

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BOLOGNA

---

FACOLTÀ DI AGRARIA

DIPARTIMENTO DI COLTURE ARBOREE

**DOTTORATO DI RICERCA (XXI CICLO)**

IN COLTURE ARBOREE ED AGROSISTEMI FORESTALI,  
ORNAMENTALI E PAESAGGISTICI

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE:

AGR/03 ARBORICOLTURA GENERALE E COLTIVAZIONI ARBOREE

**STUDIO MOLECOLARE DEI MECCANISMI  
DELL'AUTOINCOMPATIBILITÀ GAMETOFITICA  
IN PERO EUROPEO (*Pyrus communis*)**

DISSERTAZIONE PRESENTATA DAL DOTT. PAOLO DE FRANCESCHI

Tutore:

*Chiar.mo Prof.*

**SILVIERO SANSAVINI**

Coordinatore:

*Chiar.mo Prof.*

**LUCA CORELLI GRAPPADELLI**

Cotutore:

*Dr.* **LUCA DONDINI**



# Indice

<b>Abstract</b>	<b>1</b>
<b>1 Introduzione</b>	<b>9</b>
1.1 Inquadramento sistematico . . . . .	9
1.2 Il miglioramento genetico del pero . . . . .	10
1.3 L'autoincompatibilità . . . . .	11
1.4 Le S-RNasi . . . . .	15
1.4.1 Identificazione dei geni delle S-RNasi in pero europeo . . . . .	16
1.5 I determinanti pollinici: S-Locus F-Box . . . . .	17
1.5.1 Identificazione dei geni S-Locus F-Box nelle Pyrinae . . . . .	20
1.6 Meccanismo d'azione . . . . .	22
1.6.1 Modelli classici . . . . .	22
1.6.2 Modelli recenti . . . . .	23
1.7 Fattori esterni al locus S . . . . .	28
1.7.1 La transglutaminasi . . . . .	30
1.8 Superamento dell'autoincompatibilità . . . . .	33
1.9 Aspetti evolutivi legati al locus S . . . . .	35
<b>2 Scopi della tesi</b>	<b>41</b>
2.1 Caratterizzazione dei geni S-locus F-Box . . . . .	42
2.2 Ricerca di fattori esterni al locus S . . . . .	43
2.2.1 Sequenziamento del gene della transglutaminasi . . . . .	44
<b>3 Materiali e metodi</b>	<b>45</b>
3.1 Materiale vegetale . . . . .	45
3.2 Estrazione di DNA . . . . .	46
3.2.1 Estrazione da embrioni . . . . .	47
3.2.2 Quantificazione e diluizione . . . . .	47

3.3	PCR . . . . .	48
3.3.1	Realizzazione dei primer . . . . .	49
3.3.2	Elettroforesi su gel d'agarosio . . . . .	49
3.3.3	Elettroforesi su gel di poliacrilamide . . . . .	50
3.3.4	Genotipizzazione al locus S . . . . .	52
3.3.5	Marcatori CAPS . . . . .	53
3.4	Clonaggio . . . . .	54
3.4.1	Terreni di coltura . . . . .	54
3.4.2	Cellule competenti . . . . .	55
3.4.3	Amplificazione con DNA polimerasi High-Fidelity . . . . .	56
3.4.4	Ligasi . . . . .	57
3.4.5	Trasformazione . . . . .	57
3.4.6	Estrazione di plasmidi . . . . .	59
3.5	Impollinazioni e campionamento degli stili . . . . .	59
3.6	Estrazione di RNA da stili . . . . .	60
3.6.1	Trattamento dei materiali e dei reagenti . . . . .	61
3.6.2	Protocollo d'estrazione . . . . .	61
3.6.3	Trattamento con DNasi . . . . .	62
3.6.4	Quantificazione . . . . .	63
3.7	Retrotrascrizione . . . . .	63
3.7.1	Sintesi del primo filamento di cDNA . . . . .	63
3.7.2	Sintesi del secondo filamento di cDNA . . . . .	63
3.8	cDNA-AFLP . . . . .	65
3.8.1	Formazione dei campioni di cDNA . . . . .	65
3.8.2	Restrizione . . . . .	65
3.8.3	Ligasi . . . . .	66
3.8.4	Preamplificazione . . . . .	66
3.8.5	Amplificazione . . . . .	67
3.8.6	Clonaggio dei TDF (Transcript-Derived Fragment) . . . . .	68
3.9	RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) . . . . .	70
3.10	Strumenti bioinformatici . . . . .	71
<b>4</b>	<b>Risultati e discussione</b>	<b>73</b>
4.1	Ricerca e caratterizzazione di geni S-locus F-box . . . . .	73
4.1.1	Analisi dell'omologia di sequenza: S-RNasi e SFBB . . . . .	73
4.1.2	Geni F-box del gruppo Pp $\alpha$ . . . . .	77
4.1.3	Geni F-box del gruppo Pp $\beta$ . . . . .	79

4.1.4	Geni F-box del gruppo Pp $\gamma$ . . . . .	82
4.1.5	Geni F-box del gruppo Mds9 . . . . .	84
4.1.6	Geni F-box del gruppo Mds3 . . . . .	86
4.1.7	Mappaggio dei geni identificati . . . . .	88
4.1.8	Considerazioni sulla struttura del locus S nelle Pyrinae . . . . .	92
4.2	Geni differenzialmente espressi in incroci compatibili/incompatibili . . . . .	95
4.2.1	Analisi delle sequenze . . . . .	98
4.2.2	Osservazioni sulla natura dei frammenti genici . . . . .	101
4.3	Sequenziamento del gene della transglutaminasi . . . . .	105
<b>5</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>111</b>
<b>A</b>	<b>Sequenze</b>	<b>113</b>
<b>B</b>	<b>Allineamenti</b>	<b>211</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>241</b>



---

## Abstract

### **Molecular analysis of the gametophytic self-incompatibility mechanisms in European pear (*Pyrus communis*)**

Self-incompatibility (SI) systems have evolved in many flowering plants to prevent self-fertilization and thus promote outbreeding. Pear and apple, as many of the species belonging to the Rosaceae, exhibit RNase-mediated gametophytic self-incompatibility, a widespread system carried also by the Solanaceae and Plantaginaceae. Pear orchards must for this reason contain at least two different cultivars that pollenize each other; to guarantee an efficient cross-pollination, they should have overlapping flowering periods and must be genetically compatible.

This compatibility is determined by the S-locus, containing at least two genes encoding for a female (pistil) and a male (pollen) determinant. The interaction between the two determinants occurs in the transmitting tissue of the style, and results in the selective inhibition of the growth of incompatible pollen tubes. Since this is a gametophytic self-incompatibility (GSI) system, the rejection occurs when the haploid genome of the male gametophyte (the pollen grain) carries a S-haplotype identical to one of the two possessed by the diploid pistil; cultivars possessing two common S-haplotypes are thus fully incompatible, since they cannot fertilize each other.

The female determinant in the Rosaceae, Solanaceae and Plantaginaceae system is a stylar glycoprotein with ribonuclease activity (S-RNase), that acts as a specific cytotoxin in incompatible pollen tubes degrading cellular RNAs. Since its identification, the S-RNase gene has been intensively studied and a large number of alleles has been characterized; now the sequence of the alleles carried by the most important cultivars of apple, pear and other cultivated species are available in online databases, and efficient S-genotyping molecular assays have been developed on this gene.

On the contrary, the male determinant has been only recently identified as a pollen-expressed protein containing a F-box motif, called S-Locus F-box (abbreviated SLF or SFB). Since F-box proteins are best known for their participation to the SCF (Skp1 - Cullin - F-box) E3 ubiquitine ligase enzymatic complex, that is involved in protein degradation through the 26S proteasome pathway, the male determinant is supposed to act mediating the ubiquitination of the S-RNases, targeting them for the degradation. Several models have been proposed to explain how this interaction takes

## ABSTRACT

---

place; S-RNase degradation in compatible pollen tubes would result in the possibility to grow through the style and reach the ovary, where successful fertilization would take place; in incompatible pollen tubes, on the contrary, the specific interaction between the male and female determinants would not result in S-RNase ubiquitination, leaving them intact and allowing them to exert their cytotoxic activity.

SLF/SFB genes have been identified in many species of the three families carrying RNase-mediated GSI; transformation experiments and mutant analyses have demonstrated their role as male determinants of self-incompatibility in the Solanaceae, Plantaginaceae and, among the Rosaceae, in the genus *Prunus*. In the Pyrinae (formerly Maloideae) the situation is less clear: attempts to clone homologue genes produced no results until very recently, and available sequence informations are still very poor.

Important informations came from the use of a genomic library from the apple cultivar ‘Florina’ by Sassa *et al.* 2007; the sequencing of a 317 kb region surrounding the apple S<sub>9</sub>-RNase led to the identification of two F-box genes, named MdSFBB<sup>9- $\alpha$</sup>  and MdSFBB<sup>9- $\beta$</sup>  (MdSFBB standing for *Malus*  $\times$  *domestica* S-locus F-Box Brothers); two homologue genes (MdSFBB<sup>3- $\alpha$</sup>  and MdSFBB<sup>3- $\beta$</sup> ) were found in the same library in clones containing the S<sub>3</sub>-RNase. In Japanese pear, three F-box genes linked to each of the S<sub>4</sub> and S<sub>5</sub> haplotypes were cloned from pollen cDNA, and named PpSFBB<sup>4/5- $\alpha$</sup> , PpSFBB<sup>4/5- $\beta$</sup>  and PpSFBB<sup>4/5- $\gamma$</sup>  (*Pyrus pyrifolia* SFBB).

The SFBB genes exhibit S haplotype-specific sequence divergence and pollen-specific expression; their multiplicity is a feature whose interpretation is unclear: it has been hypothesized that all of them participate in the S-specific interaction with the RNase, but it is also possible that only one of them is involved in this function.

Even if the S locus male and female determinants are the only responsible for the specificity of the pollen-pistil recognition, many other factors are supposed to play a role in GSI; these are not linked to the S locus and act in a S-haplotype independent manner. They can have a function in regulating the expression of S determinants (group 1 factors), modulating their activity (group 2) or acting downstream, in the accomplishment of the reaction of acceptance or rejection of the pollen tube (group 3).

The aim of this study was to contribute to elucidating the molecular mechanism of GSI in European pear (*Pyrus communis*) as well as in the other Pyrinae; it was divided in two parts, the first focusing on the characterization of male determinants, and the second on factors external to the S locus.



---

The research of S locus F-box genes was primarily aimed to the identification of such genes in European pear, for which sequence data are still not available; moreover, it allowed also to investigate about the S locus structure in the Pyrinae.

The recent discovery of SFBB genes led to a question around how the S locus is conserved among the different species; on one side, the presence of S-RNase alleles of almost identical sequence between the different species suggests that the current S haplotypes might derive from a very ancient common ancestor, and might have been maintained almost unaltered during the evolutionary story of the Pyrinae despite the species divergence; this has been possible due to the peculiar features of the S locus, in which recombination is very low and the loss of an haplotype is genetically strongly unfavoured, for a phenomenon called trans-specific evolution. On the other hand the evidence of the presence of very different F-box genes, for number and features, between apple and Japanese pear seems to suggest that the S locus has evolved in different structures in the two species.

To investigate this aspect, the analysis was carried out on a pool of varieties of the three species *Pyrus communis* (European pear), *Pyrus pyrifolia* (Japanese pear), and *Malus × domestica* (apple); varieties carrying S haplotypes whose RNases are highly similar were chosen, in order to check whether or not the same level of similarity is maintained also between the male determinants.

Primers were realized on each of the sequences of the SFBB genes, for the amplification of homologue genes in the three species; a total of 82 sequences was obtained, 47 of which represent the first S-locus F-box genes sequenced from European pear. The results show that the all the SFBB genes that were thought to be specific for apple or Japanese pear, actually have homologs in all the three species, pointing out that the number of F-box genes linked to each S haplotype is indeed greater than thought; moreover, in some cases F-box genes with very similar sequences were obtained from genotypes carrying highly conserved RNase alleles.

These data strongly support the hypothesis that the S locus structure is conserved among the three species, and presumably among all the Pyrinae; at least five genes have homologs in the analysed S haplotypes, but the number of F-box genes surrounding the S-RNase could be even greater. The high level of sequence divergence and the similarity between alleles linked to highly conserved RNases, suggest a shared ancestral polymorphism also for the F-box genes; as expected for genes that are inherited together as an unique segregating unit, the phenomenon of trans-specific evolution produced the same effect on F-box genes and S-RNases, leading to higher level of homology between pairs of alleles of different species than within the

## ABSTRACT

---

same species.

The F-box genes identified in European pear were mapped on a segregating population of 91 individuals from the cross ‘Abbé Fétel’ × ‘Max Red Bartlett’, for which a genetic linkage map was previously developed. All the genes were placed on the linkage group 17, where the S locus has been placed both in pear and apple maps, and resulted strongly associated to the S-RNase gene. The linkage with the RNase was perfect for some of the F-box genes, while for others, the PpSFBB<sup>α</sup> and PpSFBB<sup>γ</sup> homologs, very rare single recombination events were identified.

This demonstrates that PpSFBB<sup>α</sup> and PpSFBB<sup>γ</sup> homologs, despite a strong association with the S-RNase, cannot be considered as belonging to the S locus. Their role as the male determinants of self-incompatibility can thus be excluded. On the contrary, other F-box genes identified in this study exhibit all the genetic features expected for the pollen S, as the high level of divergence, the perfect linkage to the S locus, and the shared ancestral polymorphism; they can be thus considered as the best candidates for the role of male determinant of self-incompatibility in the Pyrinae.

The second part of this study was focused on the research of other genes involved in the SI response in pear; it was aimed on one side to the identification of genes differentially expressed in compatible and incompatible crosses, and on the other to the cloning and characterization of the transglutaminase (TGase) gene, whose role may be crucial in pollen rejection.

Some examples of factors requested for the SI response, but not linked to the S locus, have been described in the Solanaceae (*HT-B*, *120K*, *4936-factor*), but no homologue genes were identified in the Rosaceae. These factors were identified in self-compatible mutants; a mutation of one of these genes results in the breakdown of self-incompatibility, even though functional S haplotypes are carried by the S locus. However, such kind of mutants were never identified in the Pyrinae. Our study focused on the research of genic factors involved in SI response downstream the recognition of male and female determinants, involved in the execution of the triggered acceptance of rejection reaction.

For the identification of differentially expressed genes, controlled pollinations were carried out on the cultivar ‘Abbé Fétel’ using “self” pollen, incompatible pollen from the cultivar ‘Doyenne du Comice’, half-compatible pollen from ‘Cascade’ and fully compatible pollen from ‘Conference’; styles were collected at different times after pollination and expression profiles were compared through cDNA-AFLP.

---

28 fragments displaying an expression pattern related to compatibility or incompatibility were identified, cloned and sequenced; the sequence analysis allowed to assign a putative annotation to a part of them.

Among the identified genes, several were involved in the synthesis of cell wall components, suggesting a crucial role of this structure in the accomplishment of the pollen acceptance or rejection reaction; the other identified genes are involved in very different cellular processes or in defense mechanisms, suggesting a very complex change in gene expression following the pollen/pistil recognition.

The pool of genes identified with this technique offers a good basis for further study toward a better understanding of how the SI response is carried out.

Among the factors involved in SI response, an important role may be played by transglutaminase (TGase), an enzyme that catalyzes the covalent conjugation of polyamines or other amine donors (such as lysyl residues) to  $\gamma$ -carboxamide groups of protein glutamine residues. It is thus involved both in post-translational protein modification and in protein cross-linking, generating covalent bonds between lysine and glutamine, or binding the same polyamine to two glutamines from different proteins.

TGase activity was detected in pollen tubes, where the cytoskeletal proteins actin and  $\alpha$ -tubulin were identified among the substrates processed by this enzyme. An abnormal cytoskeletal reorganization was observed in self-incompatible pollen tubes during the rejection reaction, resulting in the formation of high molecular mass aggregates of actin and tubulin; these aggregates may be formed through a series of protein cross-linking catalyzed by TGase. In fact, the TGase activity detected in pear styles was significantly higher when pollinated in incompatible combinations, than in compatible ones.

In spite of the possibly important role played by this enzyme in SI, sequence informations were still not available for the TGase gene in pear and the other Rosaceae; the aim of this part of the work was thus to identify and clone the pear TGase gene.

The first plant TGase was identified in *Arabidopsis thaliana*; this sequence was aligned to some apple ESTs and primers were realized for the amplification of the homologue gene in pear. Different fragments of the gene were amplified and cloned from both genomic DNA and cDNA from incompatible pollinated styles, leading to the assembly of the full-length coding sequence of the gene. The deduced protein sequence counts 725 aminoacids and shows a good homology with the *Arabidopsis* one, particularly in the active site where the three catalytic residues Cys-His-Asp,

## **ABSTRACT**

---

typical of all TGases, were clearly identified.

The full-length coding sequence was cloned from cDNA, and provided a precious tool for the future production of the recombinant protein and further study of the *in vitro* and *in vivo* action of this enzyme.





# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Inquadramento sistematico

La famiglia delle Rosaceae comprende più di 90 generi e 3000 specie fra piante arboree, erbacee ed arbustive. Fra queste, oltre a specie coltivate a scopo ornamentale (come la rosa o il biancospino), si trovano molte delle più importanti specie da frutto, come melo, pero, cotogno, sorbo, nespolo, pesco, mandorlo, albicocco, susino, ciliegio, fragola, rovo e lampone.

Il pero europeo (*Pyrus communis*), così come il melo (*Malus × domestica*) e il pero giapponese (*Pyrus pyrifolia*), appartiene secondo la classificazione tradizionale alle Maloideae, una delle tre sottofamiglie delle Rosaceae insieme alle Rosoideae e alle Amygdaloideae (comprendenti il genere *Prunus*). Recentemente è però stata proposta una nuova classificazione, dedotta dallo studio di regioni genomiche nucleari e organellari, che suddivide la famiglia Rosaceae nelle sottofamiglie Rosoideae, Dryadoideae e Spiraeoideae; a quest'ultima apparterebbero sia il genere *Prunus* (tribù Amygdaleae) che le specie precedentemente inserite fra le Maloideae (corrispondenti alla sottotribù Pyrinae della tribù Pyreae) [1, 2].

Le Pyrinae costituiscono un gruppo estremamente vasto, comprendendo circa 1000 specie (un terzo di tutte le Rosaceae) suddivise in 30 generi. Caratteristica comune e distintiva per queste specie è il numero cromosomico di base pari a 17; poichè nelle altre specie delle Rosaceae è compreso fra 7 e 9, è probabile che le Pyrinae siano di origine allopoliploide. Già negli anni '30 [3] è stato ipotizzato che il numero cromosomico di base  $x = 17$  sia stato generato da un'ibridazione spontanea fra una specie ancestrale con  $x = 9$  ed una con  $x = 8$ , seguita da raddoppiamento cromosomico e diploidizzazione secondaria; secondo studi recenti sembra invece più probabile che l'ibridazione sia avvenuta fra due specie con  $x = 9$  e che sia stata poi

seguita da una riduzione aneuploide [4].

Oltre ad aver svolto un ruolo importante nella storia evolutiva di queste specie, l'ibridazione è un fenomeno molto diffuso fra le *Pyrinae*; alcuni ibridi, sia interspecifici che intergenerici, sono molto fertili e si ritrovano spontaneamente in natura, oppure vengono realizzati appositamente dall'uomo nei programmi di miglioramento genetico, allo scopo di introdurre caratteri agronomicamente utili da specie selvatiche a specie coltivate.

### 1.2 Il miglioramento genetico del pero

La coltivazione del pero, sia europeo che giapponese, ha subito un forte aumento negli ultimi anni; secondo le stime fornite dalla FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) la produzione di pere nell'anno 2007 ha superato i 20 milioni di tonnellate<sup>1</sup>. Il maggior produttore mondiale è la Cina, che negli ultimi anni ha costantemente incrementato la produzione fino a superare i 12 milioni di tonnellate; l'Italia si colloca al secondo posto (il primo considerando il solo pero europeo) con più di 800.000 tonnellate; di queste, circa il 70% viene prodotto in Emilia Romagna.

Nonostante questa elevata e costante produzione, è stata osservata una forte contrazione del numero di varietà di pero utilizzate in agricoltura: nell'ultimo secolo si è passati da un centinaio ad appena una trentina, e l'80% del totale della produzione europea è concentrato su sole otto varietà: Conference, William e relativi mutanti rossi (fra cui Max Red Bartlett), Abate Fétel, Blanquilla/Spadona, Decana del Comizio, Coscia/Ercolini, Dr J. Guyot e Kaiser. Diversamente da quanto avviene per altre specie da frutto, la grande maggioranza delle varietà di pero attualmente coltivate è di origine piuttosto antica, costituita da genotipi ottenuti per lo più nel corso dei secoli XVII e XVIII e propagati per innesto. Si tratta nella quasi totalità dei casi di varietà diploidi ( $2n = 2x = 34$ ), anche se esistono genotipi triploidi ( $2n = 3x = 51$ ) o tetraploidi ( $2n = 4x = 68$ ).

In Europa sono operativi almeno una quindicina di programmi di miglioramento genetico per questa specie; i principali obiettivi perseguiti sono i seguenti [5]:

- ampliamento del calendario di maturazione: molte delle varietà tradizionali maggiormente diffuse, come William, Conference, Abate Fétel, Decana del Comizio e Kaiser, occupano i due mesi principali della raccolta (agosto e settembre), mentre nel periodo precoce (da metà giugno a tutto luglio) e tardivo

---

<sup>1</sup><http://faostat.fao.org/>



(dalla seconda metà di settembre a tutto ottobre) ci sono spazi copribili da nuove varietà;

- resistenza ad insetti (*Cacopsilla pyri*) e patogeni batterici (*Erwinia amylovora*, responsabile del “fire blight”) e fungini (*Venturia pyrina*, responsabile della ticchiolatura del pero);
- habitus compatto dell'albero;
- adattabilità ambientale, in particolare per quanto riguarda la resistenza alle basse temperature invernali ed al caldo estivo;
- vari aspetti della qualità del frutto, come forma, colore della buccia, polpa e qualità organolettiche;
- ottenimento di nuove tipologie di frutto, come ibridi fra pero europeo e pero giapponese, pere ad epidermide rossa o pere a polpa particolarmente soda e compatta, adatta alla trasformazione;
- superamento dell'autoincompatibilità gametofitica ed ottenimento di cultivar autofertili.

Il fenomeno dell'autoincompatibilità presente nella quasi totalità delle cultivar di pero europeo, come anche di pero giapponese e di melo, fa sì che il polline prodotto da un fiore non possa fecondare i fiori della stessa pianta o di piante della stessa varietà. Nel frutteto è quindi necessario associare due varietà diverse per consentire la reciproca impollinazione; le due varietà devono avere periodi di fioritura sovrapponibili ed essere compatibili fra loro.

Nel pero è comunque presente anche il fenomeno della partenocarpia, cioè la possibilità di sviluppare frutti in assenza di fecondazione; i frutti che ne derivano sono caratterizzati dall'assenza di semi. La tendenza alla partenocarpia varia a seconda del genotipo e può essere stimolata mediante l'uso di fitoregolatori, che quindi assumono una notevole importanza nella regolazione della fruttificazione e dello sviluppo vegetativo dell'albero, riducendo anche il fenomeno dell'alternanza di produzione [7].

### 1.3 L'autoincompatibilità

Le Rosaceae, come molte angiosperme, producono fiori ermafroditi in cui gli organi riproduttivi femminili (pistilli) e maschili (antere) si trovano in stretta prossimità;

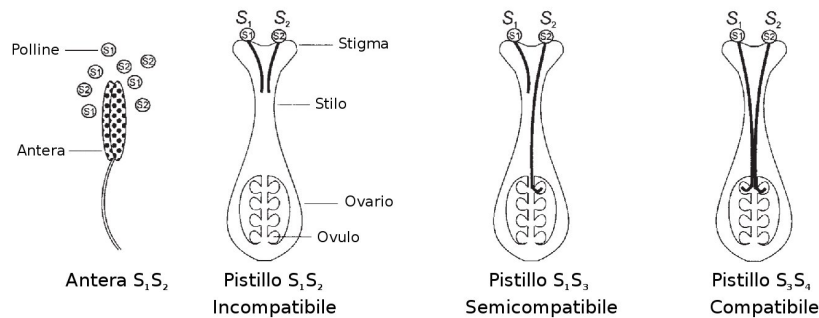
questo produce una forte tendenza all'auto-impollinazione, e di conseguenza all'autogamia. Molte specie hanno evoluto specifici meccanismi di autoincompatibilità (SI, *Self-Incompatibility*) che prevengono questo fenomeno, promuovendo l'allogamia. La reazione di autoincompatibilità comporta un processo di riconoscimento fra polline e pistillo che innesca una risposta tale da impedire al polline "self", proveniente dalla stessa pianta, di giungere a fecondare l'ovocellula.

Esistono diversi meccanismi di autoincompatibilità, evolutisi in maniera indipendente nelle diverse famiglie di angiosperme; caratteristica comune a tutti i meccanismi finora caratterizzati è il controllo genetico della specificità del riconoscimento fra polline e pistillo dovuto un singolo locus multiallelico, il locus S. Questo locus contiene almeno due geni: un determinante femminile (espresso nel pistillo) ed uno maschile (espresso nel polline), in stretta associazione fra loro e trasmessi alla progenie come un'unica entità nella segregazione, detta allele S o, più correttamente, aplotipo S. Il riconoscimento del polline "self" o "non-self" avviene grazie all'interazione fra i prodotti proteici di questi due geni, e la risposta di incompatibilità è innescata quando i due determinanti provengono dallo stesso aplotipo S [8].

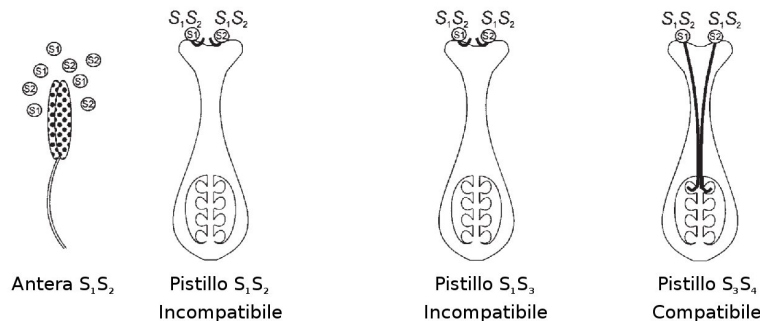
I meccanismi di autoincompatibilità possono essere di tipo gametofitico (GSI, *Gametophytic Self-Incompatibility*) o sporofitico (SSI, *Sporophytic Self-Incompatibility*). Nel primo caso il riconoscimento del granulo pollinico è determinato dal genoma aploide del granulo stesso (il gametofito), mentre nel secondo dipende dal genoma diploide della pianta da cui il polline proviene (sporofito). Entrambi i sistemi risultano nell'impossibilità per un fiore di essere fecondato da polline della stessa pianta, mentre il comportamento è significativamente diverso nell'incrocio fra individui diversi (vedi figura 1.1). Nel caso della SSI infatti il polline prodotto da un individuo viene interamente rigettato da tutte le piante che possiedano uno qualsiasi o entrambi gli alleli S posseduti dall'individuo stesso (a meno che uno dei due alleli non sia dominante sull'altro e ne inibisca l'espressione); qualora due parentali abbiano in comune anche un solo allele S, quindi, l'incrocio risulta totalmente incompatibile. Nel caso della GSI invece l'impollinazione incrociata fra due individui può portare a tre esiti diversi:

- Compatibilità totale: si ha nel caso i due parentali non abbiano in comune alcun allele S; in questo caso tutti i granuli pollinici prodotti da una pianta vengono accettati dall'altra.
- Incompatibilità totale: si ha solo quando i due parentali hanno identico genotipo S, condividono cioè entrambi gli alleli; tutti i granuli pollinici vengono rigettati e non avviene la fecondazione.

A. Autoincompatibilità gametofitica (GSI)



B. Autoincompatibilità sporofitica (SSI)



**Figura 1.1:** diverse combinazioni di incrocio in relazione all'autoincompatibilità. (A) nell'incompatibilità di tipo gametofitico il riconoscimento del polline, che avviene nel terzo superiore dello stilo, dipende esclusivamente dall'aplotipo S portato dal genoma aploide del granulo stesso, generando quindi tre possibili esiti nell'interazione fra due genotipi diploidi: incompatibilità, semicompatibilità e compatibilità totale. (B) nell'incompatibilità sporofitica invece il riconoscimento del polline avviene sulla papilla stigmatica, ed essendo determinato dal genotipo diploide del parentale maschile può portare solo a incompatibilità o compatibilità totale. Tratto da Silva and Goring, 2001 [6]

- Semicompatibilità: si ha quando i due parentali hanno in comune un allele S; i granuli pollinici contenenti l'allele comune vengono rigettati, mentre i restanti possono accrescersi nel pistillo fino a fecondare l'ovocellula.

Attualmente sono stati caratterizzati a livello molecolare tre distinti sistemi di autoincompatibilità, uno di tipo sporofitico e due di tipo gametofitico; la tabella 1.1 ne fornisce un quadro riassuntivo.

L'autoincompatibilità sporofitica è presente nelle famiglie Brassicaceae, Asteraaceae e Convolvulaceae, nelle quali probabilmente avviene attraverso meccanismi diversi; l'unico sistema sufficientemente caratterizzato è quello delle Brassicaceae. Il determinante femminile in questo caso è costituito da un recettore chinasi trans-

Famiglia	Tipo di SI	Determinante maschile	Determinante femminile
Brassicaceae	SSI	SP11/SCR	SRK
Solanaceae, Rosaceae, Plantaginaceae	GSI	SLF/SFB	S-RNasi
Papaveraceae	GSI	sconosciuto	Proteina S

**Tabella 1.1:** schema riassuntivo dei meccanismi di autoincompatibilità conosciuti. Tratto da Takayama and Isogai, 2005 [8]

smembrana (SRK, *S-locus Receptor Kinase*) [9], espresso soprattutto sulla papilla dello stigma; quello maschile da una piccola proteina ricca in cisteina (SCR, *S-locus Cysteine-Rich*, indicata anche come SP11, *S-locus Protein 11*) [10, 11]. Quest’ultima viene prodotta all’interno dell’antera nel tessuto diploide del tapetum, rimanendo poi sul rivestimento dei granuli pollinici maturi. Il riconoscimento avviene a livello dello stigma, dove il legame delle SP11/SCR ai recettori SRK innesca la reazione di rigetto del polline “self”, impedendone l’idratazione o arrestando la crescita del tubetto subito dopo la germinazione.

L’autoincompatibilità gametofitica ha una diffusione maggiore, essendo stata descritta in membri di almeno 8 famiglie (Solanaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Leguminosae, Onagraceae, Plantaginaceae, Rosaceae, Poaceae); a livello molecolare sono stati caratterizzati due meccanismi distinti: quello mediato da ribonucleasi (RNasi), presente nelle Rosaceae, Solanaceae e Plantaginaceae, e quello presente in *Papaver rhoeas* (Papaveraceae).

In quest’ultimo sistema il determinante femminile è una piccola proteina secreta nel tessuto stigmatico, detta proteina S [12], mentre non è ancora stato identificato il determinante maschile; la reazione di rigetto è mediata da una rapida crescita della concentrazione del calcio intracellulare ( $[Ca^{2+}]_i$ ) all’interno del tubetto pollinico incompatibile [13]. La  $[Ca^{2+}]_i$  è un secondo messaggero coinvolto in vie di trasduzione del segnale determinanti per la crescita apicale del tubetto; la sua rapida variazione indotta dal riconoscimento incompatibile innesca vari meccanismi, come la depolimerizzazione dei filamenti di actina [14], che portano alla morte del tubetto pollinico per PCD (*Programmed Cell Death*) [15].

L’autoincompatibilità gametofitica mediata da S-RNasi è il meccanismo più diffuso, essendo presente in molti generi delle Rosaceae (fra cui *Malus*, *Pyrus* e *Prunus*) e delle Solanaceae (*Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Petunia*, *Solanum*) ed uno delle Plan-

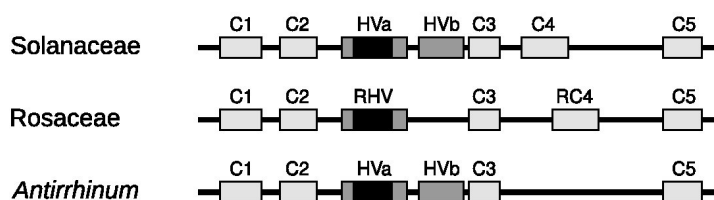
taginaceae (*Antirrhinum*). In questo sistema il determinante femminile è costituito appunto da proteine stilari con attività ribonucleasica, mentre quello maschile è una proteina con dominio F-box detta SLF (*S-Locus F-box*) o SFB (*S-locus F-Box*).

## 1.4 Le S-RNasi

I determinanti femminili dell'autoincompatibilità mediata da S-RNasi nelle Solanaceae furono identificati per la prima volta in *Nicotiana alata* come glicoproteine stilari, di circa 30 kDa, associate al locus S [16, 17]; successivamente ne fu dimostrata l'attività ribonucleasica [18]. Il loro ruolo di determinanti stilari dell'incompatibilità è stato dimostrato con esperimenti di trasformazione in *Petunia* e *Nicotiana*: il silenziamento di una S-RNasi infatti produce incapacità di rigettare il polline dello stesso apotipo S, mentre la trasformazione con un nuovo allele causa l'acquisizione di nuove specificità nel rigetto stesso [19, 20].

Le S-RNasi sono espresse specificamente nel pistillo, in particolare nel terzo superiore dello stilo, dove avviene l'inibizione della crescita dei tubetti incompatibili; sono proteine glicosilate in uno o più punti, anche se la loro glicosilazione non è indispensabile per la capacità di rigetto del tubetto pollinico [21]. I diversi alleli di S-RNasi esibiscono una grande variabilità: l'identità di sequenza a livello aminoacidico all'interno della stessa specie può essere inferiore al 25% nelle Rosaceae ed al 40% nelle Solanaceae [22]; tuttavia è possibile identificare diverse regioni conservate. Nelle Solanaceae ne sono presenti 5, denominate C1 - C5, quattro delle quali (C1, C2, C3 e C5) sono presenti anche nelle Rosaceae ed in *Antirrhinum*; la regione C4 delle Solanaceae è sostituita nelle Rosaceae da un'altra regione conservata, denominata RC4. Oltre a queste, sono presenti regioni ipervariabili: due nelle solanaceae e in *Antirrhinum* (HVa e HVb) ed una nelle Rosaceae (RHV, corrispondente alla HVa), responsabili della maggior parte della variabilità fra alleli (vedi figura 1.2).

La struttura cristallina della proteina è stata determinata per la RNasi S<sub>F11</sub> di *Nicotiana alata* e per la S<sub>3</sub> di *Pyrus pyrifolia* [24, 25]. Le due proteine hanno strutture molto simili, costituite da otto  $\alpha$ -eliche e sette foglietti  $\beta$ , corrispondenti alla struttura tipica della famiglia delle RNasi T2 [26]. Le regioni ipervariabili sono esposte sulla superficie della molecola; è probabile che queste siano coinvolte nell'interazione con il determinante pollinico e, quindi, nella specificità del riconoscimento; tuttavia è stato osservato che nelle Rosaceae alleli diversi di S-RNasi possono avere identiche regioni ipervariabili, suggerendo quindi che anche residui situati in altre posizioni della proteina siano responsabili della specificità dell'interazione [27].



**Figura 1.2:** struttura dei geni delle S-RNasi nelle diverse famiglie. In grigio chiaro sono evidenziate le regioni conservate: quattro di queste sono comuni fra le tre famiglie, mentre le regioni C4 e RC4 sono specifiche, rispettivamente, delle Solanaceae e delle Rosaceae; in grigio scuro sono invece riportate le regioni ipervariabili. La sequenza codificante è interrotta da un solo introne (in nero nella figura) presente all'interno della regione HVa/RHV. Adattato da Vieira and Charlesworth, 2002 [23]

#### 1.4.1 Identificazione dei geni delle S-RNasi in pero europeo

Le prime sequenze di S-RNasi nelle Rosaceae furono clonate in pero giapponese nel 1992 [28]; da allora molti studi sono stati finalizzati alla caratterizzazione degli alleli di questo gene ed all'ottenimento di un metodo molecolare per la genotipizzazione delle varietà al locus S, e quindi per la definizione dei gruppi di compatibilità, nelle specie coltivate autoincompatibili. A tale scopo risulta particolarmente utile l'unico introne che interrompe la sequenza codificante della S-RNasi (vedi figura 1.2), la cui dimensione, estremamente variabile, consente il più delle volte di distinguere i diversi alleli con semplici marcatori di tipo SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*).

Ad oggi sono ormai state ottenute e rese disponibili in banche dati online le sequenze degli alleli di S-RNasi delle principali cultivar di molte Rosaceae, fra cui melo, pero giapponese e pero europeo. In quest'ultima specie le prime sequenze risalgono al 2002 [29]. Studi successivi hanno portato al sequenziamento di molti alleli, generando però un'ambiguità nella loro denominazione: inizialmente infatti i diversi alleli di pero europeo sono stati nominati utilizzando una lettera ( $S_a, S_b, S_c, \dots$ ) [29, 30, 31], al fine di distinguerli da quelli di pero giapponese che vengono identificati con un numero progressivo ( $S_1, S_2, S_3, \dots$ ); in alcuni altri lavori invece è stata adottata la nomenclatura basata sul numero [32, 33], che già era stata utilizzata nell'identificazione di alleli S su base fenotipica [34]. Recentemente è stato proposto un nuovo sistema di nomenclatura degli alleli S di pero europeo basato su una numerazione che, per evitare l'ambiguità con gli alleli di pero giapponese, parte dal numero 101 (vedi tabella 1.2); questa distinzione risulta utile soprattutto per i programmi di miglioramento genetico nei quali vengono incrociati fra loro genotipi appartenenti alle

## 1.5 I determinanti pollinici: S-Locus F-Box

due specie [35].

Allele S	Vecchie denominazioni	Accession number
S <sub>101</sub>	S <sub>j</sub> /S <sub>e</sub> /S <sub>1</sub>	AF457594
S <sub>102</sub>	S <sub>l</sub> /S <sub>2</sub>	AY103409
S <sub>103</sub>	S <sub>k</sub> /S <sub>3</sub>	AY103408
S <sub>104</sub>	S <sub>b</sub> /S <sub>4</sub>	AJ458182
S <sub>105</sub>	S <sub>a</sub> /S <sub>5</sub>	AJ458181
S <sub>106</sub>	S <sub>i</sub> /S <sub>6</sub>	AF518319
S <sub>107</sub>	S <sub>h</sub> /S <sub>7</sub>	AJ459776
S <sub>108</sub>	S <sub>d</sub> /S <sub>8</sub>	AJ459775
S <sub>109</sub>	S <sub>p</sub> /S <sub>9</sub>	AY421968
S <sub>110</sub>	S <sub>g</sub> /S <sub>10</sub>	AB258360
S <sub>111</sub>	S <sub>s</sub> /S <sub>11</sub>	AB258365
S <sub>113</sub>	S <sub>t</sub> /S <sub>13</sub>	AB258366
S <sub>114</sub>	S <sub>c</sub> /S <sub>14</sub>	AJ459774
S <sub>115</sub>	S <sub>m</sub>	AY159323
S <sub>116</sub>	S <sub>n</sub>	AY195840
S <sub>117</sub>	S <sub>o</sub>	AY261994
S <sub>118</sub>	S <sub>q</sub>	AB236424
S <sub>119</sub>	S <sub>r</sub>	AB236426

**Tabella 1.2:** primi 18 aplotipi S di pero europeo per i quali è stato sequenziato il gene della RNasi. Oltre alla denominazione secondo il nuovo sistema di nomenclatura, sono riportati i nomi precedentemente attribuiti agli stessi alleli ed il numero d'accessione delle sequenze delle RNasi nei database online. Tratto da Goldway *et al.*, 2008 [35]

## 1.5 I determinanti pollinici: S-Locus F-Box

Diversamente dal determinante femminile, che è conosciuto e caratterizzato ormai da più di un decennio, la natura del determinante maschile dell'autoincompatibilità mediata da RNasi è rimasta sconosciuta per lungo tempo. Inizialmente la ricerca è stata mirata ad identificare geni che fossero espressi in polline e mostrassero una diversità allelica collegata all'aplotipo S [36, 37, 38]; tuttavia questo tipo di approccio, condotto in *Nicotiana alata* e *Petunia inflata*, non si è mostrato efficace in quanto nelle Solanaceae il locus S è localizzato in posizione centromerica [39], cioè in una regione a bassissima frequenza di ricombinazione: pertanto anche geni esterni al

locus S e fisicamente molto distanti dalla S-RNasi mostrano un'altissima associazione ad essa, e di conseguenza una variabilità allelica correlabile all'aplotipo S [40].

I primi risultati significativi sono stati ottenuti grazie al sequenziamento di cloni genomici per un totale di 63 kb intorno alla RNasi S<sub>2</sub> di *Antirrhinum hispanicum* [41]. In questa regione sono state identificate 10 sequenze codificanti (ORFs, *Open Reading Frames*), di cui 4 corrispondenti a retrotrasposoni, elementi mobili estremamente diffusi nei genomi vegetali; delle restanti, si è verificato che una sola viene espressa specificamente nel tapetum dell'antera e nel polline. Questo gene, situato a circa 9 kb di distanza dalla RNasi S<sub>2</sub>, codifica per una proteina contenente un dominio F-box ed è stato pertanto nominato AhSLF (*A. hispanicum S-Locus F-box*).

Lo stesso approccio è stato successivamente applicato alle Rosaceae *Prunus dulcis* (mandorlo) e *P. mume* (albicocco giapponese). Nel primo caso il sequenziamento della regione di 70 kb fiancheggiante la RNasi S<sub>c</sub> ha consentito di identificare due geni F-box specificamente espressi in polline [42]; nel secondo è stata sequenziata la regione fiancheggiante la RNasi S<sub>7</sub>, per un totale di 62,5 kb, che ha evidenziato la presenza di ben 4 geni F-box [43]. In entrambi i casi uno solo dei geni F-box presenti è stato considerato come possibile determinante maschile dell'autoincompatibilità, in quanto caratterizzato da una divergenza allelica simile a quella delle S-RNasi; questo gene è stato nominato SFB (*S haplotype-specific F-Box*) in *P. dulcis* e SLF (*S-Locus F-box*) in *P. mume*. Geni omologhi sono stati sequenziati da varie altre specie del genere *Prunus*, confermando una diversità allelica paragonabile a quella delle RNasi degli stessi aplotipi S; inoltre è stata caratterizzata una struttura primaria conservata (vedi figura 1.3): il dominio F-box si trova nella porzione N-terminale della proteina, che è estremamente conservata fra i diversi alleli; esistono poi due regioni variabili (V1 e V2) e due ipervariabili (HVa e HVb). La porzione C-terminale della proteina è altamente variabile, contenendo le regioni V2, HVa e HVb; inoltre è ricca in aminoacidi idrofili, che ne indicano una probabile esposizione verso l'esterno nella struttura tridimensionale della proteina; ciò porta ad ipotizzare che questa regione sia coinvolta nell'interazione con il determinante femminile e sia responsabile della specificità del riconoscimento [44].

Il ruolo dei geni F-box come determinanti maschili dell'autoincompatibilità mediata da RNasi è stato dimostrato nel 2004 grazie ad esperimenti di trasformazione in *Petunia inflata* [45]. A tale scopo è stato sfruttato il fenomeno dell'interazione competitiva, osservato nelle Solanaceae in piante tetraploidi, che risulta nella perdita dell'autoincompatibilità a seguito di un'alterazione nella funzione pollinica. Queste piante infatti producono polline diploide, che pertanto contiene due aplotipi S; i gra-





**Figura 1.3:** struttura dei geni SLF/SFB nel genere *Prunus*. Il dominio F-box è posizionato all'estremità ammino-terminale della proteina; sono inoltre state identificate due regioni variabili (V1 e V2) e due ipervariabili (HVa e HVb), in posizione carbossi-terminale; la sequenza codificante non è interrotta da alcun introne.

nuli omoallelici, cioè portatori di due alleli identici, conservano la loro funzione nel riconoscimento incompatibile e possono quindi essere rigettati; al contrario i granuli eteroallelici, portatori di due alleli diversi, non vengono inibiti anche se lo stilo contiene una o entrambe le RNasi degli stessi aplotipi [46]; la presenza di due determinanti pollinici diversi in uno stesso granulo, quindi, ne impedisce il rigetto. Il gene F-box isolato dall'aplotipo  $S_2$  di *P. inflata*, PiSLF<sub>2</sub>, è stato inserito mediante transgenesi ed espresso in piante con genotipo  $S_1/S_1$ ,  $S_1/S_2$  e  $S_2/S_3$ : in tutti e tre i casi le piante trasformate sono risultate autocompatibili per perdita della funzione pollinica; l'analisi della progenie da autofecondazione delle piante  $S_1/S_2$  e  $S_2/S_3$  ha inoltre evidenziato che ad essere accettati come compatibili sono solamente i granuli pollinici portatori dell'allele  $S_1$  nel primo caso e  $S_3$  nel secondo. Si è osservato cioè che l'espressione di PiSLF<sub>2</sub> in granuli contenenti un altro allele S porta alla perdita della funzione pollinica, esattamente come avviene nel polline diploide eteroallelico; ciò dimostra che PiSLF<sub>2</sub> è il determinante pollinico dell'aplotipo  $S_2$  di *P. inflata*.

Nel genere *Prunus* la funzione dei geni SLF/SFB come determinanti maschili è supportata dalla caratterizzazione di alcuni aplotipi S di mutanti autocompatibili di tipo PPM (*Pollen-Part Mutant*); questi aplotipi presentano una funzione stilare intatta, producendo S-RNasi funzionali in grado di rigettare i tubetti pollinici incompatibili, mentre sono difettivi della funzione pollinica: i granuli portatori di questi aplotipi non possono cioè essere riconosciuti e rigettati.

- l'aplotipo  $S_{4'}$  di ciliegio dolce (*P. avium*), ottenuto dall'aplotipo  $S_4$  per mutagenesi indotta tramite raggi X, ha evidenziato nella sequenza del gene SFB una delezione di 4 bp che produce un frame-shift a monte della regione HVa, producendo quindi una proteina difettiva mancante della porzione C-terminale [47, 48];
- nell'aplotipo  $S_f$  di *P. mume* la sequenza codificante del gene SFB è interrotta da un'inserzione di 6,8 kb, che causa la produzione di trascritti anomali [47];

- l'aplotipo S<sub>3</sub> di *P. avium*, ottenuto anch'esso per mutagenesi indotta tramite raggi X dall'aplotipo S<sub>3</sub>, contiene una delezione che elimina completamente il gene SFB [48];
- l'aplotipo S<sub>1</sub> di ciliegio acido (*P. cerasus*), derivato da una mutazione naturale dell'aplotipo S<sub>1</sub>, contiene un trasposone di tipo *Ds* di 615 bp che interrompe la sequenza del gene SFB a livello della regione V1 [49].
- nell'aplotipo S<sub>13</sub> di *P. cerasus* la sequenza del gene SFB contiene una sostituzione puntiforme che genera un codone di stop della traduzione a monte della regione V2, generando quindi una proteina difettiva mancante della porzione C-terminale [50].

La verifica dell'associazione fra l'alterazione del gene SFB e la perdita della funzione pollinica nell'autoincompatibilità è estremamente significativa soprattutto per le specie arboree, nelle quali l'approccio della trasformazione, che potrebbe dare una prova definitiva del ruolo di SFB come determinante pollinico, è più complesso e richiede tempi molto più lunghi rispetto a *Petunia*.

### 1.5.1 Identificazione dei geni S-Locus F-Box nelle Pyrinae

Le prime sequenze di geni F-box associati al locus S nelle Pyrinae sono state ottenute nel 2006 in melo [51]. Tramite primer degenerati realizzati sulle regioni maggiormente conservate dei geni SLF/SFB di *Prunus* sono stati ottenuti cDNA di geni omologhi, retrotrascritti da RNA estratti da polline; l'amplificazione degli stessi frammenti da un pool di 7 cultivar dotate di aplotipi S diversi ha poi permesso di verificare l'associazione di due di questi geni, nominati SLF<sub>1</sub> (*S-locus-Linked F-box*) e SLF<sub>2</sub>, rispettivamente agli aplotipi S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>. Anche se l'associazione a specifici aplotipi S e l'espressione in polline fanno di questi geni due possibili candidati al ruolo di determinanti pollinici, l'assenza di dati sulla loro posizione fisica e il basso numero di cultivar sulle quali la ricerca è stata condotta non danno informazioni certe sulla loro reale associazione al locus S.

Il sequenziamento di cloni genomici ha permesso anche in questo caso di chiarire la situazione ed ottenere informazioni di grande importanza. È stata utilizzata una libreria genomica ottenuta dalla varietà di melo 'Florina', il cui genotipo S è S<sub>3</sub>/S<sub>9</sub>; sei cloni contenenti la RNasi S<sub>9</sub> sono stati interamente sequenziati da Sassa *et al.* [52]. Ciò ha permesso di ottenere la sequenza di una regione di 317 kb all'interno della quale sono stati individuati due geni F-box, nominati MdSFBB (*Malus × domestica S-locus F-Box Brothers*): uno (MdSFBB<sup>9-α</sup>) situato 42 kb a monte della S-RNasi, l'altro

## 1.5 I determinanti pollinici: S-Locus F-Box

---

(MdsFBB<sup>9-β</sup>) 93 kb a valle. Nelle vicinanze di questi sono stati trovati anche due pseudogeni ( $\psi$ MdsFBB<sup>9-α</sup> e  $\psi$ MdsFBB<sup>9-β</sup>) ad essi omologhi ma contenenti diverse inserzioni e delezioni.

Primer realizzati sulle sequenze di questi due geni MdsFBB hanno permesso di ottenere ulteriori sequenze:

- due geni omologhi sono stati identificati nella stessa libreria genomica da due cloni contenenti la RNasi S<sub>3</sub>, e sono stati pertanto nominati MdsFBB<sup>3-α</sup> e MdsFBB<sup>3-β</sup>;
- da RNA estratto da polline di pero giapponese cv. 'Kosui' (S<sub>4</sub>/S<sub>5</sub>) sono stati clonati i cDNA di 6 geni F-box, nominati PpSFBB (*Pyrus pyrifolia S-locus F-Box Brothers*); un'analisi di associazione con il gene della S-RNasi condotta su una progenie di 40 individui ha permesso di verificare l'associazione di tre di questi (PpSFBB<sup>4-α</sup>, PpSFBB<sup>4-β</sup> e PpSFBB<sup>4-γ</sup>) all'aplotipo S<sub>4</sub> e degli altri tre (PpSFBB<sup>5-α</sup>, PpSFBB<sup>5-β</sup> e PpSFBB<sup>5-γ</sup>) all'aplotipo S<sub>5</sub>.

Il grado di divergenza di questi geni è considerato compatibile con quello delle S-RNasi a cui sono associati; le sequenze di melo mostrano maggiore omologia fra geni dello stesso aplotipo che non fra i due aplotipi diversi, mentre quelli di pero giapponese sono chiaramente suddivisibili in tre gruppi ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) maggiormente conservati fra aplotipi distinti. È stato inoltre verificato che tutti gli SFBB sono espressi in maniera specifica in polline, sia in melo che in pero giapponese.

Le informazioni fornite da questo studio non si prestano ad un'interpretazione univoca; se infatti da un lato l'appartenenza (dimostrata solo in melo) o associazione al locus S, la divergenza allelica correlata all'aplotipo S e l'espressione specifica in polline sono caratteristiche compatibili con il ruolo di determinanti pollinici per i geni SFBB, dall'altro la loro molteplicità pone un quesito tuttora irrisolto. In particolare, analogamente a quanto osservato in aplotipi S nei generi *Prunus*, *Petunia* e *Antirrhinum*, il determinante pollinico potrebbe essere costituito da un solo gene F-box anche se altri ne sono presenti nel locus S o nelle immediate vicinanze; oppure, come ipotizzato dagli stessi autori del lavoro, tutti i prodotti dei geni SFBB potrebbero svolgere il ruolo di determinanti pollinici, eventualmente costituendo un complesso proteico multimerico.

## 1.6 Meccanismo d'azione

L'attività ribonucleasica del determinante stilare è essenziale per il rigetto dei tubetti incompatibili: è stato infatti verificato che S-RNasi mutagenizzate, contenenti alterazioni nel sito catalitico tali da impedirne la funzionalità, non sono in grado di innescare la reazione di autoincompatibilità [53]. Questo dato, unito alla degradazione di rRNA pollinici osservata in tubetti incompatibili [54], indica che le S-RNasi possono agire come specifiche citotossine all'interno dei tubetti pollinici, degradando gli RNA cellulari. Partendo da questa considerazione sono stati formulati diversi modelli per spiegare il meccanismo molecolare che innesca le reazioni di accettazione e rigetto del tubetto pollinico.

### 1.6.1 Modelli classici

Inizialmente, quando ancora non erano disponibili informazioni sulla natura del determinante pollinico, sono stati formulati due modelli principali: uno prevedeva che il determinante maschile fosse un recettore di membrana (*Receptor model*), l'altro un inibitore delle S-RNasi (*Inhibitor model*) [55, 56].

- *Receptor model*: l'inibizione specifica del polline "self" dipenderebbe semplicemente dalla traslocazione delle S-RNasi dalla matrice stilare all'interno del tubetto; secondo questo modello il determinante maschile dell'autoincompatibilità potrebbe agire come uno specifico recettore associato alla membrana, in grado di riconoscere la RNasi dello stesso aplotipo S ed importarla nel tubetto, dove questa svolgerebbe la propria azione citotossica. La reazione compatibile, al contrario, sarebbe prodotta dall'incapacità del tubetto di importare le RNasi stilari.
- *Inhibitor model*: il determinante pollinico agirebbe come inibitore delle S-RNasi, in grado di bloccare tutti gli alleli tranne quello "self". Il modello più semplice ipotizza che il determinante pollinico contenga un dominio inibitore ed un dominio di specificità per il riconoscimento della RNasi corrispondente; il dominio inibitore sarebbe conservato fra tutti gli aplotipi S ed aspecifico, in grado cioè di impedire l'attività di tutte le RNasi, mentre il dominio di specificità formerebbe un legame più stabile, e quindi termodinamicamente favorito, con la sola RNasi dello stesso aplotipo. All'interno del tubetto "self" il legame del dominio specifico su una RNasi ne proteggerebbe l'attività enzimatica impedendo il legame del dominio inibitore. Una versione modificata di questo modello ipotizza invece che l'inibizione delle RNasi avvenga ad opera di una

terza proteina, aspecifica, mentre il determinante maschile sarebbe dotato del solo dominio specifico di riconoscimento e protezione della S-RNasi “self”.

L’osservazione che entrambe le S-RNasi prodotte in uno stilo vengono importate sia dai tubetti compatibili che da quelli incompatibili ha portato ad abbandonare il *Receptor model* [57]. Tuttavia neanche l’*Inhibitor model* è in grado di spiegare completamente il meccanismo dell’autoincompatibilità: infatti secondo questo modello il polline eteroallelico prodotto da piante tetraploidi, esprimendo due diversi determinanti maschili in grado di proteggere le rispettive RNasi dall’inibizione, dovrebbe risultare incompatibile su qualsiasi pistillo avente uno o entrambi gli aplotipi S in comune; al contrario, come si è osservato nel fenomeno dell’interazione competitiva, l’espressione di due diversi determinanti pollinici risulta nella perdita dell’incompatibilità.

Per spiegare l’incapacità di rigetto del polline eteroallelico è stata proposta una versione ulteriormente modificata dell’*Inhibitor model*, secondo cui il determinante pollinico agirebbe in forma multimerica [58]. Nel normale polline aploide, quattro subunità identiche formerebbero un omotetramero in grado di svolgere la propria funzione di protezione della RNasi dall’inibitore aspecifico; nel polline eteroallelico invece due determinanti diversi risulterebbero espressi contemporaneamente ed a livelli simili, favorendo la formazione prevalente di eterotetrameri, che non sarebbero in grado di legarsi correttamente alla RNasi stilare. Questa non verrebbe quindi protetta dall’inibizione e non potrebbe di conseguenza svolgere la propria azione citotossica. In realtà esperimenti di over-espressione di un allele SLF/SFB in polline eteroallelico in *Petunia* sembrano indicare che, contrariamente a quanto ipotizzato da questo modello, la perdita della capacità di rigetto non dipenda dalla concentrazione relativa delle due proteine F-box all’interno del tubetto eteroallelico [59].

### 1.6.2 Modelli recenti

Dopo l’identificazione dei determinanti pollinici i modelli sono stati ridefiniti ed adattati alle nuove informazioni che mano a mano si rendono disponibili. Le proteine F-box, infatti, sono note per varie funzioni, fra le quali di particolare importanza è la partecipazione al complesso enzimatico E3 ubiquitina ligasi, coinvolto nella via di degradazione proteica ad opera del proteasoma 26S [60, 61, 62]. L’ubiquitina è un polipeptide di 76 aminoacidi che funge da marcatore per la degradazione proteica, in un sistema che prevede tre passaggi: l’ubiquitina viene prima di tutto attivata dal legame con l’enzima E1 (enzima di attivazione); successivamente viene trasferita all’enzima E2 (enzima di coniugazione); infine, tramite l’azione del complesso E3 (ubiquitina

ligasi) la molecola viene trasferita sulla proteina target; le proteine ubiquitinate in questo modo vengono riconosciute e degradate all'interno del proteasoma.

Il complesso E3, detto SCF per le tre subunità che lo compongono (Skp1, Cullina, F-box), è quindi responsabile del riconoscimento della proteina target da marcare per la degradazione, e del traferimento di più molecole di ubiquitina su di essa. Ciò porta ad ipotizzare che i determinanti pollinici SLF/SFB possano agire in maniera del tutto simile all'interno del tubetto compatibile [45, 63]. L'ubiquitinazione e la successiva degradazione delle RNasi "non-self" sarebbero quindi le condizioni che permetterebbero la crescita del tubetto all'interno dello stilo. Il modello proposto ipotizza, in particolare, che il determinante pollinico interagisca con la RNasi stilare in due possibili modi (vedi figura 1.4 A):

- tramite un dominio aspecifico, conservato fra tutti gli aplotipi S; il legame attraverso questo dominio consentirebbe al complesso SCF, del quale il determinante SLF/SFB farebbe parte, di ubiquitinare la RNasi;
- tramite un dominio allele-specifico, in grado di legare soltanto la RNasi dello stesso aplotipo S; in questo caso il legame fra SLF/SFB e RNasi proteggerebbe quest'ultima dall'ubiquitinazione.

L'ipotesi del coinvolgimento del sistema proteolitico ubiquitina/proteasoma 26S nella degradazione delle S-RNasi è stata recentemente avvalorata da due ulteriori osservazioni: in *Antirrhinum* è stata identificata una proteina omologa alla Skp1, detta AhSSK1 (*A. hispanicum* SLF-interacting Skp1-like 1), che interagisce direttamente con il dominio F-box del determinante pollinico SLF<sub>2</sub> [64]; in *Petunia* è stato dimostrato che estratti pollinici sono in grado di ubiquitinare e degradare RNasi *in vitro*, anche se non in maniera allele-specifica [65, 66]. Tuttavia questo modello, detto *Protein-Degradation model*, ricalca in sostanza il precedente *Inhibitor model*, con l'unica differenza di proporre l'ubiquitinazione e successiva degradazione della S-RNasi anziché la semplice inibizione; come il modello precedente, quindi, anche questo non è in grado di spiegare l'interazione competitiva: infatti teoricamente il polline diploide eteroallelico, producendo due F-box diversi, sarebbe in grado di proteggere dall'ubiquitinazione contemporaneamente entrambe le RNasi "self", portando al rigetto del tubetto pollinico.

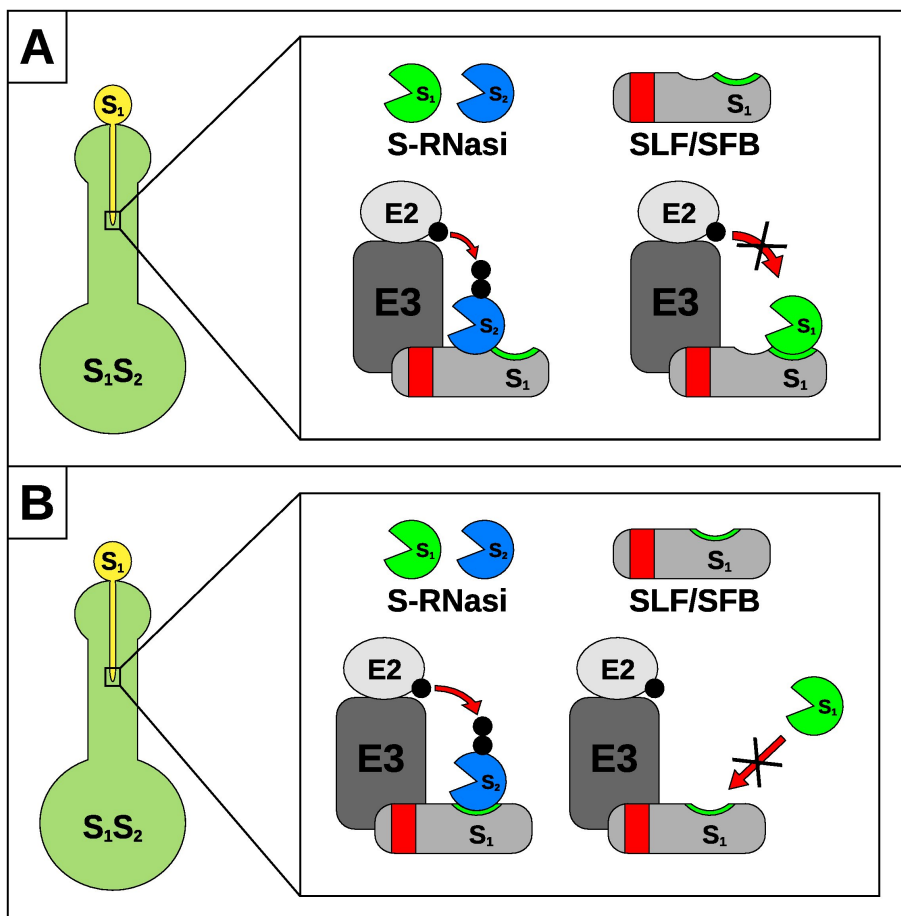
Risultati ottenuti dallo studio *in vitro* del legame fra S-RNasi e SLF di *Petunia* hanno consentito di ottenere nuove informazioni ed elaborare una versione modificata di questo modello. Si è osservato, prima di tutto, che l'interazione di una proteina SLF con la RNasi *self* è più debole che con le RNasi *non-self* [65]; esperimenti con-

dotti con proteine SLF chimeriche hanno inoltre permesso di identificare tre domini funzionali (FD1, FD2 e FD3), dei quali uno (FD2) tende a formare un legame estremamente forte con le S-RNasi in modo aspecifico, mentre gli altri due (FD1 e FD3) destabilizzano in maniera specifica l'interazione con la sola RNasi "self" [59]. Secondo il *Modified Protein-Degradation model* (vedi figura 1.4 B) a determinare l'accettazione o il rigetto del tubetto pollinico sarebbe quindi la forza del legame fra RNasi e SLF [67]:

- nel tubetto compatibile, l'interazione fra il dominio FD2 del determinante pollinico e le due RNasi *non-self* risulterebbe forte abbastanza da consentirne l'ubiquitinazione e, quindi, la degradazione;
- nel tubetto incompatibile, la proteina SLF potrebbe formare un legame sufficientemente stabile solo con la RNasi *non-self*; al contrario, il legame con la RNasi *self* sarebbe destabilizzato in maniera specifica a causa dei domini FD1 e FD3; questa non potrebbe quindi essere ubiquitinata e resterebbe attiva, svolgendo la propria azione citotossica che porterebbe al rigetto del tubo pollinico.

Questo modello è compatibile con il fenomeno dell'interazione competitiva: infatti, se una proteina SLF è in grado di mediare l'ubiquitinazione di tutte le RNasi tranne quella dello stesso aplotipo S, questa verrebbe comunque ubiquitinata in caso di presenza nello stesso tubetto pollinico di un secondo SLF con specificità diversa; entrambe le RNasi stilari verrebbero quindi degradate e il polline eteroallelico non potrebbe in alcun caso essere rigettato.

Il *Modified Protein-Degradation model*, nonostante si adatti molto bene ai dati sperimentali ottenuti in *Petunia*, non può tuttavia essere considerato conclusivo. Altri fattori, infatti, potrebbero essere coinvolti nella modulazione della risposta di autoincompatibilità; fra questi potrebbe essere di particolare importanza la compartimentazione delle RNasi: è stato osservato che le RNasi, una volta importate dal tubetto, vengono inizialmente sequestrate all'interno di un vacuolo, per poi essere rilasciate nel citoplasma solo in caso di reazione incompatibile [68]. Inoltre, il *Modified Protein-Degradation model* non è in grado di spiegare la presenza di mutanti di parte pollinica (PPM): infatti secondo questo modello la delezione o mancata espressione del determinante SLF/SFB nel tubetto pollinico risulterebbe nell'incapacità di ubiquitinare le RNasi, e quindi inevitabilmente nella reazione di rigetto dello stesso. Questo può essere considerato plausibile nelle Solanaceae o in *Antirrhinum*, per le quali non sono noti casi di perdita della funzione pollinica; la mancanza



**Figura 1.4:** rappresentazione del meccanismo di ubiquitinazione della RNasi “self” secondo i due modelli di degradazione proteica. Il determinante maschile SLF/SFB, tramite il dominio F-box (rappresentato in rosso) partecipa alla formazione del complesso E3, che trasferisce la molecola di ubiquitina (in nero) dall’enzima E2 alla S-RNasi “non-self”. A) *Protein-Degradation model*: il determinante maschile SLF/SFB contiene due siti di legame con la RNasi, uno aspecifico ed uno allele-specifico; il legame della RNasi “non-self” avviene sul dominio aspecifico e porta all’ubiquitinazione della stessa (parte sinistra della figura); la RNasi “self”, al contrario, è termodinamicamente favorita a legarsi sul dominio allele-specifico, che la protegge dall’ubiquitinazione (parte destra). B) *Modified Protein-Degradation model*: il sito di interazione fra RNasi e SLF/SFB è unico, ma varia la stabilità del legame, che è più forte con le RNasi “non-self”; l’interazione con la RNasi “self” è destabilizzata da specifici domini sulla proteina SLF/SFB e risulta troppo debole per consentire l’ubiquitinazione della stessa.

di mutanti PPM potrebbe anzi essere spiegata proprio dal fatto che questo tipo di mutazione, risultando nell’impossibilità per il tubetto di giungere alla fecondazione, non potrebbe essere trasmesso alla progenie e verrebbe immediatamente eliminato.



Tuttavia non può essere questo il caso del genere *Prunus*, nel quale è stata osservata associazione fra alterazione del gene SFB e perdita della funzione pollinica (come descritto nel par. 1.5). Occorre inoltre considerare che, almeno in alcune specie di *Prunus*, non è presente il fenomeno dell'interazione competitiva: *P. cerasus* è infatti una specie tetraploide, derivata dall'ibridazione fra *P. avium* e *P. fruticosa* [69]; in questa specie il polline eteroallelico contenente due aplotipi S funzionali viene rigettato da piante contenenti uno o entrambi gli stessi aplotipi S [49]. Sembra invece che l'interazione competitiva sia presente in altre specie tetraploidi di *Prunus*, fra cui *P. pseudocerasus* [70].

È quindi possibile che il meccanismo molecolare attraverso cui S-RNasi e SLF/SFB interagiscono sia diverso in *Prunus* rispetto alle Solanaceae ed *Antirrhinum*. In questo quadro non sarebbe assolutamente chiara la collocazione delle Pyrinae: questo gruppo è infatti filogeneticamente molto più vicino al genere *Prunus*, facendo parte della stessa famiglia, le Rosaceae; d'altro canto però le Pyrinae esibiscono per quanto riguarda l'autoincompatibilità un comportamento più simile a quello delle Solanaceae, essendo presente il fenomeno dell'interazione competitiva e non essendo noti mutanti di tipo PPM. Un'ipotesi è che il meccanismo presente nelle Solanaceae ed in *Antirrhinum* corrisponda al meccanismo ancestrale dell'autoincompatibilità mediata da RNasi; questo potrebbe aver subito una modificazione durante la storia evolutiva delle Amygdaleae, risultando nel meccanismo attualmente presente in *Prunus*, mentre potrebbe essere stato mantenuto da una parte delle Rosaceae, fra cui appunto le Pyrinae.

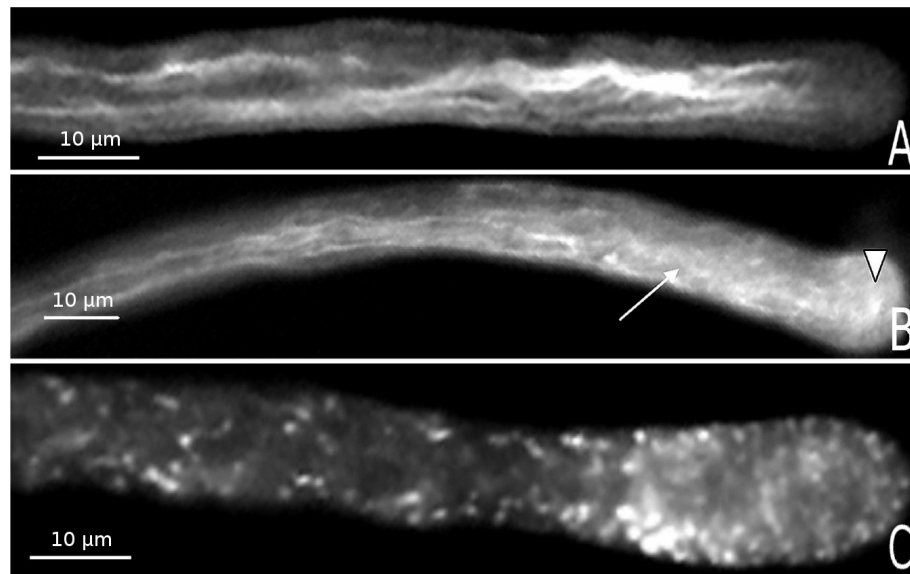
## 1.7 Fattori esterni al locus S

Nelle fasi iniziali di germinazione e penetrazione nel tessuto trasmittente dello stilo, i tubetti compatibili ed incompatibili si comportano allo stesso modo. Successivamente, circa all'altezza del terzo superiore dello stilo, il riconoscimento del polline "self" innesca la reazione di rigetto: la crescita diviene irregolare, la parete si assottiglia, l'apice si ferma e si rigonfia, formando un grosso deposito di callosio [71].

Anche se S-RNasi e SLF/SFB sono gli unici responsabili della specificità del riconoscimento fra polline e pistillo, l'attuazione di questa reazione coinvolge molti altri fattori, codificati esternamente al locus S ed in grado di agire in maniera indipendente dall'aplotipo S [72, 73, 74, 75]. Questi fattori sono stati catalogati in tre gruppi a seconda delle loro caratteristiche d'azione [76]:

- Gruppo 1: fattori che modulano l'espressione dei determinanti; agiscono cioè "a monte" di S-RNasi e SLF/SFB, modulandone o la trascrizione o modifiche post-trascrizionali essenziali perchè questi possano svolgere la loro attività. Mutazioni in uno di questi fattori possono quindi risultare nell'assenza o nella non funzionalità dei determinanti e quindi nell'interruzione dell'autoincompatibilità, nonostante la presenza al locus S di aplotipi S integri e funzionali. Una mutazione di questo tipo è stata descritta in *Petunia* [75].
- Gruppo 2: fattori che interagiscono direttamente con i determinanti; questi agiscono congiuntamente ad S-RNasi e SLF/SFB, modulandone la funzione. Nelle Solanaceae sono stati caratterizzati diversi di questi fattori, fra cui *HT-B*, *120K* e *4936-factor* [77, 76, 78, 79], che si pensa possano agire sull'importazione e la compartimentazione delle RNasi stilarì nel tubetto pollinico; il silenziamento di uno di questi geni risulta nell'interruzione dell'autoincompatibilità nonostante i determinanti siano funzionali ed espressi a livelli normali sia nel polline che nello stilo.
- Gruppo 3: fattori che non interagiscono direttamente con i determinanti, ma sono coinvolti nella reazione da essi innescata; a questo gruppo appartengono fattori che, oltre ad avere un ruolo nell'autoincompatibilità, possono agire su altri meccanismi più generali nell'interazione polline-pistillo o anche in altri processi cellulari. Questi fattori sono responsabili dell'attuazione del processo che porta al blocco della crescita del tubetto pollinico, agendo quindi "a valle" dell'azione di S-RNasi e SLF/SFB.

La conoscenza di fattori esterni al locus S nelle Pyrinae è piuttosto limitata;



**Figura 1.5:** alterazioni a carico del citoscheletro del tubetto pollinico indotte dalla risposta di autoincompatibilità in *Pyrus pyrifolia*; la colorazione con fluorescina isotiocianato (FITC) e falloidina permette di evidenziare la distribuzione dell'actina. A) tubetto pollinico in condizioni normali: i filamenti di actina sono visibili principalmente in direzione parallela all'asse del tubetto ed arrivano fino a circa  $10\ \mu\text{m}$  dall'apice. B) dopo 20 minuti dall'aggiunta di S-RNasi "self" i filamenti si presentano parzialmente disgregati, sono visibili frammenti (indicati dalla freccia), l'apice si presenta rigonfio e denso di residui di actina. C) dopo 40 minuti i microfilamenti sono completamente disgregati e l'actina è accumulata in foci. Tratto da Liu *et al.*, 2007 [80].

la caratterizzazione del meccanismo cellulare che porta all'arresto della crescita del tubetto "self" è, insieme alla comprensione dell'interazione molecolare fra S-RNasi e SLF/SFB, uno degli obiettivi principali della ricerca nel campo della biologia florale.

La degradazione degli RNA pollinici è probabilmente il primo passaggio conseguente al riconoscimento specifico fra i determinanti. I passaggi successivi sono meno chiari, ma coinvolgono sicuramente una forte alterazione a carico del citoscheletro: è stato infatti osservato *in vitro* che le S-RNasi "self" inducono la degenerazione dei filamenti di actina, con formazione di foci [80]; il fenomeno osservato, visibile in figura 1.5, è del tutto analogo a quello prodotto dalla Citocalasina B, una tossina che agisce sui microfilamenti impedendo la polimerizzazione dell'actina.

I microfilamenti di actina, in condizioni normali, hanno all'interno della cellula un comportamento estremamente dinamico generato dalla continua addizione di monomeri ad un'estremità e dal loro distacco all'estremità opposta. Il citoscheletro ha un'importanza cruciale nella crescita del tubetto pollinico: fornisce infatti la strut-

tura per il trasporto degli organelli, ad opera del motore molecolare della miosina, verso l'apice [81, 82]; l'inibizione della polimerizzazione dell'actina è sufficiente a causare l'arresto della crescita [83]. È stato inoltre osservato che l'inibizione sia della polimerizzazione che della depolimerizzazione dell'actina può indurre morte cellulare programmata (PCD) in cellule di lievito o animali [84, 85]. La stessa cosa sembra avvenga in *Papaver rhoeas* nella reazione di rigetto del polline incompatibile [86]: in questo caso l'alterazione del citoscheletro è innescata da una rapida variazione della concentrazione intracellulare di ioni calcio (come descritto nel par. 1.3). È stato recentemente ipotizzato che l'autoincompatibilità mediata da RNasi possa coinvolgere un meccanismo del tutto simile, in cui l'iniziale degradazione degli RNA cellulari innescerebbe la degradazione dei microfilamenti di actina e, successivamente, la morte cellulare programmata. Marcatori tipici dell'apoptosi delle cellule animali, come il rilascio del citocromo C nel citoplasma, la degenerazione dei mitocondri e la frammentazione del DNA genomico, sono infatti stati osservati *in vitro* in tubetti pollinici trattati con S-RNasi "self" [87].

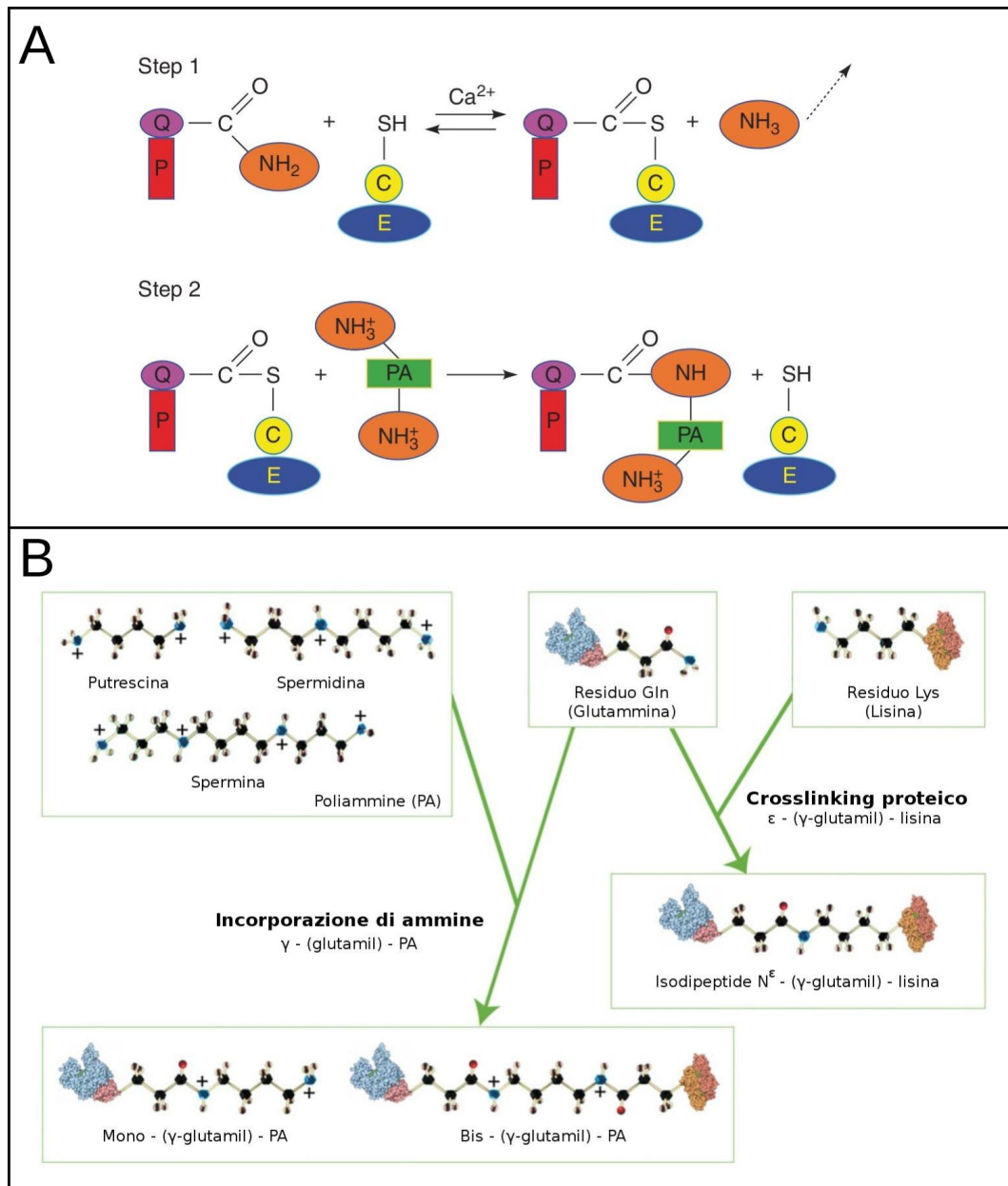
### 1.7.1 La transglutaminasi

Un ruolo di particolare importanza nella reazione di autoincompatibilità potrebbe essere svolto dalla transglutaminasi (TGasi), un enzima calcio-dipendente che catalizza la reazione di transamidazione fra un gruppo amminico ed un gruppo  $\gamma$ -carbossiamidico di un residuo di lisina (vedi figura 1.6); il gruppo amminico può essere fornito da poliammine, fra cui le più diffuse nelle piante sono putrescina, spermidina e spermina, oppure da un residuo di glutammina [88]. La TGasi è quindi in grado di creare legami crociati (cross-linking) fra proteine in due modi:

- legando direttamente un residuo di glutammina al gruppo amminico di un residuo di lisina;
- legando i due gruppi amminici di una stessa poliammina a due residui di glutammina di proteine diverse.

Il legame simultaneo di più proteine attraverso ponti di poliammine può portare alla formazione di complessi proteici ad alto peso molecolare.

Questo enzima è estremamente diffuso, essendo stato identificato in vari microrganismi, invertebrati, vertebrati e piante; si trova sia all'interno della cellula che nella matrice extracellulare, dove per la sua capacità di modificazione post-traduzionale e cross-linking delle proteine può svolgere un ruolo in una grande varietà di funzioni



**Figura 1.6:** attività enzimatica della TGasi. A) Reazione di transamidazione fra una proteina (P) ed una poliammina (PA); la reazione avviene in due stadi: nel primo il residuo glutammico (Q) viene legato al gruppo tiolico del residuo di cisteina (C) nel sito attivo dell'enzima (E); nel secondo si ha il trasferimento acilico sul gruppo amminico della poliammina. B) Substrati e prodotti della TGasi. Il residuo glutammico può reagire con il gruppo amminico di una lisina creando un cross-linking fra le due proteine (parte sinistra), oppure con una poliammina (incorporazione di ammine, parte destra); anche questa reazione può risultare in un cross-linking proteico se un residuo glutammico di una seconda proteina viene legato alla stessa poliammina. Tratto da Serafini-Fracassini and Del Duca, 2008 [89].

biologiche, fra cui il differenziamento cellulare, la trasduzione del segnale, l'adesione e la regolazione del meccanismo dell'apoptosi nelle cellule animali [90, 91].

Il possibile coinvolgimento della TGasi nel meccanismo dell'autoincompatibilità gametofitica è supportato da diversi indizi:

- con il blocco della crescita del tubetto pollinico incompatibile si ha la formazione di foci di F-actina (vedi figura 1.5 C) e aggregati ad alto peso molecolare di tubulina; la formazione di questi complessi avviene probabilmente attraverso una serie di cross-linking fra le proteine costituenti il citoscheletro: questo meccanismo non è ancora stato caratterizzato, ma potrebbe essere mediato appunto dalla TGasi.
- all'interno del tubetto pollinico di melo è rilevabile attività TGasica sia intrache extracellulare; fra i substrati della TGasi nel tubetto in crescita ci sono sia l'actina che la  $\alpha$ -tubulina, sulle quali avviene incorporazione di poliammine [92].
- nel tubetto pollinico incompatibile di *Papaver rhoeas* la disorganizzazione del citoscheletro porta alla morte cellulare programmata (PCD); la TGasi è coinvolta, in cellule animali, nel meccanismo dell'apoptosi [93, 94], che per molti versi è analogo alla PCD nelle cellule vegetali [95]; l'azione della stessa sulla tubulina, in particolare, è stata associata all'induzione di apoptosi in cellule tumorali di neuroblastoma [96].
- in stili di pero europeo impollinati con polline incompatibile l'attività TGasica è più alta rispetto a stili impollinati con polline compatibile, suggerendo che la reazione di rigetto comporti un'aumento dell'espressione della TGasi [97].

È quindi possibile che l'anomala riorganizzazione del citoscheletro che avviene durante il rigetto del tubetto pollinico incompatibile sia mediata dall'azione della TGasi, che potrebbe quindi agire come fattore esterno al locus S del terzo gruppo; la sua azione potrebbe inoltre essere determinante nell'induzione della morte cellulare programmata, meccanismo che è alla base della reazione di incompatibilità nelle *Papaveraceae* e che potrebbe essere coinvolto anche nei sistemi di incompatibilità mediata da RNasi.

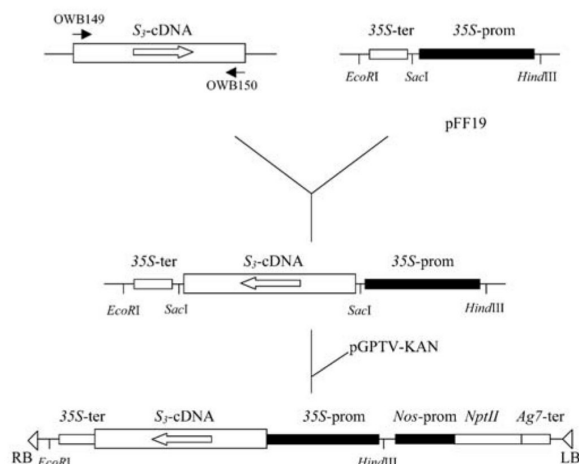
## 1.8 Superamento dell'autoincompatibilità

Nelle specie arboree ad impollinazione entomofila, il successo della fecondazione reciproca fra cultivar compatibili in campo dipende dall'efficienza degli insetti pronubi come vettori del polline, che a sua volta è fortemente influenzata dalle condizioni ambientali, quali temperatura e precipitazioni atmosferiche. Per questo motivo, condizioni sfavorevoli nel periodo della fioritura possono causare una scarsa efficienza dell'impollinazione incrociata e di conseguenza ridurre la produzione di frutti in alcune annate [98]. L'ottenimento di varietà autocompatibili può garantire una maggiore uniformità nella fecondazione e, quindi, nella produzione.

Varietà autocompatibili sono state ottenute in molte specie del genere *Prunus* attraverso mutagenesi indotta o selezione di mutanti naturali: sono noti genotipi S in cui l'autoincompatibilità è legata alla perdita della funzionalità del determinante maschile (vedi par. 1.5), di quello femminile [50, 99, 100, 101] o a fattori esterni al locus S [102].

Nelle *Pyrinae* la frequenza di mutanti autocompatibili è molto più bassa. Il caso più noto e meglio caratterizzato è quello della cultivar 'Osa Nijisseiki' di pero giapponese, mutante gemmario della varietà 'Nijisseiki' [103]. L'autoincompatibilità in questo caso è dovuta alla perdita della funzione del determinante femminile ed è legata all'aplotipo  $S_4^{sm}$  (mutante stilare dell'aplotipo  $S_4$ ). Questo è caratterizzato da una vasta delezione che ha eliminato completamente il gene della RNasi  $S_4$  [104]; recentemente, grazie all'impiego di librerie genomiche delle due varietà, è stata caratterizzata ed interamente sequenziata la regione dell'aplotipo  $S_4$  deleta nel mutante [105]. Questa regione ha dimensione di 236 kb, estendendosi da 48 kb a monte fino a 188 kb a valle della RNasi  $S_4$ ; al suo interno è stato individuato anche un gene F-box, denominato  $S_4$ F-box0. Nonostante questo gene presenti una buona omologia con gli SFBB identificati in melo e sia specificamente espresso in polline, la funzione maschile dell'autoincompatibilità è intatta nel polline  $S_4^{sm}$ : è quindi da escludere che  $S_4$ F-box0, pur essendo all'interno del locus S il gene F-box più vicino alla S-RNasi, possa essere il determinante pollinico dell'aplotipo  $S_4$ .

In melo è stata riportata autoincompatibilità per la varietà giapponese 'Megumi' [106], ma non ne è stata approfondita la base genetica. In pero europeo è stato recentemente identificato un aplotipo mutato che conferisce autoincompatibilità nelle varietà 'Abugo' e 'Ceremeño' [107]. Anche in questo caso si tratta di una mutazione di parte stilare: l'autoincompatibilità è conferita dall'aplotipo  $S_{121}^{\circ}$ , mutante dell'aplotipo  $S_{121}$ ; il pistillo portatore di  $S_{121}^{\circ}$  perde la capacità di riconoscere sia il polline "self" che quello portatore di  $S_{121}$ , mentre il polline  $S_{121}^{\circ}$  viene normalmente rigetta-



**Figura 1.7:** costruzione del vettore binario utilizzato per la trasformazione della cultivar ‘Elstar’ di melo. Il cDNA della RNasi  $S_3$  è stato clonato all’interno del plasmide pFF19, fra il promotore 35S-prom ed il terminatore 35S-ter; questi elementi regolatori di origine virale (CaMV, *Cauliflower Mosaic Virus*) inducono la trascrizione forte e costitutiva all’interno dei tessuti della pianta. Il costrutto è stato poi trasferito al vettore binario pGPTV-KAN per la trasformazione mediata da *Agrobacterium*, contenente un marcatore per la selezione dei trasformanti (il gene *NptII* per la neomicina fosfotrasferasi, che conferisce resistenza a kanamicina) e le regioni RB e LB (Right e Left-Border) del T-DNA. Tratto da Broothaerts *et al*, 2004 [109].

to su pistilli  $S_{121}$ . Il confronto fra le sequenze geniche delle S-RNasi dei due aplotipi ha evidenziato nel gene della RNasi  $S_{121}$ ° l’inserzione di un elemento trasponibile di tipo TRIM [108] di 556 bp all’interno dell’introne, oltre a due delezioni di 2 e 30 bp nella regione 3’UTR (regione non tradotta all’estremità 3’ della sequenza genica) e 6 sostituzioni puntiformi. Tre di queste cadono all’interno della sequenza codificante, ma non generano cambiamenti di amminoacido: la sequenza proteica codificata dai due aplotipi è quindi identica; la perdita della funzione stilare è in questo caso associata alla mancata espressione del gene della RNasi  $S_{121}$ ° nel pistillo.

Un approccio alternativo alla ricerca di mutanti spontanei ed alla mutagenesi indotta è il ricorso all’ingegneria genetica. La trasformazione con determinanti stilari e pollinici in piante modello è stata utilizzata, come descritto nei par. 1.4 e 1.5, per dimostrare il ruolo degli stessi nell’autoincompatibilità, ottenendo mutanti con acquisizione di nuove specificità o perdita delle stesse. La stessa tecnologia può essere applicata su specie coltivate per ottenere genotipi autofertili; nelle piante arboree questo approccio è stato utilizzato su melo [109]. La cultivar ‘Elstar’, di genotipo



$S_3/S_5$ , è stata trasformata con un costrutto contenente il cDNA della RNasi  $S_3$  sotto controllo del promotore costitutivo 35S di CaMV (vedi figura 1.7). L'integrazione di più copie all'interno del genoma ha prodotto linee trasformate autocompatibili, ovviamente per perdita della funzione stilare; le piante trasformate producono polline funzionale, normalmente rigettato all'interno del pistillo della cultivar 'Elstar', mentre non sono in grado di riconoscere e bloccare tubetti pollinici "self" portatori degli aplotipi  $S_3$  e  $S_5$ : è stato infatti verificato che la trascrizione costitutiva ad alti livelli del gene della RNasi  $S_3$  risulta in un'inibizione post-trascrizionale dell'espressione sia della RNasi  $S_3$  che di quella  $S_5$  per il fenomeno del silenziamento genico mediato da RNA [110, 111].

### 1.9 Aspetti evolutivi legati al locus S

Si stima che il fenomeno dell'autoincompatibilità si sia evoluto indipendentemente in almeno 21 momenti diversi nella storia delle angiosperme [112]; l'estremo successo di questo tipo di meccanismo indica che, almeno per la maggior parte delle specie, l'allogamia conferisce un importante vantaggio in termini evolutivi rispetto all'autogamia. Questo vantaggio può essere legato in particolare al fenomeno della "depressione da inbreeding", che si manifesta come perdita di vigore all'aumentare del grado di omozigosi. In questo senso la comparsa di mutazioni che eliminano l'autoincompatibilità, pur offrendo un immediato vantaggio in termini di successo riproduttivo grazie all'ampliamento delle possibilità di incrocio compatibile, comporta uno svantaggio dovuto alla generazione di prole da autofecondazione caratterizzata da livelli di omozigosi che aumentano ad ogni generazione: quindi, anche se la diffusione di alleli mutati autocompatibili è favorita all'interno di una popolazione, ciò non si traduce in un beneficio per la popolazione stessa, per la quale al contrario è vantaggioso il mantenimento dell'autoincompatibilità.

Nelle specie autoincompatibili in natura, inoltre, è favorito il mantenimento di un alto numero di alleli S diversi. Infatti le caratteristiche peculiari del locus S fanno sì che questo sia sottoposto ad una selezione frequenza-dipendente [113]:

- un allele raro ha maggiore possibilità di essere trasmesso, in quanto il polline portatore dello stesso allele potrà essere accettato dalla grande maggioranza delle piante; la sua frequenza all'interno della popolazione tenderà quindi ad aumentare.
- un allele molto frequente, al contrario, può essere trasmesso in misura minore,

essendo rigettato da molti individui della popolazione; la sua frequenza tenderà quindi a diminuire.

Per questo motivo l'eliminazione di un aplotipo S funzionale risulta estremamente difficile; si stima che la selezione frequenza-dipendente al locus S possa mantenere un aplotipo per tempi talmente lunghi da superare la durata dell'esistenza della stessa specie in cui l'aplotipo si genera [114, 115]. Di conseguenza alleli presenti in un progenitore ancestrale possono in molti casi essere mantenuti nelle specie diverse da esso discendenti: questo fenomeno, detto evoluzione trans-specifica [116], fa sì che in molti casi alleli di specie diverse mostrino un'omologia molto più alta di quella riscontrabile all'interno della stessa specie [117]. Per lo stesso meccanismo per cui l'eliminazione di un aplotipo vecchio è estremamente difficile, l'insorgenza di un aplotipo nuovo è fortemente favorita: nel momento in cui si genera un allele con nuove specificità, infatti, la sua diffusione all'interno della popolazione è favorita proprio in virtù della sua iniziale rarità, e la sua frequenza può raggiungere quella degli altri alleli in un numero relativamente limitato di generazioni. L'effetto di questa pressione selettiva per la formazione di nuovi alleli è riscontrabile nella variabilità di sequenza fra i geni delle S-RNasi. L'analisi dei polimorfismi riscontrabili nelle sequenze nucleotidiche infatti evidenzia un rapporto tra sostituzioni non-sinonime  $Ka$  (che generano un cambio di aminoacido) e mutazioni silenti  $Ks$  (che non producono variazioni nella sequenza proteica) molto più alto che per gli altri geni. Valori elevati di  $Ka/Ks$  indicano che, contrariamente a quanto avviene per la maggioranza dei geni, per le S-RNasi le mutazioni non silenti sono favorite [118, 119, 120, 121, 122].

Il meccanismo attraverso cui si generano nuovi aplotipi S non è chiaro; infatti l'acquisizione di una nuova specificità richiede che entrambi i determinanti cambino in maniera coordinata, in quanto la mutazione di uno solo di essi risulterebbe in un aplotipo non funzionale. L'evoluzione del locus S si traduce cioè in una coevoluzione dei due determinanti, in cui alla mutazione di uno deve sempre corrispondere una mutazione dell'altro affinché l'autoincompatibilità gametofitica venga mantenuta.

Le ipotesi formulate su come ciò possa avvenire partono dalla considerazione del rapporto di reciprocità fra aplotipi S. In condizioni normali, infatti, il rapporto è sempre reciproco: un'aplotipo accetta come compatibili quegli aplotipi dai quali è a sua volta accettato (vedi figura 1.8 A). Tuttavia in seguito ad una mutazione la reciprocità può essere interrotta; in questo caso la selezione tende sempre ad avvantaggiare l'aplotipo il cui polline è più compatibile, ed il cui pistillo viceversa è più selettivo. Se per esempio il polline di  $A$  è accettato da  $B$ , ma quello di  $B$  non è accettato da  $A$ , l'aplotipo  $A$  grazie alle maggiori possibilità di successo nella feconda-

zione potrà diffondersi nella popolazione a discapito di  $B$ , che tenderà ad estinguersi gradualmente con il succedersi delle generazioni [123].

Un'ipotesi prevede la formazione di nuovi aplotipi attraverso intermedi non funzionali, con una temporanea perdita dell'autoincompatibilità [124, 125]. Come schematizzato nella figura 1.8 B, questa perdita sarebbe dovuta ad una mutazione iniziale del determinante maschile, che non verrebbe più rigettato dal determinante femminile dello stesso aplotipo. Per esempio una mutazione del determinante maschile di un aplotipo  $A$  potrebbe produrre un nuovo aplotipo  $A'$  autocompatibile, che risulterebbe quindi nettamente avvantaggiato rispetto ad  $A$ . La frequenza dell'allele mutato  $A'$  aumenterebbe rapidamente all'interno della popolazione<sup>2</sup>, causando peraltro anche un aumento della depressione da inbreeding. Tuttavia una seconda mutazione in  $A'$  a carico del determinante femminile potrebbe consentire a quest'ultimo di acquisire specificità per l'allele mutato del determinante pollinico, perdendo di conseguenza la capacità di riconoscimento per l'allele originale. Il nuovo aplotipo  $A''$ , pur essendo autoincompatibile, sarebbe nettamente avvantaggiato rispetto ad  $A'$ : infatti fra i due non ci sarebbe reciprocità, essendo il determinante stilare di  $A''$  in grado di rigettare il polline  $A'$  e non viceversa;  $A''$  inoltre produrrebbe una progenie di maggior vigore, evitando la depressione da inbreeding. La frequenza di  $A''$  andrebbe quindi crescendo nella popolazione a discapito di quella di  $A'$ , fino all'eliminazione di quest'ultimo. A questo punto l'autoincompatibilità sarebbe ripristinata nell'intera popolazione e  $A''$  costituirebbe un nuovo aplotipo S, funzionalmente distinto dall'aplotipo  $A$  da cui si è originato.

È anche possibile che una nuova specificità al locus S si evolva senza intermedi autocompatibili [126]. È stato infatti osservato che possono esistere varianti diverse di uno stesso aplotipo, originate da mutazioni casuali e non soggette a pressione selettiva, caratterizzate da determinanti maschili o femminili leggermente diversi che però presentano la stessa specificità di riconoscimento; nel caso coesistano due varianti  $A_1$  e  $A_2$  di uno stesso aplotipo, il rapporto fra le due è reciproco: l'aplotipo  $A_1$  riconosce e rigetta  $A_2$  e l'aplotipo  $A_2$  a sua volta riconosce e rigetta  $A_1$ ; non c'è alcuna distinzione a livello funzionale fra le due varianti ed entrambe possono essere mantenute. Tuttavia una mutazione del determinante maschile potrebbe produrre un nuovo aplotipo  $A'_1$  il cui polline, pur continuando ad essere autoincompatibi-

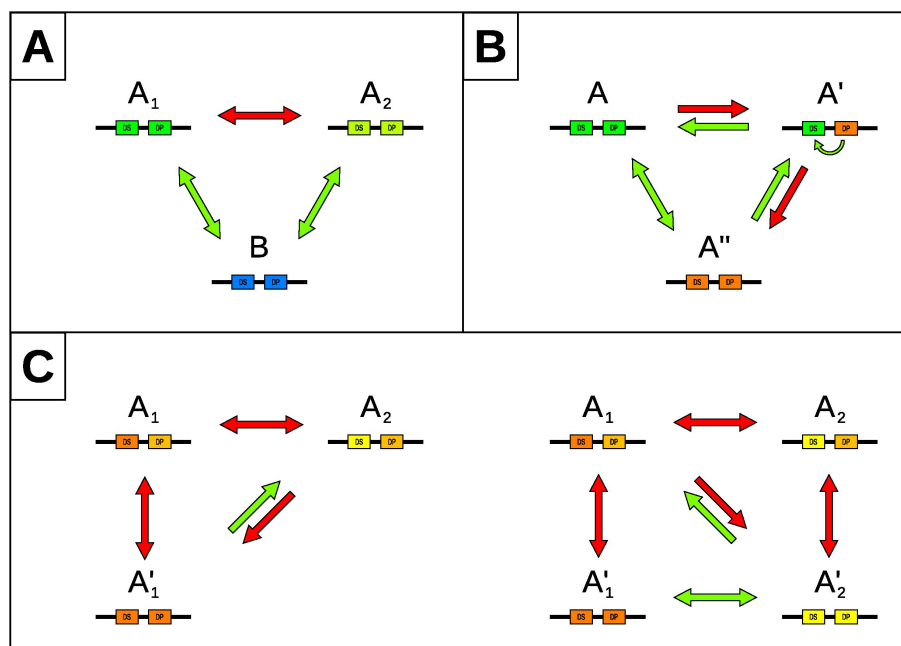
---

<sup>2</sup>Si noti che una mutazione per la funzione femminile, al contrario, sarebbe sfavorita rispetto all'originale autoincompatibile. Il polline portatore dell'allele mutato continuerebbe infatti ad essere rigettato dal pistillo portatore dell'allele wild-type, mentre il polline portatore dell'allele wild-type sarebbe accettato dal pistillo portatore dell'allele mutato. In questo caso la mancanza di reciprocità fra i due aplotipi tenderebbe ad eliminare la mutazione.

## INTRODUZIONE

---

le su pistilli portatori di  $A_1$ , potrebbe essere accettato da  $A_2$  (vedi figura 1.8 C). Questo nuovo aplotipo sarebbe avvantaggiato rispetto ai precedenti per la maggiore possibilità di accettazione del proprio polline. In maniera del tutto analoga una mutazione dello stesso genere in  $A_2$  potrebbe produrre un nuovo aplotipo  $A'_2$  il cui polline potrebbe essere accettato dai pistilli portatori di  $A_1$ . A questo punto  $A'_1$  e  $A'_2$  tenderebbero gradualmente a sostituire  $A_1$  e  $A_2$  e, essendo compatibili fra loro, risulterebbero due nuovi aplotipi S funzionali e distinti.



**Figura 1.8:** modelli teorici per la formazione di nuove specificità al locus S. Per ogni aplotipo è rappresentato schematicamente il locus, contenente i geni del determinante stilare (DS) e pollinico (DP); le frecce indicano il comportamento del polline nell'incrocio: frecce verdi indicano compatibilità, rosse rigetto. A) Normale situazione di reciprocità fra aplotipi: il polline degli aplotipi  $A$  è compatibile su  $B$  e viceversa; per uno stesso aplotipo possono coesistere varianti leggermente differenti,  $A_1$  e  $A_2$ , che mantengono comunque la capacità di riconoscimento e rigetto reciproco. B) Formazione di un nuovo aplotipo attraverso un intermedio autocompatibile. Una mutazione del determinante pollinico di  $A$  genera dapprima un aplotipo  $A'$  il cui polline viene accettato sugli stili  $A$  (freccia verde), mentre lo stilo mantiene la sua specificità originaria e continua quindi a rigettare il polline  $A$  (freccia rossa); questa mancanza di reciprocità favorisce la diffusione di  $A'$  a discapito di  $A$ . In un secondo momento una mutazione nel determinante stilare di  $A'$ , che conferisce specificità di riconoscimento per il determinante pollinico mutato, genera un nuovo aplotipo  $A''$  in cui è ripristinata l'autoincompatibilità; questo aplotipo rigetta sia il proprio polline, sia il polline di  $A'$ , mentre accetta quello di  $A$ . In questa situazione è  $A''$  ad essere avvantaggiato rispetto ad  $A'$ , la cui frequenza nella popolazione tende a scendere fino ad estinguersi;  $A''$  costituisce quindi un nuovo allele funzionalmente distinto da  $A$ . C) Formazione di un nuovo aplotipo S senza interruzione dell'autoincompatibilità. Nell'ambito di uno stesso aplotipo coesistono due varianti,  $A_1$  e  $A_2$ , dotate di determinanti stilari leggermente diversi; una prima mutazione di  $A_1$  (parte sinistra della figura) genera un aplotipo  $A'_1$  il cui determinante pollinico mantiene la capacità di riconoscimento da parte del determinante stilare di  $A_1$ , mentre risulta compatibile sugli stili di  $A_2$  (freccia verde). Analogamente una mutazione a carico di  $A_2$  (parte destra) produce un aplotipo  $A'_2$  il cui polline risulta compatibile su  $A_1$  e  $A'_1$ . La mancanza di reciprocità fra  $A'_1$  e  $A_2$  e fra  $A'_2$  e  $A_1$  favorisce gli aplotipi mutati, che risultando fra loro compatibili costituiscono due nuovi aplotipi distinti.



## Capitolo 2

### Scopi della tesi

Lo studio dei determinanti genici dell'autoincompatibilità gametofitica mediata da RNasi ha portato negli ultimi vent'anni ad acquisire una notevole quantità di informazioni; tuttavia molti aspetti di questo meccanismo restano ancora da chiarire. Inoltre, la grande maggioranza delle attuali conoscenze molecolari deriva dallo studio di specie modello, su tutte le Solanaceae *Petunia* e *Nicotiana*: sebbene ci sia motivo di ritenere che le stesse informazioni siano in larghissima parte estensibili anche alle Rosaceae da frutto, i dati direttamente ottenuti sulle arboree sono molto più limitati; è inoltre possibile, come detto nel par. 1.6.2, che a fronte di un meccanismo ancestrale conservato nelle tre famiglie Solanaceae, Rosaceae e Plantaginaceae, si siano create nel corso della storia evolutiva di alcuni generi differenze riguardanti alcuni aspetti dell'attuazione dello stesso meccanismo.

Rispetto a specie erbacee come *Petunia* e *Nicotiana*, lo studio della biologia florale nelle specie arboree da frutto è complicato da una serie di fattori, primo fra tutti il lungo periodo di giovanilità durante il quale la pianta non fiorisce; è tuttavia necessario che questo tipo di ricerca prosegua, sia per verificare l'effettiva validità per queste specie dei modelli ottenuti nelle Solanaceae, sia per giungere ad una migliore comprensione di un fenomeno che, oltre all'indubbio interesse nel campo della biologia cellulare vegetale, ha sicuramente una sua importanza dal punto di vista culturale e quindi economico.

Questo studio si propone di ottenere attraverso analisi molecolari informazioni sul meccanismo dell'autoincompatibilità gametofitica in pero europeo (*Pyrus communis*), specie di grande importanza nell'agricoltura italiana, ma per la quale i dati sono ancora molto limitati. Fra le Rosaceae da frutto, infatti, la maggioranza dei dati ottenuti in questo ambito di ricerca deriva dal genere *Prunus*, mentre lo studio delle Pyrinae è più difficile sia per la maggiore complessità del genoma, di origine

allopoliploide, sia per l'estrema rarità di mutanti autocompatibili. Fra le Pyrinae inoltre le specie maggiormente studiate sono il melo (*Malus × domestica*) e il pero giapponese (*Pyrus pyrifolia*).

Lo studio procederà in due direzioni distinte: da un lato si cercherà di ottenere informazioni di sequenza sui geni F-box interni al locus S, che in pero europeo ancora non sono disponibili, e dall'altro si lavorerà all'identificazione di fattori esterni al locus S coinvolti nelle reazioni di rigetto o accettazione del tubetto pollinico.

## 2.1 Caratterizzazione dei geni S-locus F-Box

Il punto di partenza per questa parte del lavoro sarà fornito dalle sequenze dei geni SFBB identificate da Sassa *et al.* 2007 [52] in melo e pero giapponese, che costituiscono le prime sequenze di F-box nelle Pyrinae per le quali è stata dimostrata l'appartenenza al locus S. Successivamente a questo lavoro sono state clonate sequenze di PpSFBB $\gamma$  da molte varietà di pero giapponese, e sulle stesse è stato messo a punto un metodo di genotipizzazione S [127]; non sono invece ancora disponibili sequenze di pero europeo.

L'elevata sintonia fra i genomi di queste specie è tale da garantire nella maggioranza dei casi il funzionamento di primer eterologhi; è inoltre da considerare il fenomeno dell'evoluzione trans-specifica, che come detto nel par. 1.9, fa sì che gli aplotipi S possano mostrare un'elevatissimo grado di conservazione anche successivamente alla divergenza delle specie. Questo fenomeno emerge chiaramente dall'analisi delle sequenze delle S-RNasi delle Pyrinae ed è plausibile che si manifesti in misura analoga anche per i geni S-locus F-box.

Tuttavia dal lavoro di Sassa *et al.* emerge un interrogativo a tale proposito; sono infatti stati ottenuti dati contrastanti per melo e pero giapponese: non solo per il numero di geni SFBB, due nella prima specie e tre nella seconda, ma anche per le caratteristiche degli stessi. I geni SFBB di melo infatti mostrano maggiore similitudine fra geni dello stesso aplotipo, mentre quelli di pero giapponese permettono di individuare chiaramente i tre gruppi  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  altamente conservati fra aplotipi diversi.

Questo farebbe supporre una differenza nell'organizzazione del locus S fra le due specie, differenza che non era attesa sulla base delle sequenze delle S-RNasi, e che aprirebbe un ulteriore interrogativo sulla collocazione del pero europeo. Quest'ultima specie infatti appartiene al genere *Pyrus* come il pero giapponese, e con esso è perfettamente compatibile dando ibridi fertili; tuttavia il genoma di pero europeo presenta



anche una forte sintenia con quello di melo, tale da consentire il trasferimento di un grande numero di marcatori SSR fra le due specie e la valutazione della colinearità fra i due genomi [128].

Al fine di investigare sui rapporti fra le tre specie per quanto riguarda la struttura del locus S, nelle analisi saranno inseriti genotipi di melo e pero giapponese, oltre a quelli di pero europeo. Si cercherà inoltre di scegliere coppie di genotipi di specie diverse aventi S-RNasi molto simili, per poter valutare se il fenomeno dell'evoluzione trans-specifica si rifletta anche sui geni S-locus F-Box.

Dal punto di vista operativo, il lavoro partirà dalla realizzazione di primer sulle sequenze dei geni SFBB sia di melo che di pero giapponese; i prodotti amplificati dai genotipi delle tre specie saranno clonati e sequenziati, e se ne verificherà la co-segregazione con le S-RNasi, al fine di dimostrarne l'associazione al locus S. Per quanto riguarda il pero europeo, in particolare, si procederà al mappaggio degli stessi nella popolazione da incrocio 'Abate Fétel' × 'Max Red Bartlett' per la quale è già disponibile una mappa genetica [128, 129, 130, 131].

## 2.2 Ricerca di fattori esterni al locus S

In parallelo alla ricerca e caratterizzazione dei determinanti pollinici, questo studio si propone come obiettivo l'identificazione di geni coinvolti nell'attuazione della risposta cellulare all'incompatibilità. A tale scopo si è scelto di procedere con la tecnica della cDNA AFLP [132, 133, 134].

L'analisi partirà da impollinazioni artificiali secondo tutte le combinazioni d'incrocio possibili: sarà utilizzato polline "self" (autoimpollinazione), incompatibile, semicompatibile e totalmente compatibile; gli stili saranno campionati al momento dell'impollinazione e successivamente ad intervalli regolari fino alle 48 ore dall'impollinazione. Verranno poi estratti gli RNA totali e si procederà alla retrotrascrizione del cDNA doppio filamento. Questo sarà utilizzato come da protocollo AFLP, con i passaggi di restrizione, ligazione ad oligonucleotidi adattatori, preamplificazione ed amplificazione.

L'obiettivo è riuscire a visualizzare profili polimorfici fra le diverse tesi, per poter identificare frammenti genici la cui trascrizione è modulata specificamente in risposta alla reazione compatibile o incompatibile. Tali frammenti saranno clonati e sequenziati per poter ottenere informazioni sulla natura di questi geni e formulare ipotesi sul loro possibile coinvolgimento in questo meccanismo.

### 2.2.1 Sequenziamento del gene della transglutaminasi

Nell'ambito dei fattori esterni al locus S, come spiegato nel par. 1.7.1, la transglutaminasi potrebbe svolgere un ruolo particolarmente significativo. Tuttavia il gene codificante per questo enzima in pero europeo non è ancora stato identificato e caratterizzato.

La prima TGasi vegetale ad essere caratterizzata a livello genico è stata quella di *Arabidopsis thaliana*, codificata dal gene *AtPng1p* [135]. Non sono note invece sequenze di TGasi nelle Rosaceae; tuttavia in banche dati online di ESTs (*Expressed Sequence Tags*) si possono trovare frammenti di geni espressi omologhi alla sequenza di *A. thaliana*.

Fra questi, in particolare, esistono due ESTs di melo<sup>1</sup> che si allineano a porzioni diverse della sequenza di *AtPng1p*. L'allineamento fra queste sequenze e il gene di *A. thaliana* sarà il punto di partenza per la realizzazione di primer eterologhi, disegnati sulle regioni maggiormente conservate, con i quali si tenterà di clonare da DNA genomico di pero europeo frammenti dello stesso gene. Sulla base delle informazioni disponibili, si tenterà poi di clonare il cDNA full-length; a tale scopo sarà utilizzato RNA estratto da stili impollinati in combinazione incompatibile, nei quali è stato dimostrato un'aumento dell'attività TGasica che fa supporre un buon livello di espressione dello stesso gene.

---

<sup>1</sup>Sequenze MD4C477240 e MD4C271570 presenti nel "Tree Fruit Technology - Apple Database" della Michigan State University, <http://genomics.msu.edu/fruitdb/analyses/database.shtml>

## Capitolo 3

# Materiali e metodi

### 3.1 Materiale vegetale

Per il campionamento di materiale vegetale (foglie, stili, frutti) sono state utilizzate varietà di pero europeo, pero giapponese e melo allevate nei campi della Stazione Sperimentale del Dipartimento di Colture Arboree, Università di Bologna, in località Cadriano (BO), o presso i campi del CITA (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón) in località Montañana, Saragozza (Spagna).

Per la ricerca dei geni F-box del locus S sono stati scelti i seguenti genotipi:

- ‘Abate Fétel’ (genotipo S:<sup>1</sup> PcS<sub>104</sub>/PcS<sub>105</sub>) e ‘Max Red Bartlett’ (PcS<sub>101</sub>/PcS<sub>102</sub>) di pero europeo, per la disponibilità di una mappa molecolare e della relativa popolazione derivante dal loro incrocio [128, 129, 130, 131], utile per verificare la segregazione degli alleli di geni F-box individuati nel corso del lavoro;
- le varietà ‘Conseiller a La Coeur’ di pero europeo (PcS<sub>103</sub>/PcS<sub>123</sub>) e ‘Fuji’ di melo (MdS<sub>1</sub>/MdS<sub>9</sub>), per l’elevata omologia fra le S-RNasi degli alleli PcS<sub>123</sub> e MdS<sub>9</sub>, oltre alla disponibilità delle sequenze di geni F-box appartenenti all’aplotipo MdS<sub>9</sub> [52];
- le varietà ‘Wilder’ di pero europeo (PcS<sub>101</sub>/PcS<sub>111</sub>) e ‘Kumoi’ di pero giapponese (PpS<sub>1</sub>/PpS<sub>3</sub>), per l’elevata omologia fra le S-RNasi degli alleli PcS<sub>111</sub> e PpS<sub>1</sub>; è stato inoltre scelto il genotipo ‘Chojuro’ di pero giapponese (PpS<sub>2</sub>/PpS<sub>3</sub>) per la disponibilità di una popolazione di embrioni ibridi ottenuti dall’incrocio con ‘Wilder’;

---

<sup>1</sup>nell’indicazione dei genotipi S per chiarezza ogni aplotipo sarà preceduto dalla sigla “Pc” (*Pyrus communis*) se appartenente a pero europeo, “Pp” (*Pyrus pyrifolia*) se appartenente a pero giapponese e “Md” (*Malus × domestica*) se appartenente a melo.

- le varietà ‘Packham’s Triumph’ di pero europeo (PcS<sub>101</sub>/PcS<sub>103</sub>) e ‘McIntosh’ di melo (MdS<sub>10</sub>/MdS<sub>25</sub>), per l’elevata omologia fra le S-RNasi degli alleli PcS<sub>103</sub> e MdS<sub>25</sub>; inoltre la presenza dei due aplotipi PcS<sub>101</sub> e PcS<sub>103</sub> nella varietà ‘Packham’s Triumph’ permette un controllo incrociato con le sequenze ottenute da ‘Max Red Bartlett’, ‘Wilder’ (entrambe portatrici di PcS<sub>101</sub>) e ‘Conseiller a La Coeur’ (portatrice di PcS<sub>103</sub>).

Per gli incroci necessari per la cDNA-AFLP si è deciso di procedere ad impollinazioni artificiali sulla varietà ‘Abate Fétel’, secondo quattro combinazioni:

- polline “self”, che innesca la reazione di autoincompatibilità;
- polline della varietà ‘Decana del Comizio’ (PcS<sub>104</sub>/PcS<sub>105</sub>), incompatibile;
- polline della varietà ‘Cascade’ (PcS<sub>101</sub>/PcS<sub>104</sub>), compatibile al 50%;
- polline della varietà ‘Conference’ (PcS<sub>108</sub>/PcS<sub>119</sub>), compatibile al 100%.

Per la ricerca del gene della transglutaminasi, infine, si è deciso di operare sui genotipi ‘Abate Fétel’ e ‘William’.

### 3.2 Estrazione di DNA

Per l’estrazione di DNA sono state utilizzate foglie giovani da germogli in attiva crescita; queste sono state congelate in azoto liquido e conservate a -80°C oppure liofilizzate. L’estrazione è stata condotta su campioni da 0,1-0,5 grammi di foglie fresche macinate in azoto liquido, oppure su 5 mg di foglie liofilizzate macinate con aggiunta di carburo di silicio ed agitazione tramite Mixer Mill a 29 colpi/minuto per 3 minuti.

Al campione così polverizzato sono stati aggiunti 900  $\mu$ l di buffer di estrazione CTAB preriscaldato, la cui composizione è riportata nella tabella 3.1; le provette sono state vortexate e lasciate in incubazione a 60°C per 30 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 900  $\mu$ l di diclorometano/alcool isoamilico 24:1; il campione è stato emulsionato agitando dolcemente per 10 minuti e centrifugato a 5000 rpm per 5 minuti. Il sopranatante è stato trasferito in un tubo pulito e si è ripetuta l’estrazione con diclorometano/isoamilico e centrifugazione. Al sopranatante è stato quindi aggiunto un uguale volume di isopropanolo freddo (-20°C) per far precipitare l’acido nucleico; il campione è stato centrifugato a 13000 rpm per 5 minuti ed il sopranatante è stato eliminato. Il pellet di DNA è stato lavato con 500  $\mu$ l di washing

buffer per due volte, quindi è stato seccato all'aria e risospeso in 100  $\mu\text{l}$  di acqua bidistillata sterile.

CTAB buffer	
CTAB (Sigma)	2 %
NaCl	1,4 M
Tris-HCl pH8	100 mM
EDTA	20 mM
PVP-40	2 %
$\beta$ -mercaptoetanolo	1 %

Washing buffer	
Etanolo	76 %
Ammonio acetato	10 mM

**Tabella 3.1:** soluzioni per l'estrazione del DNA.

### 3.2.1 Estrazione da embrioni

Gli embrioni sono stati prelevati dai semi avendo cura di eliminare il tegumento esterno, il cui tessuto è di origine materna; sono stati macinati direttamente in eppendorf con appositi pestelli, insieme a 400  $\mu\text{l}$  di CTAB buffer; si sono poi aggiunti altri 400  $\mu\text{l}$  di buffer e, dopo aver miscelato bene, i campioni sono stati incubati a 60°C per 30 minuti. Sono stati effettuati due passaggi di estrazione con 800  $\mu\text{l}$  di fenolo:cloroformio:alcool isoamilico 25:24:1 seguiti da centrifugazione a 5000 rpm per 5 minuti e prelevamento del soprannatante; a questo è stato poi aggiunto un uguale volume di isopropanolo freddo per la precipitazione del DNA ed il campione è stato centrifugato per 5 minuti a 13000 rpm. Il pellet è stato lavato con 800  $\mu\text{l}$  di washing buffer incubando a temperatura ambiente per almeno 20 minuti, poi si è lasciato seccare brevemente all'aria e si è risospeso in 200  $\mu\text{l}$  di acqua bidistillata sterile.

### 3.2.2 Quantificazione e diluizione

La concentrazione e la purezza del DNA estratto sono state misurate tramite spettrofotometro NanoDrop ND-1000 UV-Vis. Caricando 1  $\mu\text{l}$  di DNA lo strumento fornisce sia la concentrazione del campione, espressa in  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , sia i rapporti di assorbanza 260/230 e 260/280 nm; questi ultimi parametri permettono di stimare la purezza del DNA da vari contaminanti quali proteine, polisaccaridi e fenoli: un valore prossimo

o superiore a 2 per entrambi è indice di una purezza soddisfacente per il successivo impiego del campione in PCR.

Il DNA è stato quindi diluito per tutti i campioni ad una concentrazione standard di 50 ng/ $\mu$ l; nel caso del DNA di embrioni, una volta testata la stabilità della resa del processo di estrazione, non si è ritenuto necessario provvedere alla diluizione in quanto la concentrazione ottenuta risulta già idonea all'impiego in PCR.

### 3.3 PCR

L'amplificazione di frammenti di DNA tramite PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è stata condotta utilizzando *Taq*-DNA polimerasi e relativi reagenti delle ditte Fisher e Invitrogen. La miscela di reazione standard è riportata nella tabella 3.2.

<b>Miscela PCR standard</b>	
Acqua bidistillata sterile	15,8 $\mu$ l
Buffer di reazione 10X	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0,5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM ognuno)	0,2 $\mu$ l
Primer Forward 10 $\mu$ M	0,2 $\mu$ l
Primer Reverse 10 $\mu$ M	0,2 $\mu$ l
<i>Taq</i> -DNA polimerasi 5U/ $\mu$ l	0,1 $\mu$ l
DNA 50 ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Volume finale	20 $\mu$ l

**Tabella 3.2:** miscela di reazione PCR standard su un volume finale di 20  $\mu$ l.

Il protocollo di amplificazione, schematizzato nella tabella 3.3, è stato di volta in volta adattato al frammento da amplificare; i principali parametri tenuti in considerazione sono stati:

- la temperatura di annealing, fortemente dipendente dalle sequenze dei primer utilizzati; temperature troppo alte infatti non consentono un efficiente appaiamento degli stessi sul template, risultando in amplificazioni deboli o assenti, mentre temperature troppo basse possono risultare nell'amplificazione di frammenti aspecifici.
- la durata della fase di estensione: generalmente è sufficiente un minuto per l'amplificazione di frammenti entro o poco oltre le 1000 bp, mentre per frammenti di dimensione maggiore è stato necessario impostare tempi più lunghi.

- il numero di cicli; un aumento rispetto al valore standard di 32 cicli, fino a 36-40, può in alcuni casi migliorare la resa, tuttavia aumenta il rischio che durante l'amplificazione si generino frammenti ricombinanti, in particolare quando si amplificano due alleli di uno stesso gene; in alcuni casi è quindi stato impostato un numero di cicli inferiore allo standard, che garantisca una resa sufficiente minimizzando al contempo la formazione di ricombinanti.

**Protocollo PCR standard**

Fase	Temp.	Durata	N. cicli
Denaturazione iniziale	94°C	3'	1
Denaturazione	94°C	30"	
Annealing	58°C	45"	32
Estensione	72°C	1'	
Estensione finale	72°C	10'	1

**Tabella 3.3:** protocollo standard d'amplificazione.

### 3.3.1 Realizzazione dei primer

I primer sono stati realizzati sulla base delle informazioni di sequenza rinvenute in banche dati online per i geni di interesse, oppure sulle sequenze ottenute nel corso del lavoro. Le sequenze dei primer sono state testate utilizzando il programma Primer3 [136], disponibile online all'indirizzo:

[http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

Si è verificato che le temperature di melting fossero il più possibile simili per le coppie forward/reverse da utilizzare congiuntamente; si è generalmente considerata come ottimale una temperatura di annealing compresa fra 58 e 60°C.

### 3.3.2 Elettroforesi su gel d'agarosio

Per la separazione di frammenti di DNA di dimensione superiore alle 300 bp è stata utilizzata l'elettroforesi su gel d'agarosio. I campioni sono stati preparati aggiungendo 0,2 volumi di Blue Dye (vedi tabella 3.4). Il gel è stato preparato sciogliendo l'agarosio in polvere in buffer TAE 1X; sono state utilizzate concentrazioni di agarosio pari ad 1, 1,5 o 2% w/v a seconda del peso molecolare dei frammenti da visualizzare (concentrazioni maggiori per frammenti più piccoli). Insieme ai campioni è stato caricato un marcatore di peso molecolare; la corsa elettroforetica è stata condotta

## MATERIALI E METODI

---

a 100/120 Volt per tempi compresi fra 45 minuti e 2 ore, a seconda delle esigenze di separazione. Il gel è stato colorato per immersione in una soluzione contenente il fluoroforo intercalante Etidio bromuro per 15/20 minuti, seguita da rilevazione su Kodak Image Station 440 CK.

<b>TAE buffer 50X</b>	
Tris Base	242 g
Acido acetico glaciale	57,1 ml
EDTA 0,5 M pH 8	100 ml
Acqua distillata	a vol. 1 l

<b>Blue Dye</b>	
TAE 50X	2 ml
Ficoll 400	2,5 g
Blu di bromofenolo	25 mg
Acqua distillata	a vol. 20 ml

<b>Soluzione colorante</b>	
Etidio bromuro 10 mg/ml	100 $\mu$ l
Acqua distillata	1 l

**Tabella 3.4:** soluzioni per l'elettroforesi su gel d'agarosio.

### 3.3.3 Elettroforesi su gel di poliacrilamide

L'elettroforesi su gel di poliacrilamide è stata utilizzata per la separazione di frammenti di dimensione inferiore alle 300 bp, per i quali la risoluzione dei gel di agarosio non è sufficiente.

Per questo tipo di elettroforesi è stato utilizzato il buffer TBE (vedi tabella 3.5); il gel viene preparato utilizzando un buffer contenente TBE e urea, per creare condizioni denaturanti, al quale vengono aggiunte acrilamide e bisacrilamide, il catalizzatore Temed ed il polimerizzante ammonio persolfato (APS) secondo la ricetta riportata nella tabella 3.5. Il gel viene colato fra due lastre di vetro appositamente trattate e polimerizza in un paio d'ore, al termine delle quali può essere montato nella camera elettroforetica con il buffer TBE 1X; prima dei campioni viene caricata una soluzione di pre-corsa, costituita da acqua e denaturante in parti uguali, e viene fatta partire la corsa in modo da riscaldare il gel. I campioni vengono preparati aggiungendo 0,5/1



volumi di denaturante, riscaldati a 95°C per 5/10 minuti, poi trasferiti rapidamente in ghiaccio. Quando il gel ha raggiunto una temperatura di circa 45°C i campioni vengono caricati, insieme ad un marcatore di peso molecolare, e la corsa viene fatta partire a 65 Watt; la durata varia da 45 minuti a 2 ore a seconda della dimensione dei frammenti da separare.

---

**TBE buffer 5X**

Tris Base	54 g
Acido borico	27,5 g
EDTA 0,5 M pH 8	20 ml
Acqua distillata	a vol. 1 l

---

**TBE - Urea**

Urea	210 g
TBE 5X	100 ml
Acqua distillata	a vol. 500 ml

---

**Gel di poliacrilamide**

TBE - Urea	55 ml
Liquacril (40% acrilamide, MP Biomedicals)	8,5 ml
Liquabis (2% bis-acrilamide, MP Biomedicals)	8,5 ml
Temed (N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylenediamine, Sigma)	45 $\mu$ l
APS (Ammonio persolfato 10%)	300 $\mu$ l

---

**Denaturante**

EDTA 0,5 M pH 8	0,5 ml
Blu di bromofenolo	25 mg
Xilene cianolo	25 mg
Formamide 98%	a vol. 25 ml

**Tabella 3.5:** soluzioni per l'elettroforesi su gel di poliacrilamide.

La colorazione avviene tramite silver staining con nitrato d'argento. Il gel viene

## MATERIALI E METODI

---

prima lasciato mezz'ora in una soluzione fissativa (Fix solution, tabella 3.6; seguono due lavaggi da 5 minuti in acqua distillata, poi il gel viene trasferito nella staining solution, contenente nitrato d'argento, per altri 30 minuti. Lo sviluppo, preceduto da un ulteriore rapidissimo lavaggio in acqua distillata per pochi secondi, avviene in due passaggi in developing solution; quando la visibilità delle bande sul gel è ottimale, la reazione viene stoppata aggiungendo alla developing solution la fix precedentemente utilizzata. Il gel viene poi lavato in acqua e seccato all'aria, per poter essere acquisito tramite un normale scanner.

<b>Fix solution</b>	
Acido acetico 10% v/v in acqua distillata	

<b>Staining solution</b>	
AgNO <sub>3</sub>	1 g
Formaldeide 37%	1,5 ml
Acqua bidistillata	a vol. 1 l

<b>Developing solution</b>	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	60 g
Formaldeide 37%	3 ml
Sodio tiosolfato 1%	400 $\mu$ l
Acqua bidistillata	a vol. 2 l

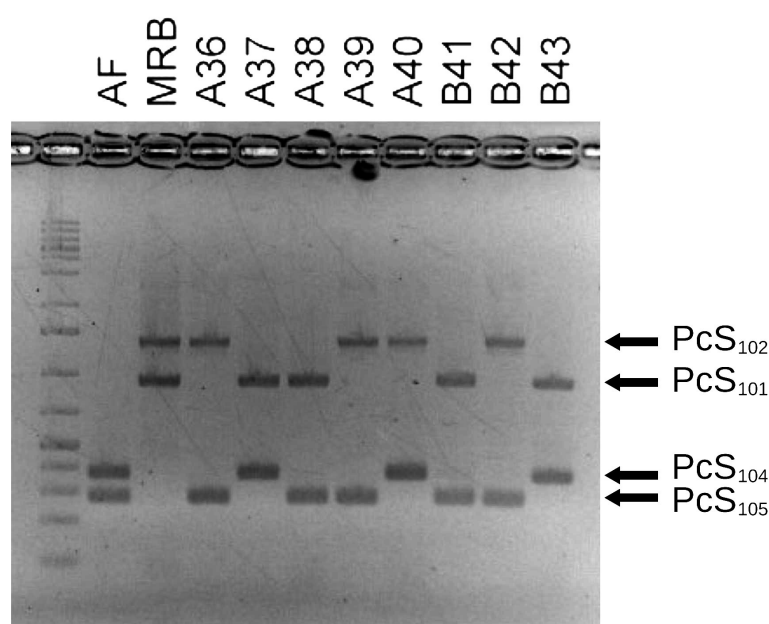
**Tabella 3.6:** soluzioni per la colorazione silver staining dei gel di poliacrilamide.

### 3.3.4 Genotipizzazione al locus S

Per determinare la composizione allelica al locus S degli individui appartenenti alle progenie segreganti, sono stati utilizzati primer (riportati nella tabella 3.7) disegnati sulle regioni maggiormente conservate del gene della S-RNasi, a monte e a valle dell'unico introne presente. La dimensione altamente variabile di quest'ultimo infatti permette di ottenere amplificati chiaramente distinguibili per gli alleli analizzati in elettroforesi su gel d'agarosio, consentendo quindi di determinare la composizione allelica con un semplice marcatore di tipo SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*, vedi figura 3.1).

SRNase_for	G TTCACGGWTTTRTGGCCTTC
SRNase_rev	TACGTTSGGCCAAATAATTWCCA

**Tabella 3.7:** primer utilizzati per la genotipizzazione al locus S.



**Figura 3.1:** verifica della composizione allelica al locus S attraverso l'amplificazione di una porzione del gene della S-RNasi; sono presenti i genotipi 'Abate Fétel' (AF), 'Max Red Bartlett' (MRB) e 8 individui della progenie.

### 3.3.5 Marcatori CAPS

Per distinguere alleli diversi che producono amplificati della stessa dimensione si è proceduto ad un taglio con enzimi di restrizione, che possono produrre profili differenti nel caso i due alleli abbiano una diversa distribuzione dei siti di taglio lungo il frammento amplificato. Si parla in questo caso di marcatori CAPS (*Cleavage Amplified Polymorphic Sequence*). Questi sono stati utilizzati sia in fase di clonaggio, per tentare di distinguere gli alleli diversi appartenenti alla stessa cultivar, sia in fase di verifica della segregazione dei geni SFBB identificati; in quest'ultimo caso, avendo già a disposizione le informazioni di sequenza, è stata prima condotta un'analisi *in silico* della distribuzione dei siti di restrizione, per trovare l'enzima che consentisse la migliore distinzione degli alleli in questione.

In totale sono stati utilizzati cinque diversi enzimi di restrizione di tipo "frequent cutter", che riconoscono cioè siti bersaglio di 4 bp, ed un "6-cutter", riassunti nella

tabella 3.8. Gli enzimi utilizzati sono della ditta Fermentas ed ognuno è dotato di un appropriato buffer di reazione a concentrazione 10X; la restrizione è avvenuta su 10  $\mu$ l di prodotto PCR, con 1 unità di enzima ed il buffer alla concentrazione finale di 1X, per la durata di circa 90-120 minuti alla temperatura appropriata per ogni enzima.

<b>Enzima</b>	<b>Sito di taglio</b>	<b>Temperatura</b>
<i>Tru</i> II ( <i>Mse</i> I)	5' - T/T A A - 3'	65°C
<i>Taq</i> I	5' - T/C G A - 3'	65°C
<i>Alu</i> I	5' - A G/C T - 3'	37°C
<i>Rsa</i> I	5' - G T/A C - 3'	37°C
<i>Bsu</i> RI	5' - G G/C C - 3'	37°C
<i>Eco</i> RI	5' - G/A A T T C - 3'	37°C

**Tabella 3.8:** enzimi di restrizione utilizzati per la distinzione degli alleli; i siti di taglio sono sequenze palindromiche di quattro bp.

## 3.4 Clonaggio

### 3.4.1 Terreni di coltura

Il terreno comunemente usato per la coltura di *Escherichia coli* è quello sviluppato da Luria e Bertani negli anni '50 (LB broth); altri tipi di terreno, come il SOC o il 2XYT, sono stati impiegati in fasi particolari come la preparazione delle cellule competenti o la trasformazione. La composizione dei diversi mezzi di coltura è riportata nella tabella 3.9; la preparazione è avvenuta sciogliendo i vari componenti in acqua distillata, aggiustando il pH al valore di 7.0 e sterilizzando in autoclave a 120°C per 20 minuti. I composti termolabili sono invece stati sterilizzati per filtrazione ed aggiunti dopo il passaggio in autoclave ed il raffreddamento del mezzo. Per la selezione dei batteri trasformati con plasmidi che conferiscono resistenza ad ampicillina, l'antibiotico è stato aggiunto al mezzo alla concentrazione finale di 50 mg/l.

Per la preparazione di terreno solido è stato aggiunto agar nella misura di 15 g/l prima della sterilizzazione in autoclave; quando richiesto, l'ampicillina è stata aggiunta al mezzo quando la temperatura è scesa sotto i 50°C. Il terreno è stato quindi versato nelle piastre petri e lasciato solidificare.

Per la selezione delle colonie trasformate (vedi par. 3.4.5), alle piastre contenenti

LB - ampicillina sono stati aggiunti 4  $\mu\text{l}$  di una soluzione di IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalattopiranoside) 24 mg/ml in acqua e 40  $\mu\text{l}$  di X-Gal 20 mg/ml in N,N'-dimetilformamide; questi sono stati distribuiti uniformemente sulla superficie della piastra utilizzando uno spreader.

<b>Terreno LB</b>	
Bacto-Tryptone	10 g/l
Bacto-Yeast extract	5 g/l
NaCl	10 g/l

<b>Terreno 2XYT</b>	
Bacto-Tryptone	16 g/l
Bacto-Yeast extract	10 g/l
NaCl	5 g/l

<b>Terreno SOC</b>	
Bacto-Tryptone	20 g/l
Bacto-Yeast extract	5 g/l
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	20 mM
Glucosio	20 mM

**Tabella 3.9:** terreni di coltura batterica utilizzati nelle diverse fasi del clonaggio.

### 3.4.2 Cellule competenti

Sono state utilizzate cellule di *Escherichia coli* del ceppo DH5 $\alpha$ , privo di plasmidi e quindi idoneo alla trasformazione con vettori contenenti geni di antibiotico-resistenza.

Le cellule sono state piastrate su terreno LB e lasciate crescere a 37°C overnight; si è quindi prelevata una singola colonia ed è stata inoculata in 5 ml di LB liquido; questo è stato incubato in vigorosa agitazione a 37°C overnight. 1 ml della coltura batterica a confluenza è quindi stato inoculato in 100 ml di terreno 2XYT, posto anche in questo caso in vigorosa agitazione a 37°C, fino al raggiungimento della concentrazione ottimale; questa è stata valutata misurando l'assorbanza a 550 nm: quando la densità ottica ha raggiunto il valore di 0,6 la crescita è stata fermata trasferendo la coltura in ghiaccio per 10 minuti. Sono quindi state prelevate quattro

aliquote da 10 ml, trasferite in tubi da 13 ml, e centrifugate a 5000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il terreno è stato eliminato ed in ogni tubo le cellule sono state delicatamente risospese in 5 ml di una soluzione di cloruro di calcio 100 mM sterile. Si è lasciato in incubazione in ghiaccio per 20 minuti, al termine dei quali i tubi sono stati nuovamente centrifugati a 5000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il pellet è quindi stato risospeso in 1 ml di cloruro di calcio 100 mM, al quale successivamente sono stati aggiunti 275  $\mu$ l di glicerolo 60% v/v in acqua. Le cellule sono infine state distribuite in aliquote di 200  $\mu$ l in tubi da 1,5 ml con tappo a vite e conservate a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

### 3.4.3 Amplificazione con DNA polimerasi High-Fidelity

La *Taq*-DNA polimerasi è l'enzima utilizzato per tutte le PCR di routine; per alcune applicazioni, fra cui il clonaggio di geni per il successivo sequenziamento, è tuttavia consigliabile utilizzare altri enzimi caratterizzati da un tasso di errore molto inferiore a quello della *Taq*. In questo lavoro sono state utilizzate due DNA polimerasi ad alta fedeltà, fornite dalle ditte Takara e Finnzyme. La maggiore fedeltà di questi enzimi deriva dall'attività "proofreading", che consente agli stessi di agire come esonucleasi in direzione 3'-5' eliminando eventuali basi erroneamente incorporate che generano un appaiamento imperfetto, per poi riprendere la sintesi dello stesso filamento. Questo tipo di enzima richiede un'ottimizzazione del protocollo di amplificazione rispetto agli standard riportati nelle tabelle 3.2 e 3.3, in particolare per quanto riguarda il tempo di estensione (che generalmente deve essere di almeno 1 minuto per ogni 1000 bp di lunghezza dell'amplicone); le modifiche al protocollo sono state condotte seguendo le indicazioni fornite dai produttori.

A causa della loro attività 3'-5' esonucleasica queste DNA polimerasi generano frammenti blunt-end, a differenza della *Taq* che invece incorpora una base di adenina al 3' del filamento sintetizzato; poichè questa base sporgente è necessaria per il clonaggio in vettori di tipo pGEM-T, deve essere aggiunta successivamente alla PCR.

Per l'aggiunta di adenina al 3' (A-tailing) i frammenti PCR devono prima di tutto essere purificati. Al prodotto PCR è stato aggiunto un uguale volume di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico 25:24:1 ed è stato centrifugato a 5000 rpm per 5 minuti; il sopranatante è stato trasferito in un tubo da 200  $\mu$ l pulito e si è aggiunto un volume di isopropanolo freddo per precipitare il frammento di DNA. Dopo centrifugazione alla massima velocità per 10 minuti, il pellet è stato delicatamente lavato

con 100  $\mu\text{l}$  di washing buffer (vedi tabella 3.1) e seccato all'aria, quindi risospeso in 10  $\mu\text{l}$  di acqua bidistillata sterile.

La reazione di A-tailing è stata condotta aggiungendo la *Taq*-DNA polimerasi, con il proprio buffer, alla miscela contenente il prodotto PCR purificato e dATP secondo le concentrazioni riassunte nella tabella 3.10. Dopo aver miscelato bene, la reazione è stata incubata a 72°C per 20 minuti; il prodotto così ottenuto è utilizzabile nella reazione di ligazione al plasmide pGEM-T.

<b>A-tailing</b>	
Prodotto PCR purificato	10 $\mu\text{l}$
Buffer 10X	1,5 $\mu\text{l}$
ATP 10 mM	0,75 $\mu\text{l}$
<i>Taq</i> -DNA polimerasi 5U/ $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{l}$
Acqua bidistillata sterile	2,55 $\mu\text{l}$
Volume finale	15 $\mu\text{l}$

**Tabella 3.10:** miscela di reazione per l'aggiunta della base di adenina al 3'.

#### 3.4.4 Ligasi

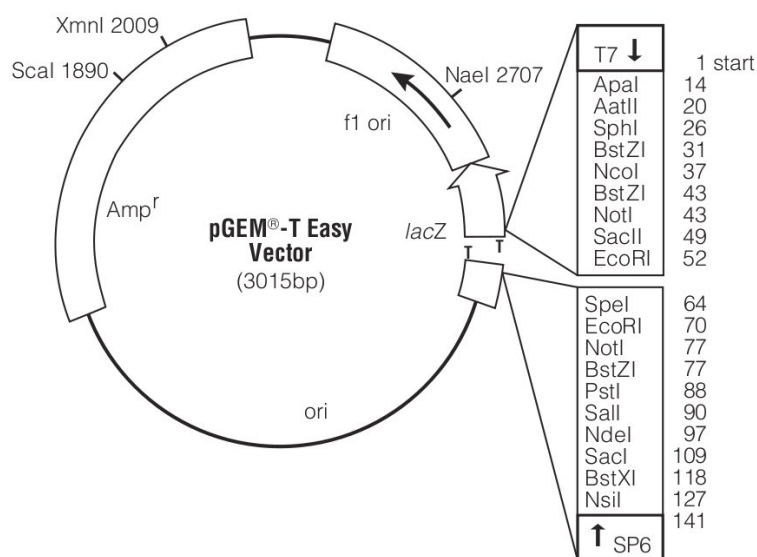
Per i clonaggi è stato utilizzato il kit pGEM-T Easy Vector System della ditta Promega, il cui vettore è riportato nella figura 3.2. La reazione è stata condotta su un volume finale di 5  $\mu\text{l}$ , come riportato nella tabella 3.11, ed incubata overnight a 4°C.

<b>Ligasi</b>	
Prodotto PCR	1,5 $\mu\text{l}$
pGEM-T 50 ng/ $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$
Buffer 2X	2,5 $\mu\text{l}$
T4 DNA ligasi 3U/ $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$
Volume finale	5 $\mu\text{l}$

**Tabella 3.11:** miscela di reazione per la ligazione dell'inserto al vettore di clonaggio.

#### 3.4.5 Trasformazione

La trasformazione è avvenuta su cellule del ceppo DH5 $\alpha$  di *Escherichia coli* rese chimicamente competenti secondo il protocollo descritto nel par. 3.4.2.



**Figura 3.2:** mappa del vettore di clonaggio pGEM-T Easy.

Le cellule competenti, conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$ , sono state fatte scongelare lentamente in ghiaccio;  $100\ \mu\text{l}$  della sospensione cellulare sono quindi stati aggiunti a  $2,5\ \mu\text{l}$  di miscela di ligasi in un tubo sterile da 2 ml e si è lasciato in incubazione per 30 minuti in ghiaccio. Per indurre uno shock termico tale da consentire alle cellule di incorporare il plasmide, la provetta è stata immersa in bagno termostatico a  $42^{\circ}\text{C}$  per 45 secondi e poi immediatamente riportata in ghiaccio. Si sono quindi aggiunti  $900\ \mu\text{l}$  di mezzo SOC ed i tubi sono stati incubati a  $37^{\circ}\text{C}$  in vigorosa agitazione per 60/80 minuti, fino al raggiungimento di una crescita soddisfacente. Due aliquote di 90 e  $180\ \mu\text{l}$  della sospensione cellulare sono state indipendentemente piastrate su petri con terreno LB addizionato di ampicillina, X-gal e IPTG, ed incubate a  $37^{\circ}\text{C}$  overnight.

La presenza sul plasmide del gene  $\text{Amp}^{\text{r}}$  consente la selezione positiva delle cellule trasformate in presenza di ampicillina. Inoltre il sito di inserzione del frammento clonato interrompe la sequenza del gene  $\text{LacZ}$  per la  $\beta$ -galattosidasi, la cui trascrizione è indotta dall'IPTG, analogo del galattosio; in presenza dell'enzima funzionale, cioè nelle cellule che hanno acquisito il plasmide privo dell'inserito, l'X-gal viene convertito in un composto di colore blu. Pertanto le colonie contenenti il plasmide ricombinante possono essere distinte in quanto risultano bianche, mentre quelle contenenti il plasmide privo dell'inserito risultano blu.

Le colonie positive sono state prelevate e singolarizzate su piastre contenenti LB addizionato di ampicillina; la verifica della presenza dell'inserito è avvenuta tramite



### 3.5 Impollinazioni e campionamento degli stili

---

colony-PCR ed elettroforesi su gel d'agarosio.

#### 3.4.6 Estrazione di plasmidi

Per l'estrazione del plasmide sono state utilizzate cellule prelevate da una colonia singola e lasciate crescere fino a confluenza in tubi da 13 ml, con 5 ml di terreno LB addizionato di ampicillina; le soluzioni utilizzate sono riportate nella tabella 3.12.

Un'aliquota da 2 ml della sospensione cellulare è stata trasferita in un tubo eppendorf da 2 ml, centrifugata a 6000 rpm per 2 minuti ed il soprannatante è stato eliminato. Le cellule sono quindi state delicatamente risospese in 200  $\mu$ l di soluzione LYR ed incubate 5 minuti a temperatura ambiente. Sono quindi stati aggiunti 400  $\mu$ l di Alkaline SDS per provocare la lisi alcalina delle cellule, si è miscelato bene per inversione ed incubato 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 300  $\mu$ l di KOAc 5M pH 4.8, che provoca la flocculazione dei residui cellulari insieme al DNA cromosomiale, ed il tubo è stato lasciato in incubazione in ghiaccio per 30 minuti.

Il campione è quindi stato centrifugato per 5 minuti alla massima velocità ed il soprannatante è stato trasferito in un tubo pulito; questo passaggio è stato ripetuto per ottenere una migliore pulizia del campione dal residuo flocculante. Il DNA è stato fatto precipitare aggiungendo un volume di isopropanolo freddo ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) e lasciando incubare 5 minuti. Dopo centrifugazione alla massima velocità per 5 minuti, il soprannatante è stato eliminato ed il pellet lavato con 1 ml di etanolo 80% e successivamente seccato all'aria. Il DNA è quindi stato risospeso in 100  $\mu$ l di acqua bidistillata sterile e quantificato al NanoDrop (vedi par. 3.2.2). Aliquote da 1  $\mu$ g sono state caricate su gel d'agarosio 1% insieme ad un marcatore di peso molecolare per verificare, dopo corsa elettroforetica a 100 Volt per 90 minuti, il corretto profilo e peso molecolare del plasmide.

Il plasmide, diluito alla concentrazione richiesta, è stato inviato a ditte esterne per il sequenziamento; la reazione di sequencing è stata effettuata utilizzando i primer universali M13 e SP6.

### 3.5 Impollinazioni e campionamento degli stili

I fiori delle varietà scelte come impollinatore sono stati prelevati, nella misura di 100-300 per incrocio, allo stadio di bottone florale; le antere sono state separate ed essiccate a  $22-25^{\circ}\text{C}$  per 24 ore, per provocarne la deiscenza ed ottenere quindi la

Soluzione LYR	
Glucosio	10 % w/v
EDTA, pH 8	10 mM
Tris, pH 8	25 mM
Lisozima	2 mg/ml
RNasi A	2 mg/ml

Alkaline SDS	
NaOH	0,1 M
SDS	1 % w/v

KOAc 5M pH 4.8	
Potassio acetato	5 M
Acido acetico glaciale	0,23 % v/v

**Tabella 3.12:** soluzioni necessarie per l'estrazione di plasmidi.

liberazione del polline. Questo è stato raccolto e conservato a 4°C fino al momento dell'utilizzo.

Sulle piante delle varietà scelte come portaseme sono state selezionate branchette fruttifere con una buona densità di corimbi; queste sono state protette con sacchi di cartone o rete a maglia fitta per evitare contaminazioni. Immediatamente prima dell'antesi i fiori sono stati demasculati, asportando gli stami insieme a calice e corolla; si è quindi proceduto all'impollinazione manualmente. Al termine dell'operazione sulle branche sono stati rimessi i sacchi per proteggere i fiori dalle contaminazioni di polline estraneo portato dagli insetti pronubi.

Gli stili da destinare all'estrazione di RNA per l'analisi tramite cDNA-AFLP sono stati posti in tubi eppendorf da 2 ml, prelevando per ogni campione gli stili di 10 fiori; i campioni sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C.

### 3.6 Estrazione di RNA da stili

Per l'estrazione di RNA da stili impollinati sono stati testati diversi protocolli, ottenendo risultati non soddisfacenti in termini di resa o di purezza; è quindi stato ottimizzato un protocollo, la cui versatilità è stata verificata anche nell'estrazione di

RNA da vari altri tessuti, e di cui è stata pubblicata la versione definitiva in Zamboni *et al.* 2008 [137].

### 3.6.1 Trattamento dei materiali e dei reagenti

La vetreria utilizzata per le soluzioni necessarie all'estrazione di RNA e alla successiva fasi di retrotrascrizione è stata sterilizzata in stufa a 200°C per 4 ore, oppure immersa in soluzione di NaOH 0,1 M per 60 minuti ed autoclavata a 120°C per 20 minuti; il doppio trattamento assicura infatti l'inattivazione delle RNasi contaminanti, che la semplice sterilizzazione in autoclave non è in grado di garantire.

Le soluzioni di lavoro sono state addizionate di DEPC (dietil-pirocarbonato) alla concentrazione dello 0,1% v/v per degradare le proteine presenti in soluzione, comprese le RNasi; le soluzioni sono quindi state agitate vigorosamente per 12 ore ed autoclavate a 120°C per 20 minuti per inattivare il DEPC rimanente. I tapponi contenenti Tris, non potendo essere addizionati di DEPC, sono stati preparati in vetreria sterilizzata secondo la procedura sopra descritta ed utilizzando acqua bidistillata precedentemente trattata con DEPC.

Il materiale plastico, se non garantito dal produttore con la dicitura "RNase-free", è stato immerso per 30-60 minuti in acqua distillata addizionata di DEPC, quindi asciugato all'aria ed autoclavato a 120°C per 20 minuti.

### 3.6.2 Protocollo d'estrazione

La composizione delle soluzioni utilizzate è riportata nella tabella 3.13.

I campioni sono stati macinati in azoto liquido direttamente nei tubi eppendorf da 2 ml, grazie ad appositi pestelli in PTFE. Al campione così polverizzato è stato aggiunto 1 ml di buffer d'estrazione preriscaldato e si è posto in incubazione a 65°C per 15 minuti con occasionali vigorose agitazioni. Si è quindi aggiunto 1 ml di cloroformio:alcool isoamilico 24:1 e, dopo una vigorosa agitazione, il campione è stato centrifugato a 10000 rcf per 10 minuti a 4°C; il sopranatante è stato delicatamente trasferito in un tubo pulito e si è ripetuto il lavaggio con cloroformio:alcool isoamilico 24:1 seguito da centrifugazione. Al sopranatante è quindi stato aggiunto 1/3 vol di LiCl 8 M per la precipitazione selettiva dell'RNA e si è lasciato in incubazione in ghiaccio overnight.

Il campione è stato centrifugato alla massima velocità per 35 minuti a 4°C ed il sopranatante è stato eliminato; il pellet è stato risospeso delicatamente in 1 ml di soluzione SSTE. È stato effettuato un ulteriore lavaggio con cloroformio:alcool isoamilico 24:1 seguito da vigorosa agitazione e centrifugazione a 15000 rcf per 10

Buffer d'estrazione	
CTAB	2 %
PVP	2 %
EDTA	0,5 M
NaCl	5,8 %
Spermidina	0,05 %
TrisHCl	5 %
$\beta$ -mercaptoetanolo	0,2 %

SSTE	
NaCl	1 M
SDS	0,5 %
TrisHCl	10 mM
EDTA	1 mM

**Tabella 3.13:** soluzioni per l'estrazione di RNA.

minuti a 4°C. Il sopranatante è stato trasferito in un tubo pulito e si è aggiunto 1 ml di etanolo 100% freddo (-20°C) per la precipitazione dell'acido nucleico. Dopo un'incubazione a -80°C per 30 minuti, il campione è stato centrifugato alla massima velocità per 35 minuti a 4°C. Il pellet è stato asciugato rapidamente all'aria, risospeso in 30  $\mu$ l di acqua bidistillata sterile trattata con DEPC e conservato a -80°C.

### 3.6.3 Trattamento con DNasi

Anche se il protocollo d'estrazione si è dimostrato piuttosto efficace nella rimozione del DNA genomico, si è comunque deciso di trattare i campioni con l'enzima DNasi per evitare contaminazioni anche minime, che avrebbero potuto inficiare l'analisi cDNA-AFLP. Il trattamento è stato eseguito con Turbo DNase della ditta Ambion.

Al campione di RNA del volume di 30  $\mu$ l sono stati aggiunti 3  $\mu$ l di buffer 10X e 1  $\mu$ l di DNasi; dopo aver accuratamente risospeso, il campione è stato posto in incubazione a 37°C per 20-30 minuti. Si sono quindi aggiunti 3  $\mu$ l di DNase Inactivator Reagent e si è lasciato in incubazione a temperatura ambiente per 2 minuti. Il campione è stato centrifugato a 10000 rcf per 1 minuto e il sopranatante è stato trasferito in un nuovo tubo.

### 3.6.4 Quantificazione

La concentrazione e la purezza dell'RNA estratto sono state misurate con lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 UV-Vis; i rapporti di assorbanza 260/230 e 260/280 superiori a 2 indicano un'ottima purezza del campione da contaminanti di natura proteica, zuccherina o fenolica.

L'integrità è invece stata valutata caricando 1  $\mu\text{g}$  di RNA su gel di agarosio 1% e verificando, dopo la corsa elettroforetica a 100 Volt per 60 minuti, che le bande caratteristiche degli RNA ribosomiali risultassero ben visibili e nitide.

## 3.7 Retrotrascrizione

La retrotrascrizione dell'RNA estratto da stili in cDNA a singolo o doppio filamento è stata condotta utilizzando l'enzima SuperScript II Reverse Transcriptase ed il kit SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis della ditta Invitrogen.

### 3.7.1 Sintesi del primo filamento di cDNA

Per la retrotrascrizione 2  $\mu\text{g}$  di RNA totale sono stati trasferiti in un tubo da 200  $\mu\text{l}$ ; è stato aggiunto 1  $\mu\text{l}$  di primer oligo-dT(12-18) 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e si è portato a volume di 12  $\mu\text{l}$  con acqua bidistillata trattata con DEPC. Il campione è stato incubato a 70°C per 10 minuti e poi trasferito rapidamente in ghiaccio. Si sono quindi aggiunti 5  $\mu\text{l}$  di buffer di reazione 5X, 2  $\mu\text{l}$  di DTT 0,1 M e 1  $\mu\text{l}$  di soluzione di dNTPs (10 mM ognuno); la miscela è stata risospesa accuratamente ed incubata a 45°C per 2 minuti. Per ultimo è stato aggiunto l'enzima SuperScript II RT; dopo aver risospeso delicatamente, la reazione è stata incubata per 60 minuti a 45°C. A reazione terminata il campione è stato trasferito in ghiaccio.

Il prodotto così ottenuto è stato utilizzato come template per le reazioni di PCR, diluito 10 volte in acqua bidistillata trattata con DEPC, oppure per la sintesi del secondo filamento, necessaria per la cDNA-AFLP.

### 3.7.2 Sintesi del secondo filamento di cDNA

Al prodotto della reazione di sintesi del primo filamento sono stati direttamente aggiunti i componenti necessari per la sintesi del secondo, riportati nella tabella 3.15; dopo un'accurata risospensione il campione è stato incubato a 16°C per 120 minuti.

**Sintesi First-Strand**

RNA totale	2 $\mu\text{g}$
Oligo-dT(12-18) 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{l}$
Acqua DEPC	a vol. 12 $\mu\text{l}$
5X First-Strand Buffer	4 $\mu\text{l}$
DTT 0,1 M	2 $\mu\text{l}$
dNTPs (10 mM ognuno)	1 $\mu\text{l}$
SuperScript II RT 200 U/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
Volume finale	20 $\mu\text{l}$

**Tabella 3.14:** miscela di reazione per la retrotrascrizione del primo filamento di cDNA.

**Sintesi Second-Strand**

cDNA First-Strand	20 $\mu\text{g}$
Acqua DEPC	91 $\mu\text{l}$
5X Second-Strand Buffer	30 $\mu\text{l}$
dNTPs (10 mM ognuno)	3 $\mu\text{l}$
DNA ligasi 10 U/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
DNA polimerasi I 10 U/ $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$
RNasi H 2 U/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
Volume finale	150 $\mu\text{l}$

**Tabella 3.15:** miscela di reazione per la retrotrascrizione del secondo filamento di cDNA.

Al termine della reazione sono stati aggiunti 2  $\mu\text{l}$  di T4 DNA polimerasi 5 U/ $\mu\text{l}$  e si è lasciato il campione in incubazione a 16°C per ulteriori 5 minuti. Il tubo è stato quindi trasferito in ghiaccio e si sono aggiunti 10  $\mu\text{l}$  di EDTA 0,5 M.

Il campione è stato trasferito in un tubo eppendorf da 1,5 ml; sono stati aggiunti 160  $\mu\text{l}$  di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico 25:24:1 e, dopo una vigorosa agitazione, il campione è stato centrifugato a 14000 rcf per 5 minuti. Il soprannatante è stato trasferito in un tubo pulito, al quale sono stati aggiunti 0,5 volumi di ammonio acetato 7,5 M e 500  $\mu\text{l}$  di etanolo 100% freddo (-20°C) per la precipitazione dei frammenti di DNA. Il campione è stato centrifugato alla massima velocità per 20 minuti; il pellet è stato lavato con 500  $\mu\text{l}$  di etanolo 70% freddo, velocemente seccato all'aria ed infine risospeso in 30  $\mu\text{l}$  di acqua bidistillata sterile.

### 3.8 cDNA-AFLP

La tecnica della cDNA-AFLP prevede le stesse fasi della normale AFLP descritta da Vos *et al.* 1995 [138]: restrizione, ligazione ad adattatori, preamplificazione ed amplificazione; il materiale di partenza è però costituito da cDNA a doppio filamento (dscDNA).

#### 3.8.1 Formazione dei campioni di cDNA

Gli stili sono stati campionati immediatamente dopo l'impollinazione (T=0) ed a quattro tempi successivi: 4, 8, 24 e 48 ore; per ridurre il numero di tesi da confrontare nella cDNA-AFLP per ogni incrocio, si è deciso di creare un pool relativo a tutti i tempi successivi all'impollinazione, mantenendo invece il T=0 singolo come controllo. A tale scopo sono stati uniti 2  $\mu\text{g}$  di RNA da ognuna delle quattro tesi e la retrotrascrizione è stata condotta su un totale di 8  $\mu\text{g}$  di RNA.

#### 3.8.2 Restrizione

Dopo la sintesi del cDNA a doppio filamento, il prodotto è stato quantificato utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop. Per la reazione di restrizione si sono quindi prelevati 500 ng di dscDNA per ogni campione; la reazione è stata condotta utilizzando un enzima di tipo 4-cutter, *MseI*, ed un 6-cutter, *EcoRI* (vedi tab. 3.8). La miscela di reazione, riportata nella tabella 3.16, è stata incubata 120 minuti a 37°C.

Restrizione	
dscDNA	500 ng
Buffer 5X RL	8 $\mu\text{l}$
<i>EcoRI</i> 10 U/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
<i>MseI</i> 10 U/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
Acqua bidistillata sterile	a vol. 40 $\mu\text{l}$

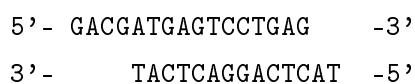
Buffer 5X RL	
Buffer One-Phor-All 10X	500 $\mu\text{l}$
BSA 20 mg/ml	12,5 $\mu\text{l}$
DTT 1M	25 $\mu\text{l}$
Acqua bidistillata sterile	a vol. 1 ml

**Tabella 3.16:** miscela di reazione per la digestione enzimatica del dscDNA e composizione del buffer RL, utilizzato sia per la restrizione che per la ligasi.

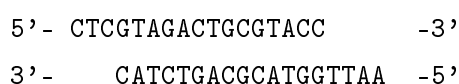
### 3.8.3 Ligasi

I frammenti di dscDNA digeriti sono stati legati ad oligonucleotidi adattatori specifici, dotati di estremità complementari a quelle lasciate dagli enzimi *MseI* e *EcoRI*.

Struttura *MseI*-Adapter:



Struttura *EcoRI*-Adapter:



La reazione di ligazione è stata preparata secondo la ricetta riportata nella tabella 3.17 ed incubata a 37°C per 3 ore.

Ligazione	
Prodotto della restrizione	40 $\mu$ l
Buffer 5X RL	2 $\mu$ l
<i>MseI</i> -Adapter 5 pmol/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
<i>EcoRI</i> -Adapter 5 pmol/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
ATP 10 mM	1 $\mu$ l
T4 DNA ligasi 5 U/ $\mu$ l	0,2 $\mu$ l
Acqua bidistillata sterile	4,8 $\mu$ l
Volume finale	50 $\mu$ l

**Tabella 3.17:** miscela di reazione per la ligazione dei frammenti di dscDNA agli adattatori.

### 3.8.4 Preamplificazione

La preamplificazione è stata condotta utilizzando come template il prodotto della reazione di ligazione diluito 1:10 in acqua bidistillata sterile. Sono stati utilizzati due primer realizzati sulla sequenza dell'adattatore e del sito di restrizione di ognuno dei due enzimi, con in più una base di specificità all'estremità 3':

Primer Eco-A: 5'- GACTGCGTACCAATTCA -3'

Primer Mse-C: 5'- GATGAGTCCTGAGTAAC -3'



Nelle tabelle 3.18 e 3.19 sono riportati rispettivamente la miscela di reazione ed il programma d'amplificazione usati.

Miscela di reazione	
Acqua bidistillata sterile	9,48 $\mu$ l
Buffer di reazione 10X	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1 $\mu$ l
dNTPs (10 mM ognuno)	0,4 $\mu$ l
Primer Eco-A 30 ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Primer Mse-C 30 ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
<i>Taq</i> -DNA polimerasi 5U/ $\mu$ l	0,12 $\mu$ l
Template	5 $\mu$ l
Volume finale	20 $\mu$ l

**Tabella 3.18:** miscela di reazione per la preamplificazione della cDNA-AFLP.

Programma preamplificazione			
Fase	Temp.	Durata	N. cicli
Denaturazione	94°C	30"	
Annealing	56°C	30"	32
Estensione	72°C	1'	

**Tabella 3.19:** profilo termico della reazione di preamplificazione della cDNA-AFLP

### 3.8.5 Amplificazione

L'amplificazione è stata condotta utilizzando come template il prodotto della preamplificazione diluito 1:250 in acqua bidistillata sterile, secondo la miscela di reazione descritta nella tabella 3.20. I primer utilizzati, riportati nella tabella 3.21, corrispondono a quelli utilizzati in preamplificazione con in più due ulteriori basi di specificità [139]; in totale sono state testate 96 diverse combinazioni di primer Eco e Mse, come riportato nella tabella 3.22.

Il prodotto è stato separato tramite corsa elettroforetica su gel di poliaccrilamide per 2 ore a 65 Watt.

Miscela di reazione	
Acqua bidistillata sterile	12,48 $\mu$ l
Buffer di reazione 10X	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1 $\mu$ l
dNTPs (10 mM ognuno)	0,4 $\mu$ l
Primer Eco-N 30 ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
Primer Mse-N 30 ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
<i>Taq</i> -DNA polimerasi 5U/ $\mu$ l	0,12 $\mu$ l
Template	2 $\mu$ l
Volume finale	20 $\mu$ l

**Tabella 3.20:** miscela di reazione per l'amplificazione della cDNA-AFLP.

### 3.8.6 Clonaggio dei TDF (Transcript-Derived Fragment)

Le bande polimorfiche che presentavano un pattern di presenza/assenza o di intensità chiaramente correlabile al grado di compatibilità dell'incrocio sono state clonate e sequenziate.

Si è proceduto incidendo delicatamente con un bisturi il contorno della banda sul gel essiccato; sulla banda sono poi stati aggiunti 15-20  $\mu$ l di acqua bidistillata sterile per consentire la reidratazione della matrice. La banda è quindi stata staccata dalla lastra di vetro con l'aiuto di una spatolina e trasferita in un tubo eppendorf pulito. Si sono aggiunti 30  $\mu$ l di acqua e si è incubato a 65°C per 5 minuti; infine il campione è stato centrifugato a 13000 rpm per 1 minuto e 2  $\mu$ l del sopranatante sono stati utilizzati come template in PCR utilizzando gli stessi primer Eco e Mse già utilizzati in fase di amplificazione. Il prodotto è stato visualizzato tramite elettroforesi su gel d'agarosio 1,5% e clonato come descritto nel par. 3.4.4.

---

**Primer Eco**

---

**E31** : GACTGCGTACCAATTC AAA  
**E32** : GACTGCGTACCAATTC AAC  
**E33** : GACTGCGTACCAATTC AAG  
**E34** : GACTGCGTACCAATTC AAT  
**E35** : GACTGCGTACCAATTC ACA  
**E36** : GACTGCGTACCAATTC ACC  
**E37** : GACTGCGTACCAATTC ACG  
**E38** : GACTGCGTACCAATTC ACT  
**E39** : GACTGCGTACCAATTC AGA  
**E40** : GACTGCGTACCAATTC AGC  
**E43** : GACTGCGTACCAATTC ATA  
**E44** : GACTGCGTACCAATTC ATC

---

**Primer Mse**

---

**M47**: GATGAGTCCTGAGTAA CAA  
**M48**: GATGAGTCCTGAGTAA CAC  
**M49**: GATGAGTCCTGAGTAA CAG  
**M50**: GATGAGTCCTGAGTAA CAT  
**M51**: GATGAGTCCTGAGTAA CCA  
**M52**: GATGAGTCCTGAGTAA CCC  
**M53**: GATGAGTCCTGAGTAA CCG  
**M54**: GATGAGTCCTGAGTAA CCT  
**M55**: GATGAGTCCTGAGTAA CGA  
**M56**: GATGAGTCCTGAGTAA CGC  
**M57**: GATGAGTCCTGAGTAA CGG  
**M58**: GATGAGTCCTGAGTAA CGT  
**M59**: GATGAGTCCTGAGTAA CTA  
**M60**: GATGAGTCCTGAGTAA CTC  
**M61**: GATGAGTCCTGAGTAA CTG  
**M62**: GATGAGTCCTGAGTAA CTT

---

**Tabella 3.21:** sequenze dei primer utilizzati nelle amplificazioni della cDNA-AFLP.

	E31	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E43	E44
M47		×		×		×		×		×		×
M48		×		×		×		×		×		×
M49		×		×		×		×		×		×
M50		×		×		×		×		×		×
M51	×		×		×		×		×		×	
M52	×		×		×		×		×		×	
M53	×		×		×		×		×		×	
M54	×		×		×		×		×		×	
M55		×		×		×		×		×		×
M56		×		×		×		×		×		×
M57		×		×		×		×		×		×
M58		×		×		×		×		×		×
M59	×		×		×		×		×		×	
M60	×		×		×		×		×		×	
M61	×		×		×		×		×		×	
M62	×		×		×		×		×		×	

**Tabella 3.22:** combinazioni di primer Eco/Mse testate.

### 3.9 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Per il clonaggio del gene full-length della TGasi è stato tentato un approccio tramite RACE, impiegando il kit “GeneRacer” della ditta Invitrogen. È stato utilizzato RNA estratto da stili impollinati nelle combinazioni autoincompatibili ‘Abate Fétel’ × ‘Abate Fétel’ e ‘William’ × ‘William’. Il kit utilizzato impiega un metodo mediato da RNA ligasi (RLM-RACE, *RNA Ligase Mediated RACE*); si è quindi proceduto secondo le indicazioni fornite dal produttore alle fasi di defosforilazione dell’RNA, eliminazione del “cap” di 7-metil-guanosina al 5’, ligazione dell’oligonucleotide di RNA e retrotrascrizione.

L’amplificazione è stata condotta utilizzando i primer forniti nel kit insieme a primer gene-specifici realizzati secondo le indicazioni, le cui sequenze sono riassunte nella tabella 3.23.

<b>TGase5'race</b>	TCTAGCCAATTCCTCGTCCGATTTCA
<b>TGase5'nested</b>	GATTTGAGCAATTCGTCGTTCTGAG
<b>TGase3'race</b>	TTTGCTTGCCTCTTTTGAAGCTAAAC
<b>TGase3'nested</b>	GCATTTGATGGGATACGCATGTCTAA

**Tabella 3.23:** sequenze dei primer utilizzati nella RACE.

### 3.10 Strumenti bioinformatici

Durante le fasi di pianificazione del lavoro e di analisi dei risultati sono stati impiegati i seguenti software bioinformatici:

- **FinchTV 1.3.1** (Geospiza Inc., <http://www.geospiza.com/>) per la visualizzazione e la manipolazione dei cromatogrammi risultanti dal sequenziamento;
- **Clustal X 2.0.3** [140] per l'allineamento globale fra sequenze multiple, nucleotidiche o aminoacidiche;
- **Lalign** ([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)) per l'allineamento locale a coppie;
- **Blast** [141] e **Fasta** [142] per l'allineamento e la ricerca di sequenze omologhe in database;
- **MEGA 4** [143] per l'analisi delle distanze e la costruzione di alberi filogenetici sulla base dell'allineamento di sequenze;
- **JoinMap 3.0** [144] per il mappaggio dei geni SFBB identificati nella popolazione 'Abate Fétel' × 'Max Red Bartlett';
- **MapChart 2.0** per la rappresentazione grafica dei linkage group ottenuti dall'elaborazione con JoinMap [145]



## Capitolo 4

# Risultati e discussione

### 4.1 Ricerca e caratterizzazione di geni S-locus F-box

#### 4.1.1 Analisi dell'omologia di sequenza: S-RNasi e SFBB

Come descritto nel par. 3.1, sono state scelte varietà appartenenti a specie diverse dotate di aplotipi S le cui RNasi presentassero un'elevata omologia, per poter successivamente valutare se il fenomeno dell'evoluzione trans-specifica si rifletta allo stesso modo sui determinanti femminili e maschili del locus S. Nella tabella 4.1 sono riassunti i genotipi S di tutte le varietà analizzate.

<b>Specie</b>	<b>Varietà</b>	<b>Genotipo S</b>
Pero europeo	'Abate Fétel'	PcS <sub>104</sub> /PcS <sub>105</sub>
	'Max Red Bartlett'	PcS <sub>101</sub> /PcS <sub>102</sub>
	'Conseiller a La Coeur'	PcS <sub>103</sub> /PcS <sub>123</sub>
	'Wilder'	PcS <sub>101</sub> /PcS <sub>111</sub>
	'Packham's Triumph'	PcS <sub>101</sub> /PcS <sub>103</sub>
Melo	'Fuji'	MdS <sub>1</sub> /MdS <sub>9</sub>
	'McIntosh'	MdS <sub>10</sub> /MdS <sub>25</sub>
Pero giapponese	'Kumoi'	PpS <sub>1</sub> /PpS <sub>3</sub>
	'Chojuro'	PpS <sub>2</sub> /PpS <sub>3</sub>

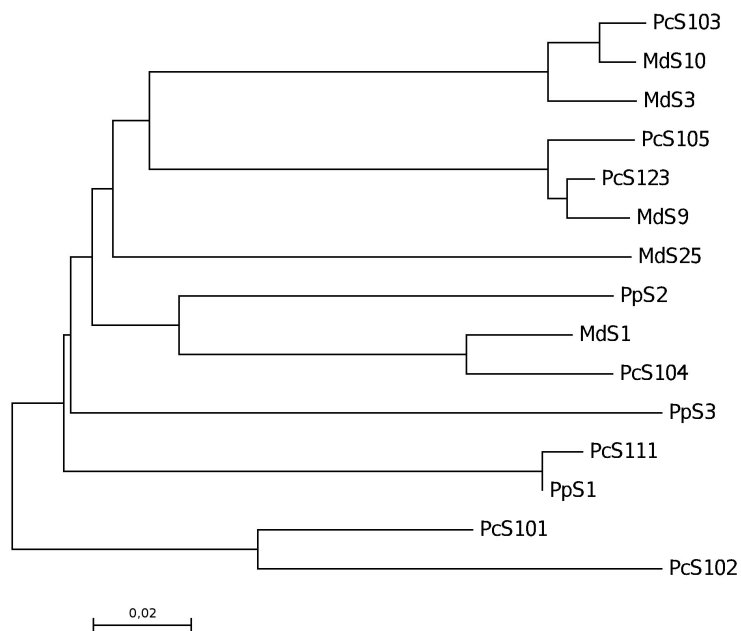
**Tabella 4.1:** riassunto delle varietà analizzate e dei rispettivi genotipi S.

Le sequenze delle S-RNasi possedute dai genotipi utilizzati sono quindi state allineate per verificarne l'omologia; le percentuali di identità calcolate attraverso il programma ClustalX sono riassunte nella tabella 4.2. L'elevato grado di similarità fra le coppie di alleli PcS<sub>103</sub> e MdS<sub>10</sub> (con un'identità di sequenza pari al 98%), PcS<sub>123</sub>

## RISULTATI E DISCUSSIONE

---

e MdS<sub>9</sub> (98%), PcS<sub>111</sub> e PpS<sub>1</sub> (99%), è evidente nell'albero filogenetico derivante da questo allineamento (figura 4.1).



**Figura 4.1:** albero filogenetico ottenuto dal confronto dei dati di sequenza delle S-RNasi dei genotipi analizzati; si noti come, a testimonianza del fenomeno dell'evoluzione trans-specifica, le sequenze appartenenti a specie diverse possano mostrare un grado di omologia molto più alto di quello che si riscontra all'interno della stessa specie.



#### 4.1 Ricerca e caratterizzazione di geni S-locus F-box

	Pc S <sub>101</sub>	Pc S <sub>102</sub>	Pc S <sub>103</sub>	Pc S <sub>104</sub>	Pc S <sub>105</sub>	Pc S <sub>111</sub>	Pc S <sub>123</sub>	Pp S <sub>1</sub>	Pp S <sub>2</sub>	Pp S <sub>3</sub>	Md S <sub>1</sub>	Md S <sub>3</sub>	Md S <sub>9</sub>	Md S <sub>10</sub>	Md S <sub>25</sub>
PcS <sub>101</sub>	100														
PcS <sub>102</sub>	87	100													
PcS <sub>103</sub>	80	78	100												
PcS <sub>104</sub>	81	78	83	100											
PcS <sub>105</sub>	80	77	82	81	100										
PcS <sub>111</sub>	81	78	80	81	82	100									
PcS <sub>123</sub>	81	78	82	82	97	82	100								
PpS <sub>1</sub>	81	79	81	81	82	<b>99</b>	83	100							
PpS <sub>2</sub>	80	78	81	82	80	80	81	81	100						
PpS <sub>3</sub>	79	76	78	78	79	79	79	80	80	100					
MdS <sub>1</sub>	81	77	82	95	81	81	81	82	83	78	100				
MdS <sub>3</sub>	79	78	96	82	82	80	83	81	80	77	82	100			
MdS <sub>9</sub>	81	77	81	81	96	82	<b>98</b>	82	80	79	80	82	100		
MdS <sub>10</sub>	80	78	<b>98</b>	83	82	80	82	81	80	78	82	96	82	100	
MdS <sub>25</sub>	81	78	80	80	81	80	81	80	80	78	81	80	81	81	100

**Tabella 4.2:** percentuali di identità fra le sequenze delle S-RNasi di tutti i genotipi utilizzati; in grassetto sono riportati i valori relativi alle tre coppie di alleli maggiormente simili.

Le sequenze dei geni SFBB di melo e pero giapponese riportate da Sassa *et al.* 2007 [52] e presenti in database, sono state utilizzate per disegnare i primer per l'amplificazione di geni omologhi.

Per le sequenze di pero giapponese, chiaramente suddivisibili nei gruppi  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  altamente conservati, si è deciso di realizzare una coppia di primer per ognuno dei tre gruppi (primer Pp $\alpha$ -for/rev, Pp $\beta$ -for/rev e Pp $\gamma$ -for/rev). A questo scopo sono state ricercate le regioni in prossimità degli estremi 5' e 3' che fossero il più possibile conservate fra le sequenze appartenenti allo stesso gruppo, ed il più possibile divergenti rispetto agli altri gruppi. Per il gruppo  $\beta$ , in particolare, dopo i primi clonaggi che hanno consentito di verificare l'elevata omologia fra le sequenze ottenute e quelle in database, si è deciso di realizzare un secondo primer reverse che consentisse l'amplificazione del gene "full-length" (Pp $\beta$ -FL-rev); questo infatti inizialmente non era stato possibile a causa delle ridotte dimensioni della regione 3' non tradotta della sequenza PpSFBB<sup>5- $\beta$</sup> , che termina a sole 17 basi a valle del codone di stop.

Lo stesso approccio non è stato possibile per le sequenze di melo; in questo caso infatti l'omologia che si riscontra fra sequenze appartenenti allo stesso gruppo,  $\alpha$  o  $\beta$ , è nettamente inferiore rispetto a quella riscontrabile fra sequenze di gruppi diversi appartenenti allo stesso aplotipo, MdS<sub>3</sub> o MdS<sub>9</sub>. Non è stata quindi giudicata conveniente la realizzazione di primer per i due gruppi  $\alpha$  e  $\beta$ , preferendo invece lavorare sulle singole sequenze.

Per l'aplotipo MdS<sub>9</sub> sono stati quindi disegnati due primer forward specifici per le due sequenze MdSFBB<sup>9- $\alpha$</sup>  MdSFBB<sup>9- $\beta$</sup>  (primer Md9 $\alpha$ -for e Md9 $\beta$ -for). La realizzazione di primer reverse specifici si è rivelata più difficoltosa, anche a causa della presenza di regioni ripetute a valle della porzione codificante dei due geni; si è pertanto deciso di realizzare un unico primer reverse in una regione conservata fra le due sequenze (Md9-rev), considerando l'ipotesi, peraltro poi confermata dai successivi dati ottenuti, che le differenze nei primer forward fossero sufficienti a conferire la necessaria specificità.

Per l'aplotipo MdS<sub>3</sub> sono state realizzate due coppie di primer specifiche per ciascuna delle due sequenze MdSFBB<sup>3- $\alpha$</sup>  MdSFBB<sup>3- $\beta$</sup>  (primer Md3 $\alpha$ -for/rev e Md3 $\beta$ -for/rev); tuttavia queste non hanno prodotto amplificati da nessuno dei genotipi analizzati. L'amplificazione di frammenti omologhi è invece stata possibile realizzando due primer su regioni della porzione codificante conservate fra le due sequenze (primer Md3-for/rev).

La tabella 4.3 riporta le sequenze di tutti i primer, mentre la figura B.1 in appendice B mostra l'allineamento fra le sequenze utilizzate nella realizzazione degli stessi.

## 4.1 Ricerca e caratterizzazione di geni S-locus F-box

Tutte le coppie di primer sono state testate sui 9 genotipi oggetto di studio; in totale sono state ottenute 82 sequenze di geni omologhi, suddivise nei 5 gruppi citati nella tabella 4.3, riportate in appendice A.

Primer	Sequenza	Prodotti amplificati
Pp $\alpha$ -for	tcttgtggaatgatactgc	Gruppo Pp $\alpha$
Pp $\alpha$ -rev	atatcatgcatacaaaattaaatggaac	
Pp $\beta$ -for	gtcccaggtgcgtaaaagtg	Gruppo Pp $\beta$
Pp $\beta$ -rev	cacataaataagagcttcsaaatctg	
Pp $\beta$ -FL-rev	ttaaataaggagaaaatggaagtgtg	
Pp $\gamma$ -for	gtgtgaataattcatgtgcatgg	Gruppo Pp $\gamma$
Pp $\gamma$ -rev	ggaacgtttcctcaactcaa	
Md9 $\alpha$ -for	tgtgaattcttgtgaaataacacaac	Gruppo MdS9
Md9 $\beta$ -for	attcctgtggaccaatacagttg	
Md9-rev	ccacaaagcaaaattagaagatgc	
Md3 $\alpha$ -for	gttctatcctgcaaacaaaattattg	<i>nessun prodotto</i>
Md3 $\alpha$ -rev	acttttctcactcaacttgacat	
Md3 $\beta$ -for	taaggtggtcgaaatcctgtg	<i>nessun prodotto</i>
Md3 $\beta$ -rev	acttctcctcaactcaacttgagt	
Md3-for	aaccgttctcaggctcaca	Gruppo MdS3
Md3-rev	cacataaataagamcttcaaaatccac	

**Tabella 4.3:** primer realizzati sui geni SFBB e gruppi di sequenze derivate dall'amplificazione con gli stessi; i gruppi sono stati nominati in base alle sequenze su cui sono stati disegnati.

### 4.1.2 Geni F-box del gruppo Pp $\alpha$

La coppia di primer Pp $\alpha$ -for/rev ha permesso di amplificare frammenti omologhi da tutti i genotipi analizzati, appartenenti alle tre specie. Sono state ottenute in totale 17 sequenze, riassunte nella tabella 4.4, corrispondenti a due alleli diversi per ogni genotipo testato ad eccezione di 'Abate Fétel', per il quale è stato possibile amplificare un solo frammento.

Tutti i frammenti sequenziati presentano un'elevata omologia con le sequenze PpSFBB<sup>4- $\alpha$</sup>  e PpSFBB<sup>5- $\alpha$</sup> , formando con queste un cluster ben delineato; le percentuali di identità a coppie fra sequenze appartenenti a questo cluster sono infatti superiori al 95%.

<b>Genotipo</b>	<b>Sequenze</b>
‘Abate Fétel’	AF Alfa A
‘Max Red Bartlett’	MRB Alfa A, MRB Alfa B
‘Conseiller a La Coeur’	Cons Alfa A, Cons Alfa B
‘Wilder’	Wild Alfa A, Wild Alfa B
‘Packham’s Triumph’	Pack Alfa A, Pack Alfa B
‘Fuji’	Fuji Alfa A, Fuji Alfa B
‘McIntosh’	McInt Alfa A, McInt Alfa B
‘Kumoi’	Kum Alfa A, Kum Alfa B
‘Chojuro’	Cho Alfa A, Cho Alfa B

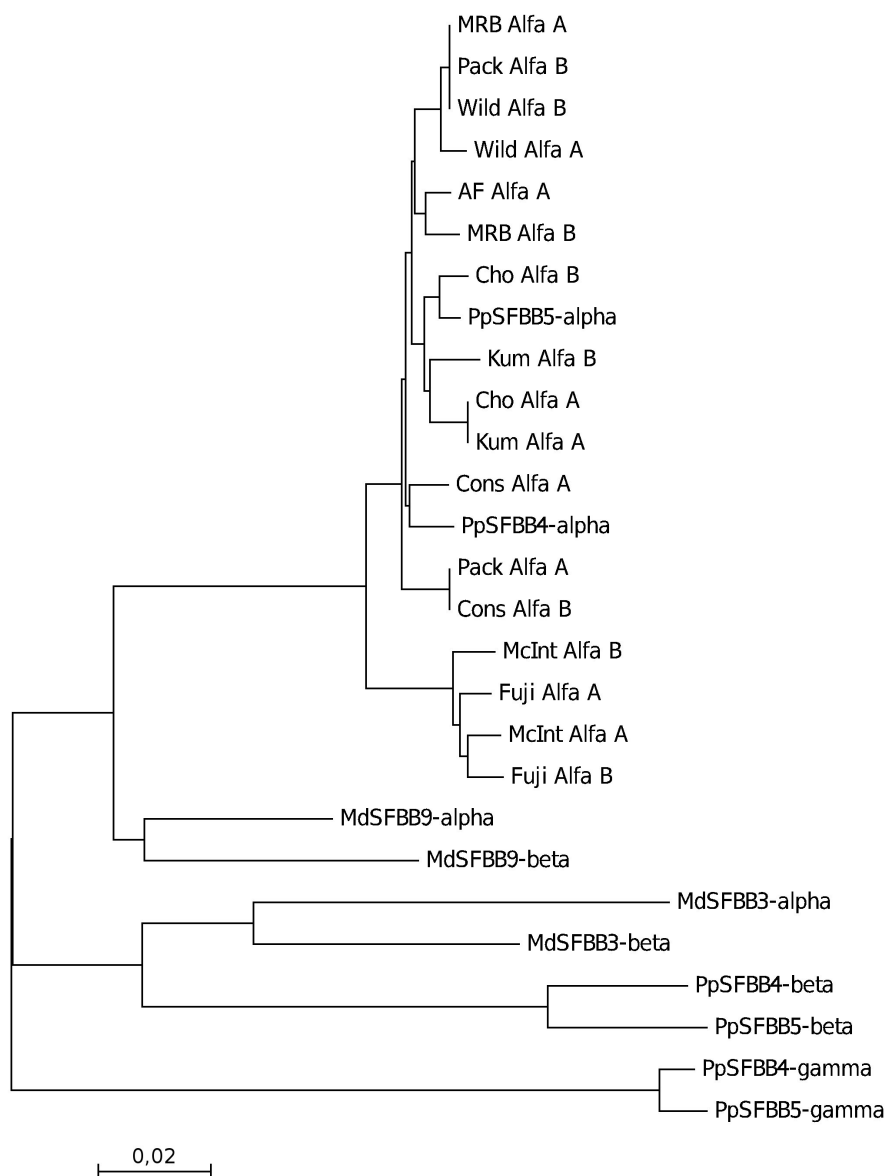
**Tabella 4.4:** sequenze ottenute per i frammenti omologhi ai geni PpSFBB $\alpha$ ; le sequenze sono riportate per esteso nell’appendice A.

Sequenze identiche sono state ottenute da tutti i genotipi che condividono un aplotipo S: in particolare, sono identiche le sequenze MRB Alfa A, Pack Alfa A e Wild Alfa B ottenute dalle varietà ‘Max Red Bartlett’, ‘Packham’s Triumph’ e ‘Wilder’, tutte e tre portatrici dell’aplotipo PcS<sub>101</sub>; le sequenze Cons Alfa B e Pack Alfa A, da ‘Conseiller a La Coeur’ e ‘Packham’s Triumph’, portatrici di PcS<sub>103</sub>; infine le sequenze Kum Alfa A e Cho Alfa A, da ‘Kumoi’ e ‘Chojuro’, portatrici di PpS<sub>3</sub>.

Anche se questo testimonia una probabile forte associazione del gene al locus S, non è tuttavia riscontrabile alcuna analogia nei livelli di similarità fra alleli S, derivanti dal confronto fra le S-RNasi e da quello fra i frammenti del gruppo Pp $\alpha$ . Infatti le tre coppie di genotipi ‘Conseiller a La Coeur’ e ‘Fuji’, ‘Wilder’ e ‘Kumoi’, ‘Packham’s Triumph’ e ‘McIntosh’, dotate di RNasi con sequenze estremamente simili (vedi figura 4.1), non hanno prodotto in questo gruppo sequenze di SFBB con gli stessi livelli di similarità, cosa che invece è plausibile debba presentarsi per i geni del determinante pollinico per il fenomeno dell’evoluzione trans-specifica degli aplotipi S.

Al contrario è individuabile nell’albero riportato in figura 4.2 una suddivisione delle sequenze più in base alla specie che non alla similarità delle RNasi: le quattro sequenze di melo infatti si distinguono abbastanza chiaramente da quelle di pero europeo e giapponese. Questa distribuzione induce ad ipotizzare che il gene in questione, pur essendo associato al locus S, non sia un buon candidato per il ruolo di reale determinante pollinico dell’autoincompatibilità.

## 4.1 Ricerca e caratterizzazione di geni S-locus F-box



**Figura 4.2:** albero ottenuto dal confronto fra le sequenze ottenute per il gruppo  $Pp\alpha$  e quelle degli SFBB di melo e pero giapponese presenti in database. Le sequenze ottenute confermano un'elevata omologia con le  $PpSFBB\alpha$ ; si noti inoltre come le quattro sequenze di melo (McInt Alfa A/B, Fuji Alfa A/B) formino un cluster distinto da quelle di pero europeo e giapponese.

### 4.1.3 Geni F-box del gruppo $Pp\beta$

Anche in questo caso è stata ottenuta l'amplificazione di frammenti omologhi da tutti i genotipi analizzati; sono state ottenute da due a quattro sequenze per ogni

genotipo, per un totale di 25 frammenti, riassunti nella tabella 4.5.

<b>Genotipo</b>	<b>Sequenze</b>
‘Abate Fétel’	AF Beta A FL, AF Beta B FL
‘Max Red Bartlett’	MRB Beta A FL, MRB Beta Z
‘Conseiller a La Coeur’	Cons Beta A FL, Cons Beta B, Cons Beta C FL, Cons Beta D FL
‘Wilder’	Wild Beta A FL, Wild Beta B FL, Wild Beta C
‘Packham’s Triumph’	Pack Beta A FL, Pack Beta B
‘Fuji’	Fuji Beta A FL, Fuji Beta B FL, Fuji Beta Z
‘McIntosh’	McInt Beta A, McInt Beta B FL, McInt Beta C FL, McInt Beta Z
‘Kumoi’	Kum Beta A FL, Kum Beta B FL, Kum Beta Z
‘Chojuro’	Cho Beta A FL, Cho Beta B FL

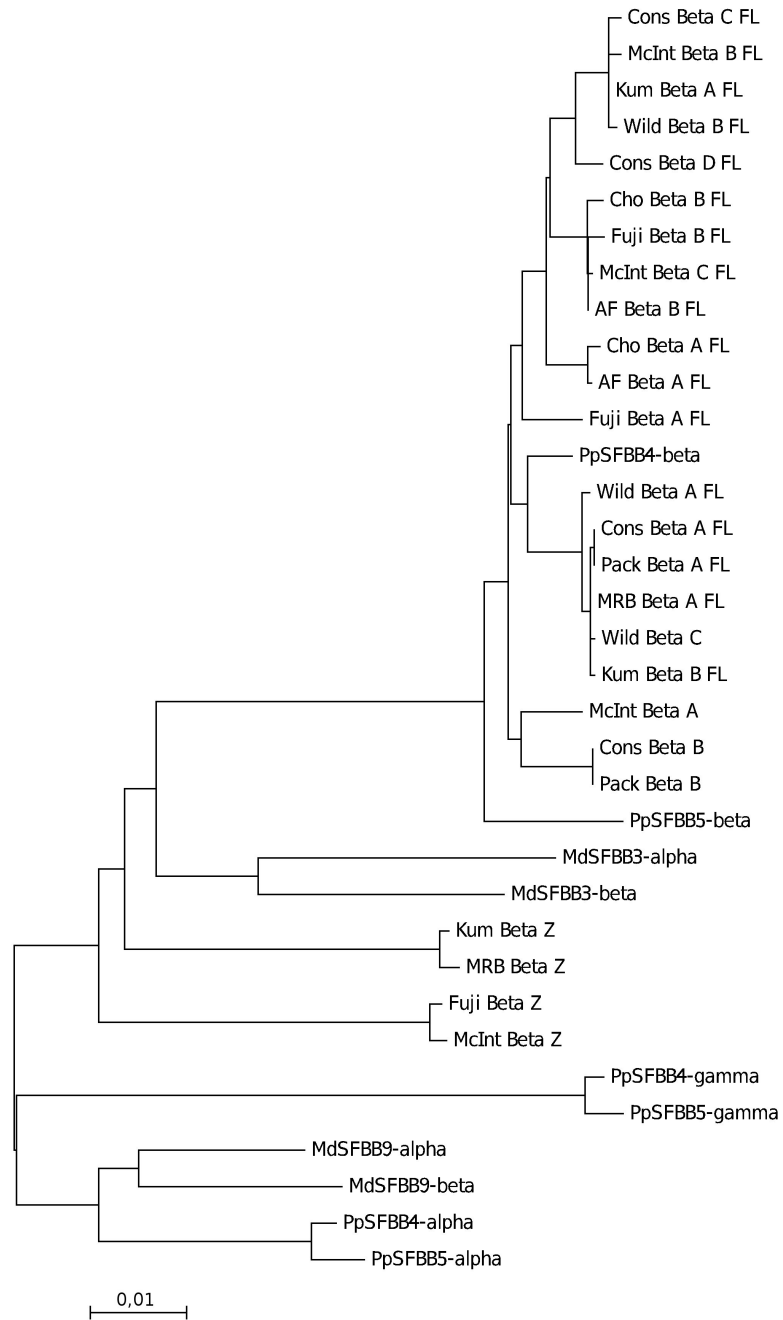
**Tabella 4.5:** sequenze ottenute per i frammenti omologhi ai geni PpSFBB<sup>β</sup>; le sequenze siglate con “FL” sono state amplificate con i primer Ppβ-for/FL-rev, le restanti con Ppβ-for/rev.

In questo caso la situazione si presenta decisamente più complicata rispetto al gruppo Ppα. Quattro delle sequenze ottenute (MRB Beta Z, Kum Beta Z, Fuji Beta Z e McInt Beta Z), appartenenti alle tre specie, hanno una dimensione inferiore di circa 50 bp rispetto alle altre, e presentano un’omologia di sequenza minore con le sequenze PpSFBB<sup>4-β</sup> e PpSFBB<sup>5-β</sup>; si collocano infatti in una posizione separata nell’albero risultante dall’analisi delle sequenze (figura 4.3).

Le restanti 21 sequenze mostrano invece una buona omologia con i geni PpSFBB<sup>β</sup>, con cui formano un cluster chiaramente individuabile, all’interno del quale le percentuali di identità non scendono sotto al 93%. Il numero di sequenze ottenute per genotipo, fino a 4, indica che indubbiamente il gene è andato incontro a duplicazione, per lo meno in alcuni aplotipi; non è detto inoltre che, anche nei genotipi che hanno prodotto solo due sequenze distinte, non siano presenti altre copie che non è stato possibile clonare. Risulta quindi piuttosto difficile stabilire delle chiare corrispondenze alleliche, anche se alcuni genotipi portatori degli stessi aplotipi S hanno prodotto sequenze identiche: è il caso delle sequenze Cons Beta A e Cons Beta B di ‘Conseiller a La Coeur’, identiche rispettivamente a Pack Beta A e Pack Beta B di ‘Packham’s Triumph’, che potrebbero quindi essere entrambe associate all’aplotipo PcS<sub>103</sub>.

Anche la distribuzione delle sequenze nel cluster non si presta ad una facile interpretazione; infatti, diversamente dalle sequenze del gruppo Ppα, non è presente una

#### 4.1 Ricerca e caratterizzazione di geni S-locus F-box



**Figura 4.3:** albero ottenuto dal confronto fra le sequenze ottenute per il gruppo  $Pp\beta$  e quelle degli SFBB di melo e pero giapponese presenti in database. Quattro delle sequenze ottenute, marcate con la lettera Z, sono posizionate fuori dal cluster dei geni  $PpSFBB^{\beta}$ ; le restanti formano un gruppo caratterizzato da una struttura piuttosto complessa, sicuramente dovuta anche alla presenza di più copie del gene.

distinzione netta fra frammenti di specie diverse, come è atteso che debba essere per i geni interni al locus S; tuttavia non è neanche riscontrabile alcuna corrispondenza tra sequenze di aplotipi S con RNasi altamente conservate.

#### 4.1.4 Geni F-box del gruppo Pp $\gamma$

Anche la coppia di primer Pp $\gamma$ -for/rev ha permesso di amplificare frammenti omologhi da tutti i genotipi analizzati; sono state ottenute 17 sequenze, riportate nella tabella 4.4, corrispondenti a due alleli diversi per ogni varietà ad eccezione di ‘Fuji’, per la quale è stato amplificato un solo frammento.

<b>Genotipo</b>	<b>Sequenze</b>
‘Abate Fétel’	AF Gamma A, AF Gamma B
‘Max Red Bartlett’	MRB Gamma A, MRB Gamma B
‘Conseiller a La Coeur’	Cons Gamma A, Cons Gamma B
‘Wilder’	Wild Gamma A, Wild Gamma B
‘Packham’s Triumph’	Pack Gamma A, Pack Gamma B
‘Fuji’	Fuji Gamma A
‘McIntosh’	McInt Gamma A, McInt Gamma B
‘Kumoi’	Kum Gamma A, Kum Gamma B
‘Chojuro’	Cho Gamma A, Cho Gamma B

**Tabella 4.6:** sequenze ottenute per i frammenti omologhi ai geni PpSFBB $\gamma$ .

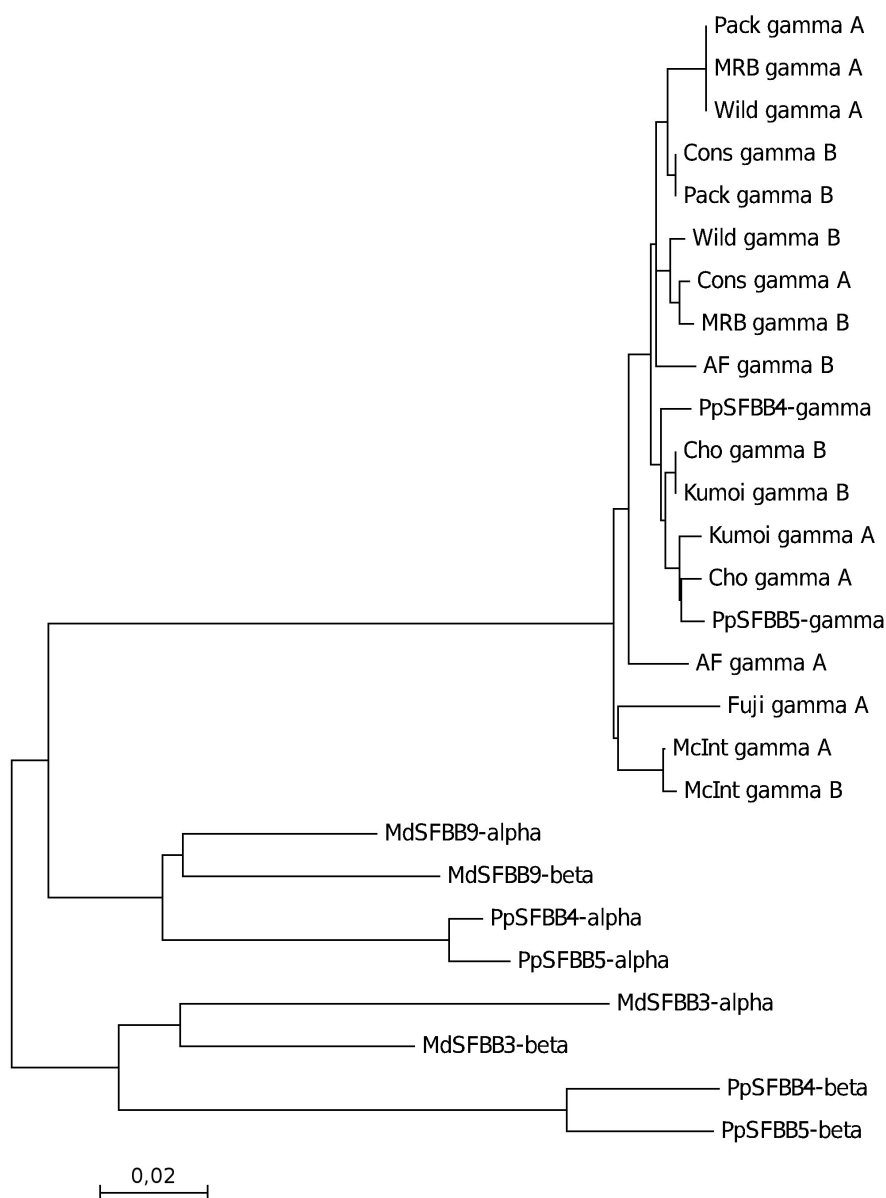
Le sequenze ottenute formano un cluster chiarissimamente delineato insieme alle sequenze PpSFBB $\gamma$ , con le quali mostrano un’alta omologia; le percentuali di identità a coppie fra sequenze interne a questo cluster sono in tutti i casi superiori al 95%.

Come per il gruppo Pp $\alpha$ , anche in questo caso le corrispondenze alleliche sono evidenti: sono infatti identiche le sequenze MRB Gamma A, Pack Gamma A e Wild Gamma B, ottenute dalle varietà ‘Max Red Bartlett’, ‘Packham’s Triumph’ e ‘Wilder’, associabili quindi all’aplotipo PcS<sub>101</sub>; le sequenze Cons Gamma B e Pack Gamma B, da ‘Conseiller a La Coeur’ e ‘Packham’s Triumph’, associabili a PcS<sub>103</sub>; infine le sequenze Kum Gamma B e Cho Gamma B, da ‘Kumoi’ e ‘Chojuro’, associabili a PpS<sub>3</sub>.

Neanche in questo gruppo si riscontra una corrispondenza fra i livelli di omologia delle RNasi e i frammenti genici ottenuti; è invece individuabile nell’albero riportato in figura 4.4 una suddivisione legata alla divergenza delle specie, con le tre sequenze



#### 4.1 Ricerca e caratterizzazione di geni S-locus F-box



**Figura 4.4:** albero ottenuto dal confronto fra le sequenze ottenute per il gruppo Pp $\gamma$  e quelle degli SFBB di melo e pero giapponese presenti in database. Le sequenze ottenute confermano un'elevata omologia con le PpSFBB $\gamma$ ; anche in questo caso le sequenze di melo (McInt Gamma A/B, Fuji Gamma A) si collocano in posizione distinta rispetto alle sequenze di pero europeo e giapponese.

di melo posizionate a formare un cluster interno distinto da quelle di pero europeo e giapponese.

#### 4.1.5 Geni F-box del gruppo MdS9

La coppia di primer Md9 $\alpha$ -for/Md9-rev ha prodotto un amplificato da due sole varietà: ‘Fuji’ e ‘Conseiller a La Coeur’, mentre la coppia Md9 $\beta$ -for/Md9-rev ha amplificato da 8 genotipi. Si è deciso di non sequenziare i frammenti amplificati da ‘Fuji’, in quanto la varietà è portatrice dell’aplotipo MdS<sub>9</sub>, al quale appartengono appunto le sequenze MdSFBB<sup>9- $\alpha$</sup>  e MdSFBB<sup>9- $\beta$</sup>  sulle quali sono stati realizzati questi primer. In totale sono quindi stati sequenziati 10 frammenti (tabella 4.7).

<b>Genotipo</b>	<b>Sequenze S9<math>\alpha</math></b>
‘Fuji’	MdSFBB <sup>9-<math>\alpha</math></sup>
‘Conseiller a La Coeur’	Cons S9Alfa

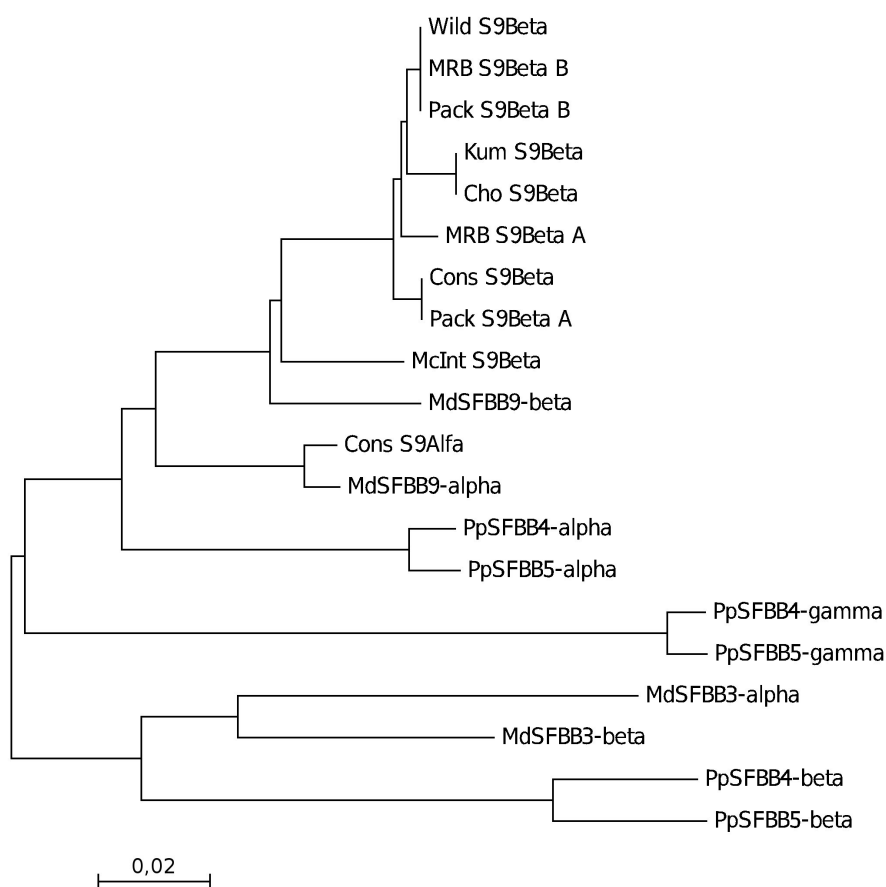
<b>Genotipo</b>	<b>Sequenze S9<math>\beta</math></b>
‘Fuji’	MdSFBB <sup>9-<math>\beta</math></sup>
‘Max Red Bartlett’	MRB S9Beta A, MRB S9Beta B
‘Conseiller a La Coeur’	Cons S9Beta
‘Wilder’	Wild S9Beta
‘Packham’s Triumph’	Pack S9Beta A, Pack S9Beta B
‘McIntosh’	McInt S9Beta
‘Kumoi’	Kum S9Beta
‘Chojuro’	Cho S9Beta

**Tabella 4.7:** sequenze ottenute per i frammenti omologhi ai geni MdSFBB<sup>9</sup>.

L’unico frammento omologo al gene MdSFBB<sup>9- $\alpha$</sup>  è stato individuato nella varietà di pero europeo ‘Conseiller a La Coeur’: ciò appare estremamente significativo in considerazione dell’omologia fra le RNasi degli aplotipi MdS<sub>9</sub> e PcS<sub>123</sub>. Inoltre la percentuale di identità fra la sequenza Cons S9Alfa e MdSFBB<sup>9- $\alpha$</sup>  è del 98%, lo stesso valore che si riscontra fra le sequenze codificanti delle due RNasi. Ciò supporta fortemente l’ipotesi che i due aplotipi MdS<sub>9</sub> e PcS<sub>123</sub> si siano originati da uno stesso aplotipo ancestrale, risalente al periodo evolutivo precedente alla divergenza delle specie melo e pero, mantenuto poi pressochè inalterato nel corso della storia evolutiva delle due specie per il fenomeno dell’evoluzione trans-specifica.

Frammenti omologhi a MdSFBB<sup>9- $\beta$</sup>  sono invece stati ottenuti da più genotipi; queste sequenze formano un cluster al cui interno le percentuali di identità non scendono sotto al 93%. Curiosamente, la sequenza Cons S9Beta ottenuta da ‘Conseiller a La Coeur’ non presenta un’alto grado di omologia con MdSFBB<sup>9- $\beta$</sup> , diversamente da

#### 4.1 Ricerca e caratterizzazione di geni S-locus F-box



**Figura 4.5:** albero ottenuto dal confronto fra le sequenze ottenute per il gruppo MdS9 e quelle degli SFBB di melo e pero giapponese presenti in database. Si noti come il gene MdSFBB<sup>9-α</sup> abbia un omologo solo nella varietà di pero ‘Conseiller a La Coeur’, portatrice dell’allele PcS<sub>123</sub> la cui RNasi è estremamente conservata rispetto alla RNasi dell’aplotipo MdS<sub>9</sub>.

quanto osservato con Cons S9Alfa e MdSFBB<sup>9-α</sup>; è invece perfettamente identica alla sequenza Pack S9Beta A, essendo quindi più verosimilmente associata all’aplotipo PcS<sub>103</sub>. È tuttavia ragionevole ipotizzare che anche l’aplotipo PcS<sub>123</sub> contenga un gene omologo a MdSFBB<sup>9-β</sup>; questo in fase di amplificazione potrebbe essere risultato sfavorito rispetto al frammento associato a PcS<sub>103</sub>, non potendo quindi essere clonato.

Altre associazioni alleliche facilmente individuabili sono quelle delle tre sequenze identiche MRB S9Beta B, Pack S9Beta A e Wild S9Beta all’aplotipo PcS<sub>101</sub>, e delle due sequenze Kum S9Beta e Cho S9Beta all’aplotipo PpS<sub>3</sub>.

La maggiore divergenza fra le sequenze di questo gruppo rispetto ai gruppi pre-

cedentemente analizzati, pur non raggiungendo il livello di divergenza riscontrabile fra le S-RNasi, induce ad ipotizzare una più stretta associazione di questi frammenti al locus S, o addirittura l'appartenenza allo stesso, come peraltro dimostrato per il gene MdsFBB<sup>9-β</sup>. Tuttavia non è possibile trarre conclusioni certe in questo senso: infatti il ridottissimo tasso di ricombinazione che caratterizza il locus S rende ogni aplotipo virtualmente isolato dagli altri; quindi, anche se MdsFBB<sup>9-β</sup> è situato a soli 93 kb di distanza dalla MdS<sub>9</sub>-RNasi [52], non è assolutamente scontato che anche i frammenti omologhi individuati occupino la stessa posizione nei rispettivi aplotipi S.

#### 4.1.6 Geni F-box del gruppo MdS3

La coppia di primer Md3-for/rev ha consentito di clonare e sequenziare un totale di 13 frammenti da 8 genotipi, riassunti nella tabella 4.8.

<b>Genotipo</b>	<b>Sequenze</b>
'Abate Fétel'	AF S3 A
'Max Red Bartlett'	MRB S3 A, MRB S3 B
'Conseiller a La Coeur'	Cons S3 A, Cons S3 B
'Wilder'	Wild S3 A
'Packham's Triumph'	Pack S3 A, Pack S3 B
'Fuji'	Fuji S3 A
'McIntosh'	McInt S3 A, McInt S3 B
'Chojuro'	Cho S3 A, Cho S3 B

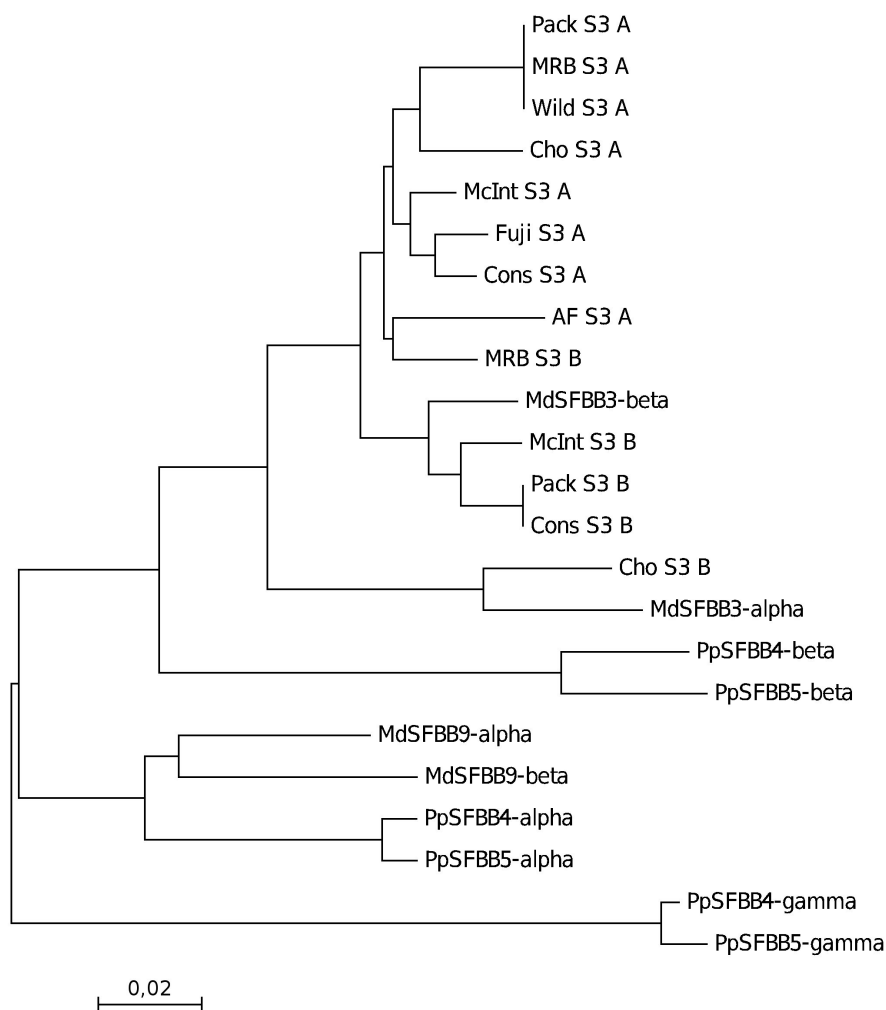
**Tabella 4.8:** sequenze ottenute per i frammenti omologhi ai geni MdsFBB<sup>3</sup>.

Le sequenze ottenute presentano un'omologia maggiore con MdsFBB<sup>3-β</sup> rispetto a MdsFBB<sup>3-α</sup>, con l'unica eccezione di Cho S3 B di 'Chojuro' che presenta con quest'ultima un'identità di sequenza pari al 94%. Il cluster comprendente le altre 12 sequenze e MdsFBB<sup>3-β</sup> presenta percentuali di identità a coppie non inferiori al 93%.

Anche in questo cluster sequenze identiche sono state ottenute da genotipi che condividono un aplotipo S: le sequenze MRB S3 A, Pack S3 A e Wild S3 A, provenienti da 'Max Red Bartlett', 'Packham's Triumph' e 'Wilder' ed identiche fra loro, possono essere associate all'aplotipo PcS<sub>101</sub>; analogamente le sequenze Pack S3 B e Cons S3 B, da 'Packham's Triumph' e 'Conseiller a La Coeur', sono state associate all'aplotipo PcS<sub>103</sub>.

La distribuzione delle sequenze nel cluster non riflette differenze legate alla divergenza delle specie, come invece osservato per i gruppi Ppα e Ppγ; sono invece

#### 4.1 Ricerca e caratterizzazione di geni S-locus F-box



**Figura 4.6:** albero ottenuto dal confronto fra le sequenze ottenute per il gruppo MdS3 e quelle degli SFBB di melo e pero giapponese presenti in database.

rilevabili omologie maggiori fra coppie di sequenze di specie diverse, piuttosto che fra sequenze della stessa specie, esattamente come avviene per le S-RNasi. È inoltre interessante notare come i maggiori livelli di similarità si riscontrino fra sequenze dotate di RNasi altamente conservate: è il caso di Fuji S3 A e Cons S3 A delle varietà ‘Fuji’ e ‘Conseiller a La Coeur’, identiche al 98% esattamente come le RNasi MdS<sub>9</sub> e PcS123, alle quali potrebbero quindi essere associate; lo stesso discorso potrebbe valere per le sequenze Pack S3 B e Cons S3 B, associate come detto all’aplotipo PcS103, identiche al 97% con McInt S3 B di ‘McIntosh’; si può quindi ipotizzare che quest’ultima sequenza sia associata all’aplotipo MdS<sub>10</sub>, la cui RNasi è al 98% identica a quella appunto dell’aplotipo PcS103.

La distribuzione delle sequenze e delle ramificazioni in questo cluster potrebbero quindi, almeno in una certa misura, riflettere la struttura del cluster relativo alle RNasi, riportato nella figura 4.1. Ciò porta ad ipotizzare una stretta associazione delle sequenze ottenute per questo gruppo al locus S; questa osservazione appare compatibile con la posizione dei geni MdsFBB3<sup>3- $\alpha$</sup>  e MdsFBB3<sup>3- $\beta$</sup> , isolati da cloni genomici contenenti la MdS<sub>3</sub>-RNasi e quindi ad essa fisicamente molto vicini. Tuttavia, poiché 317 kb dell'aplotipo MdS<sub>9</sub> sono state interamente sequenziate e contengono solo i due geni MdsFBB9<sup>9- $\alpha$</sup>  e MdsFBB9<sup>9- $\beta$</sup>  [52], se almeno una delle due sequenze ottenute da 'Fuji' è effettivamente associata all'aplotipo MdS<sub>9</sub>, è da escludere che questa si trovi nelle 317 kb fiancheggiando la MdS<sub>9</sub>-RNasi.

#### 4.1.7 Mappaggio dei geni identificati

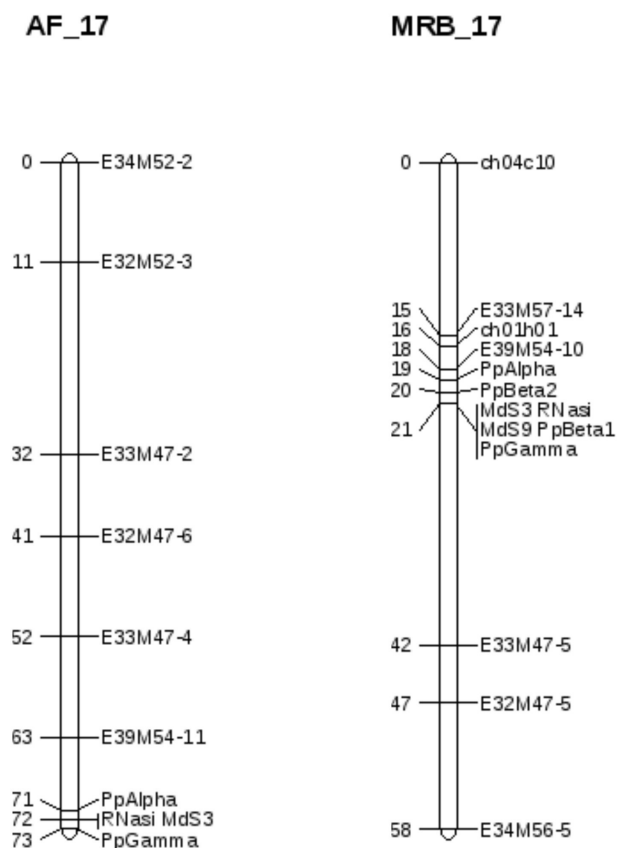
I 91 individui della popolazione 'Abate Fétel' × 'Max Red Bartlett', di cui è già disponibile una mappa genetica [128, 129, 130, 131], sono stati prima di tutto analizzati per determinarne il genotipo S, verificando la distribuzione delle quattro S-RNasi tramite il marcatore SCAR descritto nel par. 3.3.4. L'analisi di mappa si è focalizzata sul linkage group (LG) 17, sede del locus S in melo [146] ed in pero [147].

I dati relativi a tutte le segregazioni analizzate sono stati inseriti nel dataset della mappa disponibile per questa popolazione ed elaborati con il programma JoinMap; la RNasi e tutti i frammenti di geni F-box identificati sono stati posizionati sul linkage group 17, in stretta associazione fra loro. La mappa del cromosoma 17 ottenuta è riportata nella figura 4.7.

Il LG 17 di 'Max Red Bartlett', in particolare, è denominato ed orientato dalla presenza dei microsatelliti ch01h01 e ch04c10; prima di questo lavoro di tesi il LG 17 di 'Abate Fétel' invece non era identificato, in quanto i due microsatelliti sopra citati sono caratterizzati da una segregazione dominante. I marcatori relativi al locus S sviluppati ed analizzati nel corso di questo studio sono stati associati al LG 17 di 'Max Red Bartlett' e, per quanto riguarda il parentale 'Abate Fétel', ad un gruppo di associazione formato solo da marcatori AFLP; in questo modo il LG 17 di 'Abate Fétel' è stato identificato dagli stessi marcatori del locus S.

Sulla base delle informazioni di sequenza ottenute per i geni F-box dei due parentali sono poi stati realizzati specifici marcatori di tipo CAPS per poter verificare la segregazione nella progenie dei geni identificati. La tabella 4.9 riassume gli enzimi di restrizione utilizzati per ogni gruppo di sequenze e i frammenti dei quali è stato possibile seguire la distribuzione.

La verifica della segregazione ha confermato l'associazione al locus S di tutti i



**Figura 4.7:** mappa relativa al linkage group 17 di ‘Abate Fétel’ × ‘Max Red Bartlett’; i geni PpBeta1 e PpBeta2 corrispondono, rispettivamente, alle sequenze MRB Beta A e MRB Beta Z. Il cromosoma 17 è chiaramente identificato dalla presenza del microsatellite ch01h01, mappato sia in melo [148, 149, 150] che in pero [147], e del microsatellite ch04c10, mappato soltanto in pero [129].

gruppi genici analizzati. Come atteso, inoltre, tutte le sequenze di ‘Max Red Bartlett’ che erano state putativamente attribuite all’aplotipo  $S_{101}$  per l’identità con frammenti di altri genotipi dotati dello stesso aplotipo, hanno confermato di essere associate ad esso. La tabella 4.10 riassume le associazioni stabilite fra le sequenze analizzate e gli aplotipi S.

Le tre sequenze del gruppo  $Pp\alpha$  sono state mappate come marcatore codominante di tipo “a0 × bc”; pur confermando una forte associazione alle S-RNasi, sono stati individuati due genotipi ricombinanti: si tratta degli individui A36 e B42. Entrambi hanno genotipo S  $PcS_{102}/PcS_{105}$ , ma contengono, oltre al frammento AF Alfa A associato a  $PcS_{105}$ , la sequenza MRB Alfa A, che in tutti gli altri individui è stata trovata associata all’aplotipo  $PcS_{101}$ . È quindi presumibile che entrambi i casi siano

Gruppo	Enzima	Sequenze mappate
Pp $\alpha$	<i>RsaI</i>	AF Alfa A, MRB Alfa A, MRB Alfa B
Pp $\beta$	<i>RsaI</i>	MRB Beta A, MRB Beta Z
Pp $\gamma$	<i>MseI</i>	AF Alfa A, AF Alfa B, MRB Alfa A, MRB Alfa B
MdS9	<i>EcoRI</i>	MRB S9Beta A, MRB S9Beta B
MdS3	<i>TaqI, RsaI</i>	AF S3 A, MRB S3 A, MRB S3 B

**Tabella 4.9:** enzimi di restrizione usati per lo sviluppo di marcatori CAPS e sequenze per le quali è stata verificata la segregazione.

stati originati da un analogo evento di ricombinazione a carico del parentale maschile ‘Max Red Barlett’, causato da un crossing-over fra il gene della S-RNasi e il gene F-box in questione durante la microsporogenesi.

Le quattro sequenze del gruppo Pp $\gamma$  sono state mappate come marcatore codominante di tipo “ab  $\times$  cd”; anche in questo caso, nonostante la forte associazione al gene della RNasi, è stato individuato un genotipo ricombinante: l’individuo A38. Questo ha genotipo S PcS<sub>101</sub>/PcS<sub>105</sub> ed ha mostrato di possedere le sequenze MRB Gamma A, associata appunto a PcS<sub>101</sub>, e AF Gamma B che invece è stata in tutti gli altri genotipi associata all’aplotipo PcS<sub>104</sub>. In questo caso l’evento di ricombinazione è a carico del parentale materno ‘Abate Fétel’, ed ha riguardato un crossing-over durante la macrosporogenesi.

Poichè i primer Md9 $\beta$ -for e Md9-rev non hanno prodotto nessun amplificato dalla varietà ‘Abate Fétel’, è stato possibile mappare le due sequenze ottenute da ‘Max Red Bartlett’ come marcatore di tipo “00  $\times$  ab”. Le due sequenze MRB S9Beta A e MRB S9Beta B hanno confermato una perfetta associazione rispettivamente agli aplotipi PcS<sub>102</sub> e PcS<sub>101</sub>; nessun genotipo ricombinante è stato individuato.

Le tre sequenze del gruppo MdS3 sono state mappate come marcatore codominante di tipo “a0  $\times$  bc” ed hanno confermato di essere perfettamente associate al locus S; nessun genotipo ricombinante è stati infatti individuato per le sequenze di questo gruppo.

Il mappaggio delle sequenze del gruppo Pp $\beta$  è stato meno facile perchè, come discusso precedentemente, il gene è sicuramente presente in più copie, e non è stato possibile ottenere le sequenze di tutte; i profili di restrizione del marcatore CAPS realizzato hanno infatti mostrato più bande rispetto a quanto atteso dall’analisi *in silico* dei siti di restrizione, generando pattern complessi ed impedendo di ottenere risultati certi per alcune delle segregazioni ottenute. Uniche eccezioni sono state le due sequenze di ‘Max Red Bartlett’ MRB Beta A e MRB Beta Z, che hanno prodotto



#### 4.1 Ricerca e caratterizzazione di geni S-locus F-box

Sequenza	Aplotipo associato
AF Alfa A	PcS <sub>105</sub>
MRB Alfa A	PcS <sub>101</sub>
MRB Alfa B	PcS <sub>102</sub>
MRB Beta A	PcS <sub>101</sub>
MRB Beta Z	PcS <sub>102</sub>
AF Gamma A	PcS <sub>105</sub>
AF Gamma B	PcS <sub>104</sub>
MRB Gamma A	PcS <sub>101</sub>
MRB Gamma B	PcS <sub>102</sub>
MRB S9Beta A	PcS <sub>102</sub>
MRB S9Beta B	PcS <sub>101</sub>
AF S3 A	PcS <sub>105</sub>
MRB S3 A	PcS <sub>101</sub>
MRB S3 B	PcS <sub>104</sub>

**Tabella 4.10:** associazione delle sequenze mappate agli aplotipi S.

bande della dimensione attesa univocamente associabili ad esse, grazie alle quali è quindi stato possibile seguirne la segregazione. L'analisi delle sequenze discussa nel par. 4.1.3 mette tuttavia in forte dubbio l'allelismo fra le due sequenze; si è anzi ritenuto molto più probabile che la sequenza MRB Beta Z, che si posiziona fuori dal cluster principale (figura 4.5), appartenga ad un locus distinto, diverso da quello di MRB Beta A. Per questo motivo si è deciso di mappare le due sequenze in questione indipendentemente l'una dall'altra, entrambe come marcatori dominanti di tipo presenza/assenza. La sequenza MRB Beta A ha dimostrato di essere associata alla RNasi dell'aplotipo PcS<sub>101</sub>, non producendo alcun genotipo ricombinante; La sequenza MRB Beta Z è stata invece associata all'aplotipo PcS<sub>102</sub>, ma in questo caso è stato individuato un evento di ricombinazione: la sequenza infatti si è rivelata assente nell'individuo A36, con genotipo PcS<sub>102</sub>/PcS<sub>105</sub>, già identificato come ricombinante per il gruppo Pp $\alpha$ . È quindi probabile che i due geni in questione siano situati in prossimità sul cromosoma e che lo stesso evento di crossing-over abbia prodotto la ricombinazione per entrambi.

Occorre sottolineare come il numero di individui della progenie, 91, non consenta un mappaggio fine dei geni analizzati; infatti il ridottissimo tasso di ricombinazione che caratterizza il locus S richiederebbe un'analisi su un numero molto maggiore di

Locus	Segregazione	ac	ad	bc	bd	nn	np	md	$\chi^2$
RNasi	<ab×cd>	25	19	21	26	-	-	0	1.4
PpAlpha	<ab×cd>	25	19	23	24	-	-	0	0.9
PpBeta1	<nn×np>	-	-	-	-	44	46	1	0.0
PpBeta2	<nn×np>	-	-	-	-	47	43	1	0.2
PpGamma	<ab×cd>	26	19	20	26	-	-	0	1.9
MdS3	<ab×cd>	25	19	21	26	-	-	0	1.4
MdS9	<nn×np>	-	-	-	-	45	46	0	0.0

**Tabella 4.11:** Single Locus Analysis relativa ai geni del locus S mappati; sono riportati il tipo di segregazione, il numero di individui in ogni classe genotipica, il numero di dati mancanti (“md”) ed il test  $\chi^2$ .

genotipi per poter stabilire sia le effettive frequenze di ricombinazione fra il gene della RNasi e i geni F-box individuati, sia la reale perfetta associazione per quei geni che non hanno prodotto ricombinanti.

Tuttavia dall’analisi condotta si può comunque concludere che tutti i geni F-box analizzati sono associati al locus S; fra questi, i geni del gruppo Pp $\alpha$  e Pp $\gamma$  e la sequenza MRB Beta Z pur essendo associati al locus S non possono probabilmente essere considerati appartenenti ad esso; infatti si trovano ad una distanza dalla RNasi tale da consentire di individuare genotipi ricombinanti. Il loro ruolo come determinanti maschili dell’autoincompatibilità è quindi estremamente improbabile: infatti una ricombinazione fra la RNasi e il determinante maschile produrrebbe un aplotipo mutante autocompatibile, in cui le specificità di riconoscimento sarebbero diverse da parte stilare e pollinica; tuttavia mutanti di questo tipo non sono mai stati individuati nelle Pyrinae. I geni F-box dei gruppi Md9 e Md3 e la sequenza MRB Beta A, che non mostrano eventi di ricombinazione con la RNasi, restano invece ottimi candidati a svolgere il ruolo di determinanti maschili.

#### 4.1.8 Considerazioni sulla struttura del locus S nelle Pyrinae

I dati prodotti nel presente studio mettono in discussione l’ipotesi, formulata da Sassa *et al.* 2007 [52], secondo cui il locus S potrebbe avere una struttura diversa fra melo e pero giapponese, essendo dotato nella prima specie di due geni F-box e nella seconda di tre. Emerge invece chiaramente come tutti i geni SFBB identificati in melo e pero giapponese abbiano omologi in tutte e tre le specie analizzate nel presente studio.

## 4.1 Ricerca e caratterizzazione di geni S-locus F-box

---

È quindi presumibile che le specie melo, pero europeo e pero giapponese condividano la stessa struttura del locus S. Questa ipotesi appare peraltro decisamente più plausibile non solo per l'elevata sintonia fra i genomi delle tre specie, ma anche e soprattutto per le caratteristiche peculiari dello stesso locus S; infatti, come citato nel par. 1.9, l'estrema improbabilità dell'eliminazione di un aplotipo S in condizioni naturali fa sì che molti degli aplotipi attuali si siano originati in tempi antichissimi, precedenti la divergenza delle specie, e si siano mantenuti pressochè inalterati anche grazie al ridottissimo tasso di ricombinazione che contraddistingue questo locus [114, 115].

Il fenomeno dell'evoluzione trans-specifica [116] è testimoniato anche dall'identificazione nella varietà 'Conseiller a La Coeur' di una sequenza altamente omologa al gene PpSFBB<sup>9- $\alpha$</sup> , dato che supporta una volta di più l'ipotesi dell'origine comune degli aplotipi PcS<sub>123</sub> e MdS<sub>9</sub>.

A questo proposito occorre fare una considerazione sul comportamento di alcuni dei geni F-box identificati; infatti, se è vero che i geni interni al locus S sono stati mantenuti inalterati o quasi durante la storia evolutiva delle tre specie, e che i geni ad esso esterni sono invece andati incontro ad un'evoluzione indipendente, appare chiaro come almeno due dei geni clonati, corrispondenti ai gruppi Pp $\alpha$  e Pp $\gamma$ , debbano essere considerati geni esterni al locus S: in questi gruppi la suddivisione delle sequenze riflette appunto la divergenza delle specie, risultando particolarmente evidente per le sequenze di melo che si presentano in un cluster separato rispetto a quelle di pero. L'identificazione di genotipi ricombinanti nella progenie di 'Abate Fétel'  $\times$  'Max Red Bartlett' conferma ulteriormente questo dato; sui geni PpSFBB $\gamma$  è stato anche sviluppato un saggio di genotipizzazione S [127], che alla luce dei dati presentati è possibile sia soggetto ad errori, sia pure in percentuali molto basse.

Rimangono invece ancora da chiarire tre questioni fondamentali:

- il numero di geni F-box associati ad ogni aplotipo S. È infatti chiaro che ne esistono più dei 2 o 3 identificati da Sassa *et al.* rispettivamente in melo e pero giapponese; per almeno 5 geni sono stati trovati omologhi in vari aplotipi delle tre specie, ma il numero potrebbe essere ancora ampiamente sottostimato sia per l'eventuale presenza di altri geni (come quelli identificati da Cheng *et al.* in melo [51]), sia per la possibile duplicazione di alcuni di questi, come verificato per il gruppo Pp $\beta$ . Dati definitivi in questo senso probabilmente verranno solo dai programmi di sequenziamento del genoma.
- la dimensione del locus S. La regione dell'aplotipo S<sub>9</sub> sequenziata misura 317 kb, una delle regioni sequenziate del locus S più ampie insieme a quella dell'a-

plotipo S<sub>2</sub> di *Petunia* [151]. Evidentemente però possono esistere geni F-box anche più distanti dalla RNasi; anche se è chiaro che il determinante pollinico debba trovarsi sufficientemente vicino alla RNasi da essere ereditato con essa come un'unica unità segregante, non si possono trarre conclusioni certe su quali valori possa raggiungere questa distanza. È degno di nota, a questo proposito, come il gene F-box fisicamente più vicino alla RNasi S<sub>4</sub> di pero giapponese, S<sub>4</sub>F-box0, sia inequivocabilmente non necessario per il riconoscimento, visto che la sua delezione non modifica la funzione pollinica [105].

- la natura del determinante pollinico. Non è infatti chiaro quanti e quali dei geni F-box che circondano la RNasi siano effettivamente responsabili della specificità di riconoscimento fra polline e pistillo; un'ipotesi è quella formulata da Sassa *et al.*, secondo la quale i diversi geni SFBB cooperano nello svolgimento di questo ruolo [52]; tuttavia il numero maggiore di geni F-box identificati e l'evidenza che alcuni di questi possono andare incontro a ricombinazione rispetto alla RNasi, sembrano indicare una risposta differente. Così come avviene in diversi aplotipi S di *Prunus*, *Petunia* e *Antirrhinum*, nei quali il determinante è un singolo gene SLF/SFB ma altri geni F-box esistono nelle immediate vicinanze della RNasi [41, 42, 43, 151], analogamente anche nelle Pyrinae un solo gene F-box potrebbe essere responsabile della funzione pollinica dell'autoincompatibilità, mentre tutti gli altri potrebbero svolgere ruoli accessori.

Anche se non è possibile trarre conclusioni definitive in merito al determinante pollinico, l'analisi condotta fornisce comunque una serie di informazioni importanti in merito; infatti, se da un lato è probabile che per alcuni dei geni SFBB noti sia da escludere il diretto coinvolgimento come determinanti dell'autoincompatibilità (gruppi Pp $\alpha$  e Pp $\gamma$ ), altri, come i geni F-box dei gruppi Mds3 e Mds9, al contrario esibiscono tutte le caratteristiche genetiche attese per questo ruolo:

- la perfetta associazione al gene della S-RNasi;
- un'alto livello di divergenza delle sequenze;
- la similarità fra geni di aplotipi S le cui RNasi sono estremamente conservate.

Per questo motivo, i geni identificati nel corso di questo lavoro costituiscono i candidati più credibili al ruolo di determinante maschile dell'autoincompatibilità gametofitica in pero europeo e negli altri membri delle Pyrinae.

## 4.2 Geni differenzialmente espressi in incroci compatibili ed incompatibili identificati tramite cDNA-AFLP

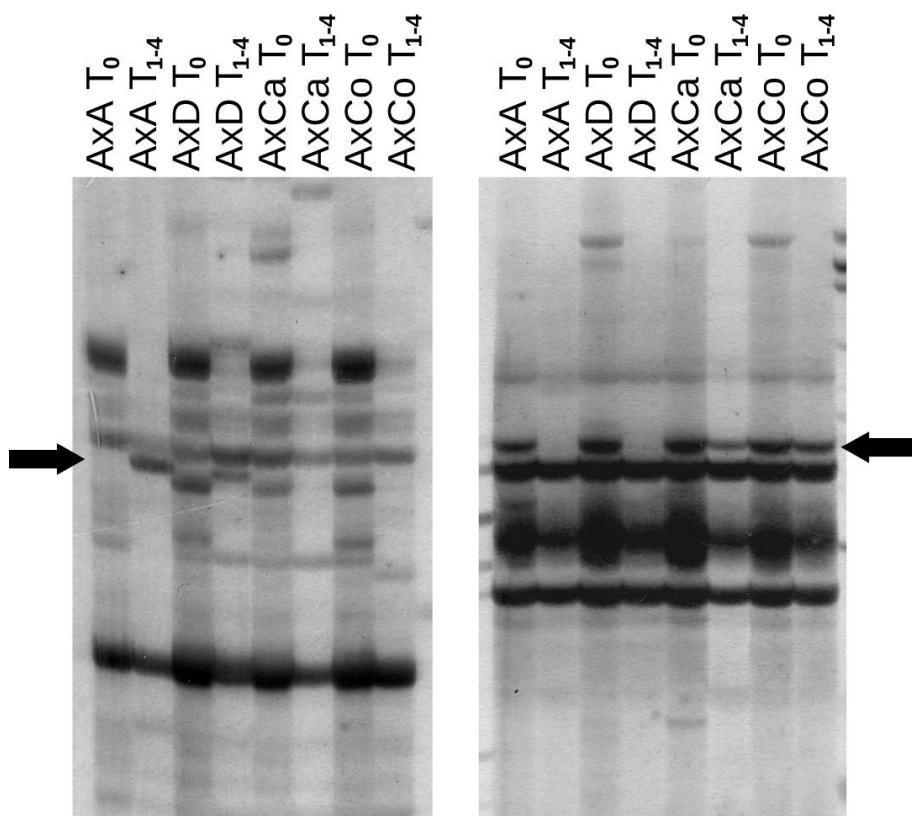
L'analisi è stata condotta partendo da stili impollinati secondo quattro combinazioni d'incrocio (autoimpollinazione, impollinazione incompatibile, semicompatibile e compatibile), confrontando i profili d'espressione relativi al tempo zero ( $T_0$ ) e ad un pool di quattro tempi successivi ( $T_{1-4}$ : 4, 8, 24 e 48 ore dall'impollinazione).

I profili di trascrizione prodotti, come previsto, si sono rivelati piuttosto complessi; la grande parte di questa complessità è indubbiamente da attribuire alla variabilità ambientale, che ovviamente deve essere limitata al massimo in fase sperimentale, ma che risente del fatto che il campionamento debba essere effettuato su alberi in pieno campo. Per questo motivo, nella ricerca di frammenti con espressione correlata alle reazioni di accettazione o rigetto, non sono state considerate bande che non presentassero il profilo atteso in almeno 7 delle 8 tesi testate; due esempi sono riportati nella figura 4.8.

I profili presi in considerazione, in particolare, sono stati i seguenti:

- frammenti, sempre assenti o sempre presenti nei  $T_0$ , presenti solo nei  $T_{1-4}$  relativi agli incroci compatibile e semicompatibile; questo tipo di pattern corrisponde teoricamente a geni la cui espressione è attivata o mantenuta attiva solo in presenza di tubetti compatibili.
- frammenti, sempre assenti o sempre presenti nei  $T_0$ , presenti solo nei  $T_{1-4}$  relativi agli incroci incompatibili ed al semicompatibile, corrispondenti a geni la cui trascrizione è attivata o mantenuta attiva solo in presenza di tubetti incompatibili.
- frammenti, sempre assenti o sempre presenti nei  $T_0$ , presenti solo nei  $T_{1-4}$  relativi all'incrocio 100% compatibile, corrispondenti a geni la cui trascrizione è attivata o mantenuta attiva solo in assenza di tubetti incompatibili.
- frammenti, sempre assenti o sempre presenti nei  $T_0$ , presenti solo nei  $T_{1-4}$  relativi agli incroci incompatibili, corrispondenti a geni la cui trascrizione è attivata o mantenuta attiva solo in assenza di tubetti compatibili.
- frammenti con pattern corrispondente a uno dei quattro precedenti, ma caratterizzati, anziché dalla presenza/assenza della banda, da una sua più che evidente differenza di intensità fra le tesi.

In totale, grazie alle 96 combinazioni di primer AFLP testate, sono state individuate 36 bande con profilo rispondente ai requisiti; per 28 di queste è stato possibile ottenere la sequenza. I pattern d'espressione relativi ai 28 TDF (*Transcript Derived Fragments*) risultanti sono schematizzati nella tabella 4.12; tutte le sequenze sono riportate in appendice A.



**Figura 4.8:** esempio di profili cDNA-AFLP relativi ai quattro incroci (la denominazione dei campioni è la stessa utilizzata nella tabella 4.12); a sinistra la freccia indica la banda da cui è stato ricavato il TDF 30, assente nei T<sub>0</sub> e presente nei pool T<sub>1-4</sub> solo degli incroci incompatibili (AxA e AxD); a destra il profilo del TDF 04, presente in tutti i T<sub>0</sub> e nei T<sub>1-4</sub> solo delle combinazioni semicompatibile (AxCa) e compatibile (AxCo).

## 4.2 Geni differenzialmente espressi in incroci compatibili/incompatibili

Frammento	Primer	Dim.	Pattern di espressione							
			A×A		A×D		A×Ca		A×Co	
			T <sub>0</sub>	T <sub>1-4</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>1-4</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>1-4</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>1-4</sub>
<b>TDF 02</b>	E40 - M47	128 bp	+	-	+	-	+	+	+	+
<b>TDF 03</b>	E36 - M49	152 bp	0	0	1	0	1	1	1	1
<b>TDF 04</b>	E40 - M47	364 bp	1	0	1	0	1	1	1	1
<b>TDF 05</b>	E36 - M47	107 bp	0	0	0	-	0	+	0	++
<b>TDF 06</b>	E40 - M48	200 bp	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>TDF 07</b>	E43 - M52	103 bp	+	0	+	0	+	-	+	+
<b>TDF 09</b>	E43 - M54	472 bp	1	0	1	0	1	1	1	1
<b>TDF 11</b>	E37 - M51	101 bp	0	1	0	1	0	0	0	0
<b>TDF 12</b>	E38 - M58	210 bp	1	0	1	0	1	1	1	1
<b>TDF 14</b>	E44 - M57	127 bp	1	0	1	0	1	1	1	1
<b>TDF 15</b>	E39 - M62	319 bp	1	0	1	0	1	0	1	1
<b>TDF 16</b>	E39 - M62	97 bp	-	0	-	0	-	+	-	++
<b>TDF 18</b>	E32 - M47	238 bp	0	0	1	0	1	0	1	1
<b>TDF 19</b>	E31 - M62	190 bp	0	0	1	0	1	-	1	+
<b>TDF 20</b>	E31 - M60	190 bp	1	0	1	0	1	1	1	1
<b>TDF 21</b>	E33 - M51	238 bp	1	0	1	0	1	1	1	1
<b>TDF 23</b>	E35 - M59	305 bp	0	0	1	0	1	0	1	1
<b>TDF 24</b>	E35 - M59	372 bp	1	0	1	0	1	-	1	+
<b>TDF 26</b>	E38 - M49	358 bp	1	1	1	1	1	-	1	0
<b>TDF 27</b>	E35 - M52	268 bp	1	1	0	1	0	1	0	0
<b>TDF 28</b>	E35 - M53	169 bp	0	0	1	0	1	1	1	1
<b>TDF 30</b>	E37 - M59	384 bp	0	1	0	1	0	0	0	0
<b>TDF 31</b>	E43 - M60	289 bp	1	1	0	1	0	0	0	0
<b>TDF 32</b>	E43 - M61	250 bp	1	0	1	0	1	1	1	1
<b>TDF 33</b>	E44 - M48	187 bp	1	0	1	0	1	1	1	1
<b>TDF 34</b>	E32 - M57	96 bp	1	1	0	1	0	1	0	0
<b>TDF 35</b>	E33 - M61	158 bp	0	0	0	0	0	1	0	1
<b>TDF 36</b>	E33 - M62	523 bp	1	0	1	0	1	0	1	1

**Tabella 4.12:** (pagina precedente) schema riassuntivo dei 28 Transcript-derived fragments (TDF) identificati attraverso l'analisi di cDNA-AFLP. Per ognuno sono riportati i primer AFLP attraverso i quali il frammento è stato amplificato, la dimensione ed il livello di espressione del frammento al tempo 0 ( $T_0$ ) e nel pool di tempi successivi ( $T_{1-4}$ ) nelle 4 combinazioni testate:

"A×A" = 'Abate Fétel' × 'Abate Fétel' (autoincompatibilità)

"A×D" = 'Abate Fétel' × 'Decana' (incompatibilità)

"A×Ca" = 'Abate Fétel' × 'Cascade' (semicompatibilità)

"A×Co" = 'Abate Fétel' × 'Conference' (compatibilità)

Simboli utilizzati per definire l'espressione:

"0", "1" = banda assente/presente

"-", "+", "++" = banda di intensità debole, forte, molto forte.

### 4.2.1 Analisi delle sequenze

Le sequenze ottenute sono state allineate in database utilizzando gli strumenti Fasta e Blast, alla ricerca di omologie con geni conosciuti per poter trarre informazioni sulla natura dei frammenti identificati.

Sei delle sequenze ottenute (TDF 07, 14, 16, 23, 32, 33) non hanno prodotto alcun allineamento significativo, mentre per altre 12 (TDF 03, 09, 11, 12, 15, 24, 26, 27, 28, 34, 35, 36) l'allineamento è stato ottenuto con sequenze ESTs o genomiche non annotate, che non hanno quindi consentito di trarre le informazioni desiderate. Solo per le restanti 10 è stato quindi possibile individuare, in diversi gradi, omologia con geni noti.

**TDF 02.** La sequenza del TDF 02, la cui trascrizione sembra essere fortemente repressa negli incroci incompatibili, presenta un'identità del 96% con la EST di melo numero CN444502<sup>1</sup>; questa EST non è annotata, ma presenta un'Open Reading Frame (ORF) di 303 bp, seguita dal codone di stop e quindi probabilmente corrispondente alla porzione 3' della sequenza codificante del gene. Questa regione presenta un'elevata omologia, sia a livello di cDNA che di sequenza proteica dedotta, con

---

<sup>1</sup>tutti i numeri di accessione di ESTs e proteine riportati in questo capitolo sono riferiti al database dell'EBI (European Bioinformatics Institute), <http://www.ebi.ac.uk/Databases/>



## 4.2 Geni differenzialmente espressi in incroci compatibili/incompatibili

il gene AT4G04970<sup>2</sup> di *Arabidopsis thaliana*, codificante per una putativa callosio sintasi (1,3- $\beta$ -glucano sintasi).

**TDF 04.** Il pattern d'espressione di questo TDF indica un silenziamento nei soli incroci incompatibili. La sequenza si allinea molto bene a varie ESTs, fra cui le AM289644 e DY649229 di pesco e la CO722274 di melo; corrisponde ad una porzione interna alla sequenza codificante, dalla quale può quindi essere dedotta una sequenza aminoacidica di 114 residui. Questa presenta una buona omologia con le sequenze di varie UDP-glucosio o UDP-saccarosio pirofosforilasi, fra cui le proteine DQ399739 di *Cucumis melo* e DQ267699 di *Glycine max*.

**TDF 05.** La sequenza di questo TDF, la cui espressione sembra essere attivata in proporzione al grado di compatibilità dell'incrocio, si allinea bene con la EST CV880781 di melo; quest'ultima contiene una porzione codificante di 624 bp, tradotta in una sequenza di 208 aminoacidi altamente omologa al gene "TUA5" per la  $\alpha$ -tubulina 5 di *Arabidopsis* (locus AT5G19780).

**TDF 06.** Il TDF 06, il cui pattern indica una trascrizione silenziata negli incroci incompatibili e nel semicompatibile, presenta un'ottima omologia con diverse ESTs di melo, fra cui in particolare la CV630007, nella porzione codificante; la sequenza proteica dedotta, di 66 aminoacidi, si allinea quasi perfettamente ad una regione della proteina codificata dal locus AT3G62830 di *Arabidopsis* e corrispondente ad una UDP-acido glucuronico decarbossilasi probabilmente di membrana.

**TDF 18.** Il pattern d'espressione del TDF 18 indica, come per il TDF 06, un silenziamento in tutti gli incroci tranne il 100% compatibile. La sua sequenza mostra omologia con varie ESTs di melo, fra cui la CV092062, nella porzione codificante; la sequenza proteica dedotta, di 79 aminoacidi, esibisce una buona omologia con diverse proteine contenenti PPR (*Pentatricopeptide Repeat*), come la EEF36579 di *Ricinus communis* e la NP\_172694 di *Arabidopsis*.

**TDF 19-20.** I TDF 19 e 20 sono stati isolati indipendentemente l'uno dall'altro ma hanno fornito sequenze identiche al 98%. Il pattern d'espressione di entrambi indica un silenziamento negli incroci incompatibili; le sequenze si allineano bene a varie ESTs, fra cui la numero DR996645 di melo. Anche in questo caso la sequenza

---

<sup>2</sup>i numeri di accessione di geni di *Arabidopsis* citati appartengono al database TAIR (The Arabidopsis Information Resource), <http://www.arabidopsis.org/>

## RISULTATI E DISCUSSIONE

---

dei TDF può essere tradotta in una porzione aminoacidica di 63 residui; le sequenze dedotte per i due TDF differiscono per due soli aminoacidi, e mostrano omologia con varie proteina disolfuro isomerasi (PDI) fra le quali la Q84XU4 di *Elaeis guineensis*.

**TDF 21.** La sequenza del TFD 21, che sembra avere un'espressione silenziata negli incroci incompatibili, si allinea alla EST CO898236 e a varie altre di melo, a ridosso del codone di stop della traduzione. La porzione codificante del TDF permette di dedurre una sequenza di sole 17 bp, che però è identica alla sequenza dedotta per la EST CO898236; quest'ultima contiene 79 aminoacidi e presenta omologia con la proteina O24591 di *Zea mays*, una istone deacetilasi.

**TDF 30.** Questo TDF presenta un pattern che ne indica un'attivazione dell'espressione solo negli incroci incompatibili; la sequenza presenta omologia con alcuni cDNA di *Prunus serotina* codificanti per idrolasi di glucosidi cianogenetici, come la prunasina idrolasi (sequenza AF411009) e la amigdalina idrolasi (U50201).

**TDF 31.** Anche il pattern relativo al TDF 31 indica un'attivazione dell'espressione solo negli incroci incompatibili; la sequenza si allinea perfettamente alla EST AJ504952 di pero europeo e di varie altre ESTs di melo, a ridosso del codone di stop della traduzione. La sequenza aminoacidica dedotta, di 51 residui, si allinea alla porzione carbossi-terminale di diversi carrier di membrana, fra cui la proteina A0FKR1, un Citrato/H<sup>+</sup> symporter vacuolare di *Citrus sinensis*.

TDF	Distribuzione	Allineamenti rilevati
TDF 02	T <sub>0</sub> , T <sub>1-4</sub> compatibili	Callosio sintasi
TDF 04	T <sub>0</sub> , T <sub>1-4</sub> compatibili	UDP-zucchero pirofosforilasi
TDF 05	T <sub>1-4</sub> compatibili	α-tubulina 5
TDF 06	T <sub>1-4</sub> compatibili	UDP-acido glucuronico decarbossilasi
TDF 18	T <sub>0</sub> , T <sub>1-4</sub> 100% compatibile	Proteine contenenti PPR
TDF 19, TDF 20	T <sub>0</sub> , T <sub>1-4</sub> compatibili	Proteina disolfuro isomerasi
TDF 21	T <sub>0</sub> , T <sub>1-4</sub> compatibili	Istone deacetilasi
TDF 30	T <sub>1-4</sub> incompatibili	Prunasina idrolasi
TDF 31	T <sub>1-4</sub> incompatibili	Citrato/H <sup>+</sup> symporter vacuolare

**Tabella 4.13:** tabella riassuntiva dei TDF per i quali è stato possibile trovare allineamenti significativi con geni noti.

### 4.2.2 Osservazioni sulla natura dei frammenti genici

Il quadro che emerge da questa analisi è piuttosto complesso, come peraltro era atteso in considerazione del profondo riassetto dell'espressione genica che investe il tubetto pollinico e lo stilo dal momento in cui avviene il riconoscimento.

Sulla base dei pattern di espressione è possibile suddividere i frammenti identificati in tre gruppi.

1. frammenti la cui espressione, attiva al tempo  $T_0$ , viene mantenuta attiva solo in presenza di tubetti compatibili;
2. frammenti la cui espressione, assente o molto debole al tempo  $T_0$ , viene attivata solo in presenza di tubetti compatibili;
3. frammenti la cui espressione, assente al tempo  $T_0$ , viene attivata solo in assenza di tubetti compatibili.

**Gruppo 1.** Il primo gruppo è prevedibilmente il più ampio; al suo interno infatti possono ricadere, oltre a eventuali fattori stilari che consentono la crescita del tubetto, anche tutti quei geni pollinici i cui mRNA vengono degradati dall'azione della RNasi in caso di incompatibilità. Appartengono a questo gruppo i TDF 02, 04, 18, 19, 20, 21.

In questo gruppo l'annotazione putativamente attribuita al TDF 02, corrispondente ad una callosio sintasi, appare particolarmente coerente. Il callosio è infatti il componente dello strato interno della parete del tubetto pollinico e dei cosiddetti tappi che si formano lungo la crescita del tubetto, mediante i quali il citoplasma in avanzamento verso l'apice viene separato dalle sezioni più arretrate del tubo; l'irregolare deposizione del callosio è peraltro una caratteristica osservabile al microscopio tipica del tubetto incompatibile subito prima del blocco [152, 153, 154].

È significativo che due frammenti, i TDF 19 e 20, abbiano fornito lo stesso allineamento; in entrambi i casi si tratta di sequenze omologhe a PDI, proteina disolfuro isomerasi. Questi enzimi agiscono sui ponti disolfuro fra residui di cisteina nelle catene proteiche, regolandone quindi l'assunzione ed il mantenimento della corretta struttura terziaria e quaternaria; agiscono sia come chaperon molecolari per il folding proteico, sia nella regolazione di vari processi, e nelle piante ne esistono almeno 10 famiglie [155, 156]. Il ruolo svolto da questi enzimi potrebbe quindi essere coinvolto anche nella modulazione della risposta di incompatibilità. L'attività disolfuro isomerasica è peraltro caratteristica anche dell'enzima transglutaminasi [88, 89]; tuttavia non vi è omologia fra i TDF in questione e la sequenza della TGasi ottenuta in

questa tesi (par. 4.3), inoltre la trascrizione di questi due TDF sembra sia mantenuta in caso di compatibilità del tubetto, mentre per l'attività TGasica si è riscontrato un aumento associato alla reazione incompatibile [97].

La UDP-zucchero pirofosforilasi, con cui il TDF 04 ha esibito omologia, è un enzima che può operare su vari zuccheri come substrato ed i cui prodotti, come appunto l'UDP-glucosio, sono precursori per la biosintesi di glicolipidi, glicoproteine e componenti della parete cellulare come pectine ed emicellulose. La sua regolazione può quindi rientrare anche in questo caso in una notevole varietà di processi cellulari, ma appare particolarmente significativo che lo stesso enzima sia risultato essenziale per lo sviluppo del polline in *Arabidopsis* [157, 158]; è possibile quindi che un analogo ruolo sia richiesto per la crescita del tubetto nello stilo, e che il suo silenziamento sia associato all'arresto nella reazione incompatibile.

Meno chiara appare infine l'interpretazione da attribuire all'annotazione dei TDF 18 e 21; le proteine contenenti PPR (TDF 18) sono conosciute come famiglia di proteine con domini di legame all'RNA e coinvolte nell'espressione genica organellare all'interno di cloroplasti e mitocondri [159]. L'enzima istone deacetilasi (TDF 21) catalizza la deacetilazione dei residui di lisina negli istoni H2A, H2B, H3 e H4 (che formano il core del nucleosoma), passaggio che innesca la eterocromatinizzazione del DNA [160].

**Gruppo 2.** I frammenti appartenenti al gruppo 2 (TDF 05 e 06) possono invece derivare da geni funzionali alla crescita del tubetto la cui espressione è indotta a seguito del riconoscimento compatibile.

Il TDF 06 sembra corrispondere ad una UDP-acido glucuronico decarbossilasi; questo enzima converte l'UDP-acido glucuronico in UDP-xilosio, un coniugato zucchero-nucleotide richiesto nella via biosintetica di diversi polisaccaridi componenti la parete, come xilano e xiloglucano [161]. Anche questo enzima quindi, come la callosio sintasi (TDF 02) e la UDP-zucchero pirofosforilasi (TDF 04), rientra nel metabolismo della parete vegetale, struttura la cui regolazione sembra quindi giocare un ruolo fondamentale nella crescita del tubetto nello stilo.

Anche in questo caso appare di meno facile interpretazione la presenza di una tubulina (TDF 05); se infatti è vero che il citoscheletro svolge un ruolo fondamentale nella crescita del tubetto, e che una parte importante delle alterazioni innescate dalla reazione di autoincompatibilità è a carico proprio di actina e tubulina (peraltro entrambe substrato della TGasi), è anche vero che i geni della tubulina sono normalmente considerati geni "housekeeping", la cui espressione dovrebbe essere co-

## 4.2 Geni differenzialmente espressi in incroci compatibili/incompatibili

---

stitutivamente attiva su tutti i tessuti della pianta. Future verifiche via Real Time PCR potranno fornire le indicazioni mancanti per definire un modello interpretativo dell'attività di questi geni.

**Gruppo 3.** Al terzo gruppo, nel quale ricadono i TDF 30 e 31, sono ascrivibili quei geni necessari a modulare la reazione di rigetto, espressi quindi solo a seguito del riconoscimento incompatibile.

Il TDF 30 ha esibito omologia con l'amigdalina e la prunasina idrolasi di *Prunus*, enzimi coinvolti nel metabolismo dei glucosidi cianogenetici; l'idrolisi di amigdalina e prunasina produce mandelonitrile, che successivamente si dissocia spontaneamente o enzimaticamente a formare benzaldeide ed acido cianidrico [162]. È interessante notare come questi composti siano coinvolti nella difesa della pianta contro patogeni, insetti ed erbivori; il rigetto del polline incompatibile potrebbe quindi coinvolgere in qualche misura vie normalmente deputate alla difesa contro i patogeni. Un parallelo fra il riconoscimento del polline incompatibile e del patogeno è peraltro già stato ipotizzato nell'incompatibilità sporofitica in *Brassica* [163].

Il TDF 31, infine, potrebbe corrispondere ad una proteina di trasporto associata al tonoplasto, deputata al simporto di citrato ed ioni  $H_+$ ; questo carrier è quindi coinvolto nella segregazione degli acidi organici e nell'acidificazione del vacuolo, e la sua attivazione potrebbe essere correlata alla disgregazione vacuolare osservata all'interno del tubetto negli stadi conclusivi della reazione di rigetto [68].

La cDNA-AFLP è una tecnica che conta ancora pochi esempi di impiego nelle specie arboree, pur essendo stata applicata alle tematiche di studio più diverse, quali la disidratazione della mandorla in *Prunus amygdalus* [164], l'embriogenesi somatica in *Fraxinus angustifolia* [165], la maturazione del frutto di albicocco [166], l'acidità del frutto di melo [167] e la risposta a *Plasmopara viticola* in vite [168].

Come avvenuto negli esempi precedenti, anche in questo sistema modello il quadro emerso è piuttosto complesso, poichè coinvolge vie biosintetiche diverse, tutte importantissime per la cellula, la cui interconnessione è sicuramente cruciale non solo nei fenomeni di rigetto ed accettazione del tubetto pollinico; le speculazioni rese possibili dall'annotazione di alcuni frammenti hanno comunque bisogno di ulteriori verifiche sperimentali per poter essere accettate. Innanzitutto sarà necessaria una validazione attraverso Real-Time PCR dell'effettivo livello di up- o down-regulation dei geni identificati.

Sin dalla pubblicazione del metodo, rispetto alla precedente tecnica del Differential Display [169] veniva osservata una considerevole riduzione dei "falsi positivi",

cioè di geni risultati differenzialmente espressi con la tecnica ma che non venivano confermati tali dalle successive validazioni molecolari; tali frammenti infatti venivano stimati già da Bachem *et al.* 1998 [132] sotto l'1%. Fra i limiti della tecnica bisogna ricordare la ridotta dimensione dei frammenti identificati, che in diversi casi, come si è visto, non hanno consentito l'annotazione delle sequenze. Le verifiche dovranno inoltre escludere le eventuali possibilità di errore legate all'influenza dei fattori ambientali ed alla possibile diversità allelica fra i genotipi utilizzati nelle impollinazioni (una diversa distribuzione dei siti di taglio per gli enzimi utilizzati in fase di digestione del cDNA a doppio filamento potrebbe produrre profili polimorfici anche per geni non coinvolti nel meccanismo oggetto di studio).

Attraverso questa tecnica è comunque stato possibile individuare un buon numero di geni, sui quali potranno proseguire gli studi volti a chiarirne il coinvolgimento nei meccanismi dell'autoincompatibilità; una migliore caratterizzazione dei frammenti individuati, che richiederà anche l'ottenimento di sequenze più lunghe, ed una verifica più fine dei livelli di espressione degli stessi all'interno degli stili impollinati (attraverso Real-Time PCR), potrà sicuramente fornire informazioni più chiare sull'azione di questi geni, i quali, pur essendo esterni al locus S, possono svolgere un ruolo importante nel meccanismo di autoincompatibilità modulando o la risposta compatibile o quella incompatibile.

## 4.3 Sequenziamento del gene della transglutaminasi

Per il gene *AtPng1p* di *Arabidopsis thaliana*, primo gene di una transglutaminasi vegetale identificato e sequenziato [135], sono disponibili in database la sequenza genomica, per un totale di 4327 basi, e quella del cDNA, di 2438 bp; la sequenza codificante è suddivisa in 17 esoni, separati fra loro da 16 introni di dimensioni variabili fra le 71 e le 288 bp, e misura in totale 2166 bp; la proteina è costituita da 721 residui aminoacidici.

Questa proteina ha dimostrato di possedere attività TGasica dipendente da  $\text{Ca}^{2+}$  e GTP; pur non mostrando grande omologia con le TGasi animali, ne condivide la struttura tridimensionale e le proprietà biochimiche ed immunologiche, essendo riconosciuta dagli stessi anticorpi; è mantenuta anche la triade catalitica tipica delle TGasi, costituita da tre residui di cisteina, istidina e acido aspartico. Sembra essere un enzima estremamente diffuso nelle piante: attività TGasica è infatti stata rilevata in diversi organi e componenti sub-cellulari, in particolare nei cloroplasti dove la sua funzione è stata più approfonditamente studiata. I suoi possibili ruoli *in vivo* riguardano principalmente la modificazione post-traduzionale delle proteine mediante legame a poliammine e cross-linking proteico; agisce sui complessi fotosintetici, sul citoscheletro, probabilmente su varie componenti della parete ed altri substrati. È stato ipotizzato che la sua funzione rientri nella modulazione di una vasta gamma di meccanismi cellulari, come la risposta a stress biotici ed abiotici, la risposta di ipersensibilità, la morte cellulare programmata, la senescenza ed appunto il controllo della fertilizzazione, giocando quindi un ruolo importante anche nell'ambito dell'autoincompatibilità gametofitica [89].

Pur non essendo disponibili le sequenze di geni omologhi di pero o altre Rosaceae, nel database TFT (*Tree Fruit Technology*) della Michigan State University<sup>3</sup> sono presenti due ESTs di melo che presentano omologia con la sequenza di *AtPng1p*:

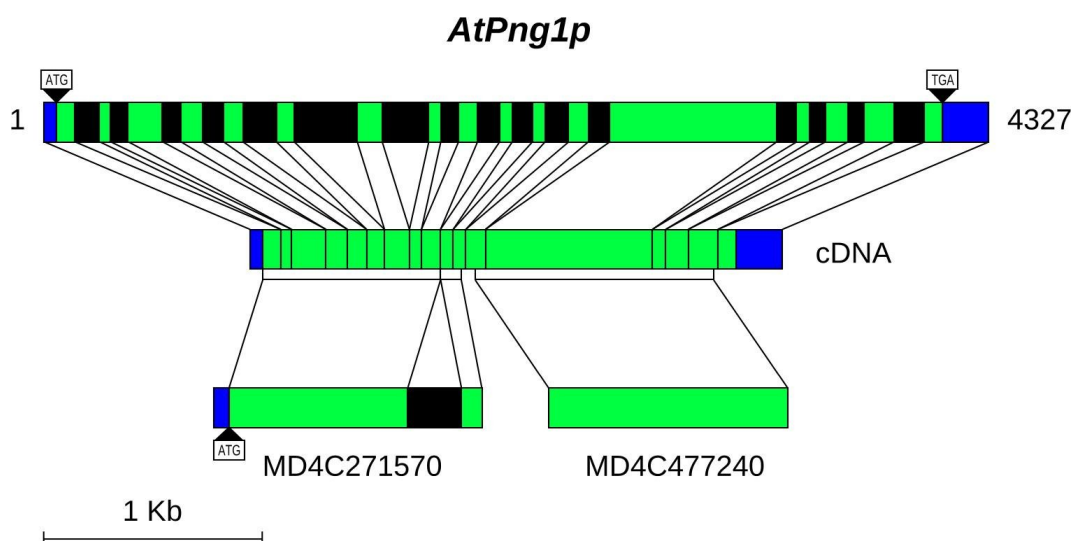
- la EST MD4C477240, di 1094 bp, si allinea al cDNA di *AtPng1p* nella porzione compresa fra le basi 1037 e 2133, fra il dodicesimo ed il sedicesimo esone; l'omologia fra le due sequenze è del 64% a livello nucleotidico e del 57% nelle sequenze aminoacidiche dedotte.
- la EST MD4C271570 misura 1233 bp e si allinea alla porzione 5' del cDNA di *Arabidopsis*; le prime 70 basi di questa sequenza, putativamente corrispondenti alla regione 5' non tradotta (5'UTR) del cDNA di melo, non presentano un'omologia apprezzabile. La porzione compresa fra le basi 71 e 898 si allinea

---

<sup>3</sup><http://genomics.msu.edu/fruitdb/analyses/database.shtml>

al cDNA di *AtPng1p* nella regione che va dal codone ATG di inizio della traduzione alla fine del nono esone; la MD4C271570 contiene poi una sequenza di 246 bp in cui si ha perdita di omologia, probabilmente corrispondente ad un introne; le ultime 89 basi della EST infatti si allineano agli esoni 10 e 11 di *AtPng1p*. La sequenza codificante dedotta per la MD4C271570, ottenuta eliminando il presunto introne, misura 987 bp e presenta un'omologia del 65% con la sequenza di *Arabidopsis*; la sequenza aminoacidica dedotta conta 305 residui e presenta un'omologia con la proteina *AtPng1p* del 68%.

La figura 4.9 riassume le zone di omologia fra il gene di *Arabidopsis* e le due ESTs considerate, mentre gli allineamenti sono riportati in appendice B nelle figure B.2 e B.3.



**Figura 4.9:** rappresentazione schematica delle regioni di omologia fra la sequenza del gene *AtPng1p* della TGasi di *Arabidopsis* e le ESTs MD4C477240 e MD4C271570 di melo. La regione codificante è colorata in verde, le regioni non tradotte al 5' e al 3' in blu, gli introni in nero.

Per clonare un primo frammento del gene di pero e verificarne quindi l'omologia con le sequenze disponibili, sono stati disegnati due primer su regioni conservate individuabili nell'allineamento fra la EST MD4C477240 e la sequenza di *Arabidopsis*; si è deciso di realizzare il forward in corrispondenza dell'esone 12 (primer TGex12\_for) ed il reverse dell'esone 14 (TGex14\_rev): in questo modo è infatti possibile amplificare un frammento contenente per intero l'esone 13, il più grande dei 17 del gene *AtPngp1*, e solo due introni.

I primer TGex12\_for e TGex14\_rev (la cui posizione è riportata nella figura



### 4.3 Sequenziamento del gene della transglutaminasi

---

B.2) hanno permesso di amplificare un frammento di 1036 bp del gene omologo dal DNA genomico delle varietà ‘Abate Fétel’ e ‘William’; il frammento è stato clonato e sequenziato da entrambe le varietà; l’allineamento con la EST di melo e la sequenza genomica di *Arabidopsis* è riportato nella figura B.4.

Le due sequenze di pero, oltre ad essere estremamente conservate fra loro (99% di identità), mostrano un’elevatissima omologia con la EST di melo: a livello della sequenza codificante si osserva un’identità del 96%. L’omologia con la sequenza di *Arabidopsis* è invece del 62%.

Sfruttando questa omologia fra le sequenze di melo e pero, si è deciso di realizzare una serie di primer sulle ESTs MD4C477240 e MD4C271570 per l’amplificazione di una serie di frammenti che, sommati, coprissero tutta la regione del gene compresa fra gli esoni 2 e 14; la posizione di questi primer sulle sequenze EST è rappresentata negli allineamenti nelle figure B.2 e B.3, mentre le sequenze di tutti i primer utilizzati sono riportate nella tabella 4.14.

Il sequenziamento di questi frammenti ha permesso di assemblare per la varietà ‘Abate Fétel’ una sequenza complessiva di 3731 bp; l’allineamento con le ESTs di melo e la sequenza di *Arabidopsis* ha permesso di individuare esoni ed introni, evidenziando una porzione di 1758 bp di sequenza codificante.

Per ottenere la sequenza delle estremità del gene si è deciso di utilizzare la tecnica RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), utilizzando RNA estratto da stili da autoimpollinazione delle varietà ‘Abate Fétel’ e ‘William’; nelle combinazioni di impollinazione incompatibile è stata infatti riportata una maggiore attività della TGasi rispetto alle combinazioni compatibili. L’effettiva espressione del gene in questi campioni è stata verificata amplificando dal cDNA un frammento del gene, utilizzando i primer “TGex12\_for” e “TGex14\_rev”. I primer utilizzati per la RACE, disegnati direttamente sulle sequenze di ‘Abate Fétel’, sono riportati nella tabella 3.23. Questa tecnica ha permesso di amplificare l’estremità 3’ del gene, che è stata clonata e sequenziata, mentre nessun amplificato è stato ottenuto per l’estremo 5’.

Un tentativo di amplificazione dell’estremità 5’ del gene è stato condotto utilizzando la EST MD4C271570 per disegnare un primer a monte del codone di start della traduzione, nella regione non tradotta al 5’ (5’UTR); questo primer (“TG\_5’\_for”, riportato nella tabella 4.14) tuttavia non ha prodotto alcun amplificato, nè da cDNA nè da DNA genomico, indicando che probabilmente l’elevata omologia fra le sequenze di melo e pero è limitata solo alla porzione codificante. Un ultimo primer è quindi stato realizzato sulla stessa EST esattamente a ridosso del codone di start (“TG\_atg\_for”), consentendo in questo caso l’amplificazione da DNA genomico.

<b>TGex2_for</b>	AACTGTTCTCCCTCACCTCC
<b>TGex7_for</b>	GTAACTCGCCTGCCTGTG
<b>TGex8_for</b>	TTCCCACGCTACAATGATCC
<b>TGex12_for</b>	CGCTATACGAGGAAGTGGC
<b>TG_5'_for</b>	GATCATTTCCGCCACTGT
<b>TG_atg_for</b>	GACAAGATGGTGGCTCGG
<b>TGex7_rev</b>	TATTTACGGTGTTATTGCCACA
<b>TGex9_rev</b>	ACGCCCTCTTCTTGTTTCC
<b>TGex13_rev</b>	TCCTTCTCATCACGCTCTTC
<b>TGex14_rev</b>	CACCATTGGTTCTTCCCA

**Tabella 4.14:** sequenze dei primer utilizzati per l'amplificazione e il clonaggio di frammenti del gene della TGasi di pero europeo. Tutti i primer riportati sono stati disegnati sulle ESTs MD4C477240 e MD4C271570 di melo; la posizione degli stessi sulle sequenze è rappresentata nelle figure B.2 e B.3

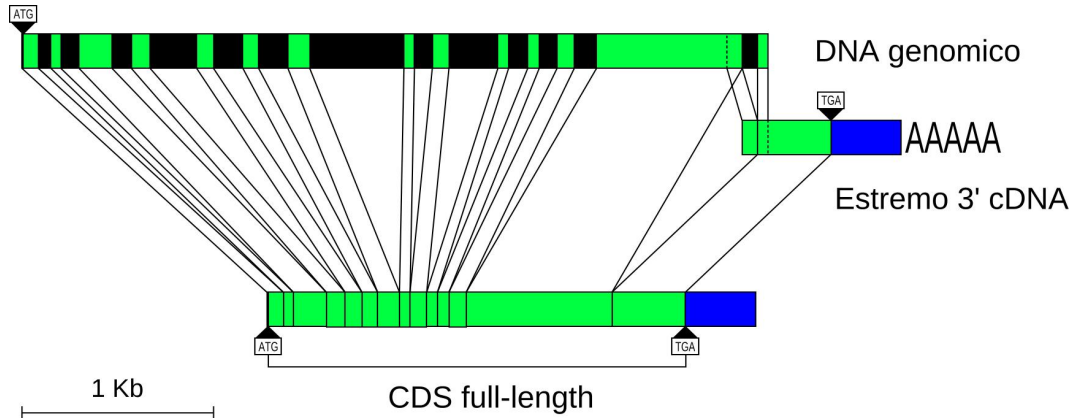
Il sequenziamento di quest'ultimo frammento al 5' del gene dalla varietà 'Abate Fétel' ha permesso di assemblare la sequenza genomica, per un totale di 3893 bp, compresa fra il codone di start e l'esone 14, riportata in appendice A a pagina 206; l'allineamento di quest'ultima alle ESTs di melo e alla sequenza di *AtPng1p* ha permesso di individuare i primi 13 introni del gene, di dimensione fra le 65 e le 492 bp, la cui posizione è conservata fra *Arabidopsis* e pero.

L'assemblaggio della porzione codificante del gene dedotta dalla sequenza genomica con l'estremità 3' del cDNA sequenziata tramite RACE, ha infine permesso di assemblare la sequenza di 2569 bp del cDNA dal codone di start fino all'estremità poliadenilata, riportata a pagina 208, e comprendente l'intera porzione codificante del gene; questo assemblaggio è schematizzato nella figura 4.10.

In totale la regione codificante conta 2178 bp, producendo una proteina di 725 residui aminoacidici. La sequenza dedotta per la proteina è riportata a pagina 210, mentre le figure B.5 e B.6 mostrano l'allineamento fra le sequenze dei cDNA e delle proteine di pero e *Arabidopsis*. L'omologia fra il gene individuato in pero europeo e *AtPng1p* è del 66% nella sequenza codificante e del 64% nella sequenza proteica. Come atteso, la regione maggiormente conservata è quella del dominio catalitico; in particolare sono facilmente individuabili i tre residui che compongono la triade catalitica tipica delle transglutaminasi: cisteina, istidina e acido aspartico, che si trovano rispettivamente nelle posizioni 256, 283 e 300 della sequenza dedotta della proteina di pero.

### 4.3 Sequenziamento del gene della transglutaminasi

Per rendere disponibile la sequenza codificante “full-length” del gene per la successiva produzione della proteina ricombinante, sono stati realizzati due primer (riportati nella tabella 4.15) per l’amplificazione del frammento compreso esattamente fra il codone ATG di start e quello TGA di stop della traduzione; questo frammento è stato amplificato da cDNA utilizzando una DNA polimerasi “high-fidelity” e clonato in un plasmide di tipo pGEM-T.



**Figura 4.10:** schema dell’assemblaggio dei dati di sequenza genomici e di cDNA per l’ottenimento della sequenza codificante completa del gene della TGasi di pero europeo. La regione codificante è colorata in verde, la regione non tradotta al 3’ in blu, gli introni in nero.

---

<b>TG_FL_for</b>	ATGGTGGCTCGGAGCTTC
<b>TG_FL_rev</b>	TCAACTGCTTCTAGAATAGAGGTCAATG

---

**Tabella 4.15:** sequenze dei primer utilizzati per l’amplificazione e il clonaggio della sequenza codificante “full-length” della TGasi di pero; la posizione degli stessi sulle sequenze è rappresentata nella figura B.5.



## Capitolo 5

# Conclusioni

Questa tesi si è proposta di studiare il meccanismo dell'autoincompatibilità gametofitica nel pero a livello molecolare, orientandosi non solo sui determinanti maschili e femminili appartenenti al locus S, ma concentrandosi anche sulla ricerca e sull'identificazione di geni esterni a questo locus.

La ricerca di geni F-box interni al locus S ha permesso di identificare un grande numero di sequenze, fra le quali le prime isolate da pero europeo; queste forniscono una notevole quantità di informazioni di estremo rilievo in un ambito, quello delle *Pyrinae*, in cui la ricerca del determinante pollinico si è rivelata decisamente più complicata che in molte altre specie, portando solo in tempi recentissimi ai primi risultati.

I dati ottenuti in questo lavoro di tesi hanno permesso di chiarire l'ambiguità sulla struttura del locus S delle *Pyrinae*; se da un lato, infatti, l'evidenza di alleli di RNasi altamente omologhe fra le diverse specie testimonia l'estremo grado di conservazione di questo locus, dall'altro ciò appariva in contrasto con la presenza di geni F-box diversi per numero e caratteristiche fra melo e pero giapponese precedentemente descritta in letteratura [52]. Questa tesi dimostra che pero europeo, pero giapponese e melo condividono un numero di geni F-box, appartenenti o quantomeno strettamente associati al locus S, superiore a quanto si credesse; i tre geni che si ipotizzava fossero specifici di *Pyrus pyrifolia*, così come i due di *Malus × domestica*, hanno in realtà omologi nelle tre specie.

Le sequenze ottenute sono state mappate in una popolazione segregante di pero europeo, permettendo di verificare per tutte l'associazione al locus S. Per alcuni di questi geni la presenza di singoli eventi di ricombinazione (molto rari) con il gene

## CONCLUSIONI

---

della RNasi, ha permesso di escluderne il diretto coinvolgimento come determinanti maschili dell'autoincompatibilità; altri, caratterizzati da un'associazione perfetta al gene della RNasi e da un maggiore livello di divergenza fra alleli, sono invece candidati credibili per questo ruolo. Ulteriori studi sono comunque necessari per chiarire quanti e quali dei geni F-box che circondano il locus della RNasi siano effettivamente coinvolti nella specificità del riconoscimento fra polline e pistillo.

Attraverso una serie di incroci controllati condotti in campo secondo combinazioni compatibili ed incompatibili, sono stati ottenuti campioni di stili impollinati i cui profili d'espressione sono stati analizzati tramite la tecnica cDNA-AFLP. Questo approccio ha consentito di ottenere un pool di sequenze di geni la cui espressione appare coinvolta nei meccanismi di accettazione o rigetto del tubetto pollinico. È noto che, anche se la specificità dell'interazione polline/pistillo dipende esclusivamente dai determinanti interni al locus S, altri fattori debbano essere coinvolti nella mediazione della risposta susseguente; le sequenze ottenute costituiscono quindi un ottimo punto di partenza per la ricerca di quei fattori esterni al locus S, di cui si conoscono casi ben documentati in altri sistemi, ma che costituivano, prima di questo lavoro di tesi, un campo non ancora investigato nell'ambito delle *Pyrinae*.

Infine, nel corso di questo studio si è giunti al clonaggio ed alla caratterizzazione del gene della transglutaminasi (TGasi) di *persea* europea, il primo noto nelle specie arboree da frutto. Questo enzima, la cui attività sembra svolgere un ruolo determinante nella reazione di incompatibilità, potrà ora essere studiato più a fondo, anche mediante la produzione della proteina ricombinante, per studiare *in vitro* ed *in vivo*, unitamente ai suoi substrati, in quale misura la sua attività risulti coinvolta nell'autoincompatibilità.

Nel complesso il lavoro presentato in questa tesi ha consentito, attraverso l'impiego di tecniche molecolari diverse, di raccogliere informazioni nuove su alcuni dei principali fattori coinvolti nell'autoincompatibilità gametofitica in *persea* europea e nelle altre *Pyrinae*. La conoscenza di tali fattori è importante non solo per lo studio della biologia cellulare vegetale, ma anche per l'importanza che il fenomeno dell'autoincompatibilità ha per la coltura di queste specie.

# Appendice A

## Sequenze

---

### Geni S-Locus F-Box

gruppo Pp $\alpha$	pag. 114 - 130
gruppo Pp $\beta$	pag. 131 - 155
gruppo Pp $\gamma$	pag. 156 - 172
gruppo Mds9	pag. 173 - 182
gruppo Mds3	pag. 183 - 195

---

<b>TDF derivati da cDNA-AFLP</b>	pag. 196 - 205
----------------------------------	----------------

---

<b>TGasi</b>	pag. 206 - 210
--------------	----------------

---

## SEQUENZE

---

### Sequenza AF Alfa A

Varietà: 'Abate Fétel'; coppia di primer: Ppafor-rev

---

```
1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTAAAAC TCCTGAAGAT AAGGTGGTCC AAATGTTGTC
61 CAGGTTGCCG CCCAAGTCCC TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTAT
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAAACA CGTCAGCAAT ACAGTGGACA ACAAATTCTC
181 ATCCTTCACT TGCATCCTTT TCAACCGATC TCAGGTTTCAT GTTTTCGCGG ACAGGAGTTG
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGATTAA TCTTTCCATT GAAAGTGATG AGCCCAACCT
301 TCATTATGAT GTCGAGGACC TAAATATAAC CTTTCCTATG GAAGTTCAAG ACAATGTACA
361 GCTTTACGGT TACTGCAATG GGATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGAAAATG TTCTTCTATG
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCCGATTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC
481 CACGGGAAAA TTCGGATTGG AAACGCTCTT TAAGGGATTG GGATTTGGCT ATGATTGCAA
541 AACTAAAGAA TATAAGGTTG TCGGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGAAGG
601 TAAAGAATCA TATCATGAGC GTATTCTTCT TCCCTACACG GCAGAGGTAT ACACCGCGGC
661 TGCTAACTCT TGGAAAGAGA TCAAGATTGA TACATCAAGT GATACTGATC CGTATTGCAT
721 TCCCTATTCT TGTTCACTGT ACTTGAAGGG ATTTTGTTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG
781 GGAGTACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAG AATTGCCTTT
841 TAGGAGAGAA TCCGATTTTA ATTTTATGG TCTTTTTCTG TATAATGAAT CCGTCGCTTC
901 TTATTGCTCT CGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTGCTTGAA ATATGGGTAA TGGACGACTA
961 TGATGGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAACCT CCTAACCGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA
1021 GTCTCCTTCG ACATTTTGGG AATGTGACGA GGTTCTTATC CTTTCCTCAT ATGGAAAAGC
1081 CACCTCTTAT AATTCTAGTA CCGGAAATCT CAAGTATCTT CATATTCCTC CTATTATCAA
1141 TTGGATGATA GATTATGTGG AAACCTATTGT TCCAGTCAGG TGAATTGAGG ACAA
```



---

### Sequenza MRB Alfa A

Varietà: 'Max Red Barlett'; coppia di primer: Ppafor-rev

---

```
1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTGAAAC TCCTGAAGAT AAGGTGGTCG AAATCTTGTC
61 CAGGTTGCCG CCCAAGTCCT TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTAT
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAACA CCTCAGCAAT ACAGTGGACA ACAAATTCTC
181 ATCCTTCACT TGCATCCTTT TCAACCGATC TCAGGTTCAT GTTTTCGCGG ACAGGAGTTG
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGATTAA TCTTTCATT GAAAGTGATG AGCACAACCT
301 TCATTATGAT GTCGAGGACC TAAATATACC CTTTCCTATG GAAGTTCAAG ACAATGTACA
361 GCTTTACGGT TACTGCAATG GAATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGAAAATG TTCTTCTATG
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCCGATTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC
481 CACGGGAAAA TTCGGATTGG AAACGCTCTT TAAAGGATTG GGATTTGGCT ATGATTGCAA
541 AACTAAAGAA TATAAGGTTG TGCGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGAAGG
601 TAAAGAATCA TATCATGAGC GTATTCTTCT TCCCTACACG GCTGAGGTAT ACACCACGGC
661 TGCTAACTCT TGGAAAGAGA TCCAAATTGA TACATCAAGT GATACTGATC CGTATTGCAT
721 TCCCTATTCT TGTTCAAGT ACTTGAAGGG ATTCTGTTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAG AATTGCCTTT
841 TAGGAGAGAA TCCGATTTTA ATTTTATGG TCTTTTTCTG TATAATGAAT CCGTCGCTC
901 TTATTGCTCT CGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTGCTTGAA ATATGGGTAA TGGACGACTA
961 TGATAGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAACCT CTAACCGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA
1021 GTCTCCTTCG ACATTTTGG AATGTGACGA GGTTCTTATC CTTTCCTCAT ATGAAAAGC
1081 CACCTCTTAT AATTCTAGTA CCGGAAATCT CAAGTATCTT CATATTCCTC CTATTATTA
1141 TTGGATGATA GATTATGTGG AAAC TATTGT TCCAGTCAAG TGAATTGAGG ACAA
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza MRB Alfa B

Varietà: 'Max Red Barlett'; coppia di primer: Ppafor-rev

---

```
1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTAAAAC TCCTGAAGAT AAGGTGGTCC AAATCTTGTC
61 CAGGTTGCCG CCCAAGTCCC TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTAT
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAAACA CCTCAGCAAT ACAGTGGACA ACAAATTCTC
181 ATCCTTCACT TGCATCCTTT TCAACCGATC TCAGGTTTCAT GTTTTCGCGG ACAGGAGTTG
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGATTAA TCTTTCCATT GAAAGTGATG AGCACAACCT
301 TCATTATGAT GTCGAGGACC TAAATATAAC CTTTCCTATG GAAGTTCAAG ACAATGTACA
361 GCTTTACGGT TACTGCAATG GGATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGAAAATG TTCTTCTATG
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCCGATTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC
481 CACGGGAAAA TTCGGATTGG AAACGCTCTT TAAAGGATTG GGATTTGGCT ATGATTGCAA
541 AACTAAAGAA TATAAGGTTG TCGGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGAAGG
601 TAAAGAATCA TATCATGAGC GTATTCTTCT TCCCTACACG GCAGAGGTAT ACACCGCGAC
661 TGCTAACTCT TGGAAAGAGA TCAAGATTGA TACATCGAGT GATACTGATC CGTATTGCAT
721 TCCCTATTCT TGTTCAAGTGT ATTTGAAGGG ATTTTGTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAG AATTGCCTTT
841 TAGGAGAGAA TCCGATTTTA ATTTTATGG TCTTTTTCTG TATAATGAAT CCGTTGCTTC
901 TTATTGCTCT CGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTGCTTGAA ATATGGATAA TGGACGACTA
961 TGATCAAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAACCT CCTAACCGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA
1021 GTCTCCTTCG ACATTTTGGG AATGTGACGA GGTTCTTATC CTTTCCTCAT ATGAAAAGC
1081 CACCTCTTAT AATTCTAGTA CCGGAAATCT CAAGTATCTT CATATTCCTC CTATTATCAA
1141 TTGGATGATA GATTATGTGG AAACATTGTG TCCAGTCAAG TGAATTGAGG ACAA
```

---

### Sequenza Cons Alfa A

Varietà: 'Conseiller a La Coeur'; coppia di primer: Ppøfor-rev

---

1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTGAAAC TCCTGAAGAT AAGGTGGTCG AAATCTTGTC  
61 CAGGTTGCCG CCCAACTCCC TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTAT  
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAACA CCTCAGCAAT ACCGTGGACA ACAAATTCTC  
181 ATCCTTCACT TGCATCCTTT TCAACCGATC TCAGGTTCAT GTTTTCGCGG ACAGGAGTTG  
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGATTAA TCTTTCATT GAAAGTGATG AGCACAACCT  
301 TCATTATGAT GTCGAGGACC TAAATATACC CTTTCCTATG GAAGTTCAAG ACAATGTACA  
361 GCTTTACGGT TACTGCAATG GGATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGAAAATG TTCTTCTATG  
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCGGATTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC  
481 CACGGGAAAA TTCGGATTGG AAACGCTCTT TAAAGGATTG GGATTTGGCT ATGATTGCAA  
541 AACTAAAGAA TATAAGGTTG TGCGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGAAGG  
601 TAAAGAAATCA TATCATGAGC GTATTCTTCT TCCCTACACG GCTGAGGTAT ACACCACGGC  
661 TGCTAACTCT TGAAAAGAGA TCAAGATTGA CACATCAAGT GATACTGATC CGTATTGCAT  
721 TCCCTATTCT TGTTCAAGT ACTTGAAGGG ATTTTGTTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG  
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAG AATTGCCTTT  
841 TAGGAGAGAA TCCGATTTTA ATTTTATGG TCTTTTTCTG TATAATGAAT CCGTCGCTC  
901 TTATTGCTCT CGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTGCTTGAA ATATGGGTAA TGGACGACCA  
961 TGATGGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAACCT CCTAACCGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA  
1021 GTCTCCTTCG ACATTTTGG AATGTGACGA TGTTCTTATC CTTTCCTCAT ATGGAAAAGC  
1081 CACCTCTTAT AATTCTAGTA CCAGAAATAT CAAGTATCTT CATATTCCTC CTATTATCAA  
1141 TTGGATGATA GATTATATGG AAAC TATTGT TCCAGTCAAG TGAATTAAGG ACAA

## SEQUENZE

---

### Sequenza Cons Alfa B

Varietà: 'Conseiller a La Coeur'; coppia di primer: Ppafor-rev

---

```
1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTAAAAC TCCTGAAGAT AAGGTGGTCC AAATCTTGTC
61 CAGGCTGCCA CCCAAGTCCC TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTGT
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAAACA CCTCAGCAGT ACCGTGGACA ACAAATTCTC
181 ATCCTTCACT TGCATCCTTT TCAACCGATC TCAGGTTTCAT GTTTTCGCGG ACAGGAGTTG
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGATTAA TCTTTCCATT GATAGTGATG AGCACAACCT
301 TCATTATGAT GTCGAGGACC TAAATATAAC CTTTCCTATG GAAGTTCAAG ACAATGTACA
361 GCTTTACGGT TATTGCAATG GGATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGAAAATG TTCTTCTATG
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCCGGTTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC
481 CACGGGAAAA TTCGGATTGG AAACGCTCTT TAAAGGATTG GGATTTGGCT ATGATTGCAA
541 AACTAAAGAA TATAAGGTTG TCGGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGAAGG
601 TAAAGAATCA TATCATGAGC GTATTCTTCT TCCCTACACG GCAGAGGTAT ACACCACGGC
661 TGCTAACTCT TGGAAAGAGA TCAAGATTGA TGCATCAAGT GATACTGATC CGTATTGCAT
721 TCCCTATTCT TGTTCACTGT ACTTGAAGGG ATTTTGTTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAG AATTGCCTTT
841 TAGGAGAGAA TCCGATTTTA ATTTTATGG TATTTTTCTG TATAATGAAT CTGTGCTTC
901 TTATTGCTCT CGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTGCTTGAA ATATGGGTAA TGGACGACTA
961 TGATGGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAACCT CCTAACCGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA
1021 GTCTCCTTCG ACATTTTGGG AATGTGACGA GGTTCTTATC CTTTCCTCAT ATGAAAAGC
1081 CACCTCTTAT AATTCTAGTA CCGAAAATCT CAAGTATCTT CATATTCCTC CTATTATCAA
1141 TTGGATGATA GATTATATGG AAACATTGTG TCCAGTCAAG TGAATTAAGG ACAA
```

---

## Sequenza Wild Alfa A

Varietà: 'Wilder'; coppia di primer: Ppøfor-rev

---

1 CGAAATGTCC CAGGAGCATG AAAGTGAAAC TCCTGAAGAT AAGGTGGTCG AAATCTTGTC  
61 CAGGTTGCCG CCCAAGTCCC TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTAT  
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAACA CCTCAGCAGT ACCGTGGACA ACAAATTCTC  
181 ATCCTTCAGT TGCATCCTTT TCAACCGATC TCAGGTTCAT GTTTTCGCGG ACAGGAGTTG  
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGATTAA TCTTTCATT GAAAGTGATG AGCACAACCT  
301 TCATTATGAT GTCGAGGACC TAAATATACC CTTTCCTATG GAAGTTCAAG ACAATGTACA  
361 GCTTTACGGT TACTGCAATG GAATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGAAAATG TTCTTCTATG  
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCCGATTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC  
481 CACGGGAAAA TTCGGATTGG AAACGCTCTT TAAAGGATTG GGATTTGGCT ATGATTGCAA  
541 AACTAAAGAA TATAAGGTTG TGCGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGAAGG  
601 TAAAGAATCA TATCATGAGC GTATTCTTCT TCCCTACACA GCTGAGGTAT ACACCACGGC  
661 TGCTAACTCT TGGAAAGAGA TCCAAATTGA TACATCAAGT GATACTGATC CGTATTGCAT  
721 TCCCTATTCT TGTTCAAGTGT ACTGAAGGG ATTCTGTTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG  
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAG AATTGCCTTT  
841 TAGGAGAGAA TCCGATTTTA ATTTTCTGG TCTTTTTCTG TATAATGAAT CCGTCGCTC  
901 TTATTGCTCT CGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTGCTTGAA ATATGGGTAA TGGACGACTA  
961 TGATAGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAACCT CCTAACCGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA  
1021 GTCTCCTTCG ACATTTTGGG AATGTGACGA GGTTCTTATC CTTTCCTCAT ATGAAAAGC  
1081 CACCTCTTAT AATTCTAGTA CCGGAAATCT CAAGTATCTT CATATTCCTC CTATTATTAA  
1141 TTGGATGATA GATTATGTGG AAAC TATTGT TCCAGTCAAG TGAATTGAGG ACAA

## SEQUENZE

---

### Sequenza Wild Alfa B

Varietà: 'Wilder'; coppia di primer: Ppafor-rev

---

```
1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTAAAAC TCCTGAAGAT AAGGTGGTCC AAATCTTGTC
61 CAGGTTGCCG CCCAAGTCCT TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTAT
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAAACA CCTCAGCAAT ACAGTGGACA ACAAATTCTC
181 ATCCTTCACT TGCATCCTTT TCAACCGATC TCAGGTTTCAT GTTTTCGCGG ACAGGAGTTG
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGATTAA TCTTTCCATT GAAAGTGATG AGCACAACCT
301 TCATTATGAT GTCGAGGACC TAAATATACC CTTTCCTATG GAAGTTCAAG ACAATGTACA
361 GCTTTACGGT TACTGCAATG GAATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGAAAATG TTCTTCTATG
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCCGATTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC
481 CACGGGAAAA TTCGGATTGG AAACGCTCTT TAAAGGATTG GGATTTGGCT ATGATTGCAA
541 AACTAAAGAA TATAAGGTTG TGCGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGAAGG
601 TAAAGAATCA TATCATGAGC GTATTCTTCT TCCCTACACG GCTGAGGTAT ACACCACGGC
661 TGCTAACTCT TGGAAAGAGA TCCAAATTGA TACATCAAGT GATACTGATC CGTATTGCAT
721 TCCCTATTCT TGTTCAAGTGT ACTTGAAGGG ATTCTGTTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAG AATTGCCTTT
841 TAGGAGAGAA TCCGATTTTA ATTTTATGG TCTTTTTCTG TATAATGAAT CCGTCGCTTC
901 TTATTGCTCT CGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTGCTTGAA ATATGGGTAA TGGACGACTA
961 TGATAGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAACCT CCTAACCGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA
1021 GTCTCCTTCG ACATTTTGGG AATGTGACGA GGTTCTTATC CTTTCCTCAT ATGAAAAGC
1081 CACCTCTTAT AATTCTAGTA CCGGAAATCT CAAGTATCTT CATATTCCTC CTATTATTA
1141 TTGGATGATA GATTATGTGG AAACATTGTG TCCAGTCAAG TGAATTGAGG ACAA
```

---

## Sequenza Pack Alfa A

Varietà: 'Packham's Triumph'; coppia di primer: Ppafor-rev

---

```
1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTGAAAC TCCTGAAGAT AAGGTGGTCG AAATCTTGTC
61 CAGGCTGCCA CCCAAGTCCC TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTGT
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAACA CCTCAGCAGT ACCGTGGACA ACAAATTCTC
181 ATCCTTCACT TGCATCCTTT TCAACCGATC TCAGGTTCAT GTTTTCGCGG ACAGGAGTTG
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGATTAA TCTTTCATT GATAGTGATG AGCACAACCT
301 TCATTATGAT GTCGAGGACC TAAATATACC CTTTCCTATG GAAGTTCAAG ACAATGTACA
361 GCTTTACGGT TATTGCAATG GGATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGAAAATG TTCTTCTATG
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCCGTTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC
481 CACGGGAAAA TTCGGATTGG AAACGCTCTT TAAAGGATTG GGATTTGGCT ATGATTGCAA
541 AACTAAAGAA TATAAGGTTG TGCGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGAAGG
601 TAAAGAATCA TATCATGAGC GTATTCTTCT TCCCTACACG GCAGAGGTAT ACACCACGGC
661 TGCTAACTCT TGGAAAGAGA TCAAGATTGA TGCATCAAGT GATACTGATC CGTATTGCAT
721 TCCCTATTCT TGTTCAAGTGT ACTGAAGGG ATTTTGTTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAG AATTGCCTTT
841 TAGGAGAGAA TCCGATTTTA ATTTTATGG TATTTTTCTG TATAATGAAT CTGTCGCTC
901 TTATTGCTCT CGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTGCTTGAA ATATGGGTAA TGGACGACTA
961 TGATGGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAACCT CTAACCGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA
1021 GTCTCCTTCG ACATTTTGGG AATGTGACGA GGTTCTTATC CTTTCCTCAT ATGGAAAAGC
1081 CACCTCTTAT AATTCTAGTA CCGGAAATCT CAAGTATCTT CATATTCCTC CTATTATCAA
1141 TTGGATGATA GATTATATGG AAAC TATTGT TCCAGTCAAG TGAATTAAGG ACAA
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza Pack Alfa B

Varietà: 'Packham's Triumph'; coppia di primer: Ppøfor-rev

---

```
1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTAAAAC TCCTGAAGAT AAGGTGGTCC AAATCTTGTC
61 CAGGTTGCCG CCCAAGTCCT TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTAT
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAAACA CCTCAGCAAT ACAGTGGACA ACAAATTCTC
181 ATCCTTCACT TGCATCCTTT TCAACCGATC TCAGGTTTCAT GTTTTCGCGG ACAGGAGTTG
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGATTAA TCTTTCCATT GAAAGTGATG AGCACAACCT
301 TCATTATGAT GTCGAGGACC TAAATATAAC CTTTCCTATG GAAGTTCAAG ACAATGTACA
361 GCTTTACGGT TACTGCAATG GAATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGAAAATG TTCTTCTATG
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCCGATTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC
481 CACGGGAAAA TTCGGATTGG AAACGCTCTT TAAAGGATTG GGATTTGGCT ATGATTGCAA
541 AACTAAAGAA TATAAGGTTG TCGGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGAAGG
601 TAAAGAATCA TATCATGAGC GTATTCTTCT TCCCTACACG GCTGAGGTAT ACACCACGGC
661 TGCTAACTCT TGGAAAGAGA TCCAAATTGA TACATCAAGT GATACTGATC CGTATTGCAT
721 TCCCTATTCT TGTTCAAGTGT ACTTGAAGGG ATTCTGTTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAG AATTGCCTTT
841 TAGGAGAGAA TCCGATTTTA ATTTTATGG TCTTTTTCTG TATAATGAAT CCGTCGCTTC
901 TTATTGCTCT CGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTGCTTGAA ATATGGGTAA TGGACGACTA
961 TGATAGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAACCT CCTAACCGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA
1021 GTCTCCTTCG ACATTTTGGG AATGTGACGA GGTTCTTATC CTTTCCTCAT ATGGAAAAGC
1081 CACCTCTTAT AATTCTAGTA CCGGAAATCT CAAGTATCTT CATATTCCTC CTATTATTA
1141 TTGGATGATA GATTATGTGG AAACCTATTGT TCCAGTCAAG TGAATTGAGG ACAA
```



---

## Sequenza Fuji Alfa A

Varietà: 'Fuji'; coppia di primer: Ppofor-rev

---

1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTGAAAC TCCTGAAGAT AAGGTGGTCG AAATCTTGTC  
61 AAGGTTGTCG CCCAAGTCCC TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTAT  
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAACA CCTCAGCAAT ACCGTGGACA ACAAATTCTC  
181 ATCCTTCACT CGCATCCTTT TCAACCGATG TCAGGTTCAT GTCTTCCCGG ACAGGAGTTG  
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGATTAA TCTTTCATT GATAGTGATG AGCACAACCT  
301 TCGTTATGAT GTCGAGGACC GAAATATAACC CTTTCCTATA GAAGTTCAAG ACAATGTACA  
361 GCTTTACGGT TATTGCAATG GGATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGAAAATG TTCTTCTATG  
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCCGATTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC  
481 CATGGGAAAA TTCGGATTGG AAACCTCTT TAAAGGATTG GGATTTGGCT ACGATTGCAA  
541 AACTAAAGAA TATAAGGTTG TGCGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGATGG  
601 TAAAGAATCA TATATTGAGC GTATTCTTCT TCCTTACACG GCTGAGGTAT ACACCACGGC  
661 TGCTAACTCT TGGAAAGAGA TCAAGATTGA TACATCAAGT GATACTGATC CCTATTGCAT  
721 TCCCTATTCT TGTTCAATGT ACTGAAGGG ATTTTGTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG  
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAG AATTGCCTTT  
841 TCGGAGAGAA TCCGATTTTA AGTTTGTGG TCTTTTTCTG TATAATGAAT CCGTCGCTC  
901 TTATTGCTCT TGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTGGTTGAA ATATGGGTAA TGGATGATTA  
961 TGATGGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAAC TCTAACCGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA  
1021 GTCTCCTTTG AAATTTTGA AATGTGACGA GGTTCTTAGC CTTTCCTCGT ATGGAAAAGC  
1081 CACCTCTTAT AATTCTAGTA CCGGAAATCT CAAGTATTTT CATATTCCTC CTATTATCAA  
1141 TTGGATGATA GATTATGTGG AAACATTTTT TCCTGTCAAG TGAATTGAGG ACAA

## SEQUENZE

---

### Sequenza Fuji Alfa B

Varietà: 'Fuji'; coppia di primer: Ppøfor-rev

---

```
1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTAAAAC TCCTGAAGAT AAGGTGGTCG AAATCTTGTC
61 AAGGTTGTGC CCCAAGTCCC TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTAT
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAAACA CCTCAGCAAT ACCGTGGACA ACAAATTCTC
181 ATCCTGCACT CGCATCCTTT TCAACCGATG TCAGGTTTCAT GTCTTCCCGG ACAGGAGTTG
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGATTAA TCTTTCCTTT GATAGTGATG AGCACAACCT
301 TCATTATGAT GTCGAGGACC GAAATATAAC CTTTCCTATA GAAGTTCAAG ACAATGTACA
361 GCTTTACGGT TATTGCAATG GGATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGAAAATG TTCTTCTATG
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCTGATTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC
481 CACGGGAAAA TTCGGATTGG AAACGCTCTT TAAAGGATTG GGATTTGGCT ACGATTGCAA
541 AACTAAAGAA TACAAGGTTG TCGGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGATGG
601 TAAAGAATCA TATATTGAGC GTATTCTTCT TCCTTACACG GCTGAGGTAT ACACCACGGC
661 TGCTAACTCT TGGAAAGAGA TCAAGATTGA TACATCAAGT GATACTGATC CCTATTGCAT
721 TCCCTATTCT CGTTCAATGT ACTTGAAGGG ATTTTGTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATGTTT CATAGAATAG AATTGCCTTT
841 TCGGAGAGAA TCCGATTTTA AGTTTTGTGG TCTTTTTCTG TATAATGAAT CCGTCGCTTC
901 TTATTGCTCT TGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTGGTTGAA ATATGGGTAA TGGATGATTA
961 TGATGGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAAC TCTAACCGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA
1021 GTCTCCTTTG AAATTTTGGG AATGTGACGA GGTTCTTATC CTTTCCTCGT ATGGAAAAGC
1081 CACATCTTAT AATTCTAGTA CCGGAAATCT CAAGTATTTT CATATTCCGC CTATTATCAA
1141 TTGGATGATA GATTATGTGG AAAC TATTGT TTCAGTCAAG TGAATTGAGG ACAA
```

---

## Sequenza McInt Alfa A

Varietà: 'McIntosh'; coppia di primer: Ppøfor-rev

---

```
1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTGAAAC TCCTGAAGAT AAGGTGGTCG AAATCTTGTC
61 AAGTTGTGCG CCCAAGTCCC TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAGATCAT GGTGCACTAT
121 CATCAGTAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAACA CCTCAGCAAT ACCGTGGACA ACAAATTCTC
181 ATCCTTCACT TGCATCCTTT TCAACCGATG TCAGGTTCAT GTCTTCCCGG ACAGGAGTTG
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGATTAA TCTTTCCATT GATAGTGATG AGCACAACCT
301 TCATTATGAT GTCGAGGACC GAAATATAACC CTTTCCTATA GAAGTTCAAG ACAATGTACA
361 GCTTTACGGT TATTGCAATG GGATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGAAAATG TTCTTCTATG
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCCGATTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC
481 CATGGGAAAA TTCGGATTGG AAACCTCTT TAAAGGATTG GGATTTGGCT ACGATTGCAA
541 AACTAAAGAA TACAAGGTTG TGCGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ACTCAGATGG
601 TAAAGAAATCA TATATTGAGC GTATTCTTCT TCCTTACACG GCTGAGGTAT ACACCACGGC
661 TGCTAACTCT TGGAAAGAGA TCAAGATTGA TACATCAAGT GATACTGATC CCTATTGCAT
721 TCCCTATTCT TGTTCAATTG ACTTGAAGGG ATTTTGTTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATGTTT CATAGAATAG AATTGCCTTT
841 TCGGAGAGAA TCCGATTTTA AGTTTTGTGG TCTTTTTCTG TATAATGAAT CCGTTGCTTC
901 TTATTGCTCT TGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTGGTTGAA ATATGGGTAA TGGATGACTA
961 TGATGGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAAC TCTAACCGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA
1021 GTCTCCTTTG AAATTTTGGA AATGTGACGA GGTTCTTATC CTTTCCTCGT ATGGAAAAGC
1081 CACCTCTTAT AATTCTAGTA CCGGAAATCT CAAGTATTTT CATATTCCGC CTATTATCAA
1141 TTGGATGATA GATTATGTGG AAAC TATTGT TTCAGTCAAG TGAATTGAGG ACAA
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza McInt Alfa B

Varietà: 'McIntosh'; coppia di primer: Ppafor-rev

---

```
1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTAAAAC TCCTGAAGAT AAGGTGGTCG AAATCTTGTC
61 AAGGTTGTCG CCCAAGTCCC TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTAT
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAAACA CCTCAGCAAT ACCGTGGACA ACAAATTCTC
181 ATCCTTCACT CGCATCCTTT TCAACCGGTG TCAGGTTTCAT GTTTCCCGG ACAGGAGTTG
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGATTAA TCTTCCATT GATAGTGATG AGCACAACCT
301 TCGTTATGAT GTCGAGGACC GAAATATAAC CTTTCCTATA GAAGTTCAAG ACAATGTACA
361 GCTTTACGGT TATTGCAATG GGATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGAGAATG TTCTTCTATG
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCCGATTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC
481 CACGGGAAAA TTCGGATTGG AAACGCTCTT TAAAGGATTG GGATTTGGCT ACGATTGCAA
541 AACTAAAGAA TACAAGGTTG TCGGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGATGG
601 TAAAGAATCA TATATTGAGC GTATTCTTCT TCCTTACACG GCTGAGGTAT ACACCACGGC
661 TGCTAACTCT TGGAAAGAGA TCAAGATTGA TACATCAAGT GATACTGATC CGTATTGCAT
721 TCCCTATTCT CGTTCAATGT ACTTGAAGGG ATTTTGTTAT TGGTTGCAA ACGATAACGG
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAG AATTGCCTTT
841 TCGGAGAGAA TCCGATTTTA AGTTTTGTGG TCTTTTTCTG TATAATGAAT CCGTCGCTTC
901 TTATTGCTCT TGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTGGTTGAA ATATGGGTAA TGGATGATTA
961 TGATGGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAACCT CCTAACCGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA
1021 GTCTGCTTTG ACATTTTGGG AATGTGACGA GGTTCTTATC CTTTCTCGT ATGGAAAAGC
1081 CACATCTTAT AATTCTAGTA CCGAAAATCT CAAGTATTTT CATATTCCTC CTATTATCAA
1141 TTGGATGATA GATTATGTGG AAACATTGTG TTTAGTCAAG TGAATTGAGT ACAA
```

---

## Sequenza Kum Alfa A

Varietà: 'Kumoi'; coppia di primer: Ppøfor-rev

---

1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTGAAAC TCCTCAAGAT AAGGTGGTCG AAATCTTGTC  
61 CAGGTTGCCG CCCAAGTCCC TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTAT  
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAACA CCTCAGCAAT ACCGTGGACA ACAAATTCTC  
181 ATCCTTCACT TGCATCCTTT TCAACCGATC TCAGGTTCAT GTTTTCGCGG ACAGGAGTTG  
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGATTAA TCTTTCATT GAAAGTGATG AGCACAACCT  
301 TCATTATGAT GTCAAGGACC TAAATATACC CTTTCCTATG GAAGTTCAAG ACAATGTACA  
361 GCTGTACGGT TACTGCAATG GAATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGGAAATG TTCTTCTATG  
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCCGATTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC  
481 CACGGGAAGA TTCGGATTGG AAACGCTCTT TAAAGGATTG GGATTTGGCT ATGATTGCAA  
541 AACTAAAGAA TATAAGGTTG TGCGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGAAGG  
601 TAAAGAATCA TATTATGAGC GTATTCTTCT TCCCTACACG GCTGAGGTAT ACACCACGGC  
661 TGCTAAATCT TGAAAAGAGA TCAAGATTGA TACATCAAGT GATACTGATC CGTATTGCAT  
721 TCCCTATTCT TGTTCAAGT ACTTGAAGGG ATTTTGTTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG  
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAG AATTGCCTTT  
841 TAGGAGAGAA TCCGATTTTA ATTTTATGG TCTTTTTCTG TATAATGAAT CTGTCGCTTC  
901 TTATTGCTCT CGTTATGAAG AGGATTGTAA ATTGCTTGAA ATATGGGTAA TGGACGACGA  
961 TGATGGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAACCT CTAACAGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA  
1021 GTCTCCTTCG ACATTTTGG AATGTGACGA GGTTCTTATC CTTTCCTCAT ATGAAAAAGC  
1081 CACCTCTTAT AATTCTAGTA CTGGAAATCT CAAGTATCTT CATATTCCTC CTATTATCAA  
1141 TTGGATGATA GATTATGTGG AAAC TATTGT TCCAGTCAAG TGAATTGAGG ACAA

## SEQUENZE

---

### Sequenza Kum Alfa B

Varietà: 'Kumoi'; coppia di primer: Ppafor-rev

---

```
1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTAAAAC TCCTCAAGAT AAGGTGGTTG AAATCTTGTC
61 CAGGTTGCCG CCCAAGTCCC TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTAT
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAAACA CCTCAGCAAT ACCGTGGACA ACAAATTCTC
181 ATCCTTCACT TGCATCCTTT TCAACCGATC TCAGGTTTCAT GTTTTCGCGG ACAGGAGTTG
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTACGATTAA TCTTTCCATT GAAAGTGATG AGCACAACCT
301 TCATTATGAT GTCAAGGACC TAAATATAAC CTTTCCTATG GAAGTTCAAG ACAATGTACA
361 GCTTTACGGT TACTGCAATG GAATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGAAAATG TTCTTCTATG
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCCAATTCA TCCCTCCTCC TACCCCTTCC
481 CACGGGAAAA TTCGGATTGG AAACGCTCTT TAAAGGATTG GGATTTCGGCT ATGATTGCAA
541 AACTAAAGAA TATAAGGTTG TGCGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGAAGG
601 TAAAGAATCA TATTATGAGC GTATTCTTCT TCCCTACACG GCTGAGGTAT ACACCGCGGT
661 TGCTAACTCT TGGAAAGAGA TCAAGATTGA TACATCAAGT GATACTGATC CGTATTGCAT
721 TCCCTATTCT TGTTCAAGTGT ACTTGAAGGG ATTTTGTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAG AATTGCCTTT
841 TAGGAGAGAA TCCGATTTTA ATTTTATGG TCTTTTTCTG TATAAGGAAT CCGTCGCTTC
901 TTATTGCTCT CGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTGCTTGAA ATATGGGTAA TGGACGACTA
961 TGATGGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAACCT CCTAACAGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA
1021 GTCTCCTTCG ACATTTTGGG AATGTGACGA GGTTCTTATC CTTTCCTCAT ATGAAAAGC
1081 CACCTCTTAT AATTCTAGTA CCGAAAATCT CAAGTATCTT CATATTCCTC CTATTATCAA
1141 TTGGATGATA GATTATGTGG AAACATTGTG CCCAGTCAAG TGAATTGAGG ACAA
```

---

## Sequenza Cho Alfa A

Varietà: 'Chojuro'; coppia di primer: Ppøfor-rev

---

```
1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTGAAAC TCCTCAAGAT AAGGTGGTCG AAATCTTGTC
61 CAGGTTGCCG CCCAAGTCCC TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTAT
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAACA CCTCAGCAAT ACCGTGGACA ACAAATTCTC
181 ATCCTTCACT TGCATCCTTT TCAACCGATC TCAGGTTCAT GTTTTCGCGG ACAGGAGTTG
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGATTAA TCTTTCATT GAAAGTGATG AGCACAACCT
301 TCATTATGAT GTCAAGGACC TAAATATACC CTTTCCTATG GAAGTTCAAG ACAATGTACA
361 GCTGTACGGT TACTGCAATG GAATTGTCTG TGTAATAGTA GGGGGAAATG TTCTTCTATG
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCCGATTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC
481 CACGGGAAGA TTCGGATTGG AAACGCTCTT TAAAGGATTG GGATTTGGCT ATGATTGCAA
541 AACTAAAGAA TATAAGGTTG TGCGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGAAGG
601 TAAAGAAATCA TATTATGAGC GTATTCTTCT TCCCTACACG GCTGAGGTAT ACACCACGGC
661 TGCTAAATCT TGAAAAGAGA TCAAGATTGA TACATCAAGT GATACTGATC CGTATTGCAT
721 TCCCTATTCT TGTTCAAGT ACTTGAAGGG ATTTTGTTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAG AATTGCCTTT
841 TAGGAGAGAA TCCGATTTTA ATTTTATGG TCTTTTTCTG TATAATGAAT CTGTCGCTTC
901 TTATTGCTCT CGTTATGAAG AGGATTGTAA ATTGCTTGAA ATATGGGTAA TGGACGACGA
961 TGATGGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAACCT CTAACAGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA
1021 GTCTCCTTCG ACATTTTGG AATGTGACGA GGTTCTTATC CTTTCCTCAT ATGAAAAAGC
1081 CACCTCTTAT AATTCTAGTA CTGAAAATCT CAAGTATCTT CATATTCCTC CTATTATCAA
1141 TTGGATGATA GATTATGTGG AAAC TATTGT TCCAGTCAAG TGAATTGAGG ACAA
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza Cho Alfa B

Varietà: 'Chojuro'; coppia di primer: Ppafor-rev

---

```
1 CGAAATGTCC CAGGTGCATG AAAGTGAAAC TCCTGAAGAT AAGGTGGTCC AAATCTTGTC
61 CAGGTTACCG CCCAAGTCCC TGATGAGATT CAAATGCGTA CACAAATCAT GGTGCACTAT
121 CATCAATAGT CCAAGTTTTG TGGCCAAACA CCTCAGCAAT ACGGTGGACG ACAAATTCTC
181 ATCCTTCACT TGCATCCTTT TCAACCGATC TCAGGTTTCAT GTTTTCGCGG ACAGGAGTTG
241 GAAAAGAGAT GTTTTCTGGT CTATGGTTAA TCTTTCCATT GATAGTGATG AGCACAACCT
301 TCATTATGAT GTCAAGGACC TAAATATACC CTTTCCTATG GAAGTTCAAG ACAATGTACA
361 GCTTTACGGT TACTGCAATG GAATTGTCTG TGTAATAGTA GGGACAAATG TTCTTCTATG
421 CAATCCTGCA ACAAGAGAAT TCAAGCAACT TCCCGATTCA TCCCTTCTTC TACCCCTTCC
481 CACGGGAAGA TTCGGATTGG AAACGCTCTT TAAAGGATTG GGATTTGGCT ATGATTGCAA
541 AAGTAAAGAA TATAAGGTTG TGCGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGAAGG
601 TAAAGAATCA TATTATGAGC GTATTCTTCT TCCCTACACG GCTGAGGTAT ACACCGCGGC
661 TGCTAACTCT TGGAAAGAGA TCAAGATTGA TACATCAAGT GATACTGATC CGTATTGCAT
721 TCCCTATTCT TGTTCAAGTGT ACTTGAAGGG ATTTTGTTAT TGGTTTGCAA ACGATAACGG
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAG AATTGCCTTT
841 TAGGAGAGAA TCCGATTTTA ATTTTATGG TCTTTTTCTG TATAATGAAT CCGTCGCTTC
901 TTATTGCTCT CGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTGCTTGAA ATATGGGTAA TGGACGACTA
961 TGATGGAGTG AAGAGTTCAT GGACAAAACCT CCTAACCGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA
1021 GTCTCCTTCG ACACTTTGGA AATGTGACGA GGTTCTTATC CTTTCCTCAT ATGAAAAGC
1081 CACCTCTTAT AATTCTAGTA CCGGAAATCT CAAGTATCTT CATATTCCTC CTATTATCAA
1141 TTGGATGATA GATTATGTGG AAAC TATTGT TCCAGTCAAG TGAATTGAGG ACAA
```



---

### Sequenza AF Beta A FL

Varietà: 'Abate Fétel'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

1 AAACCTCTAA AGATAGGGTG ACCGAAATGA CCCAGGTACG TGAAAGTGAA ACTCCTGAAG  
61 TTAGGGTGGC CGAAATCCTA TCCAGGTTGC CTCCGAAGTC TCTGATGCGC TTCAAATGTA  
121 TACGCAAGTC TTGGGGCACG ATCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA  
181 ATTCCGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCGCCGT TCTCAGATGC  
241 CCGTTTTCCC GGACAGAAGT TGGAAACGAG AATATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC  
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAC CTTTATTATG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT  
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTCATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG  
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAG CTACCTGATT  
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGAGG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG  
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTA AAGAATACAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA  
601 ATTGTGAGTA TTCAGATGAT ATGCGAACAT TTTCTCATCG TATTGCTCTT CCTCACACAG  
661 CTGAGGTATA TGTCATGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG  
721 ATACCTATAA TTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAGGGATT TTGTTATTGG TTTGCAAGCG  
781 ATGACGAGGA ATACGTACTT TCATTTGATT TAGGTGATGA GATATTTTAT AGAATACAAT  
841 TGCCTTATAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATCT TTTTCTGTAT AATGAATCCA  
901 TTGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAATG ACGATTCTGG AATATTGGAA ATACTTGAAA  
961 TATGGTAAT GGACGATTGT GACAGAGTCA AGAGCCCATG GACAAAATA CAAACCCTTG  
1021 GACCCTTTAA AGACAATGAG AATTTATTGA CATTTTGGAA AAGTGACGAG CTTCTTATGG  
1081 TTACCTCTGA TAAAAGAGTC ATCTCTTATA ATTCTAGTAC TGGAAATCTC AAGTATATTC  
1141 ATATTCCTCC TATTATCAAT ACGGTTGCAG ATTTCAAGC TCTTATTTAT GTGAAAAGTA  
1201 TTGTTTCAGT CTAGTGAGTT GAGG

## SEQUENZE

---

### Sequenza AF Beta B FL

Varietà: 'Abate Fétel'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

```
1  AAACTCTTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCAGGTACG TGAAAGTGAA ACTCCTGAAG
61 ATAGGGTAGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC CTCCGAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA
121 TACGCAAGTC TTGGGGCACG ATCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA
181 ATTCGGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCACCGT TCTCAGATGC
241 CCGTTTTTCC GGACAGAAGT TGGAAACGAG AATATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAAC CTTTATTATG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTGATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAA CTACCTGATT
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGATG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTG AAGAATACAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA
601 ATTGTGAGTA TTCAGATGAT ATGCGAACAT TTTCTCATCG TATTGCTCTT CCTCACACGG
661 CTGAGGTATA TGTCACGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG
721 ATACCTATAA TTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAGGGACT TTGTTATTGG TTTGCAAGTG
781 ATGACAAGGA ATACGTA CTTTTCATTGATT TAGGTGATGA GATATTTTAT AGAATACAAT
841 TGCCTTGTAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATCT TTTCTGTAT AATGAATCCA
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAATG ACAATTCTGG AACATTGGAA ATACTTGAAA
961 TATGGGTAAT GGACGATTGT GATGGAGTCA AGAGCTCATG GACAAAATA CAAACCCTTG
1021 GACCCTTTAA AGACAATGAG AATTTATTGA CTTTTTGAA AAGTGACGAG CTTCTTATGG
1081 TTACCTCTGA TAAAAGAGTC ATCTCTTATA ATTCTAGTAC TGAAAATCTC AAGTATATTC
1141 ATATCCTCC TATTATCAAT ACGGTTGCAG ATTTCTGAAGC TCTTATTTAT GTGGAAAGTA
1201 TTGTTTCAGT CTAGTGAGTT GAGG
```

---

### Sequenza MRB Beta A FL

Varietà: 'Max Red Bartlett'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

1 AAACCTCTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCATGTACG TGCAAGTGAA ATCCTTGAAG  
61 ATAGGGTGGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC TACCAAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA  
121 TACGCAAGTC TTGGTGCACG GTCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA  
181 ATTCCGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCGCCGT TCTCAGATGC  
241 CCGTTTTCCC GGACAGAAGT TGGAAACGAG AATATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC  
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAC CTTTATTACG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT  
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTTCATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG  
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAA CTACCTGATT  
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGAGG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG  
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTA ATGAGTACAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA  
601 ATTGTGAGTA TTCAGATGAT ATGCGAACAT TTTCTCATTG TATTGCTCTT CCTCACACGA  
661 CTGAGGTATA TGTCACGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG  
721 ATACCTATAA TTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAAGGATT TTGTTATTGG TTTGCAAGCG  
781 ATGACGAGGA ATACGTACTT TCATTTGATT TAGGTGATGA GATATTTTAT AGAATACAAT  
841 TGCCTTATAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATCT TTTTCTGTAT AATGAATCCA  
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAATG ACAATTCTGG AATATTGGAA ATACTTGAAA  
961 TATGGTAAT GAACGACTGT GACGGAGTTA AGAGTTCATG GACAAAATA CTAACCCTTG  
1021 GACCCTTTGA AGACAATGAG AATTTATTAA CATTTTGGAA AAGTGATGAG CTTCTTATGG  
1081 TTACCTCCGA TAAAAGAGCC ATTTCTTATA ATTCTAGTAC CGGAAATCTT AAGTATATTC  
1141 ATATTCCTCC TATTATGAAT AAGGTTACAG ATTTCGAAGC TCTTATTTAT GTGAAAAGTA  
1201 TTGTTTCAGT CAAGTGAGTT GAGG

## SEQUENZE

---

### Sequenza MRB Beta Z

Varietà: 'Max Red Bartlett'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/rev

---

```
1  AAACTCCTGA AGATAAGGTG GTTGAAATTT TGTCCAGGTT GCCACCCAAG TCTCTGATGC
61 GATTCAAATG CATACGCAAG TCTTGGTGCA CTCTCATCAA TGGTCCAAGT TTTGTGGCCG
121 AACACCTCAA CAATTCCATG GACAGCAAAC GCTCGTCCAA CACTTTTATC CTTCTCAACC
181 GTTCTCAGAT GCCCGTTTTT CCAGACAACA GTTGGAAATA TGAAGTTTTT TGGTCCATGA
241 TTAGTCTTTC CATTGATAGT GATGAGCACA ACCTTCATTA TGATGTTGAG GACCTAAATA
301 TACCGTTTCC AATGGAAGAC CATCATCCTG TAGTGATTCA CGGTCATTGC AATGGGATTG
361 TCTGTGTAAT AACAGGGAAA AATGTTGTTT TATGCAATCC TGCAATTGGG GAATTCAGGC
421 AACTTCCCGA TTGCCTCCTT CTACCCCTTC CCAACATAAA ATTCCAATTG GAGACGAGCT
481 TTGGAGGATT GGGATTGCGC TATGATTGCA AAGCTAAAGA ATACAAGGTT GTGCGAATTA
541 CGGAAAATTG TGAGTATTCA GATGCTGAAC GAACATATTA CCATCGTATT GATCTTCCTC
601 ATACGGCTCA GGTATACACC ACGACTGCTA ACTCTTGAA AGAGATCAAG ATTGATATAT
661 CAAGTAAAAG CTATCTTGAT TCTTGTCAG TGTACTTGAA GCGATTTTGT TATTGGATTG
721 CAAATGATGG CGAGGAATTC ATACTTTCAT TTGATTTAGG TGATGAGATA TTTCATAGAA
781 TACAAATGCC TCTTGGGAGA GAATCCAGTT TGCAGTTTTG TAATCTTTTT CTGTATAATG
841 AATCCCTCGC TTGTTTTTGC TCTCTTACG GTCCAAGTGG CAATTCTAGA TTATTTGAAA
901 TATTTGAAAT ATGGGTAATG GACGACTATC ACGGAGTTAA GAGTTCATGG ACAAACCTTC
961 TAGCCATTGG ACCCTTTAAG CACAATGAGA ATCCATTGAC ATTTTGAAA AGTGACGAGT
1021 TTCTTATGGT TACCTCAGAT AGAAGAGCCA CCTCTTATAA TTCAAGTACC GGAAATCTCA
1081 AGTATCTTCT TATTCTCCT ATTATGAATG AGGTTATAGA ATTACAAGCT CTTATTTATG
1141 TGGAAAGTAT TGTTCCAGTC AACTGAGTTG AGG
```

---

### Sequenza Cons Beta A FL

Varietà: 'Conseiller a La Coeur'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

1 AAACCTCTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCATGTACG TGCAAGTGAA ATCCTTGAAG  
61 ATAGGGTGGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC TACCAAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA  
121 TACGCAAGTC TTGGTGCACG GTCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA  
181 ATTCCGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCGCCGT TCTCAGATGC  
241 CCGTTTTCCC GGACAGAAGT TGGAAACGAG AATATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC  
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAC CTTTATTACG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT  
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTTCATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG  
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAA CTACCTGATT  
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGAGG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG  
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTA ATGAGTACAA AGTTGTGAAA ATTATAGAAA  
601 ATTGTGAGTA TTCAGATGAT ATGCGAACAT TTTCTCATTG TATTGCTCTT CCTCACACGA  
661 CTGAGGTATA TGTCACGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG  
721 ATACCTATAA TTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAAGGATT TTGTTATTGG TTTGCAAGCG  
781 ATGACGAGGA ATACGTACTT TCATTTGATT TAGGTGATGA GATATTTTAT AGAATACAAT  
841 TGCCTTATAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATCT TTTTCTGTAT AATGAATCCA  
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAATG ACAATTCTGG AATATTGGAA ATACTTGAAA  
961 TATGGTAAT GAACGACTGT GACGGAGTTA AGAGTTCATG GACAAAATA CTAACCCTTG  
1021 GACCCTTTGA AGACAATGAG AATTTATTAA CATTTTGGAA AAGTGATGAG CTTCTTATGG  
1081 TTACCTCCGA TAAAAGAGCC ATTTCTTATA ATTCTAGTAC CGGAAATCTT AAGTATATTC  
1141 ATATTCCTCC TATTATGAAT AAGGTTACAG ATTTCGAAGC TCTTATTTAT GTGAAAAGTA  
1201 TTGTTTCAGT CAAGTGAGTT GAGG

## SEQUENZE

---

### Sequenza Cons Beta B

Varietà: 'Conseiller a La Coeur'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/rev

---

```
1  CAACTCTTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCATGTACG TGAAAGTGAA ATTCCTGAAC
61  ATAGGGTGGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC CGCCGAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA
121 TACGCAAGTC TTGGTGCACG GTCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA
181 ATTCGGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCATCGT TCTCAGATGC
241 CCGTTTTCCC GGACAGAAGT TGGAAACGAG AATATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAC TTTTATTATG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTGATG GCTATTGCAA TGGGATTCTC TGTCTAATAG
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAC CTACCTGATT
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGAGG GAAAGTTAGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCCAAGCTA AAGAATACAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA
601 ATTGTGAGTA TTCAGATGAT ATGCGAACAT TTTCTCATCG TATTGCTCTT CCTCACACGG
661 CTGAGGTATA TGTCACAAC ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG
721 ATACCTATAA CTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAGGGATT TTGTTATTGG TTTGCAAGCG
781 ATGACGAGGA ATACATACTT TCATTTGATT TAGGTGATGA GATATTTGAT AGAATACAAT
841 TGCCTTGTAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATCT TTTTTGTAT AGTGAATCCA
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAAAA GTGACAATTC TGGAATAATG GAAATACTTG
961 AAATATGGGT AATGGATGAC TGTGACGGTG TCAAGAGTTC ATGGACAAAA CTGCTAACCC
1021 TTGACCCTT TAAAGACAAT GAGAATTTAT TGACATTTTG GAAAAGTGAT GAGCTTCTTA
1081 TGGTTACCTC CGATAAAAAGA GCCATCTCTT ATAATTCTAG TACCAGAAAT CTCAAGTATA
1141 TTCATATTCC TCCTATTATC ACGGTTA
```

---

### Sequenza Cons Beta C FL

Varietà: 'Conseiller a La Coeur'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

1 AAACCTCTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCAGGTACG TGAAAGTGAA ACTCCTGAAG  
61 ATAGGGTGGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC CTCCAAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA  
121 TACGCAAGTC TTGGGGCACG ATCATCAACA ACCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA  
181 ATTCCGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCGCCGG TCTCAGATGC  
241 CCGTTTTCCC GGACAGAAGT TGGAAACGAG AACATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC  
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAC CTTTATTATG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT  
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTCATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG  
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAA CTACCTGATT  
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGAGG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG  
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTA AAGAATACAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA  
601 ATTGTGAGTA CTCAGATGAT CAACGAACAT TTTCTCATCG TATTGCTCTT CCTCACACGG  
661 CTGAGGTATA TGTCACGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG  
721 ATACCTATAA CTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAGGGATT TTGTTATTGG TTTGCAAGCG  
781 ATGATGAGGA ATACATACTT TCATTTGATT TAGGTGATGA AATATTTTAT AGAATACAAT  
841 TGCCTTATAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATT TTTTCTGTAT AATGAATCCA  
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAAAA GTGACAATTC TGGAATATTG GAAATACTTG  
961 AAATATGGAT AATGGACGAT TGTGATGGAG TCAAGAGCTC ATGGACAAAA CTACAAACCC  
1021 TTGGACCCTT TAAAGGCAAT GAGAATTTAT TGACATTTTG GAAAAGTGAC GAGTTTCTTA  
1081 TGGTTACCTC TGATAAAAGA GTCATCTCTT ATAATTCCTG TACTGGAAAT CTCAAGTATA  
1141 TTCATATTCC TCCTATTATC AATACGGTTG CAGATTTTGA AGCTCTTATT TATGTGGAAA  
1201 GTATTGTTTC AGTCCAGTGA GTTGAG

## SEQUENZE

---

### Sequenza Cons Beta D FL

Varietà: 'Conseiller a La Coeur'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

```
1  AAACTCTTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCAGGTACG TGAAAGTGAA ACTCCTGAAG
61 ATAGGGTGGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC CTCCAAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA
121 TACGCAAGTC TTGGGGCACG ATCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCCCAGCA
181 ATTCCGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCGCCGG TCTCAGATGC
241 CCGTTTTCCC GGACAGAAGT TGGAAACGAG AACATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAC CTTTATTATG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTCATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAA CTACCTGATT
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGAGG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTA AAGAATACAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA
601 ATTGTGAGTA CTCAGATGAT CAACGAACAT TTTCTCATCG TATTGCTCTT CCTCACACGG
661 CTGAGGTATA TGTCACGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATTAAGTG
721 ATACCTATAA TTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAGGGACT TTGTTATTGG TTTGCAAGCG
781 ATGACGAGGA ATATGTA CTTTTCATTTGATT TAGGTGATGA GATATTTTCAAT AGAATACAAT
841 TGCCTTGTAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATCT TTTTCGGTAT AATGAATCCA
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAATG ACAATTCTGG AATATTGGAA ATACTTGAAA
961 TATGGGTAAT GGACGATTGT GATGGAGTCA AGAGCTCATG GACAAAATA CAAACCCTTG
1021 GACCCTTTAA AGACAATGAG AATTTATTGA CTTTTTGAA AAGTGACGAG CTTCTTATGG
1081 TTACCTCTGA TAAAAGAGTC ATCTCTTATA ATTCTTGTAC TGAAAATCTC AAGTATATTC
1141 ATATTCCTCC TATTATCAAT ACGGTTGCAG ATTTTGAAGC TCTTGTTTAC GTGGAAAGTA
1201 TTGTTTCAGT CCAGTGAGTT GAGG
```



---

### Sequenza Wild Beta A FL

Varietà: 'Wilder'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

1 AAACTCTTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCATGTACG TGCAAGTGAA ATCCTTGAAG  
61 ATAGGGTGGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC TACCAAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA  
121 TACGCAAGTC TTGGTGCACG GTCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACTCAGCAA  
181 TTCCGTTGAC AACAAATTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCCGCCGTT CTCAGATGCC  
241 CGTTTTCCCG GACAGAAGTT GGAAACGAGA ATATTTCTGG TCCATGATTA ATCTTTCCCA  
301 TGATAGTGAT GAGCACAACC TTTATTACGA TGTTGAGGAC CTAAATATAC AATTTCCATT  
361 GGAAGATCAT GATCATGTAT CGATTCATGG CTATTGCAAT GGGATTGTCT GTCTAATAGT  
421 AGGGAAAAAT GCTGTTTTAT ACAATCCTGC AACGAGGGAA CTGAAGCAAC TACCTGATTC  
481 ATGCCTTCTT CTACCTTCCC CTCCGGAGGG AAAATTGCAA TTGGAATCGA CCTTTCAAGG  
541 AATGGGATTT GGCTATGATA GCAAAGCTAA TGAGTACAAG GTTGTGAAAA TTATAGAAAA  
601 TTGTGAGTAT TCAGATGATA TGTGAACATT TTCTCATCGT ATTGCTCTTC CTCACACGAC  
661 TGAGGTATAT GTCACGACTA CTAACTCTTG GAGAGTGATC GAGATTGAAA TATCAAGTGA  
721 TACCTATAAT TGTTCTTGTT CAGTATACTT GAAAGGATTT TGTTATTGGT TTGCAAGCGA  
781 TGACGAGGAA TACGTACTTT CATTGATTT AGGTGATGAG ATATTTCATA GAATACAATT  
841 GCCTTATAGG AAAGAATCCG GTTTTTATT TTATGATCTT TTTCTGTATA ATGAATCCAT  
901 CGCTTCTTTT TGCTCTCATT ATGATAATGA CAATTCTGGA ATATTGGAAA TACTTGAAAT  
961 ATGGGTAATG GACGACTGTG ACGGAGTTAA GAGTTCATGG ACAAACACTAC TAACCCTTGG  
1021 ACCCTTTGAA GACAATGAGA ATTTATTAAC ATTTTGAAAA AGTGATGAGC TTCTTATGGT  
1081 TACCTCCGAT AAAAGAGCCA TTTCTTATAA TTCTAGTACC GGAAATCTTA AGTATATTCA  
1141 TATTCCTCCT ATTATGAATA AGGTTACAGA TTTCGAAGCT CTTATTTATG TGGAAAGTAT  
1201 TGTTTCAGTC AAGTGAGTTG AGG

## SEQUENZE

---

### Sequenza Wild Beta B FL

Varietà: 'Wilder'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

```
1  AAACTCTTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCAGGTACG TGAAAGTGAA ACTCCTGAAG
61  ATAGGGTGGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC CTCCAAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA
121 TACGCAAGTC TTGGGGCACG ATTATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA
181 ATTCGGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCGCCGG TCTCAGATGC
241 CCGTTTTTCC GGACAGAAGT TGGAAACGAG AACATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC
301 CTGATAGTGA TGAGCACAAAC CTTTATTATG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTGATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAA CTACCTGATT
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGAGG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTA AAGAATACAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA
601 ATTGTGAGTA CTCAGATGAT CAACGAACAT TTTCTCATCG TATTGCTCTT CCTCACACGG
661 CTGAGGTATA TGTCACGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG
721 ATACCTATAA CTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAGGGATT TTGTTATTGG TTTGCAAGCG
781 ATGATGAGGA ATACATACTT TCATTTGATT TAGGTGATGA AATATTTTAT AGAATACAAT
841 TGCCTTATAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATTT TTTTCTGTAT AATGAATCCA
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAAAA GTGACAATTC TGGAATATTG GAAATACTTG
961 AAATATGGAT AATGGACGAT TGTGATGGAG TCAAGAGCTC ATGGACAAAA CTACAAACCC
1021 TTGGACCCTT TAAAGGCAAT GAGAATTTAT TGACATTTTG GAAAAGTGAC GAGTTTCTTA
1081 TGGTTACCTC TGATAAAAAGA GTCATCTCTT ATAATTCTAG TACTGGAAAT CTCAAGTATA
1141 TTCATATTCC TCCTATTATC AATACGGTTG CAGATTTTCA AGCTCTTATT TACGTGAAAA
1201 GTATTGTTTC AGTCCAGTGA GTTGAGG
```

---

## Sequenza Wild Beta C

Varietà: 'Wilder'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/rev

---

1 AAACCTCTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCATGTACG TGCAAGTGAA ATCCTTGAAG  
61 ATAGGGTGGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC TACCAAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA  
121 TACGCAAGTC TTGGTGCACG GTCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA  
181 ATTCCGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCGCCGT TCTCAGATGC  
241 CCGTTTTCCC GGACAGAAGT TGGAAACGAG AATATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC  
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAC CTTTATTACG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT  
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTTCATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG  
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAA CTACCTGATT  
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGAGG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG  
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTA ATGAGTACAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA  
601 ATTGTGAGTA TTCAGATGAT ATGCGAACAT TTTCTCATTG TATTGCTCTT CCTCACACGA  
661 CTGAGGTATA TGTCACGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG  
721 ATACCTATAA TTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAAGGATT TTGTTATTGG TTTGCAAGCG  
781 ATGACGAGGA ATACGTACTT TCATTTGATT TAGGTGATGA GATATTTTAT AGAATACAAT  
841 TGCCTTATAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATCT TTTTCTGTAT AATGAATCCA  
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAATG ACAATTCTGG AATATTGGAA ATACTTGAAA  
961 TATGGGCAAT GAACGACTGT GACGGAGTTA AGAGTTCATG GACAAAATA CTAACCCTTG  
1021 GACCCTTTGA AGACAATGAG AATTTATTAA CATTTTGGAA AAGTGATGAG CTTCTTATGG  
1081 TTACCTCCGA TAAAAGAGCC ATTTCTTATA ATTCTAGTAC CGGAAATCTT AAGTATATTC  
1141 ATATTCCTCC TATTATGAAT AAGGTTA

## SEQUENZE

---

### Sequenza Pack Beta A FL

Varietà: 'Packham's Triumph'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

```
1  AAACTCTTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCATGTACG TGCAAGTGAA ATCCTTGAAG
61 ATAGGGTGGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC TACCAAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA
121 TACGCAAGTC TTGGTGCACG GTCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA
181 ATTCGGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCGCCGT TCTCAGATGC
241 CCGTTTTTCC GGACAGAAGT TGGAAACGAG AATATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAAC CTTTATTACG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTGATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAA CTACCTGATT
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGAGG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTA ATGAGTACAA AGTTGTGAAA ATTATAGAAA
601 ATTGTGAGTA TTCAGATGAT ATGCGAACAT TTTCTCATTG TATTGCTCTT CCTCACACGA
661 CTGAGGTATA TGTCACGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG
721 ATACCTATAA TTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAAGGATT TTGTTATTGG TTTGCAAGCG
781 ATGACGAGGA ATACGTA CTTTTCATTG TAGGTGATGA GATATTTTCA ATGAATCCA
841 TGCCTTATAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATCT TTTTCTGTAT AATGAATCCA
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAATG ACAATTCTGG AATATTGGAA ATACTTGAAA
961 TATGGGTAAT GAACGACTGT GACGGAGTTA AGAGTTCATG GACAAAATA CTAACCCTTG
1021 GACCCTTTGA AGACAATGAG AATTTATTAA CTTTTTGAA AAGTGATGAG CTTCTTATGG
1081 TTACCTCCGA TAAAAGAGCC ATTTCTTATA ATTCTAGTAC CGGAAATCTT AAGTATATTC
1141 ATATTCCTCC TATTATGAAT AAGGTTACAG ATTTTGAAGC TCTTATTTAT GTGAAAAGTA
1201 TTGTTTCAGT CAAGTGAGTT GAGG
```

---

## Sequenza Pack Beta B

Varietà: 'Packham's Triumph'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/rev

---

```
1  CAACTCTTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCATGTACG TGAAAGTGAA ATTCCTGAAC
61  ATAGGGTGGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC CGCCGAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA
121 TACGCAAGTC TTGGTGACAG GTCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA
181 ATTCCGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCATCGT TCTCAGATGC
241 CCGTTTTCCC GGACAGAAGT TGGAACGAG AATATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAC TTTTATTATG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTATG GCTATTGCAA TGGGATTCTC TGTCTAATAG
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAC CTACCTGATT
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGAGG GAAAGTTAGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCCAAGCTA AAGAATACAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA
601 ATTGTGAGTA TTCAGATGAT ATGCGAACAT TTTCTCATCG TATTGCTCTT CCTCACACGG
661 CTGAGGTATA TGTCACAAC ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG
721 ATACCTATAA CTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAGGGATT TTGTTATTGG TTTGCAAGCG
781 ATGACGAGGA ATACATACTT TCATTTGATT TAGGTGATGA GATATTTTAT AGAATACAAT
841 TGCCTGTAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATCT TTTTTTGTAT AGTGAATCCA
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAAAA GTGACAATTC TGGAATAATG GAAATACTTG
961 AAATATGGGT AATGGATGAC TGTGACGGTG TCAAGAGTTC ATGGACAAAA CTGCTAACCC
1021 TTGGACCCTT TAAAGACAAT GAGAATTTAT TGACATTTTG GAAAAGTGAT GAGCTTCTTA
1081 TGTTACCTC CGATAAAAGA GCCATCTCTT ATAATTCTAG TACCAGAAAT CTCAAGTATA
1141 TTCATATTCC TCCTATTATC ACGGTTA
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza Fuji Beta A FL

Varietà: 'Fuji'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

```
1  AAACCTCTTAA AGATAAGGTG ACTGAAATGA CTAAGGTACG TGAAAGTGAA ACTCCTGAAG
61  ATAGGGTGGC CGAAATCTTG TCCAGGTTGC CTCCGAAGTC TCTGATGCGT TTCAAATGTA
121 TAAGCAAGTC TTGGTGCACG GTCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA
181 ATTCGGTTAA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCACCGT TCTCAGATGC
241 CCGTTTTCCC GGACAGAAGT TGGAAACGAG AATATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC
301 ATGATAGTGA TGAACACAAC CTTTATTATG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTGATG GCTATTGCAA TGGGGTTGTC TGTCTAATAG
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAA CTGCCTGATT
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGAGG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG
541 GAATGGGATT TGGATATGAT AGCAAAGCTA AAGAATACAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA
601 ATTGTGAGTA TTCAGATGAT ATGCGAACAT TTTCTCATCG TATTGCTCTT CCTCACACGG
661 CTGAGGTATA TATCAGGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG
721 ATACCTATAA TTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAGGGATT TTGTTATTGG TTTGCAAGCG
781 ATGACGAGGA ATACATACTT TCATTTGATT TAGGTAATGA GATATTTGAT AGAATACAAT
841 TGCCTTATAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATCT TTTTCTGTAT AATGAATCCA
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCTT TATGATAAAA GTGACAATTC TGGAATATTG GAAATACTTG
961 AAATATGGGT AATGGACAAT TGTGACAGAG TCAAGAGTTC ATGGACAAAA CTGCAAACCC
1021 TTGGACCCTT TAAAGACAAT GAGAATTTAT TGACATTTTG GAAAAGTGAC GAGCTTCTTA
1081 TGGTTACCTC CGATAAAAAGA GTCATCTCTT ATAATTATAG TACCGGAAAT CTCAAGTATA
1141 TTCATATTCC TCCTATTATC AATAAGGTTA CAGATTTTGA AGCTCTTATT TATGTGAAAA
1201 GTATTGTTTC AGTCAAGTGA GTTGAGG
```

---

### Sequenza Fuji Beta B FL

Varietà: 'Fuji'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

1 AAACTCTTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCAGGTACG TGAAAGTGAA ACTCCTGAAG  
61 ATAGGGTAGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC CTCCGAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA  
121 TACGCAAGTC TTGGGGCACG ATCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA  
181 ATTCCGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCACCGT TCTCAGATGC  
241 CCGTTTTCCC GGACAGAAGT TGAAAACGAG AATATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC  
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAC CTTTATTATG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT  
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG  
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAA CTACCTGATT  
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGATG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG  
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTG AGAATACAAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA  
601 ATTGTGAGTA TTCAGATGAT ATGCGAACAT TTTCTCATCG TATTGCTCTT CCTCACACGG  
661 CTGAGGTATA TGTCACGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG  
721 ATACCTATAA TTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAGGGACC TTGTTATTGG TTTGCAAGTG  
781 ATGACAAGGA ATACGTACTT TCATTTGATT TAGGTGATGA GATATTTTAT AGAATACAAT  
841 TGCCTGTAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATCT TTTTCTGTAT AATGAATCCA  
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCGT TATGATAATG ACAATTCTGG AACATTGGAA ATACTTGAAA  
961 TATGGTAAT GGACGATTGT GATGGAGTCA AGAGCTCATG GACAAAATA CAAACCCTG  
1021 GACCCTTTAA AGACAATGAG AATTTATTGA CATTTTGAA AGGTGACGAG CTTCTTATGG  
1081 TTACCTCTGA TAAAAGAGTC ATCTCTTATA ATTCTAGTAC TGGAAATCAC AAGTATATTC  
1141 ATATTCCTCC TATTATCAAT ACGGTTGCAG ATTTCAAGC TCTTATTTAT GTGAAAAGTA  
1201 TTGTTTCAGT CTAGTGAGTT GAGG

## SEQUENZE

---

### Sequenza Fuji Beta Z

Varietà: 'Fuji'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/rev

---

```
1  AAACCTCTGA AGATAAGGTG GTCGAAATCC TGTCGAGGTT GCCGCCCAAG TCTCTCATGC
61 GATTCAAATG CATAACAAG TCTTGGTGCA CTCTCATCAA AAGTTCAAGT TTTGTGGCCA
121 AACACCTCAG TAATTCAATG GACAACAAAC TCTCAACCTC CACTTGTATC CTTCTCAACC
181 GTTCTGAAAT GCCCGTTTTT CCGGACGACA GTTGAAGTA TGAAGTTTTA TGGTCCATGA
241 TTAATCTTTC CATTGATAGT GATGAGCACA ACCTTCATTA TAATGTTGAG GACCTAAATA
301 TACCGTTTCC AATGGAATAC CATCACCTG TATTGATTCA CGGTTATTGC GATGGTATTT
361 TCTGTGTAAT TACAGGGGAA AATGTTGTTT TATGCAATCC TGCAATTGGG GAATTCAGGC
421 AACTTCCCGA TTCATGCCTT CTTCTACCTG CCCCTCCTGA GAGAAAATTC GAATTGGAAA
481 CGACCTTTCG GGCATTGGGA TTTGGCTATG ATTGCAAAGC TAAAGAATAC AAGGTTGTGC
541 GAATTATAGA AAATTGTGAA TATTCTGATG ATGAGCAAAC ATATAATCAT CGTATTTCTC
601 TTCCTTACAC TGCTGAGGTA TACACAACGA CTGGTAACTC TTGGAAAGAG ATCAATATTG
661 ATGTATCAAG TAAAGCCTAT CCATGTTCTT GTTCAGTGTA CTTGAAGGGA TTTTGTATT
721 GGTTTGCAAC AGATGGCGAG GAATACATAC TTTCAATTTGA CTTAGGAGAT GAGATATTTT
781 ACAGAATACA ATGCCTTCT AGGAAAGAAT CCGGTTTTAA GTTTTATAGT CTTTTTCTGT
841 ACAATGAATC AGTCACCTTCT TATTGCTCTC ATTACGATCC AAGCGAGGAT TCTAAATTAT
901 TTGAAATATG GGTGATGGAC AACTATGACG GAGTTAAGAG CTCATGGAAG AAACCTCTAA
961 CCGTTGGACC CCTTAAAGGC ATTCGTTATC CATTGACACT TTGAAAGGT GATGAACCTC
1021 TTATGCTTGC CTCCGACAAA AGAGTCACCT CCTATAATTC TAGTACCAGA AATCTCAAGT
1081 ATCTTCATAT TCCTCCTATT ATCGATGAGA TCA
```



---

### Sequenza McInt Beta A

Varietà: 'McIntosh'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/rev

---

```
1 AAAGTCTTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CTCAGGTACG TGAAAGTGAA ACTCCTGAAG
61 ATAGGGTGGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC CGCCGAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA
121 TACGCAAGTC TTGGTACAAG GTCATCAAAA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA
181 AAAATTCCGT TGACAACAAA TTCTCATCCT CCACTTGTAT CCTTCTCCAC CGTTCTCAGA
241 TGCCCGTTTT CCCGGACAGA AGTTGGAAAC GAGAATATTT CTGGTCCATG ATTAATCTTT
301 CCCATGATAG TGATAAGCAC AACCTTTATT ATGATGTTGA GGACCTAAAT ATACAATTTT
361 CATTGGAAGA TCATGATCAT GTATCGATTC ATGGCTATTG TAATGGGATT GTCTGTCTAA
421 TAGTAGGGAA AAATGCTGTT TTATACAATC CTGCAACGAG GGAAGTGAAG CAACTACCTG
481 ATTCATGCCT TCTTCTACCT TCCCCTCCGG AGGGAAAATT CAAATTGGAA TCGACCTTTC
541 AAGGAATGGG ATTTGGCTAT GATAGCCAAG CTAAAGAATA CAAGGTTGTC AAAATTATAG
601 AAAATTGTGA GTATTCAGAT GATATGAGAA CATTTTCTCA TCGTATTGCT CTTCTCACA
661 CGGCTGAGGT ATATGTCATG ACTACTAACT CTTGGAGAGT GATCGAGATT GAAATATCAA
721 GTGATACCTA TAACTGTTCT TGTCAGTAT ACTTGAAGGG ATTTTGTTAT TGGTTTGCAA
781 GCGATGACGA GGAATATATA CTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATAGAATAC
841 AATTGCCTTA TAGGAAAGAA TCCGGTTTTT TGTTTTATAA TCTTTTTCTG TATAATGAAT
901 CCATCGCTTC TTTTGTCTCT CATTATGATA AAAGTGACAA TTCTGGAATA CTGAAAATAC
961 TTGAAATATG GGTAATGGAC GACTGTGATG GAGTCAAGAG TTCATGGACA AAAGTCTAA
1021 CCCTTGACC CTTTAAAGAC AATGAGAATT TATTGACATT TTGGAAAAGT GACGAGCTTC
1081 TTATGGTTAC CTCCGATAAA AAAACCATCT CTTATAATTC TAGTACCGGA AATCTCAAGT
1141 ATATTCATAT TCCTCCTATT ATCAATAAGG TTA
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza McInt Beta B FL

Varietà: 'McIntosh'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

```
1  AAACTCTTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCAGGTACG TGAAAGTGAA ACTCCTGAAG
61  ATAGGGTGGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC CTCCAAAGTC TCTGATGCGG CTCAAATGTA
121 TACGCAAGTC TTGGGGCACG ATCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA
181 ATTCCGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCGCCGG TCTCAGATGC
241 CCGTTTTTCC GGACAGAAGT TGGAAACGAG AACATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAAC CTTTATTATG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTGATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAA CTACCTGATT
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGAGG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTA AAGAATACAA AGTTGTGAAA ATTATAGAAA
601 ATTGTGAGTA CTCAGATGAT CAACGAACAT TTTCTCATCG TATTGCTCTT CCTCACACGG
661 CTGAGGTATA TGTCACGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG
721 ATACCTATAA CTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAGGGATT TTGTTATTGG TTTGCAAGCG
781 ATGATGAGGA ATACATACTT TCATTTGATT TAGGTGATGA AATATTTTAT AGAATACAAT
841 TGCCTTATAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATTT TTTTCTATAT AATGAATCCA
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAAAA GTGACAATTC TGGAATATTG GAAATACTTG
961 AAATATGGAT AATGGACGAT TGTGATGGAG TCAAGAGCTC ATGGACAAAA CTACAAACCC
1021 TTGGACCCTT TAAAGGCAAT GAGAATTTAT TGACATTTTG GAAAAGTGAC GAGTTTCTTA
1081 TGGTTACCTC TGATAAAAAGA GTCATCTCTT ATAATTCTAG TACTGGAAAT CTCAAGTATA
1141 TTCATATTCC TCCTATTATC AATACGGTTG CAGATTTTCA AGCTCTTATT TACGTGAAAA
1201 GTATTGTTTC AGTCCAGTGA GTTGAGG
```

---

### Sequenza McInt Beta C FL

Varietà: 'McIntosh'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

```
 1 AAACCTTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCAGGTACG TGAAAGTGAA ACTCCTGAAG
61 ATAGGGTAGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC CTCCGAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA
121 TACGCAAGTC TTGGGGCACG ATCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA
181 ATTCCGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCACCGT TCTCAGATGC
241 CCGTTTTCCC GGACAGAAGT TGAAAACGAG AATATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAC CTTTATTATG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAA CTACCTGATT
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGATG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTG AAGAATACAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA
601 ATTGTGAGTA TTCAGATGAT ATGCGAACAT TTTCTCATCG TATTGCTCTT CCTCACACGG
661 CTGAGGTATA TGTCACGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG
721 ATACCTATAA TTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAGGGACT TTGTTATTGG TTTGCAAGTG
781 ATGACAAGGA ATACGTACTT TCATTTGATT TAGGTGATGA GATATTTTAT AGAATACAAT
841 TGCCTGTAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATCT TTTTCTGTAT AATGAATCCA
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAATG ACAATTCTGG AACATTGGAA ATACTTGAAA
961 TATGGTAAT GGACGATTGT GATGGAGTCA AGAGCTCATG GACAAAATA CAAACCCTG
1021 GACCCTTAA AGACAATGAG AATTTATTGA CATTTTGGAA AAGTGACGAG CTTCTTATGG
1081 TTACCTCTGA TAAAAGAGTC ATCTCTTATA ATTCTAGTAC TGGAAATCTC AAGTATATTC
1141 ATATTCCTCC TATTATCGAT ACGGTTGCAG ATTTCAAGC TCTTATTTAT GTGAAAAGTA
1201 TTGTTTCAGT CTAGTGAGTT GAGG
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza McInt Beta Z

Varietà: 'McIntosh'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/rev

---

```
1  AAACTCCTGA AGATAAGGTG GTCGAAATCC TGTCGAGGTT GCCGCCAAG TCTCTCATGC
61 GATTCAAATG CATAACAGG TCTTGGTGCA CTCTCATCAA AAGTTCAAGT TTTGTGGCCA
121 AACACCTCAG TAATTCTATA GACAACAAAC TCTCAGCCTC CACTTGTATC CTTCTCAACC
181 GTTCTGAAAT GCCCGTTTTT CCGGACGACA GTTGGAAGTA TGAAGTTTTA TGGTCCATGA
241 TTAATCTTTC CATTGATAGT GATGAGCACA ACCTTCATTA TAATGTTGAG GGCCTAAATA
301 TACCGTTTCC AATGGAATAC CATCATCCTG TATTGATTCA CGGTTATTGC GATGGTATTT
361 TCTGTGTAAT TACAGGGGAA AATGTTGTTT TATGCAATCC TGCAATTGGG GAATTCAGGC
421 AACTTCCCGA TTCATGCCTT CTTCTACCTG CCCCTCCTGA GAGAAAATTC GAATTGGAAA
481 CGACCTTTCG GGCATTGGGA TTTGGCTATG ATTGCAAAGC TAAAGAATAC AAGGTTGTGC
541 GAATTATAGA AAATTGTGAA TATTCTGATG ATGAGCAAAC ATATAATCAT CGTATTTCTC
601 TTCCTTACAC TGCTGAGGTA TACACAACGA CTGGTAACTC TTGGAAAGAG ATCAATATTG
661 ATGTATCAAG TAAAGCCTAT CCATGTTCTT GTTCAGTGTA CTTGAAGGGA TTTTGTATT
721 GGTTTGCAAC AGATGGCGAG GAATACATAC TTTCATTTGA CTTAGGAGAT GAGATATTTT
781 ACAGAATACA ATGCCTTCT AGGAAAGAAT CCGGTTTTAA GTTTTATAGT CTTTTTCTGT
841 ACAATGAATC AGTCACTTCT TATTGCTCTC ATTACGATCC AAGCGAGGAT TCTAAATTAT
901 TTGAAATATG GGTGATGGAC AACTATGACG GAGTTAAGAG TTCATGGAAG AAACCTCTAA
961 CCGTTGGACC CCTTAAAGGC ATTCGTTATC CATTGACACT TTGAAAGGT GATGAACCTC
1021 TTATGCTTGC CTCCGACAAA AGAGTCACCT CCTATAATTC TAGTACCAGA AATCTCAAGT
1081 ATCTTCATAT TCCTCCTATT ATCGATGAGA TCA
```

---

### Sequenza Kum Beta A FL

Varietà: 'Kumoi'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

1 AAACCTCTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCAGGTACG TGAAAGTGAA ACTCCTGAAG  
61 ATAGGGTGGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC CTCCAAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA  
121 TACGCAAGTC TTGGGGCACG ATCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA  
181 ATTCCGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCGCCGG TCTCAGATGC  
241 CCGTTTTCCC GGACAGAAGT TGGAAACGAG AACATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC  
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAC CTTTATTATG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT  
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTCATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG  
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAA CTACCTGATT  
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGAGG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG  
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTA AAGAATACAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA  
601 ATTGTGAGTA CTCAGATGAT CAACGAACAT TTTCTCATCG TATTGCTCTT CCTCACACGG  
661 CTGAGGTATA TGTCACGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG  
721 ATACCTATAA CTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAGGGATT TTGTTATTGG TTTGCAAGCG  
781 ATGATGAGGA ATACATACTT TCATTTGATT TAGGTGATGA AATATTTTAT AGAATACAAT  
841 TGCCTTATAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATT TTTTCTGTAT AATGAATCCA  
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAAAA GTGACAATTC TGGAATATTG GAAATACTTG  
961 AAATATGGAT AATGGACGAT TGTGATGGAG TCAAGAGCTC ATGGACAAAA CTACAAACCC  
1021 TTGGACCCTT TAAAGGCAAT GAGAATTTAT TGACATTTTG GAAAAGTGAC GAGTTTCTTA  
1081 TGTTACCTC TGATAAAAGA GTCATCTCTT ATAATTCTAG TACTGGAAAT CTCAAGTATA  
1141 TTCATATTCC TCCTATTATC AATACGGTTG CAGATTTTGA AGCTCTTATT TACGTGGAAA  
1201 GTATTGTTTC AGTCCAGTGA GTTGAGG

## SEQUENZE

---

### Sequenza Kum Beta B FL

Varietà: 'Kumoi'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

```
1  AAACTCTTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCATGTACG TGCAAGTGAA ATCCTTGAAG
61 ATAGGGTGGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC TACCAAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA
121 TACGCAAGTC TTGGTGCACG GTCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA
181 ATTCGGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCGCCGT TCTCAGATGC
241 CCGTTTTCCC GGACAGAAGT TGGAAACGAG AATATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAAC CTTTATTACG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTGATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAA CTACCTGATT
481 CATGCCTTCT TCTACCCTCC CCTCCGGAGG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTA ATGAGTACAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA
601 ATTGTGAGTA TTCAGATGAT ATGCGAACAT TTTCTCATTG TATTGCTCTT CCTCACACGA
661 CTGAGGTATA TGTCACGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG
721 ATACCTATAA TTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAAGGATT TTGTTATTGG TTTGCAAGCG
781 ATGACGAGGA ATACGTA CTT TCACTTGATT TAGGTGATGA GATATTTTCAAT AGAATACAAT
841 TGCCTTATAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATCT TTTTCTGTAT AATGAATCCA
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAATG ACAATTCTGG AATATTGGAA ATACTTGAAA
961 TATGGGTAAT GAACGACTGT GACGGAGTTA AGAGTTCATG GACAAAATA CTAACCCTTG
1021 GACCCTTTGA AGACAATGAG AATTTATTAA CTTTTTGAA AAGTGATGAG CTTCTTATGG
1081 TTACCTCCGA TAAAAGAGCC ATTTCTTATA ATTCTAGTAC CGGAAATCTT AAGTATATTC
1141 ATATTCCTCC TATTATGAAT AAGGTTACAG ATTTCGAAGC TCTTATTTAT GTGAAAAGTA
1201 TTGTTTCAGT CAAGTGAGTT GAGG
```

---

### Sequenza Kum Beta Z

Varietà: 'Kumoi'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/rev

---

1 AAACTCCTGA AGATAAGGTG GTTGAAATTT TGTCCAGGTT GCCACCCAAG TCTCTGATGC  
61 GATTCAAATG CATACGCAAG TCTTGGTGCA CTCTCATCAA TGGTCCAAGT TTTGTGGCCG  
121 AACACCTCAA CAATTCCGTG GACAGCAAAC GCTCGTCCAA CACTTGTATC CTTCTCAACC  
181 GTTCTCAGAT GCCCGTTTTT CCAGACAACA GTTGAAATA TGAAGTTTTT TGGTCCATGA  
241 TTAGTCTTTC CATTGATAGT GATGAGCACA ACCTTCATTA TGATGTTGAG GACCTAAATA  
301 TACCGTTTCC AATGGAAGAC CATCATCCTG TAGTGATTCA CGGTCATTGC AATGGGATTG  
361 TCTGTGTAAT AACAGGAAA AATGTTGTTT TATGCAATCC TGCAATTGGG GAATTCAGGC  
421 AACTTCCCGA TTGCCTCCTT CTACCCCTTC CCAACATAAA ATTCCAATTG GAGACGAGCT  
481 TTGGAGGATT GGGATTCGGC TATGATTGCA AAGCTAAAGA ATACAAGGTT GTGCGAATTA  
541 CAGAAAATTG TGAGTATTCA GATGCTGAAC GAACATATTA CCATCGTATT GATCTTCCTC  
601 ATACGGCTCA GGTATACACC ACGACTGCTA ACTCTGGAA AGAGATCAAG ATTGATATAT  
661 CAAGTAAAAG CTATCTTGAT TCTTGTCCAG TGTACTTGAA GGGATTTTGT TATTGGATTG  
721 CAAATGATGG CGAGGAATTC ATACTTTCAT TTGATTTAAG TGATGAGATA TTTCATAGAA  
781 TACAAATGCC TCTTGGGAGA GAATCCAGTT TGCAGTTTTG TAATCTTTTT TTGTATAATG  
841 AATCCCTCGC TTGTTTTTGC TCTCTTACG GTCCAAGTGG CAATTCTAGA TTATTGAAA  
901 TATTTGAAAT ATGGGTAATG GACGACTATC ACGGAGTTAA GAGTTCATGG ACAAACCTC  
961 TAGCCATTGG ACCCTTTAAG CACAATGAGA ATCCATTGAC ATTTTGAAA AGTGACGAGT  
1021 TTCTTATGGT TACCTCAGAT AGAAGAGTCA CCTCTTATAA TTCAAGTACC GGAAATCTCA  
1081 AGTATCTTCT TATTCTCCT ATTATGAATG AGGTTATAGA TTTACAAGCT CTTATTTATG  
1141 TGGAAAGTAT TGTTCCAGTC AACTGAGTTG AGG

## SEQUENZE

---

### Sequenza Cho Beta A FL

Varietà: 'Chojuro'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

```
1  AAACTCTTAA AGATAGGGTG ACCGAAATGA CCCAGGTACG TGAAAGTGAA ACTCCTGAAG
61  TTAGGGTGGC CGAAATCCTA TCCAGGTTGC CTCCGAAGTC TCTGATGCGC TTCAAATGTA
121 TACGCAAGTC TTGGGGCACG ATCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA
181 ATTCCGTTGA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCGCCGT TCTCAGATGC
241 CCGTTTTCCC GGACAGAAGT TGGAAACGAG AATATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAC CTTTATTATG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTGATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAG CTACCTGATT
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGAGG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTA AAGAATACAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA
601 ATTGTGAGTA TTCAGATGAT ATGCGAACAT TTTCTCATCG TATTGCTCTT CCTCACACAG
661 CTGAGGTATA TGTCATGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG
721 ATACCTATAA TTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAGGGATT TTGTTATTGG TTTGCAAGCG
781 ATGACGAGGA ATACGTA CTTTTCATTGATT TAGGTGATGA GATATTTTCAAT AGAATACAAT
841 TGCCTTATAG GAAAGAATCC GGTTTTTTGT TTTATGATCT TTTTCTGTAT AATGAATCCA
901 TTGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAATG ACGATTCTGG AATATTGGAA ATACTTGAAA
961 TATGGGTAAT GGACGATTGT GACAGAGTCA AGAGCTCATG GACAAAATA CAAACCCTTG
1021 GACCCTTTAA AGACAATGAG AATTTATTGA CTTTTTGAA AAGTGACGAG CTTCTTATGG
1081 TTACCTCTGA TAAAAGAGTC GTCTCTTATA ATTCTACTAC TGAAAATCTC AAGTATATTC
1141 ATATTCCTCC TGTTATCAAT ACGGTTGCAG ATTTTGAAGC TCTTATTTAT GTGGAAAGTA
1201 TCGTTTCAGT CCAGTGAGTT AAGG
```



---

### Sequenza Cho Beta B FL

Varietà: 'Chojuro'; coppia di primer: Pp $\beta$ for/FL-rev

---

1 AAACCTCTAA AGATAGGGTG ACTGAAATGA CCCAGGTACG TGAAAGTGAA ACTCCTGGAG  
61 ATAGGGTAGC CGAAATCCTG TCCAGGTTGC CTCCGAAGTC TCTGATGCGG TTCAAATGTA  
121 TACGCAAGTC TTGGGGCACG ATCATCAACA ATCCAAGTTT TATGGCCAAA CACCTCAGCA  
181 ATTCCGTAA CAACAAATTC TCATCCTCCA CTTGTATCCT TCTCCACCGT TCTCAGATGC  
241 CCGTTTTCCC GGACAGAAGT TGAAAACGAG AATATTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCC  
301 ATGATAGTGA TGAGCACAAC CTTTATTATG ATGTTGAGGA CCTAAATATA CAATTTCCAT  
361 TGGAAGATCA TGATCATGTA TCGATTCATG GCTATTGCAA TGGGATTGTC TGTCTAATAG  
421 TAGGGAAAAA TGCTGTTTTA TACAATCCTG CAACGAGGGA ACTGAAGCAA CTGCCTGATT  
481 CATGCCTTCT TCTACCTTCC CCTCCGGATG GAAAATTCGA ATTGGAATCG ACCTTTCAAG  
541 GAATGGGATT TGGCTATGAT AGCAAAGCTG AAGAATACAA GGTGTGAAA ATTATAGAAA  
601 ATTGTGAGTA TTCAGATGAT ATGCGAACAT TTTCTCATCG TATTGCTCTT CCTCTCACGG  
661 CTGAGGTATA TGTCACGACT ACTAACTCTT GGAGAGTGAT CGAGATTGAA ATATCAAGTG  
721 ATACCTATAA TTGTTCTTGT TCAGTATACT TGAAGGGACT TTGTTATTGG TTTGCAAGTG  
781 ATGACAAGGA ATACGTACTT TCATTTGATT TAGGTGATGA GATATTTTAT AGAATACAAT  
841 TGCCTGTAG GAAAGAATCC GGTTTTTGT TTTATGATCT TTTTCTGTAT AATGAATCCA  
901 TCGCTTCTTT TTGCTCTCAT TATGATAATG ACAATTCTGG AACATTGGAA ATACTTGAAA  
961 TATGGTAAT GGACGATTGT GATGGAGTCA AGAGCTCATG GACAAAATA CAAACCCTTG  
1021 GACCCTTAA AGACAATGAG AATTTATTGA CATTTTGAA AAGTGACGAG CTTCTTATGG  
1081 TTACCTCTGA TAAAAGAGTC ATCTCTTATA ATTCTAGTAC TGGAAATCTC AAGTATATTC  
1141 ATATTCCTCC TATTATCAAT ACGGTTGCAG ATTTCAAGC TCTTATTTAT GTGAAAAGTA  
1201 TTGTTTCAGT CTAGTGAGTT GAGG

## SEQUENZE

---

### Sequenza AF Gamma A

Varietà: 'Abate Fétel'; coppia di primer: Pp $\gamma$ for-rev

---

```
1 AACAAAATTG CCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCCTGAAGA TAGGATGGTC
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC ACCCAAGTCT CTGATGCGAT TCAAATGCAT ACGCAAATCT
121 TGGTGCACCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ACCTCAGCGA TTCTGTGGAC
181 AACAAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA CGTTTGCTCG
241 GAAAAAAGTT GGAAACAAGA AGTTTCATGG TCCGTGATTA ATCTTTCCAT TGATGGTGAT
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGACCTAACT ATTGTACCGT TTCTAAAGGA TGACCCTCAT
361 GAAGTAGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTTG
421 TTTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA
481 CCCCTTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT
541 GGTATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT
601 GAGTATTCAG ATGATGGAGA AACATATATC GAGCATATTG CTCTTCCTTA CACTGCTGAA
661 GTATACACCA TGACTIONTAA CTCTTGAAAA GAGATCACGA TTGATATACT AAGTAAAATA
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTAT TCAGTGTATT TGAAAGGGTT TTGTTATTGG
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TATCTAATGA AATATCTGAT
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGAGAATTC GGTTTTAAGC GTGATGGTAT TTTTCTGTAT
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCACTAGT TACGAAGAGC CTCCACATT ATTTGAAATA
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA TGGATTTAAG AGTTCATGGA CAAAACACCT AACTGCTGGA
1021 CCTTTTAAAG ACATGGACTT TCCATTGACA CATTGGAAAC GTGACGAGTT TCTTATGATT
1081 GCTTCAGATG GAAGAGTTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT
1141 ATTCCTGTTA TTATTAATGA GAATAGGGTT GTAGATTACG TGAAAAGTAT TGTTTTAGTC
1201 AA
```

---

## Sequenza AF Gamma B

Varietà: 'Abate Fétel'; coppia di primer: P $\gamma$ for-rev

---

1 AACAAAATTG TCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCCCGAAGA TAGGATGGTC  
61 GAAATCTTGT CCAGGTTACC ACCCAAGTCT CTGATGCGAT TCAAATGCAT ACGCAAATCT  
121 TGGTGCACCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ATCTCAGCGA TTCTGTGGAC  
181 AACAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA CGTTTGCTCG  
241 GAACAGAGTT GGAAACAAGA AGTTTCATGG TCCGTGATTA ATCTTTCCAT TGATGGTGAT  
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGACCTAACT ACTGTACCGT TTCTAAAGGA TGACCCTCAT  
361 GAAGTAGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTCC  
421 TTTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA  
481 CCCCTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT  
541 GGTATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT  
601 GAGTATTCAG ATGATGGAGA AACATATATG GAGCATATTG CTCTTCCTTA CACTGCTGAA  
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAA GAGATCACGA TTGATATACT AAGTAAAATA  
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTAT TCAGTGTATT TGAAGGGGTT TTGTTATTGG  
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT  
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGAGAATTT GGTTTTAAGC GTGATGGTAT TTTTCTGTAT  
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCAGTAGT TACGAAGAGC CTTCCACATT ATTTGAAAATA  
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA CGGATTTAAG AGTTCATGGA CAAAACACCT AACTGCTGGA  
1021 CCTTTTACAG ATATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAC GTGACGAGCT TCTTATGATT  
1081 GCCTCGGATG GAAGAGCTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT  
1141 ATTCCTGTTA TTATTAATCA GAATAGGGTT GTAGATTATG TGAAAAGTAT TATTCTAGTC  
1201 AA

## SEQUENZE

---

### Sequenza MRB Gamma A

Varietà: 'Max Red Bartlett'; coppia di primer: Ppγfor-rev

---

```
1 AATAAAATTG CCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCCTGAAGA TAGGATGGTC
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC GCCCAAGTCT CTGATGCGAT TCAAATGCAT ACGCAAATCT
121 TGGTGCACCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ATCTCAGCGA TTCTGTGGAC
181 AACAAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA CGTTTGCTCG
241 GAAGAGAGTT GGAAACAAGA AGTTTCATGG TCCGTGATTA ATATTTCCAT TGATGGTGAT
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGACCTAACT AATGTACCGC TTCTAAAGGA TGACCCTCAT
361 GAAGTTGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTTG
421 TTTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA
481 CCCCTTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT
541 GGTATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT
601 GAGTATTCAG ATGATGGAGA AACATATATG GAGCATATTG CTCTTCCTTA CACTGCTGAA
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAAA GAGATCACGA TTGATATACT AAGTAAAATA
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTAT TCAGTGTATT TGAAGGGGTT TTGTTATTGG
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGAGAATTC GGTTTTAAGC GTGATGGTAT TTTTCTGTAT
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCAGTAGT TACGAAGAGC CTCCACATT ATTTGAAATA
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA TGGATCTAAG AGTTTATGGA CAAAACACCT AACTGCTGGA
1021 CCTTTTAATG ATATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAAT GTGACGAGCT TCTTATGATT
1081 GCCTCCGATG GAAGAGCTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT
1141 ATTCCTGTTA TTATTAATCA GAATAGGGTT GTAGATTACG TGAAAAGTAT TATTCTAGTC
1201 AA
```

---

## Sequenza MRB Gamma B

Varietà: 'Max Red Bartlett'; coppia di primer: Pp $\gamma$ for-rev

---

```
1 AACAAAATTG CCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCCTGAAGA TAGGATGGTC
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC ACCCAAGTCT CTGATGCGAT TCAAATGCAT ACGCAAATCT
121 TGGTGCACCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ATCTCAGCGA CTCTGTGGAC
181 AACAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA CGTTTGCTCG
241 GAAGAGAGTT GGAAACAAGA AGTTTCATGG TCCGTGATTA ATCTTTCCAT TGATGGTGAT
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGACCTAACT AATGTACCGC TTCTAAAGGA TGACCCTCAT
361 GAAGTTGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTTTC
421 TTTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA
481 CCCCTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT
541 GGTATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT
601 GAGTATTCAG ATGATGGAGA AACATATATC GAGCATATTG CTCTTCCTTA CACTGCTGAA
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAA GAGATCACGC TTGATATAACC AAGTAAAATA
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTAT TCAGTGTATT TGAAGGGGTT TTGTTATTGG
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGAGAATTC GGTTTTAAGC GTGATGGTAT TTTTCTGTAT
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCAGTAGT TACGAAGAGC CTTCCACATT ATTTGAAAATA
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA CGGATTTAAG AGTTCATGGA CAAAACACCT AACTGCTGGA
1021 CCTTTTACAG ATATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAC GTGACGAGCT TCTTATGATT
1081 GCCTCGATG GAAGAGCTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCGT
1141 ATTCCTGTTA TTATTAATCA GAATAGGGTT GTAGATTACG TGAAAACATAT TATTCTAGTC
1201 AA
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza Cons Gamma A

Varietà: 'Conseiller a La Coeur'; coppia di primer: Pp $\gamma$ for-rev

---

```
1 AACAAAATTG CCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCCTGAAGA TAGGATAGTC
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC ACCCAAGTCT CTGATGCGAT TCAAATGCAT ACGCAAATCT
121 TGGTGCACCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ATCTCCGCGA CTCTGTGGAC
181 AACAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA CGTTTGCTCG
241 GAAGAGAGTT GGAAACAAGA AGTTTCATGG TCCGTGATTA ATCTTTCCAT TGATGGTGTAT
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGACCTAACT AATGTACCGC TTCTAAAGGA TGACCCTCAT
361 GAAGTTGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTTCT
421 TTTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA
481 CCCCTTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT
541 GGTATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT
601 GAGTATTCAG ATGATGGAGA AACATATATC GAGCATATTG CTCTTCCTTA CACTGCTGAA
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAAA GAGATCACGA TTGATATACC AAGTAAAATA
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTAT TCAGTGTATT TGAAGGGGTT TTGTTATTGG
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGAGAATTC GGTTTTAAGC GTGATGGTAT TTTTCTGTAT
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCAGTAGT TACGAAGAGC CTCCACATT ATTTGAAATA
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA CGGATTTAAG AGTTCATGGA CAAAACACCT AACTGCTGGA
1021 CCTTTTACAG ATATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAAC GTGACGAGCT TCTTATGATT
1081 GCCTCCGATG GAAGAGCTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT
1141 ATTCTGTGTA TTATTAATCA GAATAGAGTT GTAGATTACG TGAAAAGTAT TATTCTAGTC
1201 AA
```

---

## Sequenza Cons Gamma B

Varietà: 'Conseiller a La Coeur'; coppia di primer: Ppγfor-rev

---

1 AACAAAATTG CCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCCTGAAGA TAGGATGGTC  
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC ACCCAAGTCT CTGATGCGAT TCAAATGCAT ACGCAAATCT  
121 TGGTGCACCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ACCTCAGCGA TTCTGTGGAC  
181 AACAAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA CGTTTGCTCG  
241 GAAGAGAGTT GGAAACAAGA AGTTTCATGG TCCGTGATTA ATCTTTCCAT TGATGGTGAT  
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGACCTAACT AATGTACCGC TTCTAAAGGA TGACCCTCAT  
361 GAAGTTGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTTCT  
421 TTTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA  
481 CCCCTTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT  
541 GGTATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT  
601 GAGTATTCAG ATGATGGAGA AACATATATG GAGCATATTG CTCTTCCTTA CACTGCTGAA  
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAA GAGATCACGA TTGATATACT AAGTAAAATA  
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTAT TCAGTGTATT TGAAGGGGTT TTGTTATTGG  
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT  
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGAGAATTC GGTTTTAAGC GTGATGGTAT TTTTCTGTAT  
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCAGTAGT TACGAAGAGC CTTCCACATT ATTTGAAAATA  
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA CGGATTTAAG AGTTCATGGA CAAAACACCT AACTGCTGGA  
1021 CCTTTTACAG ACATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAT GTGACGAGCT TCTTATGATT  
1081 GCCTCGGATG GAAGAGCTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT  
1141 ATTCCTGTTA TTATTAATCA GAATAGAGTT GTAGATTACG TGAAAAGTAT TATTCTAGTC  
1201 AA

## SEQUENZE

---

### Sequenza Wild Gamma A

Varietà: 'Wilder'; coppia di primer: Pp $\gamma$ for-rev

---

```
1 AATAAAATTG CCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCCTGAAGA TAGGATGGTC
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC GCCCAAGTCT CTGATGCGAT TCAAATGCAT ACGCAAATCT
121 TGGTGCACCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ATCTCAGCGA TTCTGTGGAC
181 AACAAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA CGTTTGCTCG
241 GAAGAGAGTT GGAAACAAGA AGTTTCATGG TCCGTGATTA ATATTTCCAT TGATGGTGTAT
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGACCTAACT AATGTACCGC TTCTAAAGGA TGACCCTCAT
361 GAAGTTGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTTG
421 TTTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA
481 CCCCTTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT
541 GGTATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT
601 GAGTATTCAG ATGATGGAGA AACATATATG GAGCATATTG CTCTTCCTTA CACTGCTGAA
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAAA GAGATCACGA TTGATATACT AAGTAAAATA
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTAT TCAGTGTATT TGAAGGGGTT TTGTTATTGG
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGAGAATTC GGTTTTAAGC GTGATGGTAT TTTTCTGTAT
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCAGTAGT TACGAAGAGC CTCCACATT ATTTGAAATA
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA TGGATCTAAG AGTTTATGGA CAAAACACCT AACTGCTGGA
1021 CCTTTTAATG ATATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAT GTGACGAGCT TCTTATGATT
1081 GCCTCCGATG GAAGAGCTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT
1141 ATTCCTGTTA TTATTAATCA GAATAGGGTT GTAGATTACG TGAAAAGTAT TATTCTAGTC
1201 AA
```



---

## Sequenza Wild Gamma B

Varietà: 'Wilder'; coppia di primer: Pp $\gamma$ for-rev

---

1 AACAAAATTG CCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCCTGAAGA TAGGATAGTC  
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC ACCCAAGTCT CTGATGCGAT TCAAATGCAT ACGCAAATCT  
121 TGGTGCACCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ATCTCAGCGA CTCTGTGGAC  
181 AACAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA CGTTTGCTCG  
241 GAAAAAAGTT GGAAACAAGA AGTTTCATGG TCCGTGATTA ATCTTTCCAT TGATGGTGAT  
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGACCTAACT ATTGTACCGT TTCTAAAGGA TGACCCTCAT  
361 GAAGTAGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTTCT  
421 TTTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA  
481 CCCCTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT  
541 GGTATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT  
601 GAGTATTCAG ATGATGGAGA AACATATATC GAGCATATTG CTCTTCCTTA CACTGCTGAA  
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAA GAGATCACGA TTGATATAACC AAGTAAAATA  
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTAT TCAGTGTATT TGAAGGGGTT TTGTTATTGG  
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT  
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGAGAATTC GGTTTTAAGC GTGATGGTAT TTTTCTGTAT  
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCAGTAGT TACGAAGAGC CTTCCACATT ATTTGAAAATA  
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA CGGATTTAAG AGTTCATGGA CAAAACACCT AACTGCTGGA  
1021 CCTTTTACAG ATATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAAC GTGACGAGCT TCTTATGATT  
1081 GCCTCGGATG GAAGAGCTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCGT  
1141 ATTCCTGTTA TTATTAATCA GAATAGGGTT GTAGATTACG TGAAAACAT TATTCTAGTC  
1201 AA

## SEQUENZE

---

### Sequenza Pack Gamma A

Varietà: 'Packham's Triumph'; coppia di primer: Ppγfor-rev

---

```
1 AATAAAATTG CCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCCTGAAGA TAGGATGGTC
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC GCCCAAGTCT CTGATGCGAT TCAAATGCAT ACGCAAATCT
121 TGGTGCACTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ATCTCAGCGA TTCTGTGGAC
181 AACAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA CGTTTGCTCG
241 GAAGAGAGTT GGAAACAAGA AGTTTCATGG TCCGTGATTA ATATTTCCAT TGATGGTGAT
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGACCTAACT AATGTACCGC TTCTAAAGGA TGACCCTCAT
361 GAAGTTGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTC
421 TTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA
481 CCCCTTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT
541 GGTATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT
601 GAGTATTCAG ATGATGGAGA AACATATATG GAGCATATTG CTCTTCCTTA CACTGCTGAA
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAA GAGATCACGA TTGATATACT AAGTAAAATA
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTAT TCAGTGTATT TGAAGGGGTT TTGTTATTGG
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGAGAATTC GGTTTTAAGC GTGATGGTAT TTTTCTGTAT
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCAGTAGT TACGAAGAGC CTCCACATT ATTTGAAATA
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA TGGATCTAAG AGTTTATGGA CAAAACACCT AACTGCTGGA
1021 CCTTTTAATG ATATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAT GTGACGAGCT TCTTATGATT
1081 GCCTCCGATG GAAGAGCTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT
1141 ATTCCTGTTA TTATTAATCA GAATAGGGTT GTAGATTACG TGAAAAGTAT TATTCTAGTC
1201 AA
```

---

## Sequenza Pack Gamma B

Varietà: 'Packham's Triumph'; coppia di primer: Pp $\gamma$ for-rev

---

```
1 AACAAAATTG CCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCCTGAAGA TAGGATGGTC
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC ACCCAAGTCT CTGATGCGAT TCAAATGCAT ACGCAAATCT
121 TGGTGCACCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ACCTCAGCGA TTCTGTGGAC
181 AACAAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA CGTTTGTCTG
241 GAAGAGAGTT GGAAACAAGA AGTTTCATGG TCCGTGATTA ATCTTTCCAT TGATGGTGAT
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGACCTAACT AATGTACCGC TTCTAAAGGA TGACCCTCAT
361 GAAGTTGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTTT
421 TTTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA
481 CCCCTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT
541 GGTATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT
601 GAGTATTCAG ATGATGGAGA AACATATATG GAGCATATTG CTCTTCCTTA CACTGCTGAA
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAA GAGATCACGA TTGATATACT AAGTAAAATA
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTAT TCAGTGTATT TGAAGGGGTT TTGTTATTGG
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGAGAATTC GGTTTTAAGC GTGATGGTAT TTTTCTGTAT
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCAGTAGT TACGAAGAGC CTTCCACATT ATTTGAAAATA
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA CGGATTTAAG AGTTCATGGA CAAAACACCT AACTGCTGGA
1021 CCTTTTACAG ACATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAT GTGACGAGCT TCTTATGATT
1081 GCCTCGATG GAAGAGCTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT
1141 ATTCCTGTTA TTATTAATCA GAATAGAGTT GTAGATTACG TGAAAAGTAT TATTCTAGTC
1201 AA
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza Fuji Gamma A

Varietà: 'Fuji'; coppia di primer: Pp $\gamma$ for-rev

---

```
1 AACAAAATTG CCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCCTGAAGA TAGGATGGTC
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC ACCCAAGTCT CTGATGCGAT TCAAATGCAT ACGCAAATCT
121 TGGTGCACCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTAGCCAAAC ACCTCAGCGA TTCAGTGGAC
181 AACAAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTAAGGCTCA CGTTTGCTCG
241 GAAGAGAGTT GGAAACAAGG AGTTTTATGG TCCGTGATTA ATCTTTCCAT TGATGGTGTAT
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGACCTAACT AATGTACCGT TTCTAAGGGA TGACCAACAT
361 GAATTAGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTATTTGTG TAACGGTAAA CGAAAATTTG
421 TTTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA
481 CCCCTTCCCG GTGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT
541 GGTATATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT
601 GAGTATTCAG ATGATGGAGA AACATATATC GAGCATATTG CTCTTCCTCA CACTGCTGAA
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAAA GAGATCACGA TTGATATATT AAGTAAAATA
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTAT TCAGTGTATT TGAAAGGGTT TTGTTATTGG
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGAGAATTC GGTTTTAAGC GTGATGGTAT TTTTCTGTAT
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCTCTAGT TACGAAGAGC CTCCACATT ATTTGAAATA
961 TGGGTCATGG ATTACAATGA CGGATTTAAG AGTCCATGGA CAAAACACTT AACTGCTGGA
1021 CCTTTTAAAG ACATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAC GTAACGAGCT TCTTATGATT
1081 ACCTCCGATG GAAGAGTTGC TTCTTATAAT TCTTGTAGCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT
1141 ATTCCTGTTA TTATTAATGA GAATAGGGTT GTAGATTACG TGAAAAGTAT TATTCTAGTC
1201 AA
```

---

## Sequenza McInt Gamma A

Varietà: 'McIntosh'; coppia di primer: Pp $\gamma$ for-rev

---

1 AACAAAATTG CCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCCTGAAGA TAGGATGGTC  
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC ACCCAAGTCT TTGATGCGTT TCAAATGCAT ACGCAAATCT  
121 TGGTGCACCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ACCTCAGCGA TTCTGTGGAC  
181 AACAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA CGTTTGCTCG  
241 GAAGAGAGTT GGAAACAAGA AGTTTTATGG TCCGTGATTA ATCTTTCCAT TGATGGTGAC  
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGGCCTAACT AATGTACCGT TTCTAAAGGA TGACCATCCT  
361 GAAGTAGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTTT  
421 TTTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA  
481 CCCCTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT  
541 GGTATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT  
601 GAGTATTCAG ATGATGGAGA AACATATATC GAGCATATTG CTCTTCCTCA CACTGCTGAA  
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAA GAGATCACGA TTGATATATT AAGTAAAATA  
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTAT TCAGTGTTTT TGAAAGGGTT TTGTTATTGG  
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT  
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGGGAATTC GGTTTTAAGC GTGATGGTAT TTTTCTGTAT  
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCACTAGT TACGAAGAGC CTTCCACATT ATTTGAAAATA  
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA CGGATTTAAG AGTTCATGGA CAAAACATCT AACTGCTGGA  
1021 CCTTTTAAAG ACATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAT GTGACGAGCT TCTTATGATT  
1081 GCCTCGATG GAAGAGCTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT  
1141 ATTCCTGTTA TTATTAATGA GAATAGGGTT GTAGATTACG TGAAAAGTAT TAGTCTAGTC  
1201 AA

## SEQUENZE

---

### Sequenza McInt Gamma B

Varietà: 'McIntosh'; coppia di primer: Pp $\gamma$ for-rev

---

```
1 AACAAAATTG CCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCCTGAAGA TAGGATGGTC
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC ACCCAAGTCT TTGATGCGTT TCAAATGCAT ACGCAAATCT
121 TGGTGCCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ACCTCAGCGA TTCTGTGGAC
181 AACAAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA CGTTTGCTCG
241 GAAGAGAGTT GGAAACAAGA AGTTTTATGG TCCGTGATTA ATCTTTCCAT TGATGGTGAC
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGGCCTAACT AATGTACCGT TTCTAAAGGA TGACCATCCT
361 GAAGTAGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTTG
421 TTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA
481 CCCCTTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT
541 GGTATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT
601 GAGTATTCAG ATGATGGAGA AACATATATT GAGCATATTG CTCTTCCTCA CACTGCTGAA
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAAA GAGATCACGA TTGATATATT AAGTAAAATA
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTGT TCAGTGTTTT TGAAAGGGTT TTGTTATTGG
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGGGAATTC GGTTTTAAGC GTGATGGTAT TTTTCTGTAT
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCACTAGT TACGAAGAGC CTCCACATT ATTTGAAATA
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA CGGATTTAAG AGTTCATGGA CAAAACATCT AACTGCTGGA
1021 CCTTTTAAAG ACATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAT GTGACGAGCT TCTTATGATT
1081 GCCTCCGATG GAAGAGCTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT
1141 ATCCTGTTA TTATTAATGA GAATAGGGTT GTAGATTACG TGAAAAGTAT TAGTCTAGTC
1201 AA
```

---

## Sequenza Kumoi Gamma A

Varietà: 'Kumoi'; coppia di primer: Pp $\gamma$ for-rev

---

1 AACAAAATTG CCGAAATGTC TCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCTTGAAGA TAGGATGGTC  
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC ACCCAAGTCT CTGATGCGAT TCAAATGCAT ACGCAAATCT  
121 TGGTGCACCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ACCTCAGCGA TTCTGTGGAC  
181 AACAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA CGTTTGCTCG  
241 GAAAAGAGTT GGAAACAAGA AGTTTCATGG TCCGTGATTA ATCTTTCCAT TGATGGTGAT  
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGACCTAACT ATTGTACCGT TTCTAAAGGA TGGCCCTCAT  
361 GAAGTAGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTTCT  
421 TTTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA  
481 CCCCTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT  
541 GGTATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT  
601 GAGTATTCAG AAGATGGAGA AACATATATC GAGCATATTG CTCTTCCTTA CACTGCTGAA  
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAA GAGATCACGA TTGATATACT AAGTAAAATA  
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTAT TCAGTGTATT TGAAGGGGTT TTGTTATTGG  
781 TTGTCATGCG ATGTCGAGGA ATATATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT  
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGAGAATTC GGTTTTAAAC GTGATGGTAT TTTTCTGTAC  
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCAGTAGT TATGAAGAGC CTTCCACATT ATTTGAGATA  
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA CGGATTTAAG AGTTCATGGA CAAAACACCT AACTGCTGGA  
1021 CCTTTTACAG ATATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAC GTGACGAGCT TCTTATGATT  
1081 GCCTCGATG GAAGAGCTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT  
1141 ATTCCTGTTA TTATTAATCA GAATAGGGTT GTAGATTACG TGAAAAGTAT TATTCTAGTC  
1201 AA

## SEQUENZE

---

### Sequenza Kumoi Gamma B

Varietà: 'Kumoi'; coppia di primer: Pp $\gamma$ for-rev

---

```
1 AACAAAATTG CCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCCTGAAGA TAGGATGGTC
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC ACCCAAGTCT CTGATGCGAT TCAAATGCAT ACGCAAATCT
121 TGGTGCACCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ATCTCAGCGA TTCTGTGGAC
181 AACAAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA TGTTTGCTCG
241 GAAAAGAGTT GGAAACAAGA AGTTTCATGG TCCGTGATTA ATCTTTCCAT TGATGGTGTAT
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGACCTAACT ATTGTACCGT TTCTAAAGGA TGGCCCTCAT
361 GAAGTAGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTTG
421 TTTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA
481 CCCCTTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT
541 GGTATATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT
601 GAGTATTCAG AAGATGGAGA AACATATATC GAGCATATTG CTCTTCCTTA CACTGCTGAA
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAAA GAGATCACGA TTGATATACT AAGTAAAATA
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTAT TCAGTGTATT TGAAGGGGTT TTGTTATTGG
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGAGAATTC GGTTTTAAGC GTGATGGTAT TTTTCTGTAT
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCAGTAGT TACGAAGAGC CTCCACATT ATTTGAGATA
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA CGGATTTAAG AGTTCATGGA CAAAACACCT AACTGCTGGA
1021 CCTTTTACAG ATATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAAT GTGACGAGCT TCTTATGATT
1081 GCCTCCGATG GAAGAGCTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT
1141 ATTCCTGTTA TTATTAATCA GAATAGGGTT GTAGATTACG TGAAAAGTAT TATTCTAGTC
1201 AA
```



---

## Sequenza Cho Gamma A

Varietà: 'Chojuro'; coppia di primer: Pp $\gamma$ for-rev

---

1 AACAAAATTG CCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGCGAAA CTCCTGAAGA TAGGATGGTC  
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC ACCCAAGTCT CTGATGCGAT TCAAATGCAT ACGCAAATCT  
121 TGGTGCACCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ACCTCAGCGA TTCTGTGGAC  
181 AACAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA CGTTTGCTCG  
241 GAAAAGAGTT GGAAACAAGA AGTTTCATGG TCCGTGATTA ATCTTTCCAT TGATGGTGAT  
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGACCTAACT ATTGTACCGT TTCTAAAGGA TGGCCCTCAT  
361 GAAGTAGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTTCT  
421 TTTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA  
481 CCCCTTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT  
541 GGTATGATT GCAAGGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT  
601 GAGTATTCAG ATGATGGAGA AACATATATC GAGCATATTG CTCTTCCTTA CACTGCTGAA  
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAA GAGATCACGA TTGATATACT AAGTAAAATA  
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATACTCTTAT TCAGTGTATT TGAAGGGGTT TTGTTATTGG  
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT  
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGAGAATTC GGTTTTAAAC GTGATGGTAT TTTTCTGTAC  
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCAGTAGT TATGAAGAGC CTTCCACATT ATTTGAGATA  
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA CGGATTTAAG AGTTCATGGA CAAAACACCT AACTGCTGGA  
1021 CCTTTTACAG ATATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAC GTGACGAGCT TCTTATGATT  
1081 GCCTCGGATG GAAGAGCTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT  
1141 ATTCCTGTTG TTATTAATCA GAATAGGATT GTAGATTACG TGAAAAGTAT TATTCTAGTC  
1201 AA

## SEQUENZE

---

### Sequenza Cho Gamma B

Varietà: 'Chojuro'; coppia di primer: Pp $\gamma$ for-rev

---

```
1 AACAAAATTG CCGAAATGTC CCAGGTGCGT GAAAGTGAAA CTCCTGAAGA TAGGATGGTC
61 GAAATCTTGT CCAGGTTGCC ACCCAAGTCT CTGATGCGAT TCAAATGCAT ACGCAAATCT
121 TGGTGCACCTC TTATCAATAG TCCATGTTTT GTGGCCAAAC ATCTCAGCGA TTCTGTGGAC
181 AACAAACTCT CATCCTCCAC TTGTATCCTT CTCAACTGTT CTCAGGCTCA TGTTTGCTCG
241 GAAAAGAGTT GGAAACAAGA AGTTTCATGG TCCGTGATTA ATCTTTCCAT TGATGGTGTAT
301 GAGCTTCATT ATGATATTGA GGACCTAACT ATTGTACCGT TTCTAAAGGA TGGCCCTCAT
361 GAAGTAGAGA TTCACGGTTA TTGCGATGGG ATTGTTTGTG TAACAGTAGA CGAAAATTTG
421 TTTTTGTGCA ATCCTGCAAC GGGGGAATTC AGGCAACTTC CTGATTCATG CCTTCTTCTA
481 CCCCTTCCCG GGGTAAAAGA AAAATTCGGA TTGGAAACGA CACTTAAAGG ACTGGGATTT
541 GGTATATGATT GCAAAGCTAA AGAATACAAG GTTGTGCGAA TTATAGATAA TTATGATTGT
601 GAGTATTCAG AAGATGGAGA AACATATATC GAGCATATTG CTCTTCCTTA CACTGCTGAA
661 GTATACACCA TGGCTGCTAA CTCTTGAAAA GAGATCACGA TTGATATACT AAGTAAAATA
721 TTATCATCAT ATAGCGAACC ATATTCTTAT TCAGTGTATT TGAAGGGGTT TTGTTATTGG
781 TTGTCATGCG ATGTAGAGGA ATACATATTT TCATTTGATT TAGCTAATGA AATATCTGAT
841 ATGATAGAAT TGCCTTTTAG GGGAGAATTC GGTTTTAAGC GTGATGGTAT TTTTCTGTAT
901 AATGAATCCC TCACTTATTA TTGCAGTAGT TACGAAGAGC CTCCACATT ATTTGAGATA
961 TGGGTAATGG ACTACGATGA CGGATTTAAG AGTTCATGGA CAAAACACCT AACTGCTGGA
1021 CCTTTTACAG ATATGGAGTT TCCATTGACA CCTTGAAAAT GTGACGAGCT TCTTATGATT
1081 GCCTCCGATG GAAGAGCTGC CTCTTATAAT TCTTGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT
1141 ATTCCTGTTA TTATTAATCA GAATAGGGTT GTAGATTACG TGAAAAGTAT TATTCTAGTC
1201 AA
```

---

### Sequenza MRB S9Beta A

Varietà: 'Max Red Bartlett'; coppia di primer: Md9 $\beta$ for-Md9rev

---

```
1 AAATGTCCCA GGTGTGTGAA AGTGAGACTC CTGAAGATAA AGTGGTCGAA ATCTTGTCCA
61 AGTTGCCGCC CAAGTCTCTG ATGAGATTCA AATGCATACG CAAGTCTTGG TGCACATCA
121 TCTGTAGTCC AAGTTTTGTG GCCAAACACC TCAGCAATTC CATGGACAAC AAACCTCAT
181 CCACCGTTG TATCCTTCTC TACCGTTGTC AGGTTTCATGT TTTACGCAC ACGAGTTGGA
241 AACAAGACGT TTTCTGGTCC ATGATTAATC ATTCCATTGA TAGTGATAAC CTTCATTATG
301 ATGTTGAGAA CCTACATATA CCGTTTCCAA TGGAAGATCA AGACAACGTA GAGCTTCACG
361 GTTATTGCAA TGGGATTGTC TGTTAATAG TAGGGAAAAA TGTTCTTTTA TGCAATCCTG
421 CAACAGGAGA ATTCAGGCAA CTTCCCGATT CATCCCTTCT TCTACCCCTT CCCAAGGGAA
481 GATTCCGATT GGAAACGATC TTTAAGGGAA TGGGATTTGG TTATGATTGC AAAGCTAAAG
541 AATACAAGGT TGTGCGAATT ATAGAAAATT GTGATTGTGA GTATTCGGAA GATGGAGAAT
601 CATACTATGA GCGTATTCTT CTTCCCTACA CGGCTGAGGT ATACACCACG ACTACTAACT
661 CTTGGAAAAA GATCAAGATT GATATATCAA TTGAAACTCG TTGGTATTGC ATTCCCTTTT
721 CTGGTTCAGT GACTTTGAAG GGATTTTGTT ATTGTTTGC ATACGATAAC GGGGAGTACG
781 TATTTTCATT TGATTTAGGT GATGAGATAT TTCATAGAAT AGAATTGCCT TCTAGGAGAG
841 AATCCGATTT CAAGTTTTAT GGTATTTTTC TGTATAATGA ATCTGTCACT TCGTATTGCT
901 ATCGTCATGA AGATGATTGT GAATTATTTG AAATATGGGT AATGGACGAC TATAATGGAG
961 TTCAGAGTTC ATGGACAAAA TTGCTAACCG TTGACCCCT TAAAGACATT GATTATCCAT
1021 TGACACTTTG GAAATGTGAC GAGATTCTTA TGCTTGCTC ATATGGAAAA GCTGCCTCAT
1081 GTAATTCTAT TACTGAAAAT CTCAAGTATC TTCATATTCC TCCTATTATC AAATGGATGA
1141 TGAATTATGT GAAAAGTATT GTTCCAGTCA AGTGAATTGA GGGAAAAGTT CTATTTTCTC
1201 CTATTTAATT TGTATGCATG ATACAAGGCT TGAGTTT
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza MRB S9Beta B

Varietà: 'Max Red Bartlett'; coppia di primer: Md9 $\beta$ for-Md9rev

---

```
1 AAATGTCCCA GGTGTGTGAA AGTGAGACTC CTGAAGATAA AGTGGTCGAA ATCTTGTCCA
61 AGTTGCCGCC CAAGTCTCTG ATGAGATTCA AATGCATACG CAAGTCTTGG TGCACATCA
121 TCTGTAGTCC AAGTTTTGTG GCCAAACACC TCAGCAATTC CATGGACAAC AAACCTCAT
181 CCACCGCTTG TATCCTTCTC TACCGTTGTC AGGTTTCATGT TTTCACGCAC ACGAGTTGGA
241 AACAAGACGT TTTCTGGTCC ATGATTAATC TTTCCATTGA TAGTGATAAC CTTCATTATG
301 ATGTTGAGAA CCTAAATATA CCGTTTCCAA TGGAAGATCA AGACAACGTA GAGCTTCACG
361 GTTATTGCAA TGGGATTGTC TGTTAATAG TAGGGAAAAA TGTTCTTTTA TGCAATCCTG
421 CAACAGGAGA ATTCAGGCAA CTTCCCGATT CATCCCTTCT TCTACCCCTT CCCAAGGGAA
481 GATTCCGATT GGAAACGATC TTTAAGGGAA TGGGATTTGG TTATGATTGC AAAGCTAAAG
541 AATACAAGGT TGTGCGAATT ATAGAAAATT GTGATTGTGA GTATTCGGAA GATGGAGAAT
601 CATACTATGA GCGTATTCTT CTTCCCTACA CGGCTGAGGT ATACACCACG ACTACTAACT
661 CTTGGAAAGA GATCAAGATT GATATATCAA TTGAAACTCG TTGGTATTGC ATTCCCTTTT
721 CTGGTTCAGT GTACTTGAAG GGATTTTGTT ATTGGTTTGC ATATGATAAC GGGGAGTACG
781 TATTTTCATT TGATTTAGGT GATGAGATAT TTCATAGAAT AGAATTGCCT TCTAGGAGAG
841 AATCCGAATT CAAGTTTTAT GGTATTTTTC TGTATAATGA ATCTGTCACT TCGTATTGCT
901 ATCGTCATGA AGATGATTGT GAATTATTG AAATATGGAT AATGGACGAC TATGATGGAG
961 TTCAGAGTTC ATGGACAAAA TTGCTAACCA TTGGACCCCT TAAAGACATT GATTATCCAT
1021 TGACACTTTG GAAATGTGAC GAGATTCTTA TGCTTGGCTC ATATGGAAGA GCTGCCTCTT
1081 GTAATTCTAT TACTGGAAAT CCAAGTATC TTCATATTCC TCCTATTATC AAATGGATGA
1141 TGAATTATGT GAAAAGTATT GTTCCAATCA AGTGAATTGA GGGAAAAGTT CTATTTTCTC
1201 CTATTTAATT CGTATGCATG ATACAAGGCT TGAGTTT
```

---

### Sequenza Cons S9Alfa

Varietà: 'Conseiller a La Coeur'; coppia di primer: Md9afor-Md9rev

---

```
1 CGAAATGTCC CAGGTGCGTG AAAGTGAAAC TCCTGAAGAT CAGGTGGTCG AAATCCTGTC
61 TAGGTTGCCG CCCAAGTCTC TGATGAGATT CAAATGCATA CGCAAGTCAT GGTGCACTAT
121 CATCAATAGT TCAAGTTTTG TGGCCAAACA CCTCAGCAAT TCCATAGGCA ACAAACCTCTC
181 ATCCTCCACT GGTATCCTTC TTAACCGTTG TCAGGTTCAT GTTTTCTCGG ATAGGAGTTG
241 GAAACAAGAC GTTTTCTGGT CCATGATTAA TCTTTCCATT GATAGTGATA ATAATAACCT
301 TCATTCTGAT GTTGAGGACC TAAATATACC ATTTCCAATG GAAGATCAGG ACAATGTAGA
361 GCTTCACGGT TATTGCAATG GGATTGTCTG TGTAATAGTA GGGAAAAATG TTCTTTTATG
421 CAATCCTGCA ACTGGAGAAT TCAGGCAACT TCCCGATTCA TCCCTTCTTC TACCTCTTCC
481 CAAGGGAAGA TTCGGATTGG AAACGGTCTT TAAGGGATTG GGATTTGGCT ATGATTGCAA
541 AGCTAAAGAA TACAAGGTCG TGCGAATTAT AGAAAATTGT GATTGTGAGT ATTCAGAAGG
601 TGAAGAATCA TATTATGAGC GTATTCTTCT TCCTCACACG GCTGAAGTAT ACACCATGAC
661 TGCTAACTCT TGGAAAGAGA TCAAGATTGA TGTATCAAGT GATACTGATC CGTATTGCAT
721 TCCTTATTCT TGTTCAAGTC ACTTGAAGGG ATTTTGTTAT TGGTTTGCAT GCGATAACGG
781 GGAATACATA TTTTCATTTG ATTTAGGTGA TGAGATATTT CATATAATAG AATTGCCTTC
841 TAGGAGAGAA TTTGGTTTTA AATTTTATGG TATTTTTTTG TATAATGAAT CCATCACTTC
901 TTATTGCTCT CGTTACGAAG AGGATTGTAA ATTATTTGAA ATATGGGTAA TGGACGACTA
961 TGATGGAGTT AAGAGTTCAT GGACAAAATT GCTAACCGTT GGACCCTTTA AAGACATTGA
1021 TTATCCATTG ACACTAGGGA AATGTGACGA GGTTCTTATG CTTGGCTCGT ATGGAAGAGC
1081 CGCCTTTTGT AATTCTAGTA CCGGAAATCT CAAGTATCTT CATATTCCCC CTATTATCAA
1141 TTGGATGATA GATTATGTGA AAAGTATTGT TCCAGTCAAC TGAATTAAGG GAAAAGTTCC
1201 CTTTTTCTT GTTTCATTTG TATGCATGAT ATGAAGCTTG AGTTT
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza Cons S9Beta

Varietà: 'Conseiller a La Coeur'; coppia di primer: Md9 $\beta$ for-Md9rev

---

```
1 AAATGTCCCA GGTGTGTGAA AGTGAGACTC CTGAAGATAA AGTGGTCGAA ATCCTGTCCA
61 AGTTGCCGCC CAAGTCTCTG ATGAGATTCA AATGCATACG CAAGTCTTGG TGCACATCA
121 TCTGTAGTCC AAGTTTTGTG GCCAAACACC TCAGCAATTC CATGGACAAC AAACCTCAT
181 CCACCGCTTG TATCCTTCTC TACCGTTGTC AGGTTTCATGT TTTCACGCAC ACGAGTTGGA
241 AACAAGACGT TTTCTGGTCC ATGATTAATC TTTCCATTGA TAGTGATAAC CTTCATTATG
301 ATGTTGAGAA CATAAATATA CCGTTTCCAA TGGAAGATCA AGACAACGTA GAGCTTCACG
361 GTTATTGCAA TGGGATTGTC TGTTTAATAG TAGGGAAAAG TGTTCCTTTA TGCAATCCTG
421 CAACAGGAGA ATTCAGGCAA CTTCCCGATT CATCCCTTCT TCTACCCCTT CCCAAGGGAA
481 GATTCCGATT GGAAACGATC TTTAAGGGAA TGGGATTTGG TTATGATTGC AAAGCTAAAG
541 AATACAAGGT TGTGCGAATT ATAGAAAATT GTGATTGTGA GTATTCCGAA GATGGAGAAT
601 CATACTATGA GCGTATTCTT CTTCCCTACA CGGCTGAGGT ATACACCACG ACTACTAACT
661 CTTGGAAAGA GATCAAGATT GATATATCAA TTGAAACTCG TTGGTATTGC ATTCCCTTTT
721 CTGGTTCAGT GTACTTGAAG GGATTTTGTT ATTGGTTTGC ATACGATAAC GGGGAGTACG
781 TATTTTCATT TGATTTAGGT GATGAGATAT TTCATAGAAT AGAATTGCCT TCTAGGAGAG
841 AATCCGATT CAAGTTTTAT GGTATTTTTC TGTATAATGA ATCTGTCGCT TCGTATTGCT
901 ATCGTCATGA AGATGATTGT GAATTATTG AAATATGGGT AATGGACCAC TATGATGGAA
961 TTCAGAGTTC ATGGACAAAA TTGCTAACCA TTGGACCCCT TAAAGACATT GATTATCCAT
1021 TGACACTTTG GAAATGTGAC GAGATTCTTA TGCTTGGCTC ATATGGAAGA GCTGCCTCTT
1081 GTAATTCTAT TACCGGAAAT CCAAGTATC TTCATATTCC TCCTATTATC AAATGGATGA
1141 TGGATTATGT GAAAAGTATT GTTCCAGTCA AGTGAATTGA GGGAAAAGTT CCATTTTCTC
1201 CTATTTAATT TGTATGCATG ATACAAGGCT TGAGTTT
```

---

## Sequenza Wild S9Beta

Varietà: 'Wilder'; coppia di primer: Md9 $\beta$ for-Md9rev

---

```
1 AAATGTCCCA GGTGTGTGAA AGTGAGACTC CTGAAGATAA AGTGGTCGAA ATCTTGTCCA
61 AGTTGCCGCC CAAGTCTCTG ATGAGATTCA AATGCATACG CAAGTCTTGG TGCACATCA
121 TCTGTAGTCC AAGTTTTGTG GCCAAACACC TCAGCAATTC CATGGACAAC AAACCTCAT
181 CCACCGCTTG TATCCTTCTC TACCGTTGTC AGGTTTCATGT TTTACGCAC ACGAGTTGGA
241 AACAAGACGT TTTCTGGTCC ATGATTAATC TTTCCATTGA TAGTGATAAC CTTCATTATG
301 ATGTTGAGAA CCTAAATATA CCGTTTCCAA TGGAAGATCA AGACAACGTA GAGCTTCACG
361 GTTATTGCAA TGGGATTGTC TGTTAATAG TAGGGAAAAA TGTTCTTTTA TGCAATCCTG
421 CAACAGGAGA ATTCAGGCAA CTTCCCGATT CATCCCTTCT TCTACCCCTT CCCAAGGGAA
481 GATTCCGATT GGAAACGATC TTTAAGGGAA TGGGATTTGG TTATGATTGC AAAGCTAAAG
541 AATACAAGGT TGTGCGAATT ATAGAAAATT GTGATTGTGA GTATTCGGAA GATGGAGAAT
601 CATACTATGA GCGTATTCTT CTTCCCTACA CGGCTGAGGT ATACACCACG ACTACTAACT
661 CTTGGAAAAGA GATCAAGATT GATATATCAA TTGAAACTCG TTGGTATTGC ATTCCCTTTT
721 CTGGTTCAGT GACTTTGAAG GGATTTTGTT ATTGTTTGC ATATGATAAC GGGGAGTACG
781 TATTTTCATT TGATTTAGGT GATGAGATAT TTCATAGAAT AGAATTGCCT TCTAGGAGAG
841 AATCCGAATT CAAGTTTTAT GGTATTTTTC TGTATAATGA ATCTGTCACT TCGTATTGCT
901 ATCGTCATGA AGATGATTGT GAATTATTTG AAATATGGAT AATGGACGAC TATGATGGAG
961 TTCAGAGTTC ATGGACAAAA TTGCTAACCA TTGACCCCT TAAAGACATT GATTATCCAT
1021 TGACACTTTG GAAATGTGAC GAGATTCTTA TGCTTGCTC ATATGGAAGA GCTGCCTCTT
1081 GTAATTCTAT TACTGAAAAT CTCAAGTATC TTCATATTCC TCCTATTATC AAATGGATGA
1141 TGAATTATGT GAAAAGTATT GTTCCAATCA AGTGAATTGA GGGAAAAGTT CTATTTTCTC
1201 CTATTTAATT CGTATGCATG ATACAAGGCT TGAGTTT
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza Pack S9Beta A

Varietà: ‘; coppia di primer: Md9 $\beta$ for-Md9rev

---

```
1 AAATGTCCCA GGTGTGTGAA AGTGAGACTC CTGAAGATAA AGTGGTCGAA ATCCTGTCCA
61 AGTTGCCGCC CAAGTCTCTG ATGAGATTCA AATGCATACG CAAGTCTTGG TGCACATCA
121 TCTGTAGTCC AAGTTTTGTG GCCAAACACC TCAGCAATTC CATGGACAAC AAACCTCAT
181 CCACCGCTTG TATCCTTCTC TACCGTTGTC AGGTTTCATGT TTTCACGCAC ACGAGTTGGA
241 AACAAGACGT TTTCTGGTCC ATGATTAATC TTTCCATTGA TAGTGATAAC CTTCATTATG
301 ATGTTGAGAA CATAAATATA CCGTTTCCAA TGGAAGATCA AGACAACGTA GAGCTTCACG
361 GTTATTGCAA TGGGATTGTC TGTTTAATAG TAGGGAAAAG TGTTCCTTTA TGCAATCCTG
421 CAACAGGAGA ATTCAGGCAA CTTCCCGATT CATCCCTTCT TCTACCCCTT CCCAAGGGAA
481 GATTCCGATT GGAAACGATC TTTAAGGGAA TGGGATTTGG TTATGATTGC AAAGCTAAAG
541 AATACAAGGT TGTGCGAATT ATAGAAAATT GTGATTGTGA GTATTCCGAA GATGGAGAAT
601 CATACTATGA GCGTATTCTT CTTCCCTACA CGGCTGAGGT ATACACCACG ACTACTAACT
661 CTTGGAAAGA GATCAAGATT GATATATCAA TTGAAACTCG TTGGTATTGC ATTCCCTTTT
721 CTGGTTCAGT GTACTTGAAG GGATTTTGTT ATTGGTTTGC ATACGATAAC GGGGAGTACG
781 TATTTTCATT TGATTTAGGT GATGAGATAT TTCATAGAAT AGAATTGCCT TCTAGGAGAG
841 AATCCGATTT CAAGTTTTAT GGTATTTTTC TGTATAATGA ATCTGTCGCT TCGTATTGCT
901 ATCGTCATGA AGATGATTGT GAATTATTTG AAATATGGGT AATGGACCAC TATGATGGAA
961 TTCAGAGTTC ATGGACAAAA TTGCTAACCA TTGGACCCCT TAAAGACATT GATTATCCAT
1021 TGACACTTTG GAAATGTGAC GAGATTCTTA TGCTTGGCTC ATATGGAAGA GCTGCCTCTT
1081 GTAATTCTAT TACCGGAAAT CCAAGTATC TTCATATTCC TCCTATTATC AAATGGATGA
1141 TGGATTATGT GAAAAGTATT GTTCCAGTCA AGTGAATTGA GGGAAAAGTT CCATTTTCTC
1201 CTATTTAATT TGTATGCATG ATACAAGGCT TGAGTTT
```



---

### Sequenza Pack S9Beta B

Varietà: 'Packham's Triumph'; coppia di primer: Md9 $\beta$ for-Md9rev

---

```
1 AAATGTCCCA GGTGTGTGAA AGTGAGACTC CTGAAGATAA AGTGGTCGAA ATCTTGTCCA
61 AGTTGCCGCC CAAGTCTCTG ATGAGATTCA AATGCATACG CAAGTCTTGG TGCACATCA
121 TCTGTAGTCC AAGTTTTGTG GCCAAACACC TCAGCAATTC CATGGACAAC AAACCTCAT
181 CCACCGCTTG TATCCTTCTC TACCGTTGTC AGGTTTCATGT TTTACGCAC ACGAGTTGGA
241 AACAAGACGT TTTCTGGTCC ATGATTAATC TTTCCATTGA TAGTGATAAC CTTCATTATG
301 ATGTTGAGAA CCTAAATATA CCGTTTCCAA TGGAAGATCA AGACAACGTA GAGCTTCACG
361 GTTATTGCAA TGGGATTGTC TGTTAATAG TAGGGAAAAA TGTTCTTTTA TGCAATCCTG
421 CAACAGGAGA ATTCAGGCAA CTTCCCGATT CATCCCTTCT TCTACCCCTT CCCAAGGGAA
481 GATTCCGATT GGAAACGATC TTTAAGGGAA TGGGATTTGG TTATGATTGC AAAGCTAAAG
541 AATACAAGGT TGTGCGAATT ATAGAAAATT GTGATTGTGA GTATTCGGAA GATGGAGAAT
601 CATACTATGA GCGTATTCTT CTTCCCTACA CGGCTGAGGT ATACACCACG ACTACTAACT
661 CTTGGAAAAGA GATCAAGATT GATATATCAA TTGAAACTCG TTGGTATTGC ATTCCCTTTT
721 CTGGTTCAGT GTAATTGAAG GGATTTTGTT ATTGTTTGC ATATGATAAC GGGGAGTACG
781 TATTTTCATT TGATTTAGGT GATGAGATAT TTCATAGAAT AGAATTGCCT TCTAGGAGAG
841 AATCCGAATT CAAGTTTTAT GGTATTTTTC TGTATAATGA ATCTGTCACT TCGTATTGCT
901 ATCGTCATGA AGATGATTGT GAATTATTTG AAATATGGAT AATGGACGAC TATGATGGAG
961 TTCAGAGTTC ATGGACAAAA TTGCTAACCA TTGACCCCT TAAAGACATT GATTATCCAT
1021 TGACACTTTG GAAATGTGAC GAGATTCTTA TGCTTGCTC ATATGGAAGA GCTGCCTCTT
1081 GTAATTCTAT TACTGAAAAT CTCAAGTATC TTCATATTCC TCCTATTATC AAATGGATGA
1141 TGAATTATGT GAAAAGTATT GTTCCAATCA AGTGAATTGA GGGAAAAGTT CTATTTTCTC
1201 CTATTTAATT CGTATGCATG ATACAAGGCT TGAGTTT
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza McInt S9Beta

Varietà: 'McIntosh'; coppia di primer: Md9 $\beta$ for-Md9rev

---

```
1 GAATGTCCCC TGAAAGTGAA ACTCCTGAAG ATAAGATGGT CGAAATCTTG TCCAAGTTGC
61 CGCCCAAGTC TCTGATGAGA TTCAAATGCA TACGCAAATC TTGGTGCACT ATCATCAATA
121 GTCCAAGTTT TGTGGCCAAA CACCTCAGCA ATTCCATGGA CAACAAACTC TCATCCACCA
181 CTTGTATCCT TCTCAACCGT TGTCAAGTTC ACGTTTTCCC GGACAGGAGT TGGAAACAAG
241 ACGTTTTCTG GTCCATGATT AATCTTTCCA TTGATAGTGA TGAGCACAAC CTTCATTATG
301 ATGTTGAGAA CCTAAAGATA CCGTTTCCAA TGGAAGATCA AGACAATGTA GAGCTTCAGG
361 GTTATTGCAA TGGGATTGTC TGTGTAATAG CAGGGAAAAA TGTTCTTTTA TGCAATCCTG
421 CAACAGGAGA ATTCAGGCAA CTTCCCAATT CATCTATTCT TCTACCCCTT CCCAAGGGAA
481 GATTCCGATT GGAAACGACC TTAAAGGAA TGGGATTTGG CTATGATTGC AAAACTAAAG
541 AATACAAGGT TGTGCGAATT ATAGAAAATT GTGATTGTGA GTATTCAGAG GATGGAGAAA
601 CATACAATGA GCGTATTCTT CTTCCCTACA CGGCTGAGGT ATACACCACG ACTGCTAACT
661 CTTGGAAAGA GATCAAGATT GATATATCAA TTGAAACTCG TTGGTATTGC ATTCCCTATT
721 CTGGTTCAGT GTACTTGAAG GGATTTTGTT ATTGGTTTGC ATACGATAAC GGGGAGTACG
781 TATTTTCATT TGATTTAGGT GATGAGATAT TTCATAGAAT AGAATTGCCT TCTAGGAGAG
841 AATCCGATT CAAGTTTTAT GGTATTTTTC TATATAATGA ATCCGTCACT TCGTATTGCT
901 ATCGTCACGA AGAGGGATGT CAATTATTTG AAATATGGGT AATGGACGAA TATGATGGAG
961 TTAAGAGTTT ATGGACAAAA CTGCTAACCA TTGGACCCCT TAAAGACATT GATTATCCAT
1021 TGACACTTTG GAAATGTGAC GAGATTCTTA TGCTTGGCTC ATATGGAAGA GCTGCCTCTT
1081 GTAATTCTAG TAGTGGAAT CTCAAGTATC TTCATATTCC TCCTATTATC GAATGGATGG
1141 TGGATTATGT GAAAAGTATT GTTCCAGTCA AGTGCATTGA GGGAAAAGTT CCATTTTCTC
1201 CTATTTAATT TGTATGCATG ATGTAAGGCT TGAGTTT
```

---

## Sequenza Kum S9Beta

Varietà: 'Kumoi'; coppia di primer: Md9 $\beta$ for-Md9rev

---

```
1 AAATGTCTCA GGTGTGTGAA AGTGAGACTC CTGAAGATAA AGTGGTCGAA ATCCTGTCTA
61 AGTTGCCGCC CAAGTCTCTG ATGAGATTCA AATGCATACG CAAGTCTTGG TGCACATCA
121 TCTGTAGTCC AAGTTTTGTG GCCAAACACC TCAGCAATTC CATGGACAAC AAACCTCAT
181 CCACCGCTTG TATCCTTCTC TACCGTTGTC AGGTTTCATGT TTTACGAAC ACGAGTTGGA
241 AACAAGACGT TTTCTGGTGC ATGATTAATC TTTCCATTGA TAGTGATAAC CTTATTATG
301 ATGTTGAGAA CCTAAATATA CCGTTTCCAA TGGAAGATGA AGACAACGTA GAGCTTCACG
361 GTTATTGCAA TGGGATTGTC TGTTAATAG TAGGGAAAAA TGTTCTTTTA TGCAATCCTG
421 CAACAGGAGA ATTCAGGCAA CTTCCGGATT CATCCCTTCT TCTACCCCTT CCCAAGGGAA
481 GATTCGGATT GGAAACGATC TTTAAGGGAA TGGGATTTGG TTATGATTGC AAAGCTAAAG
541 AATACAAGGT TGTGCGAATT ATAGAAAATT GTGATTGTGA GTATTCGGAA GATGGAGAAT
601 CATACTATGA GCGTATTCTT CTTCCACACA CGGCTGAGGT ATACACCACG ACTACTAACT
661 CTTGGAAAAGA GATCAAGATT GATATATCAA TTGAAACTCG TTGGTATTGC ATTCCCTTTT
721 CTGGTTCAGT GACTTTGAAG GGATTTTGTT ATTGTTTGC ATATGATAAC GGGGAGTACG
781 TATTTTCATT TGATTTAGGT GATGAGATAT TTCATAGAAT AGAATTGCCT TCTAGGAGAG
841 AATCCGATTT CAAGTTTTAT GGTATTTTTC TGTATAATGA ATCTGTCGCT TCGTATTGCT
901 ATCGTCATGA AGATGATTGT GAATTATTTG AAATATGGAT AATGGACGAC TGTGATGGAG
961 TTCAGAGTTC ATGGACAAAA TTGCTAACCA TTGACCCCT TAAAGACATT GATTATCCAT
1021 TGACACCTTG GAAATGTGAC GAGATTCTTA TGCTTGCTC ATATGGAAGA GCTGCCTCTT
1081 GTAATTCTAT TACTGGAAT CTCACGTATC TTCATATTCC TCCTATTATC AAATGGATGA
1141 TGAATTATGT GAAAAGTATT GTTCCAGTCA AGTGAATTGA GGGAAAAGTT CTACTTTCTC
1201 CTATTTAATT TGTATGCATG ATACAAGGCT TGAGTTT
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza Cho S9Beta

Varietà: 'Chojuro'; coppia di primer: Md9 $\beta$ for-Md9rev

---

```
1 AAATGTCTCA GGTGTGTGAA AGTGAGACTC CTGAAGATAA AGTGGTCGAA ATCCTGTCTA
61 AGTTGCCGCC CAAGTCTCTG ATGAGATTCA AATGCATACG CAAGTCTTGG TGCACATCA
121 TCTGTAGTCC AAGTTTTGTG GCCAAACACC TCAGCAATTC CATGGACAAC AAACCTCAT
181 CCACCGCTTG TATCCTTCTC TACCGTTGTC AGGTTTCATGT TTTCACGAAC ACGAGTTGGA
241 AACAAGACGT TTTCTGGTGC ATGATTAATC TTTCCATTGA TAGTGATAAC CTTCATTATG
301 ATGTTGAGAA CCTAAATATA CCGTTTCCAA TGGAAGATGA AGACAACGTA GAGCTTCACG
361 GTTATTGCAA TGGGATTGTC TGTTTAATAG TAGGGAAAAA TGTTCTTTTA TGCAATCCTG
421 CAACAGGAGA ATTCAGGCAA CTTCCGGATT CATCCCTTCT TCTACCCCTT CCCAAGGGAA
481 GATTCCGATT GGAAACGATC TTTAAGGGAA TGGGATTTGG TTATGATTGC AAAGCTAAAG
541 AATACAAGGT TGTGCGAATT ATAGAAAATT GTGATTGTGA GTATTCCGAA GATGGAGAAT
601 CATACTATGA GCGTATTCTT CTTCCCTACA CGGCTGAGGT ATACACCACG ACTACTAACT
661 CTTGGAAAGA GATCAAGATT GATATATCAA TTGAAACTCG TTGGTATTGC ATTCCCTTTT
721 CTGGTTCAGT GTACTTGAAG GGATTTTGTT ATTGGTTTGC ATATGATAAC GGGGAGTACG
781 TATTTTCATT TGATTTAGGT GATGAGATAT TTCATAGAAT AGAATTGCCT TCTAGGAGAG
841 AATCCGATTT CAAGTTTTAT GGTATTTTTC TGTATAATGA ATCTGTCGCT TCGTATTGCT
901 ATCGTCATGA AGATGATTGT GAATTATTTG AAATATGGAT AATGGACGAC TGTGATGGAG
961 TTCAGAGTTC ATGGACAAAA TTGCTAACCA TTGGACCCCT TAAAGACATT GATTATCCAT
1021 TGACACCTTG GAAATGTGAC GAGATTCTTA TGCTTGGCTC ATATGGAAGA GCTGCCTCTT
1081 GTAATTCTAT TACTGGAAAT CTCACGTATC TTCATATTCC TCCTATTATC AAATGGATGA
1141 TGAATTATGT GAAAAGTATT GTTCCAGTCA AGTGAATTGA GGGAAAAGTT CTACTTTCTC
1201 CTATTTAATT TGTATGCATG ATACAAGGCT TGAGTTT
```

---

### Sequenza AF S3 A

Varietà: 'Abate Fétel'; coppia di primer: Md3for-rev

---

```
1 TTTTCCCAGA CCAGAGTTGG AAACAAGAAG TTTTCTGGTC CACGATTAAT CTTTCCATTG
61 ATAGTGACGA GCATAACCTT CATTATGATG TTGAGGACCT AATTATACCG TTTCCATTGG
121 AAGATCATGA TTTTGTACTG ATTTTCGGCT ATTGCAATGG GATTATCTGT GTAGATGCAG
181 GGAAAAATGT TCTTTTATGC AATCCTGCAA CGAGAGAATT TAGGCAACTT CCCAATTCAT
241 GCCTTCTTCT ACCCCCTCCC AAGGGAAAAT TTGAATTGGA AACGACCTTT CAAGCATTGG
301 GATTTGGCTA TGA CTGCAAT GCTAAAGAAT ACAAGGTTGT GCGAATTATA GAAAATTGTG
361 AGTATTCAGA CGATGAGCAA ACATTTTCATC ATCGTATTGC TCTTCCTCAT ACAGCTGAGG
421 TATACACCAC GGCTGCTAAC TCTTGAAAAG AAATCAAGAT TGATATACCA AGTCAAACCT
481 ATCATTGTTC TTGTTTCAGTG TACTTGAAGG GATTTTGTGA TTGGTTTGCA AGCGATAGCG
541 AGGAATACAT ACTTTCATTT TATGTAAGTG ATGAAACATT TCATATAATA CAATTGCCTT
601 CTAGGAGAGA ATCCGGTTTT ACGTTTGATT ATATTTTTTCT CCGAAATGAA TCCCTTGCTT
661 CTTTTTGCTC TCCCTACAAT CCAAGTGAGG ATTTTAAATT ATTTGAAATA TGGGTAATGG
721 ACAACTATGA TGGAGATAAG ACTTTATGGA CAAAACCTCCT AACCATTGGA CCCTTTAAAG
781 GCATTGAGTA TCCATTGGCA CTTTGAAAAT ATGACGAGGT TCTTATGCTT GCGTCTGACG
841 GAAGAGCCAC CTCTTATAAT TCTGGTATCG GAAATCTCAA GTATCTTCAT ATTCCTCCTG
901 TTCTCAATAA GGTT
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza MRB S3 A

Varietà: 'Max Red Bartlett'; coppia di primer: Md3for-rev

---

```
1 TTTTCCCAGA CCAGAGTTGG AAACAAGAAG TTTTCTGGTC CACTATTGAT CTTTCCATTG
61 ATAGTGATGA GCATAACCTT CATTATGATG TGGAGGACCT AATTATACCG TTTCCATTGG
121 AAGATCATGA TTTTGTACTG ATTTTTGGTT ACTGCAATGG GATTGTTTGT GTAGATGTAG
181 GGAAAAATGT AACTTTATGC AATCCTGCAA CGAGAGAATT TAGGCAACTT CCCGATTCAT
241 GCCTTCTTCT ACCCCCTCCC AAGGGAAAAT TTGAATTGGA AAGGACCTTT CTAGCGTTGG
301 GATTTGGCTA CGACTGCAAG TCTAAAGAAT ACAAGGTTGT GCGAATTATA GAAAATTGTG
361 AGTATTCAGA TGATGAGCAA ACATTTCATC ATCGTATTGC TCTTCCTCAC ACAGCTGAGG
421 TATACACCAC GGCTGCTAAC TCTTGAAAAG AGATCAAGTT TGATATATCA AGTCAAACCT
481 ATCATTGTTC TTGTTCAAGT TACTTGAAGG GTTTTTGTTA TTGGTTTGCA AGCGATAACG
541 AGGAATACAT ACTTTCATTT TATTTAGGTG ATGAGACATT TCATATAATA CAATTGCCTT
601 CTAGGAGAGA ATCCGGTTTT ACGTTTGATT ATATTTTTCT CCAAAATGAA TCCCTTGCTT
661 CTTTTTGCTC TCCCTACAGT CCAAGTGAGG ATTCTAAATT ATTTGAAATA TGGGTAATGG
721 ATGACTATGA TGGAGTTAAG AGTTCATGGA CAAAACCTCT AACTGTTGGA CCTTTTAAAG
781 GCATTGAGTA TCCATTGACA CTTTGAAAAT TTGACGAGCT TCTTATGCTT GCGTCCGATG
841 GAAAAGCCAC CTCTTATAAT TCTAGTACCG GAAATCTCAA GTATCTTCAT ATTCCTCCCA
901 TTCTCAATAA GGTT
```

---

### Sequenza MRB S3 B

Varietà: 'Max Red Bartlett'; coppia di primer: Md3for-rev

---

```
1 TTTTCCCAGA CCAGAGTTGG AAACAAGAAG TTTTCTGGTC CACGATTAAT CTTTCTATTG
61 ATAGCGATGA GCATAACCTT CATTATGATG TTGAGGACCT AATTATACCG TTTCCATTGG
121 AAGATCATGA TTTTGTACTG ATTTTGGT ATTGCAATGG GATTATCTGT GTAGATGTAG
181 GGAAAAATGT TCTTTTATGC AATCCTGCAA CAAGAGAATT TAGGCAACTT CCCAATTCAT
241 GCCTTCTTCT ACCCCCTCCC AAGGGAAAAT TCGAGTTGGA AACGACCTTT CAAGCATTGG
301 GATTTGGCTA TGA CTGCAAT GCTAAAGAAT ACAAGGTTGT GCGAATTATA GAAAATTGTG
361 AGTATTCAGA TGATGAGCAA ACATTTTCATC ATCGTATTGC TCTTCCTCAC ACAGCTGAGG
421 TATACACAAC GGCTGCTAAC TCTTGAAAAG AGATCAAGAT TGATATATCA AGTCAAACCTT
481 ATCATTGTTC TTGTTTCAGTG TACTTGAAGG GATTTTGTTA TTGGTTTGCA AGCGATAGCG
541 AGGAATACAT ACTTTCATTT TATTTAGGTG ATGAGACATT TCATATAATA CAATTGCCTT
601 CTAGGAAAGA ATCCGGTTTT ACGTTTGATT ATATTTTTCT CCGAAATGAA TCCCTCGCTT
661 CTTTTTGCTC TCCCTACAGT CCAAGTGAGG ATTCTAAATT ATTTGAAATT TGGGTAATGG
721 ATGACTTTGA TGGAGTTAAG AGTTCATGGA CAAAACCTCCT AACCATTGGA CCCTTTAAAG
781 GCATTGAGTA TCCATTGACA CTTTGAAAAT GTGATGAGCT TCTTATGCTT GCGTCCGATG
841 GAAGAGCCAC CTCTTATAAT TCTAGTACCG GAAATCTCAA ATATCTTCAT ATTCCTCCTA
901 TTCTCAGTAA GGTT
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza Cons S3 A

Varietà: 'Conseiller a La Coeur'; coppia di primer: Md3for-rev

---

```
1 TTTTCCCAGA CCAGAGTTGG AAACAAGAAG TTTTCTGGTC CGCGATTAAT CTTTCCATTG
61 ATAGTGATGA GCATAACCTT CATTATGATG TTGAGGACTT AATTATACCG TTTCCATTGG
121 AAGATCATGA TTTTGTACTG ATTTTTGGTT ATTGTAATGG GATTATTTGT GTAGATGCAG
181 GGAAAAATGT TCTTTTATGC AATCCTGCAA TGAGAGAATT TAGGCAACTT CCGGATTCAT
241 GCCTTCTTCT ACCCCCTCCC AAGGGAAAAT TCGAATTGGA AACGACCTTT CAAGCATTGG
301 GATTTGGCTA TGACTGCAAT TCTAAAGAAT ACAAAGTTGT GCAAATTATA GAAAATTGTG
361 AGTATTCAGA TGATGAGCAA ACATTTCATC ATCGTATTGC TCTTCCTCAC ACAGCTGAGG
421 TATACACCAC GGCTGCTAAC TCTTGAAAAG AGATCAAGAT TGATATATCA AGTCAAACCT
481 ATCATTG TTCGTTG TACTTGAAGG GATTTTGTTA TTGGTTTGCA AGCGATAGCG
541 AGGAATACAT ACTTTCATTT TATTTAGGTG ATGAGACATT TCATATAATA CAATTGCCTT
601 CTAGGAGAGA ATCCGGTTTT TCATTTGATT ATATTTTTTCT CCGAAATGAA TCCCTTGCTT
661 CTTTTTGCTC TCCCTACAAT CCAAGTGAGG ATTCTAAATT ATTTGAAATA TGGGTAATGG
721 ATGACTATGA TGGAGTTAAG AGTTCATGGA CAAAACCTCT AACTGTTGGA CCCTTTAAAG
781 GCATTGAGTA TCCATTGACA CTTTGAAAAT GTGACGAGCT TCTTATGCTT GCTTCCGATG
841 GAAGAGCCAC CTCTTATAAT TCTAGTACAG GAAATCTCAA GTATCTTCAT ATTCCTCCTA
901 TTCTCAGTAA GGTT
```



---

### Sequenza Cons S3 B

Varietà: 'Conseiller a La Coeur'; coppia di primer: Md3for-rev

---

```
1 TTTTCCCAGA CCAGAGTTGG AAACAAGAAG TTTTCTGGTC CACGATTAAT CTTTCCATTG
61 ATAGTGATGA ACACAACCTT CATTATGATG TTGAGGACCT AATTATACCG TTTCCATTGG
121 AAGATCATGA TTTTGTACTG ATTTTCGGTT ATTGCAATGG GGTGTGTCTGT GTAGATGCAG
181 GGAAACATGT TCTTTTATGC AATCCTGCAA CGAGAGAATT TAGGCAACTT CCCGATTGAT
241 GCCTTCTTAA ACCCCCTCCC AAGGGAAAAT TCGAATTGGA AACGAACTTT CAAGCATTAG
301 GATTTGGCTA TGATTGCAAT ACTAAAGAAT ACAAGGTTGT GCGAATTGTA GAAAATTGTG
361 AGTATTCAGA TGATGAGCAA ACATTTTATC ATCGTATTGC ACTTCCTCAC ACAGCTGAGG
421 TATACACTAC GGCTGCTAAC TCTTGAAAAG AGATCAAGAT TGATATATCA ATTA AACCT
481 ATCATTGTTC TTGTTTCAGT TACTTGAAGG GATTTTGTTA TTGGTTTGCC AGCGATAACG
541 AGGAATACAT ACTTTCATTT TATTTAGGTG ATGAGACATT TCATATAATA CAATTGCCTT
601 CTAGGAGAGA ATCCGGTTTT ACGTTTGATT ATATTTTTCT CCGAAATGAA TCCCTTGCGT
661 CTTTTTGCTC TCCCTACAAT CCAAGTGAGG ATTCTAAATT ATTTGAAATA TGGGTAATGG
721 ACGACTATGA TGGAATTAGG AGTTCATGGA CAAAACATCAT AACCGTTGGA CCCTTTCAAG
781 GCATTGAGTA TCCTTTGACA CTTTGAAAAT GTGACGAGCT TCTTATGCTT GCATCCGATG
841 GAAGAGCTAC CTCGTATAAT TCTAGCACCA GAAATCTTAA GTATCTCCAT ATTCCTCCTA
901 TTCTCAATAA GGTT
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza Wild S3 A

Varietà: 'Wilder'; coppia di primer: Md3for-rev

---

```
1 TTTTCCCAGA CCAGAGTTGG AAACAAGAAG TTTTCTGGTC CACTATTGAT CTTTCCATTG
61 ATAGTGATGA GCATAACCTT CATTATGATG TGGAGGACCT AATTATACCG TTTCCATTGG
121 AAGATCATGA TTTTGTACTG ATTTTTGGTT ACTGCAATGG GATTGTTTGT GTAGATGTAG
181 GGAAAAATGT AACTTTATGC AATCCTGCAA CGAGAGAATT TAGGCAACTT CCCGATTCAT
241 GCCTTCTTCT ACCCCCTCCC AAGGGAAAAT TTGAATTGGA AAGGACCTTT CTAGCGTTGG
301 GATTTGGCTA CGACTGCAAG TCTAAAGAAT ACAAGGTTGT GCGAATTATA GAAAATTGTG
361 AGTATTCAGA TGATGAGCAA ACATTTCATC ATCGTATTGC TCTTCCTCAC ACAGCTGAGG
421 TATACACCAC GGCTGCTAAC TCTTGAAAAG AGATCAAGTT TGATATATCA AGTCAAACCT
481 ATCATTGTTT TTGTTCAAGT TACTTGAAGG GTTTTTGTTA TTGGTTTGCA AGCGATAACG
541 AGGAATACAT ACTTTCATTT TATTTAGGTG ATGAGACATT TCATATAATA CAATTGCCTT
601 CTAGGAGAGA ATCCGGTTTT ACGTTTGATT ATATTTTTCT CCAAAATGAA TCCCTTGCTT
661 CTTTTTGCTC TCCCTACAGT CCAAGTGAGG ATTCTAAATT ATTTGAAATA TGGGTAATGG
721 ATGACTATGA TGGAGTTAAG AGTTCATGGA CAAAACCTCT AACTGTTGGA CCTTTTAAAG
781 GCATTGAGTA TCCATTGACA CTTTGAAAAT TTGACGAGCT TCTTATGCTT GCGTCCGATG
841 GAAAAGCCAC CTCTTATAAT TCTAGTACCG GAAATCTCAA GTATCTTCAT ATTCCTCCCA
901 TTCTCAATAA GGTT
```

---

### Sequenza Pack S3 A

Varietà: 'Wilder'; coppia di primer: Md3for-rev

---

```
1 TTTTCCCAGA CCAGAGTTGG AAACAAGAAG TTTTCTGGTC CACTATTGAT CTTTCCATTG
61 ATAGTGATGA GCATAACCTT CATTATGATG TGGAGGACCT AATTATACCG TTTCCATTGG
121 AAGATCATGA TTTTGTACTG ATTTTGGTT ACTGCAATGG GATTGTTTGT GTAGATGTAG
181 GGAAAAATGT AACTTTATGC AATCCTGCAA CGAGAGAATT TAGGCAACTT CCCGATTGAT
241 GCCTTCTTCT ACCCCCTCCC AAGGGAAAAAT TTGAATTGGA AACGACCTTT CTAGCGTTGG
301 GATTTGGCTA CGACTGCAAG TCTAAAGAAT ACAAGGTTGT GCGAATTATA GAAAATTGTG
361 AGTATTCAGA TGATGAGCAA ACATTTATC ATCGTATTGC TCTTCCTCAC ACAGCTGAGG
421 TATACACCAC GGCTGCTAAC TCTTGAAAG AGATCAAGTT TGATATATCA AGTCAAACCT
481 ATCATTGTTC TTGTTTCAGT TACTTGAAGG GTTTTTGTTA TTGGTTTGCA AGCGATAACG
541 AGGAATACAT ACTTTCATTT TATTTAGGTG ATGAGACATT TCATATAATA CAATTGCCTT
601 CTAGGAGAGA ATCCGGTTTT ACGTTTGATT ATATTTTTCT CAAAATGAA TCCCTTGCTT
661 CTTTTTGCTC TCCCTACAGT CCAAGTGAGG ATTCTAAATT ATTTGAAATA TGGGTAATGG
721 ATGACTATGA TGGAGTTAAG AGTTCATGGA CAAAACCTCT AACTGTTGGA CCTTTTAAAG
781 GCATTGAGTA TCCATTGACA CTTTGAAAT TTGACGAGCT TCTTATGCTT GCGTCCGATG
841 GAAAAGCCAC CTCTTATAAT TCTAGTACCG GAAATCTCAA GTATCTTCAT ATTCCTCCCA
901 TTCTCAATAA GGTT
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza Pack S3 B

Varietà: 'Packham's Triumph'; coppia di primer: Md3for-rev

---

```
1 TTTTCCCAGA CCAGAGTTGG AAACAAGAAG TTTTCTGGTC CACGATTAAT CTTTCCATTG
61 ATAGTGATGA ACACAACCTT CATTATGATG TTGAGGACCT AATTATACCG TTTCCATTGG
121 AAGATCATGA TTTTGTACTG ATTTTCGGTT ATTGCAATGG GTTGTCTGT GTAGATGCAG
181 GGAAACATGT TCTTTTATGC AATCCTGCAA CGAGAGAATT TAGGCAACTT CCCGATTCAT
241 GCCTTCTTAA ACCCCCTCCC AAGGGAAAAT TCGAATTGGA AACGAACTTT CAAGCATTAG
301 GATTTGGCTA TGATTGCAAT ACTAAAGAAT ACAAGGTTGT GCGAATTGTA GAAAATTGTG
361 AGTATTCAGA TGATGAGCAA ACATTTTATC ATCGTATTGC ACTTCCTCAC ACAGCTGAGG
421 TATACACTAC GGCTGCTAAC TCTTGAAAAG AGATCAAGAT TGATATATCA ATTTAAACCT
481 ATCATTGTTT TTGTTTCAAGT TACTTGAAGG GATTTTGTTA TTGGTTTGCC AGCGATAACG
541 AGGAATACAT ACTTTCATTT TATTTAGGTG ATGAGACATT TCATATAATA CAATTGCCTT
601 CTAGGAGAGA ATCCGGTTTT ACGTTTGATT ATATTTTCT CCGAAATGAA TCCCTTGCCT
661 CTTTTTGCTC TCCCTACAAT CCAAGTGAGG ATTCTAAATT ATTTGAAATA TGGGTAATGG
721 ACGACTATGA TGGAATTAGG AGTTCATGGA CAAAACATCAT AACCGTTGGA CCCTTTCAAG
781 GCATTGAGTA TCCTTTGACA CTTTGAAAAT GTGACGAGCT TCTTATGCTT GCATCCGATG
841 GAAGAGCTAC CTCGTATAAT TCTAGCACCA GAAATCTTAA GTATCTCCAT ATTCCTCCTA
901 TTCTCAATAA GGTT
```

---

### Sequenza Fuji S3 A

Varietà: 'Fuji'; coppia di primer: Md3for-rev

---

```
1 TTTTCCCAGA CCAGAGTTGG AAACAAGAAG TTTTCTGGTC CACGATTAAT CTTTCCATTG
61 ATAGTGATGA GCATAACCTT CATTATGATG TTGAGGACTT AATTATACCG TTTCCATTAG
121 AAGATCATGA TTTTGTACTG ATTTTGGT ATTGTAATGG GATTATTTGT GTAGATGCAG
181 GGAAAAATGT TCTTTTATGC AATCCTGCAA CGAGAGAATT TAGGCAACTT CCCCATTCAT
241 GCCTTCTTCT ACCCCCTCCC AAGGGAAAAT TCGAATTGGA AACCAACCTTT CAAGCATTGG
301 GATTTGGCTA TGA CTGCAAT TCTAAAGATT ACAAGGTTGT GCAAATTATA GAAAATTGTG
361 AGTATTCAGA TGATGAGCAA ACATTTTCATC ATCGTATTGC TCTTCCTCAC ACAGCTGAGG
421 TATACACCAC GGCTGCTAAC TCTTGAAAAG AGATCAAGAT TGAAATATCA AGTCAAACCT
481 ATCATTGTTC TTGTTTCAGTG TACTTGAAGG GATTCTGTTA TTGGTTTGCA AGCGATAGCG
541 AGGAATACAT ACTTTCATTT TATTTAGGTG ATGAGACATT TCATATAATA CAATTACCTT
601 CTAGGAGAGA ATCCGGTTTT ACATTTGATT ATATTTTTTCT CCTAAATGAA TCCCTTGCTT
661 CTTTTTGCTC TCCCTACAAT CCAAGTGAGG ACTCTAAATT ATTTGAAATA TGGGTAATGG
721 ATGACTATGA TGGAGTTAAG AGTTCATGGA CAAAACCTCCT AACTGTTGGA CCCTTTAAAG
781 GCATTGAGTA TCCATTGACA CTTTGAAAAT GTGACGAGCT TCTTATGCTT GCTTCCGATG
841 GAAGAGCCAC CTCTTATAAT TCTAGTACAG GAAATCTCAA GTATCTTCAT ATTCCTCCTA
901 TTCTCAATAA GGTT
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza McInt S3 A

Varietà: 'McIntosh'; coppia di primer: Md3for-rev

---

```
1 TTTTCCCAGA CCAGAGTTGG AAACAAGAAG TTTTCTGGTC CACGATTAAT CTTTCCATTG
61 ATAGTGATGA GCATAACCTT CATTATGATG TTGAGGACCT AATTATACCG TTTCCATTGG
121 AAGATCATGA TTTTGTACTG ATTTTTGGTT ATTGCAATGG GATTATTTGT GTAGATGCAG
181 GGAAAAATGT TCTATTATGC AATCCTGCAA CAAGAGAATT TAGGCAACTT CCCGATTCAT
241 GCCTTCTTCT ACCGCCTCCA AAGGGAAAAT TCGAATTGGA AACGACCTTT CAAGCATTGG
301 GATTTGGCTA TGACTGCAAT TCTAAAGAAT ACAAGGTTGT GCGAATTATA GAAAATTGTG
361 AGTATTCAGA TGATGAGCAA ACATTTCATC ATCGTATTGC TCTTCCTCAC ACAGCTGAGG
421 TATACACCAC GGCTGCTAAC TCTTGAAAAG AGATCAAGAT TGATATATCA AGTCAAACCT
481 ATCATTGTTC TTGTTCACTG TACTTGAATG GATTCTGTTA TTGGTTTGCA AGCGATAGCG
541 AGGAATACAT ACTTTCATTT TATTTAGGTG ATGAGACATT TCATATAATA CAATTGCCTT
601 CTAGGAGAGA ATCCGGTTTT ACGTTTGATT ATATTTTTCT CCGAAATGAA TCCCTTGCTT
661 CTTTTTGCTC TCCCTACAAT CCAAGTGAGG ATTCTAAATT ATTTGAAATA TGGGTAATGG
721 ATGACTATGA CGGAGTTAAG AGTTCATGGA CAAAACCTCT AACCGTTGGG CCCTTTAAAG
781 GCATTGAGTA TCCATTGACA CTTTGAAAAT GTGACGAGCT TCTTATGCTT GCTTCCGATG
841 GAAGAGCCAC CTCTTATAAT TCTAGTACAG GAAATCTCAA GTATCTTCAT ATTCCTCCTA
901 TTCTCAATAA GGTT
```

---

### Sequenza McInt S3 B

Varietà: 'McIntosh'; coppia di primer: Md3for-rev

---

```
 1 TTTTCCCAGA CCAGAGTTGG AAACAAGAAG TTTTCTGGTC CACGATTAAT CTTTCCATTG
61 ATAGTGATGA ACACAACCTT CATTATGATG TTGAGGACCT AATTATACCG TTTCCATTGG
121 ATGATCATGA TTTTGTACTG ATTTTCGGTT ATTGCAATGG GATTGTCTGT GTAGATGCAG
181 GGAAAAATGT TCTTTTATGC AATCCTGCAA CGAGAGAATT TAGGCAACTT CCCGATTCAT
241 GCCTTCTTAA ACCCCCTCCC AAGGGAAAAT TCGAATTGGA AACGAACTTT CAAGCATTAG
301 GATTTGGTTA TGGTTGCAAT ACTAAAGAAT ACAAGGTTGT GCGAATTGTA GAAAATTGTG
361 AGTATTCAGA TGATGAGCAA ACATTTTATC ATCGTATTGC ACTTCCTCAC ACAGCAGAGG
421 TATACACTAC CGCTGCTAAC TCTTGAAAAG AGATCAAGAT TGATATATCA ATTTCAACCT
481 ATCATTGTTC TTGTTTCAGTG TACTTCAAGG GATTTTGTTA TTGGTTTGCA AGCGATAACG
541 AGGAATACAT ACTTTCATTT TATTTAGGTG ATGAGACATT TCATATAATA CAATTGCCTT
601 CTAGGAGAGA ATCCGGTTTT ACGTTTGATT ATATTTTTCT CCGAAATGAA TCCCTTGCTT
661 CTTTTTGCTC TCCCTACAAT CCAAGTGAGG ATTCTAAATT ATATGAAATA TGGGTAATGG
721 ACGACTATGA TGGAGTTAGT AGTTCATGGA CAAAACCTCT AACCGTTGGA CCCTTTAAAG
781 GCATTGAGTA TCCTTTGACA CTTTGAAAAT GTGACGAGCT TCTTATGCTT GCATCCGATG
841 GAAGAGCTAC CTCTTATAAT TCTAGTACCG GAAATCTTAA ATATCTCCAT ATTCCTCCTA
901 TTCTCAATAA GGTT
```

## SEQUENZE

---

### Sequenza Cho S3 A

Varietà: 'Chojuro'; coppia di primer: Md3for-rev

---

```
1 TTTTTCCTGA CCAGAGTTGG AAACAAGAAG TTTTCTGGTC CACGATTAAT CTTTCCATTG
61 ATAGTGATGA GCATAACCTT CATTACGATG TTGAGGACCT AATTATACCG TTTCCATTGG
121 AAGATCATGA TTTTGTACTG ATTTTTGGTT ACTGCAATGG GATTCTTTGT GTAGATGTAG
181 GGAAAAATGT TCTTTTATGC AATCCTGCAA CGAGACAATT TAGGCAACTT CCCGATTCAT
241 GCCTTCTTCT ACCCCCTCCC AAGGGAAAAT TCGAACTGGA AAGGACCTTT CAAGCATTGG
301 GATTTGGCTA TGACTGCAAT TCTAAAGAAT ACAAGGTTGT GCGAATTATA GAAAATTGTG
361 AGTATTCAGA TGATGAGCAA ACATTTTCATC ATCGTATTGC TCTTCCTCAC ACAGCTGAGG
421 TATACACCAC GACTGCTAAT TCTTGAAAAG AGATCAAGAT TGATATATCA AGTCAAACCT
481 ATCATTGTTT TTGTTTCAAGT TACTTGAAGG GTTTTTGTTA TTGGTTTGCA AGCGATAACG
541 AGGAATACAT ACTTTTCAAT TATTTAGGTG ATGAGACATT TCATATAATA CAATTGCCTT
601 CTAGGAGAGA ATCCGGTTTT ACGTTTGATT ATATTTTCCT CCGAAATGAA TCTCTTGCTT
661 CTTTTTGCTC CCCCTACAGT CCAAGTGAGG ATTCTAAGTT ATTTGAAATA TGGGTAATGG
721 ATGACAATGA TGGAGTTAAG AGTTCATGGA CAAAACCTCCT AACTGTTGGA CCCTTTAAAG
781 GCATTGAGTA TCCATTGACA CTGTGGAAAAT GTGACGAGCT TCTTATGCTT GCATCCGATG
841 GAAGAGCCAT CTCTTATAAT TCTAGTACCG GAAATTTCAA GTATCTTCAT ATTCTTCCTA
901 TTCTCAATAA GGTT
```



---

### Sequenza Cho S3 B

Varietà: 'Chojuro'; coppia di primer: Md3for-rev

---

```
1 TTTTCCCAGA CCAGAGTTGG AAACAAGAAG TTTTCTGGTC CATGATTAAT TTTTCCATTG
61 ACAGTGATGA GAACAACCTT TATTATGATG TTGAGGACCT AAATATACCA TTTCCATTGA
121 AAGATCATGA TTTTGTACTG ATTTTGGT ATTGCAATGG GATTGTCTGC GTAGAAGCAG
181 GGAAAAATGC TCTTTTATGC AATCCTGCAA CGAGGGAATT CAGGCAACTT CCAGATTTCAT
241 CTCTTCTTCT ACCTTCCCCT CCTGAGGGAA AATTCGAATT GGAAACGAGC TTTCAAGCAT
301 TGGGATTTGG GTATGATTGC AATGCTAAAG AATACAAGGT TGTGCGAATT ATAGAAAAC
361 GTGAGTATTC AGATGAAGAA CGAACATTTT ATCATCGTAT TGCTCTTCCT CACACGGCTG
421 AGTTATACAC CACAACGCT AACTCTTGG AAGAGATCAA GATTGATATA TCAAGTACAA
481 CCTATTCTTG TTCTCGTTCA GTGTTCTTGA AGAGATTTTG TTATTGGTAT GCAACGGATG
541 GCGAGGAATA CATACTTTCT TTTGATTTAG GTGATGACAC ATTTTCATATA ATACAACGCTG
601 CTTCTAGGAG AGAATTCGGT TTTAGGTTTT ATTATATTTT TCTGCGAAAT GAATCCCTTG
661 CTTCTTTTTG CTCTCGTTAC GATCGGAGTG AGGATTCTGA ATCATGTGAA ATATGGGTAA
721 TGGATGATTA TAACAGAGTT AAAAGGTCAT GGACAAAAC CTTAACCATT GGACCCTTAC
781 AAGGCATTAA GAAGCCATTG ACATTTTGG AAAGTGACGA GCTTCTTATG CTTGATTCCG
841 ATGGAAGAGC CACCTCTTAT AATTCTAGTA CCGGAAATCT CAATTATCTT CATATTCCTC
901 CGATTCTCAA GAGGGTT
```

## SEQUENZE

---

### TDF02

---

*MseC* -

1 AACTAATCAC TCGAATTACC CTGCTTCATT ACAAAATCTC TAGCCCGAAA AGATTCGGTG  
61 ACTCGCAAAT TGAACACAGG AGCATCAGAA GAGGAGGAAA GATGTGCTGA TTAGTGCAGA  
121 TCAGCAGC

- *EcoA*

---

### TDF03

---

*MseC* -

1 AGCAACTCCG TCTGATCAAT AGTCAATCTA TCTAGTATTG GAATCTGAAA GAGTGGATTG  
61 ATTGGATAGG ATGGATTGGA TTCGTAGTAT TGTAGATCTG TGATGGTGTT GTGTAATGCG  
121 CTTAGGTGTT TGTTAGGGGG AGGAGGGAGG AA

- *EcoA*

---

### TDF04

---

*MseC* -

1 AACAGGTGAT CAACAGCCAA GAAGTAGAAG TGTGGCCTCG TATCACATGG AAGCCAAAAT  
61 GGGCTCTCAC TTTACAGAC ATAAAAAGCA AAGTCAGTGG AAGCTGCTCA ATTTCTCAGA  
121 GGTCTACATT GGTTATCAAA GGCCGGAATG TCTTTATCAA TTCTCTCTCC TTGGATGGGG  
181 CTCTTGTTAT TGACCCAGTT GATGACGCAG AGGTAAAAGT GGAGGGCTCG GTCGTAAACA  
241 AGGTTGGGT CCTCGAACAC GTCGATTACA AAGATCCGTC GGTACCGGAG GAACTGAGAA  
301 CAAGGGGCTT CAGAATCAAC AAGATTGAAG AGCTGGAGAA GAAGTGAAGA AACGTCTTCT  
361 AAGC

- *EcoA*

---

---

**TDF05**

---

*EcoA* -

1 CCTTCCTCCA TCCCTTCACC TACATACCAA TGCGCAAATG CCCGCTTGGA ATACATAAGG  
61 TCAAATTTAT GGTCAATTCG GGAGAAGACC TCAGCTACTG CAGTGTT

- *MseC*

---

**TDF06**

---

*EcoA* -

1 GCCGGGTTTC CGTGATTGAA GGGTCCCACA TGTTACCTT CCATCAGACG CATCAGACCT  
61 TCCACCAGAT CAGAAACATA TTGAAAACCTC CTTGTTTGCT TCCCGTCACC ATAAACCGTC  
121 ATCGGTTCTT TCCTCAACGC CTGAGCAACA AAGTTGCTAA CAACACGGCC GTCATCTATG  
181 CACATTCTTG GCCCGTAAGT

- *MseC*

---

**TDF07**

---

*EcoA* -

1 TAGCAACACA GAAGAAAGTA AATGAAGATT CTCTACTAAG CTAGCAAAGA GAAGTTATAC  
61 ACCACGTAAG TCAAACACCT AAAAAAAGGT CCCAGGTAAG GGG

- *MseC*

---

## SEQUENZE

---

### TDF09

---

*MseC* -

1 CTTTGATTTG GAATAGTCGA GAGAGGCAAA GTACACAAAA CAATCCAACCT CTCTAAAGTC  
61 TAGACTAACA GATGCAAGAG GAGCACTGTA CGGTTAGGAG GGATTTGTCT CAAGATTACA  
121 CACAACATC ATCTAACCTA TGTTTGGCTT CTTGCTATTG CGGATACGAG GGAGGCTGAT  
181 ATGCCGGTGG AGCAACATTC GAGTAATTAT ATGGGGCGTA GTTGGTCTGG CCGCCACCAT  
241 AAGCACCCT GCTTCCAAAC CCAGCAGCGC CCATGCTGTC CCCAGGGAGG GAGTAGTGTT  
301 GAGGAAGAGC AGCGGGGCTT TGAGCAGGGG GTGCACCATA TGAGGATCCA TACAATGGTG  
361 CCGTTGGACC ATCGAACACA CTTTGGCTCG GGTAACCTGTA AGGACCAGAA TATCTTGTG  
421 CGGGGCTATG TTGTGGAAGA GGATTTGGGT TCCTCCTGGT AAAGGAGGGG TA

- *EcoA*

---

### TDF11

---

*EcoA* -

1 CGGGTCACGC TTTCTAAATT AGAACGGGAA ACAGGGAGCT GTTCAGAAAA TACAAAAGAA  
61 AAACCAACCA CCATAAAAAG CCCACACAGA TGGTGGCGTT G

- *MseC*

---

### TDF12

---

*EcoA* -

1 CTATTTTACA CGAATGGTTT TAGTTCTTCT TCCGCACGCA GATAACATAC AAGACTCAAT  
61 GGCAATTCAT GGAAATCAAA CACATGAACC ACGAAAAAAT AAATCCACAG CAGACGTAAA  
121 GCTAAATTCT ACAGAACCTG TACAAAAGTT ATTACAGTAG ATTGATAGAC GGGTTGAAAA  
181 ATAGCTTTCA CAAAATCCTG TGTTTATAAC

- *MseC*

---

---

## TDF14

---

*EcoA* -

1 TCTTCTTCCC CACCCATTCC TCACGGTTCT ATAACTACAA ACTTGAGGTT GCTAAAAATT  
61 TCTTCAACAA TGATTAGAAT GGGCTCAGGA CCACTCTGAT CCCTTAGTGG CTCTGCCTAT  
121 GTCTGCC

- *MseC*

---

## TDF15

---

*EcoA* -

1 GAGGTTGTGC TTTGTTATTG CGAAGCGTAA GTGCCGGATG AAAATCCGGA TATTCACTAA  
61 ATATGTGTCC TAGATCATCA ACAACAGTGA TATCTGAGTC GGTGAAGATG TAATGGGTAT  
121 GCTTCTGATT CTGAGGAAGC TCCTCCATCC TAGATTCTAG GAAGGCAATG TAAGACCTGC  
181 TTCTCTGAAG CATCAACTTG TCTCGTGAAT ATTCACCTTG AATTGGATAT ACAGTGACCT  
241 TGTTTCTGCG TATTGAAAGA TCAGCTGCCG GGTCTGTTAG AATGACTACA CTGCTCCGGG  
301 GCATAGCCAG CTGAATGAA

- *MseC*

---

## TDF16

---

*EcoA* -

1 GAAAATAATG AAGACGAATG GGATGAAATA CTGAAACATT TGTTACCTAA ATATGCCAGA  
61 AGCTGAGACT GCCGAGCGTC TTCATTAGC AATGCAA

- *MseC*

---

## SEQUENZE

---

### TDF18

---

*EcoA* -

1 ACCTAATGTC AAGACATATA CTATAATGAT TCGTGGATTG TGTAATGGGG GGCAAATATG  
61 TGAAGCGGAA AACTTGCTTA GAGAAATGGA AGAGAAAGGC TGTCTCCAA ATGGTTGGAC  
121 GTACAACACA ATTATCCGAG GCTTTATCAA TAACAACGAG ACATCAATGG GAGTGAGGCT  
181 TATTCAAGAA ATGGTGGAGA GGGGTTTTTC TGCAGATGCG TCAACTATTG AGTTGATT

- *MseC*

---

### TDF19

---

*EcoA* -

1 AAACGTGACC ACATTGGAAG ATGCTGAACG TATTTTGACT GCTGAAAGTA AAGACGTTTT  
61 GGGCTACCTC AACTCTCTGG TGGGTCCAGA GAGTGACGAG CTTGCTGCTG CTTCAAGACT  
121 TGAGGATGAG GTCACCTTTT ACCAAACTGT AGATCCCAAG GTGGCAAAC TTTCCATCT  
181 TGATGCTGAA

- *MseC*

---

### TDF20

---

*EcoA* -

1 AAACGTGACC ACATTGGAAG ATGCTGAACG TATTTTGACT GCTGAAAGTA AAGTCGTTTT  
61 GGGCTACCTC AACTCTCTGG TGGTCTCTGA GAGTGACGAG CTTGCTGCTG CTTCAAGACT  
121 TGAAGATGAG GTCACCTTTT ACCAAACTGT AGATCCCAAG GTGGCAAAC TTTCCATCT  
181 TGATGCTGGA

- *MseC*

---

---

## TDF21

---

*MseC* -

1 TCTGATGGTG CGTTGCAGAG CCATACAAAG GCAAAGCACA GTGCTGCAAA GTGAAAGGCA  
61 GATTAGTCTC CAGCCTCCAC CATCTTGATG TTTTGGAAAT CATGAGAAGA AAGTAGGTTT  
121 AGTAAGATAA CGGAGATAAT AGCGTTTTAT TCGTTACTAA CTGAACTGGT TCTGTTTGAA  
181 CCGGCGTGGA TGAGAACTT TTCAGGTGA TCTGGGAGGC ATTTTGCTAC AACTATTT

- *EcoA*

---

## TDF23

---

*MseC* -

1 TAGGGATCAA AGTACTTTGT GTGCATTTTG ATGTTTGGCT GTCTCGTGAA TGTTTATCGC  
61 TAGTTATGAA ATGAGAACAG GATGAAGGGG CTAACAGTTT CTTGAAAATA TGGTGTGCAT  
121 TGCTTCTTAG CATTACTCAG TGTTACGAG ATACAGTAAA TGTACAAAAG GCACAAACAC  
181 ATGCAAAACG CCTTGGGCGT GGTGCTCTGT ATGTCGTAAG TTTTATGAAT TATGACGCAC  
241 AACACGTATA TGGCACGCTG TAAAGGGTCG GCATGTTTTA TAACCCATTT GCTGCTGCTC  
301 AGTTG

- *EcoA*

---

## TDF24

---

*MseC* -

1 TATTTTCTTT TGAGATCTCT GAAAATTAGG GTAGATGGTG ATTGGAAGCT TTTCAGACAA  
61 ATTTTCGAAT TGAATCTGCG ATTGGTGTAT AGTGGAATTT TTCTCCGAGG CCTCCAACCA  
121 TCGTGCAAGT ATAGAATGGG GTTCTCTTCT CTCTCATCCG TTGGTGTTGT TAGAATTTGT  
181 ATAATATTGG TAGAATGTGG TGATAAATAG ATACGGTTGG GTCTGTTTTG CATAGCACAT  
241 GTACATTGCT AAGTACTGCG AGTCTGCGAC CCGTCTAAAT TTGGATGACT TGTTTTTTGG  
301 TTTGGTGCTG ACAGATTGAG GATGCTTTGG TGGATACAAA ATTAGATAGC CTGTAAACCA  
361 ACTTCACTCA TG

- *EcoA*

---

## SEQUENZE

---

### TDF26

---

*MseC* -

1 AGATATTGGT CCTCACTTTG GTCCAAAACC AAACCACTGT GCCAGGAAGA ACTTATTCTT  
61 TTTTCGGGAG GCATCAGGTG CGGCTTTTGC AGGTGAAGGG GATTTGACAG GCGAAGAGCT  
121 TGGTTTAGCT AATTTTGGGG AAACCCCTT GGCATTTCTT GCATCGTTAG GACTCTTGTC  
181 TGAGTTTTGG ATGGTGGGTT AGTTGCGGGA AATAGAGGTT GATTTTCGCT CGGAAACCTT  
241 CTGCTCCACA CGTTCTCTGC TCTCACCCC ACTTTCATTA GGAGGCTTCC CATAATTTTG  
301 CCGCAAAGCT TCAAGAAAGG AATCATCTCT TTGGTCTTGT GTCAATTGAT CAAAAAG

- *EcoA*

---

### TDF27

---

*EcoA* -

1 CAAATTGCTA CAGATGTAGG TTCTCCTCCT GTAGAGCAAG CACCCAATGT TTCTGAACCA  
61 GCAATAGTAC AAGCAGTTCC CACACCTTCC CTAGAGCCTC GAAGCATGTC AACAAGACCC  
121 ATTTGGGAAG CTCCCCTACA CACAAAGAAA ATGCCAGCCT TGAAGAAATT TAGACTGAGC  
181 AAAGAACTGG TTCAGGAAAG AGTGAAGGAT AACGTCATTA TTGTGACCTT TGGGAACTAT  
241 GCATTCATGG ATTTTATCCT GACTTGG

- *MseC*

---

### TDF28

---

*EcoA* -

1 CAACTGACCA TATATGGCAA TTCAGAACCT GAAGTTGCGG TAGGAGATGG ATGCACCTCA  
61 AGCTCCAAAG AGAATGAATC ACTTTCTATC CAAATTCAGA ATGCGAAGCA GAACCTTTCT  
121 GTTGTTCCTA AAACTTTTGT TGGCAACGAG TTATTAGATG GAAAGACG

- *MseC*

---



---

### TDF30

---

*EcoA* -

1 CGATTTTATA CTCTACACGA AGAATAAGTA TGGTGATCCA ATCATTTACA TTAGTGAGAA  
61 TGGCGTTGAT GAGTTCAATG ATCCCAACTT ATCACTAGAT GATGCCCTCC ATGATCCATT  
121 TAGGATTGAC TACTACAATC GCCACCTTTG TTACGTTCAT GCAGCAATCA AGAAGGGTAG  
181 TAATGTGAAA GGATACATTG CATGGGCAAT TTTGGACAAC TTTCAATGGA GTGAAGGCTA  
241 CACAGTTCGA TTTGGTATTA CTCAGGACTC ATCGTCACTT GGCTGCAAAG GAATCACAAA  
301 TTTTGTGGCT AGCAAAATGT CGAAAATGTG CATCATTGGT GGTGTTATTG CTATTTTTTT  
361 CATTGGGTTG CCATTCAATT TGTA

- *MseC*

---

### TDF31

---

*EcoA* -

1 TACAGGTATC TCACAATCAC AGATAGACTC ACAAATGAAT GGAATCATAG GACTATCGCT  
61 AACAAAACAT GTTCTGCTTT TTGTTATGCC TTGAGATTTT GTGAGACATC GTAACATTAT  
121 TGAACTTTCA AGTCATTGAA CTGGTTCACT TGCCCTAAAT ACATAAACTC CAAGAGTGGG  
181 CATCAAAAGG GACAACACAG CAATCCCAAC AATCTTCAAT GGCAAGCCAA TCTTGATCAT  
241 GTCTTGGAAC TCAATGTGGC CAGTGGCGAA TCCTACGGTA TTTGAAGGA

- *MseC*

---

### TDF32

---

*EcoA* -

1 TATAAATAGA AAACAGAACC CAAAATTCTA GCTTGGGTTT ACAACTATAA ATATTGATCA  
61 CCTTGTTTCT TGCAAAGTTG GTCTCCGCCG TGGGCAAAGT CGGTGCATAT TTTAGATTGT  
121 AAGCATAGAA TAGAGTGCGC GCGTGAGGGT AGCTGCAAAA TGCTGCCAAA TTGCCATACA  
181 TGTTCAAAGC ACATAGATCG ATCTGTCCAA GAAGCTGCAA GGACCACTGA AACAGAAGCA  
241 TCTTATACCA

- *MseC*

---

## SEQUENZE

---

### TDF33

---

*EcoA* -

1 TAGAAGGTGT GTTTCTGTGG AAGTGATTCA TGAAGGTTCT GGATTACAGT TTTCGGGGTT  
61 AGATTTCTGA ATCTATGGGA TTTCCTTATC AATTATCGTT TCAAGGGGTG AAAAACAGTG  
121 AGGGACGACA CAGGAAGAGG GGAGAGAGAG GACAAAATAA TGGTTTCTGC TACTTTCAAT  
181 GCTTTGG

- *MseC*

---

### TDF34

---

*EcoA* -

1 ACACAAAAAG GAACAGTCTG ATTATTAGAG AGAAACCCTA GAAATGTGAA CACTGAATGT  
61 GCATTTTCAT TTCTTGTAAC GAGCTACCTC ATCGCC

- *MseC*

---

### TDF35

---

*EcoA* -

1 AGAAATGTGA ATAGGATGAT GAAGACTTCA TCGACAGAGG AACCAACACC TGTGAGGGTA  
61 TGAGATGTGT TTTTGCGGGC TTTTCCAGCG AGTCCATGCT GTCAGGAATG GCACTGATGC  
121 CTGAAGATGA ATGATTGTTG TCAAAGCTGC TCCCTGCA

- *MseC*

---

---

**TDF36**

---

*MseC* -

1 TTTCAAAGA TGCAGCAATC AAGGTGAAAA TGA CTACTACATC CTGGGTTGCT AACCAAATAC  
61 TATATTGAAC CTGCGGATAT CTAATATCTG TACATACACC TCCGGAAACA CAGACCAAAG  
121 GCGATTTAGT ATTTGTAACC CGACAAACAC AAGTCTTCTT GTAAGCTTGA GAACTATACA  
181 CCCAGAGGAC CCTAAAATTG GGATTGAGAG TTACTTCCAC CACCAGAACT GTCTAAACAA  
241 GTATATTTTC CTCATCCGAG CATCGTATGC CATGAAGGCT CGCGCTTCTA CAGGGTCAGC  
301 ATTCAAATAC TCAAATGCAT ACATCTGTTT AGCCTCTTCC AAACCATCAA TCTCCATCAC  
361 AGCCTCTAGT AGTTGAGAGG CGTCAATTGA GTATTTGCTT TGCTCCATTG CATCAGCCAA  
421 GCGACGAATG CTTGACGCCA CAGCCATCAT TGCATCCTGA AGGGCTTCTG AGCCACGAGG  
481 GCGTTTCGAA AGTTGTCTAA GTGGCTGGAT CAGAGGGGGG TCT

- *EcoA*

---

## SEQUENZE

---

### Sequenza genomica del gene della TGasi di pero europeo, cv 'Abate Fétel' (esoni 1-14)

---

1 GACAAGATGG TGGCTCGGAG CTTCCAGGTT CACCACCAGG ACTCCACTTT CTCCGTTGAC  
61 TACGACACCG ACGACGGCCT TGAAGTATCT CTGTCTCCCT CTCTCTCTCT AAAACTCTCT  
121 TTCTCTCTCT AACATCCAAT TCATTGCAGG TCCTCAAATT TCAACTGTTC TCCCTCACCT  
181 CCGTTCCCCC CGACGAGCAA AAGTTTCGAC AGTCTCTCTG TATCTGAAAA TTGTGAAATT  
241 TCGAGCTTAA TTTTAGCTCA AGTTTGATTG AAATTGAATT ACTCTACTTT CTGTAAAGTT  
301 AATTGGATTC GATGGAGATT CCGTTGTTTC GGACGATTCG GGCCTCGTTT CGATTTGCGA  
361 GAAGCTCCGA TTGGTTTCGA TCAGCGAAGA ACAACAACAG CAAGAAGAAT CAGCGGCTCA  
421 GAACGACGAA TTGCTGAAAT CGGACGAGGA ATTGGCTAGA ATGTTGCAGG TTTGTTTACA  
481 GTTCCGTTGC TTATCAAAAT TTTCTTGAAA TTTTGATCAA TTTTAACTCT TAATTTATTA  
541 TTGTGTTGGA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA GCAGAGGAGG AAGCACTTTT GTTTCAGCAG  
601 TACGCTGCCC CTGAAGATGA TGGAAAATTC GAGCAAAAAC TGCGGCCTTA TGTCAGTCAA  
661 GTTCTTATGG TAATGTTCTT TCTCATTGCT TAGTGCGTTT GGTCCCGGG AAACCGATCG  
721 AAAACAGTGG AAAATAAAGA TTTGGAATTT AGAGGTTTAT TTTGCTCGG ACACGAGAAA  
781 GCAATGAGCT TAGGGTGCTT AGATTTTGAA TAATAGTTAA CTTGTATTTT TGTACCTCTC  
841 CAATTTACGC ATTGATTTAA ACATACTGC TAAATGATGT TTCCGTTGGG TTTTGGCCTG  
901 TTGTTGGTTT AGTACGAGGA CCCGGTGCGC CAGGAGGCTG CTCGGAAAAC AGTCCCTATA  
961 GAAGAGCTTG AGGAGAAGGC ATTGATCAGT TTGGCCAAGG TGAGAGCACT TGTCTCTTGT  
1021 CTCAGAAAAT ATATGTTTTA AGTGCCCAT TGTGTTTTT TTCTGTAGGA CTTTACTGGT  
1081 GTGTAGAAAT ATATGAATTT GCACTCTGCT AAGATGTTTT GGTGATAAGT AAATCTGATT  
1141 AAAATGTTTT AGGAGGGGAA CTTAACTCCG TCAAAAATG AGCAAGATCA TGCTTTCCTG  
1201 CTGCAGCTAC TTTTTTGGTT CAAACAGTCT TTCAGGTGTT CTGTTGCTTC GTTGGCTTAT  
1261 ACTATTGAGT TGTTTCTAAT AAAAGTTTAT TTTGTGTCGT TTTAACCAAA CTTCCGTTTC  
1321 ACTTTCATCA TTCATAGCTA CATGCTGAAT ATTGCATAAT TGTGTTCTGT CTGGTTTATT  
1381 TATTGCAGTT GGGTTAACGC ACCTGCCTGT GATAGTTGTG GCAATAACAC CGTAAATAGT  
1441 GGCATGGCTA ATGCAATTCC TTCAGAAATC CGATATGGAG CTTCTCGAGT TGAGATCTAT  
1501 AGGTATGCTA TAGAAATTAG AATATACTCA TTTGTATCGA TGCATAGTTT ACATAGTAAT  
1561 TTTCTTTCTT TACTGTTCCA CTATTATATA TCTAGCCTTT CATTGGGGTA ACTGTCTGAC  
1621 AATAATGGTT CTGGTAAAAG ATATAATTTA GTAGGCTTTC TTTGTCTGAT TTAAGATCAA  
1681 AGATAGCTGA AATTGAAAAG ACTTTTCCAC TGTAACCTG GATCCTTCCA CTATCACAGA  
1741 TGTGGAAGCA TTCACATCTA TATTGTTGAG TTTAAGCGTT TTAGGTGAG AACCTCATGT  
1801 CACAAAACAT TGACAAACTT CTATGTTTAT CACAACTTTT AACCATAGAC ATTACTTTTA  
1861 CTTATTATAT TTCCCTTTTC TTGTTTCTTA GCTTCTTATA TTTTGTGGA TGCATAAGTG  
1921 AATTTTCACA TACATATCTA GATTCAAAAT ATTTAACTAT AATGACATTT ATTGTTTTTT

---

1981 TTTCTTCTAT CCAGATGCAA TATTTGTCTT ACGGTGACTC GTTCCCACG CTACAATGAT  
2041 CCACTAAAGG TATTTACTAT TTATGAATCT TGCCCTCGTT AAGAAGCCTA TTGGATATTT  
2101 TATGTCTCCG TCAATTTCTT TTTCTGTTT TCCTCAATGC AGCTTGTGGA AACAAGAAGA  
2161 GGGCGTTGTG GGAATGGGC CAATTGCTTT ACGCTTTATT GCCGAGCTTT TGGATATGAA  
2221 CCCCGTCTTG TTAGTCATTT TCTATCTGAC TTTCTTAATA TTCAAATATG GATATGCTTA  
2281 AAGCAATATG AATATTTTTA ATTCATCCTG TACCACATTT GGAGTTGAGC TTCAATGCTG  
2341 GAATCTCATT ATACGTTTTT GGCTGAAAAT AGATAATTA GTAGTTTTCGT TGTGTCCCTT  
2401 TTTCTTAGA CTGAGGAGGC TTACTTGGAC CCATACTTGC TGTTACTGGT GACAGATTTT  
2461 TATTAATTAT GTTTTTATTT TCAGATCTTG GATTTACGG ATCATGTTTG GACAGAGTGC  
2521 TTCTCACAAT CTTTGGGAAG GTAACCTTCA TTTACGAACT AGTGCTATTT ATTTAACTTA  
2581 GGAGATTTGG AAAGCCAATA ATATATGCCT ATAATCTTCT TTTGATGCTT TGTTTTTCAG  
2641 ATGGATGCAT CTTGATCCTT GTGAAGCAGT GTATGATAAA CCCCTGTTAT ATGAAAGCGG  
2701 GTACTTTTCT TAATTAGTCT GTTCATTCAG TAGATGACTT ACTTTACCTT GACTTATCAG  
2761 CATTAGAATA TAACTTCAAG TATTTTTCGG AAGGTGGAAC AAGAAATTGA ATTATGTAAT  
2821 TGCCATCACA AAAGATGGTG TTTGTGATGT AACCAAACGC TATACGAGGA AGTGGCATGA  
2881 GGTAATCACA CTAAGTGGTA CTGGCTTTAA TTAATTTGCC TAGATTTTCA TTAGGAGATC  
2941 TACCATGCGA ACTTTATTTT GAGCCGTGAT GAGGAAGACT TCTTTTTGTT TTTGCAGGTA  
3001 CTTTCTCGAC GTAACATCAT TACAGAGCCT GCATTGTCAG CTGTGCTTGC TAATATAACA  
3061 AAAGATTGTC GAAGAGGGTT TACTTCTCAA GTACTTTCTG TACTTGAAGA GCGTGATGAG  
3121 AAGAAAAGAC AAGAACTTGA AAGAGGTTTG CATTCTACAG ACAATGACTC AACCTCATT  
3181 CCTGGGAGAC GAAGTGGGGA CAAGGAATGG CGCAAGTCAA GATTAGAATG TGTTTCTGAT  
3241 GAGAGTTGCT CCTTGAGTGG TTCTTCTTGT CCAGTTCGTT CATGCTTTGA CGAGCAGGTG  
3301 ACCAAAATTC ATAATGCATT TCTTCCAATT CTTTCAAAGC TTGTTGAGGA AGAATTTCCA  
3361 AAGTCAAGGG CCGTTGAAGT ACTTGAGACT CTAAAAGGCA TTCTCATGGA TCTTAAGAAA  
3421 TCACCTTTTA AAACAAGGAG GACCACAATC GATTCAGTTT CTAATATCAA CCAATCACCT  
3481 GTTCATCAGT TGCTGCCCTC TTCACTGAG TTACTTAATG CTCTTTCGAT GAGTGTATG  
3541 GTAGATGGTG ATGGGAAGGT CGACATTTCT CTGTCTGGAA GTGCTGTAA AACCTCTTTG  
3601 GCACTACCTG TTGCATTGGA TGCTTTGGAC AACACAATCA ATAATCTTAA CAGTTGTGAT  
3661 AACTTTGTTG AAAAGTCTCT TTGCTTGCTT CTTTTGAAGC TAAACAGAAT ACATTCTGGT  
3721 TTAGTCCTTG CAAGTGGGGA AGAAATCCC TTTGGAATTG TGAGTTTTAT TTGGTTTTGC  
3781 GGTTCATCTT TGTACCATTT CATTCAAAAA GCTTCTCAAT CTCCCCGGTA AATTCAGGC  
3841 CACATCAGCA TTTGATGGGA TACGCATGTC TAAGTGGGAA GAACCAAATG GTG

## Sequenza del cDNA del gene della TGasi di pero europeo, cv 'Abate Fétel'

```
1 GACAAGATGG TGGCTCGGAG CTTCCAGGTT CACCACCAGG ACTCCACTTT CTCCGTTGAC
61 TACGACACCG ACGACGGCCT TGAAGTCTC AAATTTCAAC TGTTCTCCCT CACCTCCGTT
121 CCCCCGAGC AGCAAAAAGTT AATTGGATTG GATGGAGATT CCGTTGTTTC GGACGATTGC
181 GGCCTCGTTT CGATTTGCGA GAAGTCCGA TTGGTTTCGA TCAGCGAAGA ACAACAACAG
241 CAAGAAGAAT CAGCGGCTCA GAACGACGAA TTGCTGAAAT CGGACGAGGA ATTGGCTAGA
301 ATGTTGCAGG CAGAGGAGGA AGCACTTTTG TTTCAGCAGT ACGCTGCCCC TGAAGATGAT
361 GGAAAATTTC AGCAAAAACCT GCGGCCATTAT GTCAGTCAAG TTCTTATGTA CGAGGACCCG
421 GTGCGCCAGG AGGCTGCTCG GAAAACAGTC CCTATAGAAG AGCTTGAGGA GAAGGCATTG
481 GTCAGTTTGG CCAAGGAGGG GAACTTAACT CCGTCAAAAA ATGAGCAAGA TCATGCTTTT
541 CTGCTGCAGC TACTTTTTTG GTTCAAACAG TCTTTCAGTT GGGTTAACGC ACCTGCCTGT
601 GATAGTTGTG GCAATAACAC CGTAAATAGT GGCATGGCTA ATGCAATTCC TTCAGAAATC
661 CGATATGGAG CTTCTCGAGT TGAGATCTAT AGATGCAATA TTTGTCCTAC GGTGACTCGT
721 TTCCCACGCT ACAATGATCC ACTAAAGCTT GTGGAACAAA GAAGAGGGCG TTGTGGGGAA
781 TGGGCCAATT GCTTTACGCT TTATTGCCGA GCTTTTGGAT ATGAACCCCG TCTTATCTTG
841 GATTTACCG ATCATGTTTG GACAGAGTGC TTCTCACAAT CTTTGGGAAG ATGGATGCAT
901 CTTGATCCTT GTGAAGCAGT GTATGATAAA CCCCTGTTAT ATGAAAGCGG GTGGAACAAG
961 AAATTGAATT ATGTAATTGC CATCACAAA GATGGTGTTC GTGATGTAAC CAAACGCTAT
1021 ACGAGGAAGT GGCATGAGGT ACTTTCTCGA CGTAACATCA TTACAGAGCC TGCATTGTCA
1081 GCTGTGCTTG CTAATATAAC AAAAGATTGT CGAAGAGGGT TTA CT TCTCA AGTACTTTCT
1141 GTACTTGAAG AGCGTGATGA GAAGGAAAGA CAAGA ACTTG AAAGAGGTTT GCATTCTACA
1201 GACAATGACT CAACCTCATT ACCTGGGAGA CGAAGTGGG ACAAGGAATG GCGCAAGTCA
1261 AGATTAGAAT GTGGTTCTGA TGAGAGTTGC TCCTTGAGTG GTTCTTCTTG TCCAGTTCGT
1321 TCATGCTTTG ACGAGCACGT GACCAAAAT CATAATGCAT TTCTTCCAAT TCTTTCAAAG
1381 CTTGTTGAGG AAGAATTTCC AAAGTCAAGG GCCGTTGAAG TACTTGAGAC TCTAAAAGGC
1441 ATTCTCATGG ATCTTAAGAA ATCACCTTTT AAAACAAGGA GGACCACAAT CGATT CAGTT
1501 TCTAATATCA ACCAATCACC TGTT CATCAG TTGCTGCCCT CTTTCACTGA GTTACTTAAT
1561 GCTCTTTCGA TGAGTGTTAT GGTAGATGGT GATGGGAAGG TCGACATTC TCTGTCTGGA
1621 AGTGCTGTTA AAACCTCTTT GGC ACTACCT GTTG CATTGG ATGCTTTGGA CAACACAATC
1681 AATAATCTTA ACAGTTGTGA TAACTTTGTT GAAAAGTCTC TTTGCTTGCC TCTTTTGAAG
1741 CTAAACAGAA TACATTCTGG TTTAGTCTTT GCAAGTGGGG AAGAAATTCC CTTTGG AATT
1801 GCCACATCAG CATT TGATGG GATACGCATG TCTAAGTGGG AAGAACC AAA TGGTGCACAA
1861 GGTTGCTGGA TCATGTATAA AGTATCTGAG AACCAGATGC ACGAACTTGT GGCATATGAG
1921 TTAATGTCAG CCAGCGATGC ACCAGAAAGG GATCCCATGG ATTGGGTTGT TGAAGGAAGC
```

---

1981 AATGATGAGG GATCAAGCTG GCATCTGTTG GATAAACGAA CTTCTCAAGT ATTTGATAGT  
2041 CGTTTTTCAGC GTAAAACATT TCAGATTGCT TCTCAAGGTT TCCTCGCAAA TGCTTTCAGG  
2101 TTTAGATTTT TGGCCGTAA AGACGTCCAA TCAAATTCGC GGCTGCAATT AGGTAGCATT  
2161 GACCTCTATT CTAGAAGCAG TTGATTCTTA CAGATCAGAA TCTCTCCATT TGGATACTCG  
2221 ATTCCAGTGC GTTGAAGAAG CTTGACGCTG CCGTTTCATT TGTTTCAGCT GCCTGTAAGT  
2281 CGCTCTCCTC CTGTCTTAAG GCATAGGGAG ACTGCCCATG GGATTTAGGA TCTATCCTAA  
2341 AACTCCTTAC CAAGATGTTT CATATTTCCA TTGGGAATCT AGGAAAAACT GTTTTCAAAA  
2401 GAGACTAAAT ATGTGGAGAA TTTATGGAGG AATTA ACTTG GCTCCCTCAA TATTCGCTAT  
2461 GTGACCTGCT TACGGA ACTT CATATTTATG ATCGGAACTT TTATATGTAT GATTGCAATG  
2521 TTCGTATTAT AAAGCATTAT CTAACGACGA TAAAAA AAAAAA

## SEQUENZE

---

### Sequenza proteica dedotta per la TGasi di pero europeo, cv 'Abate Fétel'

---

1 MVARSFQVHH QDSTFSVDYD TDDGLEVLKF QLFSLTSVPP DEQKLIQFDG DSVVSDDSGL  
61 VSICEKLRLV SISEEQQQE ESAAQNDELL KSDEELARML QAEEEALLFQ QYAAPEDDGK  
121 FEQKLRPYVS QVLMYEDPVR QEAARKTVPI EELEEKALVS LAKEGNLTPS KNEQDHAFLL  
181 QLLFWFKQSF SWVNAPACDS CGNNTVNNSGM ANAIPSEIRY GASRVEIYRC NICPTVTRFP  
241 RYNDPLKLV TRRGRCGEWA NCFTLYCRAF GYEPRLILDF TDHVWTECF S QSLGRWMHLD  
301 PCEAVYDKPL LYESGWNKKL NYVIAITKDG VCDVTKRYTR KWHEVLSRRN IITEPALSAV  
361 LANITKDCRR GFTSQVLSVL EERDEKERQE LERGLHSTDN DSTSLPGRRS GDKWRKSRL  
421 ECGSDESCSL SGSSCPVRSC FDEHVTKIHN AFLPILSKLV EEEFPKSRV EVLETGIL  
481 MDLKKSPFKT RRTTIDSVSN INQSPVHQLL PSFTELLNAL SMSVMVDGDG KVDISLSGSA  
541 VKTSLALPVA LDALDNTINN LNCDNFVEK SLCLPLLKN RIHSGVLAS GEEIPFGIAT  
601 SAFDGIRMSK WEEPNGAQC WIMYKSENQ MHELVAYELM SASDAPERDP MDWVVEGSND  
661 EGSSWHLLDK RTSQVFSRF QRKTFQIASQ GFLANAFRFR FLAVKDVQSN SRLQLGSIDL  
721 YSRSS



Appendice B

Allineamenti

## ALLINEAMENTI

**Figura B.1:** allineamento fra le sequenze dei geni SFBB di pero giapponese e melo; le regioni su cui sono stati disegnati i primer sono colorate secondo lo schema riportato alla fine dell'allineamento.

```

Mdsfbb3-alpha TCATTTAGTTTGG.TTCTCAAACCTGGTTGTGTTCTATCCT 182
Mdsfbb3-beta ..... 0
Mdsfbb9-alpha CTTTTTTGGGTAT.ATATACTTGTGAA...TTCTTGTG.. 34
Mdsfbb9-beta .....TGTAT.ATATACGTGTGAAGAATTCCTGTG.. 29
Ppsfbb4-alpha TTCTTTTATGTGT.ATATACATGTGAAGAATTCCTGTG.. 85
Ppsfbb5-alpha .....TGAAGAATTCCTGTG.. 15
Ppsfbb4-gamma .TCCTGTGTATAT.ATATACGTGTGAATAATTCATGTGCA 38
Ppsfbb5-gamma TTCTGTGTATAT.ATATACGTGTGAATAATTCATGTGCA 43
Ppsfbb4-beta TGCCAAAATGTCACAGGTGCGTAAAAGTGAAACTCTTA.. 129
Ppsfbb5-beta TGCCGAAATGTCACAGGTGCGTAAAAGTGAAACTCTTA.. 69

```

```

Mdsfbb3-alpha GCAAACAAAATTATTGAAATGTCCCATGTGCGTGAAAGTG 222
Mdsfbb3-beta ..GAATAAAACTGCCGAGATGTCCAGGTGCATGAAAGTG 38
Mdsfbb9-alpha ..AAATAACACAACCGAAAATGTCCAGGTGCGTGAAAGTG 72
Mdsfbb9-beta ..GACCAATACAGTTGAAATGTCTCAGGTGCGTGAAAGTG 67
Ppsfbb4-alpha ..GAATGATATTGCCGAAAATGTCCAGGTGCATGAAAGTG 123
Ppsfbb5-alpha ..GAATGATACTGCCGAAAATGTCCAGGTGCATGAAAGTG 53
Ppsfbb4-gamma TGGAACAAAATTGCCGAAAATGTCCAGGTGCGTGAAAGTG 78
Ppsfbb5-gamma TGGAACAAAATTGCCGAAAATGTCCAGGTGCGTGAAAGTG 83
Ppsfbb4-beta .AAGATAGGGTGACTGAAATGACCCAGGTACGTGAAAGTG 168
Ppsfbb5-beta .AAGATAGAGTGACTGAAATGACCCAGGTATGTGAAAGTG 108
          * * * * * * * * * *

```

```

Mdsfbb3-alpha AAACCTCCTGAAGATAGGGTAGTTGAAATCTTATCCAGGTT 262
Mdsfbb3-beta AAACCTCCTGAAGATAAGGTGCGTAAATCCTGTGTAGGTT 78
Mdsfbb9-alpha AAACCTCCTGAAGATCAGGTGGTTCGAAATCCTGTCTAGGTT 112
Mdsfbb9-beta AAACCTTGAAGATAAGGTGGTTCGAAATCCTGTCCAAGTT 107
Ppsfbb4-alpha AAACCTCCTGAAGATAAGGTGGTTCGAAATCTTGTCCAGGTT 163
Ppsfbb5-alpha AAACCTCCTCAAGATAAGGTGGTTCGAAATCTTGTCCAGGTT 93
Ppsfbb4-gamma AAACCTCCTGAAGATAGGATGGTTCGAAATCTTGTCCAGGTT 118
Ppsfbb5-gamma AAACCTCCTGAAGATAGGATGGTTCGAAATCTTGTCCAGGTT 123
Ppsfbb4-beta AAACCTCCTGAGGATAGGGTGGCCGAAATCCTGTCCAGGTT 208
Ppsfbb5-beta AAACCTTGAAGATAGGATGGCCGAAATCCTGTCCAGGTT 148
***** * * * * * * * * * *

```

```

Mdsfbb3-alpha ACCGCCCAAGTCTCTGATGCGGTTCAAATGCATACACAAG 302
Mdsfbb3-beta GCCACCCAAGTCTCTGATGCGATTCAAATGCATACGGAAG 118
Mdsfbb9-alpha GCCGCCCAAGTCTCTGATGAGATTCAAATGCATACGCAAG 152
Mdsfbb9-beta GCCGCCCAAGTCTCTGATGAGATTCAAATGCATACGCAAG 147
Ppsfbb4-alpha ACCGCCCAAGTCCCTGATAAGATTCAAATGCGTACGCAAA 203
Ppsfbb5-alpha GACGCCCAAGTCCCTGATGAGATTCAAATGCGTACACAAA 133
Ppsfbb4-gamma GCCACCCAAGTCTCTGATGCGATTCAAATGCATACGCAAA 158
Ppsfbb5-gamma GCCACCCAAGTCTCTGATGCGATTCAAATGCATACGCAAA 163
Ppsfbb4-beta ACCTCCGAAGTCTCTGATGCGGTTCAAATGTATACGCAAG 248
Ppsfbb5-beta GCCGCCAAAGTCTCTGATGCGGTTCAAATGTATACGCAAG 188
          * * * * * * * * * *

```

---

MdSFBB3-alpha	TCTTGGTTCTCTCTCATCAACAATCTAAGTTTTGTGGCCA	342
MdSFBB3-beta	TCTTGGTGCACCTCTCATCAATAGACCAAGTTTTGTGGCCA	158
MdSFBB9-alpha	TCATGGTGCACCTATCATCAATAGTTCAAGTTTTGTGGCCA	192
MdSFBB9-beta	TCTTGGTGCACCTATCATCAATAGTCCAAGTTTTGTGGCCA	187
PpSFBB4-alpha	TCATGGTGCACCTATCATCAATAGTCCAAGTTTTGTGGCCA	243
PpSFBB5-alpha	TCATGGTGCACCTATCATCAATAGTCCAAGTTTTGTGGCCA	173
PpSFBB4-gamma	TCTTGGTGCACCTCTTATCAATAGTCCATGTTTTGTGGCCA	198
PpSFBB5-gamma	TCTTGGTGCACCTCTTATCAATAGTCCATGTTTTGTGGCCA	203
PpSFBB4-beta	TCTTGGGGCAGCATCATCAACAATCCAAGTTTTATGGCCA	288
PpSFBB5-beta	TCTTGGTGCACGGTCATCAACAATCCAAGTTTTATGGCCA	228
	** *** * * * ***** * * ***** *****	

MdSFBB3-alpha	AACACCTCAGCAATTCCGGTGGACAACAACACTCTCATCCTC	382
MdSFBB3-beta	AACACCTTAACAATTCTGTGGACAACAACACTCTCATCCTC	198
MdSFBB9-alpha	AACACCTCAGCAATTCCATAGACAACAACACTTTTCATCCTC	232
MdSFBB9-beta	AACACCTCAACAATTCCATGGACTACAAACTCTCGTCCAC	227
PpSFBB4-alpha	AACACCTCAGCAATACCGTGGACAACAATTTCTCATCCTT	283
PpSFBB5-alpha	AACACCTCAGCAATACGGTGGACGACAATTTCTCATCCTT	213
PpSFBB4-gamma	AACACCTCAGCGATTCTGTGGACAACAACACTCTCATCCTC	238
PpSFBB5-gamma	AACATCTCAGCGATTCTGTGGACAACAACACTCTCATCCTC	243
PpSFBB4-beta	AACACCTCAGCAATTCCGTTGACAACAATTTCTCATCCTC	328
PpSFBB5-beta	AACACCTCAGCAATTCCGTTGACAAAAAATTTCTCATCCTC	268
	**** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

MdSFBB3-alpha	CACTTGTATCCTTCTCAACCGTTCTCAGGCTCACATTTTC	422
MdSFBB3-beta	CACTTGTATCCTTCTCAACCGTTCTCAGGCTCACATTTTC	238
MdSFBB9-alpha	CACTGGTATCCTTCTTAACCGTTGTCAGGTTTCATGTTTTTC	272
MdSFBB9-beta	CACTTGTATCCTTCTCAACCGTTGTCAGGTTTCATGTTTTTC	267
PpSFBB4-alpha	CACTTGCATCCTTTTCAACCGATCTCAGGTTTCATGTTTTTC	323
PpSFBB5-alpha	CACTTGCATCCTTTTCAACCGATCTCAGGTTTCATGTTTTTC	253
PpSFBB4-gamma	CACATGTATCCTTCTCAACTGTTCTCAGGCTCACGTTTTGC	278
PpSFBB5-gamma	CACTTGTATCCTTCTCAACTGTTCTCAGGCTCAAGTTTTGC	283
PpSFBB4-beta	CACTTCTATCCTTCTCCACCGTTTCTCAGATGCCCGTTTTTC	368
PpSFBB5-beta	CACTTGTATCCTTCTCCACCGTTTCTCATATGCCCGTTTTTC	308
	*** ***** * * * * * * * * * * * * * * * *	

MdSFBB3-alpha	CCGACCAGAGTTGGAAAACAAGAAGTTTTCTGGTCCATGA	462
MdSFBB3-beta	CCGGACCAGAGTTGGAAAACAAGAAGTTTTCTGGTCCACGA	278
MdSFBB9-alpha	TCGGATAGGAGTTGGAAAACAAGACGTTTTCTGGTCCATGA	312
MdSFBB9-beta	CCGGACAGGAGTTGGAAAACAAGACGTTTTCTGGTCCATGA	307
PpSFBB4-alpha	GCGGACAGGAGTTGGAAAAGAGATGTTTTCTGGTCTATGA	363
PpSFBB5-alpha	GCGGACAGGAGTTGGAAAAGAGATGTTTTCTGGTCTATGG	293
PpSFBB4-gamma	TCGGAAAAGAGTTGGAAAACAAGAAGTTTCATGGTCCGTGA	318
PpSFBB5-gamma	TCGGAAAAGAGTTGGAAAACAAGAAGTTTCATGGTCCGTGA	323
PpSFBB4-beta	CCGGACAGAAGTTGGAAACGAGAATATTTCTGGTCCATGA	408
PpSFBB5-beta	CCGGACGGAAGTTGGAAACGAGAGTATTTCTGGTCCATGA	348
	* ** ***** * * * * * * * * * * * * * * * *	

ALLINEAMENTI

MdSFBB3-alpha TTAATTTTTCCATTGATAGTGATGAGAACAACCTTCATTA 502  
 MdSFBB3-beta TTAATCTTTCCATTGATAGTGATGAACACAACCTTCATTA 318  
 MdSFBB9-alpha TTAATCTTTCCATTGATAGTGATAAGAATAACCTTTATTA 352  
 MdSFBB9-beta TTAATCTTTCCATTGATAGTGATGAGCACAAACCTTCATTA 347  
 PpSFBB4-alpha TTAATCTTTCCATTGAAAAGTGATGAGCACAAACCTTGATTA 403  
 PpSFBB5-alpha TTAATCTTTCCATTGATAGTGATGAGCACAAACCTTCATTA 333  
 PpSFBB4-gamma TTAATCTTTCCATTGATGGTGATGAG . . . . .CTTCATTA 352  
 PpSFBB5-gamma TTAATCTTTCCATTGATGGTGATGAG . . . . .CTTCATTA 357  
 PpSFBB4-beta TTAATCTTTCCATGATAGTGATGAGTACAACCTTTATTA 448  
 PpSFBB5-beta TTAATCTTTCCCGTGATAGTGATGAGCACAAACCTTTATTA 388  
 \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \*

MdSFBB3-alpha CGATGTTGAGGACCTAAATAT . . .ACCGTTTGCATTGAAA 539  
 MdSFBB3-beta TGATGTTGAGGACCTAATTAT . . .ACCGTTTCCATTGGAA 355  
 MdSFBB9-alpha TGATGTTGAGGACCTAAATAT . . .ACCATTTCCAATGGAA 389  
 MdSFBB9-beta TGATGTTGAGGACATAAATAT . . .ACCGTTTCCAATGGAA 384  
 PpSFBB4-alpha TGATGTCGAGGACCTAAATAT . . .ACCCTTTCTATGGAA 440  
 PpSFBB5-alpha TGATGTCAAGGACCTAAATAT . . .ACCCTTTCTATGGAA 370  
 PpSFBB4-gamma TGATATTGAGGACCTAACTATTGTACCGTTTCTAAAGGAT 392  
 PpSFBB5-gamma TGATATTGAGGACCTAACTATTGTACCGTTTCTAAAGGAT 397  
 PpSFBB4-beta TGATGTTGAGGACCTAAATAT . . .ACAATTTCCATTGGAA 485  
 PpSFBB5-beta TGATGTTGAGGACCTAAATGT . . .ACAATTTCCATTGGAA 425  
 \*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\* \* \* \*\* \*\* \* \*

MdSFBB3-alpha GATCATGATTTTGTACTGATTTTGGTTATTGCAATGGGA 579  
 MdSFBB3-beta GATCATGATTTTGTACTGATTTTTCGGTTATTGCAATGGGA 395  
 MdSFBB9-alpha GATCAGGACAATGTAGAGCTTCACGGTTATTGCAATGGGA 429  
 MdSFBB9-beta GATCAAGACAATGTAGAGCTTCACGGTACTGCAATGGGA 424  
 PpSFBB4-alpha GTTCAAGACAATGTACAGCTTTACGGTTATTGCAATGGGA 480  
 PpSFBB5-alpha GTTCAAGACAATGTACAGCTTTACGGTACTGCAATGGGA 410  
 PpSFBB4-gamma GGCCCTCATGAAGTAGAGATTCACGGTTATTGCGATGGGA 432  
 PpSFBB5-gamma GGCCCTCATGAAGTAGAGATTCACGGTTATTGCGATGGGA 437  
 PpSFBB4-beta GATCATGATCATGTATCGATTCATGGCTATTGCAATGGGA 525  
 PpSFBB5-beta GATCATGAACATATATCGGTTTCATGGATATTGCAATGGGA 465  
 \* \* \* \*\* \* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\*

MdSFBB3-alpha TACTCTGTGTAGAAGCTGGGAAAAATGTTCTTTTATGCAA 619  
 MdSFBB3-beta TTGTCTGTGTAGATGCAGGGAAAAATGTTCTTTTATGCAA 435  
 MdSFBB9-alpha TTGTCTGTGTAATAGTAGGGAAAAATGTTCTTTTATGCAA 469  
 MdSFBB9-beta TTGTCTGTGTAATAGTAGGGAAAAATGTTCTTTTATGCAA 464  
 PpSFBB4-alpha TTGTCTGTGTAATAGTAGGGAAAAATGTTCTTCTATGCAA 520  
 PpSFBB5-alpha TTGTCTGTGTAATAGTAGGGAAAAATGTTCTTCTATGCAA 450  
 PpSFBB4-gamma TTGTTTGTGTAACAGTAGACGAAAAATTTCTTTTGTGCAA 472  
 PpSFBB5-gamma TTGTTTGTGTAACAGTAGACGAAAAATTTCTTTTGTGCAA 477  
 PpSFBB4-beta TTGTCTGTCTGATAGTAGGGAAAAATGCTGTTTTATACAA 565  
 PpSFBB5-beta TTGTCTGTCTAATAGTAGGGAAAAATGCTCTTTTATACAA 505  
 \* \* \*\*\* \* \* \* \*\*\*\*\* \*\* \* \* \*\*\*

MdSFBB3-alpha	TCCTGCAACGAGGGAATTCAAGCAACTTCCCGATTCATGC	659
MdSFBB3-beta	TCCTGCAACGAGAGAATTTAGGCAACTTCCGGATTCATGC	475
MdSFBB9-alpha	TCCTGCAACTGGAGAATTCAGGCAACTTCCCGATTCATCC	509
MdSFBB9-beta	TCCTGCAACGGGAGAATTCAGGCAACTTCCCAATTCACCT	504
PpSFBB4-alpha	TCCTGCAACAAGAGAATTCAGCAACTTCCCGATTCATCC	560
PpSFBB5-alpha	TCCTGCAACAAGAGAATTCAGCAACTTCCCGATTCATCC	490
PpSFBB4-gamma	TCCTGCAACGGGGGAATTCAGGCAACTTCCGATTCATGC	512
PpSFBB5-gamma	TCCTGCAACGGGGGAATTCAGGCAACTTCCGATTCATGC	517
PpSFBB4-beta	TCCTGCAACGAGGGAACTGAAGCAACTACCTGATTCATGC	605
PpSFBB5-beta	TCCTGCAACGAGGGAACTCAAGCAACTACCTGATTCATGC	545
	***** * *** * * ***** ** *****	
MdSFBB3-alpha	CTTCTTCTACCTTCCCCTC...CTGAGAGAAAATTCGAAT	696
MdSFBB3-beta	CTTCTTCAAC...CCCCTC...CCAAGGGAAAATTTGAAT	509
MdSFBB9-alpha	CTTCTTCTACCTTCCC...AAGGGAAGATTTCGGAT	543
MdSFBB9-beta	CTTCTTCTACCCCTTCCC...AAGGGAAGATTTCGGAT	538
PpSFBB4-alpha	CTTCTTCTACCCCTTCCG...ACGGGAAAATTCGGAT	594
PpSFBB5-alpha	CTTCTTCTACCCCTTCCC...ACGGGAAAGATTTCGGAT	524
PpSFBB4-gamma	CTTCTTCTACCCCTTCCCGGGTAAAAGAAAATTCGGAT	552
PpSFBB5-gamma	CTTCTTCTACCCCTTCCCGGGTAAAAGAAAATTCGGAT	557
PpSFBB4-beta	CTTCTTCTACCTTCCCCTC...CGGAGGGAAAATTCGAAT	642
PpSFBB5-beta	CTTCTTCTACCTTCCCCTC...CGGAAGGAAAATTCGAAT	582
	***** ** ** ** **	
MdSFBB3-alpha	TGGAAACTAACTTTCAAGCTTTGGGATTTGGATATGATTG	736
MdSFBB3-beta	TGGAACGACTTTTCAAGCATTAGGATTTGGCTATGATTG	549
MdSFBB9-alpha	TGGAACGGTCTTTAAAGGATTTGGGATTTGGCTATGATTG	583
MdSFBB9-beta	TGGAACGACTTTTAAAGGAATGGGATTTGGCTATGATTG	578
PpSFBB4-alpha	TGGAACGCTCTTTAAAGGATTTGGGATTTGGCTATGATTG	634
PpSFBB5-alpha	TGGAACGCTCTTTAAAGGATTTGGGATTTGGCTATGATTG	564
PpSFBB4-gamma	TGGAACGACACTTAAAGGACTGGGATTTGGTTATGATTG	592
PpSFBB5-gamma	TGGAACGACACTTAAAGGACTGGGATTTGGTTATGATTG	597
PpSFBB4-beta	TGGAATCGACCTTTCAAGGAATGGGATTTGGCTATGATAG	682
PpSFBB5-beta	TGGAATCGACCTTTCAAGGAATGGGATTTGGCTATGACAG	622
	***** * ** * * * ***** ***** *	
MdSFBB3-alpha	CAATGCTAAAGAATACAAGGTTGTGCGAATTATAGAAAAT	776
MdSFBB3-beta	CAATGCTAAAGAATACAAGGTTGTGCGAATTGTGGAAAAT	589
MdSFBB9-alpha	CAAAGCTAAAGAATACAAGGTCGTGCGAATTATAGAAAAT	623
MdSFBB9-beta	CAAAAGTAAAGAATACAAGGTTGTGCGAATAATAGAAAAT	618
PpSFBB4-alpha	CAAAACTAAAGAATATAAGGTTGTGCGAATTATAGAAAAT	674
PpSFBB5-alpha	CAAAACTAAAGAATATAAGGTTGTGCGAATTATAGAAAAT	604
PpSFBB4-gamma	CAAAGCTAAAGAATACAAGGTTGTGCGAATTATAGATAAT	632
PpSFBB5-gamma	CAAAGCTAAAGAATACAAGGTTGTGCGAATTATAGATAAT	637
PpSFBB4-beta	CAAAGCTAAAGAATACAAGGTTGTGAAAATTTATAGAAAAT	722
PpSFBB5-beta	CAAAGCTAAAGAATACAAGGTTGTGAAAATTTATAGAAAAT	662
	*** ***** ***** *** ** * ** *	

**ALLINEAMENTI**

---

MdSFBB3-alpha T . . . . .GTGAGTATTCAGATGATGAACGAACATATTATT 810  
MdSFBB3-beta T . . . . .GTGAGTATTCAGATGATGAGCAAACATTTTATC 623  
MdSFBB9-alpha TGTGATTGTGAGTATTCAGAAGGTGAAGAATCATATTATG 663  
MdSFBB9-beta TGTGATTGTGAGTATTCAGATGATGGAGAATCATACTATG 658  
PpSFBB4-alpha TGTGATTGTGAGTATTCAGAAGGTAAAGAATCATATTATG 714  
PpSFBB5-alpha TGTGATTGTGAGTATTCAGAAGGTAAAGAATCATATTATG 644  
PpSFBB4-gamma TATGATTGTGAGTATTCAGAAGATGGAGAAACATATATCG 672  
PpSFBB5-gamma TATGATTGTGAGTATTCAGAAGATGGAGAAACATATATCG 677  
PpSFBB4-beta T . . . . .GTGAGTATTCAGATGATATGCGAACATTTTCTC 756  
PpSFBB5-beta T . . . . .GTGAGTATTCAGATGATGAGCGAACATTTTCTC 696  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

MdSFBB3-alpha ATCGTATTGCTCTTCCTCACACGGCTGAGTTATACACCAC 850  
MdSFBB3-beta ATCGTATAGCACTTCTCCTCACACAGCTGAGGTATATACCAC 663  
MdSFBB9-alpha AGCGTATTCTTCTTCCTCACACGGCTGAGGTATACACCAT 703  
MdSFBB9-beta AGCGTATTCTTCTTCCTCACACGGCTGAGGTATACACCAT 698  
PpSFBB4-alpha AGCGTATTCTTCTTCCTCACACGGCTGAGGTATACACCAC 754  
PpSFBB5-alpha AGCGTATTCTTCTTCCTCACACGGCTGAGGTATACACCAC 684  
PpSFBB4-gamma AGCATATTGCTCTTCCTTACACTGCTGAAGTATACACCAT 712  
PpSFBB5-gamma AGCATATTGCTCTTCCTTACACTGCTGAAGTATACACCAT 717  
PpSFBB4-beta ATCGTATTGCTCTTCCTCACACGGCTGAGGTATATGTTAC 796  
PpSFBB5-beta ATCGTATTGCTCTTCCTCACACGGCTGAGGTATGTATCAC 736  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

MdSFBB3-alpha AACTGCTAATTCTTGAAAGAGATCAAGATTGATATATCA 890  
MdSFBB3-beta GGCTGCTAACTTTTGAAAGAGATCAAGATTGATATATCA 703  
MdSFBB9-alpha GACTGCTGACTCTTGAAAGAGATCAAGATTGATGTATCA 743  
MdSFBB9-beta GACTGCTAACTCTTGAAAGAGATCAAGATTGATATATCA 738  
PpSFBB4-alpha GGCTGCTAACTCTTGAAAGAGATCAAGATTGATACATCA 794  
PpSFBB5-alpha GGCTGCTAACTCTTGAAAGAGATCAAGATTGATACATCA 724  
PpSFBB4-gamma GGCTGCTAACTCTTGAAAGAGATCACGATTGATATACTA 752  
PpSFBB5-gamma GGCTGCTAACTCTTGAAAGAGATCACGATTGATATACTA 757  
PpSFBB4-beta GACTACTAACTCTTGAGAGATCGAGATTGAAATATCA 836  
PpSFBB5-beta GACTACTAACTCTTGAGAGATGATTGAGATTGAAATATCA 776  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

MdSFBB3-alpha AGTACAAC . . . . .CTATTCTTGTTCCTCGTT 915  
MdSFBB3-beta ATTAACAAC . . . . .CTATCATTGTTCTTGTGTT 728  
MdSFBB9-alpha AGTGATAC .TGATC . .CGTATTGCATTCCCTATTCTTGTGTT 780  
MdSFBB9-beta ATTGAAAC .TCGTT . .GGTATTGCATTCCGTATTCTGGTT 775  
PpSFBB4-alpha AGTGATAC .TGATC . .CGTATTGCATTCCCTATTCTTGTGTT 831  
PpSFBB5-alpha AGTGATAC .TGATC . .CGTATTGCATTCCCTATTCTTGTGTT 761  
PpSFBB4-gamma AGTAAAATATTATCATCATATAGCGAACCATATTCTTATT 792  
PpSFBB5-gamma AGTAAAATATTATCATCATATAGCGAACCATATTCTTATT 797  
PpSFBB4-beta AGTGATAC . . . . .CTATAATTGTTCTTGTGTT 861  
PpSFBB5-beta AGTGATAC . . . . .CTATAACTGTTCTTGTGTT 801  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

---

MdSFBB3-alpha CAGTGTTTCATGAAGGGATTTTGTATTGGTATGCAACAGA 955  
MdSFBB3-beta CAGTGTA CTTGAAGGGATTTTGTATTGGTTTGCAAGCGA 768  
MdSFBB9-alpha CAGTGTA CTTGAAGGGATTTTGTATTGGTTTGCAATGCGA 820  
MdSFBB9-beta CAGTGTA CTTGAATGGATTTTGTATTGGTTTGCAATATGA 815  
PpSFBB4-alpha CAGTGTA CTTGAAGGGATTTTGTATTGGTTTGCAAAACGA 871  
PpSFBB5-alpha CAGTGTA CTTGAAGGGATTTTGTATTGGTTTGCAAAACGA 801  
PpSFBB4-gamma CAGTGTA TTTGAAGGGGTTTGTATTGGTTGTCATGCGA 832  
PpSFBB5-gamma CAGTGTA TTTGAAGGGGTTTGTATTGGTTGTCATGCGA 837  
PpSFBB4-beta CAGTATA CTTGAAGGGATTTTGTATTGGTTTGCAAGCGA 901  
PpSFBB5-beta CAGTATA CTTGAAGGAATTTTGTATTGGTTTGCAAGCGA 841  
\*\*\*\* \* \*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\* \*\*

MdSFBB3-alpha TGGCGAGGAATACATACTTTCTTTTGATTTAGGTGATGAC 995  
MdSFBB3-beta TAACGAGGAATACATACTTGCATTTTATTAGGTGATGAG 808  
MdSFBB9-alpha TAACGGGGAATACATATTTTCATTTGATTTAGGTGATGAG 860  
MdSFBB9-beta TAACGGGGAGTACGTATTTTCATTTGATTTAGGTGATGAG 855  
PpSFBB4-alpha TAACGGGGAATACATATTTTCATTTGATTTAGGTGATGAG 911  
PpSFBB5-alpha TAACGGGGAATACATATTTTCATTTGATTTAGGTGATGAG 841  
PpSFBB4-gamma TGTAGAGGAATACATATTTTCATTTGATTTAGCTAATGAA 872  
PpSFBB5-gamma TGTAGAGGAATACATATTTTCATTTGATTTAGCTAATGAA 877  
PpSFBB4-beta TGACGAGAAATACGTACTTTTCATTTGATTTAGGTGATGAG 941  
PpSFBB5-beta TGACGAGGAATGCATACTTTTCATTTGATTTAGGTCATGAG 881  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

MdSFBB3-alpha ACATTTTCATATAATAACAATGCTTCTAGGAGAGAATCCG 1035  
MdSFBB3-beta ACATTTTCATATAATAACAATTGCTTCTAGGAGAGAATCCG 848  
MdSFBB9-alpha ATATTTTCATATAATAGAATTGCTTCTAGGAGAGAATTTG 900  
MdSFBB9-beta ATATTTTCATAAAAATAGACTTGCCTTCTAGGAGAGAATCCG 895  
PpSFBB4-alpha ATATTTTCGTAGAATAGAATTGCTTTTTAGGAGAGAATCCG 951  
PpSFBB5-alpha ATATTTTCGTAGAATAGAATTGCTTTTTAGGAGAGAATCCG 881  
PpSFBB4-gamma ATATCTGATATGATAGAATTGCTTTTTAGGGGAGAATTCG 912  
PpSFBB5-gamma ATATCTGATATGATAGAATTGCTTTTTAGGGGAGAATTCG 917  
PpSFBB4-beta ATATTTTCATAGAATACAATTGCTTATAGGAAAGAATCCG 981  
PpSFBB5-beta ATATTTTCATAGAATACAATTGCTTGTAGGAAAGAATCCG 921  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

MdSFBB3-alpha GTTTTAGGTTTTATTATATTTTTCTACGAAATGAATCCCT 1075  
MdSFBB3-beta GTTTTACGTTTGATTATATTTTTCTGCGAAATGAATCCCT 888  
MdSFBB9-alpha GTTTTAAATTTTATGGTATTTTTTGTATAATGAATCCAT 940  
MdSFBB9-beta ATTTTAAAGTTTTATGGTATTTTTCTGTATAATGAATCTGT 935  
PpSFBB4-alpha ATTTTAAATTTTATGGTCTTTTTCTGTATAATGAATCCGT 991  
PpSFBB5-alpha ATTTTAAATTTTATGGTCTTTTTCTGTATAATGAATCCGT 921  
PpSFBB4-gamma GTTTTAAGCGTGATGGTATTTTTCTGTATAATGAATCCCT 952  
PpSFBB5-gamma GTTTTAAACGTGATGGTATTTTTCTGTACAATGAATCCCT 957  
PpSFBB4-beta GTTTTTGTTTTTATGATCTTTTTCTGTATAATGAATCCAT 1021  
PpSFBB5-beta GCTTTTTATTTTGTGATATTTTTCTTTATAATGAATCCAT 961  
\*\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

ALLINEAMENTI

MdSFBB3-alpha TGCTTCTTTTTGCTCTCGTTATGATAGGAGTGAGGATTCT 1115  
 MdSFBB3-beta TGCTTCTTTTTGCTCTCCCTATAATCCAAGTGAGGATTCT 928  
 MdSFBB9-alpha CACTTCTTATTGCTCTCGTTATGAA.....GAGGATTGT 974  
 MdSFBB9-beta CACTTCATATTGCTATCGTCACGAA.....GAGGATTGT 969  
 PpSFBB4-alpha CGCTTCTTATTGCTCTCGTTACGAA.....GAGGATTGT 1025  
 PpSFBB5-alpha CGCTTCTTATTGCTCTCGTTACGAA.....GAGGATTGT 955  
 PpSFBB4-gamma CACTTATTATTGCAGTAGTTACGAA.....GAGCCTTCC 986  
 PpSFBB5-gamma CACTTATTATTGCAGTAGTTATGAA.....GAGCCTTCC 991  
 PpSFBB4-beta CGCTTCTTTTTGCTCTCATTATGATAA..TGACAATGCT 1058  
 PpSFBB5-beta CGCTTCTTTTTGCTCTCATTATGATGAAAGTGACAATTCT 1001  
 \*\*\* \* \*\*\*\* \* \* \* \*\* \*

MdSFBB3-alpha .....GAATCATGTGAAATATGGGTAATGGATGACT 1146  
 MdSFBB3-beta .....AAATTATTTGAAATATGGGTAATGGACGACT 959  
 MdSFBB9-alpha .....AAATTATTTGAAATATGGGTAATGGACGACT 1005  
 MdSFBB9-beta .....GAATTATTTGAAATATGGGTAATGGACGACT 1000  
 PpSFBB4-alpha .....AAATTGCTTGAAATATGGGTAATGGACGACC 1056  
 PpSFBB5-alpha .....AAATTGCTTGAAATATGGGTAATGGACGACT 986  
 PpSFBB4-gamma .....ACATTATTTGAAATATGGGTAATGGACTACG 1017  
 PpSFBB5-gamma .....ACATTATTTGAGATATGGGTAATGGACTACG 1022  
 PpSFBB4-beta GGAATATTGAAAATACTTGAAATATGGGTAATGGACGACT 1098  
 PpSFBB5-beta GGAATATTGAAAATACTTGAAATATGGGTAATGGACGACT 1041  
 \* \*\*\* \*\*\*\*\* \*\*

MdSFBB3-alpha ATGACGGTGATAAAAAGTTCATGGACAAAACCTTTTAAACAT 1186  
 MdSFBB3-beta ATGATGGAGTTAGCAGTTCATGGACAAAACCTCCTAACTGT 999  
 MdSFBB9-alpha ATGACGGAGTTAAGAGTTCATGGACAAAATTGCTAGCCGT 1045  
 MdSFBB9-beta ATGATGGAGTTAAGAGTTCATGGACAAAACCTACTAACGAT 1040  
 PpSFBB4-alpha ATGATGGAGTGAAGAGTTCATGGACAAAACCTCCTAAACCGT 1096  
 PpSFBB5-alpha ATGATGGAGTGAAGCGTTCATGGACAAAACCTCCTAAACCGT 1026  
 PpSFBB4-gamma ATGACGGATTTAAGAGTTCATGGACAAAACACCTAACTGC 1057  
 PpSFBB5-gamma ATGACGGATTTAAGAGTTCATGGACAAAACACCTAACTGC 1062  
 PpSFBB4-beta GTGACGGAGTCAAGAGTTCATGGACAAAACCTACTAACCCCT 1138  
 PpSFBB5-beta GTGATGGAGTTAAGAGTTCGTGGACAAAACCTGCTAACCCCT 1081  
 \*\*\* \*\* \* \*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*

MdSFBB3-alpha TGGACCCTTACAAGGCATTAAGAAGCCCCTGACATTTTGG 1226  
 MdSFBB3-beta TGGACCCTTTAAAGGCGTTGAGTATCCTTTGACACTTTGG 1039  
 MdSFBB9-alpha TGGACCCTTTAAAGACATTGATTATCCATTGACACTAGGG 1085  
 MdSFBB9-beta TGGACCCCTTAAAGACATCGATTATCCATTGACACTTTGG 1080  
 PpSFBB4-alpha TGGACCCTTTAAAGACATTGAGTCTCCTTCGACATTTTGG 1136  
 PpSFBB5-alpha TGGACCCTTTAAAGACATTGAGTCTCCTTCGACATTTTGG 1066  
 PpSFBB4-gamma TGGACCCTTTTATAGATATGGAGTTTCCATTGACACCTTGG 1097  
 PpSFBB5-gamma TGGACCCTTTCACAGATATGGAGTTTCCATTGACACCTTGG 1102  
 PpSFBB4-beta TGGACCCTTTGAAGACAATGAGAATTTATTAACATTTTGG 1178  
 PpSFBB5-beta TGGACCCTTTAAAGGCAATGAGAATTTATTAACATTTTGG 1121  
 \*\*\*\*\* \* \*\* \* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\* \*\*



MdSFBB3-alpha AGAAGTGATGAGCTTCTTATGCTTGATTCCGATGGAAGAG 1266  
MdSFBB3-beta AAATGTGATGAGCTTCTTATGCTTGCAATCCGATGGAAGGG 1079  
MdSFBB9-alpha AAATTTGACGAGGTTCTTATGCTTGCTCGTATGGAAGAG 1125  
MdSFBB9-beta AAATGTGACGAGGTTCTTATGCTTGCTCATATGGAAGAG 1120  
PpSFBB4-alpha AAATGTGACGAGGTTCTTATCCTTTCTCATATGGAAGAG 1176  
PpSFBB5-alpha AAATGTGACGAGGTTCTTATCCTTTCTCATATGGAAGAG 1106  
PpSFBB4-gamma AAACGTGATGAGCTTCTTATGATTGCTTCCGATGGAAGAG 1137  
PpSFBB5-gamma AAACGTGACGAGCTTCTTATGATTGCTTCCGATGGAAGAG 1142  
PpSFBB4-beta AAAAGTGATGAGCTTCTTATGGTTACCTCCGATAAAAGAG 1218  
PpSFBB5-beta AAAAGTGACGAGCTTCTTATTGTTACCTCCGATCAAAGAG 1161  
\* \* \*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\* \*

MdSFBB3-alpha CCACCTCTTATAATTATAGTACTAGAAATCTCAAGTATCT 1306  
MdSFBB3-beta CTACCTCTTATAATTCTAGTACCGGAAATCTTAAGTATCT 1119  
MdSFBB9-alpha CCGCCTTTTGTAATTCTAGTACCGGAAATCTCAAGTATCT 1165  
MdSFBB9-beta CAGCCTCTTGTAATTCTAGTACCGGAAATCTTAGGTATCT 1160  
PpSFBB4-alpha CCACCTCTTATAATTCTGGTACCGGAAATCTCAAGTATCT 1216  
PpSFBB5-alpha CCACCTCTTATAATTCTAGTACCGGAAATCTCAAGTATCT 1146  
PpSFBB4-gamma CTGCCTCTTATAATTCTTGTACCGGAAATTTCAAATATCT 1177  
PpSFBB5-gamma CTGCCTCTTATAATTCTTGTACCGGAAATTTCAAGTATCT 1182  
PpSFBB4-beta CCATCTCTTTTAATTCTAGTACCGGAAATCTCAAGTATAT 1258  
PpSFBB5-beta CCATCTCTTATAATTCTAGTACCGGAAATCGCAAGTATAT 1201  
\* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \*

MdSFBB3-alpha TCATATTCCTCCTATTCTCAATAGGGTTGTGGATTTTGAA 1346  
MdSFBB3-beta TCATATTCCTCCTATTCTCAATAAGGTTGTGGATTTTGAA 1159  
MdSFBB9-alpha TCATATTCCTCCTATTATCAATT.....GGATGATAGA 1198  
MdSFBB9-beta TCATATTCCTCCTATTATCAAGT.....GGATGATGGA 1193  
PpSFBB4-alpha TCATATTCCTCCTATTATCAATT.....GGATGATAGA 1249  
PpSFBB5-alpha TCATATTCCTCCTATTATCAATT.....GGATGATAGA 1179  
PpSFBB4-gamma TCATATTCCTGTTATTATTAATCAGAATA.GGGTTGTGCGA 1216  
PpSFBB5-gamma TCATATTCCTGTTATTATTAATCAGAATA.GGATTGTAGA 1221  
PpSFBB4-beta TCATATTCCTCCTATTATGAATAAGGTTACAGATTTGAA 1298  
PpSFBB5-beta TCATATTCCTCCTATTATCAATAAGATTACAGATTTGAA 1241  
\*\*\*\*\* \* \*\* \* \*\* \* \* \*

MdSFBB3-alpha GTTCTTATTTATGTGAAAAGTATTGTTCAATGCAAGTGAA 1386  
MdSFBB3-beta GGTCTTATTTATGTGAAAAGTATTGTTCCACTCAAGTGAG 1199  
MdSFBB9-alpha .....TTATGTGAAAAGTATTGTTCCAGTCAAGTGAA 1230  
MdSFBB9-beta .....TTATGTGAAAAGTATTGTTCCAGTCCAGTGAA 1225  
PpSFBB4-alpha .....TTATGTGAAAAGTATTGTTCCAGTCAAGTGAA 1281  
PpSFBB5-alpha .....TTATGTGAAAAGTATTGTTCCAGTCAAGTGAA 1211  
PpSFBB4-gamma .....TTACGTGAAAAGTATTATTCTAGTCAATTGAG 1248  
PpSFBB5-gamma .....TTACGTGAAAAGTATTATTCTAGTCAATTGAG 1253  
PpSFBB4-beta GCTCTTATTTATGTGAAAAGTTTTGTTTCAAGTCAAGTGAG 1338  
PpSFBB5-beta GCTCTTATTTATGTGAAAAGTATTGTTTCAATCAAGTGAG 1281  
\*\*\* \*\* \* \*\* \* \*\* \*\* \* \* \*\* \*

ALLINEAMENTI

```

MdSFBB3-alpha  TTGAGGA.AAAAAGTTCCATTTTCTCCTAATTAATTTGTTT 1425
MdSFBB3-beta   TTGAGGG.AGAAGTTCCATTTTCTCCTATTTAATTT... 1234
MdSFBB9-alpha  TTGAGGG.AAAAAGTTACCTTTTCTCTATTTAATTTGTAT 1269
MdSFBB9-beta   TTGAGGG.AAAAAGTTCCATTTTCTCCTATTTAATTTGTAT 1264
PpSFBB4-alpha  TTAAGGA.CAAAAGTTCC.....ATTTAATTTGTAT 1310
PpSFBB5-alpha  TTGAGGA.CAAAAGTTCC.....ATTTAATTTGTAT 1240
PpSFBB4-gamma  TTGAGGG.AAACGTTCC.....A..... 1265
PpSFBB5-gamma  TTGAGGG.AAACGTTCC.....ATTTTCTCCCGAA 1282
PpSFBB4-beta   TTGAGGG.CAAACTTCCATTTTCTCCTATTTAATTTGTAT 1377
PpSFBB5-beta   TTGAGGGGCAAAGTTC..... 1297
**  ***      *   **

```

```

MdSFBB3-alpha  GCGTGACATGAGGCTTGAATTTGCATCTTTTAATTTAATC 1465
MdSFBB3-beta   ..... 1234
MdSFBB9-alpha  GCATGATATAAAGCTTGAGTTTGCATCTTCTAATTTTGCT 1309
MdSFBB9-beta   GCATGATACAAGGCTTGAGTTTGCATCTTCTAATTTTGCT 1304
PpSFBB4-alpha  GCATGATATAAAGGTTGAGTTTTCTTCTTCTAAGTTTGT 1350
PpSFBB5-alpha  GCATGATATAAAGGTTGAGTTTTCTTCTTCTAAGTTTGT 1280
PpSFBB4-gamma  ..... 1265
PpSFBB5-gamma  AAAAAAAAAAAAA..... 1293
PpSFBB4-beta   GCATGATATAATGCTTGAGTTTGCATTTTTTTAATTTTG 1417
PpSFBB5-beta   ..... 1297

```

```

MdSFBB3-alpha  TGCTTTGTGG..... 1475
MdSFBB3-beta   ..... 1234
MdSFBB9-alpha  TTGTGGCCTTTGTACTATGTTTGCTT 1335
MdSFBB9-beta   TTGTGGCCTTTGTATTTATTGTATAA 1330
PpSFBB4-alpha  TTGCGGCCTTTGTACATGTTTGCTTA 1376
PpSFBB5-alpha  TTGTGGCCTTTGTACATGTTTGCTTA 1306
PpSFBB4-gamma  ..... 1265
PpSFBB5-gamma  ..... 1293
PpSFBB4-beta   TTTGCGGCCTTTGGAAAAAAAAAAAA 1443
PpSFBB5-beta   ..... 1297

```

- Ppα-for/rev
- Ppβ-for/rev/FL-rev
- Ppγ-for/rev
- Md9α-for
- Md9β-for
- Md9-rev
- Md3α-for/rev
- Md3β-for/rev
- Md3-for/rev

**Figura B.2:** allineamento fra la EST MD4C477240 e il cDNA di *AtPng1p*; sono segnalate le regioni sulle quali sono stati realizzati i primer per l'amplificazione del gene omologo di pero.

```

AtPng1p      AATTGAATTATGTCATTGCGATTTCTAAGGACGGGGTTTGTGATG 1045
MD4C477240  .....TTTGTGATG 9
                                     *****

                                     TGex12_for
                                     ───────────────────────────────────▶
AtPng1p      TTACCAAGCGATATACAAAAGAAATGGCATGAGGTTTTATCTAGAA 1090
MD4C477240  TAACCAAACGCTATACGAGGAAGTGGCTTGAGGTTCTTTCTCGAC 54
* ***** * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * *

AtPng1p      GAACTCTCACAACCTGAATCATCTTTGCAAGATGGTCTTCGAACCC 1135
MD4C477240  GTAACATCATTACAGAGCCTGCATTGTCAGCTGTGCTTGCTAATA 99
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AtPng1p      TGACAAGGGAACGACGACGTAGCTTAATGTTGAATCTCTATCTA 1180
MD4C477240  TAACAAAAGACTGTCGAAGAGGGTTTACTTCTCAAGTACTTTCTG 144
* ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                                     TGex13_rev
                                     ◀──────────────────────────────────
AtPng1p      AGCTTGAATTACGAGACAGAAAATGAGCAGGAAGAACTAGAGAGAA 1225
MD4C477240  TACTTGAAGAGCGTGATGAGAAGGAAAGGCAAGAACTCGAAAGAG 189
* ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AtPng1p      ATCTGCATTCCGCAGATAATGCCTCAGTTTCTTTACCCGGAAGGC 1270
MD4C477240  GTTTGCATTCTACAGACAATGACTCAAGCTCATTACCTGGGAGAC 234
* ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AtPng1p      AAAGTGGGGACAGGGAATGGCGTATTATGAGATCAGAATTTGGTT 1315
MD4C477240  GAAGTGGGGACAAGGAATGGCGCAAGTCAAGATTAGAATGTGTT 279
* ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

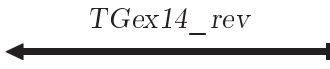
AtPng1p      CAGACGAAAACCTCATCTGTCAGCTCTTCCCTTGCCAGTTTCGCA 1360
MD4C477240  CTGATGAGAGTTGCTCCTTGAGTGGTTCTTGTTGTCCAGTTTCGTT 324
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AtPng1p      AATGCGTTGATGACCATGTGACCAACATTTATGACTCGTTTCTAC 1405
MD4C477240  CATGCTTTGACGAGCACGTGACCAAAAATTCATAATGCATTTCTCC 369
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AtPng1p      CTATCCTTACTCAGTTCGTTGAGGACGGCTTACCTGTAGCAAGAA 1450
MD4C477240  CAATTCTTTCAAAGCTTGTGAGGAAGAATTCCAAAGTCAAGGG 414
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

ALLINEAMENTI

AtPng1p MD4C477240	CAAATGAGGTA CTTAAGATGATCAAGCAAGTCCTAGTGGATCTGA CCGTTGAAGTACTTGAGATTCTAAAAGGCATTCTCATGGATCTTA * *** ***** **** * ** * ** ***** *	1495 459
AtPng1p MD4C477240	AGAATGCGCCTTACAAAAAAGGAAGGCTCGATTGACTTTAGATT AGAAATCACCTTTTAAAACAAGGAGGGCCACAATCGATTCAGTTT ***** * **** ***** **** * * ** ** *	1540 504
AtPng1p MD4C477240	CAGATAACTCAAGTTCATTCCCGGAGCAGTTTCTTCCCGCACTAG CTAATATCAACCAATCACTTGTTTCATCAGTTGTTGCCCTCTTTCA * *** * *** * * ***** * *** * *	1585 549
AtPng1p MD4C477240	GCGATTTGCTTCTCGCTCTTCTTTAAAGAGCGAGAGAGACACAA CTGAGTTACTTAAATGCTCTTTC AATGAGTGTTATGGTAGATGGTG ** * * ** ***** * * * **	1630 594
AtPng1p MD4C477240	ACGGTAAAAGTGTCACAATATCCGTAGACGGGAAACTCACTAAAA ATGGGAAAAGTTGACA...TTTCTCTGGCTGGAAGTGCTGTAAAA * ** *** ** ** * ** * * ** * *****	1675 636
AtPng1p MD4C477240	CTGCTATAGCATTGCCAGTTGCATTGGACGCGTTAAGGGA A CTTG CTTCTTTGGCACTACCTGTTGCATTGGATGCTTTGGACGACACAA ** * * * ** * ** ***** ** ** **	1720 681
AtPng1p MD4C477240	TTGCTGACCTCAGCAAAATACAAA A CTTAAACAAAGATTCACTGT TAAATAATCTTAACAATTGTGATAACTTTGTTGAAAAGTCTCTTT * * * * * ** * * ***** ** * * * * *	1765 726
AtPng1p MD4C477240	CTTTTCCACTTGTTAAACAGAACAGGGTATGCTCTGGTTCTGTCC GCTTGCCTCTTCTGAAGCTAAACAGAAATACATTCTGGTT CAGTCC ** ** *** * ** * ***** ** ***** **	1810 771
AtPng1p MD4C477240	TCGCAAGTGGTGAAGAGCTTCCTTCTGGCATTGCAACCGCAGCTT TTGCAAGTGGCGAAGAAATTCCTTTTGG A ATTGCCACTTCAGCGT * ***** ***** ***** ** ***** ** * * *	1855 816
		
AtPng1p MD4C477240	TTGATGGAATCCAAGAGTCCAAATGGGAAGAACCA A ATGGTGCAA TTGATGGGATACGCAAGTCTAAGTGGGAAGAACCA A ATGGTG CAC ***** * * * **** * ***** *****	1900 861
AtPng1p MD4C477240	AAGGCTGTTGGATCGTGTACAAA A CACTCTACAACCAGATGCACC GAGGTGTTGGATCATGTATAAAGTATCAGAGAACCAGATGCACG *** ***** **** * * * ***** **	1945 906

---

AtPng1p AACTCATAGCATACGAACTCATGTCTGCTAATGATGCCCCAGAGA 1990  
MD4C477240 AACTTGTGGCGTATGAGTTAATGTCAGCCAACGATGTACCAGAAA 951  
\*\*\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

AtPng1p GAGACCCCAAAGATTGGATTCTTGAAGGAAGTAACGATGGTGGTT 2035  
MD4C477240 GGGATCCCATGGATTGGGTTGTTGAACGAAGCAATGATGAGGGAT 996  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

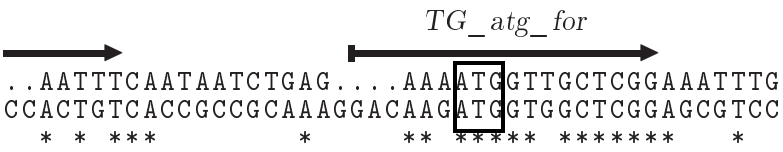
AtPng1p CGACATGGTGTGTCCTAGACAAGCAAACCTAGTCAGGTATTCGAGG 2080  
MD4C477240 CAAGCTGGCATCTGCTGGATAAAACAACTTCTCAAGTATTTGATA 1041  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

AtPng1p AACGGTTCCAACGCAAATCCTACAAAATAACTACACCTGGATTCC 2125  
MD4C477240 GTCATTTTCAGCGTAAAACATTTCAAATTGCTTCTCAAAGTTTCC 1086  
\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

AtPng1p AAGCAAATCTTTTCAGGTTCCGGTTTTTTAAGGTACGAGACGTGA 2170  
MD4C477240 TCGCAAAC..... 1094  
\*\*\*\*\*

## ALLINEAMENTI

**Figura B.3:** allineamento fra la EST MD4C271570 e il cDNA di *AtPng1p*; sono segnalate le regioni sulle quali sono stati realizzati i primer per l'amplificazione del gene omologo di pero.

		<i>TG_5'_for</i>	
AtPng1p	. . . . . AAAAGACTTGGGATCAAACAAACTTGAGAGATCATTTTGG	40	
MD4C271570	TCGATTTTGGCTTTTCGCTTTTCCAT.TTGCACCGATCATTTCGG	44	
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		
			
AtPng1p	. . AATTTCAATAATCTGAG . . . AAAATGGTTGCTCGGAAATTTG	79	
MD4C271570	CCACTGTCACCGCCGCAAAGGACAAGATGGTGGCTCGGAGCGTCC	89	
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		
	<i>Start</i>		
AtPng1p	TCGTCCGCCATGAAGATTCGAGCTTCGATGTCGACTACAACACTG	124	
MD4C271570	AGGTTACCCACAAGGACTCCACTTTCTCCGTTGACTACGACACCG	134	
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		
		<i>TGex2_for</i>	
AtPng1p	AAGATGGTCTTGAGGTTTTACGATTTCTAATCTTCTCCCTCACTT	169	
MD4C271570	ACGACGGTCTTGAAGTCTTCAAATTTCAACTGTTCTCCCTCACCT	179	
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		
AtPng1p	TAGTTCCTCCTGAAGAACA AAAAGATCGTTGCGGAAGATGATAATC	214	
MD4C271570	CCGTTCCCCCGACGAACA AAAAGTTAATTGGATTCGATGGAGATT	224	
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		
AtPng1p	GATTGGTGTCTGATGAGTCTGATCTCGTTCTTTATCTGAGAGAC	259	
MD4C271570	CCGTTGTTTCGGACGATTCGGACCTCGTTTCGATTATTGAGAAGC	269	
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		
AtPng1p	TTCGATTAGTTTCAGTTGGAGAAGATT . . . . . CTGTAGAGAA . . .	296	
MD4C271570	TCCGATTGTTTCGATCAGCGAAGAACAACAACCGCAAGAAGAAT	314	
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		
AtPng1p	. . . . . CTCAGA . TGCGGAAATGTTGAAATCAGATGAAGAATTGG	334	
MD4C271570	CAACGGTTCAGAACGACGAATTGCTAAAATCGGACGAGGAATTGG	359	
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		
AtPng1p	CTCGAATGTTGCAGGCAGAAGAAGATGCTATTATGTTTCAACAGT	379	
MD4C271570	CTAGAATGTTGCAGGCAGAGGAGGAAGCACTTTTGTTCAGCAGT	404	
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		

---

AtPng1p      TTGTCGCTGCACGAGATAACGGCGAATTTCGAAGGGAGAATTAGGC      424  
MD4C271570    ACGCTGCCCATGAAGATGATGGAAAATTCGAGCAACAACACTACGGC      449  
                 \*   \*                   \*   \*   \*   \*   \*   \*                   \*   \*   \*   \*

AtPng1p      CTTATGTTAGTCAAGTTCTCATGTATGAAGATCCAGTCCGCCAAG      469  
MD4C271570    CTTATGTCAGTCAAGTTCTTATGTATGAGGACACGGTGCGCCAGG      494  
                 \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*

AtPng1p      ATGCTGCTCGAAAGACTGTTCTTAAAGACGAGCTTGAGGAGAAAAG      514  
MD4C271570    AGGCTGCTCGAAAACAGTCCCTATAGAAGAGCTTGAGGAGAAAAG      539  
                 \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*

AtPng1p      CATTGGTTTCTCTGGCCAAGGAAGGGAATTTTGAGCCATCGAAAAG      559  
MD4C271570    CATTGGTCAGTTTGGCCAAGGAGGGGAACCTAACTCCGTCAAAAA      584  
                 \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*

AtPng1p      AGGAAAGAGACTACGCTTTCCTGCTTCAGCTTCTTTTCTGGTTCA      604  
MD4C271570    ATGAGCAAGATCATGCTTTCCTGCTGCAGCTACTTTTTTGGTTCA      629  
                 \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*

*TGex7\_for*

AtPng1p      AAAAAATCCTTCAGATGGGTCAATGAACCTCCTTGTGACTTTTGTG      649  
MD4C271570    AACAGTCTTTCAGTTGGGTAACTCGCCTGCCTGTGATAGTTGTG      674  
                 \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*

*TGex7\_rev*

AtPng1p      GTAACAAAACCATAGGCCAGGGATGGGAAACCCACTTACCTCGG      694  
MD4C271570    GCAATAACACCGTAAATATTGGCATGGCTACTGCAATTCCTTCAG      719  
                 \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*

AtPng1p      AGCTTGCTTATGGAGCAAATCGAGTTGAAATATATCGCTGTACCA      739  
MD4C271570    AAATGCGATATGGAGCTTCTCGAGTTGAGACCTATAGATGCAATA      764  
                 \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*

*TGex8\_for*

AtPng1p      TGTGTCCAACAACACTACTCGATTCCCTCGGTACAACGATCCGCTAA      784  
MD4C271570    TTTGTTCTACGGTGACTCGTTCCACGCTACAATGATCCACTAA      809  
                 \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*

*TGex9\_rev*

AtPng1p      AGCTCGTAGAAACAAAGAAAGGTCGTTGCGGAGAGTGGGCCAACT      829  
MD4C271570    AGCTTGTGGAACAAGAAGAGGGCGTTGTGGGAATGGGCCAACT      854  
                 \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*   \*

**ALLINEAMENTI**

---

AtPng1p	GCTTTACGCTATACTGCCGCACGTTTGGCTATGATTCTCGTTTGA	874
MD4C271570	GCTTTACGCTTTATTGCCGAGCTTTTGGATATGAATCCCGTCTTA	899
	***** ** ***** * ***** ***** ** ** * *	

AtPng1p	TAATGGACTTCACAGATCACGTGTGGACAGAATGCTACTCTCACT	919
MD4C271570	TCTTGGATTTACAGATCATGTTTGGACAGAGTGCTTCTCACAAT	944
	* **** ***** ** ***** ***** ** ** * *	

AtPng1p	CGTTAAAGAGGTGGATCCATCTTGACCCTTGTGAAGGAGTGTATG	964
MD4C271570	CTTTGGGAAGATGGATGCATCTTGATCCTTGTGAAGCAG.....	983
	* ** ** ***** ***** ***** ***** **	

AtPng1p	ATAAACCCATGTTATATGAGAAAGGATGGAATAAAAAATTGAATT	1009
MD4C271570	.....	983



**Figura B.4:** allineamento fra la sequenza genomica di *AtPng1p*, la EST MD4C477240 di melo e i primi due frammenti del gene omologo di pero, clonati dalle varietà ‘Abate Fétel’ (sequenza “AF\_ex12-14”) e ‘William’ (sequenza “Wil\_ex12-14”). Sono marcate le porzioni codificanti, corrispondenti agli esoni 12, 13 e 14 del gene.

<i>Esone 12</i>			
AtPng1p	TAAGGACGGGGTTTGTGATGTTACCAAGCGATATACAAAG	2480	
MD4C477240	.....TTTGTGATGTAACCAAACGCTATACGAGG	29	
AF_ex12-14	.....CGCTATACGAGG	12	
Wil_ex12-14	.....CGCTATACGAGG	12	
	** ***** * *		
-----			
AtPng1p	AAATGGCATGAGGTAATGCTACACGAAAACAGTGAAGTGT	2520	
MD4C477240	AAGTGGCTTGAGGT.....	43	
AF_ex12-14	AAGTGGCATGAGGTAATCACACTAAGTGGTACTGGCTTTA	52	
Wil_ex12-14	AAGTGGCATGAGGTAATCACACTAAGTGGTACTGGCTTTA	52	
	** **** * * * * *		
-----			
AtPng1p	TTGTTTCTCGACACCAAAAACAGTGAAGTCTTATTAATCAC	2560	
MD4C477240	.....	43	
AF_ex12-14	ATTAATTTGCCTAGATTTTCATTAGGAGATCTACCATGCG	92	
Wil_ex12-14	ATTAATTTGCCTAGATTTTCATTAGGAGATCTACCATGCG	92	
-----			
AtPng1p	TCATGGTCTTGCTGTTGTTTTCCACTGTAGGT.....	2592	
MD4C477240	.....	43	
AF_ex12-14	AAC TTTATTTT GAGCCGTGATGAGGAAGACTTCTTTTTTGT	132	
Wil_ex12-14	AAG TTTATTTT GAGCCGTGATGAGGAAGATTCTTTTTTGT	132	
 <i>Esone 13</i>			
-----			
AtPng1p	.....TTTATCTAGAAGA ACTCTCACA ACTGAATC	2622	
MD4C477240	.....TCTTTCTCGACGTAACATCATTACAGAGCC	73	
AF_ex12-14	TTTTGCAGGTACTTTCTCGACGTAACATCATTACAGAGCC	172	
Wil_ex12-14	TTTTGCAGGTACTTTCTCGACGTAACATCATTACAGAGCC	172	
	* *** * * * * * * * * * * * * * * *		
-----			
AtPng1p	ATCTTTGCAAGATGGTCTTGAACCCTGACAAGGGAACGA	2662	
MD4C477240	TGCATTGTCAGCTGTGCTTGCTAATATAACAAAAGACTGT	113	
AF_ex12-14	TGCATTGTCAGCTGTGCTTGCTAATATAACAAAAGATTGT	212	
Wil_ex12-14	TGCATTGTCAGCTGTGCTTGCTAATATAACAAAAGATTGT	212	
	* *** * * * * * * * * * * * * * * *		

ALLINEAMENTI

---

AtPng1p	CGACGTAGCTTAATGTTTGAATCTCTATCTAAGCTTGAAT	2702
MD4C477240	CGAAGAGGGTTTACTTCTCAAGTACTTTCTGTACTTGAAG	153
AF_ex12-14	CGAAGAGGGTTTACTTCTCAAGTACTTTCTGTACTTGAAG	252
Wil_ex12-14	CGAAGAGGGTTTACTTCTCAAGTACTTTCTGTACTTGAAG	252
	*** * * ** * * * ** * * ** * ** * ** *	

AtPng1p	TACGAGACAGAAATGAGCAGGAAGAACTAGAGAGAAATCT	2742
MD4C477240	AGCGTGATGAGAAGGAAAGGCAAGAACTCGAAAGAGGTTT	193
AF_ex12-14	AGCGTGATGAGAAGGAAAGACAAGAACTTCAAAGAGGTTT	292
Wil_ex12-14	AGCGTGATGAGAAGGAAAGACAAGAACTTCAAAGAGGTTT	292
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

AtPng1p	GCATTCCGCAGATAATGCCTCAGTTTCTTTACCCGGAAGG	2782
MD4C477240	GCATTCTACAGACAATGACTCAAGCTCATTACCTGGGAGA	233
AF_ex12-14	GCATTCTACAGACAATGACTCAACCTCATTACCTGGGAGA	332
Wil_ex12-14	GCATTCTACAGACAATGACTCAACCTCATTACCTGGGAGA	332
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

AtPng1p	CAAAGTGGGGACAGGAATGGCGTATTATGAGATCAGAAT	2822
MD4C477240	CGAAGTGGGGACAAGGAATGGCGCAAGTCAAGATTAGAAT	273
AF_ex12-14	CGAAGTGGGGACAAGGAATGGCGCAAGTCAAGATTAGAAT	372
Wil_ex12-14	CGAAGTGGGGACAAGGAATGGCGCAAGTCAAGATTAGAAT	372
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

AtPng1p	TTGGTTCAGACGAAAACCTCATCTGTCAGCTCTTCCTCTTG	2862
MD4C477240	GTGGTTCTGATGAGAGTTGCTCCTTGAGTGGTTCTTGTTG	313
AF_ex12-14	GTGGTTCTGATGAGAGTTGCTCCTTGAGTGGTTCTTGTTG	412
Wil_ex12-14	GTGGTTCTGATGAGAGTTGCTCCTTGAGTGGTTCTTGTTG	412
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

AtPng1p	CCCAGTTCGCAAATGCGTTGATGACCATGTGACCAACATT	2902
MD4C477240	TCCAGTTCGTTTCATGCTTTGACGAGCACGTGACCAAAATT	353
AF_ex12-14	TCCAGTTCGTTTCATGCTTTGACGAGCACGTGACCAAAATT	452
Wil_ex12-14	TCCAGTTCGTTTCATGCTTTGACGAGCACGTGACCAAAATT	452
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

AtPng1p	TATGACTCGTTTCTACCTATCCTTACTCAGTTCGTTGAGG	2942
MD4C477240	CATAATGCATTTCTCCAATTCTTTCAAAGCTTGTTGAGG	393
AF_ex12-14	CATAATGCATTTCTCCAATTCTTTCAAAGCTTGTTGAGG	492
Wil_ex12-14	CATAATGCATTTCTCCAATTCTTTCAAAGCTTGTTGAGG	492
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

---

AtPng1p	ACGGCTTACCTGTAGCAAGAACAAATGAGGTACTTAAGAT	2982
MD4C477240	AAGAATTTCCAAAGTCAAGGGCCGTTGAAGTACTTGAGAT	433
AF_ex12-14	AAGAATTTCCAAAGTCAAGGGCCGTTGAAGTACTTGAGAC	532
Wil_ex12-14	AAGAATTTCCAAAGTCAAGGGCCGTTGAAGTACTTGAGAC	532
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

AtPng1p	GATCAAGCAAGTCCTAGTGGATCTGAAGAATGCGCCTTAC	3022
MD4C477240	TCTAAAAGGCATTCTCATGGATCTTAAGAAATCACCTTTT	473
AF_ex12-14	TCTAAAAGGCATTCTCATGGATCTTAAGAAATCACCTTTT	572
Wil_ex12-14	TCTAAAAGGCATTCTCATGGATCTTAAGAAATCACCTTTT	572
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

AtPng1p	AAAAACAAGGAAGGCTCGATTGACTTTAGATTTCAGATAACT	3062
MD4C477240	AAAAACAAGGAGGGCCACAATCGATTTCAGTTTCTAATATCA	513
AF_ex12-14	AAAAACAAGGAGGACCACAATCGATTTCAGTTTCTAATATCA	612
Wil_ex12-14	AAAAACAAGGAGGACCACAATCGATTTCAGTTTCTAATATCA	612
	***** * * * * * * * * * * * * * * * *	

AtPng1p	CAAGTTCATTCCCGGAGCAGTTTCTTCCGCACTAGGCGA	3102
MD4C477240	ACCAATCACTTGTTTCATCAGTTGTTGCCCTCTTTCCTGA	553
AF_ex12-14	ACCAATCACCTGTTTCATCAGTTGCTGCCCTCTTTCCTGA	652
Wil_ex12-14	ACCAATCACCTGTTTCATCAGTTGCTGCCCTCTTTCCTGA	652
	*** * * * * * * * * * * * * * * * *	

AtPng1p	TTTGCTTCTCGCTCTTTCTTTAAAGAGCGAGAGAGACACA	3142
MD4C477240	GTTACTTAATGCTCTTTCAATGAGTGTTATGGTAGATGGT	593
AF_ex12-14	GTTACTTAATGCTCTTTTCGATGAGTGTTATGGTAGATGGT	692
Wil_ex12-14	GTTACTTAATGCTCTTTTCGATGAGTGTTATGGTAGATGGT	692
	** *** ***** * * * * * * * * * *	

AtPng1p	AACGGTAAAAGTGTCACAATATCCGTAGACGGGAAACTCA	3182
MD4C477240	GATGGGAAA...GTTGACATTTCTCTGGCTGGAAGTGCTG	630
AF_ex12-14	GATGGGAAG...GTCGACATTTCTCTGTCTGGAAGTGCTG	729
Wil_ex12-14	GATGGGAAG...GTCGACATTTCTCTGTCTGGAAGTGCTG	729
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

AtPng1p	CTAAAACCTGCTATAGCATTGCCAGTTGCATTGGACGCGTT	3222
MD4C477240	TTAAAACCTCTTTGGCACTACCTGTTGCATTGGATGCTTT	670
AF_ex12-14	TTAAAACCTCTTTGGCACTACCTGTTGCATTGGATGCTTT	769
Wil_ex12-14	TTAAAACCTCTTTGGCACTACCTGTTGCATTGGATGCTTT	769
	***** * * * * * * * * * * * * * * * *	

ALLINEAMENTI

AtPng1p AAGGGAAC TTGTTGCTGACCTCAGCAAATACCAAAACTTA 3262  
MD4C477240 GGACGACACAATAAATAATCTTAACAATTGTGATAACTTT 710  
AF\_ex12-14 GGACAACACAATCAATAATCTTAACAGTTGTGATAACTTT 809  
Wil\_ex12-14 GGACAACACAATCAATAATCTTAACAGTTGTGATAACTTT 809  
\* \* \* \* \*

AtPng1p AACAAAGATTCACTGTCTTTTCCACTTGTTAAACAGAACA 3302  
MD4C477240 GTTGAAAAGTCTCTTTGCTTGCCTCTTCTGAAGCTAAACA 750  
AF\_ex12-14 GTTGAAAAGTCTCTTTGCTTGCCTCTTTTGAAGCTAAACA 849  
Wil\_ex12-14 GTTGAAAAGTCTCTTTGCTTGCCTCTTTTGAAGCTAAACA 849  
\* \* \* \* \*

AtPng1p GGGTATGCTCTGGTTCTGTCTCGCAAGTGGTGAAGAGCT 3342  
MD4C477240 GAATACATTCTGGTTCAGTCCTTGCAAGTGGCGAAGAAAT 790  
AF\_ex12-14 GAATACATTCTGGTTTGTAGTCCTTGCAAGTGGGGAAGAAAT 889  
Wil\_ex12-14 GAATACATTCTGGTTTGTAGTCCTTGCAAGTGGGGAAGAAAT 889  
\* \* \* \* \*

AtPng1p TCCTTCTGGCATTG . . . . TAAGTAGTATCCTATTACAAG 3377  
MD4C477240 TCCTTTTGGGAATTG . . . . . 804  
AF\_ex12-14 TCCCTTTGGAATTGTGAGTTTTATTTGTTTTGCGGTTCA 929  
Wil\_ex12-14 TCCCTTTGGAATTGTGAGTTTTATTTGTTTTGCGGTTCA 929  
\*\*\* \* \*\*\* \*\*\*\*\*

AtPng1p TCTCATCTTACCATTTAATCAAACCTGTTTTTGTTATTCC 3417  
MD4C477240 . . . . . 804  
AF\_ex12-14 TCTTTGTACCATTTCAATCAAAAAGCTTCTCAATCTCCCC 969  
Wil\_ex12-14 TCTTTGTACCATTTCAATCAAAAAGCTTCTCAATCTCCCC 969

AtPng1p TAAATATCATGCCTCACTCACTGCCTCAGGCAACCGCAGC 3457  
MD4C477240 . . . . . CCACTTCAGC 814  
AF\_ex12-14 GGTAAATTTTCAGG . . . . . CCACATCAGC 992  
Wil\_ex12-14 AGTAAATTTTCAGG . . . . . CCACATCAGC 992  
\* \* \* \* \*

*Esona 14*

AtPng1p TTTTGATGGAATCCAAGAGTCCAAATGGGAAGAACCAAAT 3497  
MD4C477240 GTTTGATGGGATACGCAAGTCTAAGTGGGAAGAACCAAAT 854  
AF\_ex12-14 ATTTGATGGGATACGCATGTCTAAGTGGGAAGAACCAAAT 1032  
Wil\_ex12-14 ATTTGATGGGATACGCATGTCTAAGTGGGAAGAACCAAAT 1032  
\*\*\*\*\* \* \* \* \* \*\*\*\*\*

---

AtPng1p	GGTGCAAAAGGTATGAAATATAGCCTGATCCAAAACCTATG	3537
MD4C477240	GGTGCACGAGG.....	865
AF_ex12-14	GGTG.....	1036
Wil_ex12-14	GGTG.....	1036

\*\*\*\*

## ALLINEAMENTI

**Figura B.5:** allineamento fra il cDNA di *AtPng1p* e la sequenza assemblata per il cDNA del gene omologo di pero. I codoni di start (ATG) e stop (TGA) della traduzione sono marcati nei box; sono inoltre riportate le regioni dei due primer realizzati per il clonaggio da cDNA della sequenza codificante “full-length” del gene.

Pc_cDNA	.....	0
AtPng1p	AAAAGACTTGGGATCAAACAACCTTGAGAGATCATTGGAATT	45
Pc_cDNA	.....GACAAGATGGTGGCTCGGAGCTTCCAGGTTCCACCAC	36
AtPng1p	CAATAATCTGAGAAAATGGTTGCTCGGAAATTTGTCGTCCGCCAT	90
	* * * * *	
<i>Start</i>		
Pc_cDNA	CAGGACTCCACTTTCTCCGTTGACTACGACACCGACGACGGCCTT	81
AtPng1p	GAAGATTCGAGCTTCGATGTCGACTACAACACTGAAGATGGTCTT	135
	* * * * *	
Pc_cDNA	GAAGTCCTCAAATTTCAACTGTTCTCCCTCACCTCCGTTCCCCC	126
AtPng1p	GAGTTTTTACGATTTCTAATCTTCTCCCTCACTTTAGTTCTCTCT	180
	* * * * *	
Pc_cDNA	GACGAGCAAAAAGTTAATTGGATTCGATGGAGATTCGGTTGTTTCG	171
AtPng1p	GAAGAACAAAAGATCGTTGCGGAAGATGATAATCGATTGGTGTCT	225
	* * * * *	
Pc_cDNA	GACGATTCGGGCCTCGTTTTCGATTTGCGAGAAGCTCCGATTGGTT	216
AtPng1p	GATGAGTCTGATCTCGTTCTTTATCTGAGAGACTTCGATTAGTT	270
	* * * * *	
Pc_cDNA	TCGATCAGCGAAGAACAACAACAGCAAGAAGAATCAGCGGCTCAG	261
AtPng1p	TCAGTTGGAGAAGATT.....CTGTAGAGAA.....CTCAG	301
	* * * * *	
Pc_cDNA	AACGACGAATTGCTGAAATCGGACGAGGAATTGGCTAGAATGTTG	306
AtPng1p	A.TGCGGAAATGTTGAAATCAGATGAAGAATTGGCTCGAATGTTG	345
	* * * * *	
Pc_cDNA	CAGGCAGAGGAGGAAGCACTTTTGTTCAGCAGTACGCTGCCCT	351
AtPng1p	CAGGCAGAAGAAGATGCTATTATGTTTCAACAGTTTGTCTGCTGCA	390
	* * * * *	

---

Pc_cDNA	GAAGATGATGGAAAATTCGAGCAAAAACCTGCGGCCTTATGTCAGT	396
AtPng1p	CGAGATAACGGCGAATTCGAAGGGAGAATTAGGCCTTATGTTAGT	435
	**** * ** ***** * * * ***** **	
Pc_cDNA	CAAGTTCTTATGTACGAGGACCCGGTGCGCCAGGAGGCTGCTCGG	441
AtPng1p	CAAGTTCTCATGTATGAAGATCCAGTCCGCCAAGATGCTGCTCGA	480
	***** ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	AAAACAGTCCCTATAGAAGAGCTTGAGGAGAAGGCATTGGTCAGT	486
AtPng1p	AAGACTGTTCCCTAAAGACGAGCTTGAGGAGAAAGCATTGTTTCT	525
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	TTGGCCAAGGAGGGGAACCTTAACTCCGTCAAAAAATGAGCAAGAT	531
AtPng1p	CTGGCCAAGGAAGGGAATTTTGAGCCATCGAAAGAGGAAAGAGAC	570
	***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	CATGCTTTCCTGCTGCAGCTACTTTTTTGGTTCAAACAGTCTTTC	576
AtPng1p	TACGCTTTCCTGCTTCAGCTTCTTTTCTGGTTCAAAAAATCCTTC	615
	* ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	AGTTGGGTAAACGCACCTGCCTGTGATAGTTGTGGCAATAACACC	621
AtPng1p	AGATGGGTCAATGAACCTCCTTGTGACTTTTGTGGTAACAAAACC	660
	** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	GTAATAGTGGCATGGCTAATGCAATTCCTTCAGAAATCCGATAT	666
AtPng1p	ATAGGCCAGGGGATGGGAAACCCACTTACCTCGGAGCTTGCTTAT	705
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	GGAGCTTCTCGAGTTGAGATCTATAGATGCAATATTTGTCCTACG	711
AtPng1p	GGAGCAAATCGAGTTGAAATATATCGCTGTACCATGTGTCCAACA	750
	***** ***** ** * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	GTGACTCGTTTCCCACGCTACAATGATCCACTAAAGCTTGTGGAA	756
AtPng1p	ACTACTCGATTCCCTCGGTACAACGATCCGCTAAAGCTCGTAGAA	795
	***** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	ACAAGAAGAGGGCGTTGTGGGGAATGGGCCAATTGCTTTACGCTT	801
AtPng1p	ACAAAGAAAGGTCGTTGCGGAGAGTGGGCGAACTGCTTTACGCTA	840
	**** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	TATTGCCGAGCTTTTGGATATGAACCCCGTCTTATCTTGGATTTC	846
AtPng1p	TACTGCCGCACGTTTGGCTATGATTCTCGTTTGATAATGGAATTC	885
	** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

## ALLINEAMENTI

---

Pc_cDNA	ACGGATCATGTTTGGACAGAGTGCTTCTCACAATCTTTGGGAAGA	891
AtPng1p	ACAGATCACGTGTGGACAGAATGCTACTCTCACTCGTTAAAGAGG	930
	** ***** ** ***** ** ** ** **	
Pc_cDNA	TGGATGCATCTTGATCCTTGTGAAGCAGTGTATGATAAACCCCTG	936
AtPng1p	TGGATCCATCTTGACCTTGTGAAGGAGTGTATGATAAACCCATG	975
	***** ***** ***** ***** ***** **	
Pc_cDNA	TTATATGAAAGCGGGTGGAAACAAGAAATTGAATTATGTAATTGCC	981
AtPng1p	TTATATGAGAAAGGATGGAATAAAAAATTGAATTATGTCATTGCC	1020
	***** * ** ***** ** ***** ***** *****	
Pc_cDNA	ATCACAAAAGATGGTGTGGTGTGATGTAACCAAACGCTATACGAGG	1026
AtPng1p	ATTTCTAAGGACGGGGTTTGTGATGTTACCAAGCGATATACAAAAG	1065
	** * ** ** ** ***** ***** ** ***** * **	
Pc_cDNA	AAGTGGCATGAGGTACTTTCTCGACGTAACATCATTACAGAGCCT	1071
AtPng1p	AAATGGCATGAGGTTTTATCTAGAAACTCTCACAACTGAATCA	1110
	** ***** * ** ** * * ** ** ** *	
Pc_cDNA	GCATTGTCAGCTGTGCTTGCTAATATAACAAAAGATTGTCGAAGA	1116
AtPng1p	TCTTTGCAAGATGGTCTTCGAACCCTGACAAGGGAACGACGACGT	1155
	* ** * ** ** * * ** * ** * ** *	
Pc_cDNA	GGGTTTACTTCTCAAGTACTTTCTGTAAGAGCGTGATGAG	1161
AtPng1p	AGCTTAATGTTGAATCTCTATCTAAGCTTGAATTACGAGACAGA	1200
	* ** * * ** ** ** ***** ** **	
Pc_cDNA	AAGGAAAGACAAGAAGTGAAGAGGTTTGCATTCTACAGACAAT	1206
AtPng1p	AATGAGCAGGAAGAAGTGAAGAGGAAATCTGCATTCCGCAGATAAT	1245
	** ** ***** ** ** * ***** ***** **	
Pc_cDNA	GACTCAACCTCATTACCTGGGAGACGAAGTGGGACAAGGAATGG	1251
AtPng1p	GCCTCAGTTTCTTTACCCGGAAGGCAAAGTGGGACAGGGAATGG	1290
	* ***** ** ***** ** * ***** *****	
Pc_cDNA	CGCAAGTCAAGATTAGAATGTGGTTCTGATGAGAGTTGCTCCTTG	1296
AtPng1p	CGTATTATGAGATCAGAATTTGGTTTCAGACGAAAACCTCATCTGTC	1335
	** * ***** ***** ***** ** ** * ** *	
Pc_cDNA	AGTGGTTCTTCTTGTCCAGTTTCGTTTCATGCTTTGACGAGCACGTG	1341
AtPng1p	AGCTCTTCTTCTTGTCCAGTTTCGCAAATGCGTTGATGACCATGTG	1380
	** ** ***** ***** ***** ***** ** ** **	



---

Pc_cDNA	ACCAAAATTCATAATGCATTTCTTCCAATTCTTTCAAAGCTTGTT	1386
AtPng1p	ACCAACATTTATGACTCGTTTTCTACCTATCCTTACTCAGTTCGTT	1425
	***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	GAGGAAGAATTTCCAAAGTCAAGGGCCGTTGAAGTACTTGAGACT	1431
AtPng1p	GAGGACGGCTTACCTGTAGCAAGAACAAATGAGGTACTTAAGATG	1470
	***** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	CTAAAAGGCATTCTCATGGATCTTAAGAAATCACCTTTTAAAACA	1476
AtPng1p	ATCAAGCAAGTCCTAGTGGATCTGAAGAATGCGCCTTACAAAACA	1515
	* ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	AGGAGGACCACAATCGATTTCAGTTTCTAATATCAACCAATCACCT	1521
AtPng1p	AGGAAGGCTCGATTGACTTTAGATTCAGATAACTCAAGTTCATTC	1560
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	G TTCATCAGTTGCTGCCCTCTTTCACTGAGTTACTTAATGCTCTT	1566
AtPng1p	CCGAGCAGTTTCTTCCCGCACTAGGCGATTTGCTTCTCGCTCTT	1605
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	TCGATGAGTGTTATGGTAGATGGTGATGGGAAG...GTCGACATT	1608
AtPng1p	TCTTTAAAGAGCGAGAGAGACACAAACGGTAAAAGTGTCACAATA	1650
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	TCTCTGTCTGGAAGTGCTGTTAAAACCTCTTTGGCACTACCTGTT	1653
AtPng1p	TCCGTAGACGGGAAACTCACTAAAACCTGCTATAGCATTGCCAGTT	1695
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	GCATTGGATGCTTTGGACAACACAATCAATAATCTTAACAGTTGT	1698
AtPng1p	GCATTGGACGCGTTAAGGGAACCTTGTGCTGACCTCAGCAAATAC	1740
	***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	GATAACTTTGTTGAAAAGTCTCTTTGCTTGCCTCTTTTGAAGCTA	1743
AtPng1p	CAAACTTAAACAAAGATTCACTGTCTTTTCCACTTGTTAAACAG	1785
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	AACAGAATACATTCTGGTTTAGTCCTTGCAAGTGGGGAAGAAATT	1788
AtPng1p	AACAGGGTATGCTCTGGTTCTGTCTCGCAAGTGGTGAAGAGCTT	1830
	***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	CCTTTGGAAATTGCCACATCAGCATTGATGGGATACGCATGTCT	1833
AtPng1p	CCTTCTGGCATTGCAACCGCAGCTTTTGTGGAATCCAAGAGTCC	1875
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

ALLINEAMENTI

Pc_cDNA	AAGTGGGAAGAACCAAATGGTGCACAAGGTTGCTGGATCATGTAT	1878	
AtPng1p	AAATGGGAAGAACCAAATGGTGCAAAAGGCTGTTGGATCGTGATC	1920	
	** ***** ** * ***** **		
Pc_cDNA	AAAGTATCTGAGAACCAGATGCACGAACTTGTGGCATATGAGTTA	1923	
AtPng1p	AAAACACTCTACAACCAGATGCACCAACTCATAGCATACGAACTC	1965	
	*** * * ***** ** * ***** ** *		
Pc_cDNA	ATGTCAGCCAGCGATGCACCAGAAAGGGATCCCATGGATTGGGTT	1968	
AtPng1p	ATGTCTGCTAATGATGCCCCAGAGAGACCCCAAAGATTGGATT	2010	
	***** ** * ***** ***** ** ** ***** ***** **		
Pc_cDNA	GTTGAAGGAAGCAATGATGAGGGATCAAGCTGGCATCTGTTGGAT	2013	
AtPng1p	CTTGAAGGAAGTAACGATGGTGGTTCGACATGGTGTGTCCTAGAC	2055	
	***** ** * ***** ** ** * ** * ** * * **		
Pc_cDNA	AAACGAACTTCTCAAGTATTTGATAGTCGTTTTTCAGCGTAAAACA	2058	
AtPng1p	AAGCAAAGTACGATCGGATTCGAGGAACGGTTCCAACGCAAATCC	2100	
	** * ***** ** ***** ** ** ** * ** * ** * ** *		
Pc_cDNA	TTTCAGATTGCTTCTCAAGGTTTCTCGCAAATGCTTTCAGGTTT	2103	
AtPng1p	TACAAAATAACTACACCTGGATTCCAAGCAAATCTTTTCAGGTTT	2145	
	* * ** * * * * ** ***** ***** *****		
Pc_cDNA	AGATTTTTGGCCGTTAAAGACGTCCAATCAAATTCGCGGCTGCAA	2148	
AtPng1p	CGGTTTTTAAGTGTACGAGACGTGAATTCGACCTCGAGACTACAA	2190	
	* ***** ** ***** * ** * ** * ** * ** *		
	<i>TG_FL_rev</i>		
Pc_cDNA	TTAGGTAGCATTGACCTCTATTCTAGAAGCAGTTGATTCTTACAG	2193	
AtPng1p	CTAGGGAGCATCGATCTGTACAGAAGTCACCAGTGATT.....	2228	
	*** ***** ** * ** * ** * ** * *****		
	<i>Stop</i>		
Pc_cDNA	ATCAGAATCTCTCCATTTGGATACTCGATTCCAGTGC GTTGAAGA	2238	
AtPng1p	.TAATGATGCATTTCATGCACAT.....CAAATGTAT.AAATA	2263	
	* * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *		
Pc_cDNA	AGCTTGACGCTGCCGTTTCATTTGTTTTTCAGCTGCCTGTAAGTCCG	2283	
AtPng1p	TTCCAAAAACATCAATTTGTTTTGTCTTCACTTTCTGCACATTGA	2308	
	* * * * ** ***** * ** ** * ** *		
Pc_cDNA	TCTCCTCCTG..TCTTAAGGCATAGGGAGACTGCCCATGGGATTT	2326	
AtPng1p	TGTATTCCGTATTCGTGAGGGAATTGGCCTTTGCTATTGCTATGA	2353	
	* * ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** *		

---

Pc_cDNA	AGGATCTATCCTAAAACTCCTTACCAAGATGTTTCATATTTCCAT	2371
AtPng1p	AACACCTCTGTCTTAGACAGAGGCTTACA.GACTCATGGTCACAG	2397
	* * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	TGGGAATCTAGGAAAAACT.GTTTTCAAAGAGACTAAATATGTG	2415
AtPng1p	TTGTTATCAACGAATAATAAGCCTCCACGTGTAACCTAACCC....	2438
	* * * * * * * * * * * * * *	
Pc_cDNA	GAGAATTTATGGAGGAATTAACCTGGCTCCCTCAATATTCGCTAT	2460
AtPng1p	.....	2438
Pc_cDNA	GTGACCTGCTTACGGAACTTCATATTTATGATCGGAACTTTTATA	2505
AtPng1p	.....	2438
Pc_cDNA	TGTATGATTGCAATGTTTCGTATTATAAAGCATTATCTAACGACGA	2550
AtPng1p	.....	2438
Pc_cDNA	TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2569
AtPng1p	.....	2438

## ALLINEAMENTI

**Figura B.6:** allineamento fra la sequenza della proteina *AtPng1p* e la sequenza aminoacidica dedotta per il gene omologo di pero; la regione del dominio catalitico è segnalata e sono marcati i residui della triade catalitica Cys-His-Asp.

Pc_SP	MVARSFQVHHQDSTFSVDYDIDDGLEVLFKQFLSLTSVPPDEQKL	45
AtPng1p	MVARKFVVRHEDSSFVDVYNTEDGLEVLRFILFSLTLVPPEEQKI	45
	**** * *. * ** * ** * .***** * .**** ***.****	
Pc_SP	IGFDGDSVVSDSGLVSICEKLRLVSISEEQQQEEESAAQNDELL	90
AtPng1p	VAEDDNRLVSDSDLASLSERLRLVSVGEDSVENS.....AEML	85
	.. * .**** * * *..*..***** * . . . . . . * .*	
Pc_SP	KSDEELARMLQAEEDALLFQQAAPEDDGKFEQKLRPYVSQVLMY	135
AtPng1p	KSDEELARMLQAEEDAIMFQQFVAARDNGEFEGRIRPYVSQVLMY	130
	*****.*****..****. * . * * * * .*****	
Pc_SP	EDPVRQEAARKTVPIEELEEKALVSLAKEGNLTPSKNEQDHAFLL	180
AtPng1p	EDPVRQDAARKTVPKDELEEKALVSLAKEGNFEPKSKEERDYAFLL	175
	*****.*****.*****.***** ** * * * .****	
Pc_SP	QLLFWFKQSFSWVNAPACDSCGNNTVNSGMANAIPSEIRYGASRV	225
AtPng1p	QLLFWFKKSFRWVNEPPCDFCGNKTIGQGMGNPLTSELAYGANRV	220
	***** * * * * *.** * * * * . * . * . * . . . * . * * * *	
	<i>Cys-256</i>	
Pc_SP	EIYRCNICPTVTRFPRYNDPLKLVETRGRGGEWANCFTLYCRAF	270
AtPng1p	EIYRCTMCPPTTRFPRYNDPLKLVETKKGRCGEWANCFTLYCRTF	265
	***** .*** *****.*****.*****.***** * *	
	<i>dominio catalitico</i>	
	<i>Hys-283</i> <i>Asp-300</i>	
Pc_SP	GYEPRILDFTDHVVWTECFSSQLGRWMHLDPCEAVYDKPLLYESG	315
AtPng1p	GYDSRLIMDFTDHVVWTECYSHSLKRWIHLDPCEGVYDKPMLYEKG	310
	**..***.*****.*****.* ** * .*****.*****.*** *	
	<i>dominio catalitico</i>	
Pc_SP	WNKKLNYVIAITKDGVCVTKRYTRKWHEVLSRRNIITEPALSAV	360
AtPng1p	WNKKLNYVIAISKDGVCVTKRYTKKWHEVLSRRTLTTESSLQDG	355
	*****.*****.*****.***** . * . * *	
Pc_SP	LANITKDCRRGFTSQVLSVLEERDEKERQELERGLHSTDNDSTSL	405
AtPng1p	LRTLTRERRRSLMFESLSKLELRDRNEQEELERNLHSADNASVSL	400
	* . * . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

---

Pc_SP	PGRRSGDKWRKSRLECGSDESCSLGSSCPVRSFCDEHVTKIHN	450
AtPng1p	PGRQSGDREWRIMRSEFGSDENSSVSSSSCPVRKCVDDHVTNIYD	445
	*** ***.*** * *.***** .* * ***** * *.*** *.	
Pc_SP	AFLPILSKLVEEEFPKSRAVEVLETGILMDLKKSPFKTRRTTI	495
AtPng1p	SFLPILTQFVEDGLPVARTNEVLKMIKQVLVDLKNAPYKTRKARL	490
	*****. **. * * *** .* ***** *.****. .	
Pc_SP	DSVSNINQSPVHQLLPSFTELLNALSMSVMVDGDGK.VDISLSGS	539
AtPng1p	TLSDNSSSFPEQFLPALGDLALLALSLKSERDTNGKSVTISVDGK	535
	* *...* ** .* ***. * **.* **.*	
Pc_SP	AVKTSLALPVALDALDNTINNLNSCDFVEKSLCLPLLKLNRIHS	584
AtPng1p	LTKTAIALPVALDALRELVADLSKYQNLNKDSLSPVVKQNRVCS	580
	** .*****. * . * **.* **.* **.* *	
Pc_SP	GLVLASGEEIPFGIATSAFDGIRMSKWEENGAQGCWIMYKVSEN	629
AtPng1p	GSVLASGEELPSGIATAAFDGIQESKWEENGAAGCWIVYKTLYN	625
	* *****.* **** ***** ***** ***.** *	
Pc_SP	QMHELVAYELMSASDAPERDPMDWVVEGSNDEGSSWHLLDKRTSQ	674
AtPng1p	QMHQLIAYELMSANDAPERDPKDWILEGSNDGGSTWCVLDKQTSQ	670
	*** *.***** ***** **.* ***** **.* **.* **.*	
Pc_SP	VFDSRFQRKTFQIASQGFLANAFRFRFLAVKDVQSNRLQLGSID	719
AtPng1p	VFEERFQRKSYKITTPGFQANLFRFRFLSVRDVNSTSRQLQLGSID	715
	** .*****. * .* ** ** ***** *.*.* *****	
Pc_SP	LYSRSS	725
AtPng1p	LYRSHQ	721
	** .	



# Bibliografia

- [1] Potter D., Eriksson T., Evans R. C., Oh S. H., Smedmark J. E. E., Morgan D. R., Kerr M., Robertson K. R., Arsenault M. P., Dickinson T. A., Campbell C. S. (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. *Pl. Syst. Evol.* 266: 5-43.
- [2] Campbell C. S., Evans R. C., Morgan D. R., Dickinson T. A., Arsenault M. P. (2007). Phylogeny of subtribe Pyrinae (formerly the Maloideae, Rosaceae): limited resolution of a complex evolutionary history. *Pl. Syst. Evol.* 266: 119-145
- [3] Sax K. (1933). The origin of the Pomoideae. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 30: 147-150
- [4] Evans R. C., Campbell C. S. (2002). The origin of the apple subfamily (Mal-oideae; Rosaceae) is clarified by DNA sequence data from duplicated GBSSI genes. *Amer. J. Bot.* 89: 1478-1484
- [5] Sansavini S., Ancarani V. (2008). Miglioramento genetico e nuove varietà in Europa. *Frutticoltura* 10: 28-36
- [6] Silva N. F., Goring D. R. (2001). Mechanisms of self-incompatibility in flower-ing plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 1988-2007
- [7] AA. VV. (2007). *Il Pero*. Bayer CropScience, Milano
- [8] Takayama S., Isogai A. (2005). Self-incompatibility in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 2005;56: 467-89
- [9] Stein J. C., Howlett B., Boyes D. C., Nasrallah M. E., Nasrallah J. B. (1991). Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8816-20

## BIBLIOGRAFIA

---

- [10] Schopfer C. R., Nasrallah M. E., Nasrallah J.B. (1999). The male determinant of self-incompatibility in Brassica. *Science* 286: 1697-700
- [11] Suzuki G., Kai N., Hirose T., Fukui K., Nishio T., Takayama S., Isogai A., Watanabe M. and Hinata K. (1999). Genomic organization of the S locus: identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S9 haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* 153: 391-400
- [12] Foote H. C., Ride J. P., Franklin-Tong V. E., Walker E. A., Lawrence M. J., Franklin F. C. (1994). Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S) gene from *Papaver rhoeas* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2265-9
- [13] Franklin-Tong V. E., Holdway-Clarke T. L., Straatman K. R., Kunkel J. G., Hepler P. K. (2002). Involvement of extracellular calcium influx in the self incompatibility response of *Papaver rhoeas*. *Plant Journal* 29: 333-345
- [14] Geitmann A., Snowman B. N., Emons A. M. C., Franklin-Tong V. E. (2000). Alterations in the actin cytoskeleton of pollen tubes are induced by the self-incompatibility reaction in *Papaver rhoeas*. *Plant Cell* 12: 1239-52
- [15] Thomas S. G. and Franklin-Tong V. E. (2004). Self-incompatibility triggers programmed cell death in Papaver pollen. *Nature* 429: 305-9
- [16] Bredemeijer G. M. M., Blaas J. (1981). S-specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana alata*. *Theor. Appl. Genet.* 59: 185-190
- [17] Anderson M. A., Cornish E. C., Mau S.-L., Williams E. G., Hoggart R., Atkinson A., Bonig I., Grego B., Simpson R., Roche P. J., Haley J. D., Penschow J. D., Niall H. D., Tregear G. W., Coghlan J. P., Crawford R. J., Clarke A. E. (1986). Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature* 321: 38 - 44
- [18] McClure B. A., Haring V., Ebert P. R., Anderson M. A., Simpson R. J., Sakiyama F. Clarke A. E. (1989). Style self-incompatibility gene products of *Nicotlana alata* are ribonucleases. *Nature* 342: 955 - 957
- [19] Lee H. S., Huang S., Kao T. H. (1994). S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* 367: 560-63



- [20] Murfett J., Atherton T.L., Mou B., Gasser C.S., McClure B.A. (1994). S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* 367: 563-66
- [21] Karunanandaa B., Huang S., Kao T. H. (1994). Carbohydrate moiety of the *Petunia inflata* S<sub>3</sub> protein is not required for self-incompatibility interactions between pollen and pistil. *Plant Cell*. 6: 1933-1940
- [22] McCubbin A.G., Kao T. H. (2000). Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16: 333-64
- [23] Vieira C. P., Charlesworth D. (2002). Molecular variation at the self-incompatibility locus in natural populations of the genera *Antirrhinum* and *Misopates*. *Heredity* 88: 172-81
- [24] Ida K., Norioka S., Yamamoto M., Kumasaka T., Yamashita E., Newbiggin E., Clarke A. E., Sakiyama F., Sato M. (2001). The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana alata* S<sub>F11</sub>-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *J. Mol. Biol.* 314:103-12
- [25] Matsuura T., Sakai H., Unno M., Ida K., Sato M., Sakiyama F., Norioka S. (2001). Crystal structure at 1.5 Å resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility. *J. Biol. Chem.* 276: 45261-69
- [26] Sassa H., Nishio T., Kowyama Y., Hirano H., Koba T., Ikehashi H. (1996). Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Mol. Gen. Genet.* 250: 547-557
- [27] Zisovich A. H., Stern R. A., Sapir G., Shafir S., Goldway M. (2004). The RHV region of S-RNase in the European pear (*Pyrus communis*) is not required for the determination of specific pollen rejection. *Sex. Plant Reprod.* 17: 151-156
- [28] Sassa H., Hirano H., Ikehashi H. (1992). Self-Incompatibility-related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.) *Plant and Cell Physiology* 33: 811-814
- [29] Zuccherelli S., Tassinari P., Broothaerts W., Tartarini S., Dondini L., Sansavini S. (2002). S-allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). *Sex. Plant Reprod.* 15: 153-158

## BIBLIOGRAFIA

---

- [30] Zisovich A. H., Stern R. A., Shafir S., Goldway M. (2004) Identification of seven S-alleles from the European pear (*Pyrus communis*) and the determination of compatibility among cultivars. *J. Hort. Sci. Biot.* 80: 143-146
- [31] Takasaki T., Moriya Y., Okada K., Yamamoto K., Iwanami H., Bessho H., Nakanishi T. (2006). cDNA cloning of nine S alleles and establishment of a PCR-RFLP system for genotyping European pear cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1543-52
- [32] Sanzol J., Sutherland B. G., Robbins T. P. (2006). Identification and characterization of genomic DNA sequences of the S-ribonuclease gene associated with self-incompatibility alleles S<sub>1</sub> to S<sub>5</sub> in European pear. *Plant Breed.* 125: 513-518
- [33] Sanzol J., Robbins T. P. (2008). Combined analysis of s alleles in European pear by fertilisation efficiency of pollinations and PCR based S-genotyping: correlation between S phenotypes and S-RNase genotype. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133: 213-224
- [34] Sanzol J., Herrero M. (2002). Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Euphytica* 128: 325-331
- [35] Goldway M., Takasaki T., Sanzol J., Mota M., Zisovich A. H., Stern R. A., Sansavini S. (2008). Renumbering the S-RNase alleles of European pears (*Pyrus communis* L.) and cloning the S<sub>109</sub> RNase allele. *Sci. Hortic.*, in press
- [36] Dowd P. E., McCubbin A. G., Wang X., Verica J. A., Tsukamoto T., Ando T., Kao T. H. (2000). Use of *Petunia* as a model for the study of solanaceous type self-incompatibility. *Ann. Bot. Suppl. A* 85: 87-93
- [37] Li J. H., Nass N., Kusaba M., Dodds P. N., Treloar N., Clarke A. E., Newbigin E. (2000). A genetic map of the *Nicotiana glauca* S locus that includes three pollen-expressed genes. *Theor. Appl. Genet.* 100: 956-964
- [38] McCubbin A. G., Wang X., Kao T. H. (2000). Identification of self-incompatibility (S-) locus linked pollen cDNA markers in *Petunia inflata*. *Genome* 43: 619-627
- [39] Entani T., Iwano M., Shiba H., Takayama S., Fukui K., Isogai A. (1999). Centromeric localization of an S-RNase gene in *Petunia hybrida* Vilm. *Theor. Appl. Genet.* 99: 391-397

- [40] Kao T. H., Tsukamoto T. (2004). The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* 16 Suppl: S72-83
- [41] Lai Z., Ma W., Han B., Liang L., Zhang Y., Hong G., Xue Y. (2002). An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol. Biol.* 50: 29-42
- [42] Ushijima K., Sassa H., Dandekar A. M., Gradziel T. M., Tao R., Hirano H. (2003). Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell* 15: 771-81
- [43] Entani T., Iwano M., Shiba H., Che F. S., Isogai A., Takayama S. (2003). Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes Cells* 8: 203-13
- [44] Ikeda K., Igc B., Ushijima K., Yamane H., Hauck N. R., Nakano R., Sassa H., Iezzoni A. F., Kohn J. R., Tao R. (2004). Primary structural features of the S haplotype-specific F-box protein, SFB, in *Prunus*. *Sex. Plant Reprod.* 16: 235-243
- [45] Sijacic P., Wang X., Skirpan A. L., Wang Y., Dowd P. E., McCubbin A. G., Huang S., Kao T. H. (2004). Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* 429: 302-5
- [46] Entani T., Takayama S., Iwano M., Shiba H., Che F. S., Isogai A. (1999). Relationship between polyploidy and pollen self-incompatibility phenotype in *Petunia hybrida* Vilm. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 1882-8
- [47] Ushijima K., Yamane H., Watari A., Kakehi E., Ikeda K., Hauck N. R., Iezzoni A. F., Tao R. (2004). The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J.* 39: 573-86
- [48] Sonneveld T., Tobutt K. R., Vaughan S. P., Robbins T. P. Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S haplotype-specific F-box gene. *Plant Cell.* 17: 37-51
- [49] Hauck N. R., Ikeda K., Tao R., Iezzoni A. F. (2006). The mutated S1-haplotype in sour cherry has an altered S-haplotype-specific F-box protein gene. *J. Hered.* 97: 514-20

## BIBLIOGRAFIA

---

- [50] Tsukamoto T., Hauck N. R., Tao R., Jiang N., Iezzoni A. F. (2006). Molecular characterization of three non-functional S-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus*). *Plant Mol. Biol.* 62: 371-383
- [51] Cheng J., Han Z., Xu X., Li T. (2006). Isolation and identification of the pollen-expressed polymorphic F-box genes linked to the S-locus in apple (*Malus × domestica*). *Sex. Plant Reprod.* 19: 175-183
- [52] Sassa H., Kakui H., Miyamoto M., Suzuki Y., Hanada T., Ushijima K., Kusaba M., Hirano H., Koba T. (2007). S locus F-box brothers: multiple and pollen-specific F-box genes with S haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear. *Genetics* 175: 1869-81
- [53] Huang S., Lee H. S., Karunanandaa B., Kao T. H. (1996) Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell* 6: 1021-8
- [54] McClure B. A., Gray J. E., Anderson M. A., Clarke A. E. (1990). Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* 347: 757-760
- [55] Thompson R., Kirch H. (1992). The S-locus of flowering plants: when self-rejection is self-interest. *Trends Genet.* 8: 381-387
- [56] Kao T. H., McCubbin A. G. (1996). How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996 93: 12059-65
- [57] Luu D. T., Qin X., Morse D., Cappadocia M. (2000). S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature* 407: 649-51
- [58] Luu D. T., Qin X., Laublin G., Yang Q., Morse D., Cappadocia M. (2001). Rejection of S-heteroallelic pollen by a dual-specific S-RNase in *Solanum chacoense* predicts a multimeric SI pollen component. *Genetics* 159: 329-35
- [59] Hua Z., Meng X., Kao T. H. (2007). Comparison of *Petunia inflata* S-Locus F-box protein (Pi SLF) with Pi SLF like proteins reveals its unique function in S-RNase based self-incompatibility. *Plant Cell* 19: 3593-609
- [60] Cardozo T., Pagano M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5: 739-51

- [61] Moon J., Parry G., Estelle M. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell* 16: 3181-95
- [62] Smalle J., Vierstra R. D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 55: 555-90
- [63] Qiao H., Wang H., Zhao L., Zhou J., Huang J., Zhang Y., Xue Y. (2004). The F-box protein AhSLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *Plant Cell*. 16: 582-95
- [64] Huang J., Zhao L., Yang Q., Xue Y. (2006). AhSSK1, a novel SKP1-like protein that interacts with the S-locus F-box protein SLF. *Plant J.* 46: 780-93
- [65] Hua Z., Kao T. H. (2006). Identification and characterization of components of a putative *Petunia* S-locus F-box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* 18: 2531-53
- [66] Hua Z., Kao T. H. (2008). Identification of major lysine residues of S<sub>3</sub>-RNase of *Petunia inflata* involved in ubiquitin-26S proteasome-mediated degradation in vitro. *Plant J.* 54: 1094-1104
- [67] Hua Z., Fields A., Kao T.H. (2008). Biochemical models for S-RNase-based self-incompatibility. *Mol. Plant* 1: 575-585
- [68] Goldraij A., Kondo K., Lee C. B., Ha[cock C. N., Sivaguru M., Vazquez-Santana S., Kim S., Phillips T. E., Cruz-Garcia F., McClure B. A. (2006). Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* 439: 805-10
- [69] Olden E. J., Nybom N. (1968). On the origin of *Prunus cerasus* L. *Hereditas* 59: 327-45
- [70] Huang S. X., Wu H. Q., Li Y. R., Wu J., Zhang S. J., Heng W., Zhang S. L. (2008). Competitive interaction between two functional S-haplotypes confer self-compatibility on tetraploid Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl. CV. Nanjing Chuisi). *Plant Cell Rep.* 27: 1075-85
- [71] Newbigin E., Anderson M. A., Clarke A. E. (1993). Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell* 5: 1315-24

## BIBLIOGRAFIA

---

- [72] Anderson M. A., McFadden G. I., Bernatzky R., Atkinson A., Orpin T., Dedman H., Tregear G., Fernley R., Clarke A. E. (1989). Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell* 1: 483-91
- [73] Ai Y. J., Kron E., Kao T. H. (1991). S-alleles are retained and expressed in a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Mol. Gen. Genet.* 230: 353-358
- [74] Bernatzky R., Glaven R. H., Rivers B. A. (1995). S-related protein can be recombined with self-compatibility in interspecific derivatives of *Lycopersicon*. *Biochem. Genet.* 33: 215-25
- [75] Tsukamoto T., Ando T., Kokubun H., Watanabe H., Sato T., Masada M., Marchesi E., Kao T. H. (2003). Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by a modifier locus that suppresses the expression of an S-RNase gene. *Sex. Plant Reprod.* 15: 255-63
- [76] McClure B. A., Cruz-Garcia F., Beecher B. S., Sulaman W. (2000). Factors affecting inter- and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Ann. Bot.* 85: 113-23
- [77] McClure B. A., Canevascini S., Bernatzky R. (1999). A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 13548-53
- [78] O'Brien M., Kapfer C., Major G., Laurin M., Bertrand C., Kondo K., Kowiyama Y., Matton D. P. (2002). Molecular analysis of the stylar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *Plant J.* 32: 985-96
- [79] Hancock C. N., Kent L., McClure B. A. (2005). The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.* 43: 716-23
- [80] Liu Z. Q., Xu G. H., Zhang S. L. (2007). *Pyrus pyrifolia* stylar S-RNase induces alterations in the actin cytoskeleton in self-pollen and tubes in vitro. *Protoplasma* 232: 61-67
- [81] Tirlapur U. K., Cai G., Faleri C., Moscatelli A., Scali M., Del Casino C., Tiezzi A., Cresti M. (1995). Confocal imaging and immunogold electron microscopy of changes in distribution of myosin during pollen hydration, germination and pollen tube growth in *Nicotiana tabacum* L. *Eur. J. Cell Biol.* 67: 209-17

- [82] Hepler P. K., Vidali L., Cheung A. Y. (2001). Polarized cell growth in higher plants. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17: 159-187
- [83] Vidali L., McKenna S. T., Hepler P. K. (2001). Actin polymerization is necessary for pollen tube growth. *Mol. Biol. Cell.* 12: 2534-45
- [84] Janmey P. A. (1998). The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol. Rev.* 78: 763-81
- [85] Morley S. C., Sun G. P., Bierer B. E. (2003). Inhibition of actin polymerization enhances commitment to and execution of apoptosis induced by withdrawal of trophic support. *J. Cell. Biochem.* 88: 1066-76
- [86] Thomas S. G., Huang S., Li S., Staiger C. J., Franklin-Tong V.E. (2006). Actin depolymerization is sufficient to induce programmed cell death in self-incompatible pollen. *J. Cell Biol.* 174: 221-29
- [87] Wang C. L., Xu G. H., Jiang X. T., Chen G., Jun W., Wu J., Wu H. Q., Zhang S. L. (2009). S-RNase triggers mitochondrial alteration and DNA degradation in the incompatible pollen tube of *Pyrus pyrifolia in vitro*. *Plant J.* 57: 220-229
- [88] Del Duca S., Serafini-Fracassini D. (2005). Transglutaminases of higher, lower plants and fungi. In Metha K., Eckert R. (eds): *Transglutaminases. Prog. Exp. Tum. Res. Basel, Karger*, 38: 223-247
- [89] Serafini-Fracassini D., Del Duca S. (2008). Transglutaminases: widespread cross-linking enzymes in plants. *Ann. Bot.* 102: 145-52
- [90] Mukherjee B. B., Nemir M., Beninati S., Cordella-Miele E., Singh K., Chackalamparampil I., Shanmugam V., DeVouge M. W., Mukherjee A. B. (1995). Interaction of osteopontin with fibronectin and other extracellular matrix molecules. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 760: 201-12
- [91] Lentini A., Abbruzzese A., Caraglia M., Marra M., Beninati S. (2004). Protein-polyamine conjugation by transglutaminase in cancer cell differentiation. *Amino Acids* 26: 331-37
- [92] Del Duca S., Bregoli A. M., Bergamini C., Serafini-Fracassini D. (1997). Transglutaminase catalyzed modification of cytoskeletal proteins by polyamines during the germination of *Malus domestica* pollen. *Sex. Plant Reprod.* 10: 89-95

## BIBLIOGRAFIA

---

- [93] Fesus L., Madi A., Balajthy Z., Nemes Z., Szondy Z. (1996). Transglutaminase induction by various cell death and apoptosis pathways. *Experientia*. 52: 942-49
- [94] Autuori F., Farrace M. G., Oliverio S., Piredda L., Piacentini M. (1998). "Tissue" transglutaminase and apoptosis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 62: 129-36
- [95] Della Mea M., Serafini-Fracassini D., Del Duca S. (2007). Programmed cell death: similarities and differences in animals and plants. A flower paradigm. *Amino Acids* 33: 395-404
- [96] Piredda L., Farrace M. G., Lo Bello M., Malorni W., Melino G., Petruzzelli R., Piacentini M. (1999). Identification of 'tissue' transglutaminase binding proteins in neural cells committed to apoptosis. *FASEB J.* 13: 355-64
- [97] Di Sandro A., Serafini-Fracassini D., Del Duca S., Faleri C., Cai G., De Franceschi P., Dondini L., Sansavini S. (2008). Pollen transglutaminase in pear self incompatibility and relationships with S-RNases and S-Allele variability. *Acta Horticulturæ* 800: 423-430
- [98] Goldway M., Shai O., Yehuda H., Matityahu A., Stern R. A. (1999). 'Jonathan' apple is a lower-potency pollenizer of 'Topred' than 'Golden Delicious' due to partial S-allele incompatibility. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 74: 381-85
- [99] Yamane H., Ikeda K., Hauck N. R., Iezzoni A. F., Tao R. (2003.) Self-incompatibility (S) locus region of the mutated S<sub>6</sub>-haplotypes of sour cherry (*Prunus cerasus*) contains a functional pollen S-allele and a non-functional pistil S-allele. *J. Exp. Bot.* 54: 2431-34
- [100] Bošković R., Tobutt K. R., Duval H., Batlle I., Dicenta F., Vargas F. J. (1999). A stylar ribonuclease assay to detect self-compatible seedlings, on almond progenies. *Theor. Appl. Genet.* 99: 800-810
- [101] Watari A., Hanada T., Yamane H., Esumi T., Tao R., Yaegaki H., Yamaguchi M., Beppu K., Kataoka I. (2007). A low transcriptional level of S<sub>e</sub>-RNase in the S<sub>e</sub>-haplotype confers self-compatibility in Japanese plum. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 132: 396-406
- [102] Wünsch A., Hormaza J. I. (2004). Genetic and molecular analysis in Cristobalina sweet cherry, a spontaneous self-compatible mutant. *Sex. Plant Reprod.* 17:203-210



- 
- [103] Norioka N., Norioka S., Ohnishi Y., Ishimizu T., Oneyama C., Nakanishi T., Sakiyama F. (1996). Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNAs encoding S-allele specific stylar RNases in a self-incompatible cultivar and its self-compatible mutant of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. *J. Biochem.* 120: 335-45
- [104] Sassa H., Hirano H., Nishio T., Koba T. (1997). Style-specific self-compatible mutation caused by deletion of the S-RNase gene in Japanese pear (*Pyrus serotina*). *Plant J.* 12: 223-27
- [105] Okada K., Tonaka N., Moriya Y., Norioka N., Sawamura Y., Matsumoto T., Nakanishi T., Takasaki-Yasuda T. (2008). Deletion of a 236 kb region around S<sub>4</sub>-RNase in a stylar-part mutant S<sub>4</sub><sup>sm</sup>-haplotype of Japanese pear. *Plant Mol. Biol.* 66: 389-400
- [106] Matsumoto S., Komori S., Kitahara K., Imazu S., Soejima J. (1999). S-genotypes of 15 apple cultivars and self-compatibility of 'Megumi'. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 68: 236-41
- [107] Sanzol J. (2009). Pistil-function breakdown in a new S-allele of European pear, S<sub>21</sub><sup>°</sup>, confers self-compatibility. *Plant Cell Rep.*, in press.
- [108] Witte C. P., Le Q. H., Bureau T., Kumar A. (2001). Terminal-repeat retrotransposons in miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13778-83
- [109] Broothaerts W., Keulemans J., Van Nerum I. (2004). Self-fertile apple resulting from S-RNase gene silencing. *Plant Cell Rep.* 22: 497-501
- [110] Brodersen P., Voinnet O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.* 22: 268-80
- [111] Eamens A., Wang M. B., Smith N. A., Waterhouse P. M. (2008). RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow. *Plant Physiol.* 147: 456-68
- [112] Steinbachs J. E., Holsinger K. E. (2002). S-RNase-mediated gametophytic self-incompatibility is ancestral in eudicots. *Mol. Biol. Evol.* 19: 825-9
- [113] Lawrence M. J. (2000). Population genetics of the homomorphic self-incompatibility polymorphisms in flowering plants. *Ann. Bot.* 85: 221-226

## BIBLIOGRAFIA

---

- [114] Takahata N. (1990). A simple genealogical structure of strongly balanced allelic lines and trans-species evolution of polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2419-23
- [115] Vekemans X., Slatkin M. (1994). Gene and allelic genealogies at a gametophytic self-incompatibility locus. *Genetics* 137: 1157-65
- [116] Richman A. D., Uyenoyama M. K., Kohn J. R. (1996) Allelic diversity and gene genealogy at the self-incompatibility locus in the Solanaceae. *Science* 273: 1212-6
- [117] Ioerger T. R., Clark A. G., Kao T. H. (1990). Polymorphism at the self-incompatibility locus in Solanaceae predates speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 9732-5
- [118] Ioerger T. R., Gohlke J. R., Xu B., Kao T. H. (1991). Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sex. Plant Reprod.* 4: 81-87
- [119] Ishimizu T., Endo T., Yamaguchi-Kabata Y., Nakamura K. T., Sakiyama F., Norioka S. (1998). Identification of regions in which positive selection may operate in S-RNase of Rosaceae: implication for S-allele-specific recognition sites in S-RNase. *FEBS Lett.* 440: 337-342
- [120] Takebayashi N., Brewer P. B., Newbigin E., Uyenoyama M. K. (2003). Patterns of variation within self-incompatibility loci. *Mol. Biol. Evol.* 20: 1778-1794
- [121] Iqbal B., Smith W. A., Robertson K. A., Schaal B. A., Kohn J. R. (2007). Studies of self-incompatibility in wild tomatoes: I. S-allele diversity in *Solanum chilense* (Dun.) Reiche (Solanaceae). *Heredity* 99: 553-561
- [122] Vieira J., Morales-Hojas R., Santos R. A. M., Vieira C. P. (2007). Different positively selected sites at the gametophytic self-incompatibility pistil S-RNase gene in the Solanaceae and Rosaceae (*Prunus*, *Pyrus*, and *Malus*). *J. Mol. Evol.* 65: 175-185
- [123] Uyenoyama M. K., Newbigin E. (2000). Evolutionary dynamics of dual-specificity self-incompatibility alleles. *Plant Cell* 12: 310-12
- [124] Uyenoyama M. K., Zhang Y, Newbigin E. (2001). On the origin of self-incompatibility haplotypes: transition through self-compatible intermediates. *Genetics* 157: 1805-17

- 
- [125] Newbigin E., Uyenoyama M. K. (2005). The evolutionary dynamics of self-incompatibility systems. *Trends Genet.* 21: 500-5
- [126] Charlesworth D., Vekemans X., Castric V., Glémin S. (2005). Plant self-incompatibility systems: a molecular evolutionary perspective. *New Phytol.* 168: 61-69
- [127] Kakui H., Tsuzuki T., Koba T., Sassa H. (2007). Polymorphism of SFBB-gamma and its use for S genotyping in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Plant Cell Rep.* 26: 1619-25
- [128] Pierantoni L., Cho K. H., Shin I. S., Chiodini R., Tartarini S., Dondini L., Kang S. J., Sansavini S. (2004). Characterisation and transferability of apple SSRs to two European pear F1 populations. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1519-24
- [129] Dondini L., Pierantoni L., Gaiotti F., Chiodini R., Tartarini S., Bazzi C., Sansavini S. (2004). Identifying QTLs for fire-blight resistance via a European pear (*Pyrus communis* L.) genetic linkage map. *Mol. Breed.* 14: 407-18
- [130] Pierantoni L., Dondini L., Cho K.-H., Shin I.-S., Gennari F., Chiodini R., Tartarini S., Kang S.-J., Sansavini S. (2007). Pear scab resistance QTLs via a European pear (*Pyrus communis*) linkage map. *Tree Genetics and Genomes* 4: 311-317
- [131] Dondini L., Pierantoni L., Ancarani V., D'Angelo M., Cho K.-H., Shin I.-S., Musacchi S., Kang, S.-J. Sansavini S. (2008). The inheritance of the red colour character in European pear (*Pyrus communis* L.) and its map position in the mutated cultivar 'Max Red Bartlett'. *Plant Breeding* 127: 524-526
- [132] Bachem C. W. B., Oomen R. J. F. J., Visser R. G. F. (1998). Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol. *Plant Molecular Biology Reports* 16: 157-173
- [133] Breyne P., Zabeau M. (2001). Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 136-42
- [134] Donson J., Fang Y., Espiritu-Santo G., Xing W., Salazar A., Miyamoto S., Armendarez V., Volkmuth W. (2002). Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Mol. Biol.* 48: 75-97
- [135] Della Mea M., Caparrós-Ruiz D., Claparols I., Serafini-Fracassini D., Rigau J. (2004). AtPng1p. The first plant transglutaminase. *Plant Physiol.* 135: 2046-54

## BIBLIOGRAFIA

---

- [136] Rozen S., Skaletsky H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
- [137] Zamboni A., Pierantoni L., De Franceschi P. (2008). Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody-plants. *iForest* 1: 122-125
- [138] Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-14
- [139] Vuylsteke M., Mank R., Antonise R., Bastiaans E., Senior M. L., Stuber C. W., Melchinger A. E., Lübberstedt T., Xia X. C., Stam P., Zabeau M., Kuiper M. (1999). Two high-density AFLP linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 99: 921-35
- [140] Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-48
- [141] Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402
- [142] Mackey A. J., Haystead T. A., Pearson W. R. (2002). Getting more from less: algorithms for rapid protein identification with multiple short peptide sequences. *Molecular and Cellular Proteomics* 1: 139-147
- [143] Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-9
- [144] Van Ooijen J. W., Voorrips R. W. (2002). Joinmap 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands.
- [145] Voorrips RE (2002) MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.* 93: 77-78

- [146] Maliepaard C., Alston F. H., Van Arkel G., Brown L. M., Chevreau E., Dune-  
mann F., Evans K. M., Gardiner S., Guilford P., Van Heusden A. W., Janse  
J., Laurens F., Lynn J. R., Manganaris A. G., Den Nijs A. P. M., Periam  
N., Rikkerink E., Roche P., Ryder C., Sansavini S., Schmidt H., Tartarini S.,  
Verhaegh J. J., Ginkel M. Vrieling-Van, King G. J. (1998). Aligning male and  
female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers.  
Theor. Appl. Genet. 97: 60-73
- [147] Yamamoto T., Kimura T., Shoda M., Imai T., Saito T., Sawamura Y., Ko-  
tobuki K., Hayashi T., Matsuta N. (2002). Genetic linkage maps constructed  
by using an interspecific cross between Japanese and European pears. Theor.  
Appl. Genet. 106: 9-18
- [148] Liebhard R., Gianfranceschi L., Koller B., Ryder C. D., Tarchini R., Van De  
Weg E., Gessler C. (2002). Development and characterization of 140 new mi-  
crosatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). Mol. Breed. 10: 217-241
- [149] Liebhard R., Koller B., Gianfranceschi L., Gessler C. (2003). Creating a satu-  
rated reference map for the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. Theor  
Appl Genet 106:1497–1508
- [150] Silfverberg-Dilworth E., Matasci C. L., Van de Weg W. E., Van Kaauwen M. P.  
W., Walser M., Kodde L. P., Soglio V., Gianfranceschi L., Durel C. E., Costa  
F., Yamamoto T., Koller B., Gessler C., Patocchi A. (2006). Microsatellite  
markers spanning the apple (*Malus × domestica* Borkh) genome. Tree Genetics  
Genomes 2: 202-224
- [151] Wang Y., Tsukamoto T., Yi K. W., Wang X., Huang S., McCubbin A. G., Kao  
T. H. (2004). Chromosome walking in the *Petunia inflata* self-incompatibility  
(S-) locus and gene identification in an 881-kb contig containing S<sub>2</sub>-RNase.  
Plant Mol. Biol. 54: 727-42
- [152] Herrero M., Dickinson H. G. (1981). Pollen tube development in *Petunia hy-*  
*brida* following compatible and incompatible intraspecific matings. Journal of  
Cell Science 47: 365-383
- [153] Dumas C., Knox R. B. (1983). Callose and determination of pistil viability and  
incompatibility. Theor. Appl. Genet. 67: 1-10
- [154] Lush W. M., A. E. Clarke (1997). Observations of pollen tube growth in *Nico-*  
*tiana glauca* and their implications for the mechanism of self-incompatibility.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Sex. Plant. Reprod. 10: 27-35
- [155] Kim J., Mayfield S. P. (1997). Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. *Science* 278, 1954-1957
- [156] Houston N. L., Fan C., Xiang Q. Y., Schulze J. M., Jung R., Boston R. S. (2005). Phylogenetic analyses identify 10 classes of the protein disulfide isomerase family in plants, including single-domain protein disulfide isomerase-related proteins. *Plant Physiol.* 137: 762-778
- [157] Litterer L. A., Schnurr J. A., Plaisance K. L., Storey K. K., Gronwald J. W., Somers D. A. (2006). Characterization and expression of *Arabidopsis* UDP-sugar pyrophosphorylase. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 171-180
- [158] Schnurr J. A., Storey K. K., Jung H. J. G., Somers D. A., Gronwald J. W. (2006). UDP-sugar pyrophosphorylase is essential for pollen development in *Arabidopsis*. *Planta* 224: 520-532
- [159] Small I. D., Peeters N. (2000). The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 25: 45-47
- [160] Lusser A., Kölle D., Loidl P. (2001). Histone acetylation: lessons from the plant kingdom. *Trends in Plant Science* 6: 59-65
- [161] Harper A. D., Bar-Peled M. (2002). Biosynthesis of UDP-xylose. Cloning and characterization of a novel *Arabidopsis* gene family, UXS, encoding soluble and putative membrane-bound UDP-glucuronic acid decarboxylase isoforms. *Plant Physiol.* 130, 2188-2198
- [162] Zheng L., Poulton J.E. (1995). Temporal and spatial expression of amygdalin hydrolase and (R)-(+)-mandelonitrile lyase in black cherry seeds. *Plant Physiol.* 109: 31-9
- [163] Sanabria N., Goring D., Nürnberger T., Dubery I. (2008). Self/nonself perception and recognition mechanisms in plants: a comparison of self-incompatibility and innate immunity. *New Phytol.* 178: 503-14
- [164] Campalans A., Pagès M., Messegueur R. (2001). Identification of differentially expressed genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond (*Prunus amygdalus*). *Tree Physiol.* 21: 633-43

- [165] Zamboni A., Dondini L., Tonon G. (2005) cDNA-AFLP study of gene expression during somatic embryogenesis in *Fraxinus angustifolia* Vhal. J. Hortic. Sci. Biotech. 80: 240-244
- [166] Grimplet J., Romieu C., Audergon J. M., Marty I., Albagnac G., Lambert P., Bouchet J. P., Terrier N. (2005). Transcriptomic study of apricot fruit (*Prunus armeniaca*) ripening among 13,006 expressed sequence tags. Physiol. Plant. 125: 281-292
- [167] Yao Y. X., Li M., Liu Z., Hao Y. J., Zhai H. (2007). A novel gene, screened by cDNA-AFLP approach, contributes to lowering the acidity of fruit in apple. Plant Physiol. Biochem. 45: 139-45
- [168] Polesani M., Desario F., Ferrarini A., Zamboni A., Pezzotti M., Kortekamp A., Polverari A. (2008). cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. BMC Genomics 2008, 9: 142
- [169] Liang P., Pardee A. B. (1992): Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257: 967-971