autres espèces appartenant à gén. *Citrus*, mais rien ne peut dire sur la diversité intravariétale.

Le succès partiel de cette enquête, qui mérite cependant une étude plus approfondie, souligne, encore une fois, l'importance du le «terroir» - comprise comme un ensemble des sols et le climat, les stratégies et les techniques de culture, de savoir-faire, les traditions et la culture. Cela peut faire la différence entre des produits, même homogènes du point de vue génétique, car le seul fait d'être cultivés dans un "environnement" spécifique est également très différent l'un de l'autre.

Des exemples de ce type peuvent être rappelés pour de nombreuses espèces horticoles et fruitières; Parmi ceux-ci, l'exemple le plus illustre est peut-être celui de l'AOP Basilico Genovese. Dans ce cas, les différentes variétés de *Ocimum basilicum* sélection «Genovese» présente un cadre aromatique (terpenoïdique) significativement différent lorsqu'il est cultivé en Ligurie entre la Lunigiana (à l'est) et la frontière française (ouest) et entre la bande côtière surplombant sur la mer Méditerranée. Une enquête sur le même cadre aromatique menée sur les mêmes sélections variétales cultivées au dehors du territoire identifié ci-dessus, ne répète pas les mêmes résultats en étant sensiblement différent, du point de vue de l'analyse statistique, de celle de la zone des cultures AOP.

Les résultats de ces travaux soulignent, par conséquent, l'importance des actions de protection et de commercialisation nécessaires sur un produit, le *C. myrtifolia* "Savona", destiné à devenir, dans le cadre du projet "Mare di Agrumi" et plus encore en général, dans le cadre de la mise en valeur des produits du territoire ligure, outil et vecteur de développement économique, tant pour l'agriculture que pour le tourisme.

ALLEGATO 1



RAPPORTO DI PROVA N° 41
DATA: 16/03/2017
CLIENTE: CERSAA
NUMERO CAMPIONI CONFERITI: 36

OGGETTO: Tipizzazione genetica *Citrus* × *myrtifolia* ecotipo Savona

Obiettivi: Individuazione di un profilo esclusivo per *Citrus* × *myrtifolia* ecotipo Savona, con conseguente tipizzazione mediante codice genetico TBP dalle regioni geniche del I e II introne.

Per tutti i campioni è stata rispettata la procedura di analisi definita dal contratto stipulato tra le parti che ha previsto, una doppia estrazione del DNA (2 estratti distinti) dal materiale vegetale, una doppia amplificazione (2 amplificati distinti), due distinte corse in elettroforesi capillare (2 corse distinte). Ogni campione risulta quindi rappresentato da 8 distinte reazioni.

Le analisi concordate tra le parti si sono articolate in due sotto fasi:
Sotto fase 1 – Valutazione INTRA-VARIETALE

Campioni analizzati

S1	San Pietro	San Pietro in Carpignano (SV)	M1	Marmorassi	Marmorassi (SV)
S2	San Pietro	San Pietro in Carpignano (SV)	M2	Marmorassi	Marmorassi (SV)
S3	San Pietro	San Pietro in Carpignano (SV)	M3	Marmorassi	Marmorassi (SV)
S4	San Pietro	San Pietro in Carpignano (SV)	M4	Marmorassi	Marmorassi (SV)
F1	Ottone	Borgio Verezzi (SV)	M5	Marmorassi	Marmorassi (SV)
F2	Ottone	Borgio Verezzi (SV)			
F3	Ottone	Borgio Verezzi (SV)			
F4	Ottone	Borgio Verezzi (SV)			

E' stato prodotto un profilo TBP per entrambe le regioni del I e il II introne. Dal raffronto dei profili ottenuti non è stata riscontrata nessuna variazione nel numero e nella dimensione degli intorni (picchi). **Figura 1** riporta i profili relativi al I e II introne di un singolo individuo per ciascun gruppo (San Pietro, Ottone e Marmorassi). I valori numerici relativi all'analisi di tutti gli individui e successiva corsa in elettroforesi capillare, sono raccolti nell'**Allegato 1**.

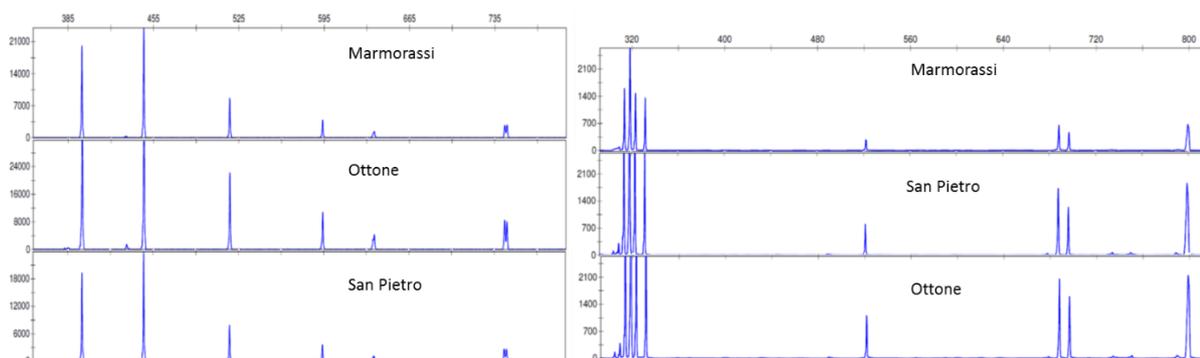


Figura 1: Da sinistra a destra, profilo TBP del I e II introne rispettivamente, relativamente ad un singolo individuo per ciascuno dei tre gruppi analizzati. Ogni picco rappresenta un introne di un diverso membro della famiglia genica. L'intensità del picco è espressa in ordinata in RFU (Relative Fluorescence Units) e la sua dimensione, seconda l'ascissa, in paia di basi (bp).



Sotto fase 2 – Valutazione INTER-VARIETALE

Campioni analizzati

	Taxa		Origine
2	Citrus aurantium L. 'Bouquetier de Nice'	Arancio amaro	Tintori
3	Citrus aurantium L. 'Corniculata'	Arancio amaro cornuto	Hanbury
4	Citrus aurantium L. 'Salicifolia' o 'Granito'	Arancio amaro a foglia di salice	Hanbury
5	Citrus bergamia Risso et Poit. 'Femminiello'	Bergamotto	Hanbury
6	Citrus limetta Risso	Limetta dolce romana	Sicilia
7	Citrus limettoides Tanaka		Sicilia
8	Citrus limon Burm.f. 'Canaliculata'	Limone incannellato o scannellato	Tintori
9	Citrus maxima Merr.	Pummelo o Sciadocco	Hanbury
10	Citrus myrtifolia Raf.	Chinotto	Hanbury
11	Citrus sinensis Osbeck.		Hanbury
12	Citrus x paradisi Macfad.	Pompelmo	Hanbury
13	Citrus aurantium L. 'Bizzarria'	Bizzarria	Tintori
14	Citrus bergamia Risso et Poit. 'Polpa verde'	Bergamotto	Hanbury
A	Citrus myrtifolia Raf.	Ingegnoli Chinotto calabrese	Ingegnoli
B	Citrus myrtifolia Raf.	Chinotto viavio bari	Bari
C	Citrus x bergamia		Bari
D	Citrus latifolia	Limetta	Sicilia
E	Citrus myrtifolia Raf.		Sicilia
F	Citrus maxima Merr.	Pummelo	Sicilia
G	Citrus mitis	Calamondino	Sicilia
H	Citrus aurantium L.	Varietà Amara, Chinotto di Savona	Azienda Pamparino, Finale (SV)
I	Citrus limon		CeRSAA
L	Citrus reticulata	varietà antica	Azienda Minuto, Savona

E' stato prodotto un profilo TBP per entrambe le regioni del I e il II introne per tutti i campioni riportati in tabella. L'albero filogenetico in **Figure 2**, ottenuto dall'analisi concomitante del profilo del I e II, mostra con chiarezza la relazione esistente tra tutti i campioni analizzati in funzione delle presenza/assenza di intorni condivisi.

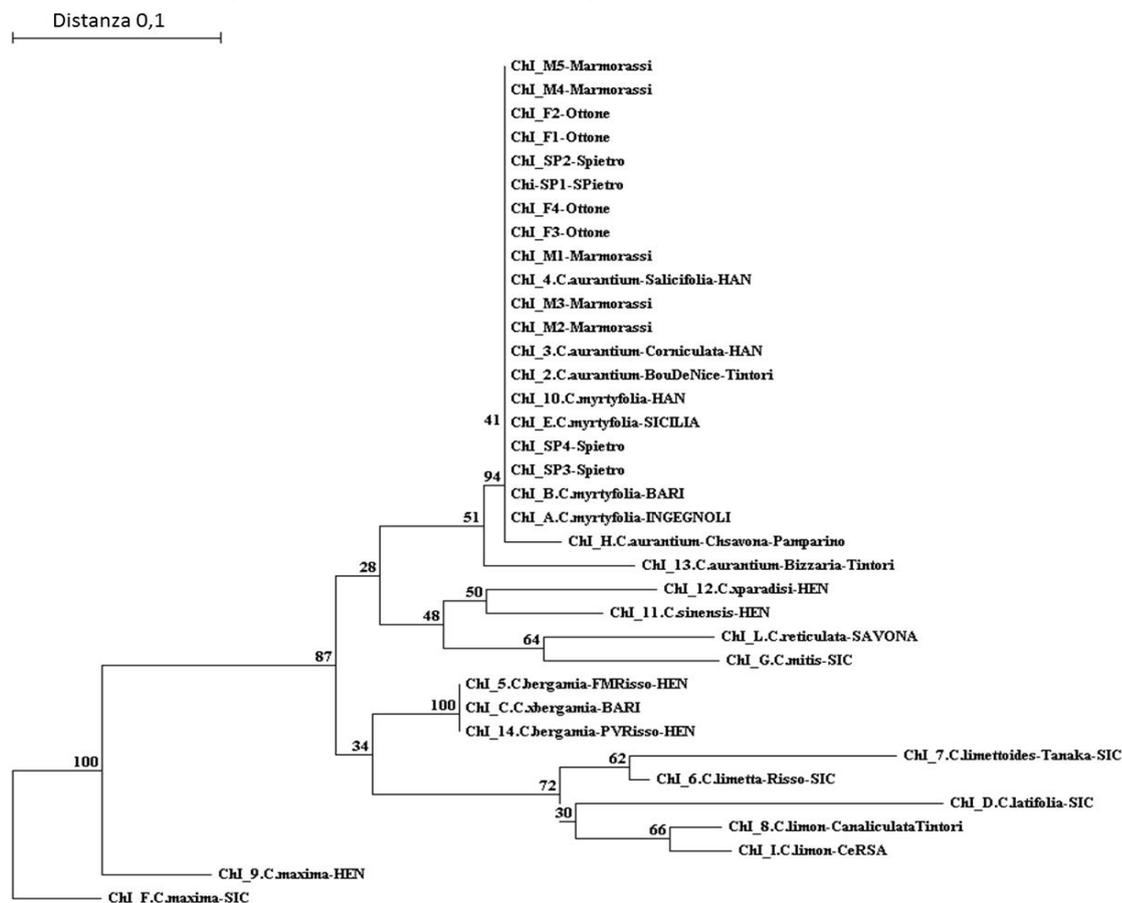


Figura 2: Albero filogenetico ottenuto mediante metodo Neighbour-joining. La dicitura completa di ogni singola accessione è riportata nella Tabella sovrastante. I numeri riportati ai nodi di ciascun ramo (bootstrap values) rappresentano la probabilità che ri-campionando il dato 1000 volte, questo restituisca il raggruppamento dato nella medesima posizione.

Sede: Via Edoardo Bassini 15 - 20133 Milano (MI)

Tel. +39 02 23699 /402 Segreteria /430 Direzione /413 Amministrazione - Fax +39 0223699411

- U.O.S. di Lodi: c/o Parco Tecnologico Padano - Via Einstein, Località Cascina Codazza - 26900 Lodi (LO)
- U.O.S. di Pisa: c/o Area della Ricerca di Pisa, Via Moruzzi, 1 - 56124 Pisa (PI)
- U.O.S. di Roma: c/o Area della Ricerca di Roma 1, Via Salaria Km 29,300 - 00015 Monterotondo S. (RM)

Osservando l'albero, è evidente che non è possibile distinguere tra le specie di *C. x myrtifolia* e *C. aurantium* se non per due singole accessioni: **H-C. aurantium**-Amara Ch.savona-Pamparino e **13-C.aurantium**-Bizzaria-Tintori che, nell'albero, si discostano dal gruppo principale.

Infatti, nel dettaglio di **Figura 3** è mostrato come sia possibile identificare per queste due accessioni, introni unici, indicati con una freccia rossa. Confrontando il loro profilo TBP II introne con *C. x myrtifolia* San Pietro e *C. x myrtifolia* Ottone rispettivamente, è possibile notare un introne di 400 bp presente soltanto in **H-C. aurantium**-Amara Ch. savona-Pamparino, e un introne di 680 bp presente soltanto in **13-C.aurantium**-Bizzaria-Tintori.

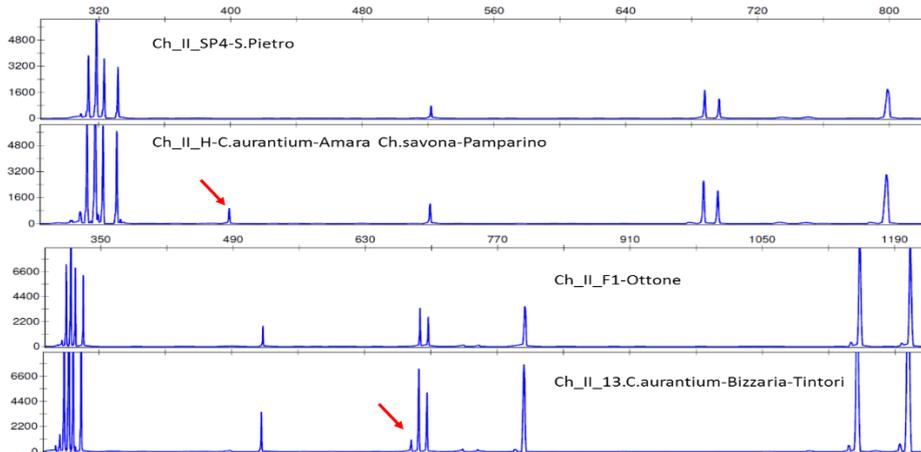


Figura 3: Raffronto tra il profilo TBP II introne delle accessioni **H-C. aurantium**-Amara Ch. savona-Pamparino, e **13-C.aurantium**-Bizzaria-Tintori con due distinti ecotipi di *C. x myrtifolia*. Gli introni unici riscontrati sono indicati da una freccia rossa

Inoltre, per il campione **13-C.aurantium**-Bizzaria-Tintori sulla regione del I introne è possibile identificare due ulteriori introni unici (414- 641 bp). Il dettaglio è riportato in **Allegato 2** che presenta il prospetto numerico di una singola corsa, rappresentativa dei campioni analizzati per il I e II introne.

Un'ulteriore indagine è stata effettuata per le accessioni **H-C. aurantium**-Amara Ch. savona-Pamparino, e **13-C.aurantium**-Bizzaria-Tintori al fine di confermare o confutare la presenza degli introni unici identificati, mediante il campionamento e l'estrazione di 3 foglie distinte per entrambe le accessioni. Le estrazioni sono state condotte in maniera indipendente definendo i seguenti campioni di analisi: **Ha, Hb e Hc** nonché **13a, 13b e 13c** (**Figura 4**). Per entrambe le accessioni il campione **a** è stato realizzato effettuando un campionando dei medesimi tessuti (**foglia**) già originariamente campionati per **H e 13** nelle due estrazioni primarie.

Chi I H	Size	395,68	446,35	517	593,41	635,74	742,47	744,37
chi_I_Ha	Size	396,95	447,64	518,26	594,45	636,95	743,98	745,98
chi_I_Hb	Size	396,93	447,58	518,16	594,45	637,01	743,97	745,97
chi_I_Hc	Size	396,93	447,58	518,3	594,53	636,9	744,07	745,98

Chi I 13	Size	395,66	413,39	446,35	516,96	593,38	635,81	640,9	742,48	744,39
chi_13a	Size	396,93	414,16	447,58	518,3	594,51	636,97	642,04	743,98	745,98
chi_13b	Size	396,93	447,53	518,22	594,48	636,98		744	746,01	
chi_13c	Size	396,93	447,58	518,24	594,53	637		744,05	746,04	

Chi II H	Size	313,03	318,03	322,79	331,09	399,31	521,22	687,26	695,93	798,23	1150,21	1203,92
chi_II_Ha	Size	313,92	318,76	323,48	331,85		522,07	688,53	697,15	799,62	1156,23	1210,69
chi_II_Hb	Size	313,92	318,67	323,41	331,81		522,09	688,43	697,14	799,62	1156,55	1210,91
chi_II_Hc	Size	314	318,69	323,39	331,78		522,01	688,42	697,06	799,53	1156,55	1210,47

Chi II 13	Size	313,2	318,03	322,81	331,17	521,3	679,44	687,38	696,04	798,33	1149,92	1203,62
chi_II_13a	Size	313,92	318,76	323,41	331,81	522,09	680,52	688,53	697,24	799,53	1156,72	1210,09
chi_II_13b	Size	313,92	318,67	323,42	331,77	522,01		688,41	697,12	799,53	1156,52	1210,09
chi_II_13c	Size	313,92	318,67	323,41	331,81	522,09		688,55	697,13	799,62	1156,44	1210,26

Figura 4: Valori numerici relativi alla dimensione dei picchi registrati nei tre campioni singoli (a, b e c) delle accessioni **H e 13**. L'approssimazione consentita per i valori registrati è di ± 1 bp. I valori sono relativi al I (prima e seconda sezione in figura) e II introne (terza e quarta sezione in figura). Nella parte alta di ogni sezione è riportata la corsa di riferimento, evidenziata in giallo, così come i picchi unici riscontrati nei campioni, anch'essi evidenziati in giallo.



Nel dettaglio, l'analisi eseguita su tre distinti campioni (a, b e c) per l'accessione **H-C. aurantium**-Amara Ch. savona-Pamparino non ha confermato il dato atteso, ovvero il picco inizialmente riscontrato nel profilo del II introne di 440 bp non è stato evidenziato in nessuno dei tre campioni singoli. Per quanto invece concerne l'accessione **13-C.aurantium**-Bizzaria-Tintori, solo il campione **13a** ha confermato quanto atteso ovvero, la presenza di due introni unici di 414- 641 bp nel I introne e di 680bp nel II introne. I restanti campioni singoli (a e b) non hanno evidenziato la presenza di tali introni. Il dato emerso evidenzia la presenza all'interno del materiale vegetale di alcuni tessuti (probabilmente una singola foglia) di diversa provenienza e riconducibili al gruppo di accessioni *C. limon* (**8-I**), *C. limetoides* (**7**), *C. limetta* (**6**) e *C. latifolia* (**8**) in virtù della presenza di tre picchi distintivi per tale gruppo.

Concludendo, possiamo affermare che con l'approccio adottato non è possibile distinguere tra le specie *C. x myrtifolia* e *C. aurantium* che presentano profili intronici esattamente identici. Le variazioni riscontrate nel campione **13-C.aurantium**-Bizzaria-Tintori sono da imputare ad eventi di contaminazione avvenuti in fase di campionamento del materiale vegetale. Alternativamente, un campionamento *ex-novo* del materiale vegetale sarebbe necessario per confutare l'eventualità di una contaminazione.

In linea generale, anche i campioni **5-C.bergamia** Risso et Poit. 'Femminiello', **14-C. bergamia** Risso et Poit. 'Polpa verde' e **C-C. x bergamia** risultano non distinguibili tra loro, in accordo con quanto atteso. Tutte le altre specie analizzate invece presentano profili con introni unici e distintivi. Interessante notare come per il gruppo *C. x myrtifolia/C. aurantium* sia possibile identificare un I introne di 594bp e un II introne di 688bp, esclusivamente condivisi con il gruppo **11-C. sinensis** Osbeck (arancio dolce), **12-C. x paradisi** Macfad (pompelmo), **G-C. mitis** (mandarino x kumquat) e **L-C. reticulata** (mandarino) a testimonianza della presenza di una linea generativa/evolutiva ancora distinguibile.

L'informazione scaturita dall'analisi dei profili TBP è esclusivamente relativa alla lunghezza della sequenze considerate e non alla loro sequenza. L'esistenza infatti di mutazioni avvenute a carico della sequenza potrebbero fornire invece uno strumento utile per la definizione di sonde molecolari altamente specifiche in grado di identificare in maniera univoca una specie dall'altra.

Li, Milano 16/03/2017

Luca Braglia Ph D.

ALLEGATO 2



RAPPORTO DI PROVA N° 45

DATA: 16/01/2018

CLIENTE: CERSAA Centro Di Sperimentazione Ed Assistenza Agricola

CONTRATTO: n° p1741 del 29/08/2017 - Fase Prima

OGGETTO: Identificazione di polimorfismi in sequenza esclusivi per *Citrus* × *myrtifolia* ecotipo Savona**Materiale vegetale**

Il materiale vegetale di riferimento è costituito dalle specie fornite da CERSAA in occasione della stipula del contratto N. 1716 del 12/12/2016 come riportato in Tabella 1

Tabella 1: Elenco del materiale vegetale oggetto di studio del presente elaborato.

Code	Latin name	Common name	Source
2	<i>Citrus aurantium</i> L. 'Bouquetier de Nice'	Arancio amaro	Tintori
3	<i>Citrus aurantium</i> L. 'Corniculata'	Arancio amaro cornuto	Hanbury
4	<i>Citrus aurantium</i> L. 'Salicifolia' o 'Granito'	Arancio amaro a foglia di salice	Hanbury
5	<i>Citrus bergamia</i> Risso et Poit. 'Femminiello'	Bergamotto	Hanbury
6	<i>Citrus limetta</i> Risso	Limetta dolce romana	Sicilia
7	<i>Citrus limetoides</i> Tanaka	Lima	Sicilia
8	<i>Citrus limon</i> Burm.f. 'Canaliculata'	Limone incannellato o scannellato	Tintori
9	<i>Citrus maxima</i> Merr.	Pummelo o Sciadocco	Hanbury
10	<i>Citrus myrtifolia</i> Raf.	Chinotto	Hanbury
11	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck.	Arancio dolce	Hanbury
12	<i>Citrus x paradisi</i> Macfad.	Pompelmo	Hanbury
13	<i>Citrus aurantium</i> L. 'Bizzarria'	Bizzarria	Tintori
14	<i>Citrus bergamia</i> Risso et Poit. 'Polpa verde'	Bergamotto	Hanbury
A	<i>Citrus myrtifolia</i> Raf.	Ingegnoli Chinotto calabrese	Ingegnoli
B	<i>Citrus myrtifolia</i> Raf.	Chinotto vivaio Puglia	Bari
C	<i>Citrus x bergamia</i>	Bergamotto	Bari
D	<i>Citrus latifolia</i>	Limetta	Sicilia
E	<i>Citrus myrtifolia</i> Raf.	Chinotto Sicilia	Sicilia
F	<i>Citrus maxima</i> Merr.	Pummelo	Sicilia
G	<i>Citrus mitis</i>	Calamondino	Sicilia
H	<i>Citrus x myrtifolia</i>	Chinotto di Savona	Azienda Pamparino, Finale (SV)
I	<i>Citrus limon</i>	Limone	CeRSAA
L	<i>Citrus reticulata</i>	Varietà antica	Azienda Minuto, Savona
S1	San Pietro	Chinotto di Savona	San Pietro in Carpignano (SV)
S2	San Pietro	Chinotto di Savona	San Pietro in Carpignano (SV)
S3	San Pietro	Chinotto di Savona	San Pietro in Carpignano (SV)
S4	San Pietro	Chinotto di Savona	San Pietro in Carpignano (SV)
F1	Ottone	Chinotto di Savona	Borgio Verezzi (SV)
F2	Ottone	Chinotto di Savona	Borgio Verezzi (SV)
F3	Ottone	Chinotto di Savona	Borgio Verezzi (SV)
F4	Ottone	Chinotto di Savona	Borgio Verezzi (SV)
M1	Marmorassi	Chinotto di Savona	Marmorassi (SV)
M2	Marmorassi	Chinotto di Savona	Marmorassi (SV)
M3	Marmorassi	Chinotto di Savona	Marmorassi (SV)
M4	Marmorassi	Chinotto di Savona	Marmorassi (SV)
M5	Marmorassi	Chinotto di Savona	Marmorassi (SV)



E' stata condotta una ricerca in banca dati mediante l'ausilio del portale di genomica vegetale comparata Phytozome v12.1 del Joint Genome Institute (JGI) all'interno del quale sono stati interrogati i dataset di sequenza disponibili per le specie afferenti al genere *Citrus*: *Citrus sinensis* (v 1.0) e *C. clementina* (v 1.1). Sono stati impostati criteri di ricerca atti alla selezione di sole sequenze di β -tubulina. Allo scopo di completare la raccolta delle informazioni disponibili, un'ulteriore ricerca è stata effettuata utilizzando gli strumenti di indagine informatici disponibili presso gli NCBI database (National Center for Biotechnology Information). L'elenco e la descrizione di tutte le sequenze complete e/o parziali, allocate o non, afferenti alla regione del gene in esame identificate, sono riportate in Tabella 2.

Tabella 2: Sequenze di β -tubulina disponibili in banca dati per le specie *C. clementina* e *C. sinensis*.

Plant species	Phytozome (>)/NCBI reference	Description	Gene ID	Location
<i>Citrus clementina</i>	>Ciclev10011723m.g (scaffold_6:15380797..15382751 rev)	tubulin beta-2 chain related	18038374 (CICLE_v10011723mg)	Unplaced
<i>cv Clemenules</i>	>Ciclev10001140m.g (scaffold_5:41945346..41948270 rev)	tubulin beta-4 chain related	18041058 (CICLE_v10001140mg)	Unplaced
	>Ciclev10028436m.g (scaffold_8:24110298..24112688 rev)	tubulin beta-4 chain related	18035052 (CICLE_v10028436mg)	Unplaced
<i>Citrus sinensis</i>	>orange1.1g013335m.g (scaffold00083:456751..458702 rev)	tubulin beta-2 chain related		Unplaced
<i>cv Valencia</i>	>orange1.1g013165m.g (scaffold00026:304979..307342 rev)	tubulin beta-4 chain related		Unplaced
	>orange1.1g047757m.g (scaffold00039:348916..351965 frw)	tubulin beta chain		Unplaced
	NC_023048.1 (27560003..27562962, complement)	tubulin beta-6 chain	102631140	Chromosome 3
	NC_023051.1 (17502108..17505792)	tubulin beta-5 chain	102608054 (CISIN_1g013154mg)	Chromosome 6
	NC_023051.1 (9302749..9304435, complement)	tubulin beta chain	102577942	Chromosome 6
	NC_023047.1 (7361299..7364696, complement)	tubulin beta chain	102615364 (CISIN_1g013391mg)	Chromosome 2
	NC_023050.1 (1955155..1957308)	tubulin beta chain-like	102612058	Chromosome 5
	NC_023054.1 (16655253..16657944)	tubulin beta-1 chain	102612022 (CISIN_1g013291mg)	Chromosome 9
	NC_023046.1 (16463121..16464511, complement)	tubulin beta chain-like	107177035	Chromosome 1
	NC_023053.1 (21724856..21727790, complement)	tubulin beta-2 chain	102624648 (CISIN_1g013165mg)	Chromosome 8
	NW_006257072.1 (1481854..1498468)	tubulin beta-5 chain-like	102620967	Unplaced

L'allineamento delle sequenze di β -tubulina raccolte in banca dati, per le due specie, ha permesso di selezionare solo le sequenze migliori, caratterizzandole tra regioni trascritte ed introniche (Tabella 3). Inoltre, l'analisi TBP (I e II introne) condotta in elettroforesi capillare su tutte le specie disponibili, ha permesso di associare le informazioni di sequenza raccolte in banca dati, ai diversi membri (picchi/introni) che compongono il profilo TBP. Questo è stato fatto utilizzando come genoma di riferimento *C. sinensis* unica delle due specie per le quali erano disponibili sia informazioni di sequenza sia materiale vegetale (Tabella 4 e Figura 1).

Tabella 3: Caratterizzazione delle regioni introniche, distinte tra I e II introne, per le sequenze nucleotidiche disponibili in banca dati per *C. clementina* e *C. sinensis*. In verde le sequenze selezionate per le analisi successive. Tutte le dimensioni sono espresse in paia di basi.

Plant species	seq CODE	I introne		II introne	
		Peak size	Intron size	Peak size	Intron size
<i>C. clementina</i>	CICLE-723	516	212	331	99
	CICLE-140	1368	1064	315	83
	CICLE-436	593	289	687	455
<i>C. sinensis</i>	CISIN-335	517	213	331	99
	CISIN-165	633	329	696	464
	CISIN-757	-	-	487	255

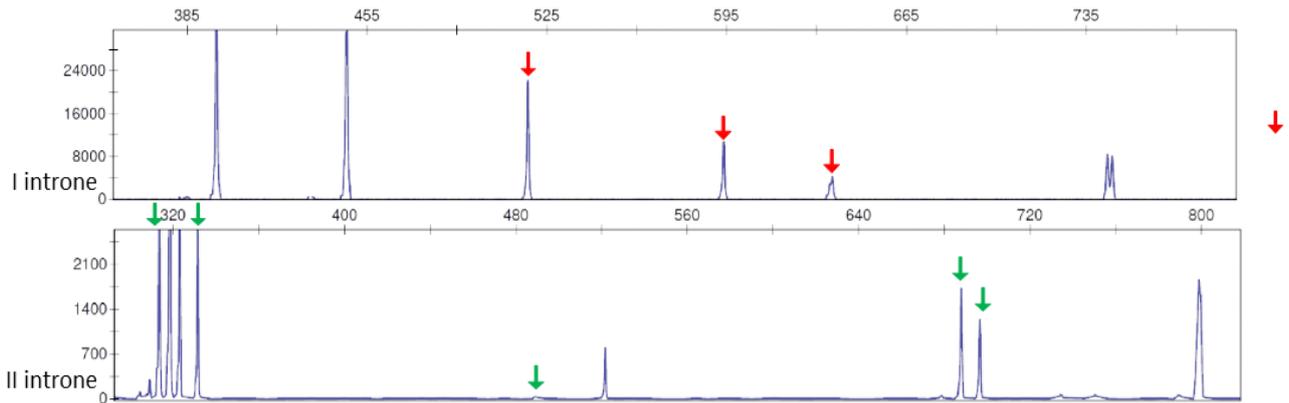


Figura 1: Ferogramma a picchi ottenuto dall'analisi TBP in elettroforesi capillare del I e II introne per *C. sinensis*. Le frecce rosse e verdi indicano i picchi per le quali sono disponibili in banca dati informazioni di sequenza, le cui dimensioni sono riportate in Tabella 4. La freccia rossa al di fuori del profilo TBP I introne indicata un picco la cui dimensione (1368bp) rimane al di fuori delle finestra di detection garantita dall'analisi (300-1200 bp).

Fissato quindi come target di indagine le regioni introniche del gene, sono state privilegiate quelle sequenze dotate di lunghi introni, sulle quali sono state disegnate 12 diversi primers (Tabella 5). Le sequenze nucleotidiche complete, corredate della sequenza e posizione dei rispettivi primers sono riportate in Allegato 1. Lo scopo di questi primers è stato quello di valutarne la trasferibilità su *C. x myrtifolia*, isolando dai prodotti PCR con essi ottenuti, sequenze specifiche per la tale specie. Alcune di queste combinazioni di primers sono state concepite per amplificare aree del gene a cavallo tra le due regioni introniche (Figura 2), in modo da garantire una maggior probabilità di identificare polimorfismi specifici per *C. x myrtifolia*.

Tabella 5: Sequenza nucleotidica e denominazione dei primer disegnati sulle sequenze disponibili in banca dati per *C. clementina* (CICLE) e *C. sinensis* (CISIN).

Name	Primer sequence	bp
Cicle436h_F1	TGCTTGCAAGGTATCGTTCC	20
Cicle436h_F2	ACTGGATCTGGAATGGGGAC	20
Cicle436h_R1	TGCTCAGATGCTAAATGTGGC	21
Cicle436h_R2	CAGATCACCAACTGCCGTA	20
Cisin165I_F1	TGCTTGCAAGGTATCGTTCC	20
Cisin165I_R1	GCACACCTGAAACCCTGAAA	20
Cisin165II_F1	TCACCACTCCCAGCTGTAAG	20
Cisin165II_R1	ATGATTCAGATCACCAACTG	20
Cicle140I_F1	GAAGTGTGATTGCTTGCAAGG	21
Cicle140I_F2	GCCCCATTTCTGTAGCCATG	20
Cicle140I_R1	CCTGAAAGCCTGGCCCAA	18
Cicle140I_R2	CGCTGCAATTTATCCCACCA	20



Figura 2: Schema della posizione dei primer disegnati sulle sequenze migliori selezionate, rispetto alle regioni introniche (indicate da rettangoli grigi) ed esoniche. Le proporzioni rispetto alle dimensioni reali non sono rispettate.



Le condizioni di amplificazione (PCR) sono state impostate in relazione alle caratteristiche dei primer stessi e alla dimensione del prodotti attesi, utilizzando protocolli già adottati presso il laboratorio. Sono state valutate nove diverse combinazioni di primer, tra quelli sintetizzati, testando diverse temperature di annealing (Tabella 6). Quattro genomi sono stati selezionati per tali prove di amplificazione (*C. sinensis* (11) - *C. paradisi* (12) - *C. latifolia* (D) - *C. bergamia* (14)) oltre a *C. x mirtyfolia* (H) per il quale il DNA estratto da tre individui distinti è stato raggruppato e utilizzato come target di analisi.

Tabella 6: Elenco di tutte le combinazioni di primer testate, condizioni di reazione (temperatura) e dimensione del prodotto atteso

Sequence	Primer combination	Tm	T annealing	Product size
CICLE-436	P1 F1-R2	58 58	58-62	1035
	P5 F1-R1	58 59	58-62	698
	P6 F2-R2	60 58	58-62	708
CISIN-165	P2 F1I-R1I	58 58	58-62	349
	P3 F1II-R1II	60 54	58-62	496
	P9 F1I-R1II	58 54	58-62	1000
CICLE-140	P4 F1-R1	59 58	58-62	1093
	P7 F1-R2	59 58	58-62	571
	P8 F2-R1	60 58	58-62	672

In Figura 3 sono mostrati i prodotti ottenuti dall'amplificazione effettuata con otto delle 9 combinazioni di primer testate. Per ragioni grafiche, la combinazione P9 non è riportata in figura ma ripresa di seguito nel presente report. Tutte le combinazioni di primer hanno prodotto amplificati per tutti i genomi testati, eccetto la coppia P6 che, come atteso, non ha trovato il proprio sito di innesco per i genomi D e 14, in quanto entrambi non in possesso dell'introne II di 687 paia di basi (vedi dettaglio II introne Tabella 4). Così come il genoma 12, che amplificato con la combinazione P4, non ha prodotto nessun prodotto. Per il genoma target di analisi (H) è sempre stato ottenuto un buon amplificato.

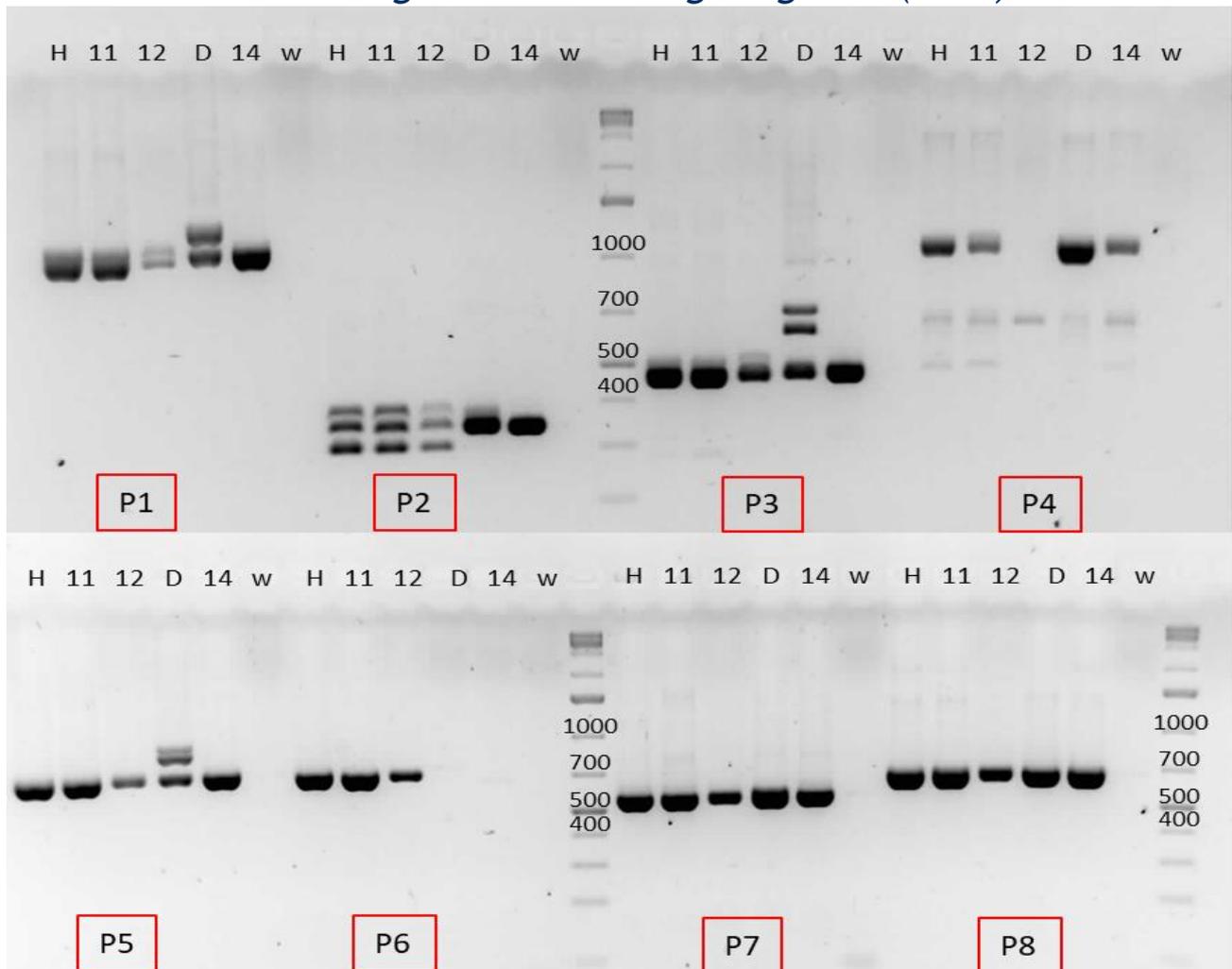


Figura 3: Gel di agarosio dei prodotti PCR ottenuti dall'amplificazione dei 5 diversi genomi con le combinazioni di primer P1-P8. Un controllo negativo di reazione (w) è sempre riportato per ogni combinazione. Come atteso, per la combinazione P6 non è stato ottenuto nessun prodotto dai genomi D e 14. La dimensione attesa dei prodotti è riportata in Tabella 6 e un marcatore di peso molecolare contestualmente carico su gel.

E' stata operata una selezione delle sole combinazioni migliori, essendo alcune semplicemente il risultato della concatenazione di coppie diverse di primer sulla stessa sequenza, definendo inoltre la temperatura ottimale di reazione, innalzata dopo una adeguata valutazione delle prove fatte, a 62°C.

Le combinazioni selezionate (P5-P6-P7-P8 e P9) sono state ri-verificate ripetendo la medesima reazione con un enzima polimerasico dotato di un più basso tasso di misincorporazione delle basi azotate ($1-10 \times 10^{-6}$ bp) rispetto ai più comuni enzimi, ed in grado quindi di assicurare una più contenuta percentuale di errore nella sintesi della sequenza nucleotidica. La reazione è stata eseguita utilizzando soltanto due genomi, (H) come target di analisi e *C. aurantium* (4).

Figura 4 mostra i prodotti ottenuti dall'amplificazione con il diverso enzima polimerasico, per le cinque combinazioni di primer selezionate. Le dimensioni dei prodotti ottenuti sono in accordo con quanto atteso. La presenza di piccole variazioni nella lunghezza della sequenza tra i due genomi testati, non sono stimabili con questo tipo di visualizzazione.

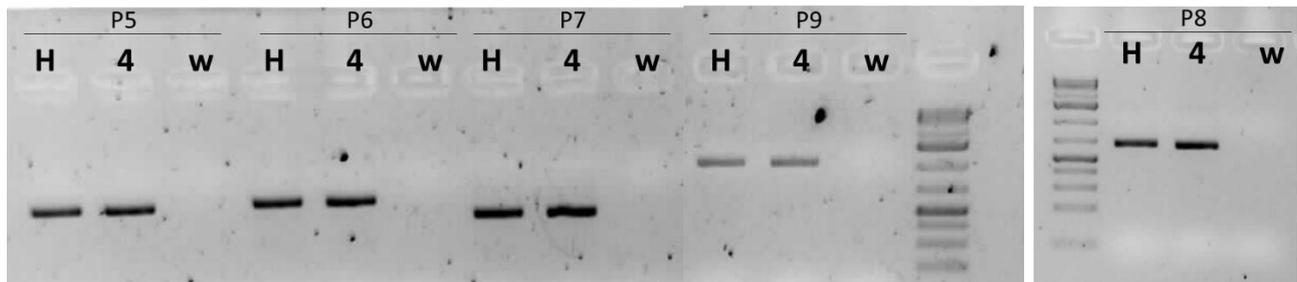


Figura 4: Prodotti dell'amplificazione dei genomi H e 4 per le 5 sole coppie di primer selezionate. La dimensione del prodotto atteso è riportato in tabella 6 e un marcatore di peso molecolare (1kb Ladder) è riportato per ogni sezione.

I prodotti PCR così ottenuti sono stati purificati mediante protocollo “microCLEAN for PCR clean-up” kit (Microzone Ltd) allo scopo di eliminare i sali di reazione e gli eventuali reagenti in eccesso presenti nel prodotto. Entrambi i prodotti PCR/bande, uno per genoma (H e 4), sono stati purificati per le cinque combinazioni di primer selezionate, e la loro valutazione quali-quantitativa mediante lettura spettrofotometrica è riportata in Tabella 7.

Tabella 7: Quantificazione spettrofotometrica dei prodotti purificati. I rapporti tra i valori di assorbanza restituiscono un indicazione sulla qualità dei prodotti stimati.

Sample ID	Nucleic Acid Conc. (ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230
Chino_bandaP5a	27,9	0,558	0,318	1,75	2,29
Chino_bandaP5b	24,7	0,494	0,288	1,71	2,07
Chino_bandaP6a	27,1	0,541	0,304	1,78	2,08
Chino_bandaP6b	28,4	0,568	0,336	1,69	2,19
Chino_bandaP7a	21,4	0,428	0,244	1,75	2,21
Chino_bandaP7b	24,5	0,489	0,282	1,73	2,5
Chino_bandaP8a	25,2	0,503	0,283	1,78	2,31
Chino_bandaP8b	27,9	0,558	0,315	1,77	2,39
Chino_bandaP9a	12,5	0,25	0,143	1,74	2,64
Chino_bandaP9b	13,6	0,272	0,156	1,74	2,05

Tutti i prodotti PCR purificati, 75ng circa per entrambi i genomi, sono stati sottoposti a reazione di sequenziamento, utilizzando come punto di innesco entrambi i primers. L'elenco dei prodotti inviati, inclusi la denominazione delle sequenza e la dimensione attesa, è riportato nel dettaglio in Tabella 8.

Tabella 8: Elenco dei prodotti inviati per la reazione di sequenziamento, denominazione e dimensione del prodotto atteso.

Genome	PCR product	Sequence name	Primer	Size (bp)	Genome	PCR product	Sequence name	Primer	Size (bp)			
<i>C. x myrtifolia</i> (H)	P5	H-436-f1	frw1	698	P5	4-436-f1	frw1	698	P5	4-436-r1	rev1	698
		H-436-r1	rev1	698		4-436-r1	rev1	698				
	P6	H-436-f2	frw2	708	P6	4-436-f2	frw2	708	P6	4-436-r2	rev2	708
		H-436-r2	rev2	708		4-436-r2	rev2	708				
	P7	H-140-f1	frw1	571	P7	4-140-f1	frw1	571	P7	4-140-r2	rev2	571
		H-140-r2	rev2	571		4-140-r2	rev2	571				
P8	H-140-f2	frw2	672	P8	4-140-f2	frw2	672	P8	4-140-r1	rev1	672	
	H-140-r1	rev1	672		4-140-r1	rev1	672					
P9	H-165-f1II	frw1II	1000	P9	4-165-f1II	frw1II	1000	P9	4-165-r1II	rev1II	1000	
	H-165-r1II	rev1II	1000		4-165-r1II	rev1II	1000					



L'analisi e l'elaborazione delle sequenze scaturite dalla prima trince di sequenziamento non ha però prodotto i risultati attesi in quanto: il sequenziamento diretto dei prodotti PCR, seppur purificati, ha portato all'ottenimento di sequenze spurie dove, come mostrato nei ferogrammi in Figura 5, la concomitante presenza di più sequenze sovrapposte ha compromesso totalmente l'utilizzo del dato, per i tutti i prodotti P7, P8 e P9. Eccezione fatta per i prodotti PCR P5 e P6 dai quali sono state ottenute sequenze di ottima qualità.



Figura 5: Ferogramma scaturiti dalla reazione di sequenziamento rispettivamente dei prodotti PCR purificati P7-P8 e P9. Nessuna delle tre sequenze si è dimostrata utilizzabile a causa concomitante presenza di più sequenze (sono visibili picchi doppi e sottesi) nel frame di lettura.

L'allineamento delle sequenze ottenute per i prodotti P5 e P6 con la sequenza di riferimento CICLE-436 non ha però fornito informazione utilizzabile, in merito a polimorfismi riscontrabili, per nessuna delle due regioni introniche, né tantomeno tra i genomi testati (4 e H). Figura 6 riporta infatti l'allineamento operato tra tutte le sequenze scaturite dei prodotti P5 e P6.



Figura 6: Allineamento eseguito tra la sequenza di riferimento CICLE-436 e le sequenze ottenute dei prodotti P5 e P6. Nessun polimorfismo è stato riscontrato.

Allo scopo di ottenere sequenze di buona qualità anche per i prodotti P7, P8 e P9, si è proceduto al clonaggio di quest'ultimi, purificati come sopra descritto e moltiplicati all'interno di un vettore plasmidico, con successiva trasformazione di cellule batteriche competenti. La reazione è stata condotta mediante l'utilizzo di protocolli standardizzati già in uso presso i laboratori ed è stata eseguita solo per il genoma di riferimento per *C. x myrtifolia* (H).

Per ogni trasformazione sono state valutate otto distinte colonie e su queste è stata operata un'ulteriore selezione mediante PCR per verificare la congruità del frammento clonato, per i tre prodotti P7, P8 e P9 (Figura 7). La posizione dei primer rispetto alla struttura della sequenza (esone/introne) rispecchia quella riportata in Figura 2, così come la sequenza di riferimento da cui hanno avuto origine (CISIN-CICLE). Tabella 9 riassume le caratteristiche dei prodotti clonati e inviati al sequenziamento.

Tabella 9: Elenco dei prodotti inviati per la reazione di sequenziamento, denominazione e dimensione del prodotto atteso

Genome	PCR product	Sequence name	Primer	Size (bp)
<i>C. x myrtifolia</i> (H)	P7	H-140-3B1	frw1	571
		H-140-3B3	frw1	
		H-140-3B4	frw1	
		H-140-3B1	rev2	
		H-140-3B3	rev2	
		H-140-3B4	rev2	
	P8	H-140-4B4	frw2	672
		H-140-4B10	frw2	
		H-140-4B4	rev1	
	P9	H-140-4B10	rev1	1000
		H-165-5B2	frw1I	
		H-165-5B8	frw1I	
		H-165-5B10	frw1I	
		H-165-5B2	rev1II	
		H-165-5B8	rev1II	
	H-165-5B10	rev1II		

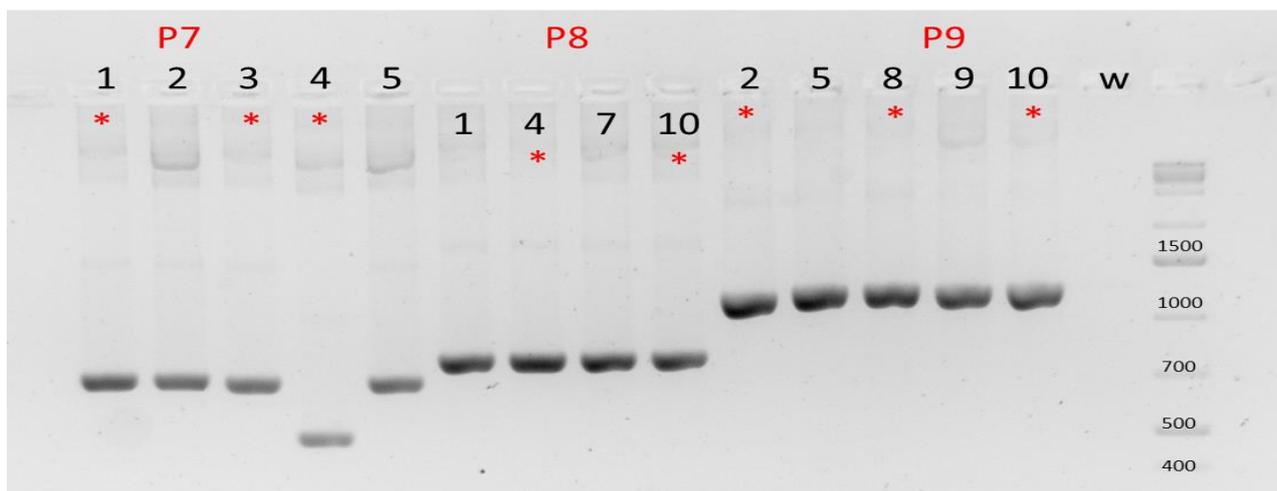


Figura 7: PCR di verifica della congruità delle dimensioni dei frammenti clonati, eseguita sulle colonie batteriche. Un controllo negativo di reazione (w) è riportato sulla destra, insieme ad un marcatore di peso molecolare. Per la stima della dimensione del frammento è necessario aggiungere al peso atteso di ciascun prodotto indicato in Tabella 9, la dimensione della sequenza plasmidica fiancheggiante (118 bp). Le colonie, ospitanti i frammenti, selezionate per il sequenziamento sono contrassegnate con un asterisco rosso.



L'allineamento delle sequenze ottenute dal clonaggio dai prodotti P7 e P8 con la sequenza di riferimento CICLE-140 (la stessa per entrambi) ha permesso di evidenziare la presenza di singoli polimorfismi (SNPs single nucleotide polymorphism) specifici per *C. x myrtifolia* a carico della regione del I e del II introne, rispettivamente per due prodotti. Figura 8 riporta gli allineamenti effettuati tra le sequenze ottenute con la sequenza di riferimento di *C. clementina* (CICLE-140).

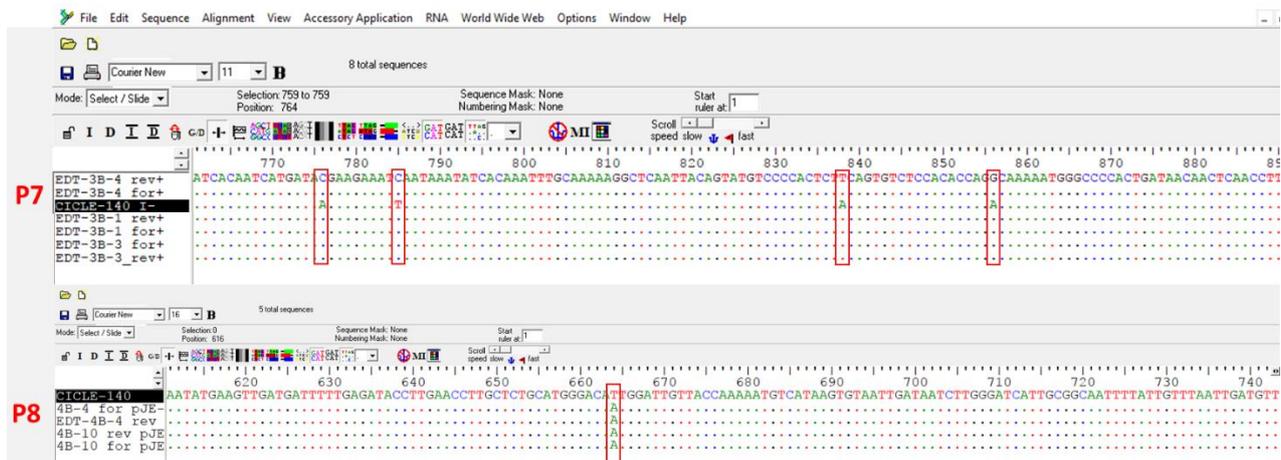


Figura 8: Allineamento eseguito tra la sequenza di derivazione depositata in banca dati per *C. clementina* (CICLE-140) e le sequenze ottenute dei prodotti P7 e P8. I polimorfismi riscontrati sono contrassegnati con un rettangolo rosso e nel dettaglio 4 SNPs per l'area del I introne (prodotti P7) e 1 solo SNPs per l'area del II introne (prodotti P8).

Il clonaggio dai prodotti P9 e l'analisi delle sequenze ottenute mediante allineamento con la sequenza di riferimento CISINE-165 ha permesso di evidenziare la presenza ulteriori SNPs specifici per *C. x myrtifolia* a carico della regione del I e del II introne, come riportato in Figura 9.



Figura 9: Allineamento di sequenza eseguito tra il riferimento depositato in banca dati per *C. sinensis* (CISINE-165) relativamente alle sole aree introniche, e le sequenze ottenute dei prodotti P9. I polimorfismi riscontrati sono contrassegnati da rettangoli rossi e nel dettaglio 3 SNPs per l'area del I introne e 3 SNPs per l'area del II introne.



La sola sequenza H-165-5B2, derivante dal sequenziamento del prodotto P9, si è rivelata dissimile all sequenza di origine CISINE-156 ma identica ad una diversa isoforma di tubulina, ovvero alla sequenza CICLE-436 isolata in banca dati da *C. clementina*. La cosa non sorprende in quanto la ridotta differenza in lunghezza delle due isoforme, attribuibile a due delezioni di 29 e 6 nucleotidi rispettivamente sul I e II introne, ha comportato la clonazione di frammenti di dimensioni molto simili. Purtroppo a carico di tale sequenza, dal confronto con la corrispondente isoforma CICLE-436, non è stato riscontrato nessun polimorfismo unico attribuibile a *C. x myrtifolia*.

Riassumendo, le sequenze isolate all'interno di questa prima Fase di lavoro per *C. x myrtifolia* rappresentano ad oggi la prima risorsa disponibile per tale specie in particolare relativamente alla famiglia genica delle β -tubuline. In linea generale, l'elevato livello di conservazione tipico di tali sequenze, che codificano per proteine costitutive fondamentali per i processi cellulari, è stato rimarcato dalla natura dei polimorfismi di sequenza riscontrati. Infatti, le uniche variazioni rilevate a carico delle regioni introniche, per definizione non codificanti proteina e quindi putativamente più soggette a variazione, sono state sostanzialmente di carattere puntiforme e costituite da gruppi di SNPs.

Le informazioni disponibili in banca dati si sono rivelate abbastanza limitate, sia in termini di quantità di specie afferenti al genere *Citrus* che per il numero di sequenze per specie, nonché di qualità, intesa come diponibilità di lunghe sequenze introniche. I polimorfismi isolati rappresentano però un buon punto di dipartenza per lo svolgimento della Seconda fase prevista dal presente progetto, dove diverranno il target per il disegno di putative sonde specifiche per *C. x myrtifolia* solo a seguito della loro riconferma. In particolare la natura e trasferibilità dei polimorfismi riscontrati sarà verificata mediante un'ulteriore indagine condotta esclusivamente tra *C. aurantium* e *C. x myrtifolia* ecotipo Savona partendo dall'isolamento diretto per queste due specie dei prodotti TBP.

Li, Milano 16/01/2018

Luca Braglia Ph. D

GCGTGAAATCCTTCACATCCAAGGTGGCCAATGCGGCAATCAAATCGGAGCCAAGTTCTGGGAAGTTGTCTGTGCTG
AACACGGCATTGACTCCACCGGCCGCTACGACGGAGACTCAGAATTCAACTGGAGAGGATCAATGTCTACTATAACG
AAGCTAGTTGTGGTAGGTTTCGTTCTCGTGCTGTTCTCATGGATTTGGAACCCGGAACCATGGACAGCGTTAGATCTG
GGCCGTACGGTCAGATTTTCAGGCCTGATAAATTCGTTTGGCCAATCCGGTGCCGTAACAACCTGGGCTAAAGGTC
ATTACACTGAAGGCGCTGAATTGATTGATTCTGTTCTCGATGTTGTCAGGAAGGAAGCCGAGAACTGCGATtgcttgcaa
ggatcgttccTCAAACCTTTTAAACATGTTGAGCAGTTAATGACATAAATAATGATGGAATGGAAGAGAAATTACACAC
TATGTTCTTATTTGTGATTTTGTCAAAAAATAGGGATGCAGTTGATATTATCTTAAATTTACTGTCGTGTTTTTATTCT
TGGAGACAAATAATGGTCGGACCAGTACGGAGGGACTTATGTGGGAAAAAATTATGGACAGAGTCAACTTTTTTGC
TTGGGGTAAGGTTGCTGATGGTTGTTTTTATTTTCTCCCTCTTTTTCAGGGTTTCAGGTGTGCCATTCTCTGGGAGGT
GGAactggatctggaatggggacGCTGTTGATTTCAAAGATACGAGAAGAGTACCCAGACAGAATGATGATGACTTTCTCTG
TGTTTCCATCGCTAAGGTGTCTGATACTGTCGTGGAGCCCTACAATGCCACTCTGTCTGTCCACCAGCTTGTTGAAAA
TGCAGATGAGTGATGGTTCTTGATAATGAGGCCCTCTACGATATTGCTCCGGACACTTAAGCTCACCCTCCAGC
TGTAAGTTACTTTTGCAATTGGAAGTATAAATTTGTCACAATGTTGTATATTTGACTATTTGATTTTCATTGTTGAAAT
GTTTATTAGATGATGAGTCATATAGGGTgccacatttagcatctgagcaTGGATGATTCATTTCAAACCCCATCCATTTAAC
GTCTAAATGAAAGCACAACTTGCAATCCAAGTACTCTGATTCCTAATTTAAAGGTGCTACCACCATTATATGCCAATC
ACAATAATTGAGTCATAGTTTCTAACCTGATTTAAGCATGATGATTTTGACCTTCATCTAATGATTGTTTTGCATAAGA
TTTTAATTATCTTTAGGAGCAATTTTGGTTTCAACGATATAGTGGCAATTTTTTCAGTCTATTGAGATTATTTAAGGTT
GGCATTTCGTTGATGTTTCTGACTATGTTTTTCATATGTTTAttacggcagttggatctgAATCATTGATATCTGCAACAA
TGTCGGGTGTTACATGCTGCTTGAGGTTCCCTGGTCAGCTTAACTCTGATCTGAGGAACTTGCTGTAAATCTAATCCC
ATCCCTCGTCTCCACTTCTTTATGGTGGGCTTTGCTCCTCTCACATCACGTGGGTACAGCAGTACCGTGCTTTGACAG
TTCCTGAGCTCACTCAGCAAATGTGGGATTCAAAGAATATGATGTGTGCAGCTGATCCACGACATGGCCGCTATCTAA
CAGCATCAGCCATGTTCCGTGGTAAGATGAGCACCAAGGAAGTAGATGAACAAATGCTGAATGTTTCAGAACAAGAAC
TCCTCATACTTTGTTGAGTGGATCCCCAACAAATGTGAAGTCTACTGTTTGTGATATCCACCCACTGGTTTGAAGATGG
CCTCCACGTTCAATGGGAACCTCACATCTATCCAGGAAATGTTTAGGCGTGTGAGTGAACAATTTACTGCCATGTTTAG
GAGAAAAGCTTTCTTACATTGGTATACCGGGGAAGGTATGGATGAGATGGAGTTCAGTGGCAGAGAGCAACATG
AATGATTTGGTTTCAGAGTATCAGCAATACCAAGATGCAACAGCTGATGAGGAAGGATATGATGATGAAGAGGAACA
GTTTGTGAAGATTATCAGCAATAATTTTATGATGGGTGGATTGCTTCTGAAGCAATTCTTTGGAACCTCAACTCCAGTT
GCTGGTTTCTGTCCATGATCTAGATAGAAGCAGGAGAAGCCCAATTGAAATAGTTTCTTCTGCTTCTCCTTTTT
TTTTTATTTTGTGGGACCTTGATGTTTAAATATGATACTTCAATTTGCTTTTGAATTCTAAGTTCTATTTTACTTTT
TTTCAA

>CICLE-723

TTCTTTAAAAAAGAAAAAGAAAAAGGAAGAATCCCCTGAAAATATCCTCTGCAAATCTCGCTAATCAAGAAACCCCA
AAAGAAGAAAATGCGTGAAATCCTTCACATTCAGGGGGCCAATGCGGGAACCAATCGGATCCAAGTTCTGGGAAG
TGTTTTCGCCGAGCACGGTATAGACCCGACCGAAAGTATCAAGGGGATACCGATTTGCAGCTTGAGAGGATTAAT
GTGTATTACAACGAGGCAAGTTGCGGGAGATACGTGCCTAGGGCCGTGCTCATGGATCTTGAACCTGGGACCATGGA
TAGCGTCAGGTCTGGTCCGTACGGTCAGGTTTTTAGGCCGACAATTTTGTCTTTGGCCAGTCCGGCGCCGAAACAA
CTGGGCGAAGGGGCATTACTGAAGGAGCTGAGCTGATTGACTCTGTGCTTGATGTTGTTTCGTAAGAAGCCGAGA
ACTGCGATTGCTTGAGGGTTGTTCTTTATACCTTTAAATTTATTTCAAGAATTTCAAGTATTTGTTACGATATGTCTA
AAATCTAAATTTAGGACATAGTACTGAAAGTTTATTAATAGTTATTATTGTTTTATATTATGTTGCGTGATTTAGTTGGT
TAAATTCGTAAAATCTATTGGGCGTGGTACGAGAAACGTGGGGATTATTGAATTGGGTTATGAAATGCAGGATTTCA
GGTGTGCCATTCTCTGGGAGGAGGGACAGGTTCCGGGATGGGAACCTTTGTTGATATCAAAGATAAGAGAGGAATAC
CCGGATAGAATGATGCTTACTTTCTCAGTTTTCCCATCTCCTAAGGTCTCTGATACTGTTGTTGAGCCTTACAACGCTAC
TCTCTGTACATCAGCTAGTTGAAAATGCAGATGAGTGTATGGTTCTTGATAATGAAGCCCTTATGACATCTGTTTCC
GCACTCTCAAACCTCAGCACTCCAAGCTGTAAGCTGGATCTTTCATTGTCATCATTTGCTTTTTGCTTAATTTTTGTAGTT
GGTTTTCAGTGGTAACTAAATTTTAAACTCTTTTGTGGCGCAGTTGGTGTATCTGAATCATTGATATCTGCTACAATG
TCTGGAGTTACCTGTTGTTGAGATTCCTGGTCAATTAACCTCTGACCTTAGAAAGCTTGCTGTTAATCTCATTCTTT
TCCTAGGCTTCATTTTTTTCATGGTGGGATTTGCTCCCTTGACATCCCCTGGCTCTCAGCAATATAGATCTTTGACTGTCC
CGGAGCTCACCCAGCAAATGTGGGATGCTAAGAATATGATGTGTGCAGCTGATCCTCGCCATGGTCTTACTTGACTG

CCTCAGCCATGTTTAGGGGCAAAATGAGCACTAAAGAAGTTGATGAGCAGATGATCAATGTGCAGAACAAGAACTCT
TCTACTTTGTGGAATGGATTCCCAATAATGTGAAATCAACTGTTTGTGATATCCCTCCAAGTGGCCTGAAAATGGCAT
CAACATTTATTGAAAACCTCGACCTCAATTCAGGAGATGTTTCAGGCGTGTGAGCGAGCAGTTCACAGCTATGTTTAGGA
GGAAGGCTTTCTTCATTGGTACACCGGCGAAGGTATGGATGAGATGGAGTTCAGTGGAGGAGCAATATGAAT
GATTTGGTTTCTGAGTATCAGCAGTACCAAGATGCTACAGCTGAAGAGGATTATTATGAGGATGAAGAAGAGGAAGT
TCATGACATGTAGACCTGATCATGTTGTGTCTGATTTGGTAATGGTTGGTTAGAAGTTTTAATTTCTGGTTGCCAGTCTT
TGGAATTATAGATCCAGAAGGGGTATGCCAATTATGTTATCTAAAAGCTTTTGGTTTTGTTCTTTTCATTTTCCATTTG
TCATTGCAGAGAACTGAGCAAGAAAAAGTTCATATAATCAATTTCTATGAAATGCTTATTATGTTTATATG

Citrus sinensis

>CISIN-165

AATCGCCTTCTTTTTACCTTCAGTTTCAATTTCAAATCTCCTGAGCGCCAGATTCAAAGCCCCCTCTCAAAAAAT
GCGTGAATCCTTCACATCCAAGGTGGCCAATGCGGCAATCAAATCGGAGCCAAGTTCTGGGAAGTTGTCTGTGCTG
AACACGGCATTGACTCCACCGGCCGCTACGACGGAGACTCAGAACTTCAACTGGAGAGGATCAATGTCTACTATAACG
AAGCTAGTTGTGGTAGGTTTCGTTCCCTCGTGCTGTTCTCATGGATTTGGAACCCGGAACCATGGACAGCGTTAGATCTG
GGCCGTACGGTCAGATTTTCAGGCCTGATAACTTCGCTTTGGCCAATCCGGTGCCGTAACAACCTGGGCTAAAGGTC
ATTACACTGAAGGCGCTGAATTGATTGATTCTGTTCTCGATGTTGTCAGGAAGGAAGCCGAGAAGTGGCATgcttgc
ggtatcgcttctCAAACCTTTTTAAACATGTTGAGCAGTTAATGATATAAATAATGATGGAATGGAAGAGAAATTACACAC
CATGTTCTTATTTGTGATTTTGTCAAAAAATAGGGATGAAGTTGATATTATCTTTAATTTACTGTCATGTTTTTATTCT
TGGAGACAAATAATGGTTGGACCAGTACGGAGGGACTTATGTGGGAAAAAAAAAAGTTTACAATCATGTTGTAATCT
GTGAAATCGTTTAAAATTATGGACAGAGTCAACTTTTTGCTTGGGGTAAGGTTGCTGATGGTTGTTTTTTTTTTCTCC
CTCCTtttcagggttcagggtGTGCCATTCTCTGGGAGGTGGAACCTGGATCTGGAATGGGGACGCTGTTGATTTCAAAGATA
CGAGAAGAGTACCCAGACAGAATGATGATGACTTTCTCTGTGTTTCCATCGCCTAAGGTGTCTGATACTGTCGTGGAG
CCCTACAATGCCACTCTGTCTGTCCACCAGCTTGTGGAAAATGCAGATGAGTGTATGGTTCTTGATAATGAGGCCCTCT
ACGATATTTGCTTCCGACACTTAAGTcaccactccagctgaagTTACCTTTTGCAATTGGAAGTATAAATTTGTCACAAT
GTTGTATATTTGACTATTTGTATTTTCATTGTTGAAATGTTTATTAGATGATGAGTCATATAGGGTGCCACATTTAGCAT
CTGAGCATGGATGATTCATTTCAAACCCCATCCATTTAACGTCTAAATGAAAGCACAACTTGTCATCCAAGTACTCT
GATTCCTAATTTAAAGGTGCTACCACCATTATATGCCAATCACAATAATTGAGTCATAGTTTCAAACCTGATTTAAGTAT
TGATGATTTGACTTTCATCTAATAATTGTTTTGCATAAGATTTTATCATCTTTAGGAGCAATTTCAATTATGCTTTCAA
CTATGTAGTGGCAATTTTTTCAGTCTCAGTATTGAGATTATTTTCAGGTTTCGATTTGCGTTGATGTTTCTGACTATGTTT
TTCATTGTTTATTACGAcagttggtgatctgaatcatTTGATATCTGCAACAATGTCGGGTGTACATGCTGCTTGAGGTTCCCT
GGTCAGCTTAACTCTGATCTGAGGAACTTGCTGTAAATCTCATCCCATTCCCTCGTCTACACTTCTTTATGGTGGGCTT
TGCTCCTCTCACATCACGTGGGTACAGCAGTACCGTGCTTTGACAGTTCCTGAGCTCACTCAGCAAATGTGGGATTCA
AAGAATATGATGTGCGCAGCTGATCCACGACATGGCCGCTATTAACAGCATCAGCCATGTTCCGTGGTAAGATGAGC
ACCAAGGAAGTAGATGAGCAAATGCTGAATGTTCAGAACAAGAAGTCTCATACTTTGTTGAGTGGATCCCCAACAAAT
GTGAAGTCTACCGTTTGTGATATCCCACCCACTGGTTTGAAGATGGCCTCCACGTTTATTGGGAAGTCCACATCTATCC
AGGAAATGTTGAGGCGTGTGAGTGAACAATTTACTGCCATGTTTAGGAGAAAAGCTTTCTTACATTGGTATACTGGGG
AAGGTATGGATGAGATGGAGTTCACTGAGGCAGAGAGCAACATGAATGATTTGGTTTTCAGAGTATCAGCAATACCAA
GATGCAACAGCTGATGAGGAAGGATATGATGATGAAGAGGAACAGTTTGTGATGAAGACTATCAGCAATAATTTGATG
GGTGGATTGCTTCTGAAGCAATTTTGGAACTCAACTTCCAGTTGCTGTTTCTGTCCATGATCTCTAGATAGAAG
CAGGAGAAGCCCAATTGAAATAGTTTCTTCTGCTTCTCTTTTTTTTTTTTTTTTT

>CISIN-757

ATGGGAAGTCTGCTGATATCAAAGATAAGAGAAGAATATCCAGAAAGAATAATGCTTACATTCTCAGTGTTCGATCT
CCAAAAGTATCAGACATAGTTGTAGAGCCTTACAATGCTACCCTTCTGTTTCATCAATTGGTTGAGAATGCTGATGAAT
GCATGGTCTCAACAATGAGGCTCTCTATGATATTTGCTTAAAGACCTCAAGCTCACCACCCAGCTGTAAGTAAAGC
CTTCATACATTAAGTAAGGGGAAGTCTCATTAGTTCTGTAATTTGAATCAATTAATCTATATCTTCAAAAATTATC
CAAAAGGTTTTATTATCTTCTGTCAGTCTATTAAGTCTGCTCATTATTTTCTATTTTCAGTTGCTACATGTGCTTGTTA

GAAAATGAGTAATTGGCTCAAATCACATATTGTTGAACAAAAATTGGGATTAATGAAGCTGTTGTTCTGTGAAATTGG
TGCATGCAGTTGGGGACTTGAATCATTTGATTTAGGAACTATGAGTGGTGAACATGTTGCTTGCATTCTCGGTCA
ACTAACTCAGACCTTAGAAAGCTAGTAGTGAATTTGATCCCATTCCAAAGGCTTCATTCGCCATGGTGGGTTTTGCT
CCACTGACATCTAGAGGATCACAAACATACCAGTCACTGTCTGTCCCTGAAATCACACATCAAATGTGGGATGACAGG
AACATGATGTGTGCAGCTGATCTACGCCATGGACGTTACCTCACAGCATCAACTATGTTTAGAGGCCAAAATGAGTGT
AAAGAAGTTGATGAACAAATGATCAATGTGCAGAACAAGAACTCTTCGTATGTTAGAATCAAGTTAGAATGGAAGA
AGATTCTTATCTCAGCAACAAGAATTAATAAATCTGATAATTCTTCTATTATTTAGAGTTCTCCAATTCAAGTTCTGA
AGCTACTAACAAGATATAGAGATTTTCCAGCACAAAGACTTGGTCTTTATGCATCCAACACTTGACCAAGCCTTTAGC
CCCCACGTCATTAGTATTGCTCACATCCAGAAGTGCCAGATACTTTGGATTAGGCTTCTAGCCCTGGTGGTTTTGCGA
GGTTCAACATCCTACTTTGTTGAGTGGATACCAAACAATGTGAAATCAAGCGTTTGTGACATCCACTAAGAGGGCTT
GCAATGGCATCTACATTCGTGGGAATTCGACCTCTATTTAGGAAATGTTTAGGCGAGTAAGTGAGTAGTTCCTGCC
ATGTTTCGGGAGAAAGGCTTTCTTGCATTGGTATACAGGTGAAGGAATGGATGAGATGGAGTTCCTGAAAGCTGAGA
GTAACATGAATGATCTTGTAGCTGAGTATCAGCAATATCAAGATGCCACTATTGATGAAGATGTTGAATATGAAGATG
ATGATGTACCCGCTCCGACAGTTGA

>CISIN-335

CCTTTCTTTAAAAAAGAAAAAGAAAAAGGAAGAATCCCCTGAAAATATCCTCTGCAAATCTCGCTAATCAAGAA
ACCCAAAAGAAGAAAATGCGTGAATCCTTCACATTCAAGGGGGCCAATGCGGGAAACCAAATCGGATCCAAGTTCT
GGGAAGTGGTTTGCGCCGAGCACGGCATAGACCCGACCGGAAAGTATCAAGGGGATACCGATTTGCAGCTTGAGAG
GATTAATGTGTATTACAACGAGGCAAGTTGCGGGAGATACGTGCCTAGGGCCGTGCTCATGGATCTTGAACCTGGGA
CCATGGATAGCGTCAGGTCTGGTCCGTACGGTCAGTTTTTAGGCCGACAATTTGTCTTTGGCCAGTCCGGCGCCG
GAAACAACCTGGGCGAAGGGGCATTATACTGAAGGAGCTGAGCTGATTGATTCTGTGCTTGATGTTGTTGTAAGAA
GCCGAGAACTGCGATTGCTTGCAGGGTTTGTCTTTATACCTTTAAAATTTATTTCAAGAATTTCAAGTATTTGTTACGA
TATATCTAAAATCTAAATTTAGGACATAGTACTGAAAGTTTATTAATAGTTATTATTGTTTTATATCATGTTGCGTGATT
AGTTGGTTAAATTCGTAATCTATTGGGCGTGGTACGAGAAACGTGGGGATTATTGAATTGGGTTATGAAATGCAG
GATTCAGGTGTGCCATTCTCTGGGAGGAGGGACGGGTTCCGGGATGGGAACCTTTGTTGATATCAAAGATAAGAGAG
GAATACCCGGATAGAATGATGCTTACTTTCTCAGTTTTCCATCTCCTAAGGTCTCTGATACTGTTGTTGAGCCTTACAA
CGTACTCTCTGTACATCAGCTAGTTGAAAATGCAGATGAGTGTATGGTTCTTGATAATGAAGCCCTTACGACATC
TGTTTCCGCACTCTCAAACCTCAGCACTCCAAGCTGTAAGCTGGATCTTTCATTGTATCATTTGTCTTTTTGCTTAATTT
TGTAGTTGGTTTTAGTGGTAACTAAATTTAAAACCTTTTGTGGCGCAGTTGGTGATCTGAATCATTTGATATCTGC
TACAATGTCTGGAGTTACCTGTTGTTGAGATTCCCTGGTCAATTAACCTCTGACCTTAGAAAGCTTGCTGTTAATCTCA
TTCCTTTTCTAGGCTTCACTTTTTCATGGTGGGATTTGCTCCCTGACATCCCGTGGCTCTCAGCAATATAGATCTTTGA
CTGTCCCGGAGCTACCCAGCAAATGTGGGATGCTAAGAATATGATGTGTGCAGCTGATCCTCGCCATGGTCTGTTACT
TGACTGCCTCAGCCATGTTTAGGGGCAAATGAGCACTAAAGAAGTTGATGAGCAGATGATCAATGTGCAGAACAAG
AACTCTTCTACTTTGTGGAATGGATTCCCAATAATGTGAAATCAACTGTTTGTGATATCCCTCCAACCTGGCCTGAAAAT
GGCATCAACATTTATTGGAACTCGACCTCAATTCAGGAGATGTTGAGGCGTGTGAGCGAGCAGTTCACAGCTATGTT
TAGGAGGAAGGCTTTCCTTTCATTGGTACACCGCGAAGGTATGGATGAGATGGAGTTCCTGAGGCAGAGAGCAAT
ATGAATGATTTGGTTTCTGAGTATCAGCAGTACCAAGATGCTACAGCTGAAGAGGATTATTATGAGGATGAAGAAGA
GGAAGTTCATGACATGTAGACCTGATCATGTTGTGTCTGATTTGGTAAATGGTTGGTTAGAAGTTTTAATTTCTGGTTGC
CAGTCTTTGGCAATTATAGATCCAGAAGGGTATGCCAATTATGTTATCTAAAAGCTTTTGGTTTTGTTCTTTCATTTTC
CATTTTGTATCGCAGAGAAGTACTGAGCAAGAAAAAGTTCATATAATCAATTTCTATGAAATGCTTATTA

ALLEGATO 2a



RAPPORTO DI PROVA N° 45

DATA: 16/01/2018

CLIENTE: CERSAA Centro Di Sperimentazione Ed Assistenza Agricola

CONTRATTO: n° p1741 del 29/08/2017 - Fase Prima

OGGETTO: Identificazione di polimorfismi in sequenza esclusivi per *Citrus* × *myrtifolia* ecotipo Savona**Materiale vegetale**

Il materiale vegetale di riferimento è costituito dalle specie fornite da CERSAA in occasione della stipula del contratto N. 1716 del 12/12/2016 come riportato in Tabella 1

Tabella 1: Elenco del materiale vegetale oggetto di studio del presente elaborato.

Code	Latin name	Common name	Source
2	<i>Citrus aurantium</i> L. 'Bouquetier de Nice'	Arancio amaro	Tintori
3	<i>Citrus aurantium</i> L. 'Corniculata'	Arancio amaro cornuto	Hanbury
4	<i>Citrus aurantium</i> L. 'Salicifolia' o 'Granito'	Arancio amaro a foglia di salice	Hanbury
5	<i>Citrus bergamia</i> Risso et Poit. 'Femminiello'	Bergamotto	Hanbury
6	<i>Citrus limetta</i> Risso	Limetta dolce romana	Sicilia
7	<i>Citrus limettoides</i> Tanaka	Lima	Sicilia
8	<i>Citrus limon</i> Burm.f. 'Canaliculata'	Limone incannellato o scannellato	Tintori
9	<i>Citrus maxima</i> Merr.	Pummelo o Sciadocco	Hanbury
10	<i>Citrus myrtifolia</i> Raf.	Chinotto	Hanbury
11	<i>Citrus sinensis</i> Osbeck.	Arancio dolce	Hanbury
12	<i>Citrus x paradisi</i> Macfad.	Pompelmo	Hanbury
13	<i>Citrus aurantium</i> L. 'Bizzarria'	Bizzarria	Tintori
14	<i>Citrus bergamia</i> Risso et Poit. 'Polpa verde'	Bergamotto	Hanbury
A	<i>Citrus myrtifolia</i> Raf.	Ingegnoli Chinotto calabrese	Ingegnoli
B	<i>Citrus myrtifolia</i> Raf.	Chinotto vivaio Puglia	Bari
C	<i>Citrus x bergamia</i>	Bergamotto	Bari
D	<i>Citrus latifolia</i>	Limetta	Sicilia
E	<i>Citrus myrtifolia</i> Raf.	Chinotto Sicilia	Sicilia
F	<i>Citrus maxima</i> Merr.	Pummelo	Sicilia
G	<i>Citrus mitis</i>	Calamondino	Sicilia
H	<i>Citrus x myrtifolia</i>	Chinotto di Savona	Azienda Pamparino, Finale (SV)
I	<i>Citrus limon</i>	Limone	CeRSAA
L	<i>Citrus reticulata</i>	Varietà antica	Azienda Minuto, Savona
S1	San Pietro	Chinotto di Savona	San Pietro in Carpignano (SV)
S2	San Pietro	Chinotto di Savona	San Pietro in Carpignano (SV)
S3	San Pietro	Chinotto di Savona	San Pietro in Carpignano (SV)
S4	San Pietro	Chinotto di Savona	San Pietro in Carpignano (SV)
F1	Ottone	Chinotto di Savona	Borgio Verezzi (SV)
F2	Ottone	Chinotto di Savona	Borgio Verezzi (SV)
F3	Ottone	Chinotto di Savona	Borgio Verezzi (SV)
F4	Ottone	Chinotto di Savona	Borgio Verezzi (SV)
M1	Marmorassi	Chinotto di Savona	Marmorassi (SV)
M2	Marmorassi	Chinotto di Savona	Marmorassi (SV)
M3	Marmorassi	Chinotto di Savona	Marmorassi (SV)
M4	Marmorassi	Chinotto di Savona	Marmorassi (SV)
M5	Marmorassi	Chinotto di Savona	Marmorassi (SV)



E' stata condotta una ricerca in banca dati mediante l'ausilio del portale di genomica vegetale comparata Phytozome v12.1 del Joint Genome Institute (JGI) all'interno del quale sono stati interrogati i dataset di sequenza disponibili per le specie afferenti al genere *Citrus*: *Citrus sinensis* (v 1.0) e *C. clementina* (v 1.1). Sono stati impostati criteri di ricerca atti alla selezione di sole sequenze di β -tubulina. Allo scopo di completare la raccolta delle informazioni disponibili, un'ulteriore ricerca è stata effettuata utilizzando gli strumenti di indagine informatici disponibili presso gli NCBI database (National Center for Biotechnology Information). L'elenco e la descrizione di tutte le sequenze complete e/o parziali, allocate o non, afferenti alla regione del gene in esame identificate, sono riportate in Tabella 2.

Tabella 2: Sequenze di β -tubulina disponibili in banca dati per le specie *C. clementina* e *C. sinensis*.

Plant species	Phytozome (>)/NCBI reference	Description	Gene ID	Location
<i>Citrus clementina</i>	>Ciclev10011723m.g (scaffold_6:15380797..15382751 rev)	tubulin beta-2 chain related	18038374 (CICLE_v10011723mg)	Unplaced
<i>cv Clemenules</i>	>Ciclev10001140m.g (scaffold_5:41945346..41948270 rev)	tubulin beta-4 chain related	18041058 (CICLE_v10001140mg)	Unplaced
	>Ciclev10028436m.g (scaffold_8:24110298..24112688 rev)	tubulin beta-4 chain related	18035052 (CICLE_v10028436mg)	Unplaced
<i>Citrus sinensis</i>	>orange1.1g013335m.g (scaffold00083:456751..458702 rev)	tubulin beta-2 chain related		Unplaced
<i>cv Valencia</i>	>orange1.1g013165m.g (scaffold00026:304979..307342 rev)	tubulin beta-4 chain related		Unplaced
	>orange1.1g047757m.g (scaffold00039:348916..351965 frw)	tubulin beta chain		Unplaced
	NC_023048.1 (27560003..27562962, complement)	tubulin beta-6 chain	102631140	Chromosome 3
	NC_023051.1 (17502108..17505792)	tubulin beta-5 chain	102608054 (CISIN_1g013154mg)	Chromosome 6
	NC_023051.1 (9302749..9304435, complement)	tubulin beta chain	102577942	Chromosome 6
	NC_023047.1 (7361299..7364696, complement)	tubulin beta chain	102615364 (CISIN_1g013391mg)	Chromosome 2
	NC_023050.1 (1955155..1957308)	tubulin beta chain-like	102612058	Chromosome 5
	NC_023054.1 (16655253..16657944)	tubulin beta-1 chain	102612022 (CISIN_1g013291mg)	Chromosome 9
	NC_023046.1 (16463121..16464511, complement)	tubulin beta chain-like	107177035	Chromosome 1
	NC_023053.1 (21724856..21727790, complement)	tubulin beta-2 chain	102624648 (CISIN_1g013165mg)	Chromosome 8
	NW_006257072.1 (1481854..1498468)	tubulin beta-5 chain-like	102620967	Unplaced

L'allineamento delle sequenze di β -tubulina raccolte in banca dati, per le due specie, ha permesso di selezionare solo le sequenze migliori, caratterizzandole tra regioni trascritte ed introniche (Tabella 3). Inoltre, l'analisi TBP (I e II introne) condotta in elettroforesi capillare su tutte le specie disponibili, ha permesso di associare le informazioni di sequenza raccolte in banca dati, ai diversi membri (picchi/introni) che compongono il profilo TBP. Questo è stato fatto utilizzando come genoma di riferimento *C. sinensis* unica delle due specie per le quali erano disponibili sia informazioni di sequenza sia materiale vegetale (Tabella 4 e Figura 1).

Tabella 3: Caratterizzazione delle regioni introniche, distinte tra I e II introne, per le sequenze nucleotidiche disponibili in banca dati per *C. clementina* e *C. sinensis*. In verde le sequenze selezionate per le analisi successive. Tutte le dimensioni sono espresse in paia di basi.

Plant species	seq CODE	I introne		II introne	
		Peak size	Intron size	Peak size	Intron size
<i>C. clementina</i>	CICLE-723	516	212	331	99
	CICLE-140	1368	1064	315	83
	CICLE-436	593	289	687	455
<i>C. sinensis</i>	CISIN-335	517	213	331	99
	CISIN-165	633	329	696	464
	CISIN-757	-	-	487	255

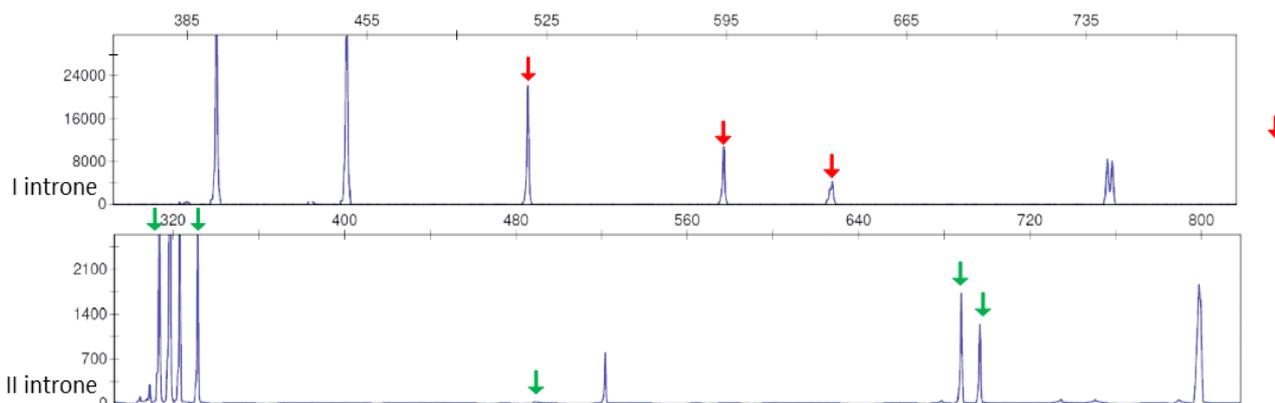


Figura 1: Ferogramma a picchi ottenuto dall'analisi TBP in elettroforesi capillare del I e II introne per *C. sinensis*. Le frecce rosse e verdi indicano i picchi per le quali sono disponibili in banca dati informazioni di sequenza, le cui dimensioni sono riportate in Tabella 4. La freccia rossa al di fuori del profilo TBP I introne indicata un picco la cui dimensione (1368bp) rimane al di fuori delle finestra di detection garantita dall'analisi (300-1200 bp).

Fissato quindi come target di indagine le regioni introniche del gene, sono state privilegiate quelle sequenze dotate di lunghi introni, sulle quali sono state disegnate 12 diversi primers (Tabella 5). Le sequenze nucleotidiche complete, corredate della sequenza e posizione dei rispettivi primers sono riportate in Allegato 1. Lo scopo di questi primers è stato quello di valutarne la trasferibilità su *C. x myrtifolia*, isolando dai prodotti PCR con essi ottenuti, sequenze specifiche per la tale specie. Alcune di queste combinazioni di primers sono state concepite per amplificare aree del gene a cavallo tra le due regioni introniche (Figura 2), in modo da garantire una maggior probabilità di identificare polimorfismi specifici per *C. x myrtifolia*.

Tabella 5: Sequenza nucleotidica e denominazione dei primer disegnati sulle sequenze disponibili in banca dati per *C. clementina* (CICLE) e *C. sinensis* (CISIN).

Name	Primer sequence	bp
Cicle436h_F1	TGCTTGCAAGGTATCGTTCC	20
Cicle436h_F2	ACTGGATCTGGAATGGGGAC	20
Cicle436h_R1	TGCTCAGATGCTAAATGTGGC	21
Cicle436h_R2	CAGATCACCAACTGCCGTA	20
Cisin165I_F1	TGCTTGCAAGGTATCGTTCC	20
Cisin165I_R1	GCACACCTGAAACCCTGAAA	20
Cisin165II_F1	TCACCACTCCCAGCTGTAAG	20
Cisin165II_R1	ATGATT CAGATCACCAACTG	20
Cicle140I_F1	GAAGTGTGATTGCTTGCAAGG	21
Cicle140I_F2	GCCCCATTTCTGTAGCCATG	20
Cicle140I_R1	CCTGAAAGCCTGGCCCAA	18
Cicle140I_R2	CGCTGCAATTTATCCCACCA	20



Figura 2: Schema della posizione dei primer disegnati sulle sequenze migliori selezionate, rispetto alle regioni introniche (indicate da rettangoli grigi) ed esoniche. Le proporzioni rispetto alle dimensioni reali non sono rispettate.



Le condizioni di amplificazione (PCR) sono state impostate in relazione alle caratteristiche dei primer stessi e alla dimensione del prodotti attesi, utilizzando protocolli già adottati presso il laboratorio. Sono state valutate nove diverse combinazioni di primer, tra quelli sintetizzati, testando diverse temperature di annealing (Tabella 6). Quattro genomi sono stati selezionati per tali prove di amplificazione (*C. sinensis* (11) - *C. paradisi* (12) - *C. latifolia* (D) - *C. bergamia* (14)) oltre a *C. x mirtyfolia* (H) per il quale il DNA estratto da tre individui distinti è stato raggruppato e utilizzato come target di analisi.

Tabella 6: Elenco di tutte le combinazioni di primer testate, condizioni di reazione (temperatura) e dimensione del prodotto atteso

Sequence	Primer combination	T _m	T annealing	Product size
CICLE-436	P1 F1-R2	58 58	58-62	1035
	P5 F1-R1	58 59	58-62	698
	P6 F2-R2	60 58	58-62	708
CISIN-165	P2 F1I-R1I	58 58	58-62	349
	P3 F1II-R1II	60 54	58-62	496
	P9 F1I-R1II	58 54	58-62	1000
CICLE-140	P4 F1-R1	59 58	58-62	1093
	P7 F1-R2	59 58	58-62	571
	P8 F2-R1	60 58	58-62	672

In Figura 3 sono mostrati i prodotti ottenuti dall'amplificazione effettuata con otto delle 9 combinazioni di primer testate. Per ragioni grafiche, la combinazione P9 non è riportata in figura ma ripresa di seguito nel presente report. Tutte le combinazioni di primer hanno prodotto amplificati per tutti i genomi testati, eccetto la coppia P6 che, come atteso, non ha trovato il proprio sito di innesco per i genomi D e 14, in quanto entrambi non in possesso dell'introne II di 687 paia di basi (vedi dettaglio II introne Tabella 4). Così come il genoma 12, che amplificato con la combinazione P4, non ha prodotto nessun prodotto. Per il genoma target di analisi (H) è sempre stato ottenuto un buon amplificato.

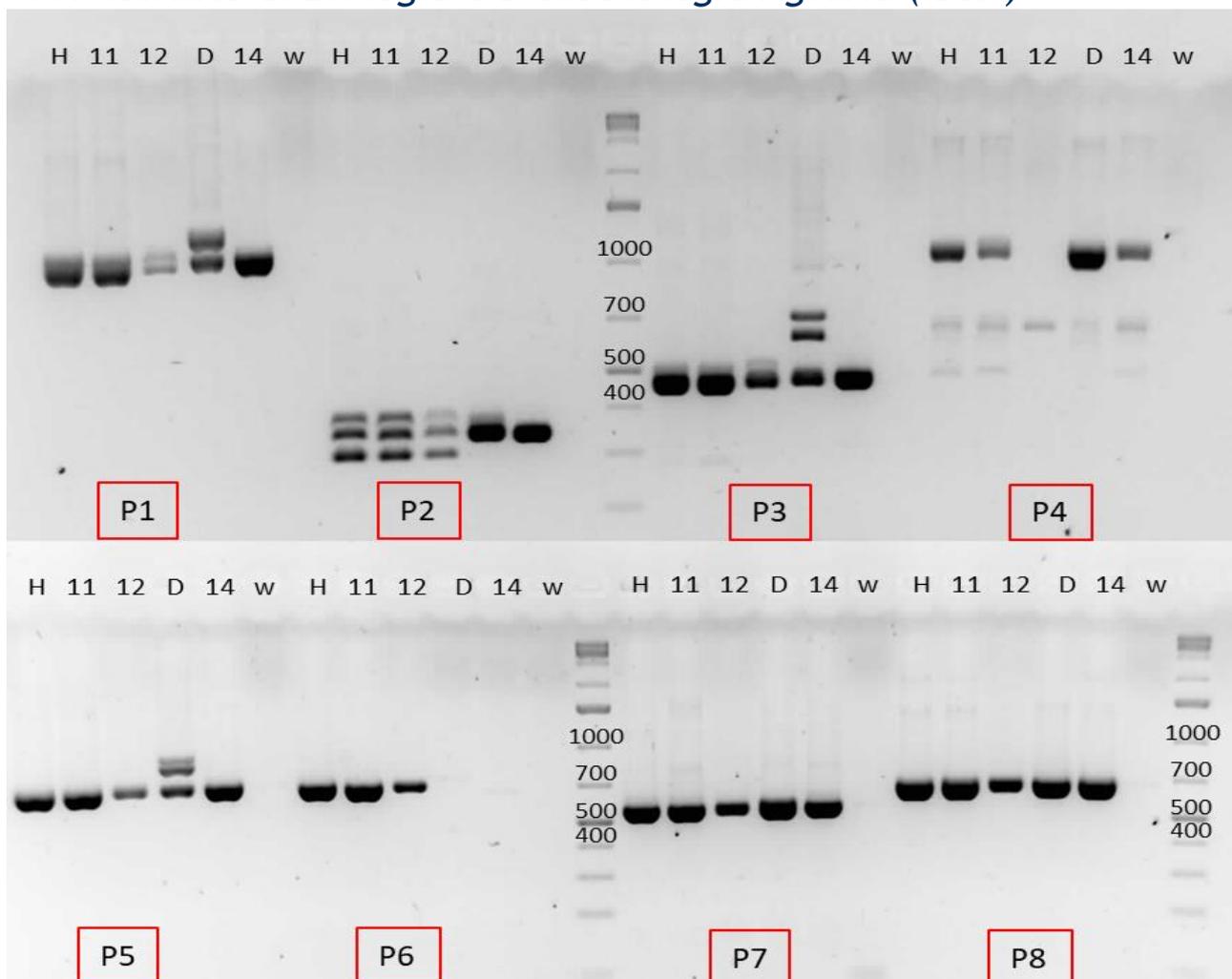


Figura 3: Gel di agarosio dei prodotti PCR ottenuti dall'amplificazione dei 5 diversi genomi con le combinazioni di primer P1-P8. Un controllo negativo di reazione (w) è sempre riportato per ogni combinazione. Come atteso, per la combinazione P6 non è stato ottenuto nessun prodotto dai genomi D e 14. La dimensione attesa dei prodotti è riportata in Tabella 6 e un marcatore di peso molecolare contestualmente carico su gel.

E' stata operata una selezione delle sole combinazioni migliori, essendo alcune semplicemente il risultato della concatenazione di coppie diverse di primer sulla stessa sequenza, definendo inoltre la temperatura ottimale di reazione, innalzata dopo una adeguata valutazione delle prove fatte, a 62°C.

Le combinazioni selezionate (P5-P6-P7-P8 e P9) sono state ri-verificate ripetendo la medesima reazione con un enzima polimerasico dotato di un più basso tasso di misincorporazione delle basi azotate ($1-10 \times 10^{-6}$ bp) rispetto ai più comuni enzimi, ed in grado quindi di assicurare una più contenuta percentuale di errore nella sintesi della sequenza nucleotidica. La reazione è stata eseguita utilizzando soltanto due genomi, (H) come target di analisi e *C. aurantium* (4).

Figura 4 mostra i prodotti ottenuti dall'amplificazione con il diverso enzima polimerasico, per le cinque combinazioni di primer selezionate. Le dimensioni dei prodotti ottenuti sono in accordo con quanto atteso. La presenza di piccole variazioni nella lunghezza della sequenza tra i due genomi testati, non sono stimabili con questo tipo di visualizzazione.

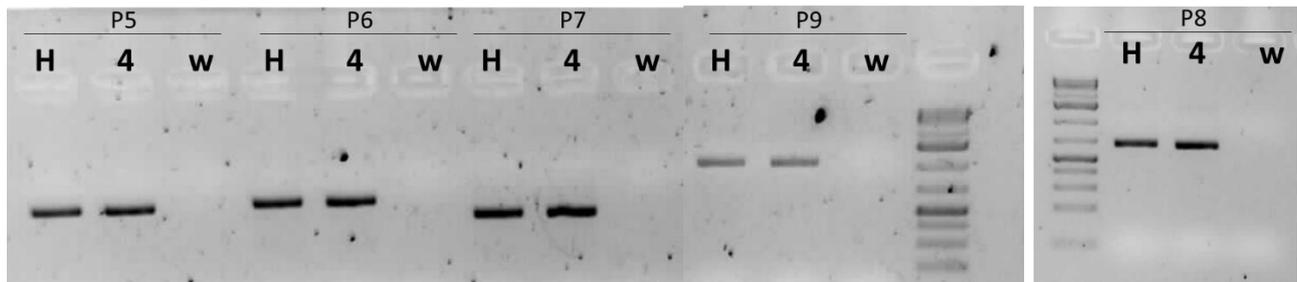


Figura 4: Prodotti dell'amplificazione dei genomi H e 4 per le 5 sole coppie di primer selezionate. La dimensione del prodotto atteso è riportato in tabella 6 e un marcatore di peso molecolare (1kb Ladder) è riportato per ogni sezione.

I prodotti PCR così ottenuti sono stati purificati mediante protocollo “microCLEAN for PCR clean-up” kit (Microzone Ltd) allo scopo di eliminare i sali di reazione e gli eventuali reagenti in eccesso presenti nel prodotto. Entrambi i prodotti PCR/bande, uno per genoma (H e 4), sono stati purificati per le cinque combinazioni di primer selezionate, e la loro valutazione quali-quantitativa mediante lettura spettrofotometrica è riportata in Tabella 7.

Tabella 7: Quantificazione spettrofotometrica dei prodotti purificati. I rapporti tra i valori di assorbanza restituiscono un indicazione sulla qualità dei prodotti stimati.

Sample ID	Nucleic Acid Conc. (ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230
Chino_bandaP5a	27,9	0,558	0,318	1,75	2,29
Chino_bandaP5b	24,7	0,494	0,288	1,71	2,07
Chino_bandaP6a	27,1	0,541	0,304	1,78	2,08
Chino_bandaP6b	28,4	0,568	0,336	1,69	2,19
Chino_bandaP7a	21,4	0,428	0,244	1,75	2,21
Chino_bandaP7b	24,5	0,489	0,282	1,73	2,5
Chino_bandaP8a	25,2	0,503	0,283	1,78	2,31
Chino_bandaP8b	27,9	0,558	0,315	1,77	2,39
Chino_bandaP9a	12,5	0,25	0,143	1,74	2,64
Chino_bandaP9b	13,6	0,272	0,156	1,74	2,05

Tutti i prodotti PCR purificati, 75ng circa per entrambi i genomi, sono stati sottoposti a reazione di sequenziamento, utilizzando come punto di innesco entrambi i primers. L'elenco dei prodotti inviati, inclusi la denominazione delle sequenza e la dimensione attesa, è riportato nel dettaglio in Tabella 8.

Tabella 8: Elenco dei prodotti inviati per la reazione di sequenziamento, denominazione e dimensione del prodotto atteso.

Genome	PCR product	Sequence name	Primer	Size (bp)	Genome	PCR product	Sequence name	Primer	Size (bp)			
<i>C. x myrtifolia</i> (H)	P5	H-436-f1	frw1	698	P5	4-436-f1	frw1	698	P5	4-436-r1	rev1	698
		H-436-r1	rev1	698		4-436-r1	rev1	698				
	P6	H-436-f2	frw2	708	P6	4-436-f2	frw2	708	P6	4-436-r2	rev2	708
		H-436-r2	rev2	708		4-436-r2	rev2	708				
	P7	H-140-f1	frw1	571	P7	4-140-f1	frw1	571	P7	4-140-r2	rev2	571
		H-140-r2	rev2	571		4-140-r2	rev2	571				
P8	H-140-f2	frw2	672	P8	4-140-f2	frw2	672	P8	4-140-r1	rev1	672	
	H-140-r1	rev1	672		4-140-r1	rev1	672					
P9	H-165-f1II	frw1II	1000	P9	4-165-f1II	frw1II	1000	P9	4-165-r1II	rev1II	1000	
	H-165-r1II	rev1II	1000		4-165-r1II	rev1II	1000					



L'analisi e l'elaborazione delle sequenze scaturite dalla prima trince di sequenziamento non ha però prodotto i risultati attesi in quanto: il sequenziamento diretto dei prodotti PCR, seppur purificati, ha portato all'ottenimento di sequenze spurie dove, come mostrato nei ferogrammi in Figura 5, la concomitante presenza di più sequenze sovrapposte ha compromesso totalmente l'utilizzo del dato, per i tutti i prodotti P7, P8 e P9. Eccezione fatta per i prodotti PCR P5 e P6 dai quali sono state ottenute sequenze di ottima qualità.

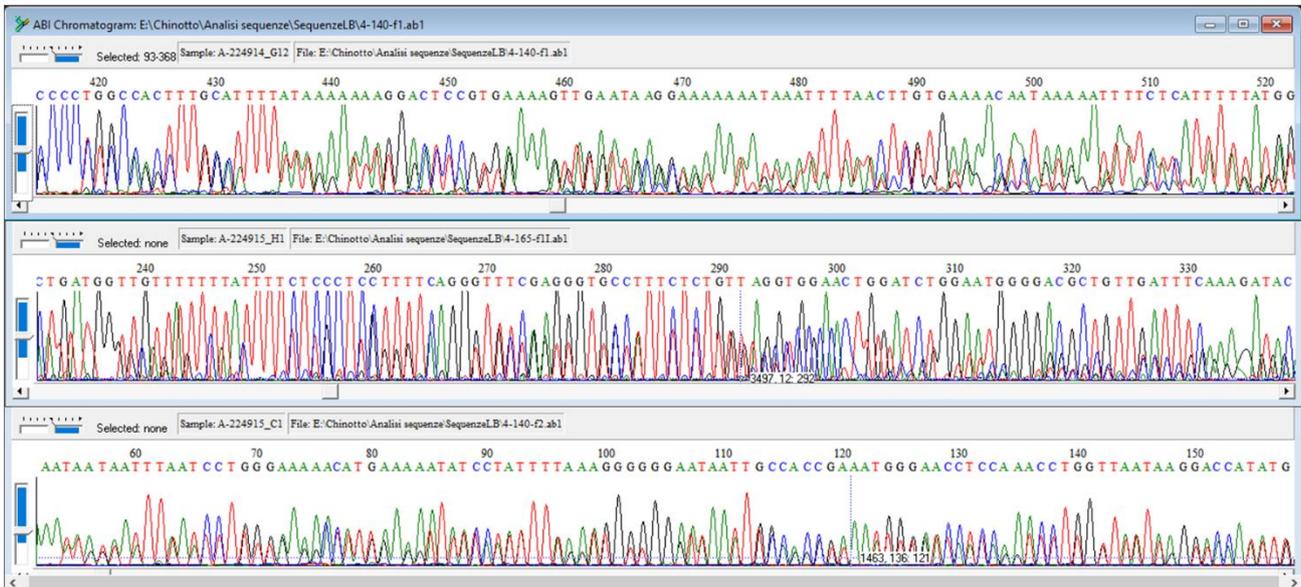


Figura 5: Ferogramma scaturiti dalla reazione di sequenziamento rispettivamente dei prodotti PCR purificati P7-P8 e P9. Nessuna delle tre sequenze si è dimostrata utilizzabile a causa concomitante presenza di più sequenze (sono visibili picchi doppi e sottesi) nel frame di lettura.

L'allineamento delle sequenze ottenute per i prodotti P5 e P6 con la sequenza di riferimento CICLE-436 non ha però fornito informazione utilizzabile, in merito a polimorfismi riscontrabili, per nessuna delle due regioni introniche, né tantomeno tra i genomi testati (4 e H). Figura 6 riporta infatti l'allineamento operato tra tutte le sequenze scaturite dei prodotti P5 e P6.



Figura 6: Allineamento eseguito tra la sequenza di riferimento CICLE-436 e le sequenze ottenute dei prodotti P5 e P6. Nessun polimorfismo è stato riscontrato.

Sede: Via Edoardo Bassini 15 - 20133 Milano (MI)

Tel. +39 02 23699 /402 Segreteria /430 Direzione /413 Amministrazione - Fax +39 0223699411

- U.O.S. di Lodi: c/o Parco Tecnologico Padano - Via Einstein, Località Cascina Codazza - 26900 Lodi (LO)
- U.O.S. di Pisa: c/o Area della Ricerca di Pisa, Via Moruzzi, 1 - 56124 Pisa (PI)
- U.O.S. di Roma: c/o Area della Ricerca di Roma 1, Via Salaria Km 29,300 - 00015 Monterotondo S. (RM)

Allo scopo di ottenere sequenze di buona qualità anche per i prodotti P7, P8 e P9, si è proceduto al clonaggio di quest'ultimi, purificati come sopra descritto e moltiplicati all'interno di un vettore plasmidico, con successiva trasformazione di cellule batteriche competenti. La reazione è stata condotta mediante l'utilizzo di protocolli standardizzati già in uso presso i laboratori ed è stata eseguita solo per il genoma di riferimento per *C. x myrtifolia* (H).

Per ogni trasformazione sono state valutate otto distinte colonie e su queste è stata operata un'ulteriore selezione mediante PCR per verificare la congruità del frammento clonato, per i tre prodotti P7, P8 e P9 (Figura 7). La posizione dei primer rispetto alla struttura della sequenza (esone/introne) rispecchia quella riportata in Figura 2, così come la sequenza di riferimento da cui hanno avuto origine (CISIN-CICLE). Tabella 9 riassume le caratteristiche dei prodotti clonati e inviati al sequenziamento.

Tabella 9: Elenco dei prodotti inviati per la reazione di sequenziamento, denominazione e dimensione del prodotto atteso

Genome	PCR product	Sequence name	Primer	Size (bp)
<i>C. x myrtifolia</i> (H)	P7	H-140-3B1	frw1	571
		H-140-3B3	frw1	
		H-140-3B4	frw1	
		H-140-3B1	rev2	
		H-140-3B3	rev2	
		H-140-3B4	rev2	
	P8	H-140-4B4	frw2	672
		H-140-4B10	frw2	
		H-140-4B4	rev1	
	P9	H-140-4B10	rev1	1000
		H-165-5B2	frw1I	
		H-165-5B8	frw1I	
		H-165-5B10	frw1I	
		H-165-5B2	rev1II	
		H-165-5B8	rev1II	
	H-165-5B10	rev1II		

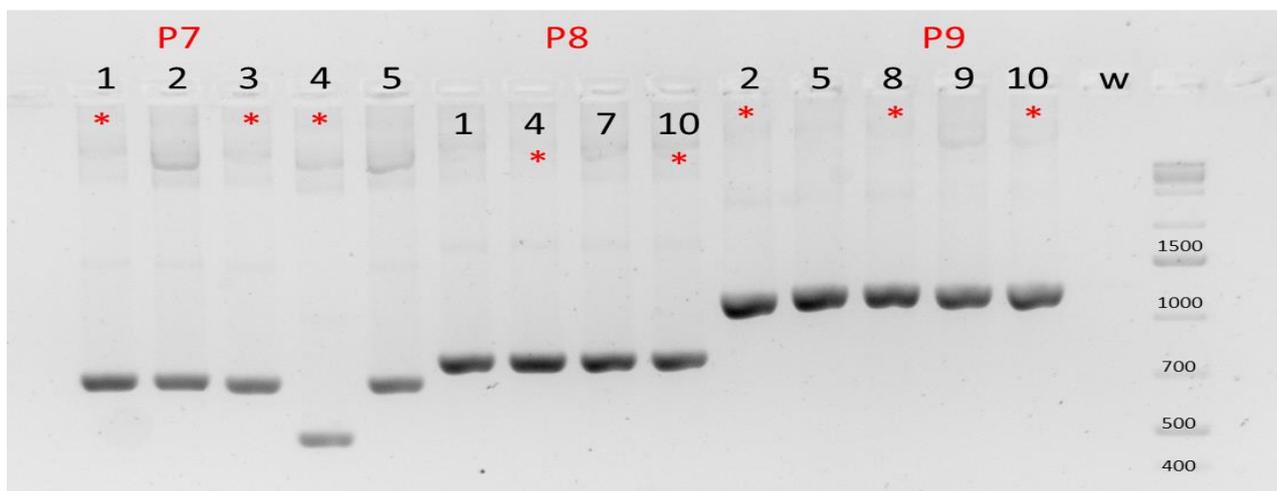


Figura 7: PCR di verifica della congruità delle dimensioni dei frammenti clonati, eseguita sulle colonie batteriche. Un controllo negativo di reazione (w) è riportato sulla destra, insieme ad un marcatore di peso molecolare. Per la stima della dimensione del frammento è necessario aggiungere al peso atteso di ciascun prodotto indicato in Tabella 9, la dimensione della sequenza plasmidica fiancheggiante (118 bp). Le colonie, ospitanti i frammenti, selezionate per il sequenziamento sono contrassegnate con un asterisco rosso.



L'allineamento delle sequenze ottenute dal clonaggio dai prodotti P7 e P8 con la sequenza di riferimento CICLE-140 (la stessa per entrambi) ha permesso di evidenziare la presenza di singoli polimorfismi (SNPs single nucleotide polymorphism) specifici per *C. x myrtifolia* a carico della regione del I e del II introne, rispettivamente per due prodotti. Figura 8 riporta gli allineamenti effettuati tra le sequenze ottenute con la sequenza di riferimento di *C. clementina* (CICLE-140).

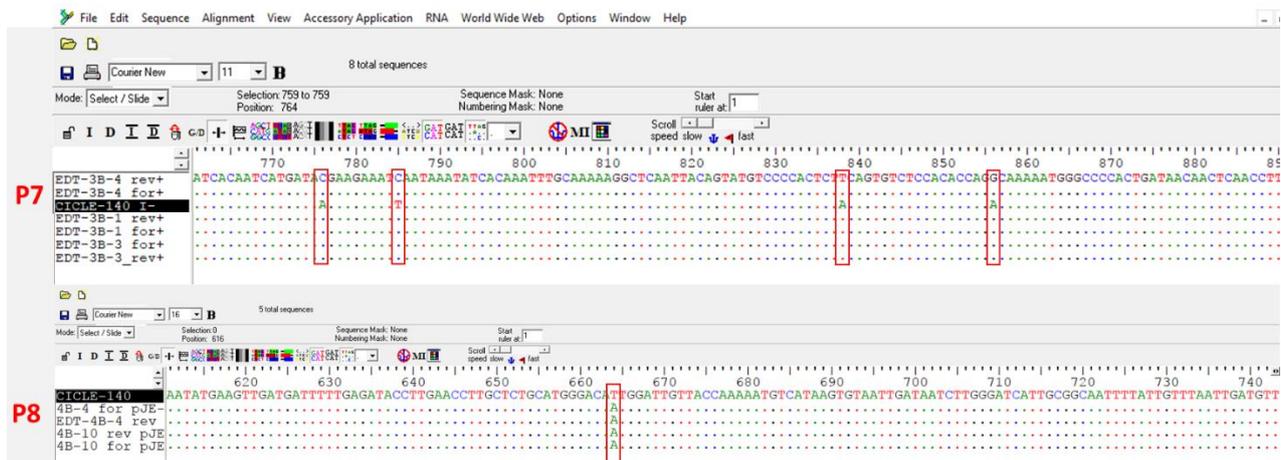


Figura 8: Allineamento eseguito tra la sequenza di derivazione depositata in banca dati per *C. clementina* (CICLE-140) e le sequenze ottenute dei prodotti P7 e P8. I polimorfismi riscontrati sono contrassegnati con un rettangolo rosso e nel dettaglio 4 SNPs per l'area del I introne (prodotti P7) e 1 solo SNPs per l'area del II introne (prodotti P8).

Il clonaggio dai prodotti P9 e l'analisi delle sequenze ottenute mediante allineamento con la sequenza di riferimento CISINE-165 ha permesso di evidenziare la presenza ulteriori SNPs specifici per *C. x myrtifolia* a carico della regione del I e del II introne, come riportato in Figura 9.

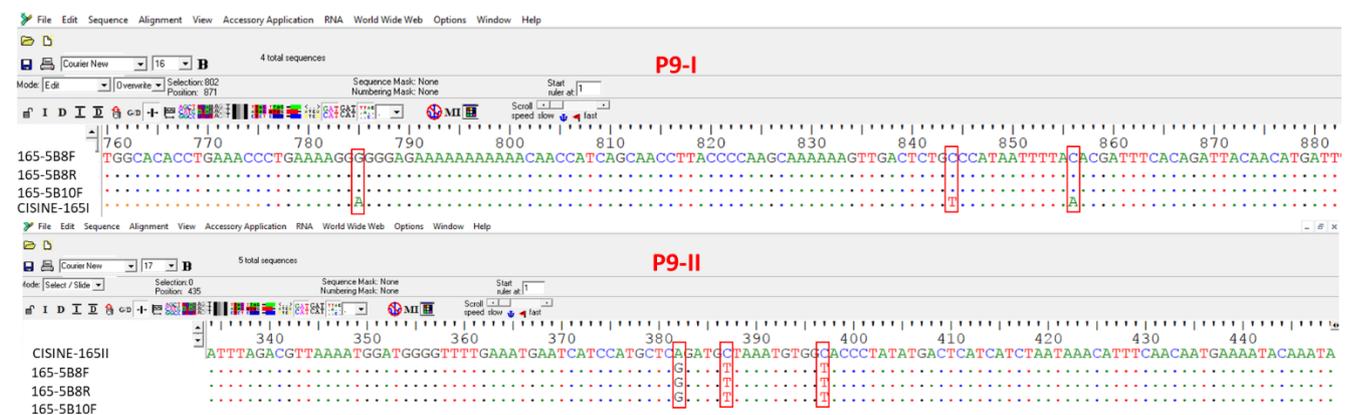


Figura 9: Allineamento di sequenza eseguito tra il riferimento depositato in banca dati per *C. sinensis* (CISINE-165) relativamente alle sole aree introniche, e le sequenze ottenute dei prodotti P9. I polimorfismi riscontrati sono contrassegnati da rettangoli rossi e nel dettaglio 3 SNPs per l'area del I introne e 3 SNPs per l'area del II introne.



La sola sequenza H-165-5B2, derivante dal sequenziamento del prodotto P9, si è rivelata dissimile all sequenza di origine CISINE-156 ma identica ad una diversa isoforma di tubulina, ovvero alla sequenza CICLE-436 isolata in banca dati da *C. clementina*. La cosa non sorprende in quanto la ridotta differenza in lunghezza delle due isoforme, attribuibile a due delezioni di 29 e 6 nucleotidi rispettivamente sul I e II introne, ha comportato la clonazione di frammenti di dimensioni molto simili. Purtroppo a carico di tale sequenza, dal confronto con la corrispondente isoforma CICLE-436, non è stato riscontrato nessun polimorfismo unico attribuibile a *C. x myrtifolia*.

Riassumendo, le sequenze isolate all'interno di questa prima Fase di lavoro per *C. x myrtifolia* rappresentano ad oggi la prima risorsa disponibile per tale specie in particolare relativamente alla famiglia genica delle β -tubuline. In linea generale, l'elevato livello di conservazione tipico di tali sequenze, che codificano per proteine costitutive fondamentali per i processi cellulari, è stato rimarcato dalla natura dei polimorfismi di sequenza riscontrati. Infatti, le uniche variazioni rilevate a carico delle regioni introniche, per definizione non codificanti proteina e quindi putativamente più soggette a variazione, sono state sostanzialmente di carattere puntiforme e costituite da gruppi di SNPs.

Le informazioni disponibili in banca dati si sono rivelate abbastanza limitate, sia in termini di quantità di specie afferenti al genere Citrus che per il numero di sequenze per specie, nonché di qualità, intesa come diponibilità di lunghe sequenze introniche. I polimorfismi isolati rappresentano però un buon punto di dipartenza per lo svolgimento della Seconda fase prevista dal presente progetto, dove diverranno il target per il disegno di putative sonde specifiche per *C. x myrtifolia* solo a seguito della loro riconferma. In particolare la natura e trasferibilità dei polimorfismi riscontrati sarà verificata mediante un'ulteriore indagine condotta esclusivamente tra *C. aurantium* e *C. x myrtifolia* ecotipo Savona partendo dall'isolamento diretto per queste due specie dei prodotti TBP.

Obiettivo prossimo della seconda Fase di studio sarà quello di verificare la consistenza dei polimorfismi riscontrati in *C. x myrtifolia* concentrandosi proprio sull'ecotipo Savona, ed in particolare sul materiale fornito dalle aziende afferenti al presidio Chinotto di Savona (Marmorassi, San Pietro ed Ottone). In modo parallelo si opererà *in primis* per identificare ulteriori punti di variabilità, andando ad ampliare le regioni studiate e contemporaneamente si lavorerà per verificare l'esistenza di aree geniche caratteristiche ed uniche (corte sequenze) in grado di definire le diversità di Chinotto di Savona da altri ecotipi disponibili a progetto (Calabria, Puglia). Sarà inoltre valutata la possibilità di sviluppare protocolli capaci di fornire strumenti di indagine immediata e di facile applicazione (i.e. sonde luminescenti), in grado di valorizzare le peculiarità, anche genetiche, riscontrate in *C. x myrtifolia* ecotipo Savona.

Li, Milano 16/01/2018

Luca Braglia Ph. D

Sede: Via Edoardo Bassini 15 - 20133 Milano (MI)

Tel. +39 02 23699 /402 Segreteria /430 Direzione /413 Amministrazione - Fax +39 0223699411

- U.O.S. di Lodi: c/o Parco Tecnologico Padano - Via Einstein, Località Cascina Codazza - 26900 Lodi (LO)
- U.O.S. di Pisa: c/o Area della Ricerca di Pisa, Via Moruzzi, 1 - 56124 Pisa (PI)
- U.O.S. di Roma: c/o Area della Ricerca di Roma 1, Via Salaria Km 29,300 - 00015 Monterotondo S. (RM)

ALLEGATO 3



RAPPORTO DI PROVA N° 57

DATA: 07/09/2018

CLIENTE: CERSAA Centro Di Sperimentazione Ed Assistenza Agricola

CONTRATTO: n° p1741 del 29/08/2017 - Fase Seconda

OGGETTO: Identificazione di polimorfismi in sequenza esclusivi per *Citrus* × *myrtifolia* ecotipo Savona

Materiale vegetale:

Il materiale vegetale di riferimento è il medesimo utilizzato nelle fase 1 (Tabella 1 Rapporto di prova N° 45). Nel corso di questa seconda fase di lavoro, ci si è concentrati sul DNA genomico estratto dalle accessioni definite come *C. x myrtifolia* ecotipo “Savona” (Pamparino (H), San Pietro (S1-4), Ottone (F1-4) e Marmorassi (M1-5)) e dalla controparte costituita da Chinotti di altra provenienza “altri” (Hanbury (10), Ingegnoli (A), Bari (B) e Sicilia (E)). I controlli negativi utilizzati sono stati: *C. aurantium* (2) e *C. sinensis* (11).

Metodo:

1. Si è proceduto alla verifica dei polimorfismi isolati per *C. x myrtifolia* in Fase 1.
2. E' stato eseguito il disegno di ulteriori sonde da nuove sequenze reperibili in banca dati per altre specie di Citrus, con relativo clonaggio e sequenziamento dei prodotti specifici per Chinotto di Savona;
3. E' stato eseguito il clonaggio e sequenziamento dei prodotti ottenuti da amplificazione hTBP, ovvero isolando un'ampia area del gene che includesse, oltre alle due regioni introniche (I e II introne) anche l'esone centrale.

Risultati:

In tabella **Tabella 2.1**, che riprende e aggiorna Tab 2 Fase 1, sono riportati gli identificativi delle sequenze depositate e disponibili in banca dati (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizzate per il disegno dei primer necessari all'isolamento di sequenze specifiche per Chinotto Savona. Rispetto a quanto riportato in Rapporto di prova N° 45 Fase 1, sono state scartate quelle sequenze che si sono rivelate incomplete o dalle quale i primer disegnati non hanno prodotto nessun amplificato in Chinotto Savona o prodotti aberranti. Tali sequenze non sono state incluse nel presente rapporto di analisi. Nel contempo, alcune sequenze di *C. clementina* sono state recentemente caratterizzate ed annotate in banca dati, aumentando la completezza delle informazioni a disposizione. Per ciascuna sequenza sono state calcolate le dimensioni delle aree introniche, e da queste sono state ricavate le dimensioni dei picchi corrispondenti sul profilo TBP I e II introne. Questo ha consentito di verificare direttamente sul profilo TBP prodotto per Chinotto Savona (I e II introne) e riportato in Tabella 4 Fase 1, l'esistenza di sequenze ortologhe (Ortologhi: geni omologhi, presenti in specie diverse ma correlate, che codificano per proteine che hanno funzioni simili e che si sono separati non per un evento di duplicazione ma in seguito a speciazione) e/o della variante paralogha (Paraloghi, geni originati dalla duplicazione di un unico gene nello stesso organismo). Definire queste sequenze come ortologhe e

**CNR -Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria (IBBA)**

paraloghe potrebbe sembrare scorretto in quanto tecnicamente appartenenti a sequenze che codificano proteine. Nel presente report però tali definizioni sono adottate per comodità nel riferirsi a sequenze introniche.

Specie	Phytozome (>) / NCBI reference	Descrizione	LOC <i>C. clementina</i>	LOC <i>C. sinensis</i>	GeneID	Location	Ref Seq	Picco	Introne	Picco	Introne
<i>C. clementina</i>	CICLE_v10011723mg	tubulin beta		LOC102577942	18038374	Unplaced	CICLE723	516	212	331	99
cv <i>Clemenules</i>	CICLE_v10001140mg	tubulin beta		LOC102631140	18041058	Unplaced	CICLE140	1368	1064	315	83
	CICLE_v10028436mg	tubulin beta-2 chain		CISIN_1g013165mg	18035052	Unplaced	CICLE436	593	289	687	455
<i>C. sinensis</i>	>orange1.1g013335m.g (scaffold000083:456751..458702 rev)	tubulin beta	CICLE_v10011723mg		102577942	Chrm 6	CISINE335	517	213	331	99
cv <i>Valencia</i>	CISIN_1g013165mg	tubulin beta-2 chain		CISIN_1g013165mg	102624648	Chrm 8	CISINE165	633	329	696	464
	NC_023048.1 (27560003..27562962, complement)	tubulin beta-6 chain	CICLE_v10001140mg		102631140	Chrm 3	CISINE48	1356	1052	324	92
	NC_023051.1 (17502108..17505792)	tubulin beta-5 chain	CICLE_v10011719mg	CISIN_1g013154mg	102608054		CISINE517	446	142	1192	960
	NC_023051.1 (9302749..9304435, complement)	tubulin beta chain	CICLE_v10011723mg		102577942	Chrm 6	CISINE51	517	213	331	99
	NC_023047.1 (7361299..7364696, complement)	tubulin beta chain	CICLE_v10015255mg	CISIN_1g013391mg	102615364	Chrm 2	CISINE47	1407	1103	798	566
	NC_023050.1 (1955155..1957308)	tubulin beta chain-like	CICLE_v10020164mg		102612058	Chrm 5	CISINE50	397	93	320	88
	NC_023054.1 (16655253..16657944)	tubulin beta-1 chain	CICLE_v10004755mg	CISIN_1g013291mg	102612022	Chrm 9	CISINE54	743	439	749	517
	NC_023053.1 (21724856..21727790, complement)	tubulin beta-2 chain		CISIN_1g013165mg	102624648	Chrm 8	CISINE53	593	289	687	455

LOC code = GeneID when published symbol is not available, and orthologs have not yet been determined

Tabella 2.1: Elenco delle sequenze di β -tubulina ricavate da banca dati per le specie *C. clementina* e *C. sinensis*. Le dimensioni delle regioni introniche è riportata sulle colonne di destra ed espressa in paia di basi. Con il codice colore sono indicate sequenze identiche depositate in banca dati o sequenze ortologhe.

Le sequenze ottenute da Chinotto Savona e presentate nel presente elaborato sono sempre il risultato del clonaggio e del successivo sequenziamento di frammenti di PCR, prodotti nei nostri laboratori. Tutti i clonaggi sono stati eseguiti a partire da entrambe le direzioni dei primer dell'innesco. Negli allineamenti che seguiranno le sequenze saranno presentate o in forma distinta per direzione di sequenziamento (F, forward ed R, reverse) o sotto forma di contig, ottenuto per appaiamento e confronto dei due precedenti a formare un'unica sequenza.

1) VERIFICA DEI POLIMORFISMI IDENTIFICATI PER CHSV IN FASE 1:

Sequenza di riferimento: **CICLE140**;

Area genica: I Introne - frammento atteso 1050/1060 bp; genoma testato H.

Sono stati clonati e sequenziati nuovi prodotti per Chinotto Savona (CHSV) che allineati con la sequenza di riferimento **CICLE140** e l'ortologo corrispondente in *C. sinensis* (CISINE48) ha determinato l'esclusione di tale sequenza da quelle di interesse in quanto, i polimorfismi puntiformi isolati per CHSV, quando non corrispondenti ad una o all'altra delle sequenze ortologhe, sono risultati eccessivamente isolati. Non si è quindi ritenuto utile procedere con la verifica della presenza di polimorfismi puntiformi su altri ecotipi di Chinotto. **Figura 2.1** riporta il dettaglio di alcuni polimorfismi evidenziati sull'allineamento delle sequenze isolate per CHSV con le sequenze di riferimento (CISINE e CICLE). Un solo polimorfismo puntiforme distingue realmente le sequenze di CHSV da entrambe quelle di riferimento. Il ridotto numero di SNPs e la posizione estremante sparsa lungo la sequenza ci ha indotto a non proseguire con ulteriori indagini su ulteriori ecotipi di Chinotto.

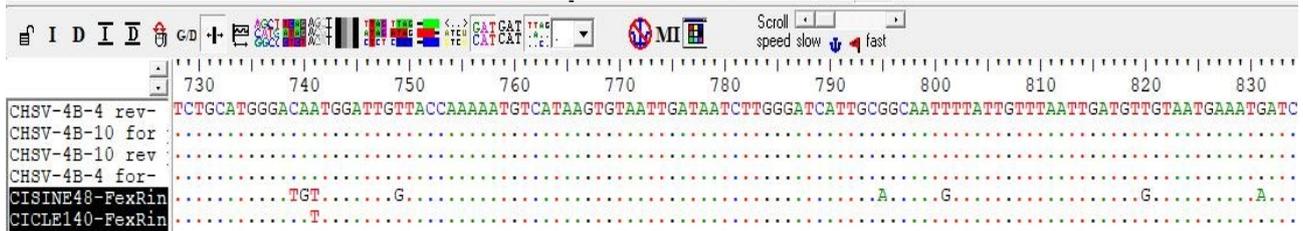


Figura 2.1. Allineamento di sequenza ottenuto tra le sequenze di riferimento, evidenziate sulla sinistra con sfondo nero e le sequenze isolate per CHSV a partire da CICLE140. Un singolo polimorfismo puntiforme in posizione 741 dell'allineamento distingue CHSV da entrambe le specie. Una singola T presente nei riferimenti è sostituita con una A in CHSV.

Sequenza di riferimento: **CISINE165**

Area genica: I & II Introne - frammento atteso 1050/1100 bp; Genoma testato H

Rispetto alla Fase 1 sono stati sequenziati nuovi cloni che hanno permesso di identificare l'esistenza di due sequenze paraloghe per tale gene anche in virtù dell'omologia riscontrata con l'ortologo di *C. clementina* (CICLE 436) e l'altra sequenza di *C. sinensis* depositata in banca dati (CISINE53).

Per l'ottenimento dell'allineamento finale si son potute sfruttare anche le sequenze precedentemente isolate da CHSV partendo da CICLE436, nonostante fossero state precedentemente scartate a causa della assenza di polimorfismi e definite come non utilizzabili agli scopi del Rapporto di prova N° 45 Fase 1.

Figura 2.2 riporta il dettaglio dell'allineamento di sequenza ottenuto. Due cloni, non sono riconducibili né alla sequenza da cui sono stati derivati (CISINE165) né al paralogo della medesima specie (CISINE53) e nemmeno all'ortologo disponibile in banca dati per *C. clementina* (CICLE436)

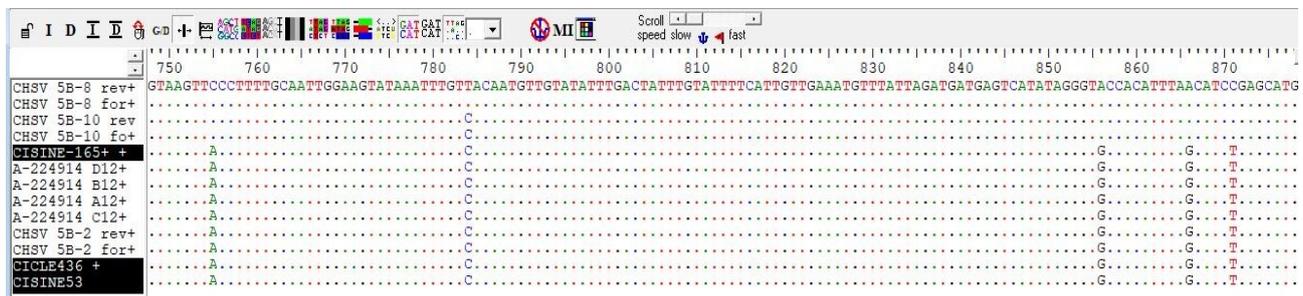


Figura 2.2. Allineamento di sequenza ottenuto tra le sequenze di riferimento, evidenziate sulla sinistra con sfondo nero, e le sequenze isolate per CHSV a partire da CISINE165. Quattro distinti polimorfismi puntiformi in posizione 755-856-866 e 871 sull'allineamento distinguono CHSV da entrambi gli ortologi. Nell'allineamento sono state incluse anche le sequenze precedentemente derivate da CICLE436 e indicate in figura con codice A-224914.

Nonostante questi polimorfismi, non si è ritenuto conveniente procedere con la verifica dell'esistenza di tale variabilità tra i Chinotti. L'esistenza in banca dati di due distinti paraloghi per *C. sinensis* (CISINE165 e CISINE53) porta infatti, a ipotizzare l'esistenza di un paraloghi anche per CHSV.

Le sequenze sopra descritte sono allegate al presente elaborato, complete di editing e allineate alle sequenze di riferimento da cui sono state derivate. Disponibili anche in formato XML.

- 2) DISEGNO E VALUTAZIONE DI NUOVE COPPIE DI PRIMERS A PARTIRE DA ULTERIORI SEQUENZE DISPONIBILI IN BANCA DATI PER CLEMENTINA E ARANCIO DOLCE.

Al termine della Fase 1 del presente progetto, la disponibilità in banca dati di nuove sequenze, non sempre annotate, e la recente annotazione di sequenze di *C. clementina* ci hanno indotto a disegnare nuove coppie di primer, testarne l'efficienza in CHSV e procedere con il clonaggio e sequenziamento di almeno due cloni ciascuno. Di seguito sono riportate le sequenze ottenute da tale procedura. Ogni sequenza è stata definita mediante il nome indicato in Tabella 2.1 alla colonna Ref Seq.

Sequenza di riferimento: **CISINE5117**

Area genica: Il introne – frammento atteso 960bp; Genoma testato SP1-4

Il sequenziamento previo clonaggio del prodotto di quattro cloni distinti ha portato all'ottenimento di sequenze specifiche per CHSV. Il confronto con la sequenza di riferimento CISINE5117 e con il corrispettivo ortologo in *C. clementina* (CICLE_v10011719mg) ha permesso di identificare una delezione significativa di 50 bp a carico di della sequenza di due cloni (**Figura 2.3**).

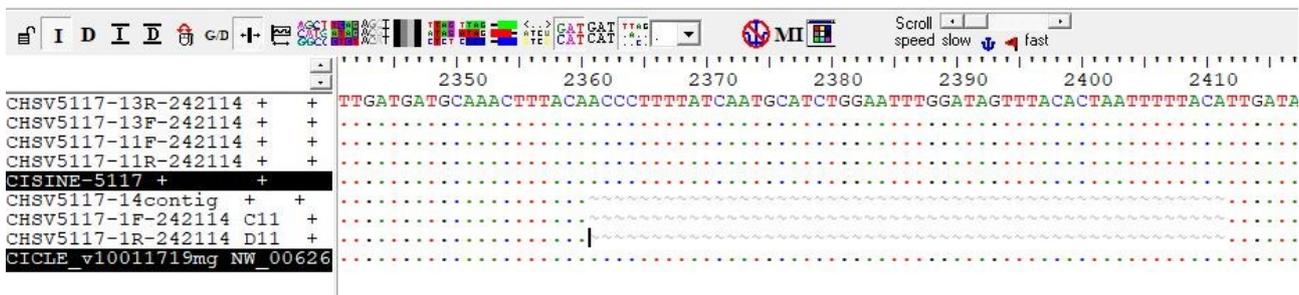


Figura 2.3: Allineamento di sequenza ottenuto tra le sequenze di riferimento di *C.sinensis* e *C. clementina*, evidenziate sulla sinistra con sfondo nero e le sequenze isolate per CHSV a partire da CISINE5117. E' evidente una delezione di 50 paia di basi nei cloni 14 ad 1.

Sulla medesima sequenza è stata identificata una sola regione recante polimorfismi puntiformi ascrivibili unicamente a CHSV e limitatamente ai cloni 14 ed 1 (**Figura 2.4**).

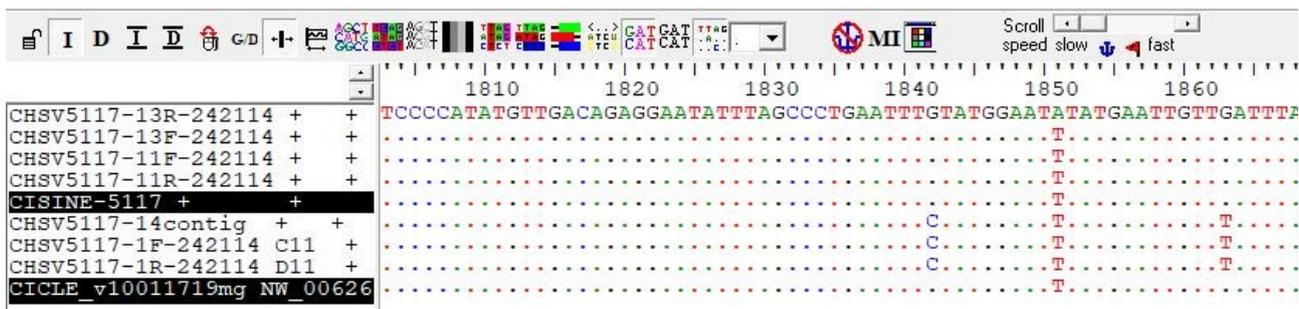


Figura 2.4: Allineamento di sequenza ottenuto tra le sequenze di riferimento di *C.sinensis* e *C. clementina*, evidenziate sulla sinistra con sfondo nero e le sequenze isolate per CHSV a partire da CISINE5117. Due distinti polimorfismi puntiformi in posizione 1842 e 1863 sull'allineamento, distinguono i cloni 14 ed 1 dai restanti ottenuti per CHSV e da entrambi gli ortologi.

L'inserzione riscontrata a carico delle sequenze isolate per CHSV (clone 14 e 1) non è utilizzabile per il disegno di sonde specifiche caratterizzanti l'ecotipo Savona in quanto non presenta aree polimorfiche limitrofe che ne consentano un disegno selettivo. Inoltre dalla stima della dimensione



CNR -Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria (IBBA)

di questo introne è stato identificato sul profilo TBP II il picco corrispondente. (Tabella 4 Fase 1) avente dimensioni di 1150bp. Questo picco risulta essere esclusivo per le specie *C. aurantium*, *C. x myrtifolia*, *C. limetta* Risso e *C. limetoides* Tanaka. Questo significa che i cloni in questione (1-14) non rappresentano altro che un paralogo per il medesimo gene, che essendo presente in più specie non induce a pensare che possano esservi polimorfismi in sequenza discriminatori di ecotipo all'interno di CHSV.

Interessante notare come la presenza della delezione nel II introne, e del corrispondente allele, del gene per la β -tubulina 5 possa essere distintiva di una linea parentale.

I polimorfismi puntiformi riscontrati e mostrati in Figura 2.4 non sono stati ritenuti utilizzabili per valutarne la trasferibilità e selettività per l'ecotipo Savona.

Si giustifica l'utilizzo di tale sequenza, in particolare delle delezione riscontrata, come strumento di indagine inter-specifico, ovvero per distinguere *C. x myrtifolia* da altre specie, dopo verifica di cross-reattività eseguita con accessioni di *C. aurantium*.

Sequenza di riferimento: **CISINE54**

Area genica: I introne – frammento atteso 469bp; Genoma testato SP1-4 e B

E' ora disponibile la sequenza ortologa per *C. clementina* (CICLEv10004755mg). I primi cloni isolati (54SP3e 54SP4) e sequenziati per tale sequenza hanno evidenziato la completa identità ad entrambe le sequenze di riferimento. Sono stati isolati altrettanti cloni (54-3SP e 54-8SP) che hanno mostrato un polimorfismo esteso e marcato. Questa eccessiva variabilità riscontrata in CHSV genoma SP ci ha portati ad ipotizzare l'esistenza di una sequenza paraloga e ortologa non ancora depositata in banca dati.

Si è quindi proceduto con il clonaggio della medesima sequenza a partire da un genoma differente (B) *C. x myrtifolia* Bari, che ha mostrato la completa identità per i cloni isolati per CHSV SP.

Se la natura del genoma B è confermata, le sequenze isolate possono essere considerate uniche per *C. x myrtifolia*. perchè non disponibili per nessuna delle specie di riferimento. L'isolamento della sequenza in esame anche dal genoma B induce però a pensare che questa non sia distintiva dell'ecotipo Savona. **Figura 2.5** evidenzia l'elevato polimorfismo riscontrato per tale sequenza in entrambi i genomi rispetto alle sequenze di riferimento e rispetto ai primi cloni.



Figura 2.5: Allineamento di sequenza ottenuto tra le sequenze di riferimento di *C.sinensis* e *C. clementina*, evidenziate sulla sinistra con sfondo nero e le sequenze isolate per CHSV a partire da CISINE54. I primi due cloni ottenuti (54SP3-

CNR -Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria (IBBA)

54SP4) mostrano un'identità completa con entrambi i riferimenti. Nel secondo gruppo di cloni prodotto, è invece evidente un marcato polimorfismo. Tra questi però, nessuna differenza significativa tra i due genomi SP e B.

Nonostante non sia stata riscontrata un'unicità delle sequenze isolate per un solo ecotipo di Chinotto, si giustifica l'utilizzo di tale sequenza, in particolare dei polimorfismi riscontrati per i cloni 54B8, 54-3-SP e 54-8-SP, come strumento di indagine inter-specifico, ovvero per distinguere *C. x myrtifolia* da altre specie, dopo verifica di cross-reattività eseguita con accessioni di *C. aurantium*.

Sequenza di riferimento: **CISINE47**

Area genica: I e II introne con approcci distinti

E' ora disponibile anche per questa sequenza l'ortologo per *C. clementina* (CICLE_v10015255mg) utilizzata per l'analisi di entrambe le regioni isolate

a) **CISINE47II** Area: II introne

Frammento atteso 617 bp - Genoma testato SP1-4, A e B

I primi cloni isolati e sequenziati per tale sequenza (47II-1SPe 47II-5SP) hanno evidenziato ampie aree polimorfiche (**Figura 2.6**) rispetto ad entrambe le sequenze di riferimento. Sono stati quindi isolati nuovi cloni da ecotipi differenti di Chinotto (A e B). Tre cloni sono stati isolati dal genoma A (47IIA2-A3-A7) ed altrettanti dal genoma B (47IIB3-B5-B6). In figura sono evidenti anche numerose inserzioni/delezioni, ma anche queste non riferibili ad un unico ecotipo.

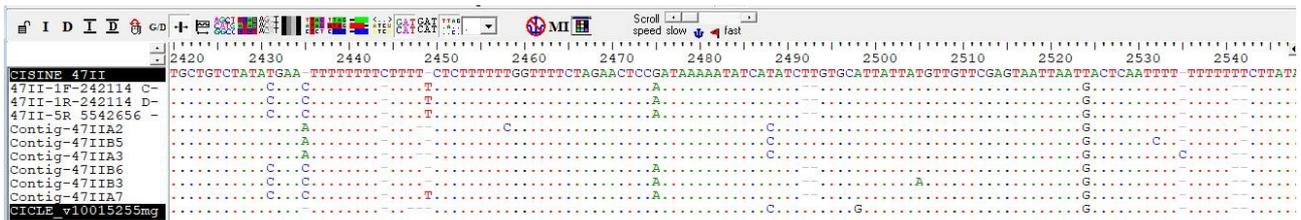


Figura 2.6: Allineamento di sequenza ottenuto tra le sequenze di riferimento di *C. sinensis* e *C. clementina*, evidenziate sulla sinistra con sfondo nero e le sequenze isolate per CHSV a partire da CISINE47. Un polimorfismo evidente in posizione 2435 distingue i Chinotti tutti dalle due sequenze di riferimento. Gli altri polimorfismi puntiformi (posizioni 2431, 2475, 2488) non sono assimilabili a nessuno degli ecotipi.

Le aree polimorfiche evidenziate in figura, nonostante appaiono numerose e ben distribuite, non risultano però esclusive per l'ecotipo CHSV ma purtroppo specifiche solo per Chinotto in generale, senza poter discriminare un ecotipo dall'altro.

b) **CISINE47I** Area: I introne

Frammento atteso 1158 bp - Genoma testato SP1-4, A e B

La sequenza in oggetto è la più lunga sino ad ora considerata. Le prime coppie di primer disegnate sulla sequenza di riferimento di *C. sinensis* hanno prodotto amplificati di ridotta intensità, sintomo di una scarsa trasferibilità degli inneschi disegnati o della presenza di un'area molto polimorfica. Si è quindi proceduto con il disegno di inneschi più esterni, ovvero maggiormente immersi nell'esone fiancheggiante. La posizione dei primer sulla sequenza è rappresentata in **Figura 2.7**.

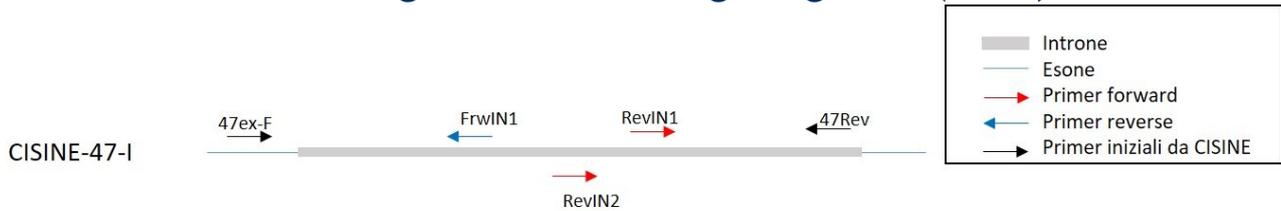


Figura 2.7: Rappresentazione grafica della sequenza di riferimento per *C. sinensis* (CISINE47I) relativamente alla regione del primo introne e le regione esoniche fiancheggiatrici. Le dimensioni non sono riprodotte in scala.

Il primo clonaggio e sequenziamento dell'intero prodotto intronico (primer 47ex/47Rev) ha originato due cloni tra loro distinti che allineati con le due sequenze di riferimento (*C. sinensis* e *C. clementina* da poco rilasciata e pubblicata in banca dati, CICLE_v10015255mg) hanno rivelato la presenza di ampie aree polimorfiche caratterizzate da lunghe delezioni ed inserzioni, distinte tra loro. **Figura 2.8** riporta infatti diverse aree dell'allineamento dove si evince la profonda diversità tra i due stessi cloni (clone 47ex1 e clone 47ex9) oltre che rispetto ai riferimenti.



Figura 2.8: Quattro distinte sezioni di un allineamento di sequenza ottenuto tra le sequenze di riferimento di *C. sinensis* e *C. clementina* (CICLE_v10015255), evidenziate sulla sinistra con sfondo nero e le sequenze isolate per CHSV a partire da CISINE47I. I due cloni ottenuti (47ex1 e 47ex9) mostrano un marcato polimorfismo caratterizzato principalmente da inserzioni e delezioni.

Considerata la complessità e diversità dei due prodotti ottenuti si è convenuto procedere con la frammentazioni della sequenza utilizzando i primers interni riportati in figura 2.7. La **Tabella 2.2** riportata di seguito, fornisce una valutazione empirica della dimensione attesa degli amplificati ottenuti con le diverse combinazioni di primer interni, al fine di sfruttare al massimo tutte le aree polimorfiche evidenziate dalle sequenze dei due cloni.

FORWARD	REVERSE	<i>C. x myrtifolia</i> (SP)		<i>C. sinensis</i> (11)
		col 1	col 9	
47ex-F	FrwIn1	delezione	395	382
RevIn2	47Rev	710	673	726
RevIn1	47Rev	559	522	575
47ex-F	47Rev	-	-	1158

Tabella 2.2: Stima delle dimensioni, espresse in paia di basi, dei prodotti ottenuti dall'amplificazione effettuata mediante i primer disegnati sulla sequenza dei cloni ottenuti (47ex1 e 47ex9) per CHSV ecotipo SP. La posizione dei primer sulla sequenza è rappresentata in figura 2.7.

La diversità riscontrata tra i due cloni ci ha portato ad ipotizzare l'esistenza di due paraloghi anche per questa sequenza. Prima quindi di procedere con il clonaggio dei prodotti finali, sono state affinate le sequenze dei primer interni, considerando che alcune di queste (FrIn1) aveva manifestato problemi di legame e selettività.

Nuove coppie di primer ("migliorati") sono state definite a partire dalla sequenza del clone 47ex9, in grado di riconoscere due distinte aree sull'introne, identificate come area 47I- A e 47I-B.

Volendo inoltre valutare l'esistenza di polimorfismi specifici per CHSV, è stata inclusa l'amplificazione di tutti gli ecotipi disponibili (SP1-4, H, F1-4, M1-5, 10, A, B, E) e di alcuni controlli (genoma 2 e 11). **Figura 2.9** riporta un'immagine dei prodotti ottenuti previa amplificazione con i primer "migliorati" sulle due aree dell'introne. Due distinti prodotti di elevata intensità sono visibili per l'area B, confermando l'ipotesi dell'esistenza di una sequenza paraloga. Non sono visibili purtroppo differenze in lunghezza tra tutti i campioni amplificati.

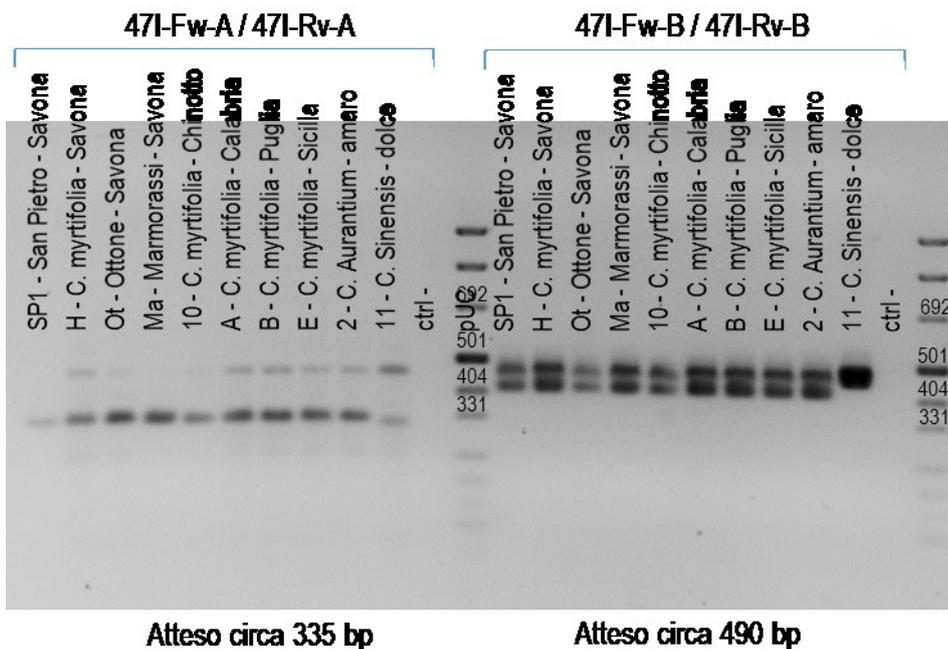


Figura 2.9. Gel di agarosio ottenuto dal caricamento di parte del prodotto di PCR dai primer "migliorati", disegnati sulle due distinte aree dell'introne 47-I (A e B). La dimensione dei frammenti ottenuti rispecchia quella attesa, ricavata sull'informazioni di sequenza fornita dai cloni 47ex1 e 47ex9 quando allineati con le sequenze di riferimento. Due distinti prodotti sono visibili per l'area B. Non sono presenti polimorfismi in lunghezza tra i genomi amplificati.

CNR -Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria (IBBA)

Il successivo clonaggio e sequenziamento dei prodotti ottenuti è stato effettuato per almeno due prodotti (in entrambe le direzioni di sequenziamento) per gli ecotipi SP, H, A, B ed E.

Gli allineamenti effettuati tra i gruppi di sequenze provenienti dalle due distinte aree dell'introne 47I, ha sempre incluso le sequenze di riferimento (CISINE 47I e CICLE_v10015255mg). Inoltre i prodotti scaturiti dall'area B sono stati considerati entrambi e definiti come BandaBassa e BandaAlta.

In **figura 2.10** sono mostrate alcune sezioni degli allineamenti ottenuti dalle sequenze delle due aree (A e B).

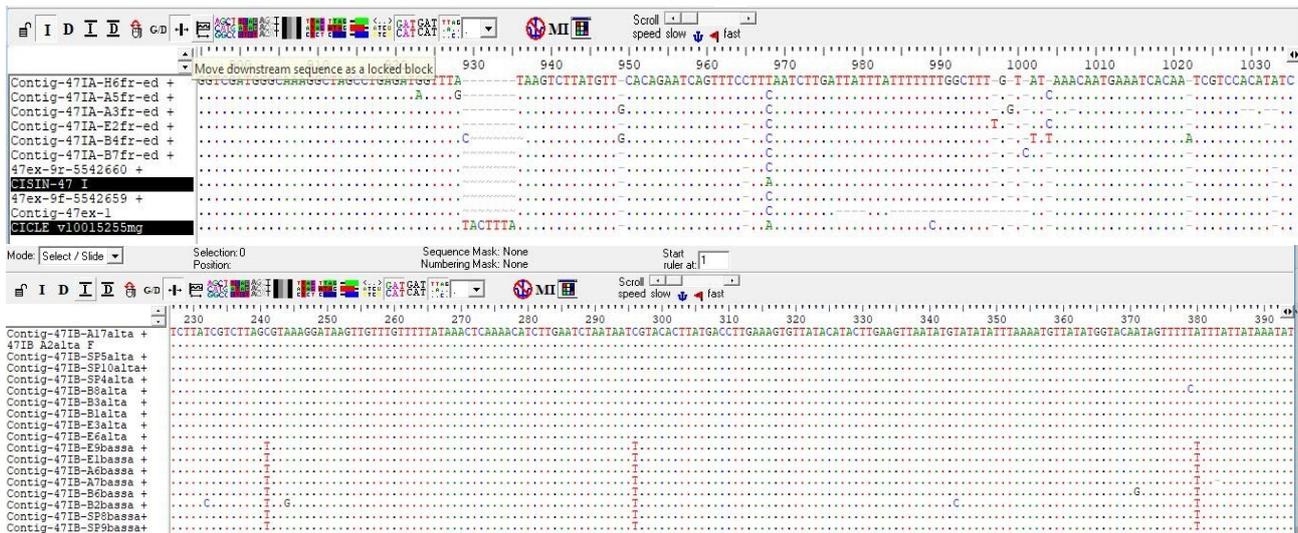


Figura 2.10: Distinte sezioni degli allineamenti ottenuti dalle sequenze ricavate per le due aree (A prima sezione e B seconda sezione). Tutti i genomi analizzati sono tra loro allineati. Solo per le sequenze dell'area A sono state incluse nell'allineamento le sequenze di riferimento di *C. sinensis* e *C. clementina* (CICLE_v10015255), evidenziate sulla sinistra con sfondo nero assieme a quelle dei due cloni iniziali (47ex1 e 47ex9). Nella sezione B sono invece state omesse per ragioni grafiche. In quest'ultima sezione tre distinte Timine (T) diversificano le sequenze ottenute da BandaAlta e BandaBassa rispettivamente.

Limitatamente all'area A dell'introne, le sequenze ottenute dai diversi cloni confermano l'esistenza di sequenze paraloghe per tale gene infatti, avendo disegnato i primer "migliorati" sulla sequenza del clone clone 47ex9, essi sono in grado di produrre frammenti identici per tale sequenza confermando la selettività per un solo paralogo. E' presente una delezione di sette nucleotidi rispetto alla sequenza di riferimento per *C. clementina*. Sono inoltre presenti alcuni polimorfismi puntiformi ma purtroppo nessuno dei essi è ascrivibile a qualsivoglia ecotipo.

L'area B, costituita da due distinte bande (BandaBassa e BandaAlta) ha prodotto due tipologie di sequenza: quelle definite BandaBassa e assimilabili alla sequenza del clone 47ex9, e un secondo gruppo definito come BandaAlta assimilabile invece alla sequenza del clone 47ex1. Anche questo conferma l'esistenza di due paraloghi per tale gene. Purtroppo però nuovamente anche i pochi polimorfismi puntiformi presenti non sono assimilabili a nessun ecotipo di Chinotto.

Le sequenze sopra descritte sono allegate al presente elaborato, complete di editing e allineate alle sequenze di riferimento da cui sono state derivate. Disponibili anche in formato XML.

CNR -Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria (IBBA)

3) ISOLAMENTO DI UN PIÙ AMPIO FRAMMENTO DEL GENE (INTRONE I + ESONE + INTRONE II) PER ECOTIPO SAN PIETRO E VERIFICA DI UNICITÀ DELLA SEQUENZA PER CHSV

Mediante l'adozione della metodica TBP in versione combinata (hTBP, horse TBP) è stato possibile isolare, a partire dai genomi CHSV SP1-4 e B (Chinotto ecotipo Bari) un ampio frammento del gene (800bp) comprensivo della sequenza esonica centrale (esone n 2 del gene) e delle due sequenze introniche ai lati di esso.

Il prodotto PCR è stato isolato da gel di agarosio, limitatamente al frammento di interesse e una volta purificato è stato clonato all'interno di *E. coli*. Le colonie di interesse sono state sequenziate come tutte quelle sopra riportate.

Il confronto tra le sequenze ottenute dai due genomi e quelle disponibili in banca dati ha permesso di identificare tale sequenza, ascrivendola ai rispettivi ortologhi in *C. clementina* (CICLE_v10020164) e *C. sinensis* (CISINE50) (Tabella 2.1). Dal confronto si è evinto che la sequenza isolata è costituita da due regioni introniche molto piccole e rispettivamente di 93 e 88 bp.

Dall'allineamento mostrato in Figura 2.11 si nota la presenza di due gruppi di sequenze: una parte riconducibili a CISINE50 e l'altra parte a CICLE_v10020164. Anche per questa sequenza sono presenti due paraloghi.

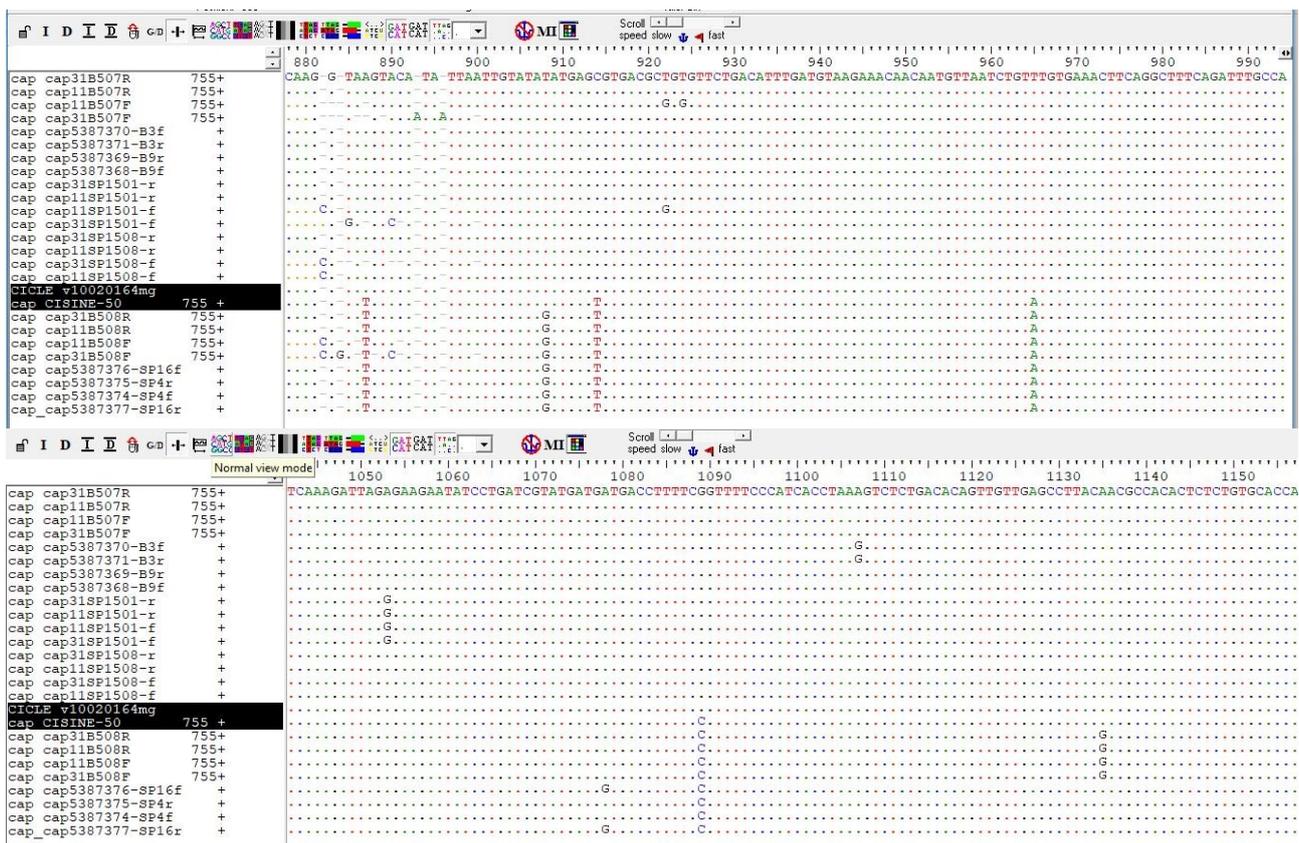


Figura 2.10: Distinte sezioni dall'allineamento ottenuto per le sequenze hTB ricavate dal genoma SP e B. Per entrambi i genomi sono stati analizzati numerosi cloni. Le sequenze di riferimento di *C. sinensis* (CISINE50) e *C. clementina* (CICLE_v10020164), evidenziate sulla sinistra con sfondo nero. Nella prima sezione delle figura sono visibili polimorfismi che permettono di ricondurre gruppi di sequenze ad un'ortologo (CICLE_v10020164) o all'altro



CNR -Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria (IBBA)

(CICLE50). Nella seconda sezione due polimorfismi puntiformi, a carico di una Guanina (G) caratterizzano alcuni cloni di SP, ma non tutti quelli presenti, rispetto agli altri.

Purtroppo, le poche mutazioni presenti su tutta la lunga sequenza non caratterizzano in maniera univoca le tre specie considerate, ovvero i polimorfismi specie-specifici sono quasi inesistenti. Inoltre, le poche variazioni presenti tra i due genomi di chinotto considerati (posizione 1053 e 1134 in figura 2.11), non sono mai riconducibili né a SP e né tantomeno a B, ma il frutto di un errore di processività dell'enzima polimerasico. Tale dato ci ha imposto di non proseguire con lo screening di ulteriori genomi.

Le sequenze sopra descritte sono allegate al presente elaborato, complete di editing e allineate alle sequenze di riferimento da cui sono state derivate. Disponibili anche in formato XML.

Conclusioni

Lo strumento utilizzato (TBP) si è dimostrato valido nell'isolamento mirato di frazioni geniche, con particolare riferimento alle regioni introniche. L'elevato livello di conservazione che caratterizza le sequenze codificanti per le β -tubuline è stato ampiamente confermato anche a livello delle loro regioni non codificanti proteina (intron). A livello di quest'ultimi, l'identità quasi totale, indagata e riscontrata nel corso delle analisi precedenti sotto forma di polimorfismi in lunghezza, all'interno della stessa specie (*C. x myrtifolia*), è stata pienamente confermata. Sono state riscontrate alcune inserzioni o delezioni inter-specifiche in grado di caratterizzare la specie in esame da quelle utilizzate come riferimento (*C. sinensis* e *C. clementina*) ma non dagli ecotipi ad essa afferenti. L'analisi della sequenza nucleotidica delle regioni universalmente considerate più dinamiche dal punto di vista evolutivo come gli introni, ha rivelato la completa staticità di tali sequenze, con trascurabili variazioni tra le specie, e inesistenti polimorfismi anche puntiformi tra ecotipi della stessa specie. La presenza di forme paraloghe delle sequenze target anche nelle specie considerate come riferimento ha, nella maggior parte dei casi, giustificato la scelta di non procedere con ulteriori indagini.

Le sequenze introniche isolate sono sicuramente l'unico esempio universalmente disponibile per *C. x myrtifolia*, anche se nessuna inferenza sull'utilizzo di tali sequenze come strumento unico di diagnosi dell'ecotipo Savona può purtroppo essere ricavata. L'utilizzo di talune sequenze isolate, come ad esempio CISINE5171 e CISINE54, può al contrario essere considerato per la realizzazione di strumenti di indagine molecolare (sonde) in grado di distinguere *C. x myrtifolia* dalle altre specie.

Li, Milano 10/09/2018

Luca Braglia Ph. D