

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
Dipartimento di Scienze dell'Ambiente Forestale e delle sue Risorse



CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale, Porano (TR)

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
ECOLOGIA FORESTALE: XXI CICLO

BIODIVERSITA' GENETICA NELLE SPECIE *JUGLANS REGIA* L., *JUGLANS NIGRA* L., E NEI RELATIVI IBRIDI INTERSPECIFICI.

S.S.D. AGR 07

Coordinatore: Prof. Paolo De Angelis

Tutor: Prof. Giuseppe Scarascia Mugnozza

Dr.ssa Maria Emilia Malvolti

Dottorando: Paola Pollegioni

Ai miei genitori ed a nonna Maria

Ringraziamenti - Acknowledgments

- ❖ Ringrazio tutte le persone che mi hanno aiutato nella stesura di questo lavoro, primo fra tutti la dott.ssa **Maria Emilia Malvolti** (CNR-IBAF di Porano, TR) per avermi seguito e guidato pazientemente in tutte le fasi del lavoro, per avermi incoraggiato ad intraprendere nuove linee di ricerca anche con soggiorni all'estero e per aver sempre creduto in me. Ringrazio anche il **Prof. Giuseppe Scarascia Mugnozza**, (direttore dell'Istituto CNR-IBAF, Porano, TR; DISAFRI Università della Tuscia, Viterbo) per l'incoraggiamento scientifico e per avermi dato la possibilità di svolgere il dottorato in Ecologia Forestale.
- ❖ I would like to thank **Dr. Renè Smulders** (Plant Breeding Department, PRI, Wageningen, The Netherlands) for giving me hospitality to the Plant Breeding PRI Laboratory. A special thank to **Dr. Gerard Van der Linden** (Group leader Abiotic Stress, Plant Breeding Department, PRI, Wageningen, The Netherlands) for his scientific support and for teaching me how to apply the NBS-profiling approach, and to **Dr. Eric Van de Weg** (Plant Breeding Department, PRI, Wageningen, The Netherlands) for statistical discussions. Last but not least I am deeply thankful for their kind friendship.
- ❖ Ringrazio tutti i colleghi del CNR-IBAF di Porano (TR), in particolare: **Claudia Mattioni, Angela Martin, Daniela Turchini e Marcello Cherubini** per l'aiuto fornito al sequenziatore, per i numerosi suggerimenti e le interminabili discussioni sull'analisi dei dati. Un ringraziamento speciale a **Susanna Bartoli, Irene Olimpieri e Giovanni De Simoni** per avermi sostenuto ed aiutato in ogni momento. Un pensiero grande a **Monica Manieri** ed a **Maura Pellegrini** per aver condiviso con me tanti "venerdì pomeriggio". Un grazie particolare al **Dr. Francesco Cannata** per avermi concesso importanti opportunità lavorative.
- ❖ I would like to thank **Prof. Keith Woeste** from U.S.D.A. Forest Service, Hardwood Tree Improvement and Regeneration Center, Department of Forestry and Natural Resources, Purdue University, (USA) and **Hanneke van de Schoot**, and **Dr. Paul Arens** (Plant Breeding Department, PRI, Wageningen, The Netherlands) for exchanging data and information useful for molecular analyses and discussion of results.
- ❖ I would like to thank my new friends met in Wageningen, "my beauty" **Anitha Kumari, Jieling Cai, Hulya Yilmaz, Luis Rodolfo Montes, Paula Hurtado Lopez, Animesh Acharjee** and **Arwa Shahin** for their support, kindness and for all huge dinners together.
- ❖ I would like to thank **Prof. Agnes Major** (Molecular Taxonomy Laboratory, Hungarian Natural History Museum, Budapest, Hungary) to carry me through the first stages of this trip.
- ❖ Ringrazio **Isacco Beritognolo e Muriel Gaudet** per i preziosi consigli forniti in questi tre anni e per la loro amicizia.

- ❖ Ringrazio **Maria Gras**, **Giovanni Mughini** (Istituto CRA-ISPIO; Unità di Ricerca Forestale, Roma) e **Fulvio Ducci** (Coordinatore Progetto RI.SELV.ITALIA) per la collaborazione e la disponibilità dimostrata.
- ❖ Ringrazio i colleghi del dipartimento DISAFRI, Università della Tuscia, Viterbo, in particolare il **Prof. Paolo de Angelis** per l'aiuto amministrativo/burocratico e per la programmazione dei miei numerosi viaggi.
- ❖ Ringrazio profondamente la mia seconda famiglia, **Veruscka**, **Alvisio**, **Iole**, **Marcello**, **Paola**, **Ludovico** ed i miei amici di sempre **Sabrina**, **Maurizio**, **Lorenzo**, **Lucia** e **Maria Elena**, per non avermi mai abbandonato, soprattutto nei momenti difficili.

INDICE

Lista delle Figure.....	1
Lista delle Tabelle.....	3
Lista delle abbreviazioni.....	4
1. Introduzione generale.....	6
1.1 <i>Juglans regia</i> L. (noce comune).....	6
1.2 <i>Juglans nigra</i> L. (noce nero).....	9
1.3 <i>Juglans x intermedia</i> Carr.....	12
1.3.1 Identificazione degli ibridi interspecifici <i>Juglans x intermedia</i> Carr.....	14
1.3.2 Ibrido francese NG23 x RA.....	15
1.4 Principali malattie epigee nel noce.....	17
1.4.1 Batteriosi.....	17
1.4.2 Cancro corticale del fusto.....	18
1.4.3 Antracnosi.....	19
1.5 Meccanismi di difesa delle piante.....	22
1.5.1 Receptor-like R-genes.....	23
1.5.2 Parete cellulare e metabolici secondari.....	27
1.5.3 Specie Reattive dell'Ossigeno (ROA).....	28
1.5.4 Resistenza all'antracnosi (<i>Gnominia leptostyla</i>) in <i>Juglans</i> spp.....	31
1.6 Scopi della tesi.....	35
2. Marcatori SSRs per la caratterizzazione di <i>Juglans nigra</i> (L.), <i>Juglans regia</i> (L.) ed <i>Juglans x intermedia</i> (Carr.): caso studio in Italia.....	37
2.1 Introduzione.....	37
2.2 Materiale e Metodi.....	38
2.2.1 Materiale (Parco di Villa Mezzalira).....	38
2.2.2 Estrazione del DNA genomico.....	40
2.2.3 SSR analisi.....	40
2.2.4 Analisi di sequenza.....	41
2.2.5 Analisi citologica.....	42
2.2.6 Analisi statistica dei frammenti SSR.....	42
2.2.7. Analisi statistica delle sequenze SSR.....	44
2.3 Risultati.....	45
2.3.1 Analisi di fingerprinting.....	45
2.3.2 Confronto delle sequenze SSR.....	48
2.4 Discussione.....	57
3. Selezione a posteriori di piante ibridogene di noce mediante l'analisi di parentela di famiglie half-sib con marcatori SSRs.....	61
3.1 Introduzione.....	61

3.2	Materiale e Metodi.....	63
3.2.1	Materiale (famiglie half-sib).....	63
3.2.2	Estrazione del DNA genomico (famiglie half-sib).....	64
3.2.3	SSR analisi (famiglie half-sib).....	65
3.2.4	Analisi dei dati (famiglie half-sib).....	65
3.2.5	Analisi di parentela.....	68
3.2.6	Pattern d'impollinazione.....	71
3.3	Risultati.....	71
3.3.1	Analisi di DNA fingerprinting.....	71
3.3.2	Analisi di parentela.....	75
3.4	Discussione.....	79
4.	NBS-profiling approach per l'identificazione di genotipi resistenti all'antracnosi (<i>Gnomonia leptostyla</i> (Fr) Ces.) in <i>Juglans</i> spp: analisi preliminare	
4.1	Introduzione.....	84
4.2	Materiale e Metodi.....	87
4.2.1	Materiale (genotipi azienda Ovile).....	87
4.2.2	Estrazione del DNA genomico (genotipi azienda Ovile).....	91
4.2.3	SSR analisi (genotipi azienda Ovile).....	91
4.2.4	Protocollo NBS-profiling (Plant Research International, Wageningen)...	91
4.2.4.1	Digestione e ligasi.....	91
4.2.4.2	Pre-amplificazione.....	93
4.2.4.3	Amplificazione e marcatura.....	94
4.2.5	Analisi dei dati.....	94
4.3	Risultati.....	96
4.3.1	DNA fingerprinting con marcatori neutrali SSR.....	96
4.3.2	Fenologia fogliare in <i>J. nigra</i> JN, <i>J. regia</i> RA.....	100
4.3.3	DNA fingerprinting con marcatori funzionali NBS.....	100
4.4	Discussione.....	108
	References.....	113
	Abstract.....	130

Lista delle Figure

Figura 1: Area d'indigenato e di attuale diffusione della specie <i>J. regia</i>	6
Figura 2: Morfologia della specie <i>Juglans regia</i> . [online: web].....	8
Figura 3: Area d'indigenato della specie <i>J. nigra</i> in Nord America, modificato da Fowell (1965).....	9
Figura 4: Piantagione di 31 anni di noce nero. [online: web].....	11
Figura 5: Morfologia della specie <i>Juglans nigra</i> [online: web].....	11
Figura 6: Morfologia fogliare in <i>Juglans</i> spp., modificato da Ducci & Malvolti (2006).....	14
Figura 7: Rappresentazione schematica delle gemme in prossimità del colletto in <i>Juglans</i> spp., da Jay-Allemand et al., (1990).....	15
Figura 8: Ibridi francesi NG23 X RA di circa 20 anni. [online: web].....	16
Figura 9: Macchie necrotiche da <i>Gnomonia leptostyla</i> in tre differenti porzioni epigee della pianta di noce comune, modificato da Belisario et al., (1992).....	19
Figura 10: Stadio assessuale del fungo <i>Gnomonia leptostyla</i> nel noce nero. [online: web]..	20
Figura 11: Siti di legame dei motivi P-loop e Kinase-3 alla molecola ATP.....	24
Figura 12: Sintesi di alcuni metabolici secondari partendo dall'acido scichimico, da Bennett & Wallsgrove, (1994).....	27
Figura 13: Eventi che caratterizzano la HR durante l'interazione avrRpm1/RPM1 tra il patogeno <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> ed <i>Arabidopsis thaliana</i> , modificato da Grant et al., (2000).....	30
Figura 14: Struttura di otto 1,4-naftochinoni presenti in <i>Juglans</i> spp., da Binder et al., (1989).....	31
Figura 15: Sintesi di juglone ed HJG in <i>Juglans</i> spp, modificato da Muller & Leistner (1978) ed Duroux et al., (1998).....	32
Figura 16: Descrizione dei marcatori microsatellitari (SSRs), modificato da Gaudet (2006).....	37
Figura 17: Mappa del Parco di Villa Mezzalira, Bressanvido, Vicenza.....	39
Figura 18: PcoordA dei genotipi collezionati nel Parco di Villa Mezzalira mediante SSRs.....	45
Figura 19: Immagine dei 48 cromosomi (3n) nella pianta ibrida triploide N21.....	47
Figura 20: Allineamento delle sequenze <i>J. nigra</i> e <i>J.regia</i> specifiche nel locus WGA331.....	54
Figura 21: Allineamento delle sequenze <i>J. nigra</i> e <i>J.regia</i> specifiche nel locus WGA24...	55

Figura 22: Mappa di 60 alberi di noce presenti nel parco Villa Mezzalira.....	63
Figura 23: Mixer Mill 300 (QIAGEN) per l'omogenizzazione di tessuto vegetale. [online web].....	64
Figura 24: Possibili risultati dell'analisi di paternità, da Leonardi, (2005).....	68
Figura 25: Un esempio di Likelihood ratio nell'analisi di parentela, da Marshall et al., (1998).....	69
Figura 26: Un esempio delle due distribuzioni della statistica Δ , Most-likely fathers e Most-likely nonfathers dell'analisi di parentela, da Marshall et al., (1998).....	70
Figura 27: PcoordA di 600 genotipi collezionati nel Parco di Villa Mezzalira, comprendenti otto famiglie half-sib, mediante SSRs.....	72
Figura 28: Successo riproduttivo dei padri <i>J. regia</i> per la produzione di progenie ibrida....	79
Figura 29: Distribuzione geografica dei donatori di polline per la produzione di ibridi.....	80
Figura 30: I quattro step principali del Motif-directed profiling approach, da Van Tienderen et al. (2002).....	86
Figura 31: Impianto Sperimentale di noce, Azienda Ovine, Località Casalotti, Roma.....	88
Figura 32: Adattatore e il corrispondente primer utilizzato nell'NBS-profiling approach...	92
Figura 33: Rappresentazione schematica di tre motivi altamente conservati (P-loop, Kinase2 e GLPL) presenti nel dominio NBS.....	94
Figura 34: Otto stadi di sviluppo della foglia in <i>J. regia</i> utilizzati per studi fenologici.....	97
Figura 35: Distribuzione spaziale di 729 profili microsatellitari totali basata sui valori di Log-Likelihood calcolati mediante test d'assegnazione di Paetkau et al., (1995).....	98
Figura 36: Cluster analisi di 132 genotipi (Azienda Ovine) mediante SSRs.....	101
Figura 37: PcoordA di 63 piante di noce comune (Azienda Ovine) mediante SSRs.....	102
Figura 38: PcoordA di 69 piante di noce nero (Azienda Ovine) mediante SSRs.....	102
Figura 39: Fenologia fogliare in 132 genotipi di noce (Azienda Ovine).....	103
Figura 40: Cluster analisi di 132 genotipi (Azienda Ovine) mediante marcatori NBS.....	105
Figura 41: PcoordA di 63 piante di noce comune (Azienda Ovine) mediante marcatori NBS.....	106
Figura 42: PcoordA di 69 piante di noce nero (Azienda Ovine) mediante marcatori NBS...	106
Figura 43: Visualizzazione del frammento RsaI-NBS1 di 110bp potenzialmente correlato alla suscettibilità/resistenza all'antracnosi del noce.....	107

Lista delle Tabelle

Tabella 1: Motivi altamente conservati nel dominio NBS, da Mayers et al., (1999).....	27
Tabella 2: Lista dei dieci microsatelliti nucleari sviluppati nella specie <i>J. nigra</i>	41
Tabella 3: Misure di differenziazione genetica nei genotipi collezionati nel Parco di Villa Mezzalira.....	46
Tabella 4: Lista degli alleli SSR <i>J. nigra</i> – specifici, <i>J. regia</i> – specifici e comuni.....	49
Tabella 5: Misure di variabilità genetica mediante marcatori SSRs in noce nero, noce comune e ibridi interspecifici.....	50
Tabella 6: Analisi dettagliata di fingerprinting di sette ibridi diploidi mediante SSRs.....	51
Tabella 7: Tabella riassuntiva dell'analisi di sequenza di 10 loci SSR in <i>Juglans</i> spp.....	53
Tabella 8: Lista delle similarità nucleotidiche tra le regioni fiancheggianti i microsatelliti ed il genoma del <i>Populus trichocarpa</i>	56
Tabella 9: Risultati dell'analisi d'assegnazione delle otto famiglie half-sib per l'identificazione di ibridi <i>J. x intermedia</i>	73
Tabella 10: Parametri di variabilità genetica mediante marcatori SSRs in noce nero, noce comune e ibridi interspecifici (600 genotipi).....	74
Tabella 11: Analisi di maternità e di DNA fingerprinting sulle otto famiglie half-sib.....	75
Tabella 12: Profilo SSR per 17 genotipi – figli della progenie N17 (pianta triploide ibrida).....	77
Tabella 13: Risultati dell'analisi di paternità su 198 ibridi diploidi.....	78
Tabella 14: Lista delle 68 piante di noce nero (Azienda Ovile) resistenti all'antracnosi, da Anselmi et al., (2007).....	89
Tabella 15: Lista delle 64 piante di noce (Azienda Ovile) suscettibili all'antracnosi, da Anselmi et al., (2007).....	90
Tabella 16: Miscela di reazione per la digestione/ligasi nell'NBS-profiling approach.....	92
Tabella 17: Test di assegnazione per il confronto dei 132 genotipi dell'Impianto Azienda Ovile con i 597 genotipi diploidi del Parco di Villa Mezzalira.....	97
Tabella 18: Misure della differenziazione genetica tra sei distinti gruppi in <i>Juglans</i> spp....	99
Tabella 19: Lista degli alleli SSR amplificati nei 729 genotipi totali.....	99
Tabella 20: Descrizione dei 320 marcatori funzionali NBS amplificati nei 132 campioni di noce resistenti/suscettibili all'antracnosi (Azienda Ovile).....	104
Tabella 21: Analisi mediante Contingency Chi-square Genetic Heterogeneity Test dei frammenti NBS amplificati.....	107

Lista delle abbreviazioni

A	Adenine
AMOVA	Analisi della Varianza Molecolare
ATP	Adeninatrifosfato
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BGD	Binary Genetic Distance coefficient
bp	base pair
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Citosina
Ca ²⁺	Ione calcio
CaM chinasi	Ca ²⁺ - chinasi calmodulina-dipendenti
CAT	Catalasi
CC	Coiled-Coil
D	Acido Aspartico
DNA	Acido deossiribonucleico
dNTP	Deossinucleotidi
EP	Esclusion probability
ESTs	Expressed Sequence Tags
FFAS	Function and Fold Assignment System
G	Glicina
G	Guanina
GD	Genotypic Distance coefficient
GTP	Guaninatrifosfato
H ⁺	Ione idrogeno
H ₂ O ₂	Perossido d'idrogeno
HCl	Acido cloridrico
H _E	Eterozigosità attesa
HJG	Idrojuglone β-D-glicopiranoside
H _O	Eterozigosità osservata
HR	Risposta d'Ipersensibilità
IAM	Infinite Alleles Mutation Model
ITS	Internal Transcribed Spacers
KCl	Cloruro di potassio
L	Leucina
L _{home}	Likelihood-home
L _{max}	Likelihood-max
LOD	log _e -likelihood ratio
LZ	Leucine Zipper
MAS	Marker-Assisted Selection
MFLP	Microsatellite-anchored fragment length polymorphisms
Mg ²⁺	Ione magnesio
MgCl ₂	Cloruro di Magnesio
mL	Microlitro
mM	milliMolare
N _a	Numero di alleli per locus
NAPDH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NB-ARC	Nucleotide Binding in APAF-1, R gene products and CED-4
NBS-LRR	Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat
N _e	Numero effettivo di alleli

ng	nanogrammi
$O_2^{\bullet -}$	Superossido
P	Prolina
PcoorA	Analisi delle Coordinate Principali
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Probability of identity
PMX/WPA	Polymix breeding with parental analysis
PRs	Pathogenesis-Related proteins
R	Resistant
RAGs	Resistant Analogs
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
ROS	Specie Reattive dell'Ossigeno
SAR	Resistenza Sistemica Acquisita
sfn	Superficie Fogliare Necrosata
SM	Simple Match
SMM	Stepwise Mutation Model
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SOD	Superossido Dismutasi
SSRs	Simple Sequence Repeats
S_{xy}	Band-sharing Similarity coefficient
T	Timina
TIR	Toll-Interleukin-1 Receptor
UTR	Untranslated regions
W	Triptofano
Δ	Statistica Delta
μg	Microgrammi
μl	microlitro
μM	microMolare
χ^2	Chi Quadro
$^{\circ}C$	Gradi centigradi
2n	Diploide
3n	Triploide

1. Introduzione generale

Negli ultimi venti anni le latifoglie di pregio come *Fraxinus excelsior*, *Acer pseudoplatanus*, *Prunus avium*, *Betula pendula*, *Betula pubescens*, *Juglans regia*, *Juglans nigra* ed *Juglans x intermedia* (Carr.) hanno assunto un'importanza crescente nei programmi di gestione forestale in Europa. In passato la deforestazione operata dall'uomo, l'azione di stress biotici ed abiotici e la successiva forestazione effettuata con conifere, come l'abete norvegese o il pino scozzese, hanno ridotto la loro area di distribuzione. L'intensa richiesta di legname in Europa per scopi energetici e/o industriali (es. combustibili, industria cartaria, produzione di pannelli,) ha inoltre favorito nel tempo la coltivazione di specie a rapida crescita come *Populus*, *Eucaliptus* e *Salix*. Le crescenti necessità ecologiche ed economiche (rapporto legno qualità /prezzo, colture sostenibili) hanno tuttavia risvegliato l'interesse per le suddette latifoglie di pregio e spinto ad incrementare le conoscenze tecniche/scientifiche in alcune specie come il ciliegio ed il noce. Per una corretta gestione forestale delle specie arboree d'interesse è necessario perciò individuare le risorse genetiche esistenti e delineare le modalità di utilizzo del germoplasma al fine di produrre legno di elevata qualità, riducendo i tempi di coltivazione e il rischio di malattie (Action E42 VALBRO, 2008).

1. 1. *Juglans regia* L. (noce comune)

Juglans regia L. (noce comune) è una specie a molteplici attitudini, di notevole importanza dal punto di vista economico, sia per la produzione di legno pregiato e di frutti apprezzati in tutto il mondo, sia per prodotti di nicchia (es. coloranti naturali).

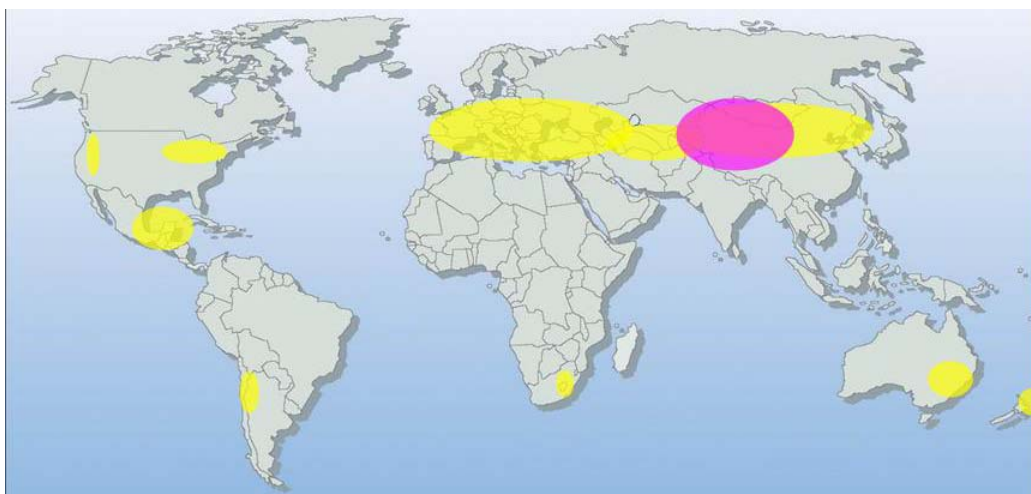


Figura 1. Area d'indigenato ■ e di attuale diffusione ■ della specie *Juglans regia*

Come altre specie arboree *J. regia*, nativa della Cina (Xinjiang, Tien Shan) e/o del massiccio dell' Himalaya (fig. 1), si è diffusa con il passare del tempo in Europa probabilmente attraverso l'India, la Persia, il Caucaso, la Grecia e l'Italia (Huntley & Birks 1983). Relitti di polline fossile, per lo più coincidenti con insediamenti Greci e Romani, testimoniano l'antica coltivazione del noce in Italia (Being, 1975). Introdotta in America solo dopo il XVII secolo, la coltivazione del noce comune ha avuto una notevole espansione soprattutto in California, principalmente per la produzione di frutta secca (Forte, 1993).

Attualmente il noce è coltivato in Europa, fino al Sud dell'Inghilterra, in U.S.A., nell'America del Sud (Cile, Messico, Antille), fino in Australia ed in Giappone. Il suo habitat è quello delle zone temperate che, secondo la classificazione usata in Italia, va dalla zona climatico - forestale del *Lauretum*, sino alla zona del *Castanetum*; predilige ambienti con temperature medie annue tra i 10°C ed i 17°C e precipitazioni annue superiori ai 700 mm (Forte, 1993). Pur trovando la possibilità di sopravvivere a condizione pedoclimatiche molto differenti, *J. regia* preferisce la media collina con terreni sufficientemente ricchi di calcio, profondi, permeabili, freschi con un pH fra 6 e 7.5; teme sia l'aridità che i ristagni d'acqua (Mapelli et al., 1997). Sono esclusi perciò suoli argillosi, mal strutturati, compatti, non drenanti ed i suoli sabbiosi caratterizzati da un drenaggio troppo rapido ed uno scarso contenuto di elementi nutritivi. Il noce comune infatti è particolarmente esigente soprattutto in azoto se utilizzato per la produzione di frutti (Bassi & Pellegrino, 1991).

J. regia è una specie assai longeva, può raggiungere i 25-30 metri di altezza e diametri di circa 1-1.5 metro. L'albero è vigoroso, dal tronco dritto, solido sormontato da una chioma generalmente globosa. La corteccia del fusto è liscia e di colore rossastro – scuro in piante giovani (2-3 anni) mentre assume il tipico colore grigio-argenteo con profonde screpolature nel senso dell'altezza in piante di età superiore ai 15 anni. Ha legno compatto, omogeneo, relativamente facile da lavorare con un colore variabile dal bruno al biondo chiaro. L'apparato radicale è fittonante, cioè con un asse principale da cui si dipartono delle radici secondarie. Il portamento dell'albero, nel complesso, è imponente, tuttavia la sua rapidità di crescita, la forma del fusto e la qualità del legno dipendono molto dalle condizioni ambientali e dal tipo di terreno in cui si trova la pianta (Fady et al., 2003).

Le foglie sono caduche, con margine intero, di color verde chiaro ed aromatiche, alterne, imparipennate, lunghe sino a 35 cm, composte da 5-9 foglioline di forma ellittica con una fogliolina più grande in posizione apicale. (fig. 2). Il noce è una pianta monoica, diclina ed eterodicogamica (Luza & Polito, 1988a). I fiori maschili sono riuniti in amenti penduli lunghi 10-15 cm, compaiono lateralmente sui rami dell'anno precedente; hanno numerosi stami a

filamento breve con grosse antere che maturano frequentemente prima (proterandria) o raramente dopo (proteroginia) la comparsa dei fiori femminili. Questi ultimi, solitari o riuniti in gruppi di 2- 3, appaiono invece sui nuovi germogli dell'anno, sono formati dall'ovario e da



uno stigma bilobato sessile. La fioritura avviene nei mesi di aprile-maggio e l'impollinazione è esclusivamente anemofila. Il polline di noce viene trasportato con estrema facilità anche da correnti di aria dalla velocità assai limitata; con una velocità di appena 0.5 m/s non si sono rilevate differenze significative nella densità della nube pollinica fino ad una distanza di 160 metri (Impiumi & Ramina, 1967).

Figura 2. Morfologia della specie *Juglans regia*. Da *Darstellung und Beschreibung sämtlicher in der Pharmacopoea Borusica aufgeführten officinellen Gewächse* by Otto Carl Berg & Carl Friedrich Schmidt.

I ricorrenti fenomeni di eterodicogamia favoriscono la riproduzione per outcrossing, ostacolando l'auto-fecondazione, processo in linea teorica possibile. Il frutto prodotto è una drupa, sub-globosa, con esocarpo carnoso chiamato mallo, di colore verde, fibroso, ricco di tannini, che si fende longitudinalmente alla maturazione liberando l'endocarpo legnoso. Il seme (gheriglio), protetto dal guscio, è costituito principalmente da due cotiledoni divisi in quattro lobi da setti legnosi (fig. 2). Il gheriglio, ricoperto da una leggera pellicola rosso-bruna, è ricco di lipidi (60% del peso secco), polisaccaridi e proteine (Vergano et al., 1995). Negli ultimi decenni alcuni studi hanno rimarcato l'importanza del frutto del noce dal punto di vista salutistico (Zwarts et al., 1999) e in particolare l'effetto positivo sulla salute umana degli acidi grassi poliinsaturi essenziali in esso presenti: acido linoleico ed acido linolenico (Feldeman, 2002).

In Italia *J. regia* è coltivata in tutta la Penisola, ad altitudini che vanno dal livello del mare fino a raggiungere quote superiori a 1000 metri a Sud (Pollegioni et al., 2006) ed 800 metri a Nord. La regione tradizionalmente più legata alla nocicoltura è la regione Campania, con il 59.6% della produzione nazionale seguita a lunga distanza dal Piemonte, Veneto, Lazio, Toscana, Calabria, Sicilia e Basilicata (Di Vaio & Minotta, 2005). Le piantagioni, prevalentemente impostate per la duplice attitudine (frutto e legno), sono spesso costituite da gruppi di piante posti ai margini di campi destinati ad altre colture arboree ed erbacee oppure disposti in doppi filari ai confini di fondi rustici. Sono molto diffusi anche impianti

consociati di due o tre specie arboree, tra le quali il noce è la specie principale. Nel decennio 1984-1993 (dati Istat) si registrava una diminuzione del 70.6% della superficie coltivata a noce (Di Vaio & Minotta, 2005). Ciò era imputabile da un lato alla mancanza di adeguati programmi di miglioramento genetico del germoplasma italiano, ed alla competitività sul mercato di varietà più produttive importate da paesi stranieri (in particolare USA e Cina), dall'altro alla richiesta sempre crescente di legno di noce da parte dell'industria e dell'artigianato del mobile. Tuttavia solo nella regione Campania con l'applicazione del Regolamento CEE 2080/92, che assegnava aiuti all'imboschimento dei terreni agricoli, sono stati realizzati, dal 1994 al 2000, circa 1820 ettari di rimboschimento di latifoglie, verosimilmente con prevalenza di impianti di noce comune (MiPAF, Direzione Generale delle risorse forestali montane ed idriche, Div. III).

1. 2. *Juglans nigra* L. (noce nero)

J. nigra è una specie originaria dell'America settentrionale dove occupa attualmente un vasto areale che si estende a tutti gli Stati centro-orientali, dalla Florida alla zona dei Grandi Laghi, tra il lago Huron ed l'Ontario (fig. 3). All'interno di questo vasto areale sono state individuate tre differenti regioni d'origine, indicate con tre distinti colori nella figura 3: il nord-ovest (Iowa, Minnesota, Wisconsin, Kansas, Michigan), il centro (Ohio, Indiana, Illinois, Missouri, Kentucky, West Virginia, Virginia) ed il sud (Alabama, Georgia, Tennessee, North Carolina, South Carolina, Texas, Oklahoma, Arkansas, Mississippi).

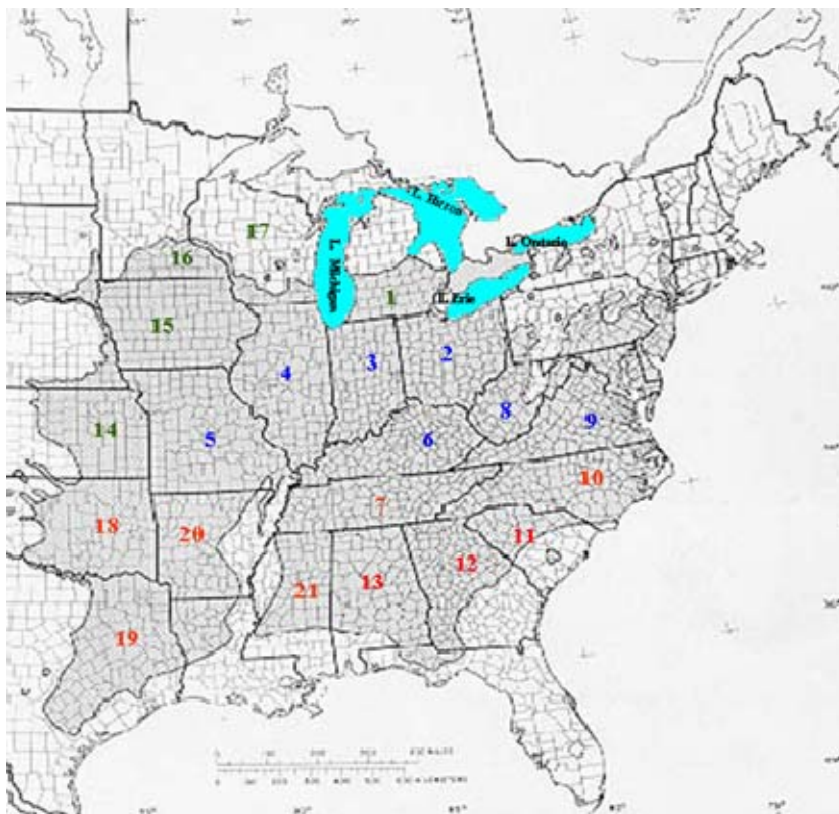


Figura 3 Fowell, 1965.

Il range naturale della specie *Juglans nigra* L. nel Nord America. Sono state individuate tre differenti aree d'indigenato indicate con tre distinti colori: ■ **Nord ovest** 1-Michigan, 14-Kansas, 15-Iowa, 16-Minnesota, 17-Wisconsin. ■ **Centro** 2-Ohio, 3-Indiana, 4-Illinois, 5-Missouri, 6-Kentucky, 8-West Virginia, 9-Virginia, ■ **Sud** 7-Tennessee 10-North Carolina, 11-South Carolina, 12-Georgia, 13-Alabama, 18-Oklahoma, 19-Texas, 20-Arkansas, 21-Mississippi.

In particolare nello Stato del Kansas, dove trova condizioni ottimali di vegetazione, il noce nero è talmente abbondante da occupare più del 50% della sua area basale. (Grey et al., 1971). Lo si ritrova spontaneo nei boschi, spesso in piccoli gruppi di piante oppure come singoli individui ma anche coltivato in impianti puri o consociato con alberi da legno di altre specie (Funk, 1970).

La specie *J. nigra* ha percorso un cammino geograficamente opposto al noce comune; nei primi decenni del 1600 è stata infatti importata in Europa dall'areale primario nord orientale americano, inizialmente a scopo ornamentale, successivamente per l'eccellente qualità del legno e la sua rusticità (Merendi, 1956). Attualmente il noce nero è coltivato in Inghilterra, i paesi centro Europei sino ai Balcani, nella Russia caucasica ed in Asia centro-orientale.

Considerata la vastità e la diversità del suo areale d'origine, *J. nigra* è caratterizzata da una buona plasticità ecologica che gli consente di vegetare rigogliosamente in una fascia climatica ampia che va, secondo la nomenclatura italiana, dal *Lauretum* alla sottozona calda del *Fagetum*, sebbene il suo optimum vegetativo sia la zona del *Castanetum*. Si è infatti adattata a stagioni vegetative corte a nord (140 giorni) e lunghe a sud (280 giorni in Florida), tollera bene variazioni di precipitazioni e di temperature, da un minimo di 640 mm a nord del Nebraska ad un massimo di oltre 1780 mm nei monti Appalachi del Tennessee e del Nord Carolina, e da 7°C al nord a 19°C al sud (Williams, 2008). Tuttavia predilige climi temperato-umidi di tipo continentale, con inverni freddi, estate caldi, abbondanti piogge in primavera e moderate in autunno (temperatura media annua 13°C; precipitazioni medie annue 890 mm). Il noce nero cresce bene in terreni profondi, ricchi di sostanza organica, ben drenati e con un pH non superiore a 7,5, in collina o nei fondovalle. Sono favoriti i terreni di medio impasto che consentono di trattenere un'elevata quantità di acqua utilizzabile poi durante i periodi di siccità nella stagione di crescita. Il noce nero infatti risulta molto più resistente all'asfissia radicale rispetto al noce comune, ma è soggetto a stress per carenza idrica soprattutto in suoli superficiali o troppo drenanti, ove si registrano accrescimenti mediocri (Mapelli et al., 1997).

J. nigra è una specie longeva (in condizioni naturali può vivere oltre i 250 anni), a rapida crescita rispetto al noce comune, può superare i 40 metri d'altezza ed 1-2 metri di diametro. La corteccia nerastra è inizialmente sottile e reticolata, successivamente si ispessisce e si fessura. Il tronco, cilindrico e dritto, presenta una forte dominanza apicale e rami sottili (fig. 4). Sebbene il legno sia considerato in Europa di minor pregio rispetto al noce comune, principalmente per la marcata differenza di colore tra il duramen rosso-bruno e l'alburno, è tuttavia molto apprezzato in quanto pesante, omogeneo, tenace e resistente allo spacco. Per

tali motivi viene tradizionalmente impiegato nell'industria del mobile ma anche nella produzione dei più svariati oggetti tra cui l'impugnatura per armi da fuoco.

L'apparato radicale è fittonante, profondo e ben sviluppato già nei primi anni di vita della pianta. Ad esempio piante di 9 anni rimosse da alcune piantagioni nello Stato dell'Indiana



presentavano in media un asse radicale principale di 2,3 metri di profondità e radici laterali di più di 2,4 metri (Burke & Williams, 1973). Ovviamente la forma e le dimensioni dell'apparato radicale dipendono molto dalla tessitura e dal livello di umidità del suolo (Williams, 1972).

Figura 4. Piantagione di 31 anni di noce nero (Eastern US Hardwoods, Douglass Jacobs).

Le foglie sono caduche, alterne, lunghe da 30 a 60 cm, composte da 15-23 foglioline lanceolate, con bordo seghettato, di colore verde scuro, odorose ma non aromatiche; la fogliolina terminale è spesso assente oppure di piccole dimensioni (fig. 5). Come *J. regia* anche *J. nigra* è una specie monoica, diclina ed eterodicogama. I fiori maschili, simili a



quelli del noce comune, sono numerosi e riuniti in amenti penduli, singoli o abbinati sui rami dell'anno precedente mentre i fiori femminili sono riuniti in gruppi da 2 a 5 e si sviluppano dalle nuove gemme miste apicali dell'anno. La fioritura avviene nei mesi di maggio-giugno e l'impollinazione è anemofila. Anche il noce nero è soggetto ad eterodicogamia (Funk, 1970). La presenza di fiori dicogamici rende altamente improbabile l'auto-fecondazione pur essendo un evento possibile.

Figura 5. Morfologia della specie *Juglans nigra*.

Da <http://digi.azz.cz/showpage.php?BookID=1&PageID=191&lng=1>

La fecondazione ha luogo dopo 2-5 giorni dopo l'impollinazione e porta alla formazione di una drupa globosa con un epicarpo (mallo) spesso almeno 10 mm e non facilmente separabile dall'endocarpo legnoso (fig. 5). La noce è piriforme, con il guscio nero, solcato da profonde e numerose creste rugose, molto duro che protegge un gheriglio, strettamente

concamerato, commestibile e ricco di grassi. La rimozione del gheriglio dal guscio è così difficile e costoso da favorire la coltivazione e la diffusione dei frutti appartenenti alla specie *J. regia*. Tuttavia ogni anno negli Stati Uniti vengono utilizzate circa 1000 tonnellate di noci appartenenti alla specie *J. nigra* per la produzione di dolci e gelati (Reid et al, 2004). Infine, a differenza del noce comune, nel noce nero non sono stati mai registrati casi di partenocarpia (Funk, 1970). La propagazione naturale si attua per seme; normalmente il freddo invernale è sufficiente a interrompere la dormienza del seme e consentire la germinazione delle piantine già nel primo anno di semina in aprile-maggio.

Nell'ultimo secolo in America sono state identificate e nominate più di 400 cultivars di noce nero; di queste circa venti sono state classificate per origine geografica e valutate per la produttività in frutti da Funk (1979). La fenologia florale, il tasso di produttività e di crescita, la resistenza a stress abiotici e biotici variano ampiamente all'interno della specie *J. nigra*. Sicuramente, il noce nero si è sempre dimostrato più resistente ad alcuni patogeni (vedi paragrafo 1.4). L'allestimento di un network di campi sperimentali in Europa (FAIR-CT96-1887 "W-BRAINS:Walnut, production of high qualità timber in Europe; up-to-date tools for tree adaptation, wood standards and managemen" 1997-2000t) ha permesso di valutare e comparare le performances (es. accrescimento, vitalità, forma fusto, dominanza apicale) di *J. regia* ed *J. nigra* in differenti condizioni ambientali (Fady et al., 2003). Dalle osservazioni condotte in tali campi sperimentali è emersa una correlazione statisticamente significativa tra la forma del fusto e la ripresa vegetativa in *J. nigra*. Inoltre è stato osservato che la ripresa vegetativa tardiva e la conseguente resistenza alle gelate primaverili influiscono positivamente sull'architettura della pianta (forte dominanza apicale).

In Europa la specie è ormai considerata naturalizzata e si rinnova abbondantemente per disseminazione spontanea. In Italia trova le sue condizioni ottimali di crescita soprattutto al Nord sia in collina o ad altitudini non superiori a 600 metri. Frequente nei giardini e nei parchi pubblici e privati della pianura Padana, è stata utilizzata principalmente nei programmi di conversione dei cedui degradati e di forestazione dei terreni ex – agricoli (Fenaroli & Gambi, 1976).

1. 3. *Juglans x intermedia* Carr.

Sebbene l'analisi filogenetica, basata sui marcatori nucleari RFLP e le sequenze *matK* ed ITS, abbia dimostrato che il noce nero ed il noce comune appartengano a due differenti sezioni del genere *Juglans*, rispettivamente *Rhysocaryon* e *Dioscaryon* (Stanford et al., 2000), in condizioni favorevoli possono dare origine ad ibridi interspecifici (*Juglans* x

intermedia Carr. o *J. nigra* x *J. regia*). Nell'ibrido *J. nigra* x *J. regia* Garavel (1972) ha riconosciuto il prototipo del “noce da legno” per le sue numerose caratteristiche. Tali ibridi sono spesso superiori per eterosi, con caratteristiche fenotipiche ed adattative intermedie tra le due specie parentali (vedi paragrafo 1.3.2).. Tuttavia la maggior parte degli ibridi *J. x intermedia* Carr. di prima generazione pur presentando un'abbondante fioritura, risultano spesso scarsamente fecondi. I pochi semi prodotti stentano a germinare, con una percentuale d'insuccesso del 73%. I processi meiotici sono altamente irregolari, soprattutto durante la formazione del granulo pollinico (Funk et al., 1970).

Inoltre l'ibridazione tra *J. nigra* ed *J. regia* non è un processo frequente in natura. La percentuale di seme ibrido in una popolazione mista è normalmente inferiore al 10%. Tale insuccesso è imputabile a mortalità prezigotica (36%) ed a una mortalità durante la prima fase di sviluppo dello zigote (56%) (Giannini & Mercurio, 1997). Tra i meccanismi prezigotici si annoverano sia lo slittamento temporale della fioritura tra le due specie parentali, sia la mancata fecondazione della cellula uovo da parte del tubo pollinico per apparenti meccanismi d'incompatibilità (Sartorius, 1990). Generalmente i fiori maschili e femminili raggiungono la completa maturazione in Aprile nella specie *J. regia* ed a Maggio per *J. nigra*, con una differenza di circa tre settimane. Esiste infatti una correlazione lineare positiva tra la data di fioritura e la temperatura ottimale di germinazione del polline, che differisce nelle due specie: 28°C in *J. regia* e 32°C in *J. nigra* (Luza et al., 1987). La produzione di ibridi naturali *J. x intermedia* Carr. pertanto richiede sia la presenza di una pianta “madre” precoce *J. nigra* ed una pianta “padre” tardiva *J. regia* in modo che vi sia sovrapposizione della fioritura, sia compatibilità genetica. In particolare i noci che presentano una specifica attitudine ad ibridarsi vengono comunemente indicate come “piante ibridogene”.

Ovviamente l'identificazione e la selezione di piante parentali ibridogene costituisce il primo passo per la produzione di una discendenza ibrida. Tuttavia, pur disponendo di piante ibridogene, risulta ancora particolarmente difficile effettuare incroci controllati (Funk et al., 1970). La rapida perdita di vitalità dei granuli pollinici di *J. regia* e l'abscissione dei fiori femminili in *J. nigra* sono i fattori che maggiormente ostacolano tale processo.

Il polline di noce comune è particolarmente sensibile alle variazioni di temperatura ed umidità; conservato a temperatura ambiente, perde la capacità di germinare dopo appena due giorni a causa della disidratazione (Luza & Polito, 1985). Inoltre il polline mostra una vitalità ed un vigore (elongazione del tubo pollinico) decrescente anche se conservato a -20°C con un valore ottimale di umidità relativa del 30%. Anche i tentativi di crio-conservazione del

polline in azoto liquido non sono stati pienamente soddisfacenti. Il polline di noce comune può essere conservato a -196°C e sopravvivere solo se il suo contenuto di acqua è di circa il 7.6%; un eccesso di acqua libera nei tessuti può portare alla morte cellulare per formazione di cristalli di ghiaccio, mentre la disidratazione può indurre l'esplosione dei granuli pollinici (Luza & Polito, 1988b). Studi recenti condotti da Aronne et al., (2003) su due varietà italiane di noce comune (Malizia, Feltrina) suggeriscono di pre – trattare il polline “fresco” ad umidità 100% per 1-2 ore per migliorare la sua germinabilità.

Il secondo fattore limitante è rappresentato dall'abscissione dei fiori femminili del noce nero ad uno stadio assai precoce di sviluppo (3 mm di diametro) per presunto overloading di polline (Catlin et al., 1987); un eccesso di polline depositato manualmente sui pistilli determina il distacco del fiore dalla base del peduncolo impedendo la fecondazione.

Per tali ragioni la produzione massiva di *J. x intermedia* Carr. non è facilmente attuabile oltre che economicamente insostenibile, e molti dei vivai forestali si limitano ad identificare e collezionare ibridi generati spontaneamente in natura.

1. 3. 1. Identificazione degli ibridi interspecifici *Juglans x intermedia* Carr.

In passato sono state utilizzate numerose metodologie per distinguere *J. nigra*, *J. regia* ed i relativi ibridi interspecifici *J. x intermedia* Carr. Tra i marcatori morfologici valutati nel tempo si annoverano la forma del frutto e la forma delle foglie. Il frutto dell'ibrido di noce è liscio e globoso, il mallo è spesso come in *J. nigra* ma dalla forma simile al frutto di *J. regia*. Le foglie invece sono caduche, alterne, composte da 13-15 foglioline, dal margine lievemente seghettato come in *J. nigra* ma di forma ellittica con una fogliolina in posizione apicale come

in *J. regia* (fig. 6).

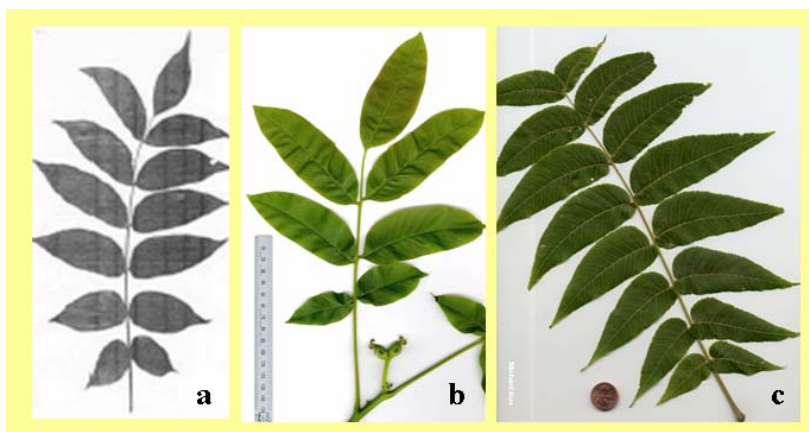
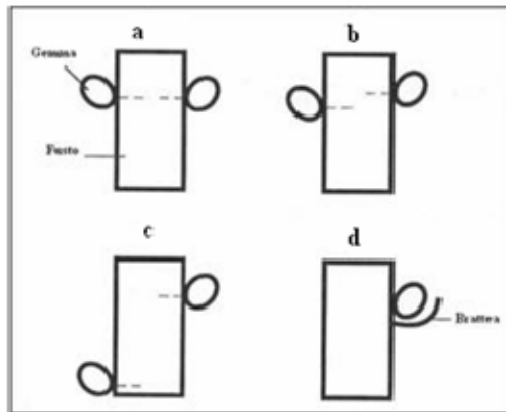


Figura 6. Ducci & Malvolti, 2006

a) *Juglans x intermedia* Carr.: foglie alterne, caduche, composte da 13-15 foglioline, di forma ellittica, dal margine leggermente seghettato, con una fogliolina in posizione apicale. b) *J. regia*: foglie alterne, caduche, lunghe sino a 35 cm, imparipennate, composte da 5-9 foglioline di forma ellittica con una fogliolina

più grande in posizione apicale, con margine intero. c) *J. nigra*: foglie alterne, caduche, lunghe da 30 a 60 cm, composte da 15-23 foglioline lanceolate, con bordo seghettato; la fogliolina terminale è spesso assente oppure di piccole dimensioni.

Nota la pianta madre *J. nigra* (es. NG23 per l'ibrido francese), il criterio morfologico più rapido per l'identificazione precoce di ibridi interspecifici *J. x intermedia* si basa



sull'osservazione della posizione delle gemme in prossimità del colletto su piantine nate da poche settimane (Jay-Allemand et al., 1990; fig. 7).

Fig. 7. Jay-Allemand et al., 1990

Rappresentazione schematica delle gemme e della loro posizione in prossimità del colletto. (a) gemme opposte senza brattee e (b) gemme sub-opposte senza brattee tipiche della specie *J. regia* e dell'ibrido *J. x intermedia* Carr., (c) gemme alterne (d) con brattee tipiche della specie *J. nigra*.

Nei genotipi *J. nigra* puri le gemme sono alternate con brattee ben visibili in prossimità del colletto (fig. 7 c, d) mentre negli ibridi le gemme sono opposte, e/o sub-opposte, e prive di brattee (fig. 7 a, b), come nella specie paterna *J. regia*. Tuttavia tali osservazioni devono essere effettuate nelle prime settimane di vita della pianta; dopo appena 1-2 mesi di crescita le brattee cadono e le gemme vengono mascherate dallo spessore del fusto. Con tale metodo si è stimato un tasso d'errore nell'identificazione degli ibridi di circa il 2-3%.

Successivamente si è preferito utilizzare marcatori molecolari non influenzabili dai fattori ambientali quali isoenzimi (Germain E. et al. 1993; Hussendorfer E. 1999), Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) (Tanzarella. & Simeone, 1996) ed Random Amplified Polymorphic DNA (RAPDs) (Malvolti, et al. 1997). Sebbene gli isoenzimi ed i RFLPs siano marcatori codominanti, non sono mai stati utilizzati "di routine" per l'identificazione degli ibridi poiché i primi sono scarsamente polimorfici mentre i secondi hanno costi assai elevati in termini di tempo e denaro. L'uso di venti differenti RAPD primers ha permesso di distinguere ibridi *J. x intermedia* di prima generazione da backcross ((*J. nigra* x *J. regia*) x *J. regia*) ed ((*J. nigra* x *J. regia*) x *J. nigra*); tuttavia tali marcatori sono dominanti (Malvolti, et al. 1997), tal volta scarsamente ripetibili e non adatti perciò all'analisi di parentela.

1. 3. 2. Ibrido francese NG23 x RA

Negli ultimi venti anni l'Institut National de la Recherche Agronomique; Station de recherches fruitières, villeneuve d'Ornon cedex in Francia si è intensamente impegnato nella produzione e nella vendita di un ibrido *J. x intermedia* noto come NG23 x RA (fig. 8).

La selezione del *NG23 x RA* ha tuttavia richiesto molto tempo e il metodo di produzione, se pur efficiente, non è esente da errori grossolani (Becquey, 1990). Partendo da circa 60 differenti genotipi di *J. nigra* potenzialmente ibridogeni, ne sono stati selezionati 6 (NG5, NG23, NG35, NG38, NG79, NG117, NG190) per la loro capacità di ibridarsi naturalmente con la specie *J. regia*. Il numero di ibridi prodotti variava nel corso degli anni, andando da un minimo di 30% ad un massimo di 90% per le piante più performanti. La pianta NG23 si è rivelata la migliore



pianta madre ibridogena possibile. Grazie ad uno studio di oltre tre anni sulla loro biologia fiorale, sono stati individuati come impollinatori quattro piante *J. regia*: RA984, RA996, RA331, RA295. Sia NG23 che i quattro padri selezionati sono stati propagati per innesto, ed utilizzati per l'allestimento di plot da seme. In tale disegno sperimentale la pianta madre risulta circondata dalle quattro piante padri in modo da permettere la produzione di progenie ibrida *NG23 x RA* per libera impollinazione (Becquey, 1990).

Figura 8. Ibridi *NG23 X RA* di circa 20 anni, Jardin botanique de Montréal.

Dieci anni dopo, l'analisi di paternità effettuata mediante marcatori RFLPs su un subset di 170 ibridi *NG23 x RA* ha rivelato una percentuale d'errore del 7,8 % dovuta ad impollinazione esterna (Tanzarella et al., 1996).

Per incrementare il numero di piante ibride *NG23 x RA* prodotte e soddisfare la richiesta crescente del mercato si è tentata la propagazione vegetativa ma con risultati assai deludenti. La micropropagazione viene fortemente limitata dalla scarsa capacità di acclimatazione delle piante prodotte in vitro (Chenervard et al. 1995) mentre la propagazione per talee si è sempre rivelata impossibile da attuare nonostante i numerosi sforzi effettuati per migliorare il processo di radicazione (Progetto UE "W -Brains" AIR3 -CT92-01429). Solo l'embriogenesi somatica su tessuto immaturo dei cotiledoni ha permesso di replicare l'ibrido *NG23 x RA* ma con una resa molto bassa (Cornu, 1988).

Rispetto alla specie parentale *J. regia*, l'ibrido *NG23 x RA* presenta grande vigore, rapida crescita (soprattutto in terreno di media e bassa fertilità), forte dominanza apicale, rami sottili, ripresa vegetativa tardiva, resistenza alle gelate primaverili (Fady B. et al. 2003) e maggiore resistenza all'asfissia radicale. (Mapelli S. et al 1997). Risulta tollerante alle tre principali malattie epigee del noce, quali batteriosi, antracnosi, e cancro corticale del fusto (Anselmi N., Ri.Selv.Italia Sottoprogetto 1.1). Il legno ottenibile in un tempo relativamente

breve (20-30 anni) è qualitativamente apprezzabile e tecnologicamente simile a quello del noce comune (Progetto UE “W –Brains” AIR3 –CT92-0142). Vegetando bene in un clima continentale, l’ibrido NG23 x RA è ritenuta la pianta ottimale per l’allestimento di piantagioni da legno in Nord Europa.

1. 4. Principali malattie epigee nel noce

Il noce può essere soggetto a stress sia di tipo abiotico che biotico, spesso interdipendenti tra loro. Ad esempio avverse condizioni climatiche (freddo, neve, vento, elevato irraggiamento, ristagno idrico), caratteristiche pedologiche del sito non favorevoli quali compattezza e asfissia del terreno, competitività con specie erbacee e mancanza di elementi nutritivi nel suolo, unite alla formazione di ferite ad opera della fauna o per una non appropriata potatura, possono favorire nel noce l’attacco di patogeni quali funghi e batteri (Mielke et al., 2004).

Attualmente tra le principali malattie che colpiscono la porzione epigea di piante di noce e che incidono di più sulla produttività in piantagioni da frutto e/o da legno spiccano la batteriosi, il cancro corticale del fusto e l’antracnosi.

1. 4. 1. Batteriosi

La batteriosi, comunemente nota come “Mal secco”, è causata dal batterio *Xanthomonas campestris pv Juglandis* (Pierce). Segnalata in Italia già dal 1884 da Savastano nella Penisola Sorrentina (Ercolani et al., 1962), è ormai ampiamente diffusa in tutte le aree di coltivazione. La malattia è in grado di attaccare tutti gli organi verdi della pianta: gemme, foglie, germogli fiori femminili e maschili e frutti. I sintomi nelle foglie sono già ben evidenti al termine della primavera e consistono in macchie dapprima puntiformi, traslucide, verde pallido, poi bruno-nerastre più o meno circondate da un alone clorotico; solo dopo la caduta delle foglie si osservano cancri allungati sugli organi legnosi. Tuttavia il danno più consistente è dovuto principalmente alla riduzione nella produzione dei frutti sia per la cascola precoce sia per l’annerimento di guscio e gheriglio che rendono i frutti invendibili (Belisario et al., 1997a). La perdita dei frutti dovuta alla necrosi può raggiungere fino il 60-80% del prodotto finale (Radix et al., 1998). L’agente eziologico penetra frequentemente nell’ospite attraverso le ferite, gli stomi e gli stigmi del fiore femminile ed invade lo xilema con successiva colonizzazione delle gemme (Anselmi, 2001). L’infezione primaria avviene in primavera sugli amenti e foglie giovani ed è assicurata da polline infetto, vento e dall’acqua, specie se ad azione battente. Le successive infezioni secondarie vengono veicolate invece da essudati batterici che fuoriescono dalle aeree necrotiche. Attualmente,

l'unico strumento per ridurre le perdite ed arginare la malattia è effettuare periodici trattamenti con composti rameici ma, a volte, la presenza di ceppi di *Xanthomonas campestris* pv *Juglandis* resistenti al rame rendono inutili tali trattamenti (Gardal et al., 1993; Radix et al., 1998).

Il test in vitro su piante di appena un anno ha permesso di determinare il tasso reale di suscettibilità/resistenza alla batteriosi in alcune specie del genere *Juglans*: *J. nigra* si può classificare come specie resistente, *J. regia* invece specie suscettibile (Belisario et al., 1997). Gli ibridi interspecifici francesi N23 X RA si dimostrano tolleranti alla batteriosi (Anselmi et al., 2007).

1. 4. 2. Cancro corticale del fusto

Tra le malattie riscontrate nell'ultimo decennio negli impianti di noce comune vi è un particolare tipo di cancro corticale che colpisce rami e fusti anche di grandi dimensioni e che sta assumendo un'importanza crescente in Italia (Saccaridi et al., 1998; Carella et al., 2003). Tale malattia infatti si manifesta anche dopo 10-12 anni dall'allestimento di una piantagione di noce e di fatto annulla il valore economico del legno delle piante colpite. Come descritto da Mazzaglia et al. (2006) e da Loreti et al., (2006), le piante mostrano dapprima delle tacche concave color bruno che evolvono rapidamente in cancri corticali, con fessurazioni della corteccia lunghe fino a 20 cm da cui fuoriescono abbondanti essudati nerastri. I tessuti danneggiati al di sotto della corteccia sono fortemente anneriti e generalmente presentano una precisa linea di demarcazione con i tessuti sani. Il deterioramento coinvolge spesso anche i tessuti più profondi fino al cambio e, nei casi più gravi, le macchie possono confluire andando ad interessare l'intera circonferenza della pianta. In questo modo l'albero deperisce rapidamente ed poi muore.

L'osservazione dei caratteri morfologici, combinata con l'analisi delle sequenze ribosomiali (ITS ed una porzione di 18S), ha permesso l'identificazione dei microrganismi isolati da frammenti di corteccia e legno nel sito necrotico. Il modello evolutivo della malattia sembra essere piuttosto complesso (Mazzaglia et al., 2005). Il batterio *Brenneria nigrifluens* è primariamente coinvolto nella malattia come dimostra la sua costante e massiccia presenza nelle lesioni; secondo tale modello il batterio aggredisce per primo i fusti ed i rami di noce generando le lesioni su cui si insediano secondariamente alcuni funghi come *Botryosphaeria obtusa*, *Paraphaeosphaeria pillata* ed *Nectria haematococca*. Questi agenti patogeni aggravano la malattia approfondendo le lesioni e sostituendo progressivamente il *B.*

nigrifluens nei tessuti malati: in particolare il *B. obtusa* ed *N. haematococca* si localizzano negli strati più superficiali, mentre il *P. pillata* in quelli interni.

Analisi preliminari su germoplama di noce italiano indicano una maggiore suscettibilità della specie *J. regia* al cancro corticale del fusto rispetto alla specie *J. nigra* (Anselmi et al., 2007).

1. 4. 3. Antracnosi

Questa malattia, riportata in Italia già dal 1921 da Voglino nella provincia di Torino, è causata dal fungo *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. Et de Not. più noto con il nome dello stadio imperfetto *Marssonina juglandis* (Lib.) Magn. L'antracnosi è la malattia fogliare più comune del noce, presente in tutte le aree di coltivazione, in particolare nel bacino del Mediterraneo, colpisce sia piante giovani in vivaio sia piante adulte nelle piantagioni. Questo fungo attacca prevalentemente le porzioni verdi come le foglie, il frutto, i germogli e più raramente rami e tronco, generando aree necrotiche di forma irregolare con un diametro generalmente inferiore a 5 mm, spesso circondate da un alone clorotico (Black & Neerly, 1978). Nelle foglie si ha un graduale aumento delle macchie che, in seguito alla progressiva fusione in macchie più grandi, occupano una vasta porzione della superficie fogliare e determinano numerose lacerazione nella lamina (fig. 9a).

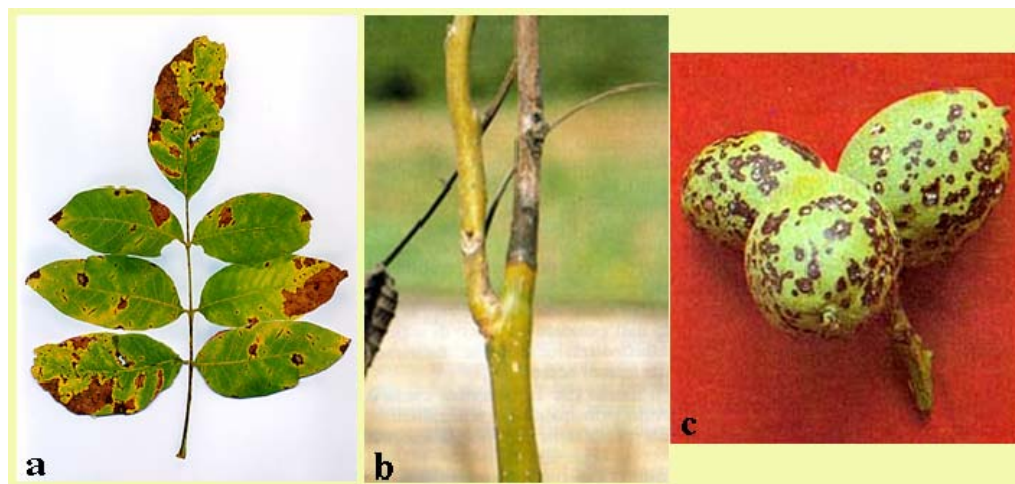


Figura 9. Belisario et al., 1992

Macchie necrotiche da *Gnomonia leptostyla* in tre differenti porzioni epigee della pianta: a) 30% di superficie necrosata in una foglia di *J. regia* b) tacca necrotica su fusto di semenzale di noce comune c) macchie necrotiche su frutti di noce comune.

Macchie bruno-nerastre più piccole di quelle osservate nelle foglie appaiono nella superficie esterna del mallo del frutto infetto. La parte centrale delle lesioni assume spesso un aspetto grigio polveroso seguito da lacerazione (fig. 9c). L'attacco ai frutti può portare alla necrosi del mallo, all'atrofizzazione del seme e successivamente alla cascola. Le infezioni sugli

organi legnosi hanno una sintomatologia simile a quanto descritto in precedenza (fig. 9b). Se le condizioni sono favorevoli alla malattia si hanno defogliazioni precoci, sviluppo di estesi cancri rameali accompagnati da disseccamento di porzioni di chioma e degenerazione dei semi. I fattori ambientali che favoriscono l'antracnosi ed aumentano l'incidenza della malattia sono un alto livello di umidità (>98%), presenza di acqua sulla superficie fogliare dovuta a pioggia, nebbia, rugiada ed irrigazione, scarso arieggiamento, basso irraggiamento ed una temperatura media di 21°C (Mielke et al., 2004).

Gnomonia leptostyla appartiene al gruppo degli ascomiceti, produce infatti spore aploidi, le ascospore, contenute in strutture claviformi, (aschi) durante la riproduzione sessuale. Generalmente tale patogeno matura e cresce durante l'inverno nelle foglie infettate cadute a terra l'estate precedente; raramente prolifera sui cancri rameali o nei frutti infettati rotolati a terra (Belisario, 1992). L'infezione primaria ha inizio in primavera con l'emissione di ascospore dal peritecio che si insediano nei tessuti erbacei della pianta ospite. Detto corpo fruttifero a forma di fiasco presenta un imenio con aschi contenenti ascospore bicellulari fusiformi di 16-26 μ x 2-6 μ . Se le condizioni lo consentono, le ascospore germinano, emettono il tubo germinativo che penetra ed infetta le foglie; le macchie si manifestano dopo 14-16 giorni (Annunziati et al., 2007). Le infezioni secondarie che si susseguono in estate fino alla caduta delle foglie sono dovute alla produzione di spore asessuali, i conidi (*Marssonina juglandis*), contenuti in piccoli corpiccioli di colore grigio-nerastri chiamati acervuli, solitamente più abbondanti sulla pagina inferiore del lembo fogliare (fig. 10a).

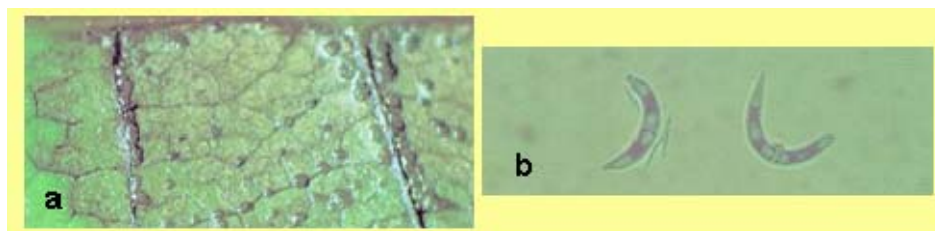


Figura 10.

Strutture riproduttive dello stadio asessuale del fungo *Gnomonia leptostyla* nel noce nero: a) gruppo di acervuli visibili ad occhio nudo sulla faccia inferiore della lamina fogliare b) conidi dalla forma arcuata, appuntiti, bicellulari.

I conidi sono spore arcuate, acuminate alle estremità, dapprima unicellulari poi settate da una parete che le divide in due cellule approssimativamente uguali (19-28 μ); la loro diffusione è favorita dal vento e dalla pioggia (fig. 10b). Lo studio sulla variabilità genetica della *Gnomonia leptostyla* in Italia ha rivelato una notevole stabilità ed omogeneità molecolare tra tutte le differenti popolazioni campionate (Belisario & Hubbes, 1997b). Dopo aver collezionato su tutto il territorio italiano foglie e rami con acervuli maturi, sono stati isolati

176 differenti inoculi. L'analisi mediante i marcatori RFLP-PCR per le regioni SrDNA-18S ed ITS non ha evidenziato alcun polimorfismo sia in lunghezza sia in sequenza.

Parallelamente nella pianta infetta il numero e le dimensioni delle lesioni, unitamente al numero di acervuli presenti sulla superficie fogliare, aumentano con il trascorrere dell'estate, con un lieve decremento tra Luglio ed Agosto ed un picco massimo invece in Agosto e Settembre (Belisario et al., 2001). Il picco massimo, che porta di solito alla defogliazione precoce, è legato ad un drammatico incremento nel numero di acervuli fertili che forniscono un inoculo continuo e abbondante per le infezioni secondarie. In questo stadio la posizione delle foglie sembra non influire sull'incidenza della malattia: i valori di superficie fogliare necrosata sono omogenei sia considerando l'altezza (3, 5, 7m) sia i quattro punti cardinali della chioma (Belisario et al., 2001). Risulta interessante il lieve decremento che coincide con il periodo di emissioni delle foglie terminali da parte dei rami potati che si dimostrano più resistenti all'antracnosi (Cline & Neerly, 1984; Belisario et al., 2001). Di fatto nel corso degli anni ripetute defogliazioni possono avere un effetto negativo sulla crescita delle piante sebbene i dati non siano di facile interpretazione. Ad esempio, selezionando alcune famiglie half-sib di noce nero resistenti all'antracnosi si è incrementata la crescita delle piante in altezza di appena il 7% (Funk et al., 1981). Secondo Todhunter & Beineke (1984) vi è in realtà una correlazione negativa significativa solo tra l'abscissione precoce di foglie per antracnosi nei primi giorni di Settembre e la crescita in diametro del fusto. L'incremento annuale in altezza nel noce termina a fine Luglio mentre l'accrescimento in diametro richiede un intervallo di tempo più ampio, e si protrae fino a Agosto inoltrato. Secondo Van Sambeek et al., (2003) l'attacco del patogeno fungino aumenterebbe il tasso di respirazione e determinerebbe una ria-allocazione dei fotosintetizzati nel sito d'infezione subito dopo l'accrescimento annuale in altezza della pianta, ma prima della conclusione dei processi di accrescimento annuale in diametro, che vengono rallentati. Inoltre, le infezioni potrebbero ridurre considerevolmente le riserve di amido della pianta e incidere sulla sua ripresa vegetativa e sulla crescita nella primavera successiva. Tuttavia anche fattori pedo-ambientali possono influire sulla crescita futura della pianta mascherando l'effetto negativo dell'antracnosi (Van Sambeek et al., 2003).

La lotta all'antracnosi si effettua rimuovendo e bruciando il materiale infetto quali foglie e rametti caduti a terra l'estate precedente oppure con trattamenti preventivi a base di poltiglia bordolese, concentrazione 0,5%, prima dell'inizio della stagione vegetativa. Nella lotta con mezzi chimici è previsto anche l'uso di fungicidi. Sebbene il Benomyl si sia dimostrato più efficace per l'inattivazione del fungo *Gnomonia leptostyla*, solo il fungicida Dodina (0,45

kg/378 L di acqua) è legalmente utilizzabile su alberi da frutto come il noce, (Berry et al., 1977). L'antracnosi può essere arginata anche aumentando il contenuto di azoto fogliare, sia fertilizzando il terreno oppure consociando il noce con specie azoto fissatrici come la specie arbustiva *Elaeagnus umbellata* (Neerly, 1986), nome comune Olivello di boemia. In particolare Kessler et al., (1990) ha successivamente osservato come la consociazione con l'Olivello di Boemia in realtà non aumenti la resistenza delle piante di noce alla malattia ma determini un brusco decremento nel numero di ascospore prodotte durante l'infezione primaria. Tale studio ha dimostrato il diretto coinvolgimento di alcuni artropodi (collemboli, termiti oribatidi), presenti nella lettiera, nella demolizione dei periteci cresciuti sulle foglie infettate di noce.

Tuttavia l'alternativa più valida alle pratiche agronomiche e chimiche nella lotta all'antracnosi è rappresentata dalla selezione di genotipi di noce resistenti alla *Gnomonia leptostyla*. Entrambe le specie, *J. regia* ed *J. nigra*, risultano suscettibili all'antracnosi sebbene vi sia una netta variabilità di comportamento verso la malattia (Funk et al., 1981; Woeste et al., 2001; Anselmi et al. 2006). Nonostante genotipi immuni non siano stati tuttora identificati, due varietà americane di noce nero, "Thomas" ed "Ohio" si sono rivelate relativamente resistenti all'antracnosi (Berry, 1960). Inoltre all'interno di una stessa parcella di terreno piante di noce americano presentano frequentemente una diversità suscettibilità; genotipi provenienti dal confine ovest del range naturale di *J. nigra* (Kansas ed Oklahoma) si dimostrano assai suscettibili all'antracnosi. Secondo Mielke et al., (2004), l'incidenza della malattia, e perciò anche la pressione selettiva esercitata sui genotipi, è stata inferiore in questa area a clima arido. In generale la resistenza all'antracnosi è un carattere altamente ereditabile (Beineke & Masters, 1973) e questo dato incoraggia un possibile miglioramento genetico per la resistenza all'antracnosi nel noce.

1. 5. Meccanismi di difesa nelle piante

Le piante reagiscono all'attacco di numerosi patogeni quali funghi, batteri, virus e nematodi, attivando un complesso sistema di difese che può agire sia nel sito d'infezione sia a livello sistemico. Si definisce "non-host resistance" o anche "basal defence" la capacità di tutti i membri appartenenti ad una stessa specie vegetale di resistere all'attacco di qualsiasi variante genetica di un dato patogeno, grazie dell' azione concertata di barriere precostituite ed inducibili (Thordal-Christensen, 2003). Al contrario la resistenza di alcuni genotipi e/o varietà nei confronti di un determinato ceppo patogeno è indicata come "race-specific resistance" e richiede lo specifico riconoscimento dal parte della pianta di un prodotto genico

avirulento (effettore) rilasciato dal patogeno stesso (Nürnberg et al., 2004). Risulta tuttavia sempre più evidente una sostanziale sovrapposizione dei meccanismi molecolari alla base della non-host e race-specific resistance (Heath, 2000). Secondo il principio gene-per-gene, l'interazione tra un effettore, ad esempio una flagellina di origine batterica, ed una proteina codificata da un gene-R (receptor-like R gene) nell'ospite determina l'attivazione delle difese inducibili, conferendo parziale o totale resistenza alla malattia (Flor, 1971; Keen, 1990).

1. 5. 1. Receptor-like R genes

Negli ultimi quindici anni un numero crescente di geni-R sono stati mappati in differenti specie di piante, clonati e successivamente sequenziati. Allineando le corrispondenti sequenze aminoacidiche è stato possibile definire quattro principali classi geniche (Martin et al., 2003).

La prima classe comprende il solo gene Pto per la resistenza al batterio *Pseudomonas syringae* nel pomodoro che codifica una serina/treonina chinasi con una glicina mistirilata all'estremità N-terminale (Martin et al. 1993). La seconda classe include un numero ampio di proteine-R citoplasmatiche caratterizzate da due domini altamente conservati, una regione Leucine-Rich Repeat all'estremità C-terminale ed un Nucleotide-Binding Site in posizione intermedia (NBS-LRR-containing gene family). Il dominio LRR, corrispondente ad un breve frammento di circa 24 aminoacidi a conformazione planare (foglietto β), sembra essere il principale responsabile del riconoscimento specifico del prodotto genico avirulento all'interno delle piante (Jia et al., 2000). In particolare, le leucine conservate nel motivo xxLxxLxx sono proiettate all'interno di un core idrofobico, mentre i restanti residui aminoacidici x esposti al solvente formano una superficie direttamente coinvolta nel legame con l'effettore (Kobe & Deisenhofer, 1995). L'elevato rapporto tra sostituzioni sinonime e non-sinonime tra i residui aminoacidici x è consistente con l'ipotesi di una rapida evoluzione della regione LRR che permetta nel tempo di riconoscere nuovi ligandi (Hulbert et al., 2001). Al contrario il dominio NBS sembra prendere parte a meccanismi di traduzione del segnale a cascata per l'induzione dei meccanismi difesa (Hammond-Kosach & Jones, 1997).

Il dominio NBS nei geni-R è caratterizzato da numerosi motivi altamente conservati tra cui il P-loop (o kinase-1), kinase-2, kinase-3 (o RNBS-B) e la regione idrofobica GLPL (tab. 1). La presenza del motivo P-loop (GVGKTT) in numerose ATP- e GTP- binding proteins, ad esempio la subunità β della ATP-sintetasi e la catena pesante della miosina, suggerisce un suo diretto coinvolgimento nel legame con il gruppo fosfato più esterno di una molecola di ATP o GTP (fig. 1; Saraste et al., 1990). Contemporaneamente la kinase-2

(LLVLDDV(D/W)) coordina il legame con ioni metallo bivalenti (es. Mg^{2+}) necessari nelle reazioni di fosfo-trasferimenti grazie ad un residuo di acido aspartico mentre la kinase-3 (GSRIITTRD) interagisce con la base purinica dell'ATP mediante un residuo di arginina (fig. 11). La regione idrofobica GLPL, invece, costituirebbe un sito di ancoraggio alle membrane citoplasmatiche. I geni-R per funzionare perciò richiedono la presenza e forse l'idrolisi di ATP e GTP (Traut e at., 1994).

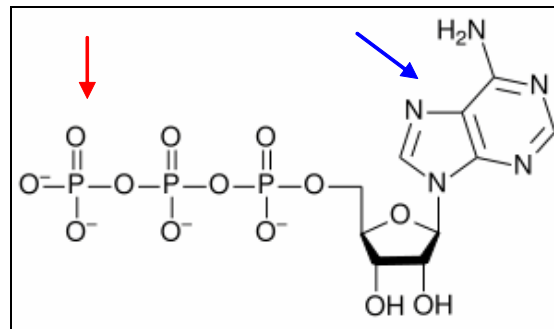


Figura 11. Una molecola di adenosintrifosfato (ATP). Il motivo P-loop si lega al gruppo fosfato più esterno (→) mentre la kinase-3 interagisce con la base purinica, l'adenina (→).

Le proteine di tipo NBS-LRR mostrano inoltre un'omologia di sequenza di circa il 50% con una regione di 320 aminoacidi presente sia nella proteina umana APAF-1 che in quella animale (*Caenorhabditis elegans*) CED-4; entrambe le proteine sono fattori di regolazione per l'apoptosi o morte programmata (Van der Biezen & Jones, 1998). Questa regione chiamata NB-ARC (Nucleotide Binding in APAF-1, R gene products and CED-4) oltre ad includere cinque motivi NBS (P-loop, kinase-2, kinase-3, RNBS-C, GLPL) presenta altri tre motivi conservati a funzione ignota. Il dominio NB-ARC consentirebbe ai geni-R di attivare a monte la morte programmata delle cellule nel sito d'infezione, limitando la diffusione del patogeno nel tessuto vegetale. A conferma di tale ipotesi vi è la constatazione che l'interazione tra il dominio LRR con il ligando avirulento e la successiva trasduzione del segnale mediata dal dominio NBS, porta frequentemente alla Risposta di Ipersensibilità (HR), una forma di morte cellulare programmata (Morel & Dangl, 1997). La struttura terziaria dedotta mediante analisi FFAS (Function and Fold Assignment System) indica un possibile coinvolgimento del dominio NB-ARC in processi di oligomerizzazione ATP-dipendenti (Jaroszewski et al., 2000).

Tabella 1. Mayers et al., 1999

Lista dei motivi aminoacidici altamente conservati nel dominio NBS presente nei geni-R sia TIR (N, RPP5, L6, M) che non-TIR (I2, Xa1, RGC2B/Dm3, RPM1, RPS2, RPS5, RPP8). con le corrispondenti sequenze consenso.

Gene or Identifier	P-loop/ Kin-1a	RNBS-A - nonTIR	RNBS-A - TIR	Kin-2	RNBS-B	RNBS-C	GLPL	RNBS-D - NonTIR ^a	RNBS-D - TIR ^a
Consensus:	GVGKTT	FDLAWVCSQx	FLENIRExSKHGLEHLOKLLSKLL	LLVLDVW	GSRIITTRD	YEVxxLSEDEAWELFKxAF	CGGLPLA	CFVYCALFPED	FLHACFF
I2	205GVGKTT	227FDLAWVCSQGEF		271LVLDVW	345GSKIIVTRK	325RMGNLSTESASWLFQRHAF	346CKGLPLA	425CFSECAIFPKD	
Xa1	225GIGKTT	340FNVKVVVVSQKF		401LVLDVW	407GNMILITRI	489KLEALKDDWLSFKVHAF	501JGNPLA	598CVSYCSLFPKG	
RGC2B/Dm3	185GVGKTR	NI		238LVLDVW	285DFKVLITSHD	309NVGLLTEAEASLFOQVE	346CCGLPLA	402TFLMCGLPED	
RPM1	227GVGKTT	227FESYAWVTISKSY		281LVLDVW	345GSRVMMITRD	339HEELLKEDEAWLFSNKAF	372CCGLPLA	435CFVCSLFPVN	
RPS2	185GVGKTT	205VDVLMVQMSREF		251LVLDVW	285CKVMFTTRS	304LRLVERLEKCHAWELFCWKV	344CCGLPLA	408CFVCSLFPPE	
RPS5	185GVGKTT	205FDVVMVWVSRS		208LVLDVW	285GCKVAFTRS	307MEVSCLOPESWDLFQMKV	344CRGLPLA	445CFVCSLFPED	
RPP8	195GIGKTT	214FDGFAWVQVSQOF		298LVLDVW	285GWKMLTSRN	318FRASLNPEESWKLCEVIF	356CCGLPLA	438RFLFAHFPEY	
M/Meu1	185GVGKTT	57FDLAWVCTVQGC		428LVLDVW	445GRIITTRE	671LDRLRPDESWELEKRAF	710CKGLPLV	776CLLYFASFPKO	
3451059 ^d	405GIGKTE	NI		531FLVLDNL ^d	545GTHILSTR	NI	568DKLGRLLT	NI	
AB008271.3	205GVGKTT	NI		272LVLDVW	NI	312YDVELLNEHEATALFCLSVF	355CKGLPLS	415CFVYLGAPPED	
N	215GVGKTT	240FLDKIKENKRGHSLQNALSELL		298LVLDVW	325GRIITTRD	340VEYALPDHESQLFKQHAF	361AKGLPLA	407FLDIACRL	
RPP5	215GIGKST	240FLTYKSTSGDSVGMKLSWQKELLSEU		291LVLDVW	315GSRIVTQD	338VEYKLPQSGALKMISQYAF	371VGSPLPLG	407FKGIACFF	
L6	205GIGKTT	239FDNIRETOEKDGGWVLOKLVSEIL		344LVLDVW	365DSRFTSRS	389VEYGSMSKPSRLEFSKHAF	432TAGLPLT	467FLDIACFF	
M	205GIGKTT	305FDVNVNRAMDEQKGFLOKLVSEIL		398LVLDVW	365GTRFTSRN	407VEYGSMSSEHSLFESKHAF	441TGLPLT	507FLDIACFF	
AB01242.7 ^c	215GIGKTT	240FEDVGOCKKVDKXCXLLDIL		298LVLDVW	315GRIITTRD	339VEYKCLONEDSLKVNIAF	379AGGLPLA	409FIR/ACLF	
AB006706.2 ^c	215GVGKTT	238FMENKVENYRNGVRRLOVEFLCRMF		291FLVLDVW	315GSRIVTTRD	338YKVKCLPKKEALQFCNYAF	379AGGLPLA	409FLVISCY	
AB01242.8 ^c	215DVGKTE	240VMILKAPQRIREFEELVLAETVCLRL		291LVLDVW	307GRIITTRN	329VEYVGLGLEFSEALQLFCLHAF	389AGGFPLS	NI	

^aThese motifs are found in the region of the protein sequence but been listed separately because the sequences are distinct.

^bNI = not identified. These motifs were not found using MEME analysis or by visual inspection.

^cHypothetical protein – selected from the phylogenetic tree to represent diverse NBS-encoding sequences.

^dSequences in parentheses were identified by visual inspection but were below the threshold for recognition using MEME analysis.

L'analisi filogenetica ha suddiviso ulteriormente la famiglia dei geni NBS-LRR in due sub-classi: TIR-NBS-LRR e non-TIR-NBS-LRR. Questa classificazione si basa sulla presenza all'estremità N-terminale delle proteine TIR-NBS-LRR di un dominio omologo al Toll-Interleukin-1 Receptor (TIR) del sistema immunitario animale (Parker et al., 1997), sostituito da un dominio Coiled-Coil (CC) o Leucine Zipper (LZ) nelle proteine non-TIR-NBS-LRR. (Meyers et al., 1999). Fino ad oggi non sono stati individuati geni di tipo TIR in piante monocotiledoni, mentre sequenze non-TIR sono presenti sia in monocotiledoni che in dicotiledoni. Le due sub-classi sono caratterizzate da differenti motivi aminoacidici nel dominio NBS: i motivi RNBS-A-TIR ed RNBS-D-TIR sono presenti esclusivamente nella sub-classe TIR, mentre i motivi RNBS-A-non TIR ed RNBS-D-non TIR sono propri solo della sub-classe non-TIR (tab. 1). Un importante elemento di discriminazione fra le due sub-classi è rappresentato dal residuo aminoacidico finale della kinase-2: nelle proteine TIR-NBS-LRR si trova l'acido aspartico (D) mentre nelle non-TIR-NBS-LRR il triptofano (W). Come il dominio NBS, anche le regioni TIR e non-TIR sarebbero coinvolte nei meccanismi di traduzione del segnale, sebbene le modalità di azione non siano state ancora chiarite. I geni R di tipo NBS-LRR sono assai numerosi nelle piante: ad esempio in *Arabidopsis* sono 163, nel riso oltre 600 (TAGI 2000, Goff et al., 2002).

La terza classe genica è formata dalle proteine Cf del pomodoro (resistenza allo *Cladosporium fulvum*) che presentano un dominio idrofobico di transmembrana (TM), una regione LRR extracellulare ed una coda citoplasmatica dal motivo non ovvio. La quarta classe è rappresentata dalla proteina Xa21 del riso (resistenza allo *Xanthomonas oryzae*) che mostra non solo una regione TM ed una porzione LRR extracellulare, ma anche una serina/treonina chinasi nella coda citoplasmatica (Martin et al. 2003).

Tuttavia quali siano le componenti molecolari e i fattori di regolazione che collegano l'attivazione delle proteine-R alle risposte fisiologiche della pianta durante l'attacco del patogeno sono ancora largamente sconosciute. La pianta infatti reagisce inducendo in maniera coordinata una serie di difese che includono il rafforzamento della parete cellulare, la sintesi di composti secondari antimicrobici come fitoalexine e fenilpropanoidi e l'accumulo delle pathogenesis-related proteins (es. β -glucanasi ed chitinasi). Variazioni in flussi ionici, la produzione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) e la sintesi di acido salicilico, etilene, acido jasmonico ed ossido nitrico (NO), sembrano giocare un ruolo importante nella trasmissione del segnale mediata dai geni-R. (Durner et al., 1997; Pieterse & Van Loon, 1999).

1. 5. 2. Parete cellulare e metaboliti secondari

L'accesso al contenuto cellulare della pianta mediante passaggio attraverso la parete cellulare è una tappa essenziale nel processo d'infezione dei patogeni quali funghi e batteri. La pianta risponde frequentemente all'attacco del patogeno rafforzando la parete cellulare in prossimità del sito d'infezione. La formazione di cross-link tra polisaccaridi ad elevato peso molecolare catalizzata da alcune perossidasi in presenza di dimeri di acido ferulico e la rapida deposizione di lignina e suberina rendono la parete stessa più resistente agli enzimi idrolitici rilasciati dai funghi (Fry, 1986; Strack, 1997). Il rafforzamento della parete cellulare passa anche attraverso la deposizione nello spazio periplasmatico di papille contenenti callosio ((1→3) β -D-glucano), glicoproteine e fenoli preesistenti o sintetizzati *de-novo* (Thordal-Christensen et al., 1997). I fenoli sono un gruppo di metaboliti secondari strutturalmente diversi sintetizzati nelle piante (Wong, 1973). Questo gruppo include tra l'altro gli acidi idrossibenzoici, acidi idrossicinnamici (precursori della lignina), i flavonoidi (es. antocianine), le fitoalexine ed i naftochinoni.

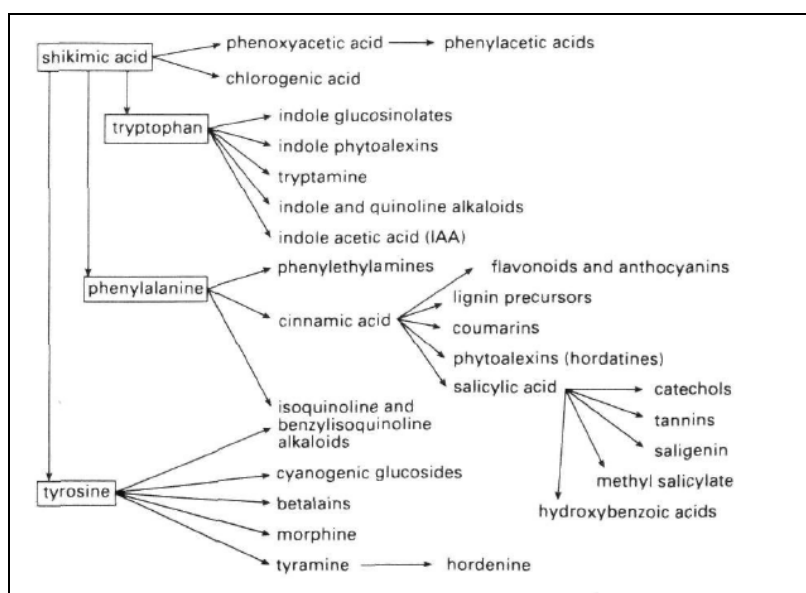


Figura 12. Bennett & Wallsgrove, 1994.

Alcuni metaboliti secondari sintetizzati partendo dall'acido scichimico e dagli aminoacidi aromatici, triptofano, fenilalanina ed tirosina.

La via biosintetica dei fenoli, che derivano da aminoacidi aromatici provenienti dalla via biosintetica dell'acido scichimico, è riassunta in figura 12.

Una delle più importanti e ben conosciute funzioni dei fenoli è la partecipazione ai meccanismi di difesa delle piante (Bennett & Wallsgrove, 1994; Dixon & Pavia, 1995). I fenoli operano in due differenti modi, non solo prendendo parte al rafforzamento della parete cellulare, come già accennato, ma anche sfruttando la loro tossicità. Essendo tossine già

presenti prima dell'infezione in forma libera o coniugata inattiva (Strack, 1997), i fenoli possono essere costitutivamente presenti nei tessuti sani a concentrazioni così elevate da inibire la crescita e la successiva diffusione del patogeno. Ad esempio negli alberi americani di faggio (*Fagus grandifolia*) resistenti al *Nectaria coccinea* var. *faginata* (cancro del fusto) la concentrazione totale dei fenoli della corteccia rimane costante per sei mesi dopo l'attacco (Ostrofsky et al, 1984). Nelle fasi iniziali dell'infezione, non vi è alcuna apparente differenza tra piante suscettibili e piante resistenti ma, passati sei mesi, la quantità di fenoli diminuisce significativamente nelle piante suscettibili. Allo stesso modo piante di tabacco transgeniche con livelli costitutivamente bassi di fenoli, grazie all'inibizione dell'enzima PAL (Phenylalanine Ammonia-Lyase), risultano considerevolmente più suscettibili all'attacco del fungo *Cercospora nicotianae* (Maher et al., 1994); in questo caso tra i fenilpropanoidi presenti, l'acido clorogenico sembra esercitare la più forte azione antimicrobica.

Tuttavia, la sintesi di una parte dei fenoli, normalmente presenti nei tessuti a bassa concentrazione, può essere rapidamente indotta subito dopo l'attacco; è nota una correlazione positiva tra la distribuzione spaziale e temporale delle fitoalexine e la resistenza ad alcuni patogeni (Bennett & Wallsgrove, 1994). La differenza tra genotipi suscettibili e resistenti dipenderebbe dalla rapidità con cui la pianta ospite è in grado di indurre la sintesi di tali composti sia nei tessuti sani sia in prossimità del sito d'infezione. Ad esempio nelle radici di soia l'infezione con il fungo *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* provoca la sintesi della fitoalexina glyceollin I (Graham et al., 1990). Nella varietà di soia resistente la glyceollin I è rilevabile nelle cellule dello strato epidermico dopo appena due ore dall'infezione mentre, nella varietà suscettibile la presenza della fitoalexina si riscontra dopo 14 ore. Durante tale lasso di tempo il fungo ha la possibilità di crescere ed iniziare la colonizzazione della corteccia della radice. La differenza temporale nella sintesi della glyceollin I è dovuta ad una diversa velocità di rilascio del suo precursore daidazeina che, conservata nelle cellule sottoforma di daidazeina-glicosilata, viene enzimaticamente convertita in daidazeina e rapidamente accumulata nella varietà resistente. Tuttavia non sempre il ruolo delle fitoalexine è così ovvio in alcune interazioni pianta-patogeno (Dixon & Pavia, 1995).

1. 5. 3. Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

Un altro importante meccanismo di difesa delle piante è dato dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno come il superossido ($O_2^{\bullet -}$) ed il perossido d'idrogeno (H_2O_2) nel sito

d'infezione. In particolare il perossido d'idrogeno liberato nello spazio periplasmatico può agire in differenti modi:

(1) Può avere un'azione antimicrobica diretta in quanto tossico, uccidendo il patogeno ed impedendone l'ingresso nella pianta. Ad esempio al momento della penetrazione del fungo *Colletotrichum coccodes* (antracnosi) nel pomodoro si osserva solo un consistente aumento extracellulare del H_2O_2 che arresta la crescita del patogeno (Mellersh et al., 2002).

(2) Il perossido d'idrogeno può fungere da substrato nelle reazioni di cross-link tra i precursori della lignina e tra proteine per rafforzare la parete cellulare (Thordal-Christensen et al., 1997; Van Breusegem et al., 2001).

(3) Vista la sua relativa stabilità e diffusibilità attraverso la membrana, H_2O_2 può fungere da messaggero secondario nei meccanismi di difesa quali la Risposta di Ipersensibilità (HR) e la Resistenza Sistemica Acquisita (SAR) (Durner et al., 1997; Van Breusegem et al., 2001).

La HR, tipica delle interazioni incompatibili patogeno-pianta (pianta resistente), è sempre associata ad un massivo incremento delle specie reattive dell'ossigeno nello spazio extracellulare ("oxidative burst") che precede o accompagna la morte delle cellule nella zona d'infezione (Pieterse & van Loor 1999). Principalmente responsabile dell'oxidative burst, è un complesso NADPH ossidasi che si attiva nella membrana plasmatica dopo l'attacco del patogeno e genera radicali superossidi che vengono convertiti in H_2O_2 dalla superossido dismutasi (SOD), oppure attraverso una spontanea dismutazione (Lamb & Dixon, 1997). Sia il perossido ($O_2^{\bullet -}$) sia il H_2O_2 sono indiscutibilmente coinvolti nel controllo genetico dell'apoptosi nelle piante (Jabs & et al., 1996). non solo a causa della loro tossicità, ma anche perché agiscono da messaggero secondario in un meccanismo di traduzione del segnale che termina con la morte cellulare (Van Breusegem et al., 2001). Ad esempio, un aumento transiente di H_2O_2 nelle piante CAT1AS (linea di tabacco transgenica che presenta solo il 10% di attività delle catalasi) è sufficiente ad attivare la HR. Tuttavia nelle piante di tabacco CAT1AS la morte cellulare programmata può essere disattivata anche in presenza di H_2O_2 inibendo la sintesi proteica *de-novo*, bloccando il flusso degli ioni Ca^{2+} ed ostacolando l'attività delle chinasi/fosfatasi. (Van Breusegem et al., 2001). Un numero crescente di dati attribuisce agli ioni Ca^{2+} un ruolo centrale nelle fasi successive all'interazione prodotto genico avirulento-proteina R (receptor-like R gene). Una variazione di flussi ionici, ed in particolare un aumento della concentrazione intracellulare degli ioni Ca^{2+} , rappresenterebbe il segnale di avvio dell'oxidative burst della HR (Zimmermann et al., 1997; Martin et al., 2003).

Di recente Grant et al., (2000) ha parzialmente rivelato i primi eventi che caratterizzano la HR durante l'interazione *avrRpm1/RPM1* gene-for-gene tra il patogeno *Pseudomonas syringae* pv *tomato* ed *Arabidopsis thaliana* transgenica per la fotoproteina equorina, sensibile al Ca^{2+} . La figura 13 riassume il meccanismo molecolare ipotizzato da Grant et al., (2000). Il riconoscimento del prodotto genico avirulento *avrRpm1* da parte del dominio LRR della proteina RPM1 (gene non-TIR-NBS-LRR) provoca un afflusso di ioni Ca^{2+} all'interno della cellula. I canali per gli ioni Ca^{2+} cambiano la loro permeabilità grazie a modifiche conformazionali, mediate dalla proteina RPM1, nella faccia citoplasmatica della membrana; non è nota la natura di tali modifiche. Vista la presenza del dominio NB-ARC nel gene RPM1 si ipotizza l'intervento di un complesso molecolare, analogo all'apoptosoma nelle cellule dei mammiferi, che attivi i canali Ca^{2+} . Tale complesso si formerebbe per oligomerizzazione-ATP-dipendente della proteina RPM1 (Zou et al., 1999). Successivamente il legame tra gli ioni Ca^{2+} , la calmodulina ed alcune NAD chinasi Ca^{2+} -calmodulina-dipendenti (CaM chinasi) provocherebbe l'attivazione transiente di alcune MAP chinasi. Il legame tra questi fattori di trascrizione e la formazione del complesso NADPH ossidasi non è stato ancora chiarito; sicuramente l'attivazione della NADPH ossidasi nella membrana plasmatica innesca l'oxidative burst.

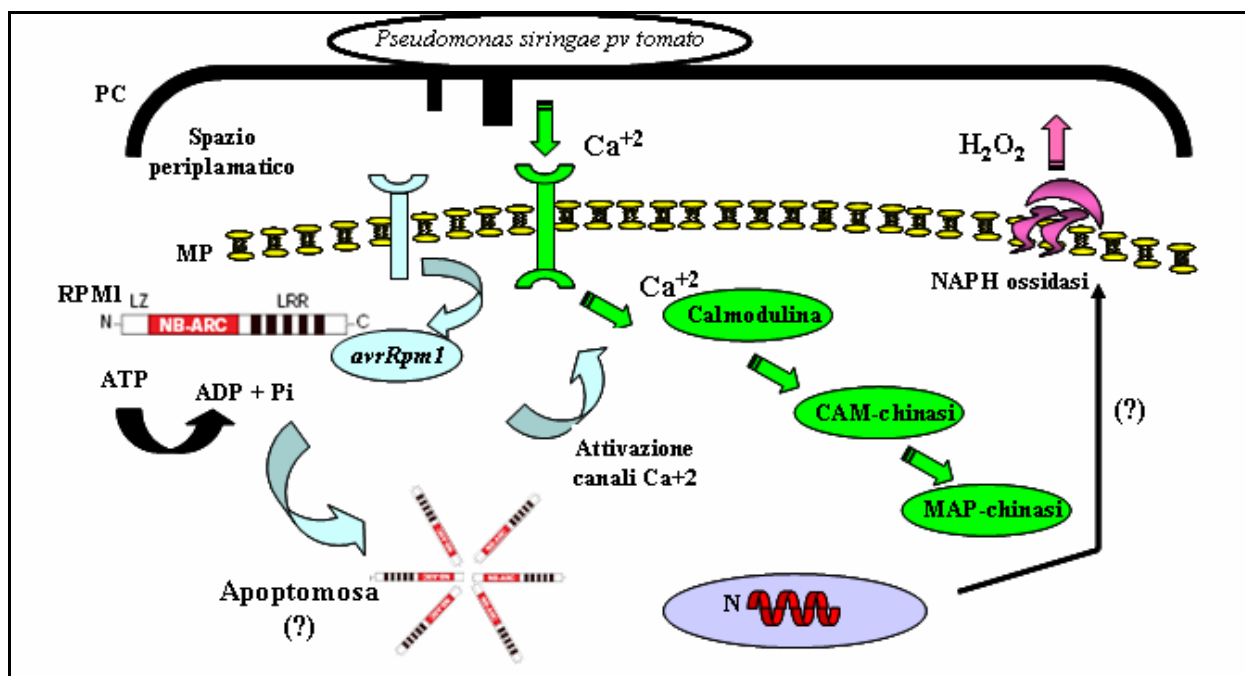


Figura 13. Grant et al., 2000.

I primi eventi che caratterizzano la HR durante l'interazione *avrRpm1/RPM1* gene-for-gene tra il patogeno *Pseudomonas syringae* pv *tomato* ed *Arabidopsis thaliana*. PC = parete cellulare; MP = membrana plasmatica.

Infine, è ormai comprovata la partecipazione sia dell'acido salicilico sia del perossido d'idrogeno alla Resistenza Sistemica Acquisita (SAR). La SAR consiste nella capacità della

pianta di resistere ad una seconda infezione dopo aver subito una prima infezione da parte del patogeno (Durner et al., 1997; Pieterse & Van Loon, 1999). La sintesi e l'accumulo di acido salicilico nelle foglie è un evento chiave nel promuovere l'espressione dei geni codificanti per le pathogenesis-related proteins (PRs) e per l'acquisizione della SAR. Secondo un modello "self-amplification-loop" l'acido salicilico ed il H₂O₂ agirebbero all'unisono: il perossido d'idrogeno promuoverrebbe l'accumulo di acido salicilico, ed a sua volta l'acido salicilico, legandosi ed disattivando le catalasi localmente presenti, aumenterebbe la quantità di H₂O₂, favorendo ulteriormente la HR (Van Breusegem et al., 2001). Sebbene siano molti gli aspetti ancora da chiarire sembra che l'etilene, l'acido jasmonico ed l'ossido nitrico (NO) siano anch'essi coinvolti come messaggeri secondari nel processo di traduzione del segnale per l'attivazione della SAR (Pieterse & Van Loon, 1999; Van Breusegem et al., 2001).

1. 5. 4. Resistenza all'antracnosi (*Gnomonia leptostyla*) in *Juglans* spp.

Nel genere *Juglans* spp. la maggior parte di metaboliti secondari estratti dagli organi epigei della pianta sono fenoli. In particolare i naftochinoni ed i flavonoidi sono i composti fenolici maggiormente presenti nelle foglie, frutti, corteccia e germogli sia di *J. nigra* che di *J. regia* (Amaral et al., 2004; Solar et al., 2006a; Burtin et al., 1998;). In tutti gli organi della pianta sono presenti otto 1,4-naftochinoni volatili specifici del genere *Juglans* (fig. 14; Binder et al., 1989). In particolare lo juglone (5-idrossi-1,4-naftochinone) ed il suo precursore glucosilato, l'idrojuglone β-D-glicopiranoside (HJG) sono i composti fenolici maggiormente presenti sia nel noce nero che in quello europeo (Amaral et al., 2004; Solar et al., 2006a/b; Burtin et al., 1998).

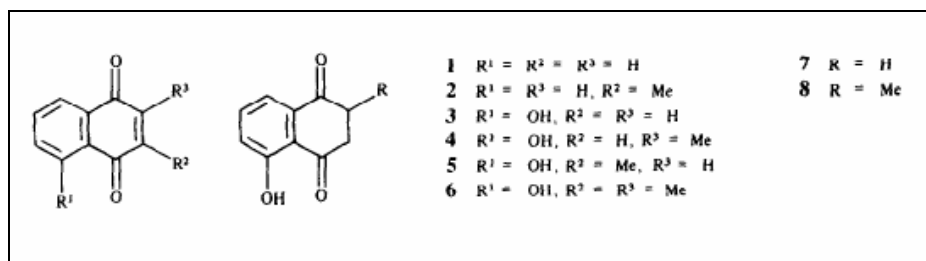


Figura 14. Binder et al. 1989.

Struttura chimica di otto 1,4-naftochinoni presenti nel genere *Juglans* spp. 1_ 1,4-naftochinone; 2_ 2-metil-1,4-naftochinone; 3_ juglone o 5-idrossi-1,4-naftochinone; 4_ 5-idrossi-2 metil-1,4-naftochinone; 5_ 5-idrossi-3 metil-1,4-naftochinone; 6_ 2,3 dimetil-5-idrossi-1,4-naftochinone; 7_ 2,3 diidro-5-idrossi-1,4-naftochinone; 8_ 2,3 diidro-5-idrossi-2 metil-1,4-naftochinone.

I naftochinoni vengono sintetizzati attraverso la via biosintetica dell'acido scichimico e dell'acido o-succinilbenzoico. In particolare la figura 15 illustra la possibile via biosintetica

dell'acido o-succinilbenzoico per la sintesi di juglone e del suo precursore HJG (Muller & Leistner, 1976; Muller & Leistner, 1978).

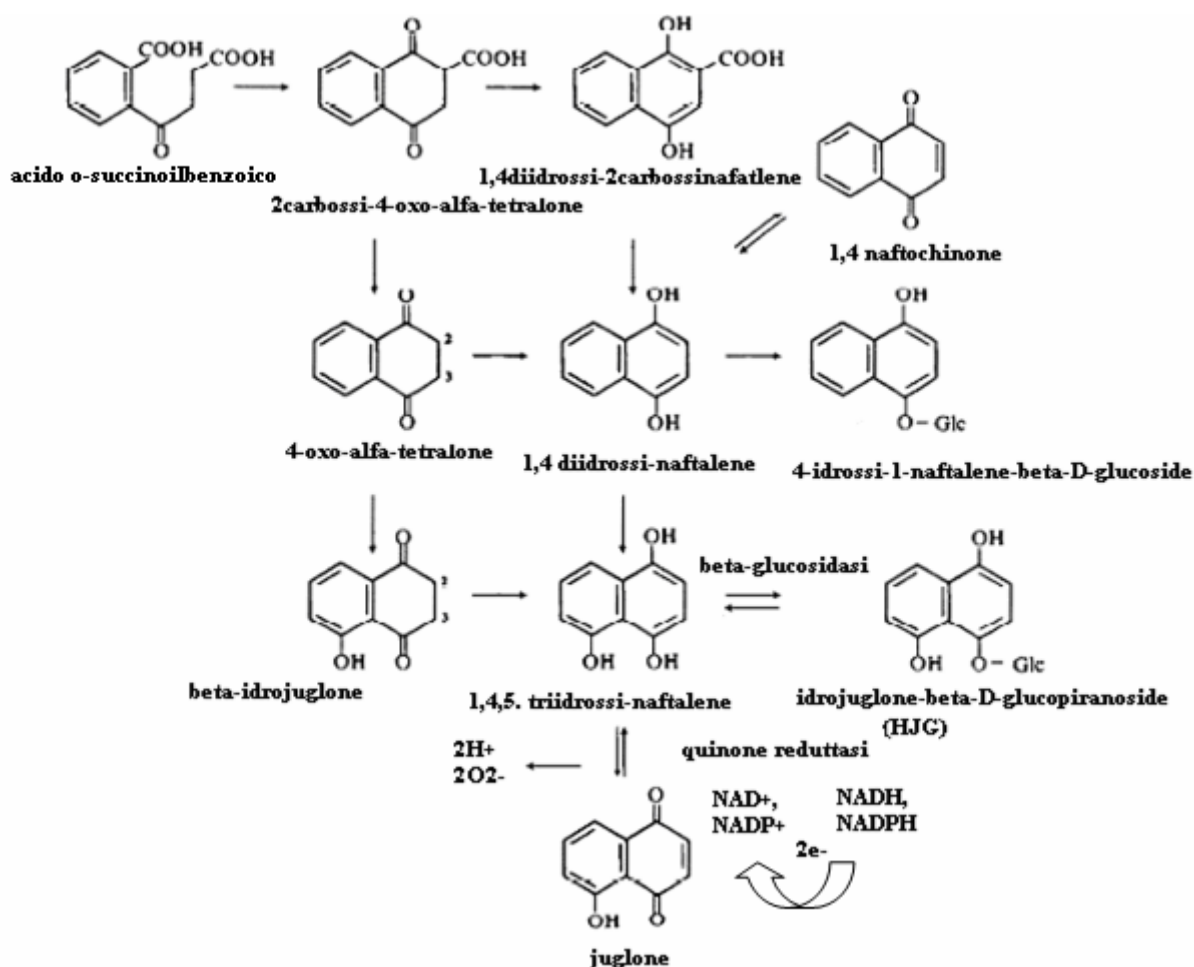


Figura 15. Muller & Leistner. 1978; Duroux et al. 1998.

Via biosintetica dell'acido o-succinilbenzoico per la sintesi di juglone ed idrojuglone β -D-glicopiranoside (HJG).

La conversione dell'HJG, accumulato nei tessuti, in juglone consta di due passaggi: la prima reazione, catalizzata da una β -glucosidasi (singola subunità di 64KD), porta alla formazione dell'1,4,5 triidrossi-naftalene che viene successivamente convertito in juglone per auto-ossidazione con contemporanea liberazione di $2O_2^-$ ed $2H^+$ (Duroux et al. 1998). Una delle caratteristiche dominanti della chimica dello juglone è la sua capacità di partecipare a reazioni di ossido-riduzione con la concomitante formazione di radicali liberi. Lo juglone, come tutti i chinoni, può essere ridotto in semichinone o/e idrochinone grazie all'attività catalitica di NADPH:chinone ossido-reduttasi. Entrambi i composti, soprattutto la forma semichinonica, sono instabili e tendono a auto-ossidarsi liberando O_2^- e favorendo perciò la formazione di altre specie reattive dell'ossigeno quali H_2O_2 ed OH^- . Secondo Duroux et al. (1998) la coniugazione dello juglone in HJG consente di evitare la formazione di radicali liberi e di accumulare nei tessuti questo composto fenolico nella forma non tossica.

Numerose sono le funzioni associate allo juglone ed al suo precursore HJG . Fin dai primi anni del 900'si è attribuito allo juglone un effetto allelopatico e cioè il rilascio nel terreno di juglone da parte delle radici inibirebbe la crescita e lo sviluppo di piante competitive in impianti di noce (Davis, 1928). In generale tale composto penetra nella membrana plasmatica e ne induce la depolarizzazione bloccando i canali degli ioni Ca^{2+} (Varga et al., 1996). Di recente è stata dimostrata una correlazione inversa tra la concentrazione nel terreno di juglone e l'attività H^{+} -ATPasi nella membrana plasmatica delle radici di soia e mais (Hejl & Koster, 2004). La miricitrina ed l'HJG sono inoltre i due principali marcatori fenolici nel processo di ringiovanimento dei tessuti di noce; promuovono infatti la divisione e l'elongazione cellulare (Jay-Allemand et al., 1990; Claudot et al., 1997).

Infine, lo juglone ed il suo precursore HJG sembrano essere coinvolti nei meccanismi di difesa della pianta contro patogeni quali funghi e batteri, anche se i risultati sono spesso contrastanti. Come descritto da Mahoney et al., (2000), quattro differenti naftochinoni con una crescente complessità strutturale (1,4-naftochinone, juglone, 2-metil-1,4-naftochinone, plumbagina), presenti nel mallo delle specie *Juglans*, ritardano la germinazione dell'*Aspergillus flavus* ed in concentrazione elevate inibiscono la sua crescita e la successiva sintesi di aflatossine. Allo stesso modo, alti livelli di juglone in pecan (*Carya illinoensis*), specie appartenente alla famiglia delle *Juglandaceae*, sarebbero correlati ad una minore incidenza della scabbia fogliare causata dal fungo *Cladosporium caryigenum* (Hedin et al., 1979; Gottwald, 1982). Tuttavia uno studio successivo su 16 differenti varietà di pecan non ha evidenziato alcuna correlazione tra elevati livelli costitutivi di juglone e di HJG nelle foglie ed immunità o resistenza al patogeno *C. caryigenum* (Gueldner et al., 1994). Parallelamente Radix et al. (1998) hanno ipotizzato un diretto coinvolgimento dello juglone e dell'HJG nei meccanismi di resistenza alla batteriosi causata da *Xanthomonas campestris* in *J. regia*. La concentrazione dei fenoli nel mallo varia durante il processo di maturazione del frutto, con picchi massimi nei primi stadi di sviluppo in corrispondenza della zona apicale. Lo juglone e l'HJG sono particolarmente abbondanti proprio nella zona che circonda lo stigma, considerato il punto d'accesso del batterio (Radix et al. 1994). Tuttavia, recenti studi sulle variazioni stagionali dei flavonoidi, acidi fenolici e chinoni in frutti e gemme di quattro varietà di noce europeo con differente suscettibilità alla batteriosi, suggeriscono il possibile coinvolgimento dell'acido ellagico e del 1,4-naftochinone nei meccanismi di difesa della pianta invece dello juglone e HJG (Solar et al., 2006a, b).

Analogamente Cline & Neerly (1983) hanno individuato una possibile correlazione tra la quantità di juglone sintetizzato durante il processo di maturazione delle foglie ed la resistenza

parziale al fungo *Gnomonia leptostyla* (antracnosi) tipica di tutte le foglie ontogeneticamente immature in *J. nigra*. Il numero di lesioni ed la quantità di acervuli prodotti, infatti, aumenta con dell'età delle foglie, mentre la concentrazione dello juglone e di HJG diminuisce progressivamente. Una concentrazione di juglone pari a 4,00-5,00 µg/ml (ED₅₀) è sufficiente ad inibire del 50% la crescita del micelio fungino mentre l' HJG al contrario stimola la crescita del fungo fino ad una concentrazione di 750 µg/ml e la inibisce di appena il 10 % passando ad un valore di 1000 µg/ml. Tuttavia, la concentrazione di juglone nelle foglie affette da antracnosi inaspettatamente diminuisce mentre i livelli di HJG aumentano, se confrontati con i valori riscontrati in foglie non-infette.

Sebbene non siano ancora noti i meccanismi che regolano la concentrazione di juglone ed HJG in foglie infette ed non-infette, Cline & Neerly (1983) ipotizzano in piante suscettibili una specifica interazione host-patogeno, che determini l'interruzione del processo di conversione dell'HJG in juglone. La riduzione dei livelli di juglone consentirebbe uno sviluppo più rapido del fungo e ne assicurerebbe la diffusione nel tessuto fogliare. Il maggiore ostacolo per la *Gnomonia leptostyla* sarebbe perciò rappresentato dalla sola quantità di juglone preformato, già presente nelle foglie durante i primi stadi dell'infezione. Tuttavia, come descritto in precedenza, lo studio del ruolo dello juglone nei meccanismi di difesa nel noce risulta complesso poichè. la sintesi dello juglone è legato anche alla risposta a differenti stress ambientali quali formazione di ferite, luce eccessiva o irraggiamento con UV (Bennett & Wallsgrove, 1994). Inoltre, Mielke et al., (2004) suggeriscono di non trascurare il differente “flashing time“ delle varietà: piante con una ripresa vegetativa tardiva possono infatti sfuggire parzialmente all'infezione primaria poiché, emettendo germogli in tarda primavera, presentano foglie ontogeneticamente immature, contenenti la quantità massima di juglone proprio durante il rilascio e la diffusione delle ascospore.

Tuttavia le scarse informazioni attualmente disponibili spingono a pensare che la comparsa di alcuni genotipi appartenenti alla specie *J. nigra* resistenti all'antracnosi sia da classificare come una “race-specific resistance” dovuta ad una interazione ligando- Receptor-like R gene che blocca la diffusione del patogeno nelle foglie.

1. 6. Scopi della tesi

Alla luce della forte diffusione dell'arboricoltura avuta in Italia nell'ultimo ventennio, ed in particolare l'importanza crescente assunta dal noce nell'ambito della politica nazionale e comunitaria, risulta opportuno incrementare il livello di conoscenze tecniche e scientifiche relative al genere *Juglans* spp. In particolare è forte l'esigenza di valorizzare il germoplasma di noce italiano, identificando, conservando *in situ* ed *ex situ* e valorizzando con opportuni programmi, genotipi che oltre a maggiore resistenza ad avversità abiotiche e biotiche (es. resistenza alle malattie) abbiano anche una buona potenzialità produttiva. Come riporta Ducci (1997), sebbene il noce abbia subito negli ultimi cinquanta anni un'erosione genetica determinata dal ripetuto utilizzo degli esemplari più pregiati, con un conseguente abbassamento del valore fenotipico del materiale di base residuo, non si può rinunciare alla selezione ed ai numerosi vantaggi che la stessa può offrire.

In questa ottica l'interesse dei "breeders" si è da tempo soffermato sull'ibrido *J. x intermedia* proprio per le sue numerose caratteristiche da legno pregiato. Sebbene sola la Francia (INRA, Station de recherches fruitières, villeneuve d'Ornon cedex) si sia intensamente impegnata nella produzione di tale ibrido (*NG23 x RA*), anche l'Italia dispone sia di ibridi interspecifici naturali sia di piante ibridogene di noce che meriterebbero di essere studiate e valorizzate.

Nell'ambito del Progetto RI.SELV.ITALIA, "Area 1-Risorse Genetiche Forestali", sottoprogetto 1.1. "Biodiversità e produzione di materiale vegetale da propagazione" sono stati individuati, in due distinti siti geografici, alcuni genotipi ideali per studi di miglioramento genetico del noce: Parco di Villa Mezzalira, località Bressanvido, Vicenza, Impianto Sperimentale "Azienda Ovale", Unità di Ricerca Forestale, Località Casalotti, Roma. Osservazioni preliminari basate su marcatori morfologici (CRA - Istituto Sperimentale per la Selvicoltura, Arezzo, 2002 -2004) e molecolari (CNR-IBAF, Porano 2005) hanno rivelato la presenza nel Parco di Villa Mezzalira di in una popolazione mista di noce (*J. nigra* e *J. regia*) e di alcuni potenziali ibridi interspecifici *J x intermedia*, ottenuti per libera impollinazione. Ricerche condotte presso Università della Tuscia di Viterbo (Prof. Nando Anselmi) sui genotipi presenti nell'Impianto Sperimentale Azienda Ovale hanno invece messo in evidenza una diversa sensibilità delle specie *J. nigra* e *J. regia* e *J. x intermedia* ad una serie di patogeni, incluso il fungo *Gnomonia Leptostyla*. In particolare le piante di noce comune e gli ibridi interspecifici di origine francese (*NG23 x RA*) presenti nell'Impianto Sperimentale Azienda Ovale risultano rispettivamente suscettibili e tolleranti all'antracnosi. Al contrario le piante di noce nero ivi cresciute sembrano essere tutte

omogeneamente resistenti agli attacchi della *Gnomonia leptostyla*, con la sola eccezione di un genotipo classificato come suscettibile (Annunziati, 2007).

Il parco di Villa Mezzalira perciò è stato eletto sito ideale per la selezione a posteriori di piante ibridogene *J. nigra* ed *J. regia* e dei loro ibridi interspecifici *J. x intermedia* di origine italiana, da destinate a programmi di arboricoltura da legno di pregio. Parallelamente l'impianto di noce Azienda Ovale è stato selezionato come sito ideale per lo studio sulla resistenza all'antracnosi nel genere *Juglans*. Risulta di fondamentale importanza comprendere se la resistenza alla *Gnomonia leptostyla* manifestata dalle piante *J. nigra* sia legata alle condizioni ambientali di crescita oppure abbia delle basi genetiche. L'analisi mediante marcatori funzionali strettamente associati ai geni Resistant (R) and Resistant-analogs (RAGs) sul germoplasma dell'impianto Azienda Ovale potrebbe fornire gli strumenti per la selezione marker assistita (MAS) di genotipi resistenti all'antracnosi anche nella popolazione di piante di noci del Parco di Villa Mezzalira.

Perciò gli obiettivi principali di questa tesi sono:

- “Fingerprinting” dei genotipi che compongono la popolazione mista di noce nel Parco di Villa Mezzalira tramite marcatori molecolari codominanti (microsatelliti nucleari) appositamente sviluppati ed ottimizzati per le due specie *J. regia* ed *J. nigra*. Caratterizzazione di ibridi interspecifici di noce di origine italiana da destinare a programmi di arboricoltura da legno di pregio.
- Selezione a posteriori di piante *J. regia* ed *J. nigra* ibridogene: “Parentage analysis” su famiglie half-sib ottenute per libera impollinazione di piante madri *J. nigra* con piante padri *J. regia* presenti nella popolazione del Parco di Villa Mezzalira.
- Analisi preliminare con marcatori funzionali strettamente associati ai geni Resistant (R) and Resistant-analogs (RAGs) per l'identificazione precoce di piante resistenti all'antracnosi (*Gnomonia leptostyla*): applicazione del NBS-profiling approach sulle piante *J. nigra*- resistente, *J. nigra*- suscettibile e *J. regia*- suscettibile presenti nell'impianto Sperimentale Azienda Ovale.

2. Marcatori SSRs per la caratterizzazione di *Juglans nigra* (L.), *Juglans regia* (L.) ed *Juglans x intermedia* (Carr.): caso studio in Italia.

2. 1. Introduzione

I microsatelliti, conosciuti anche come Simple Sequence Repeats (SSRs), sono corte sequenze di DNA ripetute (1-5 bp) presenti abbondantemente nel genoma degli organismi eucarioti (Tautz, 1989; Morgante & Olivieri 1993). Tali marcatori si ottengono per amplificazione specifica (PCR reaction) di un singolo locus di DNA contenente motivi microsatellitari ripetuti (es. AT), mediante primers complementari alle sequenze fiancheggianti il sito bersaglio (fig. 16); sono marcatori codominanti, caratterizzati da ereditabilità Mendeliana, ipervariabilità, elevata riproducibilità. Queste caratteristiche rendono i marcatori microsatelliti un utile strumento per numerose applicazioni in genetica forestale. Nell'ultimo decennio sono stati utilizzati in mapping genomico (es. pino marittimo: Ritter et al. 2002; *Vitis vinifera*: Adam-Blondon et al. 2004), parentage analysis (Streiff et al. 1999; Tabbener and Cottrell 2003), in studi di diversità genetica e flusso genico (Godoy and Jordano 2001; van der. Schoot 2000) ed infine per fingerprinting molecolari di cloni ed ibridi (Gomez et al. 2001; Bekkaoui F. et al. 2003; Nandakumar et al. 2004). L'ostacolo maggiore all'uso dei microsatelliti è rappresentato dal costo, in tempo e denaro, richiesto per il loro sviluppo; l'introduzione di sequenziatori automatici e di librerie arricchite tuttavia ha reso il processo più efficiente e rapido.

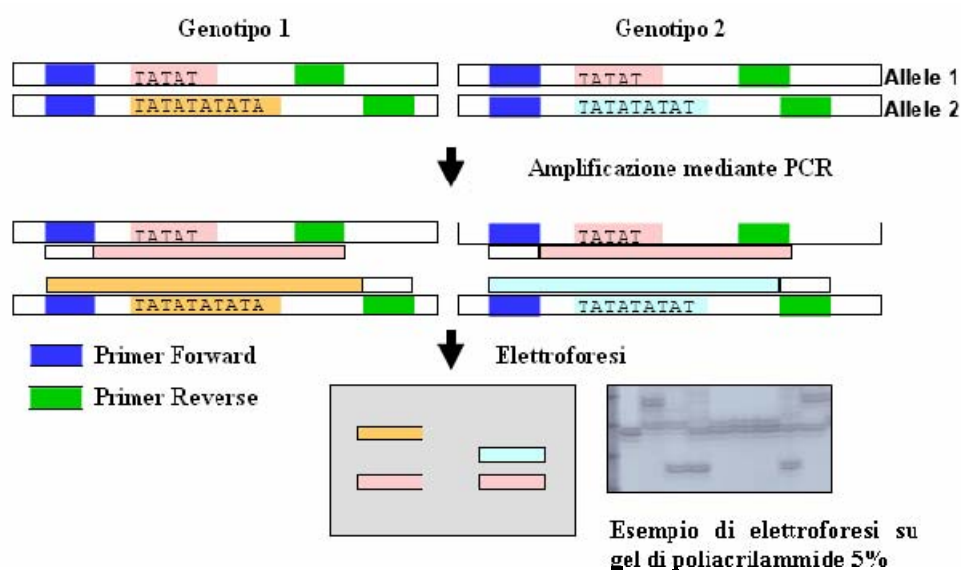


Figura 16. Gaudet, 2006.

Una coppia di primer (forward, e reverse) utilizzati per amplificare uno specifico SSR mediante Polymerase Chain Reaction. L'elevata variabilità delle regioni microsatellitari consente di amplificare e visualizzare numerosi alleli.

Con il trascorrere del tempo l'accumulo massivo di informazioni molecolari in database pubblici ha favorito la diffusione dei marcatori SSRs, consentendo anche il loro trasferimento tra genomi dello stesso genere (Davierwala et al 2000; Di Gaspero et al. 2000; Gutierrez et al. 2005). Inoltre la disponibilità di mappe genetiche ha reso possibile effettuare studi di comparative mapping tra piante filogeneticamente correlate (Marques et al. 2002; Barreneche et al 2004).

Recentemente Woeste et al., (2002) ha sviluppato e messo a punto nella specie *J. nigra* un gruppo di trenta microsatelliti nucleari alcuni dei quali sono stati usati con successo per l'identificazione clonale / parentale (Robichaud et al., 2006) e studi sulla struttura genetica di popolazioni di noce nero provenienti dal Central Hardwood Region negli Stati Uniti (Victory et al., 2006). Un subset di tali marcatori è stato selezionato ed applicato anche in *J. regia* per caratterizzare alcune cultivars di noce (Dangl et al., 2005), la varietà Sorrento (Foroni et al., 2005) e per l'analisi preliminare di alcuni ibridi *J. x intermedia* Carr. (Pollegioni et al., 2006). Tuttavia Peakall et al., (1998) ha dimostrato che il successo nell'amplificazione degli SSRs in due specie diverse non implica il mantenimento della regione microsatellitare nella specie non-source. Pertanto, studi che riguardano l'amplificazione di microsatelliti in specie diverse dovrebbero essere sempre accompagnati dalla conoscenza della sequenza di DNA dei loci in esame. Come per molte altre specie forestali, uno studio dettagliato sulla trasferibilità dei marcatori microsatellitari in *Juglans* spp. non è ancora disponibile.

Perciò in base a quanto suddetto, la ricerca si è articolata in tre distinte fasi: (a) selezione ed applicazione di un subset di marcatori SSR nucleari per l'identificazione di piante *J. nigra*, *J. regia* e ibridi *J. x intermedia* collezionate nel Parco di Villa Mezzalira, Bressanvido (VI) ((b) individuazione preliminare di genotipi *J. nigra* in grado di ibridarsi spontaneamente con *J. regia* (piante ibridogene) ed infine (c) studio della trasferibilità dei loci SSR utilizzati mediante analisi di sequenza dei frammenti amplificati nel noce nero e nel noce comune. Tale analisi hanno anche permesso di verificare se le differenze alleliche interspecifiche individuate fossero dovute semplicemente a cambiamenti nel numero di unità ripetute oppure a delezioni e/o inserzioni nelle regioni fiancheggianti il microsatellite.

2. 2. Materiale e Metodi

2. 2. 1. Materiale (Parco di Villa Mezzalira)

Negli ultimi sei anni l'Istituto di Biologia Agro-ambientale e Forestale (CNR-IBAF) di Porano (TR) e l'Istituto Sperimentale per la Selvicoltura (CRA-ISSA-) di Arezzo, si sono impegnati in un'ampia attività di monitoraggio e di salvaguardia del germoplasma di noce in Italia (Progetto

RI.SELV.ITALIA). In quest'ambito si è intrapreso lo studio di piante *J. nigra*, *J. regia* ed ibridi naturali *J. x intermedia* presenti all'interno del Parco di Villa Mezzalira, località Bressanvido, Vicenza (regione Veneto, 45° 39' 0" N, 11° 38' 0" E; fig. 17)

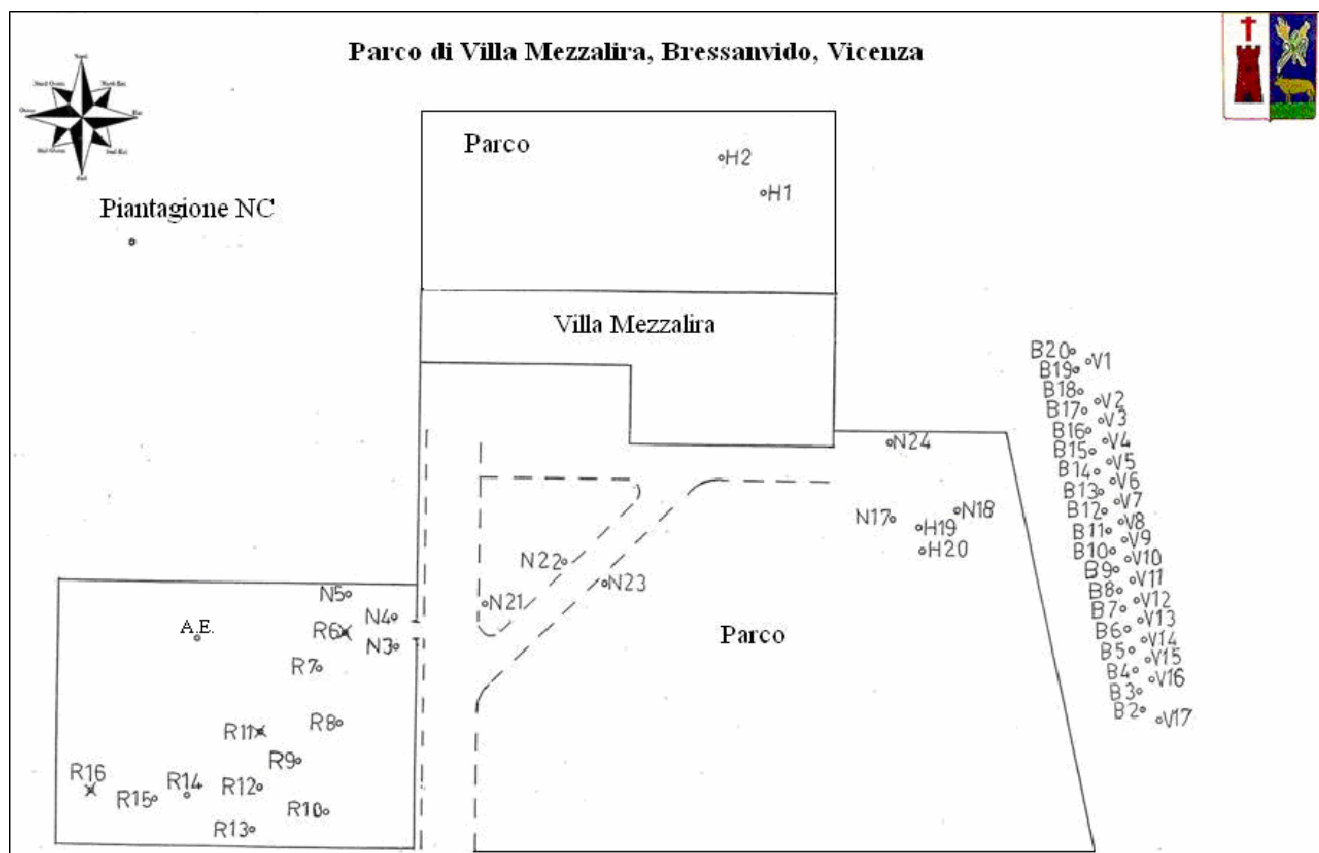


Figura 17. Mappa del Parco di Villa Mezzalira, Località Bressanvido, Vicenza, Veneto.

Nella primavera del 2003 sono state campionate foglie mature da un totale di 138 piante e conservate a -80° fino al momento dell'analisi. Osservazioni basate su marcatori morfologici effettuate dal 2002 al 2004 presso il CRA ISSA, ed una preliminare analisi genetica mediante marcatori RAPDs ed ISSRs su DNA genomico (Pollegioni et al., 2006) hanno permesso la classificazione di 49 individui noci-*J. regia*, 82 genotipi noci-*J. nigra* e 7 piante potenzialmente ibride *J. x intermedia*. Nel dettaglio sono state prese in esame sessanta piante adulte presenti nel Parco di Villa Mezzalira (fig. 17): 49 genotipi *J. regia* (R6-R16, H20, A.E, vicino alla villa; B2-B20, V1-V17 vicino al muro di cinta), 8 genotipi *J. nigra* (N3, N4, N5, N17, N18, N21, N22, N23) e 3 possibili ibridi (H1, H2, H19). Inoltre sono state campionate 63 piante, ottenute da seme raccolto nel Parco nell'autunno 2002, e conservate attualmente nel vivaio regionale Montecchio Precalcino, Vicenza: 59 genotipi *J. nigra* (N25-N83) e 4 ibridi putativi (IMP3, IMP4, IMP9, IMP18). Per avere un campione quanto più rappresentativo possibile della nube pollinica esistente nel sito di ricerca, è stato incluso nell'analisi anche un gruppo di 15 alberi di noce nero, piantati al di fuori del perimetro del Parco nel XIX secolo. Queste piante sono state

indicate come *J. nigra*-NC (NC4, NC6-NC11, NC13, NC15, NC16, NC19, NC21-NC24) per distinguerle dal restante germoplasma.

2. 2. 2. Estrazione del DNA genomico

Dopo aver polverizzato le foglie di ogni campione mediante macinazione meccanica in azoto liquido (mortaio e pestello), è stato estratto il DNA genomico mediante il DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Questo Column Kit consente l'estrazione e la purificazione rapida di una elevata qualità di DNA genomico in circa 24 h. La presenza e la qualità del DNA genomico estratto è stata monitorata effettuando un'elettroforesi su gel d'agarosio 1% in 0.5 x TBE. La quantità di DNA è stata determinata invece mediante analisi spettrofotometrica a 260nm di lunghezza d'onda e portata ad una concentrazione finale di 5 ng / μ L.

2. 2 .3. SSR analisi

In tutti i campioni collezionati sono stati amplificati dieci loci microsatellitari (tab. 2) sviluppati per *J. nigra* da Woeste et al. (2002) e successivamente selezionati per analisi molecolari in *J. regia* (Dangl et al., 2005; Pollegioni et al., 2006). Il primer forward di ogni locus è stato marcato con fluorescenza all'estremità 5': NED (giallo) per WGA1, WGA9, VIC (verde) per WGA4, WGA69, WGA202, WGA321, e FAM (blù) per WGA89, WGA118, WGA276, WGA331, corrispondente alla matrice D del ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

Ogni amplificazione PCR è stata effettuata usando un volume totale di 20 μ L, contenente 20 ng di DNA genomico, 10mM di Tris-HCl pH 8, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200 μ M di ogni dNTP, 0.2 μ M di ogni primer, 0.008 μ g di BSA, 0.4 U di Taq Polymerase (Boehringer Mannheim). Il programma di amplificazione, effettuato su una GENEamp PCR System 9700, consiste in una iniziale denaturazione del DNA per 5 minuti a 94°C, seguita da 35 cicli, ognuno costituito da 45 secondi a 94°C, 45 secondi alla temperatura ottimale di annealing per ciascun primer (tab. 1), quindi 1 minuto a 72°C. L'amplificazione termina con l'estensione finale di 7 minuti a 72°C.

Per controllare la validità del processo e determinare approssimativamente la misura del frammento ottenuto, è stata analizzata un'aliquota di 5 μ L del prodotto amplificato mediante elettroforesi su gel d'agarosio 1.8% in 0.5 x TBE, seguita da colorazione con bromuro d'etidio (1 μ g/1mL). Per determinare l'esatta dimensione del frammento microsatellitare, il DNA amplificato è stato diluito 1:10 in acqua, quindi 1 μ L di tale soluzione è stato mescolato con 0.3 μ L di 500bp internal-lane size standard (Gene ScanTM-500 ROX, Applied Biosystem) e 9.7 μ L

di formammide pura deionizzata; la soluzione mix ottenuta è stata denaturata a 95°C per 5 minuti e poi immediatamente raffreddata in ghiaccio.

Tabella 2. Lista dei dieci microsatelliti nucleari sviluppati da una libreria genomica arricchita per le sequenze (GA/CT) nella specie *Juglans nigra* da Dr. Keith Woeste della Purdue University, USA. Per ogni SSR viene riportato il numero di unità ripetute, la lunghezza attesa del frammento (expected size), la temperatura di annealing (Ta) ed il GeneBank accession number.

Locus SSR	Sequenza del primer (5' → 3')	Motivo Ripetuto	Expected size (bp)	Ta (°C)	GeneBank accession number
WGA1	F: ATTGGAAGGGAAGGGAATG R: CGCGCACATACGTAAATCAC	(GA) ₅ GCA(GA) ₃ GCA(GA) ₃	183	53	AY465952
WGA4	F: TGTTCATTGACCCACTTGT R: TAAGCCAACATGGTATGCCA	(GT) ₅ (GA) ₁₅ (GA) ₁₁	241	53	AY465953
WGA9	F: CATCAAAGCAAGCAATGGG R: CCATTGGTCTGTGATTGGG	(GA) ₁₆	247	55	AY465954
WGA69	F: TTAGATTGCAAACCCACCCG R: AGATGCACAGACCAACCCTC	(GA) ₄ ATATAA(GA) ₁₆	182	58	AY333953
WGA89	F: ACCCATCTTTCACGTGTGTG R: TGCCTAATTAGCAATTTCCA	(GT) ₁₃ (GA) ₂₁	216	55	AY352440
WGA118	F: TGTGCTCTGATCTGCCTCC R: GGGTGGGTGAAAAGTAGCAA	(GA) ₁₈ (GT) ₁₁	222	55	AY479958
WGA202	F: CCCATCTACCGTTGCACTTT R: GCTGGTGGTCTATCATGGG	(GA) ₂₀	229	58	AY479959
WGA276	F: CTCACCTTCTCGGCTCTTCC R: GGTCTTATGTGGGCAGTCGT	(GA) ₁₄	156	63	AY479961
WGA321	F: TCCAATCGAACTCCAAAGG R: TGTCCAAAGACGATGATGGA	(GA) ₁₄	236	53	AY479962
WGA331	F: TCCCCCTGAAATCTTCTCCT R: CGGTGGTGTAAGGCAAATG	(GA) ₁₃	187	53	AY479963

I frammenti PCR amplificati sono stati separati e visualizzati mediante elettroforesi capillare in un ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem); i parametri di corsa utilizzati sono quelli di default riportati sul manuale (GenScan36_Pop4 Default Module).

2. 2. 4. Analisi di sequenza

Per ogni locus microsatellitare, usando i corrispondenti primers forward e reverse (tab. 1), sono stati sequenziati due alleli, uno *J. nigra* specifico e l'altro *J. regia* specifico. Per il locus WGA331 sono stati analizzati due alleli addizionali di differente lunghezza per confermare la variazione di sequenza osservata nelle regioni fiancheggianti il microsatellite tra il noce nero e il noce comune. Le reazioni di PCR sono state effettuate impiegando genotipi omozigoti per l'allele d'interesse; il prodotto d'amplificazione è stato visualizzato su gel d'agarosio 1.8% in 0.5 x TBE. I frammenti amplificati sono stati direttamente purificati mediante QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN) ed utilizzati come DNA stampo per le reazioni di sequenza. Il volume di reazione totale di 20 µL contiene 1.5 µL di DNA stampo, 2 µL di 5X BigDye

Terminator v. 1.1 Buffer, 4 µL di BigDye Terminator v. 1.1 Ready Reaction Mastermix (Applied Biosystem), e 0.2 µM di primer, forward o reverse. Il profilo d'amplificazione per le reazioni di sequenza, effettuato su una GENEamp PCR System 9700, è stato il seguente: 1 minuto a 96°C seguito da 25 cicli, ognuno costituito da 10 secondi a 96°C, 5 secondi a 50°C e 4 minuti a 60°C. I prodotti di sequenza amplificati sono stati successivamente purificati mediante SpinColumns Kit (Princeton / Applied Biosystem) ed analizzati in un ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem); i parametri di corsa utilizzati sono quelli di default riportati sul manuale (UltraSeq36Pop4 Default).

2. 2. 5. Analisi citologica

Dalle piante oggetto d'analisi, sono stati collezionati fiori maschili in via di sviluppo ad un stadio sufficientemente precoce da permettere l'analisi citologica. Le gemme sono state poste in una soluzione fissativa (acido acetico glaciale: etanolo assoluto = 1:3) subito dopo aver effettuato il campionamento. La soluzione è stata più volte rinnovata nel corso di 24 h a temperatura ambiente. Successivamente la soluzione fissativa è stata sostituita con etanolo al 70% e il materiale conservato a -20°C. Le cellule polliniche in via di sviluppo, sono state osservate al microscopio dopo aver effettuato la classica colorazione con carminio acetato.

2. 2. 6. Analisi statistica dei frammenti SSR

I dati dei frammenti SSR amplificati sono stati raccolti mediante Gene Scan Analysis version 3.7 Software (Applied Biosystem), mentre i profili genotipici sono stati assegnati con l'aiuto del Genotyper version 3.7 NT Software (Applied Biosystem). La matrice dei marcatori SSR è stata costruita secondo il codice binario, cioè rilevando la presenza (1) o l'assenza (0) di un allele. L'uso del codice binario ha permesso di includere in tale analisi anche un campione rivelatosi poliploide. Per ogni coppia di campioni è stato calcolato il coefficiente di similarità genetica Simple Match (SM- Sokal & Sneath 1963), allo scopo di valutare le relazioni genetiche esistenti tra i genotipi collezionati. Il Simple Match Coefficient assume valori compresi tra 1 (identità totale tra due campioni) e 0 (assenza di similarità) e viene calcolato attraverso la seguente formula:

$$\text{Simple Match coefficient(SM)} = (a + d) / n$$

a = il numero di volte in cui si ha la contemporanea presenza del *i*-esimo allele

d = il numero di volte in cui si ha la contemporanea assenza del *i*-esimo allele

n = il numero totale di campioni

Sulla corrispondente matrice SM è stata poi condotta l'Analisi delle Coordinate Principali (PcoorA), per visualizzare le distanze genetiche relative dei campioni in un plot bi-dimensionale. (ROLF's 2001, NTSYSpC version 2.1 software package). Tale analisi, definita anche "Metric multidimensional scaling", consente infatti di ricostruire le posizioni relative dei campioni partendo dalla loro matrice di similarità / dissimilarità/ distanza genetica e di ordinarli in un spazio a due e/o tre dimensioni (Gower, 1966). Dopo aver rimosso dalla matrice SSR il campione poliploide, sono stati calcolati per ogni locus i tradizionali indici di diversità genetica: numero di alleli per locus (N_a), numero effettivo di alleli (N_e), eterozigosità osservata (H_o) ed attesa (H_E).

L'eterozigosità osservata (H_o) è la frazione degli individui eterozigoti per locus.

$$H_o = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2 \quad \text{con } i = 1 \dots m$$

m = numero alleli per locus, x_i = frequenza osservata dell' i -esimo allele

L'eterozigosità attesa (H_E) è la frazione di individui eterozigoti attesa in base all'equilibrio di Hardy-Weinberg per locus.

$$H_E = 1 - \sum p_i^2$$

p_i = frequenza attesa dell' i -esimo allele sulla base dell' all'equilibrio di Hardy-Weinberg.

Il numero effettivo di alleli (N_e) è il reciproco della frequenza degli omozigoti osservati

$$N_e = 1 / (1 - H_o)$$

Per individuare eventuali deviazioni dall'equilibrio di Hardy – Weinberg e verificare il linkage disequilibrium tra i loci SSR sono stati applicati rispettivamente il test del χ^2 (Hedrick 2000) ed il g-square test (Weir et al., 1979).

Mediante l'Analisi della Varianza Molecolare (AMOVA-Excoffier et al., 1992) sono stati calcolati due differenti coefficienti di differenziazione genetica tra gruppi (o subpopolazioni), sviluppati su due differenti modelli evolutivi dei loci: il coefficiente F_{st} di Wright (1951), basato sull' Infinite Alleles Mutation Model of loci (IAM, Kimura & Crow, 1964), ed il coefficiente R_{st} di Slatkin (1995) che invece prende in considerazione il Stepwise Mutation Model (SMM, Kimura & Ohta, 1978).

- ❖ Secondo il tradizionale modello IAM, ogni mutazione nel DNA genera un nuovo allele con una frequenza pari a μ . Questo modello perciò non contempla casi di omoplasia (carattere che compare in differenti taxa in maniera indipendente e non derivante da un antenato comune): alleli uguali provengono da un comune antenato e sono identici per discendenza (Identical By Descent). Sulla base di tale modello Wright (1951) ha così definito il coefficiente F_{st} :

$$F_{st} = (H_T - H_S) / H_T$$

H_T = eterozigosità attesa nella popolazione totale (sommando tutti i campioni di tutte le subpopolazioni).

H_S = eterozigosità media attesa su tutte le subpopolazioni

Il coefficiente F_{st} misura l'eccesso di omozigoti dovuto alla frammentazione della popolazione totale dei campioni in tante piccole subpopolazioni.

- ❖ Il modello SMM sembra riflettere in maniera più accurata il meccanismo di mutazione dei loci microsatellitari. Secondo tale modello ogni nuovo allele è il risultato dell'aggiunta o la delezione di una singola unità ripetuta di DNA, con una identica probabilità ($\mu / 2$) nelle due direzioni. Questo modello ammette l'omoplasia per cui alleli sono identici per stato (Identical In-State) ma non per discendenza. In generale, più due alleli differiscono in lunghezza (bp) più sono geneticamente distanti. Il coefficiente R_{st} di Slatkin (1995) basato sul modello SMM e specifico proprio per i marcatori SSR, viene così calcolato:

$$R_{st} = (S - S_w) / S$$

S = Differenze quadratiche medie in lunghezza (bp) tra tutte le possibili coppie di alleli.

S_w = Differenze quadratiche medie in lunghezza (bp) tra le coppie di alleli all'interno di ogni subpopolazione

Come suggerito da Excoffier et al., (1992), è stata determinata la significatività statistica dei valori F_{st} e R_{st} mediante 1000 permutazioni. Inoltre l'AMOVA analisi ha consentito di calcolare la percentuale di varianza molecolare spiegata tra ed entro gruppi. Tutte le analisi sono state eseguite mediante GenAlEx version 6. Software (Peakall and Smouse, 2005), NTSYSpc version 2.1 Software (Rolfh, 2001) ed POPGENE version 1.32 programme (Yeh & Boyle 1997; <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>).

2. 2. 7. Analisi statistica delle sequenze SSR

Le sequenze dei frammenti SSR sono state analizzate mediante Sequence analyzing Software 3.7 (Applied Biosystem), visualizzate mediante Chromas ver. 2.31 Software (www.technelysium.com.au) ed allineate con CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) multiple alignment package (Thompson et al., 1994).

Per confermare la trasferibilità dei loci microsatellitari e stimare la variabilità nelle regioni fiancheggianti il microsatellite all'interno della specie *J. nigra* e tra *J. nigra* e *J. regia*, sono state comparate le sequenze nucleotidiche ottenute, con il non-redundant (nr) Viridiplantae database (GeneBank database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante l'analisi BLAST (blastn). Inoltre,

per determinare se le regioni fiancheggianti i microsatelliti presentavano una significativa omologia di sequenza con geni noti, le sequenze di noce sono state confrontate con il database genomico del *Populus trichocarpa* (<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html>). Il *Populus* genome assembly 1.0 database include sia la mappa fisica che genetica del pioppo e consente l'allineamento con il genoma di *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*. In questo caso le analisi BLAST sono state condotte sia usando la sequenza nucleotidica sia quella aminoacidica (tre possibili translazioni amminoacidiche); è stata impiegata l'intera sequenza dei corrispondenti cloni disponibili sul database pubblico NCBI dopo aver filtrato le regioni a bassa complessità. Tutti i match BLAST con un expect value $E > 1.0E^{-05}$ sono stati eliminati.

2. 3. Risultati

2. 3. 1. Analisi di fingerprinting

Tutti i dieci microsatelliti hanno amplificato in entrambe le specie producendo frammenti di lunghezza variabile (tab. 4). In totale, sono stati amplificati 112 alleli con una media di 11.2 alleli per primer, da un massimo di 20 per il locus WGA276 ad un minimo di 8 per il locus WGA69.

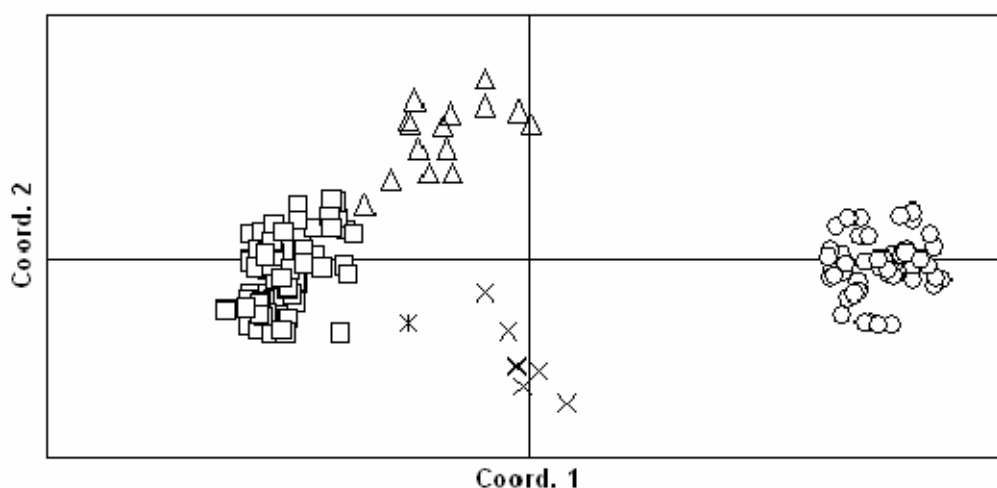


Figura 18. Analisi delle Coordinate Principali di 138 individui *Juglans* basata sui valori di similarità genetica calcolata per ogni coppia di campioni (SM – simple match coefficient) mediante 10 loci SSR. ○ *J. regia*, □ *J. nigra* N, △ *J. nigra* NC, * genotipo N21, ed × potenziali ibridi *Juglans x intermedia* Carr. (H1, H2, H19, IMP3, IMP4, IMP9 IMP18).

L'Analisi delle Coordinate Principali condotta sulla matrice SM coefficient sulla base dei 112 alleli, ha suddiviso i 138 genotipi totali in quattro distinti gruppi (fig. 18). La prima Coordinata Principale, che spiega il 34.23 % della varianza, ha separato nettamente le due specie *J. nigra* e *J. regia*. La seconda Coordinata Principale, responsabile del 6,08% della varianza, ha suddiviso i

campioni di noce nero in due sub-gruppi. Le piante *J. nigra* NC, collezionate al di fuori del Parco di Villa Mezzalira, formano un gruppo vicino ma separato dal restante germoplasma *J. nigra* N, perciò risultano geneticamente distinti dagli alberi di noce nero campionate all'interno del Parco. I potenziali ibridi interspecifici *Juglans x intermedia* (H1, H2, H19, IMP3, IMP4, IMP9 IMP18) non sono inclusi in nessuno dei gruppi precedentemente descritti, ma si pongono in una posizione intermedia tra il noce nero ed il noce comune. Infine la pianta N21 posta all'interno del Parco, classificata per i tratti morfologici come *J. nigra*, si è sorprendentemente posizionata tra il gruppo *J. nigra* N ed i sette ibridi interspecifici H ed IMP.

I valori di differenziazione genetica F_{st} (Wright, 1965) e R_{st} (Slatkin, 1995) calcolati mediante AMOVA analisi (tab. 3) riflettono la diversità molecolare tra gruppi visualizzata nella figura 3. La più grande distanza inter-popolazione è stata riscontrata tra i due clusters *J. nigra* N e *J. regia* ($R_{st} = 0.958$; $F_{st} = 0.432$). Al contrario la differenziazione genetica più bassa è stata registrata tra i due subgruppi del noce nero, *J. nigra* N e *J. nigra* NC applicando la statistica R_{st} (0.093) e tra *J. nigra* NC ed i sette genotipi ibridi diploidi usando la statistica F_{st} (0.174).

Tabella 3. Misure della differenziazione genetica tra quattro popolazioni (*J. nigra* N, *J. nigra* NC, *J. regia*, Ibridi diploidi) in *Juglans* usando il coefficiente F_{st} (Wright, 1965) e R_{st} (Slatkin's, 1995). I valori di F_{st} e R_{st} sono riportati al di sotto della diagonale, il test di significatività basato su 1000 permutazioni, al di sopra della diagonale.

Valori Pairwise Population F_{ST}					Valori Pairwise Population R_{ST}			
<i>J. nigra</i> N	<i>J. nigra</i> NC	<i>J. regia</i>	Ibridi 2n		<i>J. nigra</i> N	<i>J. nigra</i> NC	<i>J. regia</i>	Ibridi 2n
-	0.001	0.001	0.001	<i>J. nigra</i> N	-	0.001	0.001	0.001
0.216	-	0.001	0.001	<i>J. nigra</i> NC	0.093	-	0.001	0.001
0.432	0.295	-	0.001	<i>J. regia</i>	0.958	0.933	-	0.001
0.197	0.174	0.220	-	Ibridi 2n	0.735	0.420	0.680	-

Secondo l'AMOVA analisi, applicando la statistica R_{st} di Slatkin (1995), il 90% della varianza molecolare è imputabile a differenze tra gruppi, mentre soltanto il 10% è dovuta a diversità individuale delle piante entro ogni gruppo. Usando la statistica F_{st} di Wright (1965) invece la ripartizione della varianza molecolare è del 35% tra gruppi ed del 65% all'interno dei gruppi.

Un'analisi dettagliata dei 112 alleli totali ha rivelato che solo 8 alleli sono presenti sia nel noce comune sia nel noce nero e per questo sono stati indicati come "alleli comuni". I 104 alleli restanti (92.86%) sono stati classificati come "alleli specie - specifici" poiché 68 (60.7%) amplificano solo in *J. nigra* e 36 (32.1%) solo in *J. regia* (tab. 4). In quasi tutti i loci, il numero degli alleli *J. nigra* - specifici è superiore a quello degli alleli *J. regia* - specifici. Tuttavia queste differenze diminuiscono considerevolmente se il numero di alleli specie - specifici viene normalizzato con le dimensioni del campione (tab. 4).

Alti livelli di variabilità sono stati riscontrati nei loci microsatellitari considerati: il numero di alleli per locus (N_a), numero effettivo di alleli (N_e), eterozigosità osservata (H_o) ed attesa (H_E)

sono riportati in tabella 5. In nessuna delle due specie è stato rilevato linkage disequilibrium tra loci né alcuna deviazione significativa dall'equilibrio di Hardy-Weinberg. Questo sta a significare che i dieci loci microsatellitari potrebbero essere localizzati su cromosomi distinti oppure sullo stesso cromosoma ma ad una distanza > 50 cM. Nei loci WGA118, WGA276 e WGA331 il “size range” degli alleli *J. nigra* – specifici non si sovrappone con quello dei corrispondenti alleli *J. regia* – specifici. In tali loci infatti sono state rilevate differenze significative tra le due specie nelle dimensioni degli alleli (in paia di basi).

Come atteso, nei loci WGA4, WGA118, WGA202, WGA276, WGA321, WGA331 il profilo genotipico di ciascun ibrido diploide (*J. nigra* x *J. regia*) presenta un allele *J. nigra* – specifico e un allele *J. regia* – specifico; in tre loci, WGA1, WGA9, WGA89, uno o due alleli specifici sono stati sostituiti da uno o due alleli comuni (tab. 5).

Questa dettagliata analisi di fingerprinting ha permesso anche di definire la natura del genotipo N21 (tab. 6). La presenza di un allele comune *J. regia*-specifico e di due alleli comuni *J. nigra*-specifici nei 6 loci WGA1, WGA4, WGA89, WGA118, WGA202, WGA276, nonché di un allele comune *J. regia*-specifico e di un allele comune *J. nigra*-specifico nei restanti quattro loci WGA9, WGA69, WGA321, WGA331, ha permesso di classificare tale campione come pianta ibrida triploide, caratterizzata da due terzi del corredo cromosomico *J. nigra* ed un terzo *J. regia*. Per il locus WGA69 nessun ibrido, né diploide né il triploide, mostra alleli *J. regia* - specifici ma solo alleli *J. nigra* – specifici. Gli alleli osservati, grandezza 169-180 bp per *J. nigra* ed 159-180 bp per *J. regia*, si sovrappongono e perciò un'eventuale vantaggio nell'amplificazione dei frammenti più corti non può spiegare la presenza di un allele nullo negli ibridi. Probabilmente la

mancata amplificazione dell'allele *J. regia* – specifico potrebbe essere il risultato di una mutazione nelle regioni fiancheggianti il microsatellite che ha cambiato solo in *J. regia* l'affinità dei primers ai siti d'annealing.

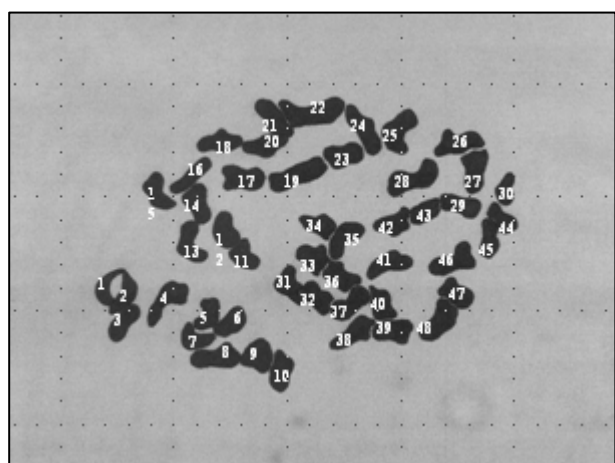


Figura 19. Visualizzazione dei 48 cromosomi (3n) presenti in una cellula materna di polline in divisione mitotica pre-meiotica nella pianta ibrida triploide N21.

Infine, l'analisi di maternità sui sette ibridi diploidi, mediante “exclusion method” (basato sulle leggi Mendeliane dell'ereditabilità), ha indicato il genotipo N17 (una delle otto piante *J. nigra*

fisicamente presenti all'interno del Parco) come unica possibile madre ibridogena di questa popolazione (tab. 6).

La conta cromosomica effettuata su cellule materne di polline in divisione mitotica pre-meiotica degli ibridi ha confermato i risultati del genotyping: il numero di cromosomi somatici è risultato diploide ($2n = 32$) per i sette ibridi H1, H2, H19, IMP3, IMP4, IMP9, IMP18, e triploide ($3n = 48$) per la pianta N21 (fig. 19).

2.3.2. Confronto delle sequenze SSR

Per confermare la trasferibilità dei 10 marcatori microsatelliti e stimare le variazioni nelle regioni fiancheggianti il microsatellite all'interno della specie *J. nigra* (a tal fine i due subgruppi *J. nigra* N e *J. nigra* NC sono stati riuniti) e tra *J. nigra* e *J. regia*, sono state effettuate le analisi di sequenza del DNA dei frammenti amplificati. In questo modo è stato possibile comprendere le ragioni alla base delle grandi differenze in "size range" tra *J. nigra* ed *J. regia* nei loci WGA118, WGA276, WGA331 e investigare sulla presenza di un potenziale allele nullo nel locus WGA69 degli ibridi.

Mediante BLASTn sono stati comparati i siti bersaglio dei primers, le regioni fiancheggianti il microsatellite ed i motivi ripetuti del noce comune e del noce nero con le corrispondenti sequenze consenso di *J. nigra* disponibili nel database pubblico NCBI. Sono state osservate differenze più o meno ampie nel numero di transizioni e transvezioni in ciascun locus (tab. 7). In tutti i frammenti sequenziati è stata individuata la regione microsatellitare ripetuta e catalogata in tre modi possibili: SSR puro (WGA9, WGA202, WGA276, WGA321, WGA331), SSR puro composto (WGA4, WGA89, WGA118) ed SSR interrotto (WGA1, WGA69). Unica differenza tra le due specie in esame è rappresentato dal microsatellite WGA1, interrotto in *J. nigra* $[(GA)_{15}G(GA)]$ e puro in *J. regia* $[(GA)_{12}]$. In entrambe le specie e in tutti i loci considerati, le regioni fiancheggianti il microsatellite hanno mostrato una significativa omologia con le corrispondenti sequenze consenso *J. nigra* su cui originariamente erano stati disegnati i primer forward e reverse ($E\text{-value} \leq 3e^{-27}$). In particolare i microsatelliti WGA1, WGA4, WGA9, WGA69, WGA89, WGA118, WGA276 e WGA321 presentano un'elevata percentuale d'identità con le sequenze consenso nelle regioni fiancheggianti la regione SSR (da 100% a 95% per *J. nigra* e da 98% a 90% per *J. regia*). In questi loci, il numero di mutazioni puntiformi e di mutazioni per delezione/inserzione è molto basso; le differenze in lunghezza (bp) tra alleli sono principalmente dovute a variazioni nelle regioni ripetute (tab. 7).

Tabella 4. Lista degli alleli microsatellitari amplificati nei 138 genotipi totali: alleli *J. nigra* – specifici (unendo i due subgruppi *J. nigra* N ed *J. nigra* NC), alleli *J. regia* – specifici ed alleli comuni.

SSR Locus	Numero totale di alleli	Alleli specie - specifici (bp)		Alleli comuni (bp)
		<i>J. nigra</i>	<i>J. regia</i>	
WGA1	9	182-184-186-188	181-193-195	191
WGA4	10	240-242-246-248-280-252-257	231-233	237
WGA9	9	229-241-251-255-257-261	239	243-247
WGA69	8	169-171-173	159-161-167	175-179
WGA89	11	190-196-201-203-207-213-222-230	215-221	211
WGA118	12	210-212-215-221-223-226-235-243	183-196-198-206	-
WGA202	11	246-248-250-252-254-258	265-267-275-295	260
WGA276	20	144-147-149-153-157-159-161-163-165-167	171-173-177-179-181-183-187-189-191-195	-
WGA321	12	236-237-242-244-246-254-264	226-239-241-243-245	-
WGA331	10	177-179-181-185-187-189-191-195	270-274	-
<i>Total</i>	<i>112</i>	<i>68 (60.7%)</i>	<i>36 (32.1%)</i>	<i>8 (7.14%)</i>

Tabella 5. Misure di variabilità genetica osservate nei due subgruppi di noce nero (*J.nigra* N e *J.nigra* NC), nel noce comune e nei loro sette ibridi interspecifici: il numero di alleli per locus (N_a), numero effettivo di alleli (N_e), eterozigotà osservata (H_o) ed attesa (H_E)

Popolazione	Locus	N_a	Size range (bp)	N_e	H_o	H_E
<i>Juglans nigra</i> N (N =66)	WGA1	5	182-191	2.703	0.652	0.630
	WGA4	8	237-257	1.834	0.439	0.455
	WGA9	6	229-261	2.901	0.667	0.655
	WGA69	2	169-171	1.163	0.152	0.140
	WGA89	7	190-213	3.337	0.758	0.700
	WGA118	3	215-226	2.297	0.697	0.565
	WGA202	5	248-260	1.618	0.424	0.382
	WGA276	6	147-167	1.924	0.500	0.480
	WGA321	6	236-264	1.265	0.212	0.210
	WGA331	6	177-195	2.921	0.682	0.658
<i>Mean (SE)</i>		<i>5.4 (0.56)</i>		<i>2.196 (0.24)</i>	<i>0.518 (0.21)</i>	<i>0.487 (0.06)</i>
<i>Juglans nigra</i> NC (N = 15)	WGA1	4	182-197	1.891	0.533	0.471
	WGA4	6	237-252	4.891	0.800	0.796
	WGA9	6	229-257	3.435	0.800	0.709
	WGA69	4	171-180	2.332	0.467	0.571
	WGA89	7	190-230	3.689	0.800	0.729
	WGA118	7	210-243	2.744	0.667	0.636
	WGA202	6	246-260	5.625	0.800	0.822
	WGA276	8	144-167	5.172	0.600	0.807
	WGA321	6	236-264	5.357	1.000	0.813
	WGA331	7	179-195	4.787	0.800	0.791
<i>Mean (SE)</i>		<i>6.1 (0.41)</i>		<i>3.992 (0.43)</i>	<i>0.727 (0.16)</i>	<i>0.714 (0.04)</i>
<i>Juglans regia</i> (N = 49)	WGA1	4	181-195	2.853	0.612	0.650
	WGA4	3	231-237	1.782	0.429	0.439
	WGA9	3	239-247	2.441	0.531	0.590
	WGA69	5	159-180	3.435	0.816	0.709
	WGA89	3	211-221	2.823	0.653	0.646
	WGA118	4	183-206	3.120	0.776	0.680
	WGA202	5	260-295	3.482	0.735	0.713
	WGA276	10	171-195	3.161	0.531	0.684
	WGA321	5	226-245	3.349	0.633	0.701
	WGA331	2	270-274	1.979	0.571	0.495
<i>Mean (SE)</i>		<i>4.4 (0.70)</i>		<i>2.843 (0.19)</i>	<i>0.629 (0.12)</i>	<i>0.631 (0.03)</i>
<i>Ibridi2n</i> (N = 7)	WGA1	5	181-193	4.083	1.000	0.755
	WGA4	3	231-250	2.513	1.000	0.602
	WGA9	3	239-247	2.649	1.000	0.622
	WGA69	1	171	1.000	0.000	0.000
	WGA89	4	201-215	2.882	1.000	0.653
	WGA118	4	196-226	3.920	1.000	0.745
	WGA202	3	252-267	2.513	1.000	0.602
	WGA276	3	147-189	2.279	1.000	0.561
	WGA321	4	226-244	2.970	1.000	0.663
	WGA331	3	181-274	2.513	1.000	0.602
<i>Mean (SE)</i>		<i>2.732 (0.86)</i>		<i>1.021 (0.40)</i>	<i>0.900 (0.31)</i>	<i>0.581 (0.21)</i>

Tabella 6. Analisi di fingerprinting di sette ibridi diploidi (H1, H2, H19, IMP3, IMP4, IMP9, IMP18), un ibrido triploide (N21) ed una potenziale madre ibridogena (N17). Le dimensioni degli alleli microsatellitari sono in bp, - indica l'allele nullo. ■ = allele *J. nigra* – specifico, ■ = allele *J. regia* – specifico, trasparente = allele comune

		Ibridi 3n			Ibridi 2n					Madre Ibr.
Locus		N21	H1	H2	H19	IMP3	IMP4	IMP9	IMP18	N17
WGA1	Allele1	188	186	188	188	186	186	186	186	188
	Allele2	186	181	181	193	193	191	181	193	186
	Allele3	181								
WGA4	Allele1	250	250	250	250	250	250	250	250	250
	Allele2	248	233	233	233	233	233	231	231	250
	Allele3	233								
WGA9	Allele1	247	247	247	247	247	247	247	247	247
	Allele2	247	243	243	239	239	239	243	239	247
	Allele3	239								
WGA69	Allele1	171	171	171	171	171	171	171	171	171
	Allele2	171	-	-	-	-	-	-		171
	Allele3	-								
WGA89	Allele1	207	201	201	201	201	201	201	201	201
	Allele2	201	221	215	221	221	215	211	215	201
	Allele3	211								
WGA118	Allele1	221	221	226	226	226	221	221	221	221
	Allele2	226	198	196	198	196	198	196	196	226
	Allele3	198								
WGA202	Allele1	252	252	252	252	252	252	252	252	252
	Allele2	246	267	265	265	265	265	267	265	252
	Allele3	260								
WGA276	Allele1	153	147	147	147	147	147	147	147	147
	Allele2	149	189	189	189	189	189	189	179	153
	Allele3	189								
WGA321	Allele1	244	244	244	244	244	244	244	244	244
	Allele2	244	243	243	239	226	239	226	239	244
	Allele3	226								
WGA331	Allele1	181	181	181	181	181	181	181	181	181
	Allele2	181	270	274	270	270	274	270	270	181
	Allele3	270								

Quattro tra gli otto loci sopra citati sono risultati particolarmente interessanti: WGA1, WGA118, WGA276 e WGA69. Il locus WGA1 ha manifestato la più alta omologia di sequenza nelle regioni fiancheggianti il microsatellite (155 bp), 100% per *J. nigra* senza mutazioni puntiformi ne delezioni/inserzioni, 98% per *J. regia* con 1.27% di delezioni/inserzioni e 1.27% di mutazioni puntiformi. In questo stesso locus, il microsatellite interrotto (GA)₅GCA(GA)₃GCA(GA)₃, presente nella sequenza consenso *J. nigra*, cambia diventando (GA)₁₅G(GA) nell'allele *J. nigra* specifico di 188 bp, e puro (GA)₁₂ nell'allele *J. regia* specifico di 181 bp. Sebbene le regioni fiancheggianti siano altamente conservate, grandi differenze in dimensioni sono state riscontrate tra gli alleli *J. nigra* ed *J. regia* specifici nei loci WGA118 ed WGA276 (tab. 6). La differenza in lunghezza tra l'allele 189 bp di *J. regia* e 153 bp di *J. nigra* nel locus WGA276 è dovuta ad una ampia contrazione della regione ripetuta, con la perdita di 16 unità (GA). Al contrario nel locus WGA118 l'espansione della regione ripetuta per inserzione di 26 unità, 9 (GA) e 17 (GT), ha dato origine all'allele *J. nigra* - specifico di 226 bp, ed ha sostituito il corrispondente allele *J. regia* - specifico di 196 bp. Nel locus WGA69 alleli identici per dimensione (180 bp), che amplificano sia nel noce nero che nel noce comune, hanno rivelato una differente percentuale di omologia nelle regioni fiancheggianti (97% e 90% rispettivamente), e numerose mutazioni in corrispondenza del microsatellite interrotto. Nella sequenza del locus WGA69 in *J. regia* è stata riscontrata una breve delezione di 3 bp a 5 pb a valle del primer forward. Questo risultato non può spiegare l'assenza d'amplificazione negli ibridi interspecifici dell'atteso allele *J. regia* - specifico (tab. 5). Si può ipotizzare la presenza di una distinta mutazione in uno dei siti d'annealing, verificabile solo con il clonaggio e poi la sequenza del frammento amplificato in *J. regia*.

Nonostante la conservazione dei siti d'annealing, i due loci WGA202 e WGA331 sono caratterizzati dalla più bassa percentuale d'omologia nelle regioni fiancheggianti il microsatellite. Nel locus WGA202 è stata osservata una sostanziale diversità di sequenza non solo tra *J. nigra* e *J. regia*, (omologia= 68 %) ma anche tra i genotipi di *J. nigra* (omologia= 69 %). In entrambe le specie l'analisi di sequenza ha messo in evidenza una inserzione di 37 bp a 38 bp a valle del primer forward, osservabile se si comparano i frammenti amplificati con la sequenza consenso *J. nigra* (tab. 6). Se il confronto viene invece effettuato tra noce nero e noce comune considerati in questo studio, l'omologia di sequenza delle regioni fiancheggianti diventa del 95%. Nel locus WGA331, gli alleli *J. regia* - specifici presentano la più bassa identità di sequenza nelle regioni fiancheggianti (55%), che invece non viene riscontrata in *J. nigra* (95%).

Tabella 7. Analisi di sequenza dei 10 loci microsatellitari amplificati nei campioni appartenenti alla specie *J. nigra* e *J. regia*. Confronto con la sequenza consenso di *J. nigra* disponibili nel database pubblico NCBI (BLASTn, Woeste et al., 2002). M. Puntiformi = numero di mutazioni puntiformi, ^a transizioni, ^b transvezioni, gaps = numero di basi rimosse per delezione o aggiunte per inserzione.

Locus SSR	Allele (bp)	GeneBank Accession Number	N° di (AG) ripetute	Sequenza consenso <i>J. nigra</i> N° di (AG) ripetute	BLASTn-Search per le regioni fiancheggianti SSR					
					GeneBank A. number	E-value	% Omologia	% gaps	M. Puntiformi.	
									% trans ^a	% transv ^a
WGA1- <i>J.nigra</i>	188	EF640283	(GA) ₁₅ G(GA)	(GA) ₅ GCA(GA) ₃ GCA(GA) ₃	<u>AY465952</u>	1e-68	100	0	0	0
WGA1- <i>J.regia</i>	181	EF640294	(GA) ₁₂			1e-62	98	1.27	0.63	0.63
WGA4- <i>J.nigra</i>	250	EF640284	(GT) ₅ (GA) ₁₇ (GA) ₁₁	(GT) ₅ (GA) ₁₅ (GA) ₁₁	<u>AY465953</u>	1e-41	95	3	1	1
WGA4- <i>J.regia</i>	231	EF640295	(GT) ₅ (GA) ₁₀ (GA) ₁₀			3e-51	95	2	2	1
WGA9- <i>J.nigra</i>	229	EF640285	(GA) ₇	(GA) ₁₆	<u>AY465954</u>	1e-75	99	0	1	0
WGA9- <i>J.regia</i>	239	EF640296	(GA) ₁₂			1e-53	95	2	0.5	2.5
WGA69- <i>J.nigra</i>	180	EF640286	(GA) ₄ ATATAA(GA) ₁₅	(GA) ₄ ATATAA(GA) ₁₆	<u>AY333953</u>	1e-47	97	0	3	0
WGA69- <i>J.regia</i>	180	EF640297	(GA) ₄ ATATAAGC(GA) ₂ GC(GA) ₁₃			3e-29	90	3	5.5	0.5
WGA89- <i>J.nigra</i>	201	EF640287	(GT) ₁₂ (GA) ₁₃	(GT) ₁₃ (GA) ₂₁	<u>AY352440</u>	1e-47	97	0	1.35	1.65
WGA89- <i>J.regia</i>	215	EF640298	(GT) ₂₀ (GA) ₁₃			1e-62	97	0.06	1.5	0.5
WGA118- <i>J.nigra</i>	226	EF640288	(GA) ₂₃ (GT) ₁₈	(GA) ₁₈ (GT) ₁₁	<u>AY479958</u>	4e-63	98	0	1	1
WGA118- <i>J.regia</i>	196	EF640299	(GA) ₁₄ (GT) ₁			3e-66	97	1.2	1.2	0.6
WGA202- <i>J.nigra</i>	252	EF640289	(GA) ₁₁	(GA) ₂₀	<u>AY479959</u>	2e-34	69	17	9.5	4.5
WGA202- <i>J.regia</i>	265	EF640300	(GA) ₁₈			2e-28	68	17	10	5
WGA276- <i>J.nigra</i>	153	EF640290	(GA) ₁₄	(GA) ₁₄	<u>AY479961</u>	7e-36	95	2.5	2.5	0
WGA276- <i>J.regia</i>	189	EF640301	(GA) ₃₀			3e-32	94	2	2.5	1.5
WGA321- <i>J.nigra</i>	244	EF640291	(GA) ₁₈	(GA) ₁₄	<u>AY479962</u>	5e-72	100	0	0	0
WGA321- <i>J.regia</i>	230	EF640302	(GA) ₁₅			2e-43	92	4.8	0.5	2.7
WGA331- <i>J.nigra</i>	179	EF640292	(GA) ₁₃	(GA) ₁₃	<u>AY479963</u>	2e-45	95	5	0	0
WGA331- <i>J.nigra</i>	181	EF640293	(GA) ₁₄			1e-50	95	5	0	0
WGA331- <i>J.regia</i>	270	EF640303	(GA) ₉			3e-27	55	42	1	2
WGA331- <i>J.regia</i>	274	EF640304	(GA) ₁₀			4e-50	55	42	1	2

Table 8. Lista delle similarità nucleotidiche individuate mediante BLASTn-query tra le regioni fiancheggianti i microsatelliti WGA1, WGA4, WGA118, altamente conservate in *J. regia* ed in *J. nigra*, ed il genoma del *Populus trichocarpa* (<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html>). (¹ Potenziale funzione del frammento di sequenza di pioppo con un' elevata omologia con le regioni fiancheggianti i microsatelliti; E = Esone; INTG = Regione intragenica; ² Indica la contemporanea presenza della regione microsatellitare nel noce e nel pioppo)

Sequenza ID	Size (bp)	BLASTn – Search vs. Populus trichocarpa database				Gene	Descrizione Match		
		Allineamento (bp)	E-value	% Identità	Posizione Mappa		Potenziale funzione del gene	Potenziale funzione del frammento allineato	MS ²
AY465952 (WGA1)	487	35	1e-7	98	LG_VIII 15395426:15395460	Fgenes1_pg_C_LG_VIII001943	Haem peroxidase	E Secretory peroxidase domain	-
AY465953 (WGA4)	484	35 45	1e-15 1e-15	100 91.1	LG_I 7467113:7467167 LG_I 7467322:7467366	— —	— —	INTG INTG	+
AY479958 (WGA118)	500	125	1.9e-19	83	LG_XII 345718:345842	Eugene3.00120042	Transcription factor ZF-HD protein dimerisation region	E ZF-HD homeobox protein Cys/His-rich dimerisation region	-

Un frammento di 125 nucleotidi all'interno della sequenza WGA118 (AY479958), in posizione adiacente al microsatellite, presenta un'omologia nucleotidica del 83% (E-value = $1.9e^{-19}$) con una regione del gene "transcription factor ZF-HD protein dimerisation". Comparando invece la sequenza aminoacidica è stata incrementata la percentuale d'identità del frammento (90%, E-value = $7e^{-22}$). Tale sequenza nel pioppo codifica per un ZF-HD homeobox protein Cys/His-rich dimerisation region e si localizza nella posizione LG_XII 345718:345842.

2. 4. Discussione

Tutte le dieci coppie di primers sviluppate in *J. nigra* hanno amplificato con successo in *J. regia*. I marcatori microsatellitari usati, grazie alla loro elevata variabilità, si sono dimostrati un potente strumento per discriminare le due specie di noce e i loro ibridi interspecifici *J. x intermedia*. L'analisi di DNA fingerprinting e la successiva analisi di maternità per esclusione hanno permesso infatti d'identificare sette ibridi interspecifici, H1, H2, H19, IMP3, IMP4, IMP9, IMP18, ed un genotipo *J. nigra* N17 che può potenzialmente produrre ibridi interspecifici naturali con *J. regia*. Inoltre solo l'applicazione di marcatori microsatellitari ha consentito di verificare la ploidia degli ibridi. Il genotipo N21 inizialmente classifico come pianta *J. nigra* sulla base di caratteri morfologici, si è poi rivelato essere un ibrido triploide (3n), caratterizzato da due terzi del corredo cromosomico di *J. nigra* ed un terzo di *J. regia*.

In generale nei dieci microsatelliti sono stati determinati alti livelli di diversità genetica sia all'interno della specie *J. nigra* sia tra le due specie mentre il numero medio di alleli per locus nel noce nero è più alto del valore riscontrato nel noce comune. Tale differenza è spesso rilevabile quando un set di microsatelliti messi a punto su una specie viene poi applicato ad un'altra specie definita "non-source". Il numero medio di alleli per locus ed il numero effettivo di alleli, calcolati per ogni gruppo, sono più alti dei livelli di variabilità registrata in *J. nigra* e *J. regia* usando marcatori molecolari quali, isoenzimi (Fornari et al., 1999) RFLP (Fjellstrom & Parfitt, 1994) e RAPDs (Malvolti et al., 1997). La ricchezza allelica e l'eterozigosità osservata tra i loci SSR è risultata simile ai valori riportati per le altre specie forestali antropizzate, come il pioppo (Van der Schoot et al., 2000) e la *Castanea sativa* (Marinoni et al., 2003). Come atteso, la diversità genetica stimata in questo studio nella specie *J. nigra* è inferiore ai valori ottenuti applicando 12 microsatelliti a 43 popolazioni americane indigene di noce nero (Victory et al., 2006), mentre è rappresentativa della variabilità molecolare osservata in passato nel germoplasma di *J. regia* (Dangl et al., 2005; Foroni et al., 2005).

Robichaud et al., (2006) ha dimostrato che in *J. nigra* alti livelli di ricchezza allelica e di eterozigosità osservata riducono la probabilità d'identità genetica (PI) ed incrementano la probabilità d'esclusione nell'analisi di parentela. Perciò alla luce dei risultati ottenuti, tali caratteristiche rendono i dieci loci microsatellitari impiegati, un eccellente strumento per analisi di fingerprinting e di parentela non solo nel noce nero ma anche nel noce comune.

Inoltre questo studio ha dimostrato la trasferibilità dei dieci microsatelliti nucleari nel genere *Juglans* attraverso l'analisi di sequenza dei frammenti amplificati. Tale analisi non solo ha messo in evidenza la conservazione in ogni locus delle regioni fiancheggianti il microsatellite ma anche della regione ripetuta stessa, pre-requisito per l'uso di marcatori SSRs in una specie non-source come, in questo caso, *J. regia*. L'analisi del DNA nei dieci loci ha rivelato un'elevata omologia di sequenza (90%) nelle regioni fiancheggianti il microsatellite tra le due specie di noce. Questi dati dimostrano inequivocabilmente che i frammenti amplificati sono alleli dello stesso locus e non alleli appartenenti a loci molto simili, sebbene le mutazioni osservate nei loci microsatellitari non siano dovute solo a cambiamenti nel numero di unità ripetute, ma anche a variazioni più complesse. Interruzioni delle unità ripetute (GA) per inserzione e delezione di basi sono state riscontrate nei loci WGA1 e WGA69. Il locus WGA69 ha esibito il più basso numero di alleli totali ed la percentuale più alta di alleli comuni (25%). Numerosi studi riportano che l'interruzione di microsatelliti puri o perfetti è correlata alla stabilità del DNA in tali regioni (Taylor et al., 1999; Davierwala et al., 2000). Gli autori suggeriscono che la purezza delle regioni ripetute influenzino il tasso di mutazione e perciò il livello di polimorfismo dei loci SSR; microsatelliti interrotti sembrano avere tassi di mutazione più bassi rispetto ai microsatelliti puri. Questo potrebbe spiegare il basso livello di polimorfismo riscontrato nel locus WGA69 nel noce. Analogamente, è interessante notare che il numero effettivo di alleli nel locus WGA1 in *J. nigra* è più basso di quello calcolato in *J. regia*; per tale locus il microsatellite interrotto in *J. nigra* diventa un microsatellite puro in *J. regia*. Tuttavia non bisogna trascurare il fatto che il tasso di mutazione dei loci SSR può essere condizionato anche da altri fattori quali la natura della sequenza delle regioni fiancheggianti, la posizione sul cromosoma e il self-accelerating (Morgante et al., 2002).

L'analisi delle sequenze del DNA ha dimostrato che le mutazioni nei loci SSR non coinvolgono solo le regioni ipervariabili ripetute. Mutazioni per inserzioni e delezioni di nucleotidi nelle regioni fiancheggianti possono contribuire a generare variazioni alleliche sia entro che tra specie. Ad esempio comparando gli alleli *J. nigra* e *J. regia* specifici del locus WGA331, è stata riscontrata una identità di sequenza relativamente bassa nelle regioni fiancheggianti il microsatellite (55 %). L'analisi BLASTn ha inoltre consentito d'individuare la presenza nel

genoma di noce di due loci potenzialmente paraloghi, WGA331 e WGA24. Si è ipotizzato che WGA331 e WGA24 siano il risultato di un evento replicativo che si è evoluto in maniera differente nelle due specie. La delezione di 100 bp nel locus WGA331 del noce nero avrebbe ridotto in quest'ultima specie la percentuale d'identità nucleotidica tra WGA331 e WGA24 e contemporaneamente sarebbe responsabile della bassa omologia di sequenza tra *J. nigra* e *J. regia* nel locus WGA331.

Si è riscontrata inoltre omoplasia nel locus WGA69 dove alleli, amplificati sia in *J. regia* che in *J. nigra*, hanno uguale lunghezza (180 bp) ma differente sequenza. Mutazioni complesse e la possibilità di avere fenomeni di omoplasia complicano notevolmente l'interpretazione dei valori di differenziazione genetica tra popolazioni come i coefficienti R_{st} e F_{st} . Tali coefficienti presuppongono due modelli di mutazione estremi: F_{st} assume l'Infinite Alleles Mutation Model of loci (IAM, Kimura & Crow, 1964), che non ammette omoplasia, R_{st} invece si basa sul Stepwise Mutation Model (SMM, Kimura & Ohta, 1978). Sebbene si stia tentando di sviluppare modelli evolutivi più realistici, SMM sembra riflettere più accuratamente il meccanismo di mutazione dei microsatelliti rispetto a IAM. I dati ottenuti hanno dimostrato che il coefficiente R_{st} stima meglio la differenziazione genetica tra noce nero e noce comune, come riportato già in numerosi studi (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Tuttavia in questo caso il modello SMM sembra sovrastimare il livello di diversità genetica tra le due specie in esame ($R_{st} = 0.958$) poiché, come evidenziato dall'analisi di sequenza, ampie delezioni ed inserzioni possono avvenire nelle regioni fiancheggianti il microsatellite. Secondo Anger and Bernatchez (1997), la divergenza molecolare tra popolazioni può essere fortemente distorta se grandi delezioni o inserzioni di basi nucleotidiche nelle regioni fiancheggianti vengono erroneamente interpretate come differenza nel numero di unità ripetute. In pratica, non essendo ancora definito quale sia il migliore approccio statistico da applicare, oltre ad una cauta interpretazione dei dati, è auspicabile, per quanto possibile, l'uso di entrambe le statistiche, F_{st} di Wright (1951), e R_{st} di Slatkin (1995).

L'utilità e la trasferibilità interspecifica dei microsatelliti non dipende solo dal loro grado di conservazione ma anche dalla loro origine e dalla loro dispersione nel genoma. Morgante et al., (2002) ha osservato che i microsatelliti nucleotidici sono presenti nella porzione non codificante del genoma ma anche negli esoni e nelle regioni non tradotte come gli introni e le untranslated regions dei geni (5'- e 3'- UTR). SSR genici derivati da ESTs (Expressed Sequence Tags) posseggono solitamente un'elevata trasferibilità perché derivanti da regioni relativamente conservate. In questo studio due degli otto marcatori SSR che esibiscono un elevato livello di conservazione nelle regioni fiancheggianti nelle specie *J. nigra* e *J. regia*, mostrano una similarità

significativa con due loci in *Populus trichocarpa*: WGA1 con il dominio di una Haem peroxidase, altamente conservato nelle piante, WGA118 con un transcription factor ZF-HD protein dimerisation region.

In conclusione il successo nell'amplificazione di SSRs tra specie può essere incrementato usando i database EST come punto di partenza (SSRs genici). Tali marcatori, che diventano ogni anno più accessibili grazie alla riduzione dei prezzi di sequenziamento, insieme agli anonimi SSRs derivati da librerie di DNA arricchite, potrebbero diventare un utile strumento per studi di genetica , ed in particolare, nel genere *Juglans*.

3. Selezione a posteriori di piante ibridogene di noce mediante l'analisi di parentela di famiglie half-sib con marcatori SSRs.

3. 1. Introduzione

Sia il noce nero che il noce comune sono specie monoiche, dicogame, ad impollinazione anemofila e apparentemente auto-compatibili, con lo stesso numero di cromosomi ($2n = 32$). La dicogamia infatti (separazione temporale della fioritura maschile e femminile) riduce il numero di fiori femminili che possono essere impollinati (Luza & Polito, 1988a). L'ipotesi di Darwin (1877) secondo cui la eterodicogamia sarebbe un meccanismo evolutivo che favorisce outcrossing è stata largamente accettata fin dalla sua prima formulazione. Gran parte delle piante di noce sono dicogame con dimorfismo proterandria – proteroginia: generalmente la proteroginia è comune in *J. nigra*, mentre la proterandria è più frequente in *J. regia* (Funk, 1970), ma non mancano eccezioni. Come descritto nell'introduzione, sebbene l'analisi filogenetica, basata sui marcatori nucleari RFLP e le sequenze *matK* ed ITS, abbia dimostrato che il noce nero ed il noce comune appartengano a due differenti sezioni del genere *Juglans*, rispettivamente *Rhysocaryon* e *Dioscaryon* (Stanford et al., 2000), in condizioni favorevoli possono dare origine ad ibridi interspecifici (*Juglans* x *intermedia* Carr. o *J. nigra* x *J. regia*). Tuttavia tale ibridazione non è un processo frequente in natura, sia per la separazione temporale delle fioriture tra le due specie parentali sia a causa di alcuni meccanismi d'incompatibilità genetica (Sartorius, 1990) che possono causare il fallimento della fecondazione (meccanismi pre-zigotici) e la morte degli embrioni (meccanismi post-zigotici). Per avere successo l'ibridazione richiede la sincronia della fioritura tra i parentali ed una appropriata temperatura per la germinazione del polline e la penetrazione del tubo pollinico attraverso lo stigma e stilo dell'ovario del noce nero (Luza et al., 1987). Infatti, anche se possibile il contrario, generalmente la pianta madre è di solito una pianta *J. nigra* mentre il padre è una pianta *J. regia*.

L'identificazione e la selezione di piante parentali ibridogene costituisce il primo passo per la produzione di una discendenza ibrida. Tuttavia, pur disponendo di genitori in grado di dare ibridi interspecifici, è risultato sempre particolarmente difficile effettuare incroci controllati (Scheeder, 1990). La difficoltà maggiore consiste nel disporre di una quantità di polline di noce comune vitale al momento della massima recettività dei fiori femminili del noce nero; purtroppo un metodo semplice e poco costoso per conservare e mantenere vitale il polline non è tuttora disponibile (Luza & Polito, 1985, 1988b). Altro ostacolo al buon esito degli incroci controllati è rappresentato dall'abscissione, più volte osservata, dei fiori femminili per overloading di polline

sia in *J. regia* (Catlin et al., 1987) che in *J. nigra* (Beineke & Masters, 1976) che riducono il numero di semi prodotti. Per tali motivi, la produzione di ibridi interspecifici si effettua principalmente per libera impollinazione di piante parentali ibridogene selezionate. Ad esempio piantagioni da seme per la produzione di ibridi *J. nigra* x *J. regia* sono state allestite in Francia (I.N.R.A, Bordeaux), ed hanno portato alla commercializzazione dell'ibrido NG23 x RA (Becquey, 1990). In queste piantagioni i semi ibridi vengono prodotti per libera impollinazione della pianta madre *J. nigra* (NG23) con quattro piante padri *J. regia* (RA984, RA996, RA331, RA295) che assicurano la necessaria quantità di polline. Con il tempo infatti è cresciuta la convinzione che un incremento della diversità del polline possa favorire la fecondità della pianta madre e la fitness della progenie, sebbene i meccanismi alla base di tale processo non siano stati ancora ben compresi (Snow, 1990). La pianta NG23 è stata selezionata per la sua capacità di ibridarsi spontaneamente con i quattro genotipi *J. regia* sopra citati grazie alla sovrapposizione della fioritura ed alla compatibilità genetica dimostrata. L'identificazione delle piante parentali attraverso osservazioni fenologiche e la loro successiva propagazione vegetativa per innesto è iniziata nel 1980 ed ha richiesto un lungo intervallo di tempo, superiore a dieci anni (Jay-Allemand et al., 1990).

Negli ultimi anni la richiesta crescente in Europa di legno, soprattutto di qualità, ha spinto molti ricercatori ad ampliare le aree di coltivazione del noce ed ad allestire nuove piantagioni da seme per la produzione di alberi *J. x intermedia*. L'applicazione del metodo marker – assistito a breve termine, sviluppato da Grattapaglia et al., (2004) in *Eucaliptus* spp., potrebbe rappresentare una valida alternativa alle osservazioni fenologiche per la selezione precoce di genotipi ibridogeni di noce, riducendo i costi in tempo e denaro. Questo metodo è simile all'approccio PMX/WPA (polymix breeding with parental analysis) utilizzato da Lambert et al., (2001) come soluzione alternativa agli incroci controllati full-sib nei programmi di miglioramento genetico del pino. In breve, l'approccio PMX/WPA richiede di effettuare incroci controllati mediante l'applicazione di un mix di polline (molteplici padri), e di eseguire poi l'analisi di parentela della progenie mediante marcatori microsatellitari (SSRs). Grattapaglia et al., (2004) ha eseguito invece i test di paternità mediante SSRs su progenie ibride di *Eucaliptus* (*E. grandis* x *E. urophylla*) ottenute per libera impollinazione di una singola pianta madre *E. grandis* con sei piante padri *E. urophylla*. Le combinazioni parentali con il più basso successo riproduttivo sono state identificate e rimosse dalle piantagioni, praticando di fatto una selezione a posteriori delle piante maggiormente adatte alla produzione della varietà *E. urograndis*.

Negli ultimi sei anni nell'ambito del progetto RISELVITALIA l'Istituto CNR-IBAF di Porano (TR) e l'Istituto CRA-ISSA di Arezzo hanno verificato nel Parco Villa Mezzalira (Bressanvido,

Vicenza) la coesistenza di piante *J. nigra*, *J. regia* e probabili *J. x intermedia*. L'analisi microsatellitare ha confermato la presenza di piante *J. nigra* e *J. regia* e portato all'identificazione di 8 *J. x intermedia* (cap. 2). Una preliminare analisi parentale di sette ibridi diploidi ha permesso di ipotizzare la presenza di piante di noce nero e noce comune ibridogene in tale popolazione. Questo studio perciò, in accordo con quanto stabilito da Grattapaglia (2004), è stato condotto per selezionare “a posteriori” parentali ibridogeni di noce da utilizzarsi in nuove piantagioni per la produzione di ibridi. A tale scopo, sono state effettuate analisi di DNA fingerprinting e di parentela mediante marcatori SSRs su famiglie half-sib, ottenute per libera impollinazione delle madri putative *J. nigra* presenti nel Parco. Nel dettaglio la ricerca è stata articolata come segue: 1) individuazione di eventuali ibridi *J. x intermedia* nelle progenie; 2) identificazione delle piante madri *J. nigra* ibridogene, 3) studio del successo riproduttivo differenziale (DRS) di eventuali padri ibridogeni *J. regia*.

3. 2. Materiale e Metodi

3. 2. 1. Materiale (famiglie half-sib)

Un totale di 138 piante sono state campionate all'interno del Parco “Villa Mezzalira” e caratterizzate con i marcatori molecolari SSRs.

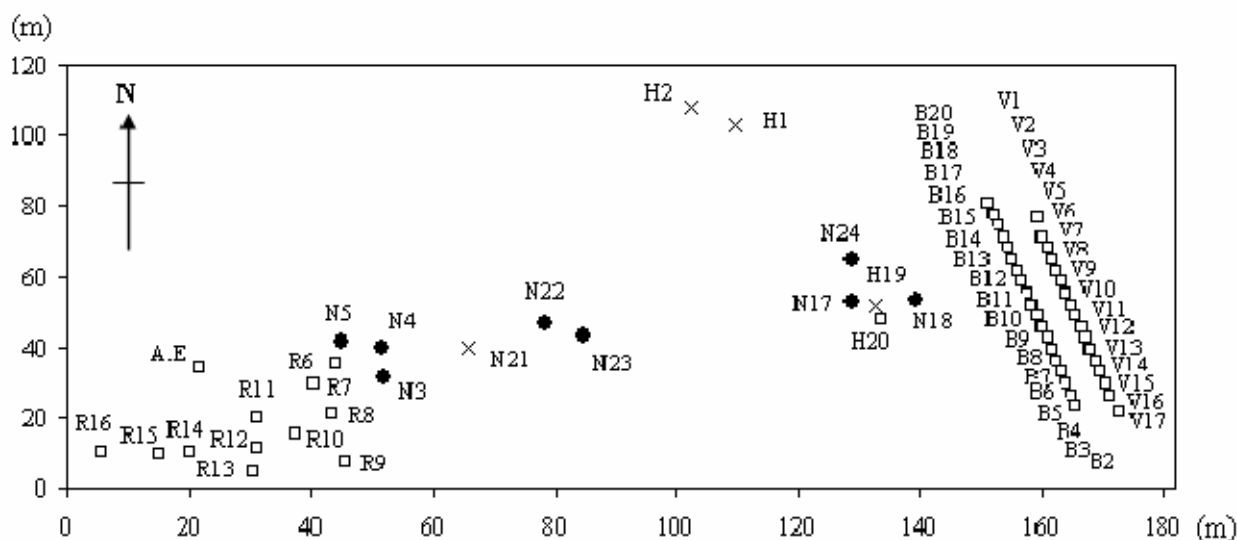


Figura 22. Localizzazione di 60 alberi di noce presenti nel parco Villa Mezzalira, (Bressanvido, VI, Veneto, 45° 39' 0" N, 11° 38' 0" E): 8 piante *J. nigra* (O), 3 *J. x intermedia* (X) and 49 *J. regia* (□)

In base all'analisi di DNA fingerprinting 49 individui sono risultati *J. regia*, 82 *J. nigra*, 8 ibridi *J. x intermedia* di cui sette diploidi ed uno triploide, con due terzi del corredo cromosomico di *J. nigra* ed un terzo di *J. regia*. Come dettagliatamente descritto nel paragrafo 2.2.1, di questi 138

campioni, 60 (49 *J. regia* R6-R16, A.E., B2-B20, V1-V17, 8 *J. nigra* N3-N4-N5-N17-N18-N22-N23-N24, 3 ibridi diploidi H1, H2, H19, un ibrido triploide N21) sono piante adulte presenti nel Parco di Villa Mezzalira (fig. 22) mentre 63 piante di sei anni d'età (59 *J. nigra* N25-N83 e 4 ibridi diploidi IMP3, IMP4, IMP9, IMP18) sono nate da seme collezionato nel medesimo parco, ed attualmente conservate nel vivaio della regione Veneto.

Nella primavera del 2005 sono state campionate foglie mature da 461 piantine di un anno nate da semi collezionati dalle sette piante madri *J. nigra* e dalla pianta N21 presenti nel sito: (41) N3, (29) N4, (88) N17, (24) N18, (18) N21, (76) N22, (71) N23, (114) N24. Della pianta *J. nigra* N5, morta nell'anno 2004, non si ha progenie. Le otto progenie collezionate ed attualmente conservate nell'Istituto per la Selvicoltura –CRA di Arezzo, sono state comparate con le 138 piante già genotipizzate. In totale lo studio ha riguardato 600 campioni.

3. 2. 2. Estrazione del DNA genomico (famiglie half-sib)

Considerando l'elevato numero di campioni da analizzare si è scelto di automatizzare parzialmente il metodo d'estrazione del DNA genomico. Per ogni campione sono stati pesati 100 mg di tessuto fogliare fresco e macinati all'interno di un tubo da microcentrifuga (2-mL) contenente una pallina di tungsteno (5 mm). Il tessuto fogliare, congelato in azoto liquido, è stato omogeneizzato mediante Mixer Mill 300 (QIAGEN, <http://www.qiagen.com>; fig. 23). Il DNA



genomico è stato estratto e purificato mediante DNeasy96 Plant Kit (QIAGEN), secondo le istruzioni del manuale (<http://www.qiagen.com>) e conservato a -20°C. Questo nuovo approccio ha consentito di processare simultaneamente 192 campioni e di estrarre DNA genomico puro in circa 5-6 h.

Figura 23. Mixer Mill 300 (QIAGEN) per la macinazione di tessuto fogliare congelato in azoto liquido.

La presenza e la qualità del DNA genomico estratto è stata monitorata effettuando un'elettroforesi su gel d'agarosio 1% in 0.5 x TBE. La quantità di DNA è stata empiricamente determinata comparando tutti i campioni, visualizzati su gel d'agarosio con sei differenti soluzioni di DNA del fago λ (concentrazione nota: 15 ng/ μ L, 31 ng/ μ L, 63 ng/ μ L, 125 ng/ μ L, 250 ng/ μ L, 500 ng/ μ L; Life Technologies), e portata ad una concentrazione finale di 5 ng / μ L.

3. 2 .3. SSR analisi (famiglie half-sib)

I dieci loci microsatelliti (WGA1, WGA4, WGA9, WGA69, WGA89, WGA118, WGA202, WGA276, WGA321, WGA331; tab. 2 cap. 2) già precedentemente descritti e utilizzati per la caratterizzazione genetica dei 138 individui di noce nero, noce comune e *J. x intermedia*, sono stati amplificati in tutti i campioni delle otto progenie che, per semplicità, vengono di seguito indicate soltanto con il nome della madre, N3, N4, N17, N18, N21, N22, N23, N24. I dieci loci utilizzati non presentano linkage disequilibrium. Le modalità di amplificazione e di visualizzazione dei marcatori nucleari SSRs sono analoghe a quelle già descritte nel paragrafo Materiale e Metodi 2. 2 sottoparagrafo 2. 2. 3. La riproducibilità in laboratorio delle amplificazioni è stata verificata includendo nelle analisi sei campioni già genotipizzati (*J. nigra* N5; ibrido triploide N21; ibrido diploide H1 e H2; *J. regia* R6 e R7).

3. 2 .4. Analisi dei dati (famiglie half-sib)

I dati ottenuti dall'amplificazione dei frammenti SSR sono stati raccolti mediante Gene Scan Analysis version 3.7 Software (Applied Biosystem), mentre i profili genotipici sono stati assegnati con Genotyper version 3.7 NT Software (Applied Biosystem). Anche in questo studio la tradizionale analisi statistica dei marcatori SSRs codominanti si è dimostrata assai complessa data la presenza di alcuni campioni con un corredo cromosomico atipico. Perciò la matrice dei marcatori SSR è stata costruita secondo il codice binario (presenza di un allele 1, assenza 0). Per ogni possibile coppia di campioni è stato calcolato il coefficiente di similarità genetica Simple Match (SM- Sokal & Sneath 1963), allo scopo di valutare le relazioni genetiche esistenti tra genotipi. Sulla corrispondente matrice SM è stata condotta l'Analisi delle Coordinate Principali (PcoorA) per visualizzare in un plot bi-dimensionale le distanze genetiche relative ai 600 campioni totali collezionati. (ROLF's 2001, NTSYSpc version 2.1 software package).

Dopo aver rimosso dalla matrice dei dati grezzi SSRs i tre campioni risultati triploidi per almeno un locus (trisomia), è stata effettuata la definitiva identificazione degli ibridi diploidi *J. x intermedia* Carr. I 459 genotipi appartenenti alle otto famiglie half-sib, sono stati assegnati alle quattro classi già precedentemente definite (capitolo 2): i due subgruppi *J. nigra* N e *J. nigra* NC, il gruppo *J. regia* ed il cluster comprendente gli ibridi diploidi *J. x intermedia*. Per ottenere ciò sono stati effettuati due differenti test d'assegnazione mediante GENECLASS 2 ver. 2.0 software (<http://montpellier.inra.fr/CBGA/software/>): il metodo frequentistico di Paetkau et al., (1995) ed il metodo parzialmente Baysiano di Rannala & Mountain (1997). Entrambi i metodi

constano di quattro principali steps: 1- Rimozione dell'individuo da assegnare dalla popolazione in cui è stato inizialmente classificato ("leave one out procedure"), 2- Calcolo delle frequenze alleliche in ogni locus per ogni popolazione campionata, 3- Calcolo della probabilità che il genotipo multilocus ha di avere origine da ognuna delle popolazioni (Likelihood), 4- Assegnazione dell'individuo alla popolazione in cui la probabilità del genotipo multilocus è più alta. Più in dettaglio, supponiamo che J loci indipendenti siano stati caratterizzati in I popolazioni e che la frequenza dell' k -esimo allele nel locus j -esimo nella i -esima popolazione sia indicata con p_{ijk} . Assumendo valido l'equilibrio di Hardy – Weinberg, la probabilità di un genotipo $A_k A_{k'}$ nel locus j -esimo nella i -esima popolazione sarà $(p_{ijk})^2$ con $k = k'$ e $2 p_{ijk} p_{ijk'}$ con $k \neq k'$. Assumendo l'indipendenza dei loci, la probabilità di un genotipo multilocus nella i -esima popolazione sarà data dal prodotto delle probabilità calcolate in ogni locus. Tutti gli individui da assegnare vengono classificati usando la statistica Λ (Paetkau et al., 1995; Rannala & Mountain 1997):

$$\Lambda = L_{\text{home}} / L_{\text{max}}$$

dove L_{home} è la probabilità di estrarre il genotipo multilocus in esame dalla popolazione in cui è stato inizialmente classificato (Likelihood-home) e L_{max} è la probabilità massima del genotipo multilocus di avere origine da una popolazione, compresa la popolazione in cui è stato campionato (Likelihood-max). Un caso particolare è rappresentato dall'assenza di un allele in una popolazione-campione (missing allele). In tal caso la stima della corrispondente frequenza allelica nella popolazione-campione sarà zero per cui la probabilità di osservare un genotipo con tale allele nella popolazione sarà automaticamente nulla e la popolazione verrà così esclusa *de-facto*. Tuttavia l'allele in questione potrebbe essere un allele raro nella popolazione reale e perciò non rappresentato nella popolazione campione per un semplice errore di campionamento. Paetkau et al., (2004) suggerisce allora di attribuire all'allele mancante una frequenza arbitraria costante pari a 0.01. L'approccio di Rannala & Mountain (1997) è analogo al metodo frequentistico di Paetkau et al., (1995) e differisce solo nelle modalità di calcolo delle frequenze alleliche delle popolazioni. Mentre con il metodo frequentistico si assume che le frequenze alleliche osservate nelle popolazioni campioni siano simili ai "valori esatti", con il metodo di Rannala & Mountain (1997) invece si stimano a posteriori le frequenze alleliche con un approccio bayesiano. Perciò la probabilità a posteriori di osservare un individuo con un genotipo $A_k A_{k'}$ nel locus j -esimo nella i -esima popolazione sarà:

$$\begin{aligned} & [(n_{ijk} + 1/K_j + 1) (n_{ijk} + 1/K_j)] / (n_{ij} + 2) (n_{ij} + 1) & \text{se } k = k' \\ & 2 [(n_{ijk} + 1/K_j) (n_{ijk} + 1/K_j)] / (n_{ij} + 2) (n_{ij} + 1) & \text{se } k \neq k' \end{aligned}$$

dove n_{ijk} è il numero di alleli k osservati nel locus j -esimo nella i -esima popolazione, n_{ij} è il numero di alleli totali nel locus j -esimo nella i -esima popolazione e K_j è il numero di alleli totali osservate in tutte le popolazioni nel locus j -esimo.

In questo studio ai due test di assegnazione è stato incorporato anche il metodo di esclusione – simulazione di Cournet et al., (1999), per avere un'indicazione sulla significatività statistica dell'assegnazione. Tale test consente di escludere una popolazione quando la probabilità che l'individuo in esame derivi da essa è più bassa di un determinato valore soglia (p value = 0.01). Tale valore è stato determinato simulando 1000 genotipi per popolazione mediante il nuovo Monte Carlo resampling method di Paetkau et al., (2004) e calcolando la frequenza del genotipo in esame nella nuova popolazione. Ad esempio se il genotipo è presente una volta su 10.000 simulazioni, la probabilità che esso appartenga alla suddetta popolazione sarà $p = 0.0001$. La simulazione dei genotipi avviene per estrazione (con risostituzione) di gameti multilocus da individui scelti a caso in ogni popolazione.

Dopo aver condotto le analisi statistiche suddette, per tutti gli individui analizzati (138 + 459) sono stati calcolati i tradizionali indici di diversità genetica: numero di alleli per locus (N_a), numero effettivo di alleli (N_e), eterozigosità osservata (H_o) ed attesa (H_E) in ogni locus. Per individuare eventuali deviazioni dall'equilibrio di Hardy – Weinberg è stato applicato il test del χ^2 (Hedrick 2000). In uno studio che richiede il DNA fingerprinting di un numero così elevato di genotipi, è importante quantificare la capacità dei marcatori molecolari di distinguere due individui differenti. Perciò è stata calcolata mediante Paetkau et al., (1998) per ogni locus microsatellitare, la unbiased probability of identity (PI_{unb}), cioè la probabilità che due alberi non imparentati, presi a caso da una popolazione, possano presentare genotipi multilocus identici. Inizialmente Paetkau & Strobeck (1994) calcolarono il valore PI per ogni locus con la seguente formula:

$$PI = \sum p_i^4 + \sum (2p_i p_j)^2$$

con p_i e p_j le frequenze dell' i -esimo e j -esimo allele.

Successivamente modificarono l'equazione prendendo in considerazione l'errore nel campionare popolazione di piccole dimensioni (Paetkau et al., 1998):

$$PI_{unb} = [n^3 (2a_2^2 - a_4) - 2n^2 (a_3 + 2a_2) + n(9a_2 + 2) - 6] / (n-1)(n-2)(n-3)$$

Indicando con n le dimensioni della popolazione, e con a_i la quantità $\sum p_j^i$ (p_j le frequenze j -esimo allele).

In popolazioni altamente sub-strutturate e specialmente in popolazioni contenenti molte famiglie di dimensioni ampie, l'equazione teorica di PI_{unb} potrebbe sottostimare la reale probabilità di trovare genotipi identici. Perciò, per i campioni presi in esame in detto studio, è stata calcolata

anche la probabilità che due piante con genitori comuni presentino genotipi multilocus identici (PI_{sib}) secondo la formula fornita da Evett & Weir (1998):

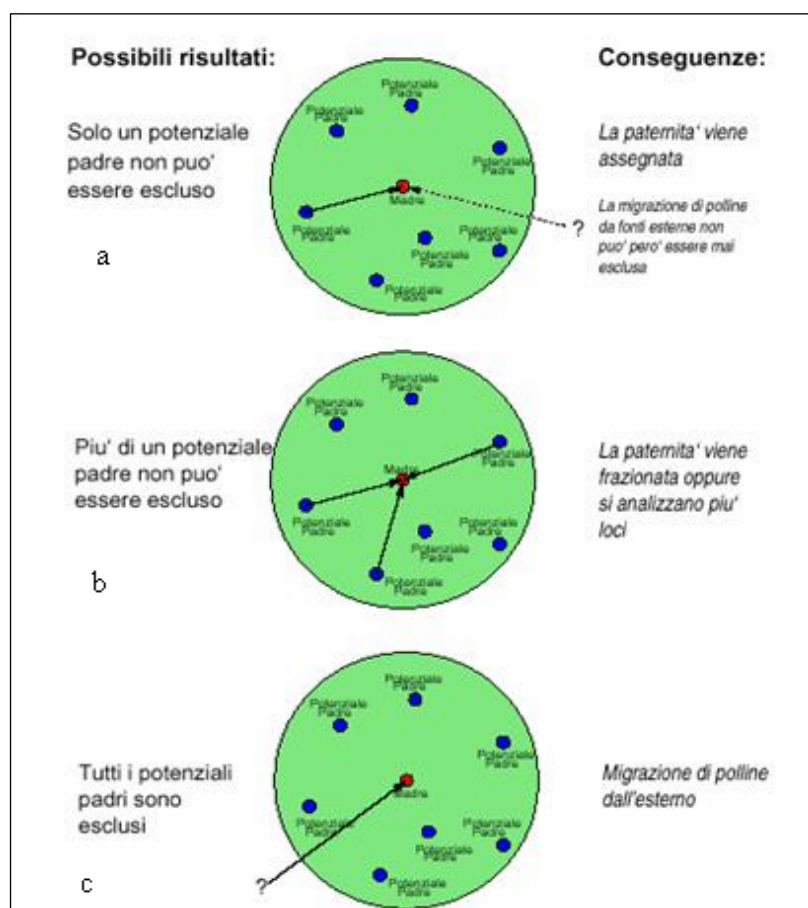
$$PI_{sib} = 0.25 + (0.5\sum p_i^2) + [0.5(0.5\sum p_i^2)^2] - (0.25\sum p_i^4)$$

Tutte le analisi sono state eseguite mediante GenAlEx version 6. Software (Peakall and Smouse, 2005).

3.2.5. Analisi di parentela

Per confermare la classificazione dei campioni nelle otto famiglie half-sib è stata effettuata l'analisi di maternità sulle otto piante madri *J. nigra* mediante il metodo ad esclusione. Tale metodo si basa sulle normali leggi di segregazione Mendeliane ed è attuabile quando si hanno a disposizione marcatori altamente polimorfici come gli SSRs. La maternità è stata definitivamente assegnata quando almeno un allele di origine materna era presente nella progenie in ogni locus per i dieci loci microsatellitari totali.

L'analisi di paternità su ogni "figlio" ibrido diploide identificato (cioè assegnare il più probabile padre *J. regia* ad una coppia geneticamente nota, in questo caso "madre *J. nigra* e figlio *J. x intermedia*") è stata eseguita mediante il software CERVUS ver. 2.0 (Marshall et al., 1998), un programma basato sul metodo "Most likelihood" (Meagher, 1986). In generale l'analisi di



paternità mediante SSRs può fornire tre possibili risultati (fig. 24). Se l'analisi ad esclusione, basata sulla probabilità di segregazione date dalle leggi di Mendel esclude tutti i potenziali padri tranne uno, la paternità viene assegnata (fig. 24a). Se tutti i potenziali padri vengono esclusi si ipotizza un'impollinazione esterna (fig. 24c).

Figura 24. Leonardi S., 2005. Dispense di ecologia vegetale, Università di Parma. Possibili risultati dell'analisi di paternità.

Se invece più di un potenziale padre non può essere escluso è necessario assegnare la paternità ad uno dei potenziali padri non esclusi (fig. 24b).

Perciò in questo studio l'aplotipo del potenziale padre è stato dedotto sottraendo il contributo materno dal genotipo multilocus della pianta figlio. L'aplotipo paterno così ottenuto è stato poi comparato sia con tutti i possibili aplotipi corrispondenti alle 49 piante adulte *J. regia* presenti nel Parco di Villa Mezzalira, sia con lo stesso genotipo materno per determinare una eventuale auto-fecondazione. In presenza di più possibili padri non esclusi, si è assegnata la paternità al padre con il valore LOD (LOD score o log_e-likelihood ratio) più alto (Most Likelihood approach, Meagher, 1986). Indicando con g_o , g_m , e g_a , il genotipo del figlio (offspring), della pianta madre (mother) e del padre putativo (alleged father) in un dato locus rispettivamente, la probabilità che il padre putativo sia il vero padre è data dalla seguente formula (Aitkin, 1995)

$$\text{Likelihood ratio} = L(H_1, H_2 | g_o, g_m, g_a) = T(g_o | g_m, g_a) / T(g_o | g_m)$$

indicando con $T(g_o | g_m, g_a)$ la probabilità di ottenere il genotipo g_o , data la madre g_m , ed il padre putativo g_a (leggi di segregazione di Mendel) e con $T(g_o | g_m)$ la probabilità che un gamete della madre si incroci con un gamete preso a caso dalla popolazione per dare il genotipo g_o . In altre parole la likelihood ratio misura la probabilità che il padre putativo abbia passato il gamete al figlio, rispetto ad un maschio preso a caso dalla popolazione (fig. 25).

Offspring's genotype (g_o)	Alleged father's genotype (g_a)	Mother's genotype (g_m)	$T(g_o g_m, g_a)$	$T(g_o g_m)$	$L(H_1, H_2)$
BB	BB	BB	1	b	$1/b$
BB	BX	BB	$1/2$	b	$1/2b$
BB	BB	BX	$1/2$	$b/2$	$1/b$
BB	BX	BX	$1/4$	$b/2$	$1/2b$
BC	BB	CC	1	b	$1/b$
BC	BX	CC	$1/2$	b	$1/2b$
BC	BB	CY	$1/2$	$b/2$	$1/b$
BC	BX	CY	$1/4$	$b/2$	$1/2b$
BC	BB	BC	$1/2$	$(b+c)/2$	$1/(b+c)$
BC	BY	BC	$1/4$	$(b+c)/2$	$1/2(b+c)$
BC	BC	BC	$1/2$	$(b+c)/2$	$1/(b+c)$

Figura 25. Marshall et al., (1998).

Likelihood ratio $[L(H_1, H_2)]$ per tutte le possibili combinazioni madre(mother) – figlio (offspring) - padre putativo (alleged father). X rappresenta un qualsiasi allele diverso da B, Y un qualsiasi allele diverso sia da B che da C. Le frequenze dell'allele B e C sono indicate con b e c .

Il LOD score è il logaritmo naturale del valore ottenuto moltiplicando i likelihood ratio di tutti i loci. Se due padri putativi hanno un LOD uguale, non è possibile attribuire la paternità. Nel caso di marcatori non sufficientemente polimorfici, questa ultima evenienza si presenta piuttosto spesso. Poiché i livelli di significatività statistica per i LOD score non possono essere derivati analiticamente, Marshall et al., (1998) hanno definito per questo fine la statistica Δ . Il valore Δ corrisponde alla differenza in LOD score tra il padre più probabile ed il secondo padre più probabile. Se indichiamo con n il numero di padri putativi non esclusi avremo:

Δ = non definito $n = 0$ (tutti i padri putativi esclusi, impollinazione esterna)

$\Delta = LOD_1$ $n = 1$ (un solo padre putativo non escluso)

$\Delta = LOD_1 - LOD_2$ $n > 1$ (due o più padri putativi non esclusi)

Basandosi sulle frequenze alleliche osservate, il programma CERVUS genera una combinazione madre-padre-figlio e un set di maschi candidati non imparentati per 10.000 volte. Per ogni simulazione calcola il corrispondente valore Δ fino ad ottenere due distribuzioni di Δ , "Most-likely fathers" e "Most-likely nonfathers" (fig. 26).

Il programma confronta i casi in cui il padre più probabile sia il vero padre e quelli in cui invece il padre più probabile sia un maschio preso a caso dalla popolazione. Il livello di confidenza sarà quel valore critico di Δ , ottenuto mediante simulazioni, che se usato fornisce una percentuale di falsi positivi (cioè assegnazione di un padre che in realtà non è imparentato) del 1:5 per l'80% (relaxed confidence) e del 1:20 per il 95% (strict confidence).

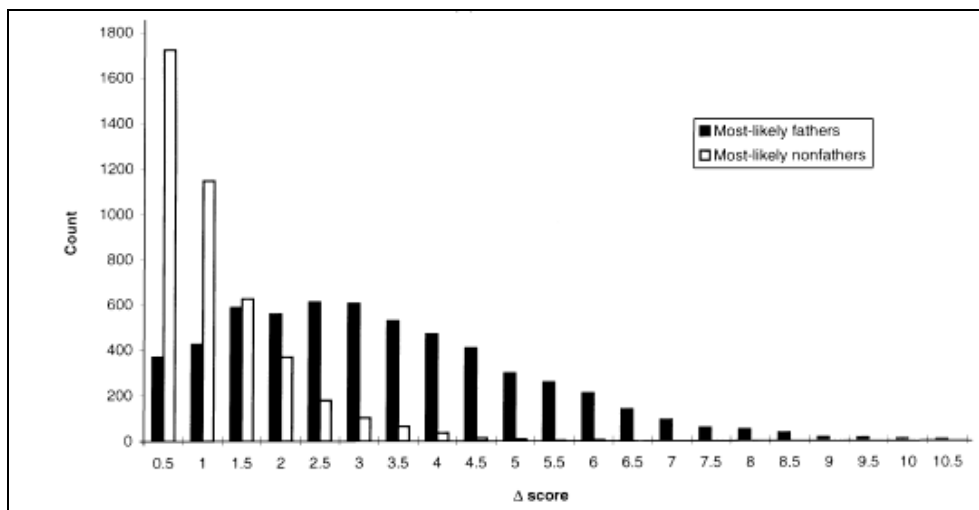


Figura 26. Marshall et al., (1998).

Le due distribuzioni di Δ , "Most-likely fathers" e "Most-likely nonfathers" ottenute mediante 10.000 simulazioni su cui calcolare il valore critico Δ per i due livelli di confidenza 80% (relaxed confidence) e 95% (strict confidence).

Nel presente studio è stata fatta l'assunzione che non vi siano errori di genotyping e che la frequenza di mutazione tra genitori e figli nei loci microsatellitari sia trascurabile. Inoltre individuati eventuali errori di campionamento, la maternità è stata ri-assegnata combinando il metodo ad esclusione con il Most Likelihood approach. Non avendo alcuna informazione sulla pianta madre, la probabilità che il genotipo putativo g_a sia un genitore per il genotipo figlio g_o è stata calcolata con la seguente formula (Marshall et al., 1998):

$$\text{Likelihood ratio} = L(H_1, H_2 | g_o, g_a) = T(g_o | g_a) / T(g_o)$$

indicando con $T(g_o | g_a)$ la probabilità di ottenere il genotipo g_o , data il genitore putativo g_a , e con $T(g_o)$ la probabilità di generare il genotipo figlio nella popolazione.

Infine, due distinte probabilità d'esclusione parentale sono state calcolate per ogni locus e per tutti i loci mediante il software CERVUS: 1) Esclusion probability second parent (EP2) corrispondente alla probabilità che un maschio non imparentato, campionato a caso nella popolazione, sia escluso come donatore di polline nell'analisi di paternità con madre nota, 2) Esclusion probability first parent (EP1) corrispondente alla probabilità che una pianta non imparentata, campionata a caso nella popolazione, sia esclusa come potenziale genitore del genotipo figlio.

3. 2 .6. Pattern d'impollinazione

Per ogni progenie sono state misurate le distanze (metri) tra la pianta madre *J. nigra* e tutti i padri *J. regia* assegnati, allo scopo di comprendere se il successo riproduttivo maschile fosse influenzato dalla disposizione spaziale degli alberi nel sito. Per comparare le distanze medie d'impollinazione tra le piante madri ibridogene *J. nigra* è stato usato il test non parametrico di Kruskal-Wallis mentre per individuare eventuali correlazioni statistiche tra il numero di successi riproduttivi e la distanza tra ogni pianta madre *J. nigra* e il padre *J. regia* assegnato è stato calcolato il coefficiente di correlazione di Spearman (XLSTATS software, Rodney-Carr 1997-2005).

3. 3. Risultati

3. 3 .1. Analisi di DNA fingerprinting

L'analisi microsatellitare dei 600 campioni ha permesso di amplificare 129 alleli, con una media di 12.9 alleli per primer da un minimo di 9 per il locus WGA69 e WGA9 ad un massimo di 23 per il locus WGA276 (tab. 10). L'Analisi delle Coordinate Principali condotta sulla matrice SM coefficient, sulla base di 129 alleli ha raggruppato i campioni in tre cluster principali (fig. 27). La Prima Coordinata Principale, che spiega il 19.89 % della varianza, ha separato nettamente due gruppi che includono rispettivamente 49 genotipi *J. regia* ed 82 genotipi *J. nigra*. La Seconda Coordinata Principale responsabile del 8.22 % della varianza, ha invece diviso le piante di noce nero in due sub-gruppi, *J. nigra* N e *J. nigra* NC. I sette ibridi diploidi già identificati (H1, H2, H19, IMP3, IMP4, IMP9 IMP18) sono stati incorporati nel terzo gruppo principale, localizzato in posizione intermedia tra il noce nero ed il noce comune. Come atteso, il triploide ibrido N21, si è posizionata tra il gruppo *J. nigra* e quello *J. x intermedia*.

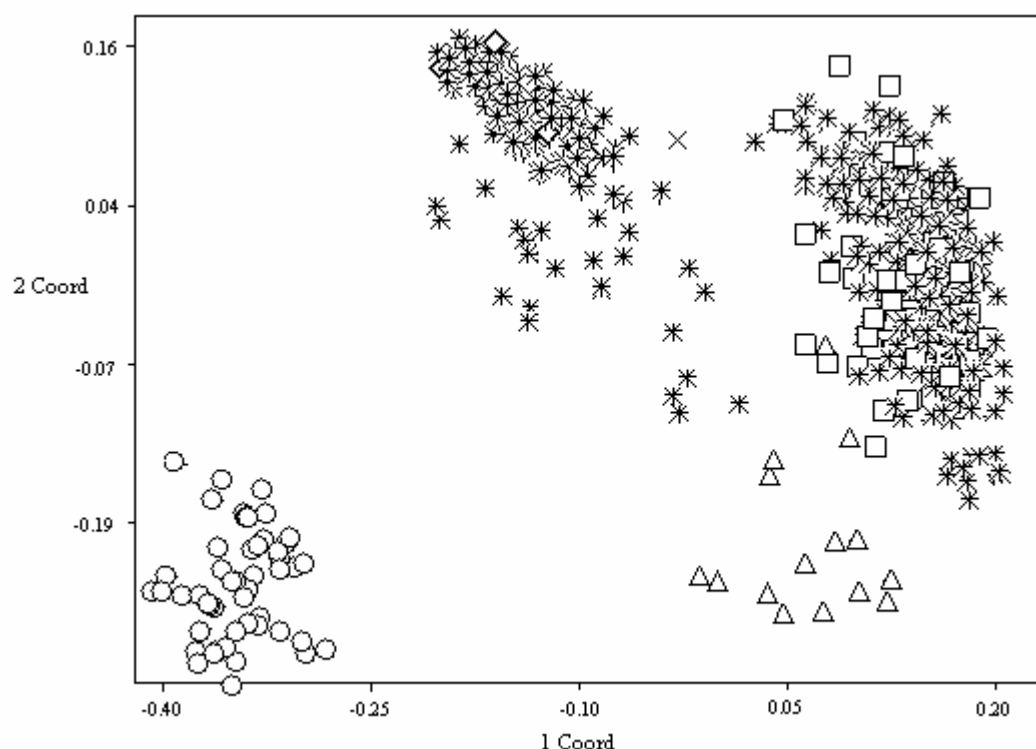


Figura 27. Analisi delle Coordinate Principali di 600 individui appartenenti al genere *Juglans* basata sui valori di similarità genetica calcolata per ogni coppia di campioni (SM – simple match coefficient) mediante 10 loci SSR. ○ *J. regia*, □ *J. nigra* N, △ *J. nigra* NC, × ibrido triploide N21, ◇ sette ibridi diploidi *Juglans x intermedia* Carr. (H1, H2, H19, IMP3, IMP4, IMP9 IMP18), * otto progenie (per un totale di 461 piante).

Tuttavia tale analisi dimostra solo che il terzo gruppo è composto da piante geneticamente distinte dalle due specie parentali, ma non da garanzie sulla loro natura di ibridi interspecifici *J. nigra x J. regia* di prima generazione. L'identificazione definitiva degli ibridi diploidi di noce presenti nelle otto progenie è stata effettuata assegnando i 459 genotipi figli alle quattro classi, corrispondenti ai quattro gruppi noti *J. nigra* N, *J. nigra* NC, *J. regia* e *J. x intermedia* (tab. 9) per mezzo dei due test di assegnazione, metodo frequentistico di Paetkau ed metodo parzialmente Baysiano di Rannala & Mountain, combinanti con il test di esclusione – simulazione di Cournot et al., (1999). Entrambi i metodi hanno assegnato 198 genotipi figli alla classe *J. x intermedia*, e 261 individui alla popolazione *J. nigra* N, con un elevato livello di confidenza statistica. Perciò nella totalità del germoplasma collezionato nel Parco di Villa Mezzalira è stato possibile identificare in totale 205 (198+7) ibridi diploidi. Due genotipi figli potenzialmente ibridi, triploidi in un singolo locus microsatellitare, sono stati esclusi dall'analisi d'assegnazione.

I loci microsatellitari analizzati hanno rivelato alti livelli di variabilità genetica nei campioni analizzati; i valori riscontrati insieme a quelli relativi alla probabilità d'identità (PI) e alla probabilità di esclusione (EP), calcolati nelle quattro classi, sono riportate nella Tabella 10.

Come atteso, sono state osservate significative deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg

Tabella 9. Assegnazione di 459 genotipi – figli a quattro classi (*J. nigra* N, *J. nigra* NC, *J. regia* e *J. x intermedia* Carr) basata sul metodo frequentistico di Paetkau et al., (1995) ed il metodo parzialmente Baysiano di Rannala & Mountain (1997). Entrambi i metodi incorporano il test di esclusione – simulazione di Cournet et al., (1999) basato sul nuovo Monte Carlo resampling method (Pautkau et al., 2004).

Specie	Gruppo	Test d'assegnazione		Numero totale di campioni ^a
		“Frequentistico”	“Parzialmente Bayesiano”	
<i>J. nigra</i> L.	<i>J. nigra</i> N (N = 67)	261	261	328
	<i>J. nigra</i> NC (N = 15)	0	0	15
<i>J. regia</i> L.	<i>J. regia</i> (N = 49)	0	0	49
<i>J. x intermedia</i> Carr.	Ibrido Diploide (N = 7)	198	198	205

^a Somma dei campioni già genotipizzati (cap. 2) con le piante – figlie assegnate.

(HWE) nel gruppo degli ibridi *J. x intermedia* con un eccesso di eterozigoti in ogni locus SSR (media $H_o = 0.887$, $H_E = 0.628$). Ciò è conforme al fatto che, un ibrido interspecifico di prima generazione (F_1) come *J. x intermedia* generalmente presenta in ogni locus SSR un allele *J. nigra*- specifico materno ed un allele *J. regia* specifico dal padre, il che determina un aumento dei valori di eterozigosità. Invece in nessuna delle due specie parentali è stata rilevata alcuna deviazione significativa dall'equilibrio di Hardy- Weinberg, ad eccezione del locus WGA89 nel sub-gruppo *J. nigra* N.

La probabilità che due individui non imparentati (PI_{unb}) o due individui con genitori comuni (PI_{sib}) condividano lo stesso profilo multilocus genetico è molto bassa nella maggior parte dei casi. Poiché nel campione analizzato i valori medi di PI_{unb} e PI_{unb} , calcolati considerando la totalità dei loci, varia rispettivamente da 2.3×10^{-6} (*J. nigra* N) a 1.8×10^{-10} (*J. nigra* NC) e da 0.003 (*J. nigra* N) a 7×10^{-4} (ibrido 2n) si può desumere che la probabilità di trovare due individui, imparentati o non imparentati, con lo stesso profilo multilocus genetico è praticamente nulla. Inoltre la probabilità che un maschio non imparentato possa essere escluso come possibile padre nell'analisi di paternità quando la madre è nota (EP2), oppure la probabilità che una pianta non imparentata sia esclusa come possibile genitore (EP1) è molto alta in tutte le popolazioni. La probabilità d'esclusione combinata (considerando tutti i loci) varia da 0.976 (*J. nigra* N) a 0.999 (*J. nigra* N) per EP2 e da 0.828 (*J. nigra* N) a 0.986 (*J. nigra* NC) per EP1, e indica che i livelli di polimorfismo erano sufficientemente alti per la successiva analisi di parentela. Tuttavia per il locus WGA69 nessun ibrido, né diploide né triploide, mostra alleli *J. regia* - specifici ma solo alleli *J. nigra* – specifici. Come dimostrato nel capitolo 2, la presenza di un allele nullo è dovuta

Tabella 10. Parametri di variabilità genetica misurati nei due sub-gruppi di noce nero (*J.nigra* N e *J.nigra* NC), nel noce comune e negli ibridi diploidi: il numero di alleli per locus (N_a), numero effettivo di alleli (N_e), eterozigosità osservata (H_o) ed attesa (H_E), probabilità d'identità (PI_{unb}, PI_{sib}), probabilità d'esclusione (EP1, EP2). Livello di significatività : ^{ns}= p > 0.05, **= p < 0.001

Source	Locus	N _a	N _e	H _o	H _E	ChiSq. Prob.	Probability of Identity		Exclusion probability	
							PI _{unb}	PI _{sib}	EP1	EP2
<i>Juglans nigra</i> N (N = 328)	WGA1	9	2.236	0.561	0.553	1.000 ^{ns}	0,277	0,543	0.160	0.286
	WGA4	9	1.893	0.530	0.472	0.696 ^{ns}	0,295	0,588	0.129	0.299
	WGA9	8	2.586	0.640	0.613	0.336 ^{ns}	0,206	0,495	0.206	0.363
	WGA69	5	1.368	0.299	0.269	0.430 ^{ns}	0,545	0,752	0.038	0.147
	WGA89	10	3.684	0.796	0.729	0.010*	0,118	0,415	0.320	0.495
	WGA118	8	2.460	0.674	0.594	0.110 ^{ns}	0,230	0,511	0.191	0.336
	WGA202	8	1.387	0.287	0.279	0.940 ^{ns}	0,528	0,743	0.042	0.158
	WGA276	10	2.326	0.573	0.570	0.203 ^{ns}	0,215	0,519	0.188	0.364
	WGA321	8	1.573	0.412	0.364	0.781 ^{ns}	0,420	0,673	0.072	0.210
	WGA331	8	2.787	0.662	0.641	0.990 ^{ns}	0,191	0,477	0.230	0.383
	Average	8.3	2.23	0.8	0.822					
Total		83					2.3x10 ⁻⁶	0.003	0.828	0.976
<i>Juglans nigra</i> NC (N = 15)	WGA1	4	1.891	0.533	0.471	0.955 ^{ns}	0,318	0,594	0.116	0.262
	WGA4	6	4.891	0.800	0.796	0.397 ^{ns}	0,071	0,370	0.421	0.600
	WGA9	6	3.435	0.800	0.709	0.685 ^{ns}	0,120	0,426	0.310	0.492
	WGA69	4	2.332	0.467	0.571	0.226 ^{ns}	0,236	0,523	0.171	0.327
	WGA89	7	3.689	0.800	0.729	0.224 ^{ns}	0,113	0,414	0.332	0.508
	WGA118	7	2.744	0.667	0.636	0.347 ^{ns}	0,162	0,473	0.245	0.429
	WGA202	6	5.625	0.800	0.822	0.061 ^{ns}	0,057	0,353	0.466	0.641
	WGA276	8	5.172	0.600	0.807	0.056 ^{ns}	0,060	0,362	0.455	0.632
	WGA321	6	5.357	1.000	0.813	0.152 ^{ns}	0,062	0,359	0.450	0.627
	WGA331	7	4.787	0.800	0.791	0.693 ^{ns}	0,073	0,373	0.418	0.596
	Average	6.1	3.992	0.72	0.714					
Total		61					1.8x10 ⁻¹⁰	1x10 ⁻⁴	0.986	0.999
<i>Juglans regia</i> (N = 49)	WGA1	4	2.853	0.612	0.650	0.548 ^{ns}	0,196	0,474	0.215	0.361
	WGA4	3	1.782	0.429	0.439	0.917 ^{ns}	0,403	0,631	0.096	0.181
	WGA9	3	2.441	0.531	0.590	0.391 ^{ns}	0,241	0,515	0.174	0.312
	WGA69	5	3.435	0.816	0.709	0.265 ^{ns}	0,134	0,429	0.288	0.461
	WGA89	3	2.823	0.653	0.646	0.993 ^{ns}	0,198	0,477	0.209	0.355
	WGA118	4	3.120	0.776	0.680	0.155 ^{ns}	0,162	0,451	0.255	0.417
	WGA202	5	3.482	0.735	0.713	0.639 ^{ns}	0,131	0,426	0.295	0.467
	WGA276	10	3.161	0.531	0.684	0.975 ^{ns}	0,154	0,447	0.273	0.437
	WGA321	5	3.349	0.633	0.701	0.983 ^{ns}	0,148	0,436	0.270	0.434
	WGA331	2	1.979	0.571	0.495	0.278 ^{ns}	0,378	0,597	0.122	0.186
	Average	4.4	2.843	0.629	0.631					
Total		44					9.3x10 ⁻⁸	5x10 ⁻⁴	0.919	0.989
<i>Hybrid 2n</i> (N = 205)	WGA1	7	4,882	1,000	0,795	0.0**	0,074	0,371	0.413	0.592
	WGA4	5	2,531	1,000	0,605	0.0**	0,235	0,506	0.188	0.322
	WGA9	5	2,578	0,873	0,612	0.0**	0,212	0,497	0.199	0.351
	WGA69	1	1,000	0,000	0,000	-	1,000	1,000	0.00	0.00
	WGA89	5	3,334	1,000	0,700	0.0**	0,133	0,433	0.289	0.467
	WGA118	6	4,306	1,000	0,768	0.0**	0,094	0,390	0.362	0.540
	WGA202	7	3,262	1,000	0,693	0.0**	0,132	0,436	0.290	0.470
	WGA276	15	5,095	1,000	0,804	0.0**	0,067	0,365	0.438	0.614
	WGA321	7	3,026	1,000	0,670	0.0**	0,154	0,454	0.256	0.431
	WGA331	4	2,720	1,000	0,632	0.0**	0,204	0,485	0.204	0.353
	Average	6.2	3,273	0,887	0,628					
Total		62					1.3x10 ⁻⁸	7x10 ⁻⁴	0.959	0.996

ad una mutazione nelle regioni fiancheggianti il microsatellite che cambiano l'affinità di uno dei due primer del noce comune per il sito di appaiamento. Perciò poiché la presenza di un allele nullo avrebbe causato errori nell'assegnazione della paternità (piante *J. regia* erroneamente escluse), il locus WGA69, utile per il check di maternità nelle piante madri *J. nigra*, è stato escluso dalla successiva analisi di parentela.

3.3.2. Analisi di parentela

Su tutti i 461 figli che compongono le otto famiglie (N3, N4, N17, N18, N21, N22, N23, N24), è stata effettuata l'analisi di maternità, con il metodo ad esclusione basato sui dieci loci microsatellitari. Gli individui che non mostravano nessuno dei due presunti alleli materni sono stati classificati come "errori di campionamento". I risultati dell'analisi di maternità nelle otto famiglie half-sib sono riportati in Tabella 11.

Tabella 11. Analisi di maternità sulle otto famiglie half-sib ed identificazione di eventuali errori di campionamento. La maternità è stata ri-assegnata combinando il metodo ad esclusione basato sulla segregazione Mendeliana ed il Most Likelihood approach di Marshall et al., (1998). Per ogni progenie è stata effettuata anche l'analisi di fingerprinting mediante dieci loci microsatellitari.

Pianta Madre	N. potenziale di figli nella progenie	Errori di campionamento	Ri-assegnazione della maternità	N. definitivo di figli nella progenie	Fingerprinting dei figli	
					<i>J. nigra</i>	<i>J. x intermedia</i>
N3	41	0	-	41	41	0
N4	29	0	-	29	29	0
N17	88	0	-	97	29	68 (70%)
N18	24	9	N17 (9)	15	15	0
N21	18	0	-	18	3	15 (83.3%) ^a
N22	76	3	N23 (3)	73	73	0
N23	71	0	-	74	57	17 (22.9%)
N24	114	0	-	114	14	100 (87.7%)

^a Due ibridi - figli, N21- 14 e N21-15, triploidi in un solo locus SSR, sono stati inclusi in tale analisi.

Sono stati riscontrati 12 errori di campionamento, 9 nella famiglia N18 e 3 nella N22, ma nessuna pianta ibrida diploide è risultata coinvolta in tali errori. La maternità dei 12 figli mal classificati è stata definita applicando il Most Likelihood approach, che ha permesso di identificare per ciascuno la pianta madre *J. nigra* senza disporre di alcuna informazione sul secondo genitore. Nove genotipi sono stati assegnati alla famiglia N17 mentre i restanti 3 alla famiglia N23 con un livello di confidenza del 95 %. Come indicato nella Tabella 11, l'analisi di fingerprinting delle progenie ha rivelato la presenza di quattro distinte madri ibridogene *J. nigra*. Centottantacinque su 198 ibridi diploidi sono nati da semi raccolti dalle piante N17, N23 e N24:

68 individui, pari al 70% della relativa progenie, sono figli di N17; 17, pari al 22,9% sono stati generati da N23; mentre la madre N24 ha dato 100 figli ibridi pari al 87.7 % della sua progenie. Nella famiglia N21 (pianta madre ibrida triploide) composta in totale da 18 figli, 15 individui sono risultati *J. x intermedia* compresi anche due campioni “atipici” (tab. 12). Il profilo multilocus dei due individui N21-14 e N21-15, è caratterizzato infatti da un allele *J. nigra* – specifico e due alleli *J. regia* – specifici rispettivamente, nel locus WGA 276 e WGA1. Inoltre nessun allele di origine materna ma solo l’allele di origine paterna (239 bp, allele *J. regia* – specifico) è presente nel locus WGA321 del campione N21-15. La crescita estremamente stentata e la successiva morte delle due piantine suddette non ha permesso di collezionare apici radicali per la conta cromosomica. .

I risultati dell’analisi di paternità dei 198 ibridi diploidi appartenenti a quattro famiglie hal-sib (N17, N21, N23, N24) sono riassunti nella Tabella 13. Nei campioni analizzati non è stato riscontrato nessun caso di auto-fecondazione. Il tasso di impollinazione esterna per le quattro piante madri è risultato assai elevato: 95 su 198 ibridi sono prodotti per impollinazione esterna alla popolazione. Più in dettaglio, la percentuale di piantine ibride ottenute per incrocio con piante di noce comune cresciute nel Parco di Villa Mezzalira è 58.83 % (40 figli) per N17, 32.29 % (6 figli) per N23, 49 % (49 figli) per N24, 61.5 % (8 figli) per N21, con un valore medio di 51.15 %. Per quattro figli, tre nella famiglia N24 ed uno nella famiglia N17, la paternità non è stata assegnata poiché due padri non escludibili presentavano lo stesso LOD score.

Ventisei (53 %) su 49 piante di *J. regia* situate nell’area del parco sono risultate essere donatrici di polline (fig. 28) ma solo 10 (V5, V7, V15, B4, B6, B7, B12, B13, B17, B19) cioè il 20.0 %, sono padri di più di due ibridi. I padri con un successo riproduttivo più elevato sono: B6 con 22 figli, V15 con 17 e B7 con 10. Un’ analisi dettagliata di ogni progenie ha rivelato che il numero più alto di fecondazioni per singolo donatore è 10 (V15) per la pianta madre N17, 12 (B6) per la pianta madre N24, e 2 (B12) per la pianta madre N21. Nessuna pianta *J. regia* ha impollinato più di una volta la madre N23.

La distanza media degli impollinatori dall’albero N21 (98.23 ± 3.96 m) e N23 (74.58 ± 12.23 m) è maggiore dei valori ottenuti per N17 (38.75 ± 6.969 m) ed N24 (46.98 ± 19 .m), (Tabella 13); queste differenze sono altamente significative (Kruskal-Wallis H tes, $P = 3.8e^{-7}$). Le distanze tra i padri assegnati e le piante madri *J. nigra* sono visualizzate per ogni progenie nella Figura 29. Ventidue tra i 36 alberi *J. regia* localizzati nel lato Est del Parco sono responsabili della produzione del 96% degli ibridi identificati. Tuttavia nessuna correlazione significativa è stata trovata tra il successo riproduttivo maschile e la distanza dalle diverse piante madri (N17, $r_s = 0.194$ ns; N21, $r_s = -0.612$ ns; N23, $r_s = 0$; N24, $r_s = -0.00384$ ns).

Tabella 12. Profilo SSR per 17 genotipi – figli della progenie N17 (pianta triploide ibrida): 15 ibridi diploidi (*hyb 2n*), 2 ibridi triploidi in un solo locus SSR (*hyb 3n*), e 2 piantine *J. nigra*. Le dimensioni degli alleli microsatellitari sono in bp, - indica l'allele nullo. ■ = allele *J. nigra* – specifico, ■ = allele *J. regia* – specifico, trasparente = allele comune

SSR Locus		WGA1			WGA4			WGA9			WGA69			WGA89			WGA118			WGA202			WGA276			WGA321			WGA331		
		A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3			
N21	Madre	187	185	180	250	248	233	247	247	239	171	171	-	201	207	211	221	226	198	252	246	260	153	149	189	244	244	226	181	181	270
N21-14	hyb 3n	187	180		250	231		239	247		171	-		201	221		226	198		252	267		149	177	189	244	239		181	274	
N21-15	hyb 3n	185	192	180	248	233		247	247		171	-		207	215		226	183		252	265		149	191		239	-		181	270	
N21-1	hyb 2n	185	192		248	233		239	247		171	-		201	211		221	196		252	267		153	189		226	244		181	270	
N21-2	hyb 2n	187	180		248	233		239	247		171	-		207	221		221	198		252	267		153	189		226	244		181	270	
N21-4	hyb 2n	187	190		248	233		239	247		171	-		201	215		221	198		246	275		149	177		226	244		181	270	
N21-5	hyb 2n	185	190		250	233		243	247		171	-		207	215		226	196		252	265		149	189		243	244		181	270	
N21-6	hyb 2n	185	190		250	233		239	247		171	-		207	215		226	196		246	275		153	189		243	244		181	274	
N21-7	hyb 2n	187	190		250	233		243	247		171	-		207	211		221	196		246	265		149	177		239	244		181	270	
N21-8	hyb 2n	187	192		248	233		239	247		171	-		201	215		226	198		246	275		153	173		226	244		181	270	
N21-9	hyb 2n	187	192		250	231		247	247		171	-		207	215		226	183		246	265		153	189		239	244		181	270	
N21-10	hyb 2n	187	180		250	233		239	247		171	-		207	211		226	198		252	275		149	189		243	244		181	270	
N21-11	hyb 2n	185	180		250	233		239	247		171	-		207	211		221	198		252	265		149	189		226	244		181	270	
N21-12	hyb 2n	187	180		248	233		247	247		171	-		201	221		221	198		246	265		153	189		239	244		181	274	
N21-13	hyb 2n	185	190		250	231		239	247		171	-		207	215		226	196		246	267		149	177		243	244		181	270	
N21-16	hyb 2n	185	190		248	233		239	247		171	-		201	221		221	196		246	265		149	189		239	244		181	270	
N21-3	J.nigra	187	187		248	252		228	247		171	171		207	190		221	221		252	260		144	149		246	244		181	195	
N21-17	J.nigra	187	185		248	240		255	247		171	171		207	201		221	221		246	256		153	153		244	244		181	181	
N21-20	J.nigra	185	185		248	250		228	247		171	175		207	190		221	223		252	252		153	161		244	244		181	181	

A1 = Allele1; A2 = Allele2; A3 = Allele3

Tabella 13. Risultati dell'analisi di paternità mediante Most-likelihood approach (Marshall et al., 1998; CERVUS software) effettuata su 198 ibridi diploidi appartenenti a quattro famiglie halb-sib (N17, N21, N23, N24).

Pianta Madre	Progenie ibrida (2n)	Impollinazione esterna	Impollinazione interna	N. impollinatori all'interno del sito	Padri assegnati con il Most-likelihood approach (casi)	Distanza media ^a (m)
N17	68	28 (41.17%)	40 (58.83%)	16	V3 (1), V4 (1), V5 (1), V7 (1), V15 (10), V16 (1), B3 (2), B4 (1), B6 (9), B7 (2), B8 (1), B10 (1), B12 (1), B13 (4), B17 (2), B19 (1)	38.75 ± 6.96
N21	13	5 (38.5%)	8 (61.5%)	8	V1 (1), V5 (1), V7 (1), V15 (1), B5 (1), B6 (1), B12 (2)	98.23 ± 3.96
N23	17	11 (64.70%)	6 (35.29%)	6	V17 (1), B4 (1), B14 (1), B17 (1), B19 (1), R10 (1)	74.58 ± 12.23
N24	100	51 (51%)	49 (49%)	18	V3 (1), V4 (1), V5 (1), V7 (2), V11 (2), V12 (1), V15 (6), B3 (1), B4 (1), B6 (12), B7 (7), B13 (2), B14 (1), B17 (3), B19 (1), R7 (1), R9 (2), AE (1)	46.98 ± 19.37

^a La distanza media tra la pianta madre ed i padri più probabili.

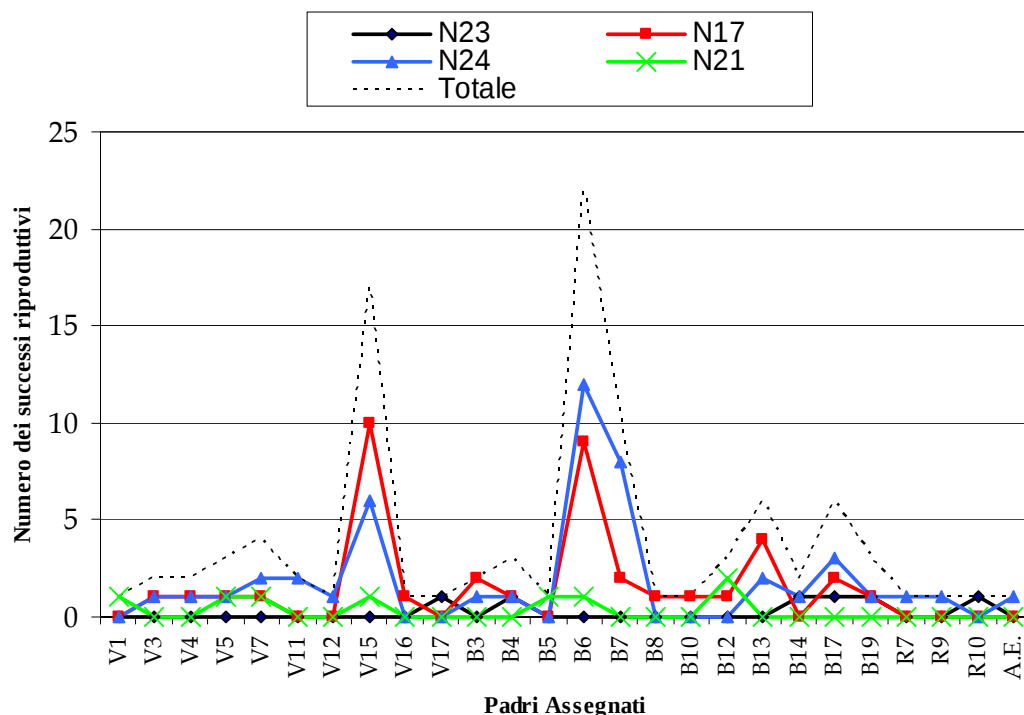


Figura 28. Successo riproduttivo dei padri *J. regia* assegnati mediante Most-likelihood approach per la produzione di ibridi diploidi interspecifici nelle quattro famiglie half-sib, N17, N21, N23, N24

3.4 Discussione

Dieci primer SSR, già testati ed ottimizzati nelle due specie *J. regia* e *J. nigra* (vedi cap. 2) sono stati utilizzati per l'analisi di DNA fingerprinting e di parentela di 461 individui ottenuti per libera impollinazione di otto piante madri presenti nel Parco di Villa Mezzalira. Come atteso i marcatori microsatellitari testati si sono rivelati un potente strumento per la discriminazione di piante di noce nero e di noce comune, ma anche dei loro ibridi interspecifici *J. nigra* x *J. regia*. Inoltre tali marcatori hanno consentito di individuare piante *J. nigra* (piante madri ibridogene) con una spontanea capacità d'ibridarsi con alcune piante *J. regia* (piante padri ibridogene). Come osservato anche in altre specie forestali, alti livelli di polimorfismo, tipici dei loci microsatellitari influenzano positivamente le probabilità d'identità e di esclusione (Streiff et al., 1999, He & Smouse 2002, Chaix et al., 2003). L'elevata ricchezza allelica ed eterozigosità misurata nei campioni in esame in ogni locus ha fornito elevate probabilità medie d'esclusione e basse probabilità medie d'identità, riflettendo il fatto che tutti questi parametri sono tra loro connessi. Tuttavia i vari range di PI (sia PI_{unb} che PI_{sib}) e di EP (sia EP1 che EP2) determinati in questo studio sono più bassi dei corrispondenti valori riportati per 39 famiglie ottenute per libera impollinazione nella specie *J. nigra*, collezionate in dieci differenti Stati Americani (Robichaud et al., 2006).

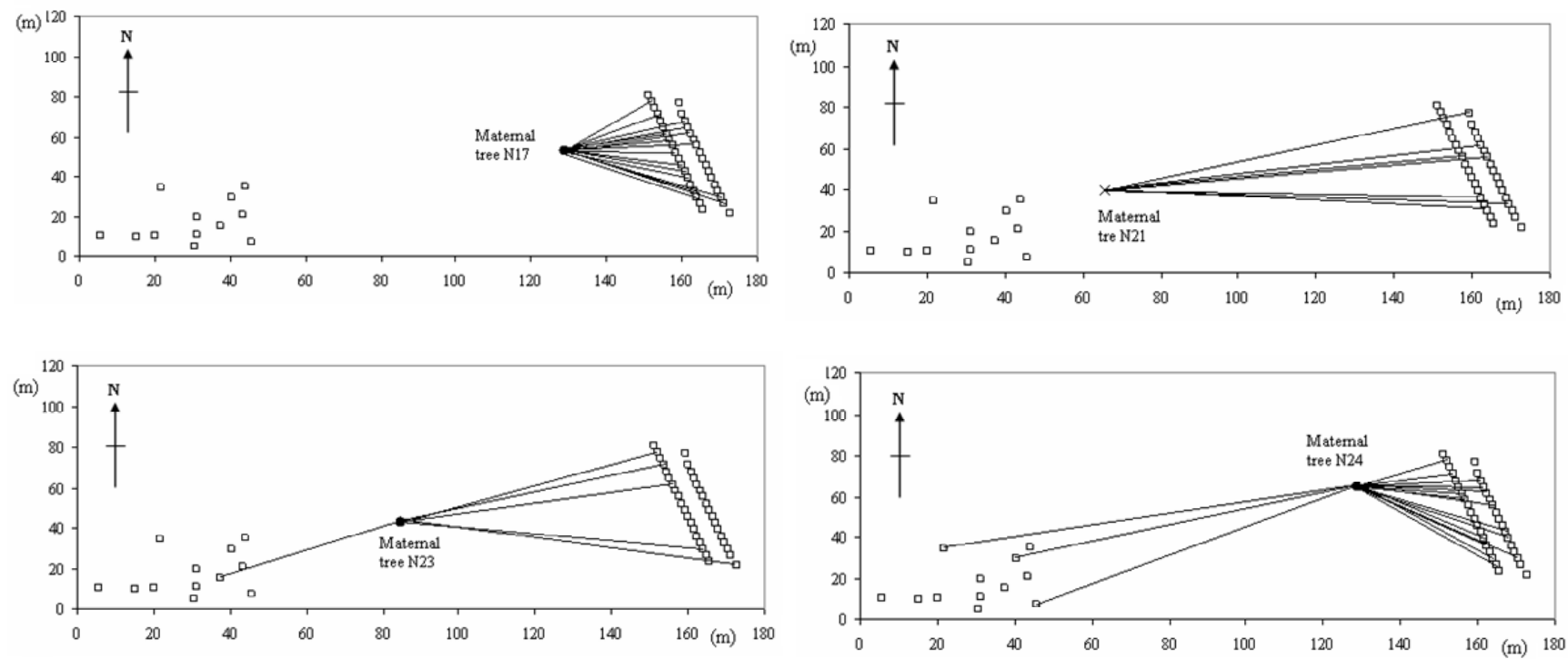


Figura 29. Distribuzione geografica dei donatori di polline per la produzione di ibridi interspecifici *J. x intermedia* Carr. con quattro piante madri ibridogene, N17, N21, N23, N24, individuate nel Parco di Villa Mezzalira.

Come già ipotizzato dagli autori, aver calcolato le frequenze alleliche nello stesso set di microsatelliti ma su campioni provenienti da un' area geografica così ampia degli Stati Uniti, avrebbe portato a sottostimare le probabilità d'identità ed a sovrastimare le probabilità d'esclusione. Comunque i risultati ottenuti in entrambi i casi dimostrano quanto questo set di marcatori SSR siano adatti per analisi di DNA fingerprinting e di parentela.

In questa ricerca l'analisi d'assegnazione, basata su 10 loci SSR, ha rivelato la presenza di 198 ibridi diploidi *J. x intermedia* tra i 461 genotipi – figli (42.9 %). L'analisi di maternità, effettuata su tutti gli individui delle otto progenie, ha consentito di evidenziare alcuni errori di campionamento (0.06 %). Ciò può essere dovuto al fatto che l'allestimento dell'impianto sperimentale con le otto progenie ha coinvolto numerosi operatori sia nella fase di raccolta dei semi da piante madri alte più di 30 m, sia per i processi di germinazione e la messa in campo delle piantine. Si suppone che alcuni errori siano avvenuti in qualche punto del processo sopra elencato. Quattro differenti madri ibridogene sono state identificate: la pianta N17, già precedentemente segnalata, ma anche N23, N24 e il triploide N21. Le tre piante di noce nero hanno mostrato un differente tasso di riproduzione, con una elevata percentuale di progenie ibrida per N24 (87.7 %) ed N17 (70 %). Contrariamente alle attese, 15 delle 18 piantine prodotte dal triploide N21 sono risultate ibride; due di loro, indicate come N21-14 ed N21-15, presentano un set cromosomico particolare. La spiegazione più plausibile per questi profili microsatellitari atipici sono i frequenti eventi meiotici irregolari che caratterizzano normalmente le piante ibride e che possono portare alla perdita o all'inserzione di uno o più cromosomi. Come descritto da Funk, (1970) alcune piante *J. x intermedia* possono fiorire abbondantemente ma produrre un numero assai ridotto di semi. Analisi citologiche in cellule meiotiche di piante ibride hanno dimostrato numerosi appaiamenti irregolari dei cromosomi omologhi.

La paternità dei 198 ibridi diploidi individuati nelle quattro famiglie half-sib, è stata dedotta applicando il Most-likelihood approach di Marshall et al., (1998), basato su nove loci microsatellitari. Una significativa porzione della progenie ibrida totale (48.85 %) è nata dall'impollinazione di piante *J. nigra* da parte di alberi *J. regia* estranei all'area campionata. Chiaramente questo sito non è geograficamente isolato da altre popolazioni/piante di noce e perciò la presenza di polline “esterno” nella nube pollinica che insiste sulla popolazione del Parco è altamente probabile. Questo risultato è particolarmente frequente; una pesante contaminazione da polline esterno, con una percentuale che varia da un minimo di 21.6 % ad un massimo di 63%, è stata osservata in numerosi studi, con specie forestali ad impollinazione anemofila come *Eucalyptus grandis* (Chaix et al., 2003), *Quercus macrocarpa* (Dow & Ashley, 1998), *Fagus crenata* (Asuka et al., 2005), *Magnolia obovata* (Isagi et al., 2004) e *Juglans*

mandshurica (Bai et al., 2007). L'ampia porzione di donatori di polline esterni al sito determinata in questo studio dimostra quanto i granuli di polline di noce comune possano essere trasportati per lunghe distanze, fino ad un miglio, sebbene l'effettiva impollinazione naturale secondo Griggs, (1953) sarebbe generalmente limitata a 60 – 100 metri. Come dimostrato da Impiumi & Ramina, (1967), la densità del polline di noce comune rimane costante per 160 metri con vento praticamente nullo (0.5 m / s). Nel presente studio la distanza media massima degli impollinatori all'interno del Parco è di 98.23 ± 3.96 metri ed i calcoli dimostrano che il polline esterno ha “viaggiato” almeno per 110 m.

I dati ottenuti dimostrano anche che vi è un differente successo riproduttivo tra i donatori di polline all'interno del sito di ricerca. Nella produzione di progenie ibrida, il successo riproduttivo maschile non è risultato equamente distribuito ne quantitativamente ne geograficamente. Apparentemente gli alberi di noce comune presenti nel versante Est del Parco hanno più possibilità di fecondare le piante madri di noce nero localizzate al centro del sito. Tuttavia solo 10 dei 26 alberi *J. regia* presenti nel versante Est contribuiscono efficacemente alla produzione di ibridi, in quanto padri di più di due figli ibridi, mentre 14 individui non partecipano affatto al processo. Una distribuzione dei successi riproduttivi maschili non omogenea è stata dimostrata più volte in molte specie (es. He & Smouse 2002; Chaix et al., 2003; Isagi et al., 2004; Grattapaglia et al., 2004). Sebbene non si disponga di dati fenologici relativi alle piante mappate nel Parco di Villa Mezzalira, e il disegno sperimentale non consenta di discriminare tra tutti i possibili fattori alla base del differente successo riproduttivo maschile, tuttavia si può tentare di formulare alcune ipotesi. Fattori come la quantità del polline e il tempo di emissione, la localizzazione geografica delle piante, la distanza tra il donatore di polline e la pianta madre, le dimensioni fisiche delle piante e le condizioni ambientali (ad esempio la direzione del vento), possono fortemente influenzare il successo riproduttivo delle piante maschili (Asuka et al., 2005; Wheeler et al., 2006). Nessuna correlazione significativa è stata trovata tra il successo riproduttivo delle piante di noce comune e la loro distanza dalle piante madri di noce nero. La distanza e l'orientamento tra alberi potrebbe aver influenzato il pattern d'impollinazione ma solo marginalmente. I tempi di rilascio del polline ed eventuali incompatibilità genetiche potrebbe essere alla base di tali risultati. I padri identificati potrebbero essere stati le uniche piante ad emettere polline quando le piante madri presentavano stigmi recettivi (sovrapposizione della fioritura). Inoltre fattori pre-zigotici come la germinazione del polline e la crescita del tubo pollinico, o fattori post-zigotici come la complementazione genetica, potrebbero aver avuto un profondo effetto sul tasso riproduttivo maschile; questi fattori sembrano essere particolarmente rilevanti per incroci interspecifici (Wheeler et al., 2006).

Sebbene siano note fluttuazioni di polline nel corso degli anni e l'esperimento sia stato eseguito su un numero relativamente ristretto di piante parentali, l'analisi di parentela di famiglie half-sib basata su microsatelliti nucleari può fornire informazioni immediate su quali genotipi di noce potrebbero essere utili all'allestimento di nuovi impianti per la produzione di ibridi interspecifici *J. x intermedia* di prima generazione. La selezione a posteriori delle piante ibridogene potrebbe essere una valida alternativa ai tradizionali approcci nei programmi di miglioramento genetico e permetterebbe di accorciare sensibilmente i tempi e ridurre i costi di manodopera. Infatti tale metodica consente d'identificare nuove combinazioni parentali a basso costo ed in breve tempo senza disporre di osservazioni morfologiche e fenologiche degli alberi.

4. NBS-profiling approach per l'identificazione di genotipi resistenti all'antracnosi (*Gnomonia leptostyla* (Fr) Ces.) in *Juglans* spp: analisi preliminare.

4. 1. Introduzione

L'antracnosi, causata dal fungo ascomicete *Gnomonia leptostyla* (Fr.), è attualmente la malattia fogliare più comune del noce, presente in tutte le aree di coltivazione, in particolare nel bacino del Mediterraneo, colpisce sia piante giovani, in vivaio, sia gli adulti nelle piantagioni. Il fungo attacca prevalentemente le porzioni verdi della pianta come le foglie, il frutto, i germogli e più raramente rami e tronco, e genera aree necrotiche di forma irregolare spesso circondate da un piccolo alone clorotico (paragrafo 1.4.3). Se le condizioni sono particolarmente favorevoli alla malattia, si hanno defogliazioni precoci, lo sviluppo di estesi cancri rameali accompagnati da disseccamento di porzioni di chioma e degenerazione dei frutti con la necrosi del mallo, l'atrofizzazione del seme e la successiva cascola (Black & Neerly, 1978). Attualmente la lotta all'antracnosi si effettua rimuovendo e bruciando il materiale infetto oppure con trattamenti preventivi a base di poltiglia bordolese o con fungicidi. Tuttavia, l'alternativa più valida alle pratiche agronomiche e chimiche nella lotta all'antracnosi è rappresentata dalla selezione di genotipi di noce resistenti alla *Gnomonia leptostyla*. Entrambe le specie, *J. regia* ed *J. nigra*, risultano suscettibili all'antracnosi, sebbene vi sia una netta variabilità di comportamento nelle piante di noce nero che in America presentano frequentemente sia suscettibilità che resistenza al fungo (Funk et al., 1981; Woeste et al., 2001; Mielke et al., 2004). Nonostante non si debba sottovalutare il ruolo svolto dal differente flushing time tra i genotipi, le scarse informazioni attualmente disponibili ci spingono a valutare la possibilità che la comparsa di alcuni genotipi resistenti appartenenti alla specie *J. nigra* sia da classificare come una "race-specific resistance" dovuta ad una interazione ligando- Receptor-like R gene che blocca la diffusione del patogeno nelle foglie (paragrafo 1.5.4).

I marcatori molecolari per la valutazione della diversità genetica possono essere suddivisi sostanzialmente in due gruppi: marcatori neutrali e marcatori funzionali. I marcatori neutrali, come AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ed i SSRs (esclusi gli EST-SSRs), non sono generalmente soggetti a pressione selettiva. Il loro range di applicazioni è ampio; dalla genetica di popolazione (es. misure di differenziazione genetica, studi di flusso genetico e d'ibridazione), a studi di genome mapping, comparative mapping, DNA fingerprinting fino a

studi di filogenesi. Tuttavia nella maggior parte dei casi le caratteristiche funzionali (es. resistenza alle malattie) che rendono una specie o un ecotipo atto ad occupare un certa area geografica o una nicchia ecologica sono regolate da un set limitato di geni, perciò la loro correlazione con marcatori neutrali è spesso puramente casuale. Al contrario, sono definiti funzionali quei marcatori che visualizzano la diversità in geni che controllano caratteri d'interesse (o nelle loro regioni fiancheggianti). I marcatori funzionali hanno come bersaglio un gene o un gruppo di geni e perciò sono soggetti a pressione selettiva. Per questo motivo è elevata la probabilità di trovare una buona correlazione tra marcatori funzionali polimorfici e il carattere quantitativo d'interesse. Tra i marcatori funzionali si annoverano i microsatelliti, sviluppati da sequenze "Expressed Sequence Tag (EST), i "single nucleotide polymorphisms (SNPs) in geni candidati ed il "Motif-directed profiling approach" (review, Van der Linden et al., 2005).

Il Motif-directed profiling approach sfrutta le sequenze di DNA altamente conservate (motivi) presenti all'interno di domini proteici tipici di alcune famiglie geniche, come il dominio MADS box per i fattori di trascrizione codificati dai MADS box genes (Theissen, 2001), il dominio catalitico di tutte le protein-chinasi (Hardie, 1999) e il dominio NBS per le Receptor-like R genes (paragrafo 1.5.1), per visualizzare la variabilità in gruppi di geni funzionalmente correlati tra loro (Van Tienderen et al. 2002). La metodica si basa sull'amplificazione mediante PCR di un gruppo di geni funzionalmente correlati (famiglia genica) usando un primer selettivo, degenerato, complementare alla sequenza del motivo conservato. Tale primer deve apparirsi al maggior numero possibile di geni all'interno di una stessa famiglia genica, ma rimane specifico e ripetibile. A secondo del grado di conservazione, questo primer può essere parzialmente degenerato, cioè contenere sia inosine sia un mix di nucleotidi nelle posizioni meno conservate (Van Tienderen et al. 2002).

Come è mostrato nella Figura 30, il Motif-directed profiling approach consta di quattro step principali. Il DNA genomico viene digerito con un singolo enzima di restrizione a taglio frequente (es. *RsaI* o *MseI*) per ottenere frammenti di differenti dimensioni, alle cui estremità viene saldato uno specifico adattatore (fig. 30a,b). Il DNA viene poi amplificato mediante PCR, utilizzando contemporaneamente il primer degenerato, che si appaia al motivo conservato, ed un primer complementare all'adattatore (fig. 30c). I frammenti amplificati vengono marcati e separati mediante elettroforesi su gel ad elevata risoluzione da cui si ottiene un profilo multilocus per ogni campione (fig. 30d). Variazione nella lunghezza di un frammento, oppure la presenza e/o l'assenza di una banda, può essere il risultato di mutazioni puntiformi e di delezioni / inserzioni di nucleotidi all'interno dei geni o vicino ai geni d'interesse. Tale approccio consente

di analizzare parti del genoma a funzione nota, in breve tempo, senza disporre di alcuna informazione precedente.

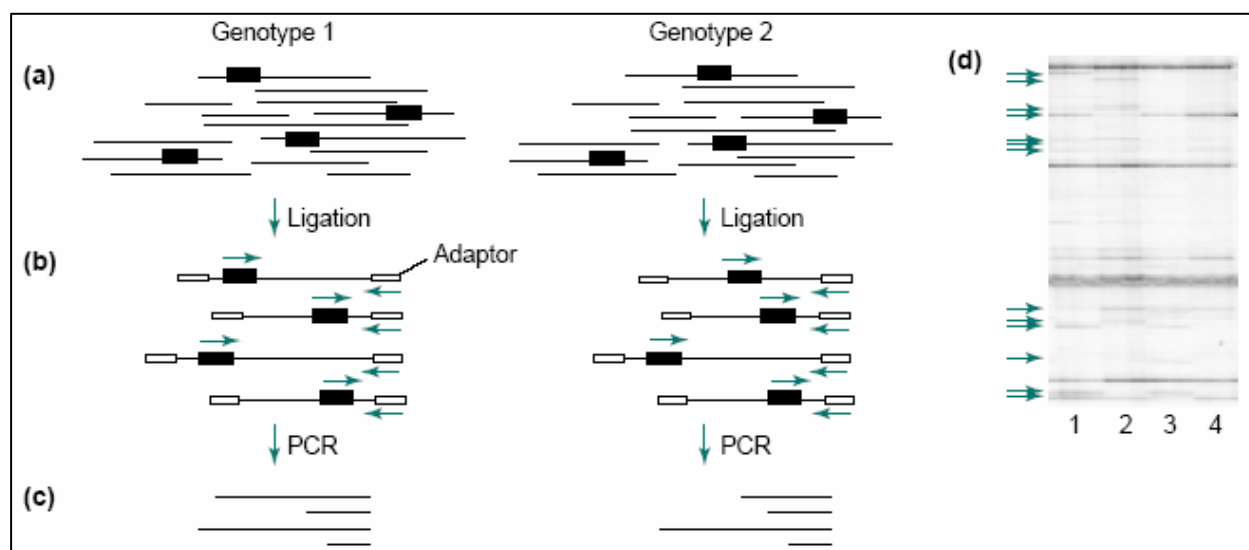


Figura 30. Van Tienderen et al. (2002).

I quattro step principali del Motif-directed profiling approach: a) Digestione del DNA genomico con un enzima di restrizione a taglio frequente (es. RsaI o MseI); b) Saldatura all'estremità dei frammenti ottenuti di un adattatore; c) Amplificazione mediante il primer degenerato complementare al motivo conservato (—) ed un primer complementare all'adattatore; d) Visualizzazione dei frammenti amplificati in un gel a alta risoluzione.

Il Nucleotide – Binding Site (NBS) profiling approach, variante del Motif-directed profiling approach, ha come target la famiglia dei Resistant genes (R-genes) ed i Resistant-gene Analogues (RAGs), e utilizza dei primer degenerati, omologhi ai motivi altamente conservati (es. P-loop, kinase2, GLPL), presenti nel dominio NBS della famiglia dei cytoplasmic nucleotide binding site-leucine rich repeat (NBS-LRR) - containing R-genes (paragrafo 1.5.1; Van der Linden et al., 2004). In passato numerose sequenze RAGs, ottenute amplificando la regione genomica, comprese tra due motivi conservati del dominio NBS, sono state clonate e mappate in differenti specie vegetali, come *Arabidopsis thaliana* (Aarts et al., 1998), mais (Collins et al., 1998), riso e orzo (Leister et al., 1998; Mago et al., 1999), lattuga (Shen et al., 1998), *Citrus* (Deng et al., 2000), *Brassica oleracea* L. (Vicente & King, 2001) *Sorghum bicolor* (Totad et al., 2005) e nel pino bianco (Liu & Ekramoddoullah., 2003). Un numero elevato di tali sequenze risultavano associate (linked loci) a geni R già noti. Tuttavia nella maggior parte dei casi l'analisi di mappatura richiedeva il clonaggio dei frammenti RAGs amplificati, l'individuazione dei polimorfismi e la conversione di tali polimorfismi in marcatori da usare nelle popolazioni segreganti. L' NBS - profiling approach proposto da Van der Linden et al., (2004) invece consente di generare un'ampia collezione di frammenti R-genes e RAGs e, allo stesso tempo, di valutare la variabilità genetica in tali frammenti. L' NBS - profiling approach è già stato

applicato con successo in numerose specie quali mela (Calange et al., 2005), lattuga, patata, pomodoro, orzo (Van der Linden et al., 2004; Syed et al., 2006, Malosetti et al., 2007), e nel grano (Mantovani et al., 2004). Molte delle bande amplificate hanno rivelato alti livelli di similarità con sequenze del dominio NBS già conosciute, dimostrando che il metodo può fornire marcatori molecolari funzionali strettamente associati ai geni R o RAGs. L' NBS - profiling approach può trovare perciò una sua valida applicazione anche in programmi di selezione marker – assistita (MAS) con la caratterizzazione di nuovi loci per la resistenza alle malattie.

Di recente, nell'ambito della collaborazione con l'Istituto CRA-ISPIO (Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura, Unità di Ricerca per le produzioni fuoriforesta, Sezione Operativa Periferica di Roma, Unità di Ricerca Forestale, Strada Valle della Quistione, Roma), è stato individuato un impianto sperimentale di noce che include *J. regia* e *J. nigra*, presso l' "Azienda Ovale", in Località Casalotti, Roma. Studi per la selezione di genotipi resistenti all'antracnosi condotti, secondo un approccio tradizionale, dal Prof. N. Anselmi dell'Università della Tuscia di Viterbo (Rapporto Finale 2007 RI.SELV.ITALIA) hanno dimostrato che le piante *J. regia* presenti nell'impianto sono tutte suscettibili all'antracnosi. Al contrario le piante di noce nero ivi cresciute sembrano essere omogeneamente resistenti agli attacchi della *Gnomonia leptostyla*, con la sola eccezione di un genotipo classificato come "suscettibile". Sulla base di tali risultati l'impianto è stato considerato adatto per applicare l'approccio NBS-profiling. Il presente studio è stato quindi condotto con i seguenti obiettivi: (1) caratterizzare geneticamente le piante di noce presenti nell'impianto sperimentale Azienda Ovale mediante i marcatori neutrali SSRs (2) studiare la ripresa vegetativa delle piante appartenenti alle due specie *J. nigra* e *J. regia* presenti nel sito di ricerca (effetto del flushing time) (3) individuare marcatori molecolari funzionali strettamente associati ai R-genes o RAGs (Resistant-analogs) per l'identificazione precoce di piante resistenti all'antracnosi. Analizzare, mediante NBS-profiling approach, un subset di campioni *J. nigra* e *J. regia* dell'impianto sperimentale Azienda Ovale.

4. 2. Materiale e Metodi

4. 2. 1. Materiale (Impianto Azienda Ovale)

L'azienda Ovale nel comune di Roma, Località Casalotti , è situata a 40 m s.l.m. ed occupa una superficie complessiva di 76 ha. L'azienda appartiene ed è gestita dall'Istituto CRA-ISPIO, Unità di Ricerca Forestale, Roma. L'impianto sperimentale, ove sono conservate 603 piante di noce, è di 1.5 ettari (fig. 31). Realizzato nel 1989 per confrontare specie pure di noce (*J. nigra* e *J. regia*) con due differenti ibridi interspecifici francesi (*NG23 x RA* ed *J. majorNG209 x RA*),

presenta un disegno sperimentale a blocchi randomizzati con 23 ripetizioni. Ogni ripetizione contiene 4 tesi (*J. nigra*; *J. regia* ed i due differenti ibridi francesi) disposte casualmente per un totale di 16 piante. Ogni tesi contiene 4 piante disposte secondo un sesto quadrato e ad una distanza di 5x5m.

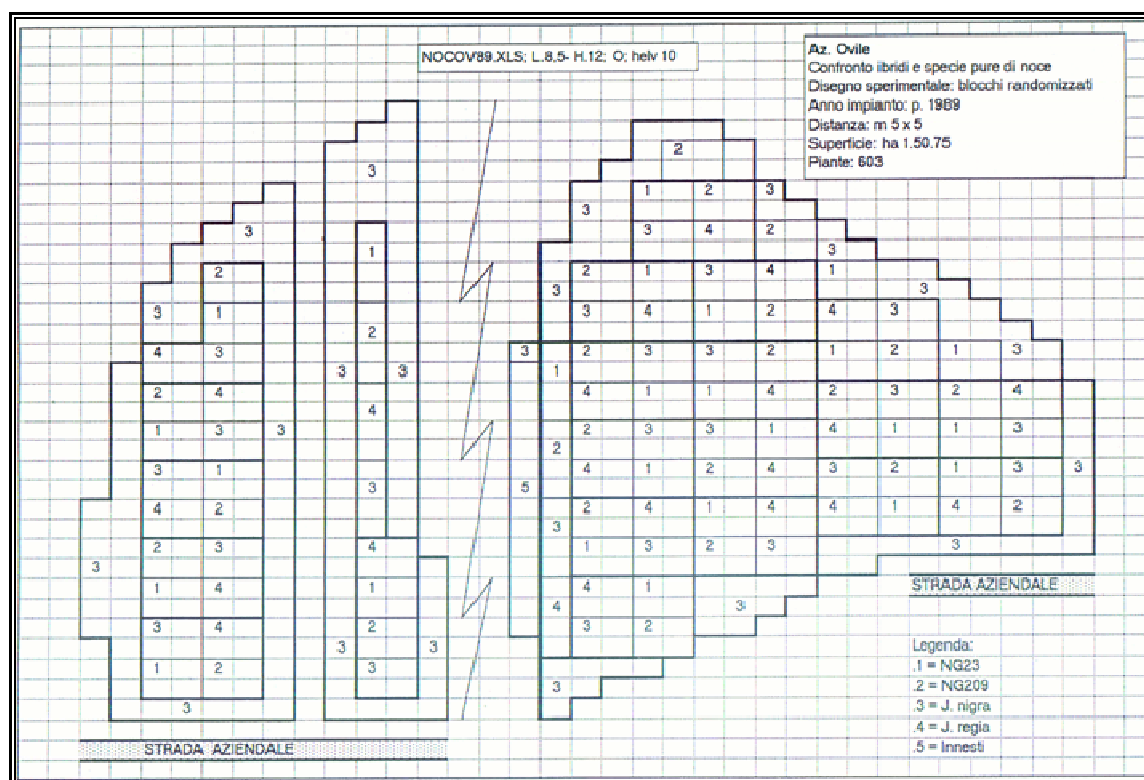


Figura 31. Impianto Sperimentale di noce, Azienda Ovile, Località Casalotti, CRA-ISPIO, Unità di Ricerca Forestale, Roma. Disegno sperimentale a blocchi randomizzati.

Le piante di noce nero e noce comune presenti nell'impianto derivano da semi commerciali forniti rispettivamente dal vivaio ex SAF di Casale Monferrato (AL) e dal vivaio ex SAF di Sorrento (NA). Nella primavera 2007 sono state campionate e quindi conservate a -80°, foglie mature da 132 piante. Osservazioni basate su marcatori morfologici effettuate dall'Istituto CRA-ISPIO Unità di Ricerca Forestale hanno permesso di classificare 63 individui come *J. regia* e 69 genotipi come *J. nigra*. Gli studi condotti dal Prof. N. Anselmi dell'Università della Tuscia di Viterbo, basati sul calcolo della superficie necrosata delle foglie raccolte in campo nell'estate 2004, indicano che le 63 piante di noce comune presenti nell'Impianto sono suscettibili all'antracnosi (tab. 15), mentre le 68 piante di noce nero sembrano essere omogeneamente resistenti agli attacchi del fungo *Gnomonia leptostyla* (tab. 14: sfn = 0.02-0.1 %), con la sola eccezione del genotipo 87 JN classificato come "genotipo con bassa suscettibilità" (tab. 15; sfn = 1.5). Sulla base dei valori medi di superficie fogliare necrosata, le piante *J. regia* sono state

Tabella 14. Anselmi et al., 2007.

Lista delle 68 piante di noce nero resistenti all'antracnosi (*Gnomonia leptostyla*) collezionate nell'impianto sperimentale Azienda Ovale, Roma.

Campioni Resistenti all'antracnosi					
Specie	genotipo	Area necrosata (%)	Specie	genotipo	Area necrosata (%)
J. nigra	13JN	0.02	J. nigra	76JN	0.06
J. nigra	23JN	0.02	J. nigra	79JN	0.06
J. nigra	51JN	0.02	J. nigra	102JN	0.06
J. nigra	57JN	0.02	J. nigra	5JN	0.07
J. nigra	59JN	0.02	J. nigra	9JN	0.07
J. nigra	116JN	0.02	J. nigra	43JN	0.07
J. nigra	2JN	0.03	J. nigra	356-1	0.07
J. nigra	14JN	0.03	J. nigra	356-2	0.07
J. nigra	88JN	0.03	J. nigra	356-3	0.07
J. nigra	111JN	0.03	J. nigra	356-4	0.07
J. nigra	112JN	0.03	J. nigra	365-1	0.07
J. nigra	117JN	0.03	J. nigra	365-2	0.07
J. nigra	118JN	0.03	J. nigra	365-3	0.07
J. nigra	124JN	0.03	J. nigra	365-4	0.07
J. nigra	125JN	0.03	J. nigra	74JN	0.07
J. nigra	10JN	0.04	J. nigra	78JN	0.07
J. nigra	60JN	0.04	J. nigra	95JN	0.07
J. nigra	63JN	0.04	J. nigra	98JN	0.07
J. nigra	68JN	0.04	J. nigra	96JN	0.07
J. nigra	75JN	0.04	J. nigra	114JN	0.07
J. nigra	71JN	0.04	J. nigra	123JN	0.07
J. nigra	83JN	0.04	J. nigra	1JN	0.08
J. nigra	101JN	0.04	J. nigra	19JN	0.08
J. nigra	113JN	0.04	J. nigra	32JN	0.08
J. nigra	115JN	0.04	J. nigra	90JN	0.08
J. nigra	31JN	0.05	J. nigra	6JN	0.1
J. nigra	52JN	0.05	J. nigra	18JN	0.1
J. nigra	58JN	0.05	J. nigra	21JN	0.1
J. nigra	62JN	0.05	J. nigra	20JN	0.1
J. nigra	61JN	0.05	J. nigra	44JN	0.1
J. nigra	69JN	0.05	J. nigra	82JN	0.1
J. nigra	100JN	0.05	J. nigra	97JN	0.1
J. nigra	24JN	0.06	J. nigra	99JN	0.1
J. nigra	70JN	0.06	J. nigra	126JN	0.1

Tabella 15. Anselmi et al., 2007.

Lista delle 64 piante di noce suscettibili all'antracnosi (*Gnomonia leptostyla*) collezionate nell'impianto sperimentale Azienda Ovale, Roma: 63 genotipi *J. regia* ed 1 genotipo *J. nigra*.

Genotipi suscettibili all'antracnosi								
Bassa Suscettibilità			Media Suscettibilità			Elevata Suscettibilità		
Specie	genotipo	A. necr. (%)	Specie	genotipo	A. necr. (%)	Specie	genotipo	A. necr. (%)
J. nigra	87JN	1.5	J. regia	37RA	12	J. regia	29RA	33
J. regia	128RA	1.3	J. regia	54RA	12	J. regia	64RA	33
J. regia	86RA	3	J. regia	85RA	12.7	J. regia	30RA	35.8
J. regia	105RA	3	J. regia	67RA	14.7	J. regia	66RA	36.1
J. regia	36RA	3.3	J. regia	107RA	16	J. regia	73RA	37
J. regia	27RA	3.4	J. regia	120RA	17	J. regia	65RA	38.5
J. regia	119RA	3.4	J. regia	40RA	19	J. regia	12RA	42.3
J. regia	94RA	4	J. regia	25RA	21	J. regia	38RA	42.5
J. regia	8RA	4.8	J. regia	81RA	21			
J. regia	39RA	4.8	J. regia	56RA	22			
J. regia	34RA	5	J. regia	28RA	22.5			
J. regia	122RA	5						
J. regia	77RA	5.3						
J. regia	4RA	5.4						
J. regia	11RA	5.5						
J. regia	91RA	5.5						
J. regia	7RA	6						
J. regia	103RA	6						
J. regia	121RA	6						
J. regia	80RA	6.2						
J. regia	47RA	6.3						
J. regia	84RA	6.6						
J. regia	49RA	6.7						
J. regia	93RA	6.7						
J. regia	46RA	6.8						
J. regia	92RA	7						
J. regia	35RA	7.2						
J. regia	55RA	7.4						
J. regia	45RA	7.5						
J. regia	33RA	7.7						
J. regia	53RA	7.7						
J. regia	16RA	8						
J. regia	50RA	8						
J. regia	104RA	8						
J. regia	109RA	8						
J. regia	108RA	8						
J. regia	48RA	8.1						
J. regia	110RA	8.2						
J. regia	26RA	8.6						
J. regia	72RA	8.6						
J. regia	3RA	8.8						
J. regia	15RA	9						
J. regia	106RA	9						
J. regia	41RA	9.8						
J. regia	42RA	10.2						

ulteriormente suddivise in tre gruppi: genotipi ad elevata suscettibilità (sfm = 42.5-33 %), media suscettibilità (22.5-12 %) e bassa suscettibilità (10.2-1.3 %).

4. 2. 2. Estrazione del DNA genomico (genotipi Azienda Ovale)

Dopo aver polverizzato foglie fresche di ogni campione mediante macinazione meccanica in azoto liquido, è stato estratto il DNA genomico utilizzando il DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). La presenza e la qualità del DNA estratto è stata monitorata effettuando un'elettroforesi su gel d'agarosio 1% in 0.5 x.TBE

La quantità di DNA è stata approssimativamente determinata comparando tutti i campioni, visualizzati su gel d'agarosio 1%, con sei differenti soluzioni di DNA del fago λ (concentrazione nota: 15 ng/ μ L, 31 ng/ μ L, 63 ng/ μ L, 125 ng/ μ L, 250 ng/ μ L, 500 ng/ μ L; Life Technologies), e opportunamente diluita per raggiungere la concentrazione finale di 5 ng / μ L, ottimale per l'analisi microsatellitare. Successivamente, per l'applicazione del NBS-profiling approach, è stata quantificata la concentrazione del DNA genomico mediante l'analisi spettrofotometrica con Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer (<http://www.biocompare.com/>) a 260nm di lunghezza d'onda e portata a 40 ng/ μ L. Questo metodo richiede infatti una precisa valutazione della quantità di DNA genomico da analizzare.

4. 2 .3. SSR analisi (genotipi Azienda Ovale)

I dieci loci microsatelliti (WGA1, WGA4, WGA9, WGA69, WGA89, WGA118, WGA202, WGA276, WGA321, WGA331; Tabella 2 cap. 2) già utilizzati per l'analisi di parentela delle otto famiglie half-sib collezionate nel Parco di Villa Mezzalira (cap. 3), sono stati applicati per la caratterizzazione genetica di 132 campioni collezionati nell'Impianto dell'Azienda Ovale di Roma. Le modalità di amplificazione e di visualizzazione dei marcatori SSRs sono analoghe a quelle già descritte in dettaglio nel paragrafo 2. 2 “Materiale e Metodi”, sottoparagrafo 2. 2. 3.

4. 2 .4. Protocollo NBS-profiling (Plant Research International, Wageningen)

4. 2 .4. 1. Digestione e Ligasi

La digestione del DNA genomico con un enzima a taglio frequente (MseI e RsaI) e la successiva ligasi di uno specifico adattatore all'estremità dei frammenti di restrizione, è stata eseguita in una singola reazione. Duecento nanogrammi di DNA genomico sono stati digeriti in un appropriato

buffer di reazione mediante incubazione a 37°C per 3 h; l'adattatore è stato saldato ad entrambe le estremità dei frammenti di restrizione per aggiunta dell' enzima Ligasi ad elevata concentrazione (vedi Tabella 16). La reazione è stata interrotta per inattivazione degli enzimi, incubando la soluzione a 65 °C per 15 minuti. Ogni miscela di reazione finale viene diluita 1:1 aggiungendo 60µL di acqua deionizzata sterilizzata.

Tabella 16. Miscela di reazione per digestione di 200 ng di DNA genomico e ligasi dell'adattore all'estremità dei frammenti di restrizione ottenuti.

Reagenti	µL per reazione
5 xRL + (AFLP Buffer)	12
ATP (10mM)	6
Enzima di restrizione (10 Units/µL)	1
Ligasi (1 Unit/µl per sticky ends)	1
(5 Unit/µl per blunt ends)	
Adattatore	3
H ₂ O (sterilizzata)	30
DNA genomico (40 ng/ µL)	5
Totale	60

L'adattatore, disegnato da Van der Linden et al., (2004), è caratterizzato da due braccia: un oligo di 32 bp (braccio lungo) con una regione iniziale (dalla posizione 1 a 21) perfettamente identica alla sequenza del primer dell'adattatore ed un oligo di 14 bp (braccio corto) con un gruppo amminico all'estremità 5' ed un gruppo fosfato all'estremità 3' (fig. 32)

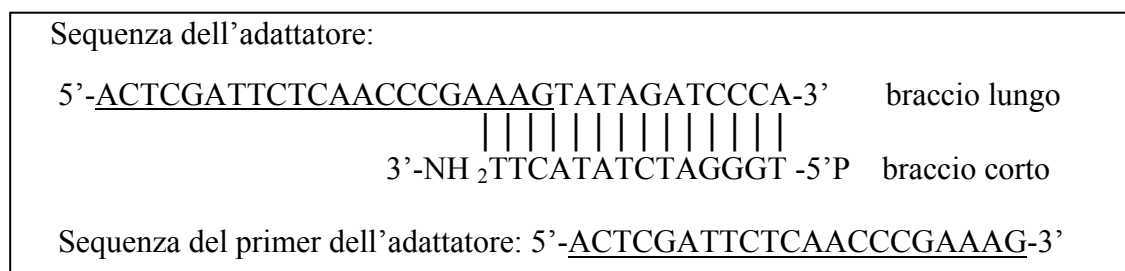


Figura 32. Van der Linden et al., 2004.
Sequenza dell'adattatore e del corrispondente primer utilizzato nell'NBS-profiling approach. Tale adattatore presenta un gruppo amminico all'estremità 5' ed un gruppo fosfato all'estremità 3'.

La presenza di un gruppo amminico (NH₂), che funge da blocco, impedisce l'elongazione del filamento corto all'estremità 3' da parte della Taq polimerasi, mentre il gruppo fosfato facilita la saldatura dell'adattatore a frammenti con blunt ends. In questo modo, all'inizio dell'amplificazione il primer dell'adattatore non può appaiarsi al DNA stampo, poiché non trova il corrispondente sito d'annealing. Solo dopo l'appaiamento del primer degenerato NBS al suo sito specifico (motivo altamente conservato) e la sintesi del filamento complementare, viene generato il sito d'annealing per il primer dell'adattatore. Il gruppo amminico impedisce

l'amplificazione di frammenti adattatore-adattatore e favorisce selettivamente l'amplificazione dei frammenti adattatore-NBS.

4.2.4.2. Pre -amplificazione

Sono stati utilizzati due differenti primer NBS degenerati, NBS1 ed NBS5A6 (NBS5A combinato con NBS6 in rapporto 1:1), per un totale di quattro distinte combinazioni enzima-NBS: MseI-NBS1, MseI-NBS5A6, RsaI-NBS1 ed RsaI-NBS5A6. Il primer NBS1 ha come target una parte del motivo P-loop mentre il primer NBS5A6 ha come sito bersaglio il motivo Kinase2. Il primer NBS1 amplifica il DNA in direzione 5' dei geni bersaglio, perciò verso l'esterno del dominio NBS, mentre il primer NBS5A6 agisce in direzione 3' dei medesimi geni, perciò verso la parte interna della regione NBS (fig. 33).

Le sequenze dei due primer NBS sono le seguenti:

NBS1 5'-GCIARWGTWGTYYTTICCYRAICC-3'

NBS5A 5'-YYTKRTHGTMITKGATGAYGTITGG-3'

NBS6 5'-YYTKRTHGTMITKGATGATATITGG-3'

dove M = [A, C]; R = [A, G]; W = [A, T]; S = [G, C]; Y = [C, T]; K = [G, T]; V = [A, C, G]; H = [A, C, T]; D = [A, G, T]; B = [G, C, T]; I = Inosina.

Ogni amplificazione PCR è stata effettuata usando un volume totale di reazione di 25 µL, contenente 5 µL di soluzione stampo (digestione e ligasi), 2.5 µL di HotStartTaq PCR buffer 10X, 1 µL di dNTP mix 5mM, 2 µL di per ogni primer 10 pMol/µL, 0.08 µL di HotStartTaq polymerase 5U/ µL (Qiagen, Germany) e 12.42 µL di acqua.

Le reazioni d'amplificazione sono state effettuate su una GENEamp PCR System 9700, secondala seguente procedura: 15 minuti a 95°C (per attivare la HotStartTaq polymerase), seguiti da 30 cicli di 30 secondi a 95°C, 1 minuto e 40 secondi a 55°C ed 2 minuti a 72°C; l'amplificazione termina con una estensione finale di 20 minuti a 72°C. Per controllare la validità del processo e determinare approssimativamente la misura dei frammenti ottenuti, è stata analizzata un'aliquota di 15 µL del prodotto amplificato mediante elettroforesi su gel d'agarosio 1% in 0.5 x TBE e colorazione con bromuro d'etidio (1µg/1mL). Al rimanente amplificato sono stati aggiunti 90 µL di acqua deionizzata sterilizzata.

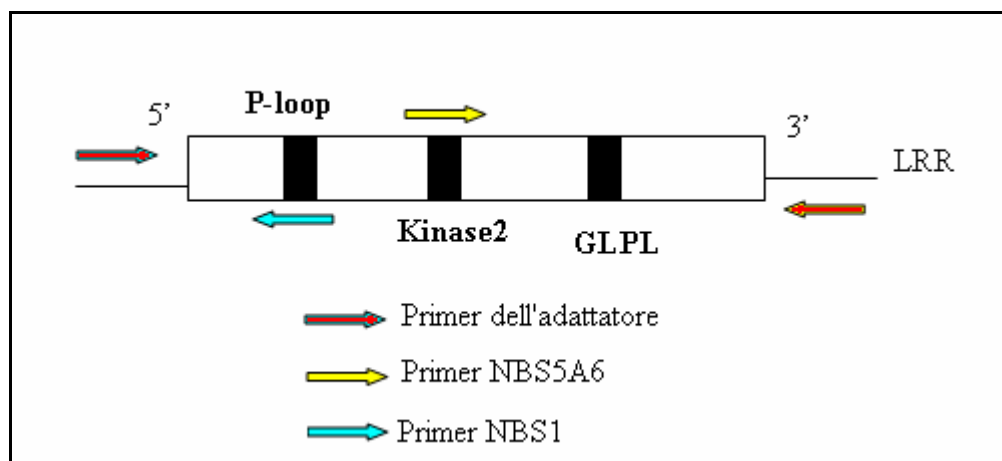


Figura 33. Rappresentazione schematica dei tre motivi altamente conservati (P-loop, Kinase2 e GLPL) presenti nel dominio NBS, tipico dei NBS-LRR- containing R-genes. Sono anche indicati i siti d'anncaling e la direzione d'amplificazione dei due primer NBS utilizzati: NBS1 ed NBS5A6.

4. 2 .4. 2. Amplificazione e marcatura

Il prodotto PCR è stato amplificato nuovamente usando un primer complementare all'adattatore marcato con fluorescenza (fluorescence, IRD-700). Ogni amplificazione PCR è stata effettuata usando un volume totale di reazione di 10 μ L, aggiungendo 5 μ L di soluzione PCR diluita 10X, 1 μ L di PCR buffer 10X, 0.4 μ L di dNTP mix 5mM, 0.3 μ L del primer NBS 10 pMol/ μ L, 0.6 μ L del IRD-labelled adapter primer 1 pMol/ μ L, 0.04 μ L di SuperTaq DNA polymerase 5U/ μ L (Sphaero Q., Olanda) e 2.7 μ L di acqua. Le reazioni d'amplificazione sono state effettuate su una GENEamp PCR System 9700, secondo la seguente procedura: 3 minuti a 95°C, seguiti da 35 cicli di 30 secondi a 95°C, 1 minuto e 40 secondi a 55°C ed 2 minuti a 72°C; l'amplificazione termina con una estensione finale di 20 minuti a 72°C.

Al prodotto PCR, marcato con fluorescenza, è stato aggiunto un uguale volume (10 μ L) di formammide loading buffer (98% di formammide, 10mM EDTA pH 8.0 ed 0.1% di blù di bromofenolo). Un'aliquota del campione (0.7 μ L) è stata analizzata nel LI-COR 4300 DNA Analysis System (Li-COR Biosciences). Il 4300 System è uno strumento di terza generazione basato sulla tecnologia LI-COR altamente sensibile alla fluorescenza ad infrarosso. I frammenti NBS amplificati e marcati sono stati separati su un gel di poliacrilammide 6% e visualizzati mediante scanner della fluorescenza emessa.

4. 2 .5. Analisi dei dati

I dati dei frammenti microsatellitari amplificati sono stati raccolti mediante Gene Scan Analysis

version 3.7 Software (Applied Biosystem), mentre i profili genotipici sono stati assegnati con il software Genotyper versione 3.7 NT (Applied Biosystem) ed organizzati in una matrice SSR. Per ogni combinazione “enzima di restrizione – NBS primer” è stata rilevata nei 132 campioni totali la presenza (1) o l’assenza (0) di ogni singola banda amplificata, ottenendo una matrice binaria tipica dei marcatori dominanti. Bande scarsamente riproducibili, di difficile risoluzione o lettura, sono state escluse dall’analisi genetica o indicate come “dati mancanti”.

L’esatta classificazione dei 132 campioni collezionati nell’Impianto Sperimentale dell’Azienda Ovale è stata determinata per comparazione con i 597 profili genetici diploidi microsatellitari visualizzati nella popolazione di noce del Parco di Villa Mezzalira (cap. 2., 3.). I 132 genotipi sono stati assegnati alle quattro classi precedentemente definite, corrispondenti ai due subgruppi di noce nero (*J. nigra* N, *J. nigra* NC), alla specie *J. regia* ed al cluster degli ibridi diploidi *J. x intermedia*, applicando il test di assegnazione di Paetkau et al. (2004) integrato con il test di esclusione – simulazione di Cournet et al., (1999) (paragrafo 3.2.4). Mediante l’Analisi della Varianza Molecolare (AMOVA-Excoffier et al., 1992) è stato calcolato il coefficiente R_{st} di Slatkin (1995) e determinata la significatività statistica dei valori R_{st} ottenuti mediante 1000 permutazioni.

Le piante di noce nero e noce comune, campionate nell’Azienda Ovale, sono state confrontate e geneticamente caratterizzate, calcolando per ogni coppia di campioni, il “Genotypic Distance coefficient (GD; Peakall & Smouse, 2005) ed il “Band-sharing Similarity coefficient” (S_{xy} ; Lynch, 1990) per i marcatori neutrali codominanti SSR ed i corrispondenti “Binary Genetic Distance coefficient” (BGD; Huff et al., 1993) ed il “Simple Match Similarity coefficient” (SM-Sokal & Sneath 1963; vedi paragrafo 2.2.6.) per i marcatori funzionali dominanti NBS. I tre coefficienti vengono calcolati con le seguenti formule:

$$S_{xy} = N_{xy} / (N_x + N_y)$$

dove N_{xy} = il numero di bande in comune tra l’individuo x e y

N_x = il numero di bande presenti nell’individuo x

N_y = il numero di bande presenti nell’individuo y

GD tra due genotipi per un singolo locus con quattro alleli (*i, j, k, l*) è $d^2(ii, ii) = 0$, $d^2(ij, ij) = 0$, $d^2(ii, ji) = 1$, $d^2(ik, ij) = 1$, $d^2(kl, ji) = 2$, $d^2(ii, kl) = 3$, $d^2(ii, jj) = 4$.

$$BGD = N [1 - (2N_{xy}/2N)]$$

dove N_{xy} = il numero di bande in comune tra l’individuo x e y

N_x = il numero totale di bande

Sulle matrici di distanza genetica, sia Genotypic Distance che Binary Genetic Distance, è stata condotta l'Analisi delle Coordinate Principali che consente di ricostruire le posizioni relative dei campioni in uno spazio a due e/o tre dimensioni. Sulle matrici di similarità genetica, sia Band-sharing Similarity coefficient che Simple Match Similarity coefficient è stata invece condotta l'analisi dei cluster mediante UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means).

I profili genetici microsatellitari sono stati confrontati con quelli ottenuti con i marcatori NBS, mediante il test di Mantel (Mantel, 1967). Tale test non parametrico, consente di stimare la correlazione statistica (r) tra due matrici indipendenti di dissimilarità o di similarità genetica e di verificare se tale correlazione è statisticamente significativa. Permutando una delle due matrici, ad esempio, 1000 volte, e calcolando r per ogni permutazione, si costruisce una distribuzione dei valori di r su cui testare la significatività della correlazione tra le due matrici originarie. Tutte le analisi sono state eseguite mediante i programmi GenAlEx version 6. (Peakall and Smouse, 2005) ed NTSYSpc version 2.1 (Rolfh, 2001).

Per individuare eventuali differenze staticamente significative nelle frequenze di distribuzione dei marcatori NBS amplificati nei diversi gruppi di campioni in *J. regia* è stato applicato il contingency Chi-square Genetic Heterogeneity Test. Il χ^2 è stato calcolato secondo la formula di Workman & Niswander, (1970),

$$\chi^2 = 2N \sum_i \sigma_{pi}^2 / \bar{p}_i$$

Indicando con N il numero totale d'individui, con σ_{pi}^2 la varianza della frequenza allelica e con $\bar{p}_i$ la media ponderata della frequenza dell'allele i -esimo.

Infine nella primavera 2008, per ogni pianta presente nell'Impianto sperimentale è stato valutato lo stadio di sviluppo delle foglie in nove differenti date (02/04, 08/04, 14/04, 21/04, 28/04, 05/05, 12/05, 19/05, 26/05, 02/06, 09/06), attribuendo ad ogni stadio un valore numerico da 0 (gemma chiusa) a 7 (foglia completamente matura) (fig. 34) (comunicazione personale Dr. Gabriel E. Hemery).

4. 3. Risultati

4. 3 .1. DNA fingerprinting con marcatori neutrali SSR

I 132 campioni di noce collezionati nell'impianto sperimentale Azienda Ovale (Roma) sono stati geneticamente caratterizzati mediante amplificazione dei dieci loci microsatellitari, già utilizzati sia nell'analisi di DNA fingerprinting, sia nell'analisi di parentela delle famiglie half-sib



Figura 34. Otto stadi di sviluppo della foglia in *J. regia* ed il corrispondente valore numero empiricamente attribuito ad ogni stadio.

collezionate nel Parco di Villa Mezzalira (cap. 3). Per confermare l'iniziale classificazione su base morfologica del germoplasma in 63 *J. regia* (RA) e 69 *J. nigra* (JN) (tab. 14, 15), sono state comparate le 132 piante totali campionate in Azienda Ovale con i 597 profili genetici diploidi microsatellitari individuati nel Parco di Villa Mezzalira. L'analisi microsatellitare dei 729 campioni totali ha prodotto 146 alleli, con una media di 14.6 alleli per primer, da un minimo di 9 per il locus WGA69 ad un massimo di 24 per il locus WGA276 (tab. 19).

Le 132 piante di noce sono state assegnate alle quattro classi precedentemente definite: i due

Tabella 17. Confronto dei 132 genotipi collezionati nell'Impianto Sperimentale Azienda Ovale con i 597 genotipi diploidi campionati nel Parco di Villa Mezzalira. Assegnazione di 69 piante potenzialmente *J. nigra* (JN) e di 63 piante potenzialmente *J. regia* (RA) alle quattro classi predefinite (*J. nigra* N, *J. nigra* NC, *J. regia* e *J. x intermedia*) mediante test di Paetkau et al., 1995. integrato con il test di esclusione – simulazione di Cournet et al., (1999).

Specie	Gruppo	Test d'assegnazione Paetkau et al., (1995)	N. assegnazioni con $p < 0.01$ Cournet et al., (1999)
<i>J. nigra</i> L.	<i>J. nigra</i> N (N = 328)	0	0
	<i>J. nigra</i> NC (N = 15)	69 (JN)	39 (JN)
<i>J. regia</i> L.	<i>J. regia</i> (N = 49)	63 (RA)	3 (RA)
<i>J. x intermedia</i> Carr.	Ibrido Diploide (N = 205)	0	0

subgruppi di noce nero (*J. nigra* N, *J. nigra* NC), la specie *J. regia* ed gli ibridi diploidi *J. x intermedia* (tab. 17). Come atteso il metodo frequentistico di Paetkau et al., (1995) ha assegnato le 69 piante JN alla specie *J. nigra*, subgruppo *J. nigra* NC, e i restanti 63 genotipi RA alla specie *J. regia*. La distribuzione spaziale a due dimensioni dei 729 profili microsatellitari totali basata sui valori di Log-Likelihood (Log-L), calcolati mediante il test di Paetkau et al. (1995) rispetto alla prima (Pop1-*J. nigra* N) ed alla seconda classe (Pop2-*J. nigra* NC) mostra quattro gruppi principali (fig. 35).

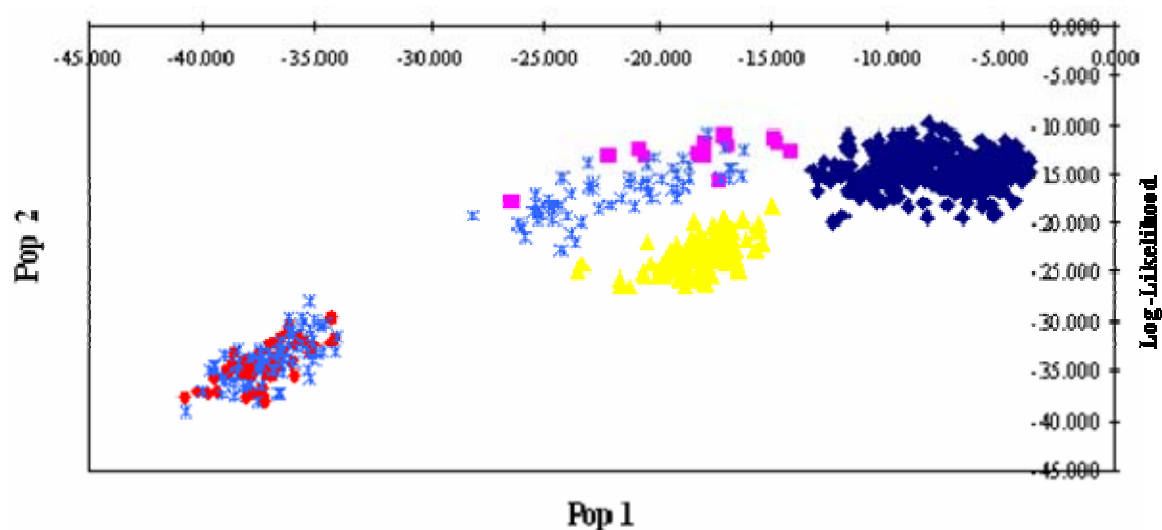


Figura 35. I valori di Log-Likelihood per i 729 profili microsatellitari totali (132 dell’Impianto Sperimentale Azienda Ovale ed 597 del Parco di Villa Mezzalira), calcolati mediante test d’assegnazione di Paetkau et al., (1995) rispetto alla prima (*J. nigra* N) ed alla seconda popolazione (*J. nigra* NC).

◆ *J. nigra* N, ■ *J. nigra* NC, ▲ *J. x intermedia*, ● *J. regia*, * 132 genotipi dell’Impianto Azienda Ovale.

I due assi, Pop1 e Pop2, separano il gruppo, comprendente sia i 49 genotipi *J. regia* del Parco di Villa Mezzalira ed i 63 genotipi *J. regia* RA dell’Azienda Ovale, dalla restante porzione di germoplasma. L’asse Pop1 divide inoltre le piante di noce nero in due sub-gruppi, il sub-gruppo *J. nigra* N e quello che include le 15 piante *J. nigra* NC e le 69 piante *J. nigra* JN dell’Azienda Ovale. Il terzo gruppo localizzato in posizione intermedia tra il noce nero ed il noce comune incorpora tutti gli ibridi diploidi *J. x intermedia*. Il test di esclusione – simulazione di Cournet et al. (1999) ha tuttavia rivelato che 42 assegnazioni, 39 per i genotipi JN e 3 per i genotipi RA, presentano una significatività statistica inferiore a 0.01 (tab. 17).

I valori di differenziazione genetica R_{st} (Slatkin, 1995) calcolati mediante AMOVA analisi (tab. 18) riflettono la diversità molecolare tra gruppi visualizzata nella Figura 35 e spiegano i risultati ottenuti mediante test di esclusione – simulazione di Cournet et al. (1999). La similarità genetica tra le piante *J. regia* RA e *J. regia* del Parco di Villa Mezzalira è così elevata che l’indice di differenziazione R_{st} calcolato non è statisticamente significativo ($R_{st} = 0.006$, $p = 0.180$). Al

contrario la differenziazione genetica tra i due subgruppi *J. nigra* NC ed *J. nigra* JN è bassa ma statisticamente significativa ($R_{st} = 0.055$, $p = 0.01$); in altre parole, pur appartenendo alla stessa specie i due sub-gruppi di noce nero sono parzialmente distinti, con una zona di sovrapposizione.

Tabella 18. Misure della differenziazione genetica (coefficiente R_{st} di Slatkin's, 1995) tra sei distinte popolazioni: quattro popolazioni collezionate nel Parco di Villa Mezzalira (*J. nigra* N, *J. nigra* NC, *J. regia*, Ibridi diploidi) e due nell'Impianto Sperimentale Azienda Ovale (*J. nigra* JN e *J. regia* RA). I valori di R_{st} sono riportati al di sotto della diagonale, il test di significatività basato su 1000 permutazioni, al di sopra della diagonale

Valori Pairwise Population R_{st}						
<i>J.nigra</i> N	<i>J.nigra</i> NC	<i>J. x intermedia</i>	<i>J.regia</i>	<i>J.nigra</i> JN	<i>J.regia</i> RA	
-	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	<i>J.nigra</i> N
0,125	-	0,010	0,010	0,010	0,010	<i>J.nigra</i> NC
0,504	0,263	-	0,010	0,010	0,010	<i>J. x intermedia</i>
0,958	0,933	0,360	-	0,010	0,180	<i>J.regia</i>
0,158	0,055	0,320	0,924	-	0,010	<i>J.nigra</i> JN
0,956	0,926	0,370	0,006	0,922	-	<i>J.regia</i> RA

Infine, l'analisi dettagliata dei 146 alleli amplificati nei 729 genotipi totali ha permesso di aggiornare i dati microsatellitari. Dei 146 alleli totali solo 11 sono presenti sia nel noce comune sia nel noce nero (alleli comuni). I restanti 135 alleli (92.83%) sono alleli specie – specifici, 94 (64.3 %) amplificano solo in *J. nigra* e 41 (28 %) solo in *J. regia* (tab. 19). Come nelle analisi precedenti, in nove loci su dieci il numero degli alleli *J. nigra* – specifici è superiore a quello degli alleli *J. regia* – specifici.

Tabella 19. Lista degli alleli SSR amplificati nei 729 genotipi totali, 132 collezionati nell'Impianto Sperimentale Azienda Ovale ed 597 genotipi analizzati nel Parco di Villa Mezzalira: alleli *J. nigra* – specifici, alleli *J. regia* – specifici ed alleli comuni

SSR Locus	Numero totale di alleli	Numero alleli specie - specifici		Numero alleli comuni
		<i>J. nigra</i>	<i>J. regia</i>	
WGA1	15	9 (60%)	4 (26.6%)	2 (13.4%)
WGA4	12	8 (66%)	2 (17%)	2 (17%)
WGA9	10	7 (70%)	1 (10%)	2 (20%)
WGA69	9	4 (44.5%)	2 (22.1%)	3 (33.4%)
WGA89	15	12 (80%)	2 (13.4 %)	1 (6.6%)
WGA118	18	13 (72.2%)	5 (27.8%)	0
WGA202	13	7 (53.8%)	5 (38.4%)	1 (7.8%)
WGA276	24	12 (50%)	12 (50%)	0
WGA321	17	11 (64.7%)	6 (35.3)	0
WGA331	13	11 (84.6%)	3 (15.4%)	0
Totale	146	94 (64.3%)	41 (28%)	11 (7.7%)

Amplificando un numero così elevato di alleli specie-specifici, i marcatori SSR utilizzati si confermano un potente strumento di discriminazione per le due specie di noce, nero e comune, e

dei relativi ibridi interspecifici *J. x intermedia*.

L'analisi UPGMA sui valori di similarità Band-Sharing Coefficient calcolati per ogni coppia di campioni, ha suddiviso i 132 genotipi in due cluster principali, il primo comprendente le 63 piante *J. regia* RA, il secondo le 69 piante *J. nigra* JN (fig. 36). Ogni cluster inoltre è caratterizzato da un'elevata variabilità molecolare tra individui, come dimostrato dai valori di eterozigosità attesa (H_e) calcolati: 0.674 ± 0.059 per *J. nigra* JN e 0.607 ± 0.031 per *J. regia* RA. Il genotipo *J. nigra* suscettibile all'antracnosi (87JN) non sembra avere un profilo multilocus microsatellitare nettamente distinto dal restante germoplasma di noce nero resistente all'antracnosi. L'Analisi delle Coordinate Principali condotta sulla matrice dei valori di Genotypic Distance coefficient, calcolati per ogni coppia di campioni all'interno di ogni specie, non ha rivelato alcuna evidente struttura genetica nel gruppo *J. regia* RA, sebbene tali piante manifestino una differente suscettibilità all'antracnosi (fig. 37). Sia la Prima che la Seconda Coordinata Principale, che spiegano rispettivamente il 14.14 % ed il 9.72 % della varianza, riuniscono in un unico gruppo tutte le piante di noce comune collezionate nell'impianto sperimentale Azienda Ovine. Al contrario la Prima e la Seconda Coordinata Principale, responsabile del 15.48 % e del 10.53 % della varianza, suddividono le 69 piante di *J. nigra* JN in tre subgruppi, sebbene 68 genotipi siano tutti omogeneamente resistenti all'antracnosi (fig. 38).

4.3.2. Fenologia fogliare in *J. nigra* JN e *J. regia* RA.

Osservazioni fenologiche effettuate nella primavera 2008, dal primo aprile al nove giugno, su tutte le piante di noce nero e noce comune collezionate nel sito sperimentale di Roma, hanno consentito di determinare uno slittamento temporale di circa 35 giorni nella ripresa vegetativa delle due specie (fig. 39).

Le piante di noce comune terminano il processo di emissione e di maturazione delle foglie nella prima settimana di maggio (05/05/2008), mentre le piante di noce nero dopo la prima settimana di giugno (09/06/2008). Nessuna correlazione statistica è stata individuata tra la velocità di emissione delle foglie in primavera ed la differenza in suscettibilità all'antracnosi nella specie *J. regia* ($r = 0.016$; $p = 0.323$).

4.3.3. DNA fingerprinting con marcatori funzionali NBS

Per determinare una eventuale componente genetica alla base delle differenti risposte all'antracnosi manifestate dalle piante di noce presenti nell'impianto sperimentale di Roma, si è reso necessario l'uso di marcatori molecolari funzionali strettamente associati ai geni-R

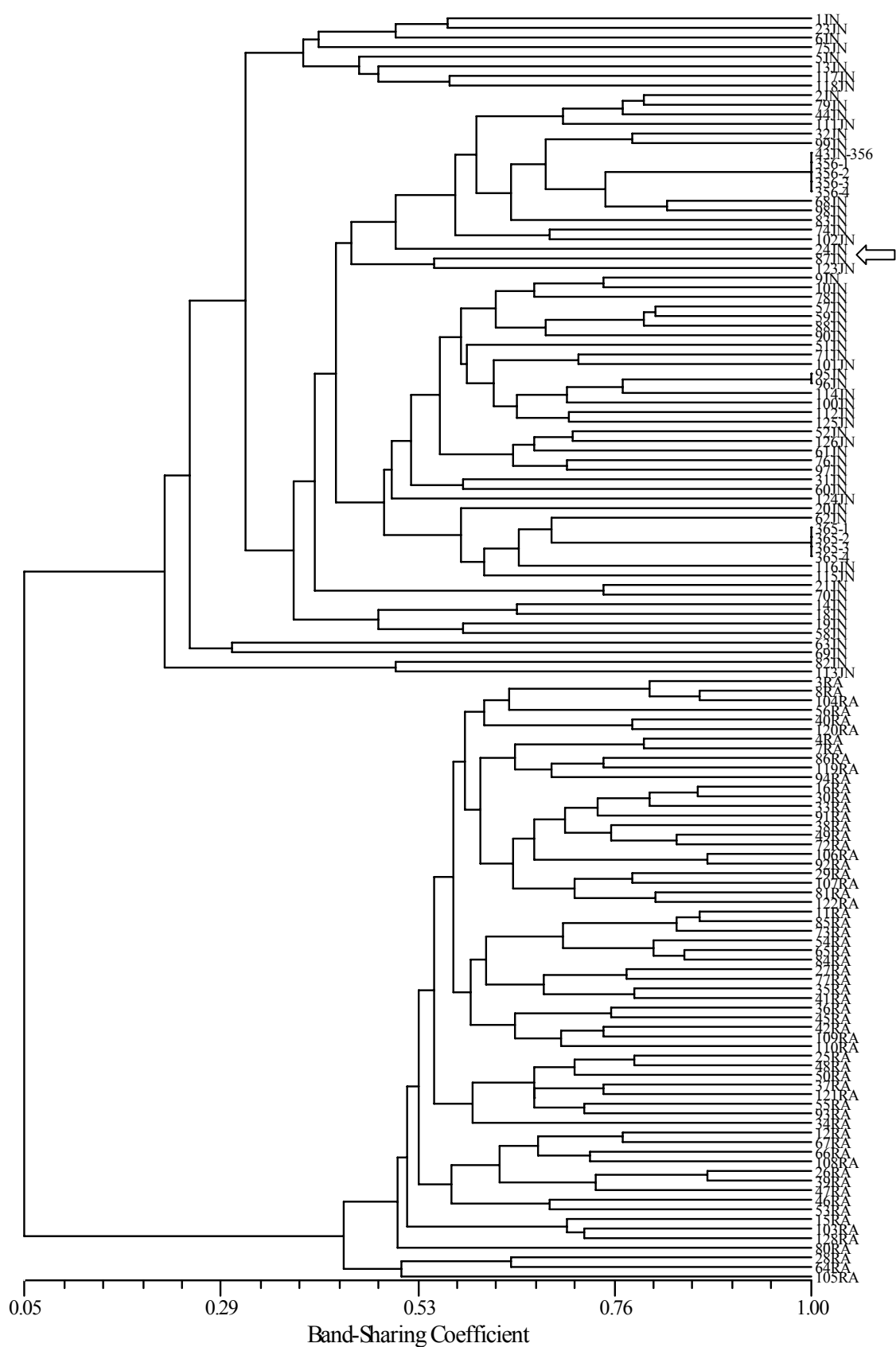


Figura 36. Cluster analisi (UPGMA) di 132 genotipi, 69 *J. nigra* (JN) e 63 *J. regia* (RA), campionati nell’Impianto Sperimentale Azienda Ovile, basata sui valori di Band-Sharing Coefficient calcolati usando 10 loci SSR. La freccia indica il genotipo 87JN, unico noce nero suscettibile all’antracnosi.

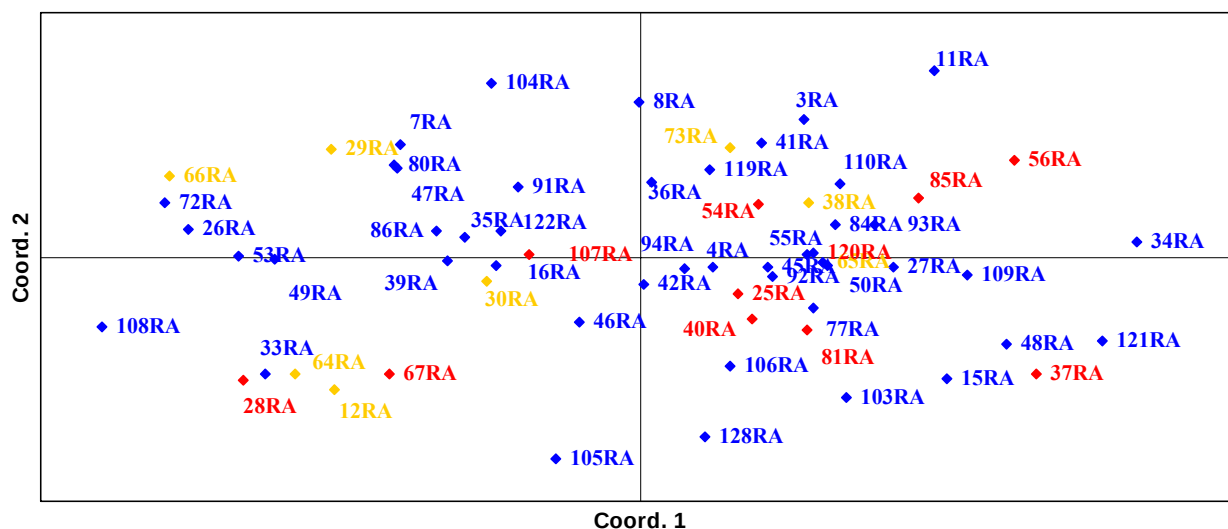


Figura 37. Analisi delle Coordinate Principali di 63 piante di noce comune collezionate nell'impianto sperimentale Azienda Ovale, basata sui valori di dissimilarità genetica calcolata per ogni coppia di campioni (Genotypic Distance coefficient) mediante 10 loci SSR. ♦ bassa suscettibilità, ♦ media suscettibilità ed ♦ elevata suscettibilità all'antracnosi.

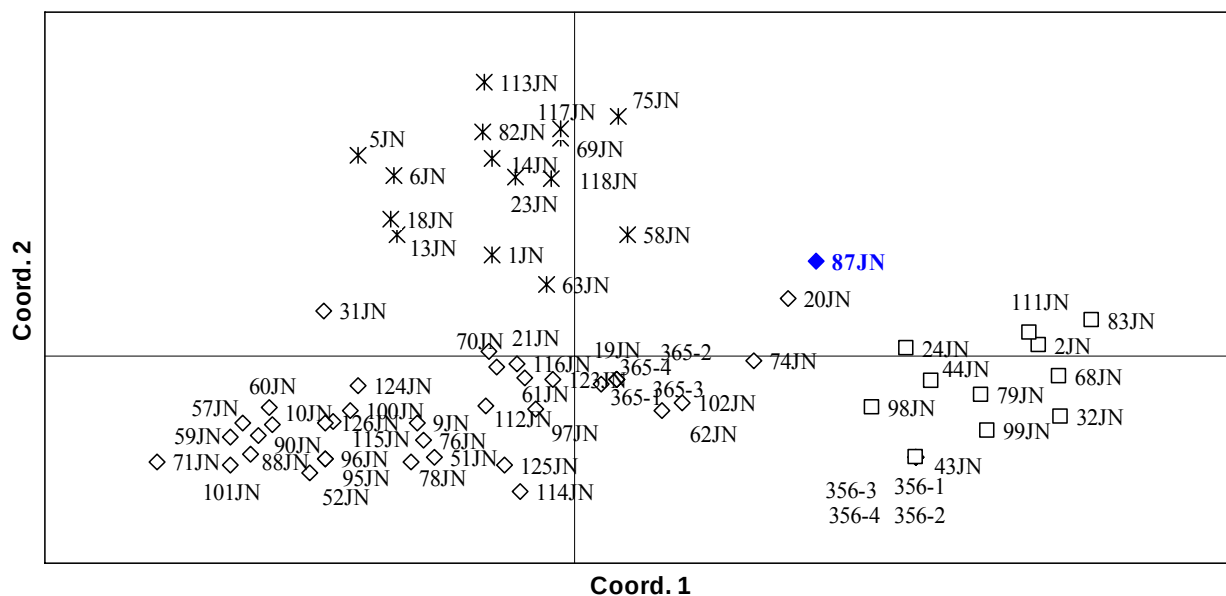


Figura 38. Analisi delle Coordinate Principali di 69 piante *J. nigra* collezionate nell'impianto Azienda Ovale, basata sui valori di distanza genetica calcolata per ogni coppia di campioni (Genotypic Distance coefficient) mediante 10 loci SSR. 68 genotipi *J. nigra* JN resistenti all'antracnosi (* ◇ = tre subgruppi visualizzati), ♦ genotipo 87JN suscettibile all'antracnosi.

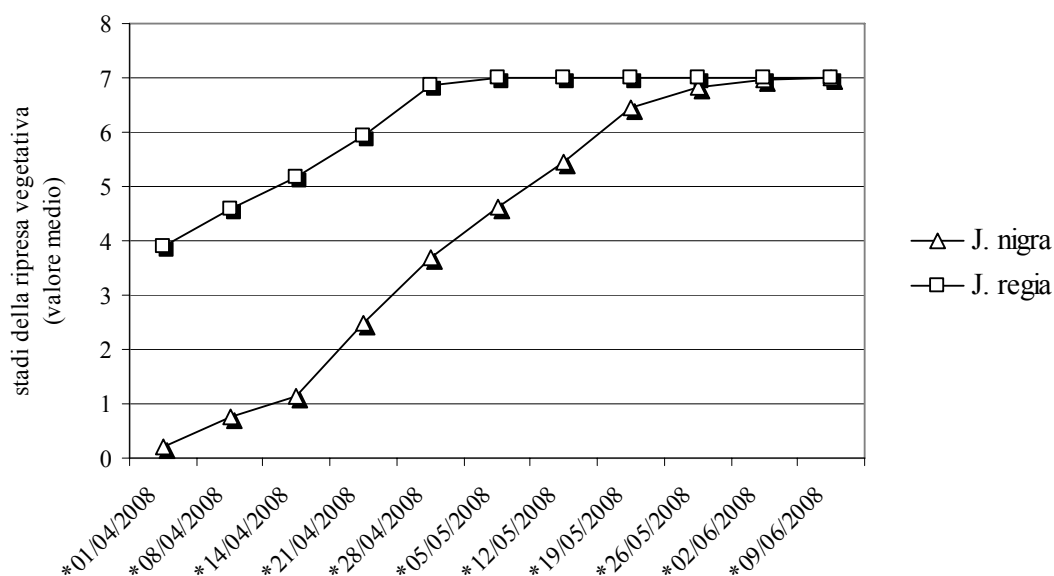


Figura 39. Fenologia fogliare in 63 piante *J. regia* e 69 piante *J. nigra* presenti nell’impianto sperimentale Azienda Ovale misurate in nove differenti momenti nella primavera 2008. Attribuzione ad ogni stadio di un valore numerico che va da 0 (gemma chiusa) a 7 (foglia completamente matura).

(Resistant) o geni RAGs (Resistant-analogs). Per la prima volta è stato messo a punto ed applicato l’NBS-profiling approach sulle due specie *J. nigra* e *J. regia*. Quattro distinte combinazioni enzima / NBS primer hanno funzionato con successo nel noce: MseI-NBS1, MseI-NBS5A6, RsaI-NBS1, ed RsaI-NBS5A6. Sono stati amplificati 320 bande NBS totali sull’intero germoplasma, 119 per la combinazione MseI-NBS1, 86 per MseI-NBS5A6, 82 per RsaI-NBS1 e 33 per RsaI-NBS5A6. Un’analisi dettagliata dei 320 frammenti NBS amplificati e la loro distribuzione nei due gruppi *J. nigra* JN e *J. regia* RA è riportata in Tabella 20.

Tra i 320 marcatori NBS, solo 48 (15 %) frammenti amplificano sia nel noce comune sia nel noce nero e per questo indicati come “marcatori comuni”. Le restanti 272 bande sono state classificate come “bande specie - specifiche” in quanto 144 (45 %) amplificano solo in *J. nigra* JN e 128 (40 %) solo in *J. regia* RA. In totale, nelle due popolazioni, *J. nigra* JN e *J. regia* RA sono state visualizzate rispettivamente 192 ed 176 bande NBS, di cui 103 (53.6 %) e 81 (46 %) polimorfiche. Il numero di frammenti amplificati combinando i due enzimi MseI ed RsaI con il primer NBS1 (N = 201), che ha come target il motivo P-loop, è superiore al valore ottenuto utilizzando il primer NBS5A6, che invece ha come motivo bersaglio la regione Kinase2 (N = 119) del dominio NBS.

Analogamente ai risultati ottenuti con marcatori neutrali SSRs, anche l’analisi UPGMA dei cluster condotta sul corrispondente Simple Match Similarity coefficient (SM) basato sui 320 marcatori funzionali NBS, suddivide il germoplasma in due gruppi ben distinti comprendenti rispettivamente i 69 genotipi *J. nigra* JN ed i 63 genotipi *J. regia* RA (fig. 40).

Tabella 20. Lista dei 320 marcatori funzionali NBS amplificati nei 132 campioni, 69 *J. nigra* (JN) e 63 *J. regia* (RA), collezionati nell’Impianto Sperimentale Azienda Ovale.

Combinazione Enzima-NBS primer	N. bande amplificate		N. bande specie-specifiche		N. bande comuni	
	<i>J. nigra</i>	<i>J. regia</i>	<i>J. nigra</i>	<i>J. regia</i>	<i>J. nigra</i>	<i>J. regia</i>
<i>MseI</i> -NBS1 (119)						
Bande monomorfe	40	40	21	22	19	18
Bande polimorfe	34	31	27	23	7	8
Totale	74	71	48	45	26	26
<i>MseI</i> -NBS5A6 (86)						
Bande monomorfe	18	17	14	13	4	4
Bande polimorfe	28	27	28	27	0	0
Totale	46	44	42	40	4	4
<i>RsaI</i> -NBS1 (82)						
Bande monomorfe	20	31	8	18	12	13
Bande polimorfe	30	16	27	14	3	2
Totale	50	47	35	32	15	15
<i>RsaI</i> -NBS5A6 (33)						
Bande monomorfe	11	7	8	5	3	2
Bande polimorfe	11	7	11	6	0	1
Totale	22	14	19	11	3	3
Totale combinazioni (320)	192	176	144 (45%)	128 (40%)	48 (15%)	

La correlazione tra le due matrici di similarità genetica, basate sui marcatori SSR ed NBS, è del 89.6% ($p = 0.001$). Tuttavia, la similarità genetica tra individui appartenenti alla stessa specie (entro-cluster) calcolata mediante i marcatori NBS è ridotta, come dimostrato dai valori di eterozigosità attesa (H_e): 0.144 ± 0.014 per *J. regia* RA ed 0.161 ± 0.013 per *J. nigra* JN. L’Analisi delle Coordinate Principali condotta sulla matrice dei valori di Binary Genetic Distance coefficient per ogni coppia di campioni all’interno di ogni specie, divide i 63 genotipi *J. regia* RA in due sub-gruppi (fig. 41). Entrambi i sub-gruppi, separati dalla Prima Coordinata (24.69 % della varianza) includono genotipi con bassa, media ed elevata suscettibilità all’antracnosi. Non è stata riscontrata alcuna correlazione statisticamente significativa tra le due matrici di dissimilarità genetica NBS ed SSRs nella specie *J. regia* ($r = 12.9\%$ $p = 0.006$). Inoltre, la Prima Coordinata Principale, responsabile del 31.91 % della varianza, suddivide le 69 piante di *J. nigra* JN (68 resistenti ed 1 suscettibile all’antracnosi) in tre gruppi parzialmente sovrapposti, analogamente a quanto ottenuto con i marcatori SSRs (fig. 42). La correlazione, infatti, tra le due corrispondenti matrici di dissimilarità genetica in *J. nigra* JN è del 41.8 % ($p = 0.001$).

Infine è stata effettuata una dettagliata analisi delle frequenze dei marcatori NBS nelle cinque differenti categorie: genotipi *J. nigra*-resistenti, genotipo *J. nigra*- bassa suscettibilità, genotipi



Figura 40. Cluster analisi (UPGMA) di 132 genotipi, 69 *J. nigra* (JN) e 63 *J. regia* (RA), campionati nell’Impianto Sperimentale Azienda Ovile, basata sui valori di SM Coefficient calcolati usando 320 marcatori funzionali NBS. La freccia indica il genotipo 87JN, unico noce nero suscettibile all’antracnosi.

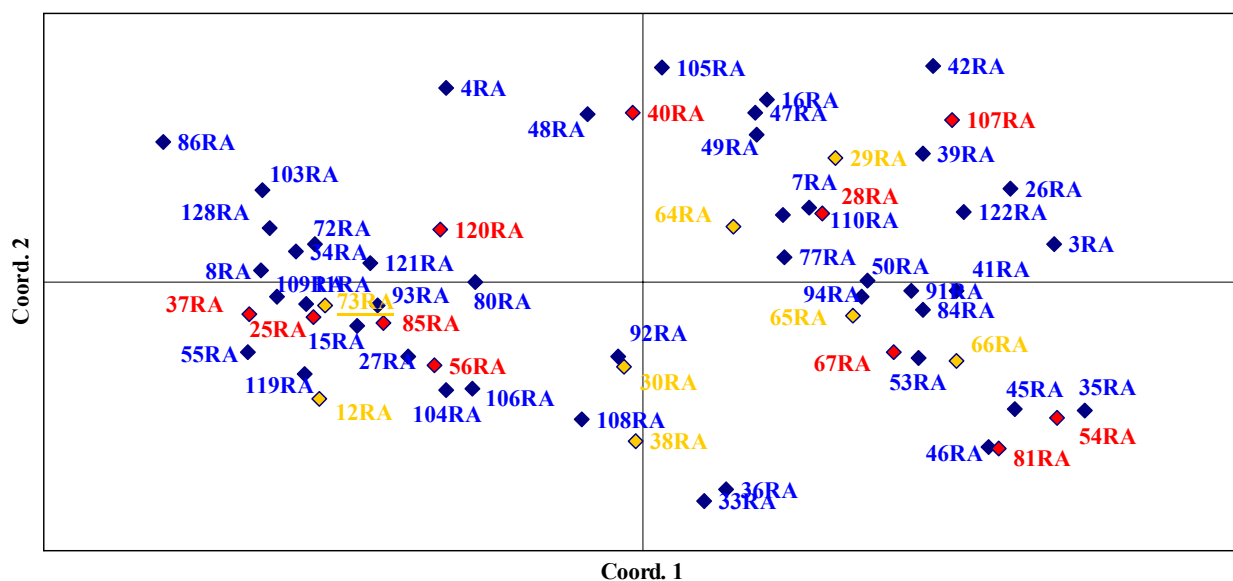


Figura 41. Analisi delle Coordinate Principali di 63 piante di *J. regia* collezionate nell'impianto sperimentale Azienda Ovile, basata sui valori di dissimilarità genetica calcolata per ogni coppia di campioni (Binary Genetic Distance coefficient) mediante 176 marcatori funzionali NBS. ♦ bassa suscettibilità, ♦ media suscettibilità ed ♦ elevata suscettibilità all'antracnosi.

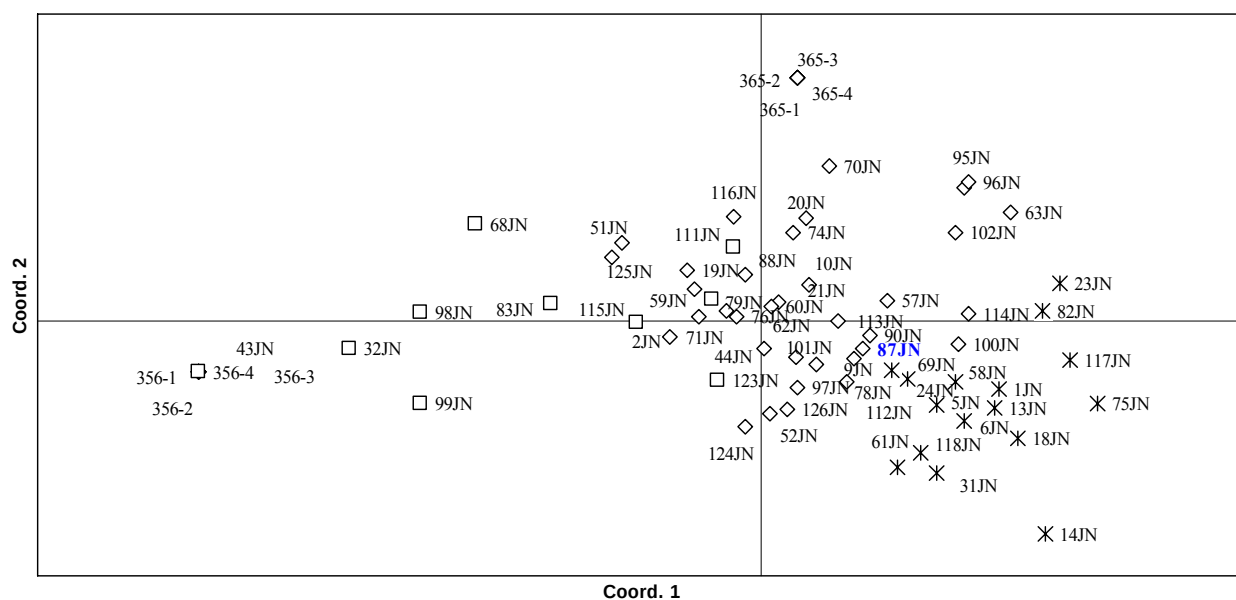


Figura 42. Analisi delle Coordinate Principali di 63 piante di *J. nigra* collezionate nell'impianto sperimentale Azienda Ovile, basata sui valori di dissimilarità genetica calcolata per ogni coppia di campioni (Binary Genetic Distance coefficient) mediante 192 marcatori funzionali NBS. 68 genotipi *J. nigra* JN resistenti all'antracnosi (□ ♦ = tre subgruppi visualizzati con marcatori SSRs), ♦ genotipo 87JN suscettibile all'antracnosi.

J.regia-bassa suscettibilità, genotipi *J. regia*-media suscettibilità, genotipi *J. regia*-alta suscettibilità. Nella combinazione RsaI-NBS1 è stata individuata una banda di 110bp presente in tutti i genotipi *J. regia* suscettibili, nell'unico campione *J. nigra* suscettibile ed assente in tutti i genotipi *J. nigra* resistenti (fig. 43). I risultati relativi al Contingency Chi-square Genetic

Banda NBS	X^2	$P <$	Frequenza della banda	
			Suscettibilità alta (N = 8)	Suscettibilità bassa (N =43)
MseI-NBS5A6-328bp	7.7	0.01	0.62	0.17
MseI-NBS1-274bp	5.4	0.05	0.125	0
RsaI-NBS1-563bp	5.9	0.05	0.62	0.93
RsaI-NBS1-611bp	5.9	0.05	0.38	0.07
			Suscettibilità alta (N = 8)	Suscettibilità media (N =11)
MseI-NBS1-537bp	4.9	0.05	0	0.45
MseI-NBS1-328bp	3.9	0.05	0.62	0.18
			Suscettibilità media (N =11)	Suscettibilità bassa (N =43)
MseI-NBS1-362bp	4.8	0.05	0.09	45.2
MseI-NBS1-214	4	0.05	0.73	0.39

Tabella 21. Analisi mediante Contingency Chi-square Genetic Heterogeneity Test (Workman & Niswander, 1970) dei frammenti NBS amplificati nei tre distinti gruppi di piante *J. regia*: genotipi con elevata, media e bassa suscettibilità all'antracnosi.

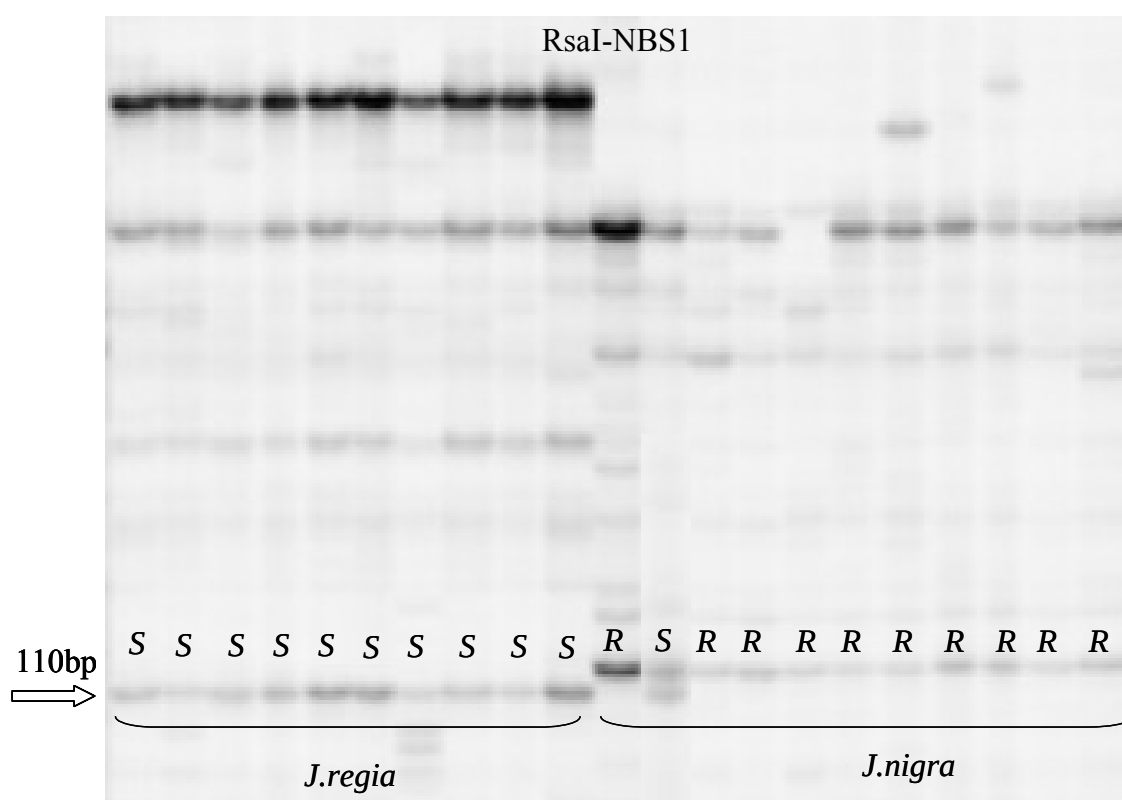


Figura 43. Marcatore RsaI-NBS1 di 110bp presente in tutti i genotipi *J. regia* suscettibili, nell'unico campione *J. nigra* suscettibile (87JN) ed assente in tutti i genotipi *J. nigra* resistenti

Heterogeneity Test (Workman & Niswander, 1970) nella specie *J. regia* sono riportati in Tabella 21. Sebbene otto frammenti NBS differiscano statisticamente per frequenza, nessuno di loro sembra essere chiaramente e fortemente ($p < 0.001$) correlato ai tre livelli di suscettibilità all'antracnosi riscontrati nel noce comune.

4. 4. Discussione

Questo studio ha avuto come principale obiettivo quello di fornire delle indicazioni assolutamente preliminari su eventuali meccanismi molecolari alla base della resistenza/suscettibilità all'antracnosi nel noce. Le indagini condotte da Anselmi e collaboratori (Rapporto Finale 2007 RI.SELV.ITALIA; Annunziati et al., 2007) su foglie attaccate dal fungo *Gnomonia leptostyla* (Fr.) nell'impianto sperimentale Azienda Ovale, basate sul calcolo della percentuale media di superficie fogliare necrosata, hanno consentito di suddividere il germoplasma in tre principali categorie: le piante *J. regia* RA suscettibili (63), *J. nigra* JN suscettibile (1) ed *J. nigra* JN resistenti (68). Inoltre tale approccio ha permesso di classificare ulteriormente le piante *J. regia* in tre gruppi: genotipi ad elevata suscettibilità, media suscettibilità e bassa suscettibilità all'antracnosi. L'applicazione dell' NBS-profiling approach su detto materiale può aiutare a comprendere se la resistenza/suscettibilità all'antracnosi sia un carattere legato alle condizioni ambientali di crescita oppure vi siano anche delle basi genetiche.

Molti fattori, oltre alla componente genetica, possono influire sull'espressione di una resistenza ad un patogeno quali funghi e batteri. Spesso l'espressione di una parziale resistenza in campo è il risultato di un'azione concertata di più componenti; ampie fluttuazioni sono state osservate al variare della temperatura, dell'umidità relativa, della concentrazione dell'inoculo, della quantità di acqua sulla superficie fogliare, dell'età e disponibilità (numero, posizione) delle foglie (McGranahan & Smalley, 1984; Wilson et al., 1990; Butler et al., 1994; Calon nec et al., 2008). Ad esempio nel genere *Fraxinus*, la velocità di emissione delle foglie sarebbe positivamente correlata alla suscettibilità all'antracnosi causata dal fungo *Gnomoniella fraxini* (Jacobs & Danielson, 2002). Malgrado una statistica dei dati scarsamente significativa, le specie di frassino native del Nord America, come il *F. quadrangulata* ed il *F. tormentosa*, con una ripresa vegetativa tardiva, risulterebbero più resistenti all'antracnosi se comparate con specie come *F. chinensis* e *F. mandshurica*, dalla precoce ripresa vegetativa. Al contrario la resistenza alla scabbia fogliare causata dal fungo *Cladosporium caryigenum* nella specie pecan (*Carya illinoensis*, famiglia delle *Juglandaceae*) sarebbe principalmente influenzata sia dalla variabilità genetica dei campioni, sia dall'età delle foglie (Turechek & Stevenson, 1998). Il periodo

d'incubazione, il numero d'infezioni, le dimensioni delle lesioni fogliari e il grado di sporulazione sarebbero indipendenti dalla temperatura e dal livello di umidità delle foglie al momento dell'inoculo. La frequenza delle infezioni e la produzione di conidi diminuisce proporzionalmente all'aumentare dell'età delle foglie; questo effetto è più evidente nella varietà resistente (Sumner). La risposta della varietà Sumner all'attacco del fungo *C. caryigenum* si manifesta in eventi post-penetrazione, impedendo l'espansione delle lesioni e la produzione di conidi (interazione host-patogeno).

Analogamente in *J. nigra* Cline & Neerly (1983) hanno individuato una possibile correlazione tra la quantità di juglone sintetizzato durante il processo di maturazione delle foglie ed la parziale resistenza al fungo *Gnomonia leptostyla* (antracnosi) tipica di tutte le foglie ontogeneticamente immature. In questo caso il numero di lesioni e la quantità di acervuli prodotti, infatti, aumenta con dell'età delle foglie, mentre la concentrazione dello juglone e del suo precursore HJG diminuisce progressivamente. Cline & Neerly (1983) ipotizzano in piante suscettibili una specifica interazione host-patogeno, che possa determinare l'interruzione del processo di conversione dell'HJG in juglone. La riduzione dei livelli di juglone consentirebbe uno sviluppo più rapido del fungo, assicurandone la sua diffusione nel tessuto fogliare. Tuttavia, analogamente agli studi effettuati sul frassino, Mielke et al., (2004) suggerisce di prendere in considerazione anche la differente velocità di emissione delle foglie come possibile fattore di apparente resistenza.

In questo studio osservazioni fenologiche, effettuate nella primavera 2008, su tutte le piante di noce nero e noce comune collezionate nel sito hanno consentito di individuare uno slittamento temporale di circa un mese nella ripresa vegetativa delle due specie, noce nero e noce comune. Come già determinato in altri impianti europei (Fady et al. 2003), se comparata con *J. regia*, la specie *J. nigra* ha una ripresa vegetativa assai tardiva. La maturazione tardiva delle foglie potrebbe perciò consentire alle piante di noce nero di sfuggire parzialmente all'infezione primaria del fungo, emettendo germogli in tarda primavera e presentando foglie ontogeneticamente immature, perciò con la quantità massima di juglone, proprio durante il rilascio e la diffusione massima delle ascospore. Questo risultato tuttavia non spiega la presenza del genotipo *J. nigra* (87 JN), suscettibile all'antracnosi, la cui ripresa vegetativa non è anticipata, ma perfettamente in linea con il restante germoplasma di noce nero dell'Impianto. Inoltre nessuna correlazione statistica è stata individuata tra la velocità di emissione delle foglie in primavera ed la differente suscettibilità all'antracnosi nella specie *J. regia*.

L'applicazione del NBS-profiling approach per la prima volta nelle due specie in esame, *J. nigra* e *J. regia*, ha permesso di ricercare eventuali marcatori molecolari funzionali strettamente

associati ai R-genes o RAGs (Resistant-analogs), correlati alla resistenza/suscettibilità all'antracnosi. Quattro distinte combinazioni enzima / NBS primer (MseI-NBS1, MseI-NBS5A6, RsaI-NBS1, ed RsaI-NBS5A6) già utilizzate in altre specie di interesse agronomico come lattuga, pomodoro, orzo, (Van der Linden et al., 2004) patata (Malosetti et al., 2007) grano (Mantovani et al., 2006) e mela (Calange et al., 2005) hanno funzionato con successo sia nel noce nero che nel noce comune. Questi risultati confermano la trasferibilità dell'NBS-profiling approach anche tra specie filogeneticamente distanti tra loro, senza che questo richieda alcuna modifica delle sequenze dei primer NBS utilizzati né l'ottimizzazione del protocollo.

Nonostante la loro natura funzionale, i marcatori NBS hanno fornito dei profili genetici tendenzialmente simili a quelli ottenuti con marcatori neutrali SSRs. Con entrambi i marcatori è stato possibile distinguere chiaramente i genotipi *J. nigra* JN dai genotipi *J. regia* RA e suddividere i genotipi *J. nigra* JN nei tre subgruppi parzialmente sovrapposti. Analogamente, né l'analisi con marcatori neutrali, né l'analisi con marcatori funzionali NBS, ha rivelato alcuna evidente struttura genetica all'interno del gruppo *J. regia*.

La correlazione tra i dati SSRs ed NBS calcolata nel genere *Juglans* è comparabile a quella calcolata per i medesimi marcatori in 58 differenti accessioni di grano duro. Mantovani et al., (2006) ipotizza che la similarità dei risultati ottenuti con marcatori così differenti sia legata all'uso di DNA genomico come materiale di partenza. L'analisi del DNA genomico non consente di distinguere tra geni funzionali, geni silenti e pseudogeni. Studi condotti nel riso e nel grano infatti hanno dimostrato che un numero relativamente ampio di geni R-NBS-LRR sono silenti, cioè non rappresentati all'interno di librerie ESTs (McFadden et al., 2006; Monosi et al., 2004). Tuttavia la variabilità genetica (eterozigosità attesa - H_E) riscontrata all'interno delle singole specie mediante analisi NBS-profiling è decisamente inferiore ai valori ottenuti con i marcatori neutrali SSRs. I vincoli funzionali dovrebbero infatti ridurre i tassi di mutazione nelle regioni trascritte del genoma e perciò portare ad una contrazione della ricchezza allelica ed i tassi di polimorfismo nei loci in esame (Woodhead et al., 2005).

Tuttavia ciò che risulta particolarmente interessante è che il DNA fingerprinting dei campioni ha consentito di individuare un marcatore funzionale NBS potenzialmente associato alla resistenza all'antracnosi nel genere *Juglans* spp. Infatti nella combinazione, primer NBS1 ed enzima di restrizione RsaI, tutte le 64 piante di noce suscettibili (63 *J. regia* RA; 1 *J. nigra* JN) mostra una banda comune di 110bp di lunghezza che al contrario è assente nelle 68 piante *J. nigra* resistenti. Sebbene sia necessario sequenziare tale frammento per confermare la sua appartenenza alla famiglia dei NBS-LRR - containing R-genes e ricercare una eventuale omologia di sequenza con geni noti, questo risultato è ovviamente particolarmente promettente.

L'associazione tra geni NBS-LRR e QTLs che conferiscono resistenza all'antracnosi è già stata riscontrata in altre specie vegetali. Nella specie *Lupinus angustifolius* L., l'applicazione del metodo MFLP con tre differenti primer NBS (P-loop; kinase2; GLPL), ha portato all'identificazione, nella combinazione GLPL - MseI, di un marcatore candidato di 184bp associato alla resistenza al fungo *Colletotrichum lupini* (You et al., 2005). Tuttavia l'analisi di sequenza del marcatore NBS candidato, seguita dall'analisi BLAST nel GeneBank database, non ha rivelato alcuna omologia nucleotidica con sequenze codificanti ESTs e sequenze BAC note. In *Medicago trunculata*, invece, il mapping genetico e fisico ad elevata risoluzione ha permesso di localizzare il locus *RCT1* per la resistenza all'antracnosi, causata dal fungo *Colletotrichum trifolii*, in un intervallo di ~ 200Kb all'estremità del gruppo di linkage 4; *RCT1* è parte di un locus assai complesso comprendente tre geni completi TIR-NBS-LRR. Come suggerito da Yang et al., (2007) *RCT1* potrebbe codificare anch'esso per una proteina NBS-LRR. In questo caso la resistenza è associata alla sintesi di pterocarpani e fitoalexine (isoflavonoidi) ed alla Risposta di Ipersensibilità (HR) nel sito d'inoculo.

Allo stesso modo in *Phaseolus vulgaris*, i QTLs associati alla resistenza all'antracnosi causata dal fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, sono stati mappati in un cluster di geni CC-NBS-LRR localizzato all'estremità del gruppo di linkage B4 (Ferrier-Cana et al., 2003) mentre il gene che conferisce resistenza all'antracnosi del fusto nel mais (fungo *Colletotrichum graminicola*) codifica anch'esso per una proteina CC-NBS-LRR (Abad et al., 2006). Infine l'analisi dell'espressione genica (suppression subtractive hybridization approach-SSH) nella fragola ha messo in evidenza il coinvolgimento di numerosi geni nella resistenza al fungo *Colletotrichum acutatum* tra cui alcune disease-resistant-related protein (chitinasi, β -1,3-gluconasi, γ -tionina), perossidasi, e tre receptor like-R genes (Casado-Diaz et al., 2006). Sono state osservate differenze nell'espressione genica nel tempo e nell'intensità tra varietà resistenti/suscettibili e nei tessuti all'interno delle varietà di fragola.

Tuttavia per comprendere quanto e se, la componente genetica domini sulla componente ambientale nel conferire la resistenza all'antracnosi ai 68 genotipi *J. nigra* JN dell'impianto sperimentale Azienda Ovale, è necessario approfondire le analisi effettuando l'inoculo del fungo in condizioni controllate su tutti i genotipi di noce analizzati (test *in vitro* o comunque in camera di crescita). La possibilità di distinguere in maniera non ambigua tra fenotipi resistenti e suscettibili, evitando il più possibile la componente ambientale, è un fattore cruciale per eventuali analisi di mapping del marcatore NBS candidato. Sia l'assenza di differenziazione genetica valutata con marcatori neutrali SSRs e marcatori funzionali NBS, sia la mancata correlazione con la velocità di emissione e maturazione delle foglie, indica una suddivisione

spuria dei genotipi *J. regia* RA nei tre gruppi: bassa, media ed alta suscettibilità all'antracnosi. I risultati suggeriscono che la suddivisione dei genotipi suscettibili di noce comune non sia reale ma sia dovuta all'azione di fattori pedo-climatici che agiscono localmente sulle singole piante e alterano quantitativamente la risposta all'attacco del fungo. Il test in condizioni controllate consentirebbe di confermare l'ipotesi sopra esposta.

References

- Aarts MGM, Te Lintel Hekkert B, Holub EB, Beynon JL, Stiekema WJ, Pereira A (1998) Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11:251–258
- Abad L., Wolters P., Stucker D., Davis P., (2006). Advances in anthracnose stalk rot resistance. The fifth national IPM symposium, “delivering on a promise” (<http://www.ipmcenters.org/ipmsymposiumv/posters/037.pdf>).
- Action E42 VALBRO – Growing Valuable Broadleaved tree species, (2008). “Noble hardwood species for rural development: improvement of agro-environment and timber production”. Orvieto, San Ludovico Monastery, 8 Maggio.
- Adam-Blondon A.F., Roux C., Claux D., Butterlin G., Merdinoglu D., (2004) Mapping 245 SSR markers on the *Vitis vinifera* genome: a tool for grape genetics. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1017-1027.
- Aitkin C.G.G., (1995). *Statistics and the evaluation of evidence for forensic scientists*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Amaral J.S., Seabra R.M., Andrade P.B, Valentão P., Pereira J.A and Ferreres F., (2004), Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia*) leaves. *Food Chemistry* 88: 373-379.
- Anger, B., & Bernatchez L., (1997): Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. *Molecular Biology and Evolution* 14: 230-238
- Annunziati M., Gras M., Pollegioni P., Mughini G. , Malvolti M.E. , Anselmi N., (2007). Resistance behavior to anthracnose disease by *Gnomonia leptostyla* (fr.) ces. in *Juglans* spp. 51° Congresso Annuale, Società Italiana di Genetica Agraria (SIGA), Riva del Garda (TN) 23-26 Settembre.
- Anselmi N., (2001). Principali malattie degli impianti industriali di latifoglie di pregio. *Annali dell'Accademia Italiana di Scienze Forestali*, vol.XLIX-L: 79-99.
- Anselmi N., Ravaioli F., Fabi A., Nasini M., Mazzaglia A., Rocco E., Vettraino A., Varvaro L., Vannini A., Gras M., Mughini G., Belisario A, Ducci F., (2007). Sette anni di indagini sulla lotta genetica contro le principali malattie nelle piantagioni di *Juglans* da legno. In Ducci F. “Monografia sui risultati Progetto RISELVITALIA relativi allo *Juglans* da legno”, CRA-Istituto Sperimentale di Selvicoltura di Arezzo (in press)
- Anselmi, N., Mazzaglia, A., Scaramuccia, L. and De Pace, C., (2006). Resistance attitude of *Juglans regia* L. provenances towards anthracnose (*Gnomonia leptostyla* (fr.) ces et de not.). *Acta Horticulturae* 705:409-416.
- Aronne G., De Micco V., Romano R., Scala M., (2003). Effetto della temperatura e dell'umidità relativa sulla germinazione del polline di noce (*Juglans regia* L.). 98° Congresso Società Botanica Italiana, Catania 24-26 settembre.

- Asuka Y., Tomaru N., Munehara Y., Tani N., Tsumura Y., Yamamoto S., (2005). Half-sib family structure of *Fagus crenata* saplings in an old-growth beech-dwarf bamboo forest. *Molecular Ecology* 14: 2565-2575.
- Balloux, F., & Lugon-Moulin N. (2002): The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155–165.
- Bai W.N., Zeng Y.F., Zhang D.Y., (2007). Mating patterns and pollen dispersal in a heterodichogamous tree, *Juglans mandshurica* (Juglandaceae). *New Phytologist* 176: 699-707.
- Barreneche T., Casasoli M., Russell K., Akkak A., Meddour H., Plomion C., Villani F., Kremer A., (2004). Comparative mapping between *Quercus* and *Castanea* using simple-sequence repeats (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics* 108: 558-566.
- Bassi R., Pellegrino S., (1991). La coltivazione del noce. Ed. Informatore Agrario, Verona Italia pag.83
- Becquey J., (1990). Quelques précisions sur les noyers hybrides. *Forêt entreprise* 69: 15-19.
- Being H.J. (1975). Man as factor in the Vegetation History of the Balkan Peninsula. In “Problems of Balkan Flora and Vegetation”. Proc First International Symposium on Balkan Flora and Vegetation”. Varna, Bulgaria. Publishing House of the Bulgarian Academy of Sciences p: 72-78
- Beineke, W.F. and C.J. Masters. 1973. Black walnut progeny and clonal tests at Purdue University Proc. 12th South. Forest Tree Improvement Conf., Baton Rouge, LA. p. 233-242.
- Beineke W.F., and Masters C.J., (1977). Controlling pollination in black walnut. Proc. 10th Central States Forest Tree Impr. Conf., Purdue Univ., W. Lafayette, Indiana, p. 66-72.
- Belisario A., (1992). Problematiche fitopatologiche del noce comune. *L’informatore Agrario*, (28): 51-53
- Belisario, A., Are, M., Palangio, C.S. and Zoina, A., (1997a). Walnut blight resistance in the genus *Juglans*. *Acta Horticulturae*. (ISHS) 442:357-360
- Belisario, A. and Hubbes, M., (1997b). Genetic variability in *Gnomonia leptostyla*. *Acta Horticulturae*. (ISHS) 442:385-388.
- Belisario, A., Forti, E., Cichello, A.M., Zoina, A., Barbieri, E. and Valier, A., (2001). Epidemiological surveys of *Gnomonia leptostyla* in *Juglans regia* hedgerow trained orchard. *Acta Horticulturae* (ISHS) 544:405-408
- Bekkaoui F., Mann B., Schroeder B., (2003). Application of for the identification and management of hybrid poplar accessions. *Agroforestry Systems* 59: 53-59.
- Bennet R.C., Wallsgrove R.M., (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytology* 127: 617–633.

- Berry F.H., (1977). Control of walnut anthracnose with fungicides in a black walnut plantation. *Plant Dis. Rep.* 61: 378-379
- Berry, F.H., (1960). Etiology and control of walnut anthracnose. Bull. A-113. University of Maryland Agriculture Experiment Station. 22 p.
- Binder R. G., Benson M. E., Flath R. A., (1989) Eight 1,4-Naphthoquinones from *Juglans*. *Phytochemistry* 28: 2799– 2801.
- Black, W., and D. Neely, (1978). Effects of temperature, free moisture, and relative humidity on the occurrence of walnut anthracnose. *Phytopathology* 68, 1054-1056.
- Burke, R. D., and Williams R. D., (1973). Establishment and early culture of plantations. In Black walnut as a crop. Proceedings, Black Walnut Symposium, August 14-15, 1973, Carbondale, IL. p. 36-41. USDA Forest Service, General Technical Report NC-4. North Central Forest Experiment Station, St. Paul, MN.
- Burtin P., Jay-Allemand C., Charpentier JP., Janin G., (1998). Natural wood colouring process in *Juglans* sp. (*J. nigra*, *J. regia* and hybrid *J. nigra* 23 × *J. regia*) depends on native phenolic compounds accumulated in the transition zone between sapwood and heartwood, *Trees* 12: 258-264.
- Butler D.R., Wadia K.D.R., Jadhav D.R., (1994). Effects of leaf wetness and temperature on late leaf-spot infection of groundnut. *Plant Pathology* 43: 112-120.
- Calenge F., Van der Linden C.G., Van de Weg E., Schouten H.J., Van Arkel G., Denancé C., Durel C-E., (2005). Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 660-668
- Calonnec A., Cartolaro P., Naulin J-M., Bialek D., Langlais M., (2008). A host-pathogen simulation model: powdery mildew of grapevine. *Plant Pathology* 57: 493-508.
- Carella D., Spigno P., de Vita N., (2003). Un caso di cancro corticale superficiale del noce in Campania. *Informatore Fitopatologico* 7-8: 32-33.
- Casado-Diaz A., Encinas-Villarejo S., De los Antos B., Schilirò E., Yubero-Serrano E.M., Amil-Ruiz F., Pocovi M.I., Pliego-Alfaro F., Dorado G., Rey M., Romero F., Munoz-Blanco J., Caballero J.L., (2006). Analysis of strawberry genes differentially expressed in response to *Colletotrichum* infection. *Physiologia Plantarum* 128: 633-650.
- Catlin P.B., Ramos D.E., Sibbett G.S., Olson W.H., Olsson E.A., (1987). Pistillate flower abscission of the Persian walnut. *HortScience* 22: 201-205.
- Chaix G., Gerber S., Razafimaharo V., Vigneron P., Verhaegen D., Hamon S., (2003). Gene flow estimation with microsatellites in a Malagasy seed orchard of *Eucalyptus grandis*. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 705-712.
- Chenervard D., Jay-Allemand C., Gendraud M., Frossard JS., (1995). The effect of sucrose on the development of hybrid walnut microcutting (*Juglans nigra* x *Juglans regia*).

- Consequences on their survival during acclimatization. *Annales des sciences forestières*. 52: 147-156.
- Claudot A.C., Ernst D., Sandermann H., Drouet A., (1997). Chalcone synthase activity and polyphenolic compounds of shoot tissues from adult and rejuvenated walnut trees. *Planta* 203: 275-282.
- Cline S. and Neely D., 1984. Relationship between juvenile-leaf resistance to anthracnose and the presence of juglone and hydrojuglone glucoside in black walnut, *Phytopathology* 74: 185–188
- Collins NC, Webb CA, Seah S, Ellis JG, Hulbert SH, Pryor A (1998) The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:968–978
- Cournet J.M., Piry S., Luikart G., Estoup A., Soligna M., (1999), New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153: 1989-2000.
- Cornu D., (1988). Somatic embryogenesis in tissue cultures of walnut (*Juglans nigra*, *J. major* and hybrids *J. nigra* x *J. regia*). In *Somatic Cell Genetics of Woody Plants*, Eds Ahuja M.R., p.45-49.
- Dangl, GS., Woeste K., Ardhya M.K., Koehmstedt A., Simon C., (2005). Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130 :348-354.
- Darwin C., (1877). *The different forms of flowers on plants of the same species*. London, UK: John Murray.
- Daviewala A.P., Ramakrishna W., Ranjekar P.K., Gupta V.S., (2000) Sequence variations at a complex microsatellite locus in rice and its conservation in cereals. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 1291-1298.
- Davis E.F., (1928). The toxic principle of *Juglans nigra* as identified with synthesis juglone and its toxic effects on tomato and alfalfa plants. *American Journal of Botany* 15: 620
- Deng Z, Huang S, Ling P, Chen C, Yu C, Weber CA, Moore GA, Gmitter FG Jr (2000) Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequences in citrus. *Theoretical Applied Genetics* 101:814–822
- Di Gaspero G., Peterlunger E., Testolin R., Edwards K.J., Cipriani G., (2000). Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis*. *Theoretical and Applied Genetics* 101 (1/2): 301-308.
- Di Vaio C., Minotta G., (2005). Indagine sulla coltivazione del noce da legno in campania. *Forest@* 2: 185-197.
- Dixon R.A., Paiva N.L., (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085–1097.

- Dow B.D., and Asley M.V., (1998). High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *Journal of Heredity* 89: 62-70.
- Ducci F., (1997). La protezione delle risorse genetiche di *Juglans regia* L. *Annali Istituto Sperimentale per la Selvicoltura di Arezzo*, vol. 25-26, p.1994-1995.
- Durner, J., Shah, J., Klessig, D.F., (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Science* 2: 266–274.
- Duroux L., Delmotte F.M., Lancelin JM., Keraviss G., Jay-Allemand C., (1998). Insight into naphthoquinone metabolism: β -glucosidase-catalysed hydrolysis of hydrojuglone β -D-glucopyranoside. *Biochemical Journal*. 333: 275-283.
- Ercolani GL., (1962). Le macchie nere del noce in Emilia. *Progresso Agricolo*, 8:895-902.
- Evett IW., Weir BS., (1998). Interpreting DNA evidence: Statistical genetics for forensic scientists. Sinauer, Sunderland.
- Excoffier, L., Smouse P.E., Quattro J.M., (1992): Analysis of molecular variance from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Fady B., Ducci F., Aleta N., Becquey J., Diaz Vazquez R., Fernandez Lopez F., Jay-Allemand, C. (2003). Walnut demonstrates strong genetic variability for adaptive and wood quality traits in a network of juvenile field tests across Europe. *New Forests* 25: 211-225
- Feldman EB (2002). The scientific evidence for a beneficial health relationship between walnuts and coronary heart disease. *Journal of Nutrition* 132: 1062S-1101S
- Ferrier-Cana E., Geffroy V., Macabre C., Creusot F., Imbert-Bollere P., Seignac M., Langin T., (2003). Characterization of expressed NBS-LRR resistance gene candidates from common bean. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 251-261.
- Fjellstrom, R.G., & Parfitt D.E., (1994). Walnut (*Juglans* spp) genetic diversity determined by restriction-fragment length polymorphisms. *Genome* 37: 690-700
- Fenaroli L., Gambi G., (1976). Alberi. *Dendroflora italica*. Museo trentino di Scienze Naturali. Trento
- Flor H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275–276.
- Fornari, B., Cannata F., Spada M., Malvolti M.E. (1999). Allozyme analysis of genetic diversity and differentiation in European and Asiatic walnut (*Juglans regia* L.) populations. *Forest Genetics* 6: 115-127.
- Foroni, I., Rao R., Woeste K., Gallitelli M., (2005): Characterization of *Juglans regia* L. with SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the ‘Sorrento’ landrace. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 80: 49-53.

- Forte V., 1993. Il Noce. Edagricole – Edizioni Agricole della Calderini s.r.l., Bologna, ISBN 88 206 3660
- Fowells HA, 1965. Silvics of forest trees of the United States. USDA Agriculture Handbook 71. Washington, DC: USDA
- Fry S., (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. Annual Review of Plant Physiology 37: 165-186
- Funk D., (1970). Genetics of black walnut. USDA For. Serv. Res. Paper (WO), Washington, DC, ii p. 1-13.
- Funk D., David T. (1979). Black walnuts for nuts and timber. In Nut tree culture in North America. p. 51-73. Northern Nut Growers Association, Hamden, CT.
- Funk D.T., Neerly D., Bey C.F., (1981). Genetic resistance to anthracnose of black walnut. Silvae Genetica 30: 4-5.
- Garavel L., (1972). Une possibilité nouvelle: la production de bois de noyer. Office National des Forêts, Bull. Tech., 3 :5-8
- Gardal L., Brault T., Germain E., (1993). Copper resistance of *Xanthomonas campestris* pv *Juglandis* in French walnut orchards and its association with conjugative plasmids, Acta Hortic. 311: 117-124.
- Germain E., Hanquier I., Monet R., (1993). Identification of eight *Juglans* spp. and their interspecific hybrids by isoenzymatic electrophoresis. Acta Horticulturae 311: 73-81.
- Giannini R., Mercurio R., (1997). Il noce comune per la produzione legnosa. Ed. Avenue media, Bologna
- Godoy, J. A., & Jordano P., (2001). Seed dispersal by animals: exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites. Molecular Ecology 10: 2275-2283.
- Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Varma H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange BM, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Miguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun WL, Chen L, Cooper B, Park S, Wood TC, Mao L, Quail P, Wing R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G, Scholl T, Miller RM, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalma T, Oliphant A, Briggs S (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science 296:92–100
- Gomez A., Pintos B., Aguiriano E., Manzanera J.A., Bueno M.A., (2001). SSR markers for *Quercus suber* tree identification and embryo analysis. Journal of Heredity 92:292-295.
- Gottwald T.R., (1982). Taxonomy of the pecan scab fungus *Cladosporium caryigenum*. Mycologia 74: 382-390.

- Graham T.L., Kim J.E., Graham M.Y., (1990). Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3: 157-166.
- Gower J.C., (1966). Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53: 325-338.
- Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J., (2000). The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *The Plant Journal* 23: 441–450
- Grattapaglia D., Ribeiro V.J., Rezende G.D.S.P., (2004). Retrospective selection of elite parent trees using paternity testing with microsatellite markers: an alternative short term breeding tactic for *Eucalyptus*. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 192-199.
- Grey, G.W., and. Naughton G.G., (1971). Ecological observations on the abundance of black walnut in Kansas. *Journal of Forestry* 69: 741-743.
- Griggs W.H., (1953). Pollination requirements of fruits and nuts. *Calif. Agr. Exp. Sta. Exp. Serv. Circ.* 424, pp.35.
- Guelldner R.C., Yates I.E., Reilly C.C., Wood B.W., Smith M.T., (1994). Levels of a hydrojuglone glucoside in developing pecan leaves in relation to scab susceptibility. *Journal of American Society of Horticultural Science*. 119: 498-504.
- Gutierrez M.V., Vaz Patto M.C., Huguet T., Cubero J.I., Moreno M.T., Torres A.M., (2005) Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 1210-1217.
- Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G., (1997). Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:575–607
- Hardie D.G., (1999). Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 50: 97-111.
- He T., and Smouse P.E., (2002). Paternity analysis in *Ophiopogon xylorrhizus* Wang et Tai (Liliaceae s.l.); selfing assures reproductive success. *Journal of Evolution and Biology* 15: 487-494.
- Heath M.C. (2000), Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion Plant Biology* 3: 315–319.
- Hedin P.A., Langhans V.E., Graves C.H. Jr., (1979). Identification of juglone in pecan as a possible factor of resistance to *Fusicladium effusum*. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 27: 92-94.
- Hedrick, P.W. (2000): *Genetics of populations*. Second edition. Edited by Jones and Bartlett (eds), Boston.

- Hejl A.M., Koster K.L., (2004). Juglone disrupts root plasma membrane H⁺-ATPase activity and impairs water uptake, root respiration, and growth in soybean (*Glycine max*) and corn (*Zea mays*). *Journal of Chemical Ecology*, 30: 453-471.
- Huff D.R., Peakall R., Smouse P.E., (1993). RAPD variation within and among populations of outcrossing buffalograss (*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm). *Theoretical and Applied Genetics* 86:927-934.
- Hulbert S.H., Webb C.A., Smith S.M., Sun Q., (2001) Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annual Review of Phytopathology* 39:285–312
- Huntley B. e Birks H.J.B. (1983). An atlas of past and present pollen maps for Europe: 0-13000 years ago. Cambridge University Press. N.Y.: p. 238-242
- Hussendorfer, E. (1999): Identification of natural hybrids *Juglans x intermedia* Carr. – using isoenzyme gene markers. *Silvae Genetica* 48: 50-52.
- Impiumi G., Ramina A., (1967). Ricerche sulla biologia fiorale e di fruttificazione del noce (*J. regia*). *Rivista dell'Ortifrutticoltura italiana* p: 538-543.
- Isagi Y., Kanazashi T., Suzuki W., Tanaka H., Abe T., (2004). Highly variable pollination patterns in *Magnolia obovata* revealed by microsatellite paternity analysis. *International Journal of Plant Science* 165: 1047-1053.
- Jabs T., Dietrich R.A., Dangel J.L., (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide . *Science* 273: 1853-1856.
- Jacobs K., Danielson D., (2002). Variation in field susceptibility of native and exotic ash species to anthracnose. *Journal of Arboriculture* 28: 35-40.
- Jay-Allemand C., Dufour J., Germain E., (1990). Detection précoce et rapide des noyers hybrides interspécifiques (*Juglans nigra x Juglans regia*) au moyen de critères morphologiques. *P.H.M.- Revue Horticole*, 311: 39-41.
- Jaroszewski L., Rychlewski L., Reed J.C., Godzik A., (2000). ATP-activated oligomerization as a mechanism for apoptosis regulation: fold and mechanism prediction for CED-4. *Proteins* 39:197–203
- Jia Y., McAdams S.A., Bryan G.T., Hershey H.P., Valent B. (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO Journal* 19:4004–4014.
- Keen N.T. (1990) Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions *Annual Review of Genetics* 24:447–463
- Kessler K. J Jr., (1990). Destruction of *Gnomonia leptostyla* perithecia on *Juglans nigra* leaves by microarthropods associated with *Elaeagnus umbellata*, *Mycologia*, 82: 387-390.
- Kimura, M., Otha T., (1978): Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in finite populations. *Proceedings National Academy of Sciences USA* 75: 2868-2872.

- Kimura M. and Crow J.F., (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- Kobe B., Deisenhofer J., (1994). The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochemical Science* 19:415–421.
- Lamb C., Dixon RC., (1997). The oxidative burst in plant disease resistance, *Annual Review of Plant Molecular Biology* 48:251-275.
- Lambert C., Lee B.C., O'Malley D., Wheeler N., (2001). Polymix breeding with parental analysis of progeny: an alternative to full-sib breeding and testing. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 930-943.
- Leister D, Kurh J., Laurie D.A., Yano M., Sasaki T., Devos K., Graner A., Schulze-Lefert P., (1998). Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereals genomes. *Proceeding of the National Academy of Science, USA*, 95: 370-375.
- Liu J.J., & Ekramoddoullah A.K.M., (2003). Isolation, genetic variation and expression of TIR-NBS-LRR resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex. D. Don.) *Molecular Genetics and Genome*, 270:432-441.
- Loreti, S., Galleli, A., Piccirillo, P. and Belisario, A., (2006). Bacterial bark canker on English walnut. *Acta Hort. (ISHS)* 705:433-435
- Lynch M., (1990). The similarity index and DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution*, 7:478-484.
- Luza J.G., Polito V. S., (1985). In vitro germination and storage of English walnut pollen. *Scientia Horticulturae*, 27: 303-316.
- Luza J.G., Polito V.S., Weinbaum S.A., (1987). Staminate bloom date and temperature responses of pollen germination and tube growth in two walnut (*Juglans*) species. *American Journal of Botany* 74: 1898-1903
- Luza J.G., Polito V. S., (1988a). Microsporogenesis and anther differentiation in *Juglans regia* L.: a developmental basis for heterodichogamy in walnut. *Botanical Gazette*, Vol. 149: 30-36
- Luza J.G., Polito V. S. (1988b). Cryopreservation of English walnut (*Juglans regia* L.) pollen. *Euphytica* 37: 141-148.
- Mantel N.A., (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209-220.
- Mago R, Nair S, Mohan M (1999). Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. *Theoretical Applied Genetics* 99:50–57
- Maher, E.A., Bate, N.J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R.A., and Lamb, C.J. (1994). Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91, 7802-7806.

- Mahoney N., Molyneux R.J., Campbell B.C., (2000). Regulation of aflatoxin production by naphthoquinones of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 48: 4418-4421.
- Malosetti M., Van der Linden C. G., Vosman B., and van Eeuwijk F. A., 2007. A Mixed-Model approach to association mapping using pedigree information with an illustration of resistance to phytophthora infestans in potato. *Genetics* 175: 879-889
- Malvolti M.E., Spada M., Beritognolo I., Cannata F., (1997). Differentiation of walnut hybrids (*Juglans nigra* L. x *Juglans regia* L.) through RAPD markers. *Acta Horticulturae* 442: 43-52.
- Mantovani P, Van der Linden G., Maccaferri M., Sanguineti M.C, Tuberosa R. (2007) NBS profiling analysis of durum wheat genetic diversity. *Genome* 49: 1473-1480.
- Mapelli S., Lombardi L., Brambilla I., Iulini A., Bertani A., (1997). Walnut plant selection to hypoxic soil resistance. *Acta Horticulturae* 442: 129-136.
- Marinoni D., Akkak A., Bounous G., Edwards K.J., Botta R. (2003): Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill.). *Molecular Breeding* 11: 127-136.
- Marques C., Brondani R., Grattapaglia D., Sederoff R., (2002). Conservation and synteny of SSR loci and QTLs for vegetative propagation in four *Eucalyptus* species. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 474-478.
- Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B., Pemberton J.M., (1998). Statical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.
- Martin G.B., Brommonschenkel S.H., Chunwongse J., Grary A.,Ganal M.W., Spivey R., Wu T., Earle E.D., Tanksley S.D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262:1432–1436
- Martin G.B., Bogdanove A.J., Sessa, G., (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* 54, 23– 61.
- Mazzaglia, A., Fabi, A., Belisario, A., Librandi, I., Cefalo, G., Varvaro, L. and Anselmi, N., (2006). Bark cankers on english walnut: an emerging disease. *Acta Hort. (ishs)* 705:437-442
- McFadden H.G., Lehmensiek A., Lagudah E.S., (2006). Resistance gene analogues of wheat: molecular genetic analysis of ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 987-1002.
- McGranahan G.H., & Smalley E.B., (1984). Influence of moisture, temperature, leaf maturity and host genotype on infection of elms by *Stegophora ulmea*. *Phytopathology* 74:1296-1300
- Meagher TR., (1986). Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. I. Identification of most-likely male parents. *American Naturalist*, 128: 199-215.

- Mellersh D.G., Foulds I.V, Higgins V.J., Heath M.C., (2002). H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *The Plant Journal* 29: 257–268.
- Merendi A., (1956). Preziosa latifolia americana. Il noce nero *Juglans nigra* L. L'Italia agricola., p. 883-885.
- Meyers B.C, Dickerman A.W, Michelmore R.W, Sivaramakrishnan S, Sobral B.W, Young N.D., (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *The Plant Journal* 20:317-32.
- Mielke ME and Ostry ME., (2004). Disease of Intensively managed eastern black walnut .Michler, C.H.; Pijut, P.M.; Van Sambeek, J.W.; Coggeshall, M.V.; Seifert, J.; Woeste, K.; Overton, R.; Ponder, F., Jr., eds. 2004. Black walnut in a new century, proceedings of the 6th Walnut Council research symposium; July 2528; Lafayette, IN. Gen. Tech. Rep. NC-243. St. Paul, MN: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Research Station. 188 p.
- Monosi B., Wissner R.J., Pennill L., Hulbert S.H., (2004). Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1434-1447.
- Morel J.B., Dang J.L., (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Differentiation* 4: 671-683
- Morgante M., & Olivieri, A.M., (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3: 175-182
- Morgante M., Hanafey M., Powell W., (2002): Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* 30: 194-200.
- Muller W.U., Leistner E., (1976). 1,4-naphthoquinone, an intermediate in juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) biosynthesis. *Phytochemistry* 15: 407-410.
- Muller W.U., Leistner E., (1978). Metabolic relation between naphthalene derivatives in *Juglans*. *Phytochemistry* 17: 1735-1738.
- Nandakumar, N., Singh A.K., Sharma R.K., Mohapatra T., Prabhu K.V., Zaman F.U., (2004): Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. *Euphytica* 136: 257-264.
- Neely D., (1986). Total leaf nitrogen correlated with walnut anthracnose resistance. *Journal of Arboriculture*. 12: 312-315.
- Nurnberger T., Brunner F., Kemmerling B., Piater L., (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunology Review* 198: 249–266
- Ostrofsky W.D., Shortle W.C., Blanchard R.O., (1984). Dark phenolics of American beech (*Fagus grandifolia*) in relation to the beech bark disease. *European journal of Forest Pathology* 14:52-59.

- Paetkau D., Strobeck C., (1994). Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology* 3:489-495.
- Paetkau D., Calvert W., Stirling W., Strobeck C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4: 347-354.
- Peakall, R., Gilmore S., Keys W., Morgante M., Rafalski A., (1998). Cross-species amplification of Soybean (*Glycine max*) simple-sequence-repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1275-1287.
- Paetkau D., Waits LP., Clarkson PL, Craighead L., Vyse E., Ward R., Strobeck C., (1998). Variation in genetic diversity across the range of North America brown bears. *Conservation Biology* 12: 418-429.
- Paetkau D., Slade R., Burden M., Estoup A., (2004). Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* 13: 55-65.
- Parker J.E., Coleman M.J., Szabo V., Frost L.N., Schmidt R., van der Biezen E.A., Moores T., Dean C., Daniels M.J., Jones I.D.G., (1997). The Arabidopsis downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the Toll and interleukin-1 receptors with N and L6. *Plant Cell* 9: 879-894
- Peakall R., & Smouse P.E., (2005). GenAlEx V6: *Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research*. The Australian National University, Canberra, Australia. <http://www.anu.edu.au/BoZo/genAlEx/>.
- Pieterse C.M, Van Loon L.C., (1999). Salicylic acid-independent plant defense pathways, *Trends Plant Science* 4 52-58.
- Pollegioni P., Bartoli S., Malvolti M.E., Mapelli S., Bertani A., Cannata F. (2006). Identificazione di ecotipi italiani di *J. regia* mediante marcatori molecolari, morfologici e biochimici. *Forest@* 3: 598-609.
- Pollegioni, P., Major, A., Bartoli, S., Ducci, F., Proietti, R. and Malvolti, M.E. (2006): Application of microsatellite and dominant molecular markers for the discrimination of species and interspecific hybrids in genus *Juglans*. *Acta Horticulturae*, 705:191-197.
- Pollegioni P., Woeste K., Major A., Scarascia Mugnozza G., Malvolti M.E., 2008. Characterization of *Juglans nigra* (L.), *Juglans regia* (L.) and *Juglans x intermedia* (Carr.) by SSR markers: a case study in Italy. *Silvae Genetica* (in pub.).
- Radix P., Seigle-Murandi F., Charlot G., (1994). Walnut blight : development of fruit infection in two orchards. *Crop Protection* 13: 629-631
- Radix P., Bastien C.; Jay-Allemand C.; Charlot G.; Seigle-Murandi F., (1998). The influence of soil nature on polyphenols in walnut tissues. A possible explanation of differences in the expression of walnut blight. *Agronomie* 18: 627-637.

- Rannala B., and Mountain J.L., (1997). Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceeding of the National Academy of Science, USA*, 94: 9197-9201.
- Reid W., Coggershall M.V., Hunt K.L., (2004). Cultivar evaluation and development for black walnut orchards. Michler, C.H.; Pijut, P.M.; Van Sambeek, J.W.; Coggeshall, M.V.; Seifert, J.; Woeste, K.; Overton, R.; Ponder, F., Jr., eds. 2004. Black walnut in a new century, proceedings of the 6th Walnut Council research symposium; July 2528; Lafayette, IN. Gen. Tech. Rep. NC-243. St. Paul, MN: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Research Station. p.188
- Ritter, E.; Aragonés, A., Markussen, T., Achere, V., Espinel, S., Fladung, M., Wrobel, S., Faivre-Rampant, P., Jeandroz, S.; Favre, J. M. (2002). Towards construction of an ultra high density linkage map for *Pinus pinaster*. *Annals of Forest Science* 59: 637-643
- Robichaud, R.L., Glaubitz J.C., Rhodes Jr O.E., Woeste K., (2006): A robust set of black walnut microsatellites for parentage and clonal identification. *New Forest* 32:179-196.
- Rohlf, F.J. (2001): NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.1. Exeter Software. East Setauket, New York.
- Saccaridi A., Sonetti V., Melegatti A., Cristanini M., (1998). Occurrence of *Erwinia nigrihuens* on English walnut (*Juglans regia*) in the Veneto region (northern Italy). *Journal of Plant Pathology* 80:63-65.
- Saraste M., Sibbald P.R., Wittinghofer A., (1990). The P-loop – a common motif in ATP- and GTP- binding proteins. *Trends Biochemical Science* 15: 430-434
- Sartorius R., (1990). Anatomische histologische und cytologische Untersuchungen zur Samenentwicklung bei der walnuß (*Juglans regia* L.) unter besonderer Berücksichtigung der apomoxis. Dissertation, Fakultät III, Agrarwissenschaften I der Universität Hohenheim, 123 p.
- Scheeder T., (1990). *Juglans intermedia* in einem Bestand am Kaiserstuhl. *AFZ Der Wald* 45: 1236-1237.
- Shen K.A., Meyers B.C., Islam-Faridi M.N, Chin D.B., Stelly D.M., Michelmore R.W. (1998) Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11:815–823
- Slatkin M., (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- Snow A.A., (1990). Effects of pollen –load size and number of donors on sporophyte fitness. *The American Naturalist*, 136: 742-758.
- Syed N.H., Sorensen A.P., Antonise R., Van der Wiel C., Van der Linden G., Van't Westende W., (2006). A detailed link-age map of lettuce based on SSAP, AFLP and NBS markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 112:517-527.

- Solar A., Colaric M., Usenik V., Stampar F., (2006a). Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Science* 170: 453-461.
- Solar A., Colaric M., Hudina M., Stampar F., (2006b). Phenolic content of walnut fruit as effected by cultivar and developmental stage. *Acta Horticulturae* (ISHS) 705:231-240.
- Sokal, R.R., and P.H.A. Sneath (1963): Principles of numerical taxonomy. Freeman, San Francisco.
- Stanford, A.M., R. Harden, and C.R. Parks (2000): Phylogeny and biogeography of *Juglans* (*Juglandaceae*) based on matK and ITS sequence data. *American Journal of Botany* 87: 872-882.
- Strack D., (1997). Phenolic metabolism. In: Dey PM, Harborne JB, eds. *Plant Biochemistry*. London, UK: Academic Press, p. 387–416.
- Streiff, R., Ducouso A., Lexer C., Steinkellner H., Gloessl J., Kremer A., (1999): Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. *Molecular Ecology* 8: 831-841.
- Tabbener H. E., Cottrell J. E., (2003). The use of PCR based DNA markers to study the paternity of poplar seedlings. *Forest Ecology and Management*, 179: 363-376.
- Tanzarella O.A. & Simeone M., (1996). Report finale Progetto UE “W –Brains” AIR3 –CT92-01429.
- Taylor, J.S., Durkin J.M.H., Breden F., (1999): The death of a microsatellite: a phylogenetic perspective on microsatellite interruptions. *Molecular Biology and Evolution* 16:567-572.
- Tautz D., (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 16: 6469-6471.
- Theissen G., (2001). Development of floral organ identity: stories from MADS house. *Current Opinion Plant Biology*. 4:75-85.
- Thompson, J.D., Higgins D.G, Gibson T.J., (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Thordal-Christensen, H., (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 351-357.
- Todhunter, M.N.; Beineke, W.F., (1984). Effect of anthracnose on growth of grafted black walnut. *Plant Disease*. 68: 203-204.
- Totad A.S., Fakrudin B., Kuruvinashetti M.S., (2005). Isolation and characterization of resistance gene analogs (RAGs) from sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Euphitica* 143:179-188.

- Traut T.W., (1994). The functions and conserved motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotidebinding sites. *European Journal of Biochemistry* 229: 9–19
- Turechek W.W., Stevenson K.L., (1998). Effects of host resistance, temperature, leaf wetness, and leaf age on infection and lesion development of pecan scab. *Phytopathology* 88:1294–1301.
- Van Breusegem, F., Vranova, E., Dat, J.F., Inze D., (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*. 131: 405–414.
- Van der Biezen E.A., Jones J.D.G., (1998). The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology* 8:R226–27.
- Van der Linden G., Wouters D. C. A. E, Mihalka V., Kochieva E. Z., Smulders M.J. M and Vosman B., (2004). Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 384-393.
- Van der Linden G., Smulders M.J.M., Vosman B., (2005). Motif-directed profiling: a glance at molecular evolution. In “Plant species level systematics: new perspectives on pattern process” Bakker FT, Chatrou LW., Gravendeel B., Pelser PB., (eds) *Regnum Vegetabile* 143. ARG Gantner Verlag, Liechtenstein, Koeltz, Koenigstein, Germany, p. 291-303.
- Van Sambeek, J., (2003). Legume ground covers alter defoliation response of black walnut saplings to drought and anthracnose . Eds Van Sambeek, J. W.; Dawson, J. O.; Ponder, F., Jr.; Loewenstein, E. F.; Fralish, J. S. *Proceedings, 13th Central Hardwood Forest conference; 2002 April 1-3; Urbana, IL. Gen. Tech. Rep. NC-234. St. Paul, MN: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, North Central Research Station.* p. 556-564
- Van der Schoot, J., Pospíšková M., Vosman B., Smulders M.J.M., (2000): Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 101: 317-322
- Van Tienderen P.H., De Haan A.A.; Van der Linden G., Vosman B., (2002). Biodiversity assessment using markers for ecologically important traits. *Trends in Ecology & Evolution* 17: 577-582.
- Varga Z., Benea L., Pierib C., Damjanovicha S. and Gáspár Jr R. (1996). The effect of juglone on the membrane potential and whole-Cell K⁺currents of human lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 18: 828-832.
- Vergano G, Botta R, Radicati L (1995). Preservation of *Juglans regia* L nuts under different storage conditions. *Acta Horticulturae* 379: 451-457.
- Vicente J.G., King G.J., (2001) Characterisation of disease gene-like sequences in *Brassica oleracea* L. *Theoretical and Applied Genetics* 102:555–563
- Victory, E., Glaubitz J.C, Rhodes Jr O.E., Woeste K., (2006): Genetic homogeneity in *Juglans nigra* (*Juglandaceae*) at nuclear microsatellites. *American Journal of Botany* 93:118- 126.

- Weir B.S., (1979). Inferences about linkage disequilibrium. *Biometrics* 35: 235-254.
- Wheeler N., Payne P., Hipkins V., Saich R., Kenny S., Tuskan G., (2006). Polymix breeding with paternity analysis in *Populus*: a test for differentiation reproductive success (DRS) among pollen donors. *Tree Genetics and Genomes* 2: 56-60.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Ac. Res.*, 18: 6531-6535.
- Williams R. D., (1972). Root fibrosity proves insignificant in survival, growth of black walnut seedlings. *Tree Planters' Notes* 23:22-25.
- Williams R.D., (2008). Black walnut <http://www.pnga.net/blackwalnuts.html>
- Wilson L.L., Madden L.V., Ellis M.A., (1990). Latent period responses of stem rust in tall fescue incubated at four temperatures. *Crop Science* 32: 589-592.
- Woeste K.E., and Beineke W.F., (2001). An efficient method for evaluating black walnut for resistance to walnut anthracnose in field plots and the identification of resistant genotypes. *Plant Breeding* 120: 454-456.
- Woeste K., Burns R., Rhodes O., Michler C., (2002): Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut. *Journal of Heredity* 93: 58-60.
- Wong E., (1973). Plant phenolics. In: Butler GW, Bailey RW, eds. *Chemistry and biochemistry of herbage*, vol. 1 . London: Academic Press, 265-322.
- Wright S., (1951): The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Woodhead M., Russel J., Squirrell J., Hollingsworth P.M., MacKenzie K., (2005). Comparative analysis of population genetic structure in *Athyrium distentifolium* (Pteridophyta) using AFLPs and SSRs from anonymous and transcribed gene regions. *Molecular Ecology* 14: 1681-1695.
- Workman P.L., & Niswander J.D., (1970). Population studies on Southwestern Indian Tribes. II. Local Genetic Differentiation in the Papago. *The American Society of Human Genetics* 22: 24-49
- Yang S., Gao M., Deshpande S., Lin S., Roe B.A., Zhu H., (2007). Genetic and physical localization of an anthracnose resistance gene in *Medicago truncatula*. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 45-52.
- Yeh F.C., Boyle T.J.B., (1997). Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 129 ,157.
- You M., Boersman J.G., Buirchell B.J., Sweetingham M.W., Siddique K.H.M., Yang H., (2004). A PCR-based molecular marker applicable for marker-assisted selection for anthracnose disease resistance in lupin breeding. *Cellular & Molecular Biology letters* 10: 123.134.

- Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J.-M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., and Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proceedings National Academy of Sciences USA* 94: 2751–2755.
- Zietkiewicz E, Rafalsky JA, Labua D (1994) : Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.
- Zou H., Li Y., Liu X., Wang X., (1999). An APAF-1 Cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 11549-11556.
- Zwarts L, Savage GP, Mcneil DL (1999). Fatty acid content of New Zealand- grown walnuts (*Juglans regia* L.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 50: 189-194.

Abstract

Juglans nigra (Eastern black walnut) and *Juglans regia* (common or Persian walnut) are highly economically important species. The Persian walnut, an indigenous species in Eurasia from the Balkans to southwest China, is cultivated throughout the temperate regions of the world for its high quality wood and edible nuts. Black walnut, native to the Eastern part of North America, is a fast growing species with a dark-colored wood used in the manufacture of furniture and other wood products. Both species are monoecious and heterodichogamous, with the same number of chromosomes. Although phylogenetic analysis has demonstrated that black walnut and Persian walnut belong to different sections of genus *Juglans*, a hybrid between them, *Juglans x intermedia* Carr. (*J. nigra* x *J. regia*), can occur naturally. However the hybridization between black and Persian walnut is not common in nature, because of temporal separation between flower maturity of both parent species and some genetic incompatibility mechanisms as failure of fertilization (pre-zygotic factors) and embryo abortion (post-zygotic factors). The identification and selection of “hybridogenic” parents is the first step to obtain hybrid progeny. Although some hybridogenic trees were detected, controlled crosses remained yet unsuccessfully. Nevertheless, seed orchards were established in France generating the so-called NG23 x RA walnut hybrid. These open-pollinated seed orchards involved the deployment of one *J. nigra* plus tree as female parent and four *J. regia* plus trees as male parents to ensure enough pollen pressure. The identification of parental plants by phenological observations and their clonal propagation by grafting started in the 1980s and required more than ten years. Compared to the parental species, most *J. x intermedia* hybrids show increased vegetative vigour, soil adaptability, good wood quality, greater winter-hardiness and less susceptibility towards to pathogenic infection than *J. regia*. Common walnut is susceptible to the damage caused by pests, flooding, drought and resulted susceptible to some walnut disease as anthracnose, bacteriosis and bark cancer. Particularly the anthracnose caused by *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. is one of the most important diseases of walnut for timber production; symptoms develop on leaves, stem and fruit as irregular necrotic areas that are often surrounded by small chlorotic halos. In severe cases, these lesions may cause premature defoliation, fruit drop or poorly filled nuts. The selection of resistant genotypes toward the anthracnose disease could represent a valid alternative to the cultural and chemical (fungicides) management. In black walnut complete resistance to the anthracnose fungi has not been found although a wide range in susceptibility exists; studies indicated that the natural resistance to *G. leptostyla* is highly heritable, encouraging genetic breeding programs in walnut. Most resistance to pathogens in plants is based on gene-for-gene model: an R-gene product recognises a pathogen gene product in the host, conferring full or partial resistance. Plant disease (R) genes fall into four mainly families, but the vast majority of them are members of the cytoplasmic nucleotide binding site -leucine rich repeat (NBS-LRR)-containing R-gene family. The NBS region of the characterized R genes contain several highly conserved motifs including P-loop, kinase -2 and GLPL motif. The NBS-LRR proteins seem to be involved in recognizing pathogens and activating signal transduction pathways to induce defences responses. Specific pathogen recognition governed by receptor-like R gene products usually lead to a hypersensitive response, associated with the coordinated induction an integrated set of defence responses as cell wall rigidification, the extracellular generation of reactive oxygen species (ROS), accumulation of phenolic compounds, synthesis of phytoalexins, deposition of papillae and accumulation of pathogenesis-related proteins. The effect of juglone (5-hydroxy-1,4-naphoquinone) and his precursor hydrojuglone glucoside on anthracnose in black walnut were correlated with a partial resistance typical of juvenile leaves. Although the mechanisms underlying such results are still poorly understood, we supposed that the resistance to *G. leptostyla* has been classified as “race-specific resistant” mediated by an interaction between R-gene product and avirulent pathogen ligand. Recently a new strategy was proposed to amplify a large collection of R-gene and R-gene Analogues (RGA) fragments. The NBS-profiling approach is based on PCR amplification using an adapter primer for an adapter matching a restriction enzyme site and a degenerate primer targeting the conserved domains present in the NBS region. In this way it is possible to obtain DNA profiles with markers mainly present in R-genes and RGAs. The aims of this work consisted of (1) Application of ten microsatellite nuclear markers for the genetic characterization of *J. nigra*, *J. regia*, and new *J. x intermedia* plants in a mixed Italian population (Villa Mezzalira’s Park). In particular, for the first time this research was also designed to confirm the transferability of ten black walnut SSR loci to Persian walnut. (2) Retrospective selection of hybridogenic walnut trees by microsatellite parentage analysis of half-sib families collected in the Villa Mezzalira’s Park. Verify if this short term marker-assisted breeding tactic could represented an alternative way to

detect new hybridogenic genotypes for walnut hybrid breeding programs. (3) Preliminary genetic analysis of Italian walnut germplasm (Azienda Ovale, CRA-ISPIO, Unità di Ricerca Forestale, Rome) using functional molecular markers tightly linked to R-gene and RGAs to detect genotypes resistant to anthracnose: application for the first time of NBS-profiling approach on forest species.

Ten microsatellites tested in the mixed walnut population collected in Villa Mezzalana's Park amplified in both species, producing fragments of variable size; eight (7.14 %) were common, 68 (60.7 %) amplified in *J. nigra* and 36 (32.1 %) in *J. regia* only (private alleles). Indices of genetic diversity revealed high level of variability. The Principal Coordinate Analysis on the basis of total 112 alleles divided the total sample set (138 plants) into three main groups: *J. nigra* (82), *J. regia* (49) and *J. x intermedia* hybrids (7). Performing the microsatellite fingerprinting, a triploid hybrid plant with two genome parts of *J. nigra* and one part of *J. regia* was identified (N21). The cytological analysis proved this triploid state showing 48 somatic chromosomes. The mother testing analysis of the 7 diploid hybrids by exclusion method indicated one putative hybridogenic mother plant (N17). The sequence analysis of amplified fragments confirmed the cross-species amplification of SSR. Inter-specific differences between alleles were due not only to simple changes in the number of repeats but also to mutations in the flanking regions.

The same battery of 10 SSR primer pairs was used to perform the DNA fingerprinting and parentage tests of 461 progeny individuals (eight half-sib families) collected in the Villa Mezzalana's Park. The high levels of polymorphism detected positively influenced the exclusion and identity probabilities. The assignment analysis revealed the presence of 198 diploid *J. x intermedia* hybrids among the total of the progeny seedlings (42.9%). Maternity checks were carried on all individuals and few errors of sampling (0.06 %) were found. Four distinct hybridogenic mother trees were identified: as expected N17 but also N23, N24 *J. nigra* genotypes and the triploid hybrid plant N21. These three black walnut plants showed a different reproductive success rates. Paternity of 198 diploid hybrids detected in four open-pollinated families were inferred by using the most-likelihood approach based on nine microsatellite loci. Differential male reproductive success was observed among pollen donors within the research site. In the production of hybrid progeny the male reproductive success was unevenly distributed both in amount and in space. In particular 49 (47.5 %) of the total diploid hybrids detected in four half-sib families were sired by only three *J. regia* genotypes. Distance and orientation between trees may influence pollination, but it is probably not a major determinant of pollen success. The timing of pollen release and genetic incompatibilities could be a plausible explanations for the observed fertilization pattern. This retrospective selection may represent an alternative measure to the traditional approach offering a method to identify new parental combinations at a reasonable cost, with no phenological and morphological data available of the trees.

A total of 132 *Juglans* plants, conserved in Azienda Ovale, were sampled and analyzed using neutral (SSRs) and functional markers (NBS). This germplasm was compared to 597 plants located in the Villa Mezzalana's Park and already genotyped. Microsatellite fingerprinting analysis of 132 samples confirmed the former classification based on morphological observations; the assignment analysis classified 63 genotypes as common walnut (*J. regia*RA) and 69 samples as black walnut (*J. nigra*JN). In addition according to the percentage of leaf necrosis area these genotypes were further divided in three main group: (68) *J. nigra*JN resistant, (1) *J. nigra*JN susceptible, and (63) *J. regia*RA susceptible to anthracnose. Phenological observations indicated that the different leaf emergence rates noted in this study (*J. nigra* and *J. regia* was late and early emerging species respectively) could have some association with resistance to anthracnose. Nevertheless this hypothesis didn't justified the presence of a susceptible genotype *J. nigra*. A total of 4 primer NBS-enzyme combinations (RsaI-NBS1, RsaI-NBS5A6, MseI-NBS1 and MseI-NBS5A6) amplified in *Juglans* spp. These primers were designed from a part of the conserved P-loop motif for NBS1 and of kinase-2 for NBS5A6. Out of the total (320 bands), 48 fragments were common, 144 fragments amplifying in *J. nigra* and 128 in *J. regia* only. A deeply analysis of NBS marker distributions revealed the presence of a putative candidate R-gene linked marker correlated to resistance/susceptibility to anthracnose in walnut. In the NBS1-RsaI combination, all susceptible plants, 63 *J. regia*RA and one *J. nigra*JN, showed a common band of 110 bp in length which was not present on the 68 resistant *J. nigra*JN plants.

Juglans nigra (noce nero) e *Juglans regia* (noce comune o Persiano) sono specie di grande importanza economica. Il noce comune, originario dell'Eurasia, dai Balcani al Sud ovest della Cina, è coltivato in tutte le regioni temperate del mondo sia per la produzione di legno pregiato sia di frutta secca. Il noce nero, nativo dell'America settentrionale, è una specie a rapida crescita dal legno colore rosso bruno usato nell'industria del mobile ma anche nella produzione dei più svariati oggetti. Entrambe le specie sono monoiche ed eterodigame, con lo stesso numero di cromosomi. Sebbene l'analisi filogenetica abbia dimostrato che il noce nero ed il noce comune appartengano a due differenti sezioni del genere *Juglans*, possono tuttavia dare origine ad ibridi interspecifici naturali *Juglans x intermedia* Carr. (*J. nigra* x *J. regia*). Tuttavia l'ibridazione tra noce nero e noce comune non è un processo frequente in natura, sia per la separazione temporale della fioritura tra le due specie parentali sia per alcuni meccanismi d'incompatibilità genetica come l'insuccesso nella fecondazione (fattori pre-zigotici) e la mortalità durante la prima fase di sviluppo dello zigote (fattori post-zigotici). L'identificazione e la selezione di piante "ibridogene" costituisce il primo passo per la produzione di una discendenza ibrida. Pur disponendo di piante ibridogene, risulta ancora particolarmente difficile effettuare incroci controllati. Tuttavia in Francia sono stati allestiti impianti da seme per la produzione di un ibrido noto come NG23 x RA. Questi impianti utilizzano una pianta madre plus *J. nigra* liberamente impollinata da quattro piante padri plus *J. regia* che assicurano il necessario apporto di polline. L'identificazione delle piante parentali attraverso osservazione fenologiche e la loro propagazione clonale per innesto ha avuto inizio negli anni 80' ed ha richiesto più di dieci anni di lavoro. Rispetto alla specie *J. regia*, la maggior parte degli ibridi *J. x intermedia* presenta grande vigore, adattabilità a vari terreni, ottima qualità del legno, maggiore resistenza alle gelate primaverili e minore suscettibilità ad alcuni patogeni. Il noce comune è sensibile all'attacco d'insetti, all'asfissia radicale per allagamento e siccità; è suscettibile ad alcune malattie quali batteriosi, antracnosi, e cancro corticale del fusto. In particolare l'antracnosi causata dal fungo *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. è una delle malattie più dannose per la produzione di legname e frutti; può attaccare le foglie, frutti, rami e provocare la formazione di aree necrotiche irregolari spesso circondate da un piccolo alone clorotico. In condizioni particolarmente favorevoli tale malattia può causare la defogliazione precoce, la cascola dei frutti e l'atrofizzazione del seme. La selezione di genotipi resistenti all'antracnosi rappresenta una valida alternativa alle pratiche agronomiche e chimiche (fungicidi). Nel noce nero non è stata ancora individuata una resistenza completa all'antracnosi sebbene esista un ampio range di variabilità; studi indicano che la resistenza naturale alla *G. leptostyla* è un carattere altamente ereditabile, incoraggiando un possibile miglioramento genetico nel noce. La resistenza ai patogeni nelle piante è spesso basato su un modello gene-for-gene: una proteina codificata da un gene-R interagisce con un ligando avirulento del patogeno, conferendo parziale o totale resistenza alla malattia. I geni Resistant-disease delle piante sono suddivise in quattro principali famiglie e, ma la maggior parte di essi sono membri della famiglia cytoplasmic nucleotide binding site -leucine rich repeat (NBS-LRR)-containing R-gene. La regione NBS, tipica dei geni-R, presenta numerosi motivi altamente conservati come P-loop, kinase -2 ed GLPL. Le proteine NBS sembrano essere coinvolte nei meccanismi di riconoscimento dei patogeni e nell'attivazione delle reazioni a cascata che inducono le risposte fisiologiche di difesa. Il riconoscimento del patogeno mediato dalle proteine codificate dai receptor-like R gene, generalmente causa la risposta d'ipersensibilità, associata all'induzione coordinata di un set integrato di difese quali il rafforzamento della parete cellulare, la produzione extracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS), l'accumulo di composti fenolici, la sintesi di fitoalexine, la deposizione di papille e l'accumulo di pathogenesis-related proteins. L'effetto dello juglone (5-idrossi-1,4-naftochinone) e del suo precursore l'idrojuglone glucoside è correlato alla parziale resistenza all'antracnosi tipica delle foglie immature nel noce nero. Sebbene non siano ancora noti i meccanismi coinvolti, supponiamo che la resistenza alla *G. leptostyla* sia da classificare come una "race-specific resistance" dovuta ad una interazione tra il prodotto di un gene-R ed un ligando genico avirulento. Recentemente è stata proposta una nuova strategia per l'amplificazione di una ampia collezione di frammenti di geni-R o -Resistant Analogues (RAG). L'NBS-profiling approach è basato sull'amplificazione mediante PCR del DNA genomico, usando un primer complementare alla sequenza dell'adattatore ed un primer degenerato complementare ad uno dei domini altamente conservati presenti nella regione NBS. In questo modo è possibile ottenere marcatori principalmente localizzati nei geni-R o RAGs. Gli obiettivi del presente studio sono stati (1) Applicazione di dieci loci microsatellitari nucleari per la caratterizzazione genetica di piante *J. nigra*, *J. regia*, e di nuovi *J. x intermedia* in una popolazione mista (Parco di Villa Mezzalira). In particolare tale studio ha permesso di confermare la trasferibilità di dieci loci SSR dal noce nero al noce comune. (2) Selezione a posteriori di piante ibridogene di noce mediante analisi di parentela con marcatori microsatellitari di

famiglie half-sib collezionate nel Parco di Villa Mezzalira. Verificare se questo metodo marker-assistito a breve termine potrebbe rappresentare una strategia alternativa per l'identificazione di nuove combinazioni parentali per la produzione di ibridi. (3) Analisi genetica preliminare di germoplasma Italiano di noce (Azienda Ovale, CRA-ISPIO, Unità di Ricerca Forestale, Roma), usando marcatori molecolari funzionali strettamente associati ai geni Resistant o Resistant Analogs per individuare genotipi resistenti all'antracnosi: applicazione dell' NBS-profiling approach per la prima volta su specie forestali.

Dieci microsatelliti, testati su una popolazione mista di noce presente nel Parco di Villa Mezzalira, hanno amplificato in entrambe le specie producendo frammenti di dimensioni variabili; otto (7.14 %) sono comuni, 68 (60.7 %) hanno amplificato solo in *J. nigra* e 36 (32.1 %) solo in *J. regia* (alleli specie specifici o privati). Gli indici di diversità genetica hanno rivelato elevati livelli di variabilità. L'Analisi delle Coordinate Principali basata su 112 alleli ha diviso il set di campioni totali (138 piante) in tre gruppi principali: *J. nigra* (82), *J. regia* (49) e ibridi *J. x intermedia* hybrids (7). Effettuando l'analisi di fingerprinting mediante SSRs è stata identificata una pianta triploide ibrida (N21), caratterizzata da due terzi del corredo cromosomico *J. nigra* ed un terzo *J. regia*. L'analisi citologica ha confermato la natura triploide della pianta N21, visualizzando 48 cromosomi somatici. L'analisi di maternità per esclusione dei sette ibridi diploidi identificati ha indicato una sola possibile madre ibridogena (N17). L'analisi di sequenza dei frammenti amplificati ha confermato la trasferibilità dei dieci loci microsatellitari. Differenze interspecifiche tra alleli non sono dovute solo a variazioni nel numero delle unità ripetute ma anche a mutazioni nelle regioni fiancheggianti il microsatellite.

La stessa serie di primer SSR è stata utilizzata per effettuare l'analisi di DNA fingerprinting e di parentela su 461 individui-figli (otto famiglie half-sib) collezionati nel Parco di Villa Mezzalira. Alti livelli di polimorfismo hanno influenzato positivamente le probabilità d'esclusione e d'identità. L'analisi d'assegnazione ha rivelato la presenza di 198 ibridi diploidi *J. x intermedia* tra tutte le piantine-figlie (42,9%). Il check di maternità su tutti gli individui campionati ha permesso d'individuare alcuni errori di campionamento (0.06%). Quattro distinte madri ibridogene sono state identificate: come atteso N17 ma anche N23, N24 tra i genotipi *J. nigra* e la pianta triploide ibrida N21. Le tre piante madri di noce nero hanno mostrato un differente successo riproduttivo. L'analisi di paternità di 198 ibridi diploidi appartenenti a quattro famiglie, ottenute per libera impollinazione, è stata effettuata applicando il most-likelihood approach basato su nove loci microsatellitari. I dati ottenuti dimostrano che vi è un differente successo riproduttivo tra i donatori di polline all'interno del sito di ricerca. Nella produzione di progenie ibrida, il successo riproduttivo maschile non è risultato equamente distribuito né quantitativamente né geograficamente. In particolare 49 (47.5%) degli ibridi diploidi identificati sono figli di solo tre piante *J. regia*. La distanza e l'orientamento tra alberi potrebbe aver influenzato il pattern d'impollinazione ma solo marginalmente. I tempi di rilascio del polline ed eventuali incompatibilità genetiche potrebbe essere alla base di tali risultati. La selezione a posteriori delle piante ibridogene potrebbe essere una valida alternativa ai tradizionali approcci consentendo d'identificare nuove combinazioni parentali a basso costo ed in breve tempo senza disporre di osservazioni morfologiche e fenologiche degli alberi.

Un totale di 132 piante, conservate in Azienda Ovale, sono state analizzate usando marcatori neutrali (SSR) e funzionali (NBS). Tali campioni sono stati comparati con le 597 piante già genotipizzate collezionate nel Parco di Villa Mezzalira. L'analisi microsatellitare di 132 campioni ha confermato la classificazione originale basata su osservazioni morfologiche: l'analisi d'assegnazione ha classificato 63 genotipi come noce comune (*J. regia*RA) e 69 come noce nero (*J. nigra*JN). Inoltre basandoci sulla percentuale di superficie necrosata delle foglie, tali genotipi sono stati ulteriormente suddivisi in tre principali gruppi: (68) *J. nigra*JN resistenti, (1) *J. nigra*JN suscettibile, e (63) *J. regia*RA suscettibili all'antracnosi. Osservazioni fenologiche indicano che i differenti tassi di emissione delle foglie riscontrati in questo studio (*J. nigra* e *J. regia* sono specie dalla ripresa vegetativa rispettivamente tardiva e precoce) potrebbero essere associati con la resistenza all'antracnosi. Tuttavia questa ipotesi non giustifica la presenza di un genotipo *J. nigra* suscettibile. Un totale di quattro combinazioni NBS-enzima di restrizione (RsaI-NBS1, RsaI-NBS5A6, MseI-NBS1 e MseI-NBS5A6) hanno amplificato nel genere *Juglans*. Il primer NBS1 ha come target una parte del motivo P-loop mentre il primer NBS5A6 ha come sito bersaglio il motivo Kinase2. Delle 320 bande totali amplificate, 48 sono risultate comuni, 144 *J. nigra* specifiche e 128 *J. regia* specifiche. Un'analisi dettagliata della distribuzione dei frammenti ha rivelato la presenza di un possibile marcatore candidato NBS correlato alla resistenza/suscettibilità all'antracnosi nel noce. Nella combinazione NBS1-RsaI, le 64 piante di noce suscettibili, 63 *J. regia* RA; una *J. nigra* JN, mostrano una banda comune di 110bp di lunghezza che al contrario è assente nelle 68 piante *J. nigra* resistenti.