

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
FACOLTA' DI AGRARIA**



**DOTTORATO DI RICERCA
IN AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA - XXIII CICLO**
Indirizzo Miglioramento Genetico ed Orticoltura

**Caratterizzazione fenotipica e molecolare per facilitare
il miglioramento genetico di *Cucurbita pepo***

Tutore

Dott.ssa M.R Ercolano

Co-Tutore

Prof. Luigi Frusciante

Coordinatore

Prof. Matteo Lorito

Candidata

Dott.ssa Gelsomina Formisano

Indice

1. Introduzione	1
1.1 Origine, diffusione e importanza della coltura.....	1
1.2 Cenni botanici e risorse genetiche	2
1.3 Caratteristiche morfologiche e qualitative	5
1.4 Esigenze pedo-climatiche	6
1.5 Avversità	6
1.6 Miglioramento genetico e metodi di selezione	9
1.7 Strumenti di analisi genomica.....	10
2. Scopo della Tesi	13
3. Materiali e metodi	14
3.1 Materiale vegetale	14
3.2 Saggi di resistenza in vivo	17
3.3 Schema di selezione per l'ottenimento di linee pure	19
3.4 Analisi molecolare	19
3.4.1 Estrazione di DNA	19
3.4.2 Analisi AFLP	20
3.4.3 Analisi RAPD	20
3.4.3.1 Amplificazione.....	20
3.4.3.2 Clonaggio e disegno di primer	21
3.4.4 Analisi SSR.....	22
3.4.4.1 Estrazione di DNA	22
3.4.4.2 Selezione e disegno dei primer	22
3.4.4.3 Amplificazione e analisi.....	23
4. Risultati	26
4.1. Caratterizzazione morfologica di collezioni di germoplasma di zucchini	26
4.2 Valutazione per resistenza a malattie.....	29
4.3 Ottenimento di linee in avanzata fase di selezione per caratteri agronomici.....	32
4.4 Miglioramento della varietà locale di zucchini San Pasquale.....	38
4.5 Analisi molecolare in cultivar commerciali	39
4.5.1 Analisi AFLP	39
4.5.2. Analisi RAPD	42
4.5.3 Analisi SSR.....	45
4.6 Studio genetico della resistenza allo ZYMV: analisi della popolazione segregante	52
5. Discussioni	55
6. Conclusioni	63
7. Bibliografia	64

1. Introduzione

1.1 Origine, diffusione e importanza della coltura

Lo zucchini è tra le specie vegetali di maggiore importanza economica ed è coltivato nelle regioni temperate e subtropicali (Paris, 1996). È nativo dell'America del Nord, dove è stato coltivato per almeno 10,000 anni (Smith, 1997) ma è stato introdotto in Europa circa 500 anni fa (Whitaker, 1947).

La parola "squash" è derivato dal termine dell'America Nativa "asquash", la forma plurale di "asq" che indica un frutto che è immaturo o incompleto (Gray e Trumbull, 1883). Sebbene il primo utilizzo delle Cucurbitacee riguarda il consumo dei suoi semi, l'uso dei suoi frutti immaturi come vegetale invece, sembra risalire comunque a migliaia di anni fa, probabilmente prima del consumo dello stesso frutto maturo (Paris, 2000).

Diverse cultivar di *Cucurbita pepo* sono state sviluppate dagli Americani nativi nell'era pre-colombiana. Molte finirono per essere coltivate, per la prima volta, nei giardini di farmacisti, di medici e di botanici dove gli incroci naturali sono stati inevitabili. Se da una parte questo ha fatto perdere le caratteristiche iniziali di ciascun parentale donatore, dall'altra ha determinato la comparsa di nuovi fenotipi ricombinanti. La selezione di una piccola minoranza di questi genotipi ha portato alla diffusione di cultivar che presentano una maggiore variabilità fenotipica, e di conseguenza un valore economico più elevato rispetto ai loro antenati del Nord America.

I principali produttori mondiali di zucchini sono Turchia, Italia, Egitto, Spagna, USA e Messico (Paris, 1996).

In Italia la coltivazione dello zucchini interessa circa 14.291 ha con una produzione di circa 380,000 t che rappresenta più del 50% della produzione dei paesi dell'Unione Europea. Nonostante questo dal nostro paese partono solo piccoli flussi di esportazione (circa l'11% degli scambi totali nella UE, rivolti particolarmente verso Germania, Gran Bretagna, Francia e Svizzera); la Spagna copre quasi il 75% degli scambi tra i paesi dell'UE. Nonostante sia in atto, come per molte altre specie orticole da mercato fresco, un processo di meridionalizzazione delle produzioni, lo zucchini continua ad essere coltivato, nel nostro Paese, a tutte le latitudini. I maggiori poli produttivi si trovano al Sud (Sicilia 2.920 ha; Lazio 1.338 ha; Puglia 1.510 ha; Calabria 1.342 ha; Campania 793 ha. Anche il Nord dedica spazio alla coltura: il Piemonte 1.401 ha, il Veneto 1.027 ha e l'Emilia Romagna 1.16 ha (ISTAT 2007). I consumi erano nel passato concentrati nei mesi estivi, mentre oggi risultano completamente destagionalizzati e soddisfatti dalla produzione nazionale anche

grazie alla diffusione della coltivazione in coltura protetta sotto apprestamenti di diverso tipo (tunnel, tunnel-serra, serre), secondo le aree di produzione.

La capillare diffusione della coltura, se da un lato assicura un costante flusso di prodotto, dall'altra determina un mercato estremamente variegato, data la molteplicità di gusti, sapori e colori della produzione nazionale.

1.2 Cenni botanici e risorse genetiche

Lo zucchini appartiene alla famiglia delle *Cucurbitaceae*, al genere *Cucurbita* e alla specie *Cucurbita pepo*. Alla stessa famiglia botanica appartengono cetriolo, melone e anguria. Il genere *Cucurbita* include alcune delle più antiche specie vegetali domestiche. Antoine Nicolas Duchesne (1747-1827) fu il primo a capire le relazioni tra le specie *Cucurbita* e studiando la loro capacità di incrociarsi identificò tre specie: *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata* e *Cucurbita polymorpha*. Sebbene il nome *Cucurbita polymorpha* è altamente appropriato, visto che rappresenta la specie più polimorfica per le caratteristiche dei frutti (Naudin 1856), le regole della nomenclatura botanica hanno dettato l'uso del nome Linneano, *Cucurbita pepo*. La forma del frutto è un carattere altamente poligenico (Emerson, 1910; Sinnott e Kaiser, 1934) e di conseguenza può riflettere le diverse relazioni genetiche esistenti tra i diversi gruppi (Paris, 1986). Questa supposizione ha ricevuto nel tempo supporto da risultati ottenuti utilizzando marcatori molecolari (Paris et al., 2003; Ferriol et al., 2003). Sulla base di ciò sono stati individuati 6 gruppi di cultivar: Zucchini, Cocozelle, Vegetable Marrow, Crookneck, Scallop e Straightneck (Paris, 1986). Ci sono altri due gruppi di *C. pepo*, Acorn e Pumpkin, i quali sono coltivati per il consumo dei loro frutti maturi (Figura 1)

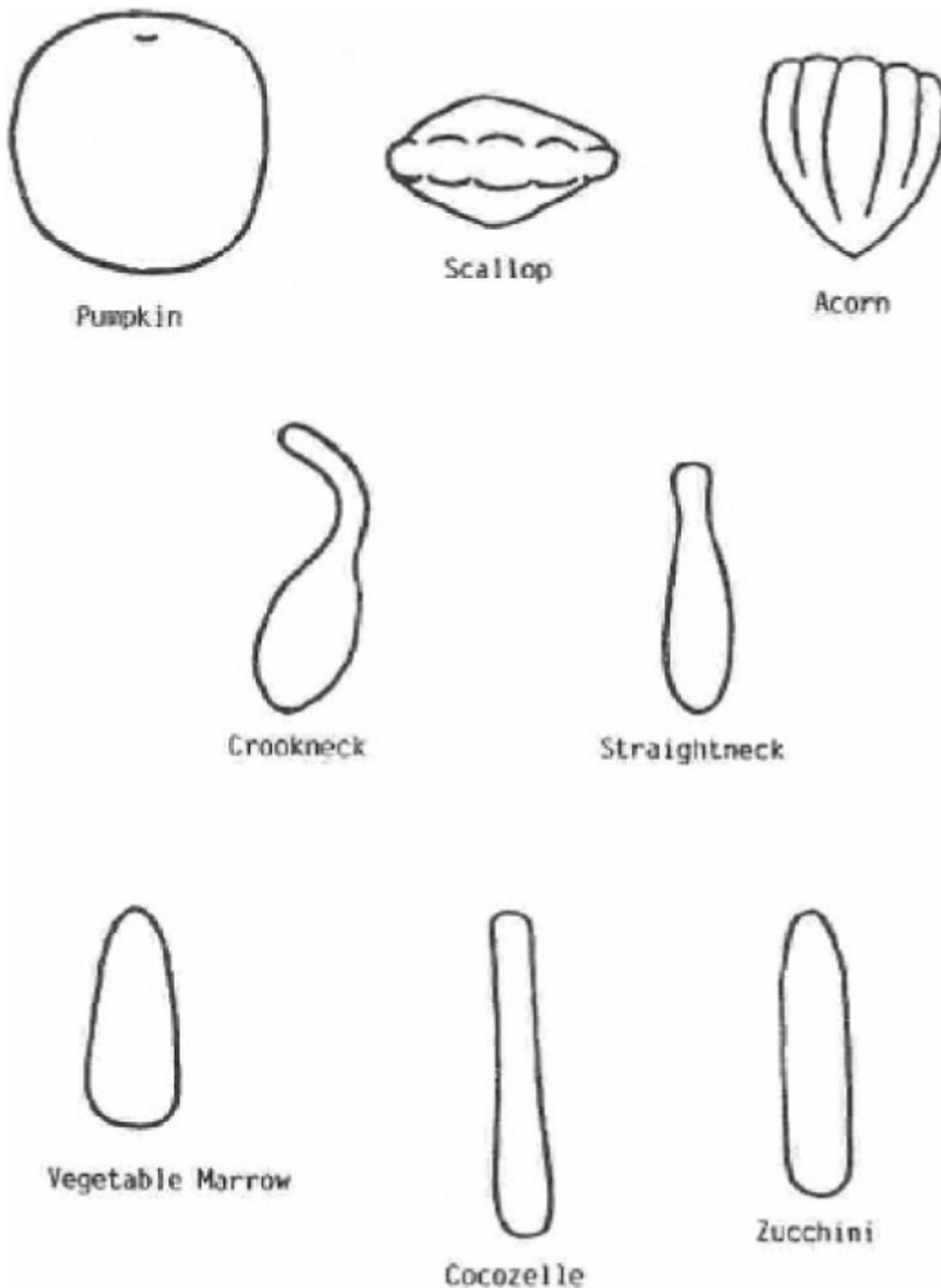


Fig.1. Rappresentazione schematica della forma dei frutti degli 8 gruppi di *C. pepo*.

In aggiunta, ci sono altri tre gruppi che non sono utilizzati a scopo culinario ma per ornamento: Round, Smooth-rinded Gourd, Oviform, Smooth-rinded e Warded Gourd (Paris, 2000). Tutti i gruppi, ad eccezione di Straightneck e Zucchini, esistono da secoli (Paris, 2000). Diverse caratteristiche fenotipiche sostengono tale raggruppamento come la forma e la dimensione dei semi. Le cultivar del gruppo Gourd con frutti piccoli, hanno anche i semi più piccoli. I gruppi Crookneck, Straightneck, Scallop e Acorn hanno i frutti e i semi più piccoli rispetto ai gruppi Cocozelle,

vegetable marrow, zucchini e pumpkin. L'attuale classificazione botanica basata su variazioni di allozimi divide *Cucurbita pepo* in tre sottospecie: *Cucurbita pepo* subsp. *fraterna*, *Cucurbita pepo* subsp. *texana* (sin. subsp. *ovifera*) e *Cucurbita pepo* subsp. *pepo*. La subsp. *pepo* include cocozelle, vegetable marrow, zucchini, pumpkin, warted gourd e round, smooth-rinded gourd; non sono state descritte specie selvatiche appartenenti a questa subspecie. Alla subsp. *texana* appartengono Crookneck, Straightneck, Scallop, Acorn, Oviform, Smooth-rinded e piante selvatiche cresciute in U.S.A. Piante selvatiche della subsp. *fraterna* sono state trovate in Messico (Andres, 1987). Polimorfismi di DNA hanno suggerito che la cultivar Miniature Ball, utilizzata per ornamento, rappresenta o è strettamente legato all'ancestrale *C. pepo* (Paris et al., 2003). Purtroppo questo germoplasma è suscettibile alle principali malattie che attaccano lo zucchini.

Numerose varietà locali di *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* sono state sviluppate in Italia. Molte di queste hanno tratti indesiderati, includendo molte ramificazioni, fogliame altamente spigolato, tarda maturità e una forte sessualità maschile. La variabilità esistente tra le varietà italiane è elevata, alcune hanno frutti rotondi (pumpkin), altre clavato (vegetable marrow) ed altre ancora lungo e bulboso (cocozelle). Il colore dei frutti varia da un verde intenso a chiaro o anche striato. Tutti e tre i gruppi presentano una miriade di caratteristiche che potrebbero essere sfruttare, tra cui estrema precocità e quasi completa espressione sessuale femminile. Vecchie cultivar di *C. pepo* subsp. *pepo*, in particolare cocozelle, possono essere utilizzate come fonte di germoplasma per l'arricchimento del gruppo di cultivar a frutto cilindrico quale zucchini. Quest'ultimo rappresenta il gruppo più moderno e più importante economicamente ma mostra la più bassa variabilità genetica tra i gruppi di *C. pepo* subsp. *pepo*.

Le vecchie cultivar italiane sono ancora conservate dai singoli agricoltori (Perrino et al., 1988), cooperative, e si possono trovare in negozi locali addetti alla vendita di semi. Ci sono diverse organizzazioni, per lo più indicate come banche del germoplasma, che sono dedite alla conservazione della variabilità genetica. Molte accessioni di *C. pepo* si trovano in strutture di alcune organizzazioni in Europa (Diez et al., 2002), in Messico, in U.S.A e in Costa Rica (Lira Saade e Montes Hernandez, 1994).

È necessario aggiungere che questa specie può essere incrociata con diverse altre specie di *Cucurbita*, tra cui *C. moschata* (Merrick, 1995). Diverse resistenze a malattie sono state trasferite in *C. pepo* da una specie tropicale di *moschata*. Questa specie è stata utilizzata anche come specie ponte per trasferire la resistenza all'oidio da *C. okechobeensis* Bailey subsp. *martinezii* a *C. pepo* (Munger, 1990; Jahn et al., 2002).

1.3 Caratteristiche morfologiche e qualitative

Lo zucchini è una pianta erbacea annuale (47-70 giorni per ottenere il prodotto) con portamento eretto, semistrisciante oppure strisciante. La specie è monoica cioè con fiori maschili e femminili separati sulla stessa pianta all'ascella delle foglie. I fiori maschili hanno un peduncolo lungo, 3 stami con antere saldate a cupola, quelli femminili hanno un peduncolo breve e robusto, uno stilo corto e tre grossi stimmi. La fioritura è scalare. Il rapporto tra fiori maschili e femminili è un carattere varietale, ma viene influenzato dalle condizioni ambientali e di coltivazione: elevate temperature e giorno lungo aumentano la produzione dei fiori maschili, al contrario, temperature basse e giorno corto sbilanciano il rapporto a favore dei fiori femminili. L'antesi dei fiori femminili inizia al mattino presto. La specie è allogama ($2n=2x=40$) ad impollinazione entomofila.

Il frutto è un peponide variabile per forma che può essere cilindrica, clavata, tonda, appiattita e per colore che può andare dal bianco, al bianco-grigio (grey), al verde chiaro, al verde medio, al verde scuro o addirittura scurissimo fino al giallo e può essere pressoché uniforme, maculato (con presenza di piccole chiazze di colore più chiaro rispetto a quello di base) o striato (con striature più chiare del colore di base). Sono stati identificati più di dodici loci che influenzano il colore dei frutti, alcuni dei quali sono multi allelici (Paris e Brown, 2005). L'epicarpo è sottile, più o meno liscio; la polpa è bianca senza cavità centrale. Il frutto viene consumato immaturo: secondo la varietà, esso raggiunge una dimensione adatta alla raccolta 4-8 giorni dopo l'impollinazione. La forma e il colore del frutto seguono molto le preferenze regionali. Il consumatore predilige frutti lunghi e striati nel Sud Italia e frutti tondi e lunghi verde scuro o chiaro nel centro Italia. Può essere commercializzato senza fiore (grande distribuzione) o con il fiore (corolla persistente): è il caso dei mercati locali, dove presenta, rispetto al prodotto che ne è privo, prezzi superiori perché indice di freschezza.

Dal punto di vista nutrizionale, lo zucchini è composto per circa il 94% di acqua, contiene pochi carboidrati e proteine, è privo di lipidi, mentre è ricco di vitamina A, C, fosforo e calcio; ha un basso valore energetico (11 cal/100g di parte edule), è dissetante, diuretico e leggermente lassativo. Sapore, valore nutritivo e consistenza sono caratteristiche importanti che determinano la qualità dello zucchini ed è stato visto che aumentano quando i frutti sono giovani, a 3 giorni dopo l'antesi, per poi diminuire rapidamente (Culpepper, 1937). Esiste una grande variabilità per il sapore dei frutti. Esso può variare in funzione del colore, infatti, gli zucchini gialli differiscono da quelli verdi ma il sapore può essere diverso anche tra zucchini dello stesso colore. Sebbene il sapore è un carattere estremamente importante per il consumatore, esso non sembra ricevere molte attenzioni dai breeder.

Dato che gli zucchini sono frutti immaturi, il loro contenuto vitaminico e minerale non è alto. Comunque, i diversi gruppi differiscono anche per il contenuto di alcuni costituenti. Il gruppo zucchini ha un più alto contenuto in potassio rispetto a crookneck, straightneck e scallop. il gruppo dei zucchini, crookneck e straightneck hanno più provitamina A rispetto al gruppo scallop e questo probabilmente, può essere attribuito alla loro più intensa colorazione esterna.

Lo sviluppo della placenta e i semi influenzano negativamente la consistenza. Essi occupano una grande porzione del volume dei frutti rotondi e corti e quindi, nei pumpkin e nei vegetable marrow sono rimossi per la preparazione culinaria. Comunque, in cucina c'è una forte preferenza di zucchini a frutti lunghi come in cocozelle, zucchini, crookneck e straightneck.

1.4 Esigenze pedo-climatiche

La coltura ha elevate esigenze termiche (Tabella 1). Per soddisfare tali esigenze il ciclo colturale in pieno campo nei nostri ambienti è tipicamente primaverile-estivo. Riguardo alle esigenze fotoperiodiche lo zucchini è specie a giorno indifferente anche se i livelli termici e la lunghezza del giorno hanno influenza, come visto in precedenza, sul rapporto numerico tra fiori maschili e femminili. La disponibilità idrica è l'altro fattore essenziale sia sotto l'aspetto quantitativo sia qualitativo delle produzioni. La carenza idrica infatti comporta una minore crescita, l'arresto dell'evoluzione fiorale, la cascola dei fiori e l'aborto dei frutticini.

Tabella 1. Esigenze termiche della zucca da zucchini.

Fase e tipo di temperatura	°C
Germinazione	
minima	10
ottimale	21 – 35
Crescita	
base	10 - 12
ottimale diurna	24 – 30
ottimale notturna	15 - 18
Fioritura	
minima	12 - 15
massima	30

1.5 Avversità

La resistenza a malattie è il più importante obiettivo del miglioramento genetico dello zucchini. La specie ha una netta predisposizione a malattie causate da virus, funghi e squilibri fisiologici. Sicuramente i primi determinano i danni maggiori. Oggi sono disponibili sul mercato ibridi di

zucchini e di crookneck, resistenti a virus, ottenuti mediante metodi tradizionali e non di miglioramento genetico.

Tra i virus, i più dannosi sono:

1. *Zucchini Yellow Mosaic Virus*, virus del mosaico giallo dello zucchini (ZYMV): i sintomi dell'infezione che interessano le foglie consistono in mosaico a tessere verde chiaro o giallo, bollosità e bandatura nervale verde (figura 2a). I sintomi più caratteristici e gravi sono tuttavia a carico dei frutti, sui quali il virus causa vistose deformazioni, bitorzoli, spaccature e che pertanto risultano non commerciabili. Dopo l'attacco la produzione di frutti è ridotta e nei casi gravi mancare del tutto.
2. *Watermelon Mosaic Virus* 1-2, razze 1 e 2 del virus del mosaico del cocomero (WMV 1-2): sulle giovani foglie si osservano mosaici diffusi, colorazioni perinervali, riduzione del lembo e malformazioni di vario grado (figura 2b). Sintomi di malformazioni, distorsioni e rottura di colore, sono presenti anche sui frutti.
3. *Cucumber Mosaic Virus*, virus del mosaico del cetriolo (CMV): le foglie mostrano superficie molto ridotta (laciniatura) che, spesso è interessata da mosaico (aree gialle alternate ad aree verdi) (figura 2c). I frutti possono essere butterati, a forma di clava.

Tutti questi virus sono trasmessi da afidi in maniera non persistente. L'unica lotta chimica possibile è quella effettuata nei confronti di questi vettori anche in fase di raccolta per cui risulta dannoso per la salute dell'uomo. Per questo motivo riveste estrema importanza non solo l'adozione di adeguate pratiche agronomiche, ma anche l'identificazione di resistenze ed il loro trasferimento in cultivar commerciali. Le resistenze genetiche sono state spesso trovate in *C. moschata*. Molti tentativi sono stati fatti per decenni al fine di trasferire la resistenza a virus a *C. pepo* mediante incrocio interspecifico, ma quasi tutti sono falliti. L'ibrido interspecifico e le piante derivate dai primi back cross spesso sono sterili rendendo difficile l'introggressione di geni di resistenza. Inoltre il recupero dei caratteri del parentale ricorrente insieme alla resistenza, in caso di successo, spesso richiede diversi reincroci. Spesso, la resistenza al singolo virus è conferita da diversi geni recessivi o complementari, di conseguenza, l'accumulo delle diverse resistenze ai virus in una stessa pianta può essere molto difficile. Nel corso degli ultimi due decenni il lavoro di miglioramento genetico per l'introduzione della resistenza a virus in zucchini è stata focalizzata sullo ZYMV ottenendo ottimi risultati. Sono state identificate diverse fonti di resistenza in *C. moschata* e sono state studiate le relazioni genetiche tra le resistenze delle diverse fonti (Paris e Brown, 2005). La resistenza derivata

da due differenti fonti è stata trasferita in *C. pepo* e introgressa nel gruppo Zucchini ottenendo diverse cultivar resistenti allo ZYMV (Provvidenti, 1997; Paris e Cohen, 2000).

Lo zucchini è anche soggetto ad attacchi di Oidio causato da *Erysiphe chicoracearum* (Ec) e *Sphaerotheca fuliginea* (Sf). I primi sintomi compaiono sulla pagina inferiore delle foglie sotto forma di chiazze biancastre, polverulente, che in seguito tendono ad allargarsi e ad interessare gran parte della superficie fogliare. In caso di forte attacco le foglie colpite ingialliscono e disseccano (figura 2d). l'incidenza delle infezioni è determinata da vari fattori ambientali come la temperatura, l'intensità della luce e l'età della pianta. Alcuni gruppi sono più suscettibili di altri, come i gruppi acorn e scallop sono meno suscettibili di cocozelle e vegetable marrow (Cohen et al., 1993). L'oidio è diffuso dal vento ed è difficile da controllare, in particolare nelle aree più asciutte. La tempestività nell'utilizzo di fungicidi è importante per riuscire a prevenirlo (McGrath e Staniszewska, 1996). Molte accessioni di *C. pepo* sono state testate per la resistenza all'oidio, ma nessuna ha mostrato un'elevata resistenza. Sono state identificate fonti di resistenza in due specie selvatiche, *Cucurbita lundelliana* (Rhodes, 1964) e *Cucurbita okechobeensis* (Contin, 1978). La resistenza è stata introdotta da *C. okechobeensis* in *C. pepo* (Paris e Cohen, 2002).



Fig. 2a. foglia infetta da ZYMV

Fig. 2b. foglia infetta da WMV

Fig. 2c. foglia infetta da CMV

Fig. 2d. foglia infetta da oidio

Allo scopo di disporre di strumenti efficienti che permettono di trasferire tali resistenze a materiale commerciale è indispensabile conoscere la base genetica di tali resistenze. In *Cucurbita* è stato già determinato il controllo genetico della resistenza ad un certo numero di malattie.

Dalle informazioni riportate in letteratura in *C. moschata* la resistenza al CMV è conferita da un singolo gene dominante, (*Cmv*) (Brown et al., 2003). La resistenza al WMV è controllata da un singolo gene dominante (*Wmv*) (Brown e al. 2003). Per quanto riguarda lo ZYMV, le due fonti di resistenza utilizzate nel miglioramento genetico sono *C. ecuadorensis* per *C. maxima* e *C. moschata* per *C. pepo*. La resistenza da *C. ecuadorensis* è data da un singolo gene recessivo, (zym^{ecu}) (Robinson et al., 1988). Diversi geni per la resistenza sono stati identificati in *C. moschata*. *Zym-0* è un gene dominante per la resistenza allo ZYMV presente nella landrace locale Nigeriana (Brown et

al., 2003; Pachner e Lelley, 2004). Il gene *Zym-1* è stato identificato nella varietà locale del Portogallo detta “Menina” ed è dominante (Pachner e Lelley, 2004; Paris et al., 1988). Questo gene conferisce resistenza anche allo WMV o è strettamente associato al suo gene di resistenza (Gilbert-Albertini et al., 1993). Quando il gene di resistenza è stato introgresso in una cultivar del gruppo zucchini di *C. pepo*, si è visto che sono coinvolti altri geni complementari. Questi geni complementari, derivati da *C. moschata*, sono denominati *Zym-2* e *Zym-3* (Paris e Cohen, 2000). Fonti di resistenza all’oidio sono state identificate in *C. lundellian* e in *C. okeechobeensis*: il gene dominante *Pm* che conferisce resistenza a *Erysiphe chicoracearum*, e il gene *Pm-0*, a dominanza incompleta, che conferisce resistenza a *Sphaerotheca fuliginea* (Cohen e al. 2003).

1.6 Miglioramento genetico e metodi di selezione

I giovani frutti dello zucchini, coltivati a scopo culinario, sono raccolti ogni giorno o ad intervalli di 2-3 giorni per diverse settimane o mesi. Questo richiede molti raccolti nel corso della stagione. La crescita a cespuglio, una caratteristica mutante conferita da un singolo gene, *Bu*, facilita notevolmente raccolte multiple. Questa caratteristica, dovuta ad internodi più corti, sembra essere rara o assente nelle landrace messicane. La selezione e la stabilizzazione di tale carattere è iniziata da parte dei selezionatori italiani nel gruppo cocozelle. Alcune cultivar che presentano una crescita a cespuglio hanno un portamento eretto mentre, la maggior parte tendono ad essere o a diventare prostrate con l’età. Il portamento eretto facilita la gestione dei campi e la raccolta.

Un’altra caratteristica importante è l’assenza di ramificazioni. È molto difficile trovare i frutti sulle piante ramificate in quanto nascosti dal fogliame. Anche in questo caso, il miglioramento è iniziato ad opera di breeder italiani ottenendo un grande successo poco prima della fine del 20th secolo con lo sviluppo di un nuovo gruppo di cultivar, denominato Zucchini, a portamento aperto e senza ramificazioni. L’assenza di ramificazione, insieme a piccioli orizzontali più che verticali, rende efficiente e veloce la raccolta (Baggett, 1972). La presenza di spine può danneggiare i frutti alla raccolta intaccando il loro aspetto. La dimensione e la densità delle spine varia tra le diverse cultivar. Un tratto desiderato per una cultivar è la presenza di poche e piccole spine o addirittura assenti del tutto. Le piante dovrebbero essere relativamente piccole con un fogliame non eccessivo, perché l’eccesso porta solo ad una bassa produttività e nasconde i frutti rallentando la raccolta. Inoltre, su alcune piante i frutti crescono molto velocemente, con conseguente aumento delle dimensioni. Questa caratteristica è indesiderata perché il valore economico dei frutti è inversamente proporzionale alla loro dimensione, i frutti più piccoli spuntano sul mercato prezzi più alti.

I risultati del miglioramento genetico nei primi anni del 20th secolo hanno contribuito enormemente allo sviluppo del settore commerciale delle sementi. La forte eterosi espressa in *C. pepo* (Passmore, 1930) ha portato Curtis (1939) a proporre la commercializzazione di ibridi di zucchini, e infatti innumerevoli ibridi F1 sono stati commercializzati da allora. Molti di essi sono superiori in resa, precocità, vigore, uniformità e resistenza. I metodi di miglioramento genetico impiegati più spesso per lo zucchini iniziano con incroci seguiti da selezione pedigree e backcross (Allard, 1960). Il metodo pedigree prevede autofecondazioni e selezione per i caratteri d'interesse ad ogni generazione. Esso è comunemente utilizzato quando entrambi i parentali dell'ibrido presentano caratteri positivi. Il back cross prevede la selezione di un parentale che porta un carattere di interesse e l'incrocio con un germoplasma mancante di tale carattere. Questo metodo è normalmente utilizzato nello sviluppo di materiale resistente a malattie.

Una lista completa di geni identificati nelle specie *Cucurbita* è stata pubblicata nel 2005 da H.S. Paris. Sono circa 66 i geni riportati per *C. pepo*, 21 per *C. moschata*, 19 per *C. maxima* e 29 geni per l'incrocio interspecifico di *C. maxima* per *C. ecuadorensis*. Di questi 29 geni 25 sono varianti isoenzimatiche. Uno o due geni sono stati anche identificati in 4 delle specie selvatiche (*C. okeechobeensis*, *C. lundelliana*, *C. fetidissima* HBK e *C. ecuadorensis*) e in diversi altri incroci interspecifici. Molti dei geni di questa lista non sono stati mappati. Comunque, sono stati riportati casi di linkage come: *D-mo2* (stelo nero e uno dei geni del colore del frutto maturo) in *C. pepo* (Paris, 1996). In *C. moschata* il gene per la resistenza a WMV è strettamente associato o è identico al gene *Zym-1* (Gilbert-Albertini et al., 1993).

1.7 Strumenti di analisi genomica

Un settore di notevole interesse e grandi potenzialità è quello dell'analisi del genoma basata sulla rilevazione di marcatori molecolari. È un settore in continua e rapida modificazione al quale contribuiscono, da un lato, la disponibilità di strumentazione sempre più affidabile e, dall'altro, la sempre migliore conoscenza della struttura e delle funzioni degli acidi nucleici. Un marcatore molecolare può essere definito come quel locus genomico che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico ed inequivocabile il tratto cromosomico con il quale si identifica. Per questo motivo non sono generalmente riferibili all'attività di specifici geni, ma si basano direttamente sulla rilevazione di polimorfismi nella sequenza nucleotidica del DNA. I vantaggi consistono nel fatto che non subiscono interferenze da parte dell'ambiente, trattandosi di differenze a livello della molecola del DNA, coprono qualsiasi parte del genoma (trascritta e non), permettendo così di individuare differenze anche tra individui geneticamente simili e

fenotipicamente indistinguibili, e inoltre, non presentano effetti epistatici o pleiotropici ed in molti casi hanno espressione codominante, consentendo di distinguere l'eterozigote dagli omozigoti. I marcatori molecolari si differenziano per il tipo di sequenze analizzate e/o per il tipo di tecnica impiegata. Alcuni tipi, come gli RFLP (Restriction fragment length polymorphism) si basano sul procedimento di ibridazione, mentre altri, RAPD (Random amplified polymorphic DNA), SSR (Simple sequence repeat), I-SSR (Inter- simple sequence repeat), AFLP (Amplified fragment length polymorphism) e STS (Sequence tagged sites), sono basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR). Gli SNP (Single nucleotide polymorphism), marcatori molecolari di nuova generazione, possono essere individuati mediante l'utilizzo di diverse tecniche.

Le applicazioni dei marcatori molecolari alla ricerca in campo vegetale sono numerose e diversificate a seconda della natura genetica e della rilevanza biologica dei polimorfismi. Attualmente, le applicazioni più interessanti riguardano: costruzione di mappe genetiche, mappaggio genico e selezione assistita (MAS), caratterizzazione della variabilità genetica, tipizzazione e identificazione varietale, individuazione di OGM, analisi dell'espressione genica e clonaggio genico. Mappe genetiche basate su marcatori molecolari sono al momento disponibili per molte specie e sono utilizzate per identificare geni agronomicamente importanti ed utili ai fini della MAS. La selezione assistita viene effettuata a livello genotipico, usando marcatori strettamente associati ai geni che controllano caratteri qualitativi importanti, come ad esempio quelli responsabili di molte resistenze a organismi patogeni. In questo modo, la valutazione e la selezione dei materiali durante un programma di miglioramento genetico finalizzato alla costituzione varietale può essere condotta a livello genotipico direttamente in laboratorio, evitando il dispendio di risorse richiesto dalle valutazioni fenotipiche convenzionali in campo o in serra. L'associazione tra marcatori molecolari ed il locus per il carattere in esame può essere determinata sperimentalmente disponendo di materiale vegetale con specifiche caratteristiche genetiche e producendo progenie segreganti attraverso appropriati programmi di incroci controllati. Una procedura attualmente molto impiegata per l'identificazione di tratti cromosomici associati a specifici geni qualitativi è quella nota come BSA (Bulked segregant analysis), messa a punto da Michelmore et al., 1991. Questa metodologia consiste nell'effettuare un incrocio iniziale tra parentali che differiscono per il carattere che si vuole mappare e quindi creare un'appropriata popolazione segregante (generalmente una popolazione F2 o BC1) dove poter selezionare singole piante per l'espressione del carattere. Una volta selezionate, tali piante vengono utilizzate per costituire due gruppi distinti di DNA (bulks) ed ogni gruppo includerà, pertanto, il DNA di piante identiche per la situazione genica al locus per il carattere qualitativo di interesse.

Negli ultimi anni, proprio grazie all'introduzione di tecniche molecolari accurate e potenti, è stato possibile raccogliere informazioni circa il grado di diversità/similarità genetica di molte specie vegetali e la variabilità sia entro che tra popolazioni. La maggior parte dei marcatori molecolari è in grado di rilevare tale variabilità genetica, la cui caratterizzazione prevede la stima di particolari coefficienti di similarità genetica (SG) o dissimilarità genetica (DG). A tal fine, i dati relativi all'insieme di marcatori molecolari raccolti nel campione di individui o sottopopolazioni in esame sono utilizzati per costruire le matrici di similarità o dissimilarità, calcolando i coefficienti relativi in tutte le possibili combinazioni a coppia tra tutti gli individui di una popolazione e/o tra più popolazioni. I coefficienti di similarità utilizzabili a tale scopo sono molteplici. In tutti i casi, un valore di similarità pari a 1 indica completa identità genetica tra la coppia di individui considerati, mentre un valore uguale a 0 completa diversità. Le matrici sono necessarie per condurre le analisi di raggruppamento attraverso la costruzione dei dendrogrammi.

Una buona caratterizzazione del germoplasma esistente è necessaria per essere utile ai genetisti e miglioratori genetici. La caratterizzazione morfologica e molecolare è essenziale per chiarire le relazioni genetiche tra i diversi gruppi della specie. Ignart e Weeden (1984), Decker (1985) e Decker-Walters et al., (1990) hanno usato il sistema alloenzimatico per analizzare le relazioni tra i differenti gruppi di *C. pepo*, ottenendo una chiara classificazione sub specifica. Recentemente sono stati studiati con lo stesso obiettivo anche polimorfismi a livello del DNA. In particolare sono stati utilizzati RFLP, RAPD, AFLP, SRAP, ISSR e SSR (Torres Ruiz e Hemleben, 1991; Baranek et al., 2000; Brown e Myers, 2000; Gwanama et al., 2000; Decker-Walters et al., 2002; Ferriol et al., 2003; Paris et al., 2003). È stata riportata anche variabilità a livello degli organelli (Wilson et al., 1992; Sanjur et al., 2002).

Sono state costruite due mappe di linkage di *Cucurbita* usando marcatori molecolari. Brown e Myers (2002) hanno usato 148 RAPD sulla progenie BC1 dell'incrocio tra *C. pepo* (straightneck) e *C. moschata* (Nigerian local). Questa mappa ha 28 gruppi di linkage e copre circa il 75% del genoma. Zraidi e Lelley (2007) hanno usato 247 RAPD 82 AFLP e 3 SSR sulla progenie F2 dell'incrocio tra pumpkin e zucchini, entrambi di *C. pepo*. la mappa ha 36 gruppi di linkage e copre circa 1,425cM. Le due mappe non possono essere comparate in quanto i RAPD sono marcatori specifici per popolazioni. La mappa di Zraidi e Lelley è stata arricchita nel 2008 con 178 SSR e 105 nuovi AFLP (Gong et al., 2008).

2. Scopo della Tesi

Lo svolgimento della presente tesi è stato volto al miglioramento genetico dello zucchini per caratteri di interesse agronomici quali caratteristiche morfologiche e di resistenza ai principali patogeni dell'area mediterranea.

In particolare, per raggiungere tali obiettivi è stata effettuata:

1. Una caratterizzazione morfologica di una collezione di varietà di zucchini
2. Una valutazione di alcuni genotipi per la resistenza a ZYMV, WMV, CMV e oidio
3. Una selezione per caratteri agronomici
4. Un'analisi molecolare sia per caratterizzare la variabilità genetica presente che per identificare marcatori eventualmente associati a caratteri di resistenza.

3. Materiali e metodi

3.1 Materiale vegetale

Sono state reperite 57 accessioni, delle quali 54 appartenenti a *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* e 3 alla subsp. *texana* (Tabella 2 e 3). Queste accessioni consistono di:

1. 10 cultivar a libera impollinazione, di derivazione italiana, 7 del morfotipo cocozelle, una del gruppo zucchini e due del gruppo pumpkin.
2. 3 accessioni gentilmente concesse dal Dott. H.S. Paris del Centro di Ricerca Newe Ya'ar, Ramat Yishay, Israele quali:
 - linea inbred della cultivar True French
 - linea 968Rb resistente all'oidio (Sf)
 - linea 381e resistente allo ZYMV. I tre geni complementari dominanti per la resistenza sono stati introgressi dalla specie portoghese *C. moschata* "Menina".

Le due accessioni 968Rb e 381e sono considerate linee isogeniche alla linea "True French" e sono state ottenute dopo sei generazioni di backcross con la selezione per resistenza ad ogni generazione.

3. 13 ibridi commerciali scelti da diverse ditte sementiere sulla base delle loro caratteristiche fenotipiche e di resistenza. Di questi 2 sono del gruppo cocozelle, 2 di vegetable marrow e 9 del gruppo zucchini.
4. 28 accessioni, la maggior parte di derivazione spagnola (Tabella 3) delle quali 7 sono del morfotipo cocozelle, 11 di vegetable marrow, 7 del morfotipo zucchini e 2 pumpkin. Tre accessioni appartenenti alla subsp. *texana*, sono del morfotipo acorn, scallop e crookneck.

Le accessioni descritte al punto 4 sono state fornite dalla banca del seme del Centro per la Conservazione e il Miglioramento Genetico della diversità agricola (COMAV) nell'Università Politecnica di Valencia (Spagna).

Tab. 2. Germoplasma utilizzato. Nella tabella è riportato il gruppo di appartenenza, il nome delle accessioni e il nome abbreviato (codice), le resistenze o tolleranze come indicate dalla ditta sementiera, e le rispettive fonti di reperimento.

<i>Gruppo</i>	<i>Accessione</i>	<i>Codice</i>	<i>Resistenza/ tolleranza</i>	<i>Ditta sementiera o referenza</i>
Cocozelle	GS2386 F1	CO-2386	PM, ZYMV	Syngenta
Cocozelle	Ortolana di Faenza	CO-ODF	--	La Semiorto Sementi
Cocozelle	Lungo Bianco	CO-LBS	--	La Semiorto Sementi
Cocozelle	San Pasquale	CO-SPQ	--	La Semiorto Sementi
Cocozelle	Alberello Sel. Valery	CO-VAL	--	La Semiorto Sementi
Cocozelle	Lungo Fiorentino	CO-LBS	--	La Semiorto Sementi
Cocozelle	Romanesco	CO-LBS	--	La Semiorto Sementi
Cocozelle	Bianca di Trieste	CO-LBS	--	La Semiorto Sementi
Cocozelle	Altea F1	CO-ALT	--	Syngenta
Vegetable Marrow	Carisma F1	VM-CAR	PM, ZYMV	Syngenta
Vegetable Marrow	Tonya F1	VM-TON	ZYMV	Syngenta
Zucchini	Afrodite F1	ZU-AFR	CMV, WMV, ZYMV	Syngenta
Zucchini	Giove F1	ZU-GIO	WMV, ZYMV	Petoseed
Zucchini	Mikonos F1	ZU-MIK	PM, CMV, WMV, ZYMV	Syngenta
Zucchini	Nano Verde di Milano	ZU-NVM	--	La Semiorto Sementi
Zucchini	Quine F1	ZU-QUI	PM, CMV, WMV, ZYMV	Syngenta
Zucchini	True French	ZU-TRF	--	Thompson & Morgan
Zucchini	Panter F1	ZU-PAN	PM, CMV, PRSV, ZYMV	Peotecseed
Zucchini	ZU1805 F1	ZU-1805	PM, CMV, WMV, ZYMV	Peotecseed
Zucchini	President F1	ZU-PRE	--	La Semiorto Sementi
Zucchini	Diamant F1	ZU-DIA	--	La Semiorto Sementi
Zucchini	Obsidian F1	ZU-OBS	PM, ZYMV	--
Zucchini	381e	ZU-381	ZYMV	Paris and Cohen, 2000
Zucchini	968Rb	ZU-968	PM	Cohen et al., 2003
Pumpkin	Tondo di Piacenza	PU-TOP	--	La Semiorto Sementi
Pumpkin	Tondo chiaro di Nizza	PU-TON	--	La Semiorto Sementi

PM= powdery mildew, ZYMV= zucchini yellow mosaic virus, CMV= cucumber mosaic virus, WMV= watermelon mosaic virus, PRSV = papaya ringspot virus.

Tab. 3. Germoplasma di derivazione spagnolo, includendo il gruppo di appartenenza, il nome delle accessioni (codice), e le rispettive origini.

<i>Gruppo</i>	<i>Codice</i>			<i>Origine</i>
Cocozelle	A	CU	2	Sarrión;Teruel
Cocozelle	AN	CU	75	Cabra;Córdoba
Cocozelle	C	CU	9	Torelló;Barcelona
Cocozelle	V	CU	74	Casas Altas.Rincón de Ademuz;Valencia
Cocozelle	V	CU	116	Giraba;Castellón
Cocozelle	V	CU	185	Cañada;Alicante
Cocozelle	PAS		15834	viver, castellon
Vegetable marrow	A	CU	12	Quicena, a 2 Km dirección N;Huesca
Vegetable marrow	AFR	CU	12	Khmelat
/	AN	CU	23	Ronda dirección Arriate;Málaga
Vegetable marrow	AN	CU	113	Beires;Almería
Vegetable marrow	CL	CU	19	Hontalbilla;Segovia
Vegetable marrow	CL	CU	21	Simancas;Valladolid
Vegetable marrow	CM	CU	32	Mariana;Cuenca
Vegetable marrow	CM	CU	47	Almodóvar del Campo;Ciudad Real
Vegetable marrow	V	CU	10	Utiel;Valencia
Vegetable marrow			949	Mondéjar;Guadalajara
Vegetable marrow	V	CU	21	La pobla de Benifasa, Castellon
Vegetable marrow	AN	CU	27/1	algeciras direccion el riconcillo cadiz
Zucchini	A	CU	13	Quicena, a 2 Km dirección N;Huesca
Zucchini	E	CU	27	Madrigal de la Vera;Cáceres
Zucchini	MU	CU	16	Ñorica.Totana;Murcia
Zucchini	MU	CU	20	Altobordo.Lorca;Murcia
Zucchini	BBC6			/
Zucchini	E	CU	10	Garganta de la olla a 2Km direccion N; Caceres
Zucchini	ECU		227	La Esperanza, Ecuador
Pumpkin	PJI		71628	Ordu, Turquia
Pumpkin	Styrian			Mexico
Acorn	BGU		8238	Iowa, USA
Crookneck	NSL		5227	California, USA
Scallop	V	CU	196	Valencia

Le piante reperite in Italia sono state trapiantate in campo a Lavorate di Sarno ad una distanza tra fila di 1 metro e su fila di 0,70 metri. Le accessioni di derivazione spagnola sono state trapiantate in vaso nelle serre del Politecnico di Valencia. Le diverse accessione sono state allevate fino a maturità al fine di verificare la loro identità, soprattutto per quanto riguarda la forma del frutto così da permettere l'assegnazione ad un preciso gruppo.

La caratterizzazione morfologica per ogni accessione è stata effettuata usando i descrittori fenotipici riportati dalle schede del CPVO (Community Plant Variety Office) linea guida TP/119/1 del 25/03/2004. Tra gli 81 caratteri riportati dalla scheda sono stati scelti i 6 caratteri, stabili

indipendentemente dal luogo di coltivazione, importanti per gli agricoltori e consumatori quali: portamento, presenza o assenza di ramificazioni, incisioni fogliari, presenza o assenza di macchie argentee sulle foglie, colore e forma del frutto.

3.2 Saggi di resistenza in vivo

Per valutare l'effettiva tolleranza/resistenza sono stati effettuati sulle diverse linee di zucchini dei saggi di resistenza all'oidio e ai virus ZYMV, WMV e CMV. I test sono stati condotti in collaborazione con il Prof. Crescenzi dell'Università della Basilicata.

Per il test dell'oidio, è stato utilizzato solo uno dei due funghi responsabili della malattia, *Erysiphe chichoracearum*. L'inoculo è stato preparato lavando al momento foglie infette in una soluzione fisiologica (NaCl 0,90%) e poi spruzzato direttamente sulle piante in maniera uniforme (figura 3). Il test è stato eseguito su piante in uno stadio avanzato di crescita (circa 1 mese dalla semina) che rappresenta lo stadio ottimale (Figura 4).



Fig. 3. Lavaggio delle foglie infette da oidio



Fig. 4. Piante inoculate con oidio

Sono stati eseguiti due rilievi visivi dopo 7 e 18 giorni dall'inoculazione considerando la percentuale di superficie fogliare coperta da feltro fungino. Sono state stabilite 5 range di percentuali: da 1 a 10%; da 11 a 25%; da 26 a 50%; 75% e da 76 a 100%.

Per quanto riguarda i test virali, sono stati utilizzati isolati ceppi locali di ZYMV, WMV e CMV. Le piantine sono state inoculate in fase cotiledonare. Per la preparazione dell'inoculo 1g di foglie virosate sono state macinate in 10 ml di tampone (fosfato 0,1M+ beta-mercaptoetanolo 0,1% pH7,2) in ghiaccio. La soluzione è stata poi strofinata su entrambi i cotiledoni precedentemente trattati con una polvere abrasiva di celite (Figura 5). Successivamente è stato effettuato un lavaggio con H₂O per eliminare l'eccesso di inoculo. È stato eseguito il saggio sierologico ELISA (Kit diagnostico Loewe) per tutte le piante.



Fig. 5. Procedura dell'infezione virale dei cotiledoni di zuccino

Nel caso dello ZYMV e WMV sono stati eseguiti i rilievi visivi dopo 5 e 16 giorni dall'inoculazione mentre nel caso del CMV dopo 11 e 26 giorni. È stata stabilita una scala di valutazione dei sintomi: 0=immune; 1=assenza di sintomi; 2=sintomi leggeri; 3=sintomi medi; 4=sintomi forti.

L'analisi per resistenza allo ZYMV della progenie segregante F2 ottenuta dall'incrocio tra ZU-TRF e ZU-381 è stata effettuata in collaborazione con la Dott.ssa Tomassoli del Centro di ricerca per la Patologia vegetale (CRA-PAV) a Roma. L'isolato dello ZYMV utilizzato per la prova è stato isolato da una pianta naturalmente infetta proveniente da una coltivazione di campo del 2009. Ogni singola pianta, contrassegnata con un numero identificativo, è stata inoculata con succo grezzo estratto, alla diluizione 1:5 in tampone fosfato pH 7.2 0.1 M, da foglie di piante di zuccino artificialmente infettate. Ogni cotiledone, cosparso di polvere abrasiva di celite, è stato inoculato con 50 µl di succo e, successivamente, lavato con acqua distillata. A partire da 7 giorni dopo l'inoculo, sono stati effettuati i controlli per la comparsa dei sintomi sulle foglie vere di tutte le piante F2 e dei due parentali, utilizzati come controllo. L'andamento dell'infezione è stata monitorata fino allo sviluppo della 6-7a foglia vera. È stato eseguito il saggio sierologico ELISA (Kit diagnostico Loewe) per tutte le piante a 18-20 gg. dall'inoculo utilizzando una sola foglia vera (2a o 3a) per pianta.

3.3 Schema di selezione per l'ottenimento di linee pure

Lo schema di selezione ha previsto nel primo anno il trapianto in campo a Lavorate di Sarno di circa 20 piante per ciascuno dei 13 ibridi reperiti. Si è proceduto all'autofecondazione manuale di alcune piante scelte a random per ciascun ibrido. In particolare, la procedura ha previsto la chiusura il giorno prima dell'antesi, dei fiori maschili e femminili con delle pinze. Il giorno successivo è stata effettuata l'autofecondazione ponendo il polline del fiore maschile su tutte le parti dello stigma del fiore femminile. Una volta effettuata l'impollinazione, i fiori femminili sono stati nuovamente chiusi con pinze o isolati con cappucci di tessuto non tessuto.

Nel secondo anno sono state trapiantate circa 25-40 piante per ciascuna delle 13 progenie F2. Ogni progenie F2 è stata ottenuta mescolando il seme dei diversi frutti ottenuti da ogni singola pianta F1 autofecondata. All'interno delle diverse progenie segreganti F2 è stata effettuata una caratterizzazione sulla base dei caratteri riportati dalle schede del CPVO e si è proceduto alla selezione e all'autofecondazione delle migliori. Nel terzo anno sono state trapiantate 40 fila F3 di 15-20 piante ciascuna. Ogni fila è derivata da una pianta F2 selezionata. Le 40 progenie-fila sono state valutate per omogeneità e caratteri agronomici secondo le schede. Si è proceduto ad ulteriori autofecondazioni delle piante migliori per stabilizzare ulteriormente i caratteri di interesse e ottenere progenie F4.

In tutti i casi, per ottenere semi maturi i frutti non dovrebbero essere raccolti prima delle 8 settimane dall'autofecondazione o incrocio mantenendo le piante in condizioni ottimali. Purtroppo può accadere che le piante che portano i frutti muoiono prima delle 8 settimane. In questo caso se il frutto raccolto è integro lo si dovrebbe conservare per almeno un mese prima di aprire per l'estrazione dei semi. L'estrazione dei semi prevede un lavaggio in H₂O dei semi per eliminare i residui di placenta. I semi sono stati posti in capsule petri per asciugare e successivamente conservati.

La stessa procedura di impollinazione manuale è stata eseguita anche per effettuare incroci controllati tra diverse varietà di zucchini.

3.4 Analisi molecolare

3.4.1 Estrazione di DNA

Il DNA è stato isolato da giovani foglie usando il metodo di Fulton et al., (1995). Ogni accessione è rappresentata da un bulk derivato da tre piante. Il DNA è stato quantificato su gel di agarosio (1%) e conservato a -20°C per l'analisi.

DNA è stato quantizzato e conservato a -20°C.

3.4.2 Analisi AFLP

L'analisi AFLP è stata effettuata usando il metodo di Vos et al. (1995) e il Kit commerciale (AFLP analysis System I, Gibco-BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) che utilizza gli enzimi di restrizione *Eco* RI e *Mse* I. Per l'amplificazione selettiva, sono state utilizzate 4 combinazioni di primer che hanno tre nucleotidi selettivi al 3' (E-AGC + M-CAG; E-AGC + M-CAC; E-ACT + M-CAT; E-ACT + M-CAC). I frammenti AFLP sono stati separati mediante elettroforesi capillare. Ogni campione è stato preparato per la corsa con 10 µl di formamide, 0.2 µl di Rox500 e 1 µl di PCR selettiva e successivamente denaturato a 94°C per 5 min. I diversi profili AFLP sono stati confrontati e i polimorfismi sono stati designati con 1 (presenza del frammento) o con 0 (assenza dei frammenti). La similarità genetica tra le diverse accessioni è stata ottenuta usando il coefficiente simple matching (Sokal and Michener, 1958). La distanza genetica di Nei (Nei e Li, 1979) è stata calcolata per 100 matrici usando il software Phyltools 1.32 (Buntjer, 2000). Successivamente, è stato costruito un albero filogenetico con neighbour-joining usando il programma PHYLIP 3.62 (Felsenstein, 1993). Un albero filogenetico è stato ottenuto anche con UPGMA usando il programma NTSYS-pc (Rohlf, 1998).

3.4.3 Analisi RAPD

3.4.3.1 Amplificazione

Per l'analisi dei polimorfismi sono stati utilizzati 7 primer la cui sequenza è riportata in Tabella 4 (Operon Technology). Le condizioni di PCR sono descritte da Stift et al. (2003). Le amplificazioni sono state ottenute usando un termociclatore con il seguente ciclo: una denaturazione iniziale a 94°C per 60 secondi seguita da 34 cicli a 94°C per 60 secondi, 36°C per 45 secondi, 72°C per 30 secondi, finendo con un'estensione finale di 5 minuti a 72°C. I frammenti sono stati separati su gel di agarosio 1,5% in 1 x TBE e visualizzati con bromuro di etidio. Le bande che differiscono tra le diverse accessioni sono state considerate polimorfiche. I profili per ciascuna accessione sono stati ottenuti ponendo 0 o 1 per l'assenza o la presenza dei frammenti, rispettivamente.

Tab. 4. Primer RAPD con relativa sequenza

Primer	sequenza
OPAA17	GAGCCCGACT
OPG02	GGCACTGAGG
OPK15	CTCCTGCCAA
OPN20	GGTGCTCCGT
OPV20	CAGCATGGTC
OPAJ03	AGCACCTCGT
OPM03	GGGGGATGAG

3.4.3.2 Clonaggio e disegno di primer

I frammenti polimorfici ottenuti con i primer RAPD sono stati tagliati dal gel e purificati mediante kit della Promega (PCPclean UP Sistem) e controllati su gel di agarosio (1%). Per il clonaggio è stato utilizzato il Kit pJEM-T Easy Vectors (Promega) con un rapporto di 3:1 tra inserto e vettore. Le colonie trasformate sono state cresciute e selezionate su LB (10g/l di triptone, 5g/l di estratto di lievito, 10g/l di NaCl, 15g/l agar, pH7.0) con 100µg/ml di ampicillina. Per la determinazione delle colonie trasformate è stata utilizzata la valutazione bianca/blu tramite X-Gal. Le colonie bianche sono state cresciute in mezzo liquido e quindi è stato estratto il plasmide con il Kit High Pure Plasmid Isolation della Roche. I plasmidi sono stati sequenziati tramite reazione con BigDye (AppliedBiosistem) con entrambi i primer SP6 e T7. L'allineamento delle sequenze è stato effettuato con l'ausilio del software Bioedit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). I primer SCARZJ03 (Tabella 5) sono stati disegnati con l'ausilio del software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Le caratteristiche dei primer hanno soddisfatto specifici parametri tra cui la percentuale di GC superiore al 45%, la lunghezza di 20-25 nucleotidi e la massima riduzione di complementarietà tra i due primer.

Le amplificazioni sono state ottenute usando un termocicizzatore con il seguente ciclo: una denaturazione iniziale a 94°C per 2 minuti seguita da 30 cicli a 94°C per 45 secondi, 52°C per 30 secondi, 72°C per 30 secondi, finendo con un'estensione finale di 5 minuti a 72°C. I frammenti sono stati corsi su gel di agarosio 1,5% in 1 x TBE e visualizzati con bromuro di etidio. La mappa di restrizione è stata ottenuta con l'aiuto del software NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). I primer SCARZJ03-2 (Tabella 5) sono stati disegnati in modo che il forward e il revers presentano 10 basi del primer RAPD più rispettivamente 10 e 13

basi adiacenti sulla sequenza. Le amplificazioni sono state ottenute con lo stesso ciclo utilizzato per l'analisi RAPD.

Tab. 5. Primer SCAR con relativa sequenza

Primer	Forward	Reverse
SCARZJ03	TGAAATCCAACAATCCTTCC	CCCGAGGAATATGAACTTGA
SCARZJ03-2	AGCACCTCGTCATCTTGATG	AGCACCTCGTATCCTATAAATGC

3.4.4 Analisi SSR

Questo studio è stato condotto nel laboratorio di miglioramento genetico delle Cucurbitaceae del COMAV guidato dalla Dott.ssa Belen Pico.

3.4.4.1 Estrazione di DNA

Il DNA è stato isolato da giovani foglie usando il metodo CTAB modificato. Per ogni accessione, 0.5g di tessuto fogliare derivato da un bulk di 5 piante è stato macinato in azoto liquido e sospeso in 0.7ml di buffer di estrazione (20 mM di EDTA, 0.1 M di Tris-HCl, 1.4 M di NaCl, 2% di CTAB, pH8). La sospensione è stata incubata a 60°C per 30 min seguita dall'estrazione con cloroformio-alcol isoamilico (24:1) e precipitato con etanolo assoluto a -20°C. Il pellet formato è stato centrifugato a 13.00 rpm per 5 min e lavato con etanolo al 70%. Il DNA è stato poi sospeso in TE (10 mM di Tris, 1 mM di EDTA, pH8).

3.4.4.2 Selezione e disegno dei primer

Sono stati selezionati in letteratura 30 primer per gli SSR genomici (Gong et al., 2008) e sono stati disegnati 30 primer per SSR in EST con l'ausilio del software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Le caratteristiche dei primer hanno soddisfatto specifici parametri tra cui la lunghezza del frammento amplificato di 150-200 bp, la percentuale di GC superiore al 45%, la lunghezza di 20-25 nucleotidi e la massima riduzione di complementarietà tra i due primer. I primer forward sono stati sintetizzati con una coda M13 al 5' (CACGACGTTGTAACGACC). Le sequenze sono riportate in Tabella 6 e 7.

3.4.4.3 Amplificazione e analisi

La miscela, per le reazioni di amplificazione, è stata preparata utilizzando 50 ng di DNA, 10mM di dNTP, 5U di Taq, 1x di Buffer, 10 mM di MgCl₂, 10 µM di primer forward, 10 µM di primer revers e 1 µM di primer M13 marcato (FAM, VIC, PET, NED, IR700, IR800) in un totale di 15 µl di reazione. Le condizioni del ciclo di PCR sono riportate da Gong et al., 2008.

Per l'analisi sono stati utilizzati due tipi di strumentazione: Li-cor model 4300 DNA Analyzer utilizzando un gel di acrilammide al 6% (acrilamide 40X, TBE 10X, urea, APS 10%, TEMED). Ogni campione è stato preparato per la corsa con il Li-cor con 10 µl di LB licor, 1 µl di PCR (IR700), 1 µl di PCR (IR800) e portato ad un volume di 20µl con H₂O e successivamente denaturato a 94°C per 5 min. Ogni campione è stato preparato per l'ABI PRISM con 12 µl di formamide, 1 µl di PCR (FAM), 1 µl di PCR (VIC) 1 µl di PCR (PET), 1 µl di PCR (NED) e 0.5 µl di Liz e successivamente denaturato a 94°C per 5 min.

I diversi profili SSR sono stati confrontati e i polimorfismi sono stati designati con 1 (presenza del frammento) o con 0 (assenza dei frammenti). La distanza genetica di Nei (Nei e Li, 1979) è stata calcolata per 1000 matrici usando il software Phyltools 1.32 (Buntjer, 2000). Successivamente, è stato costruito un albero filogenetico con neighbour-joining usando il programma PHYLIP 3.62 (Felsenstein, 1993).

Il "Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) è stato utilizzato per analizzare e confrontare le diverse sequenze nucleotidiche contro il database di sequenze nucleotidiche note. BLATX è stato utilizzato per identificare la funzione della proteina codificata.

Tab. 6. Primer SSR genomici con relativa sequenza

Primer	Forward	Reverse
CMTp193	GGTGACGGCAAGAAAAGCTA	GCTGACCCTCTCTCCCTCTC
CMTp98	GCAGAGGAGAAGTGGGTTTG	CTTTATCCGACCAAGCGTTC
CMTp131	GCACTTGAATCTTCGTCAAC	CGAGAAAGAATTAACGAGCA
CMTp187	AACAATCCTCGCCTCAAATC	ATGAAAATGGGAAGCCAGAG
CMTp63	CTTCGTCGACACCAATTCC	GAAGACGAAGATGACGTGGA
CMTp88	ACCTACCGTCACACCCACAT	CCACCTGAAAACAGGGCTAA
CMTp235	ATGATGGAGTCCCAGTCGAG	ACCCACACACCCTCTCCTC
CMTp256	CTGTTCTAGCCGATGTCTG	TGGACTTCATGCATATTGTGTG
CMTp224	CACCGACGACTCCATCATC	CTTCTTGTCCCCAAAATCACA
CMTp248	GATCGAATTGGGGCTTCTT	CCTCCGTACATCCCCAGA
CMTp142	TCAACCAAGTGCCAATCTCA	ACTGATCCACCGACTGATACG
CMTp257	CACGAAGATTTGATGGCCTTA	GGATTGGGATGGTGAAGATG
CMTp58	TCGAGAACTCGACTCTCC	TCCCAGCACCATCAGGATAC
CMTp145	ACAGCCCCATTTCTTACCG	TCAAGAACTGAGGGGATTGG

CMTp66	ACGACATGAGGGAAGATTTCG	TTCAATGCCATTTCGCCTAC
CMTp260	CCCTAGACCCATCATAGTCG	ACATTTGGTTACTTCCCCATT
CMTp245	AGGTAAGTGCACCCAGCTA	CCCATCTCTCAAGCTCATCC
CMTp36	GAAGTGCCGTGGCTGAGAG	TTCAGCTTCCCGGATTATGG
CMTp69	ATACTTGCTCCCCAAGTTTA	AAATAAAAAGACAACGTAATGGT
CMTp176	CCTGGACTTCCACATCAGTT	ACTACGTGTCTCTGCAGGAAG
CMTp33	AATGCGTTTGAACAAAGCTG	GGCTGTAAAATTTCTCTCGATT
CMTp86	GCTCTTGACAAAGAATGGTCA	ATGGCTTCTGGTGGTTTGTCT
CMTp169	TGCAGTGAATGGAAACCTGT	TCCGGCATTATAATCAGAACC
CMTp231	TCTGGTCTTGGGGTGGTTCT	AGAAACAAAGTGGCGGGTGT
CMTp208	CGTGAACATTCGTTTGTGG	TCATCCGTTTCTTTTTCAGC
CMTp209	TCACTTTACAACCAGAAGCTGA	CACTTTGCTGCTCATCCAC
CMTp183	CAGGCTATTCGCACCCTCTA	CCTCATGCATTTTGCCTGTA
CMTp188	CCGAAGGTTAGCAGACCCTTA	AAGGACCTCATGCATTTTGC
CMTp132	CCATTTCCATTTCCATTTCA	AGGTTAGAAAACAGGGGGAATC
CMTp47	AAACGGTTGAGGAGGATGAC	AGGTCATTTGGCGTGATAACT

Tab. 7. Primer SSR-EST con relativa sequenza

Primer	Forward	Reverse
CUTC004307	GAACCTCGTTGCTGGTTCTTCT	TCTAGCATCTTACGCACGCTTC
CUTC002749	GTGGGCTAAGTTCAAATCGTTC	GAACCCAATCTTCTCATTTCCA
CUTC005739	CTTCTCTACCGACCCTCCTAC	CTCAAGAGTTCCAACCTGAACC
CUTC020992	GCCGGTGATTCTGGATGAAGTA	CAGGTAGAAGGTGGGGAGATGG
CUTC008357	GACACTCACGAGCAAAATGACC	CGTGTGGAGCTTTCTCACAAC
CUTC046645	CCCTCGGTAGCAATTTTGTAGT	TTTGGTGGGAGTGATACTGATG
CUTC001906	GGAGGAGGGATAGAGAGAGAAACA	ACGATTTCTTCAGCCCTCAAAG
CUTC015525	CCCATTCTCTCCAGCACTCTTT	AGGGAGGGAGATGTGAGAGTTG
CUTC006209	CGAATTTCTCCGAAAAGAAACC	CCTCGATCAATCCTCCTACACC
CUTC006891	CGAGTACGTTTACAACCATCCA	CAACTCTCAACAAGAACCCAAG
CUTC011336	AGCACTGGGTTAACAGAGGAAA	ATGATACAGTAATCGGCGTCTT
CUTC017708	TGTGATTTGTTGGGCTCTCTGT	ACATGGAAATCCACCTCTTCGT
CUTC005800	ATCCCAGGTCCCAATTTTCTTC	CCATACCTGAGGGACCTGAAAC
CUTC007942	TCTTCTCGGAGTTTGTATGCCA	TTTACCCTCATCGGAACCTCAT
CUTC022867	TTGGACAATCTGAGGAAGTTGG	AAGGTTTGTCTTTCGACAAGGT
CUTC010796	CTAATCAGGCTGGCCAAGAAGA	CGACGTTACCGACAAGATTTCC
CUTC008409	GCAGCACACTCGATTCCCTCTTT	TAGGAAAAATGGCGGTGAAGAA
CUTC004991	TGGAGGTATCCTTCCGTATGTT	CATACGGGAGTTTCGTTTTTCT
CUTC009607	CAAAACTGCCCATGACCACTAC	CTTTCTACCCCAACCCACAT
CUTC004158	CAAGCCTTTACCAAAACCAAAC	ACGATCTTCTCCTCCTCTTCT
CUTC004399	TGTCAAATTCGCTTCCATCATC	ACGACTGTGAGAACGGTGAAAA
CUTC004782	TGGAATCCAGAGACTGATGAAG	CACGATTCCGATAACAACAAGA
CUTC008659	AGACTTTGGGTTTGTAGGAAGG	GCTAAGCATTGTTAGGGCTTCT
CUTC006703	CGACTACAGCTCAACAAAGACC	GAAGTCTATTACGCCAATTCC
CUTC018879	TCCACACCAGTGGTTCTTTCGT	TTTACCATCCGGACAATCATC

CUTC012342	CCTCTTACCTTCGTCGTCTGT	GCTGCAATTTTCCCCTTCTCT
CUTC009316	CACGAGGAAGGAAGAATCGAAG	GAAATGCAAGACCTCAAGCAGA
CUTC009760	GACGAATACTTTCGCAATCAAG	CATGTGGAAGTTGTTGTTGTTG
CUTC008419	TCGCATTTGTAAATCCCCTCT	ATGCTTTCGAGGGATAAATGGA
CUTC023363	TATGGTGGGTGGGTCTTTCAGT	GGAGTGTGCTTGATTGGGTTTC

4. Risultati

4.1. Caratterizzazione morfologica di collezioni di germoplasma di zucchini

Al fine di ottenere genotipi di zucchini con caratteri migliorati, la prima fase della mia tesi di dottorato ha previsto l'identificazione e il reperimento di genotipi dalla quale derivare linee pure. Sono state raccolte 13 varietà a libera impollinazione, compreso una varietà locale campana denominata "San Pasquale", 7 appartenenti al gruppo delle cocozelle, 2 al gruppo pumpkin e 4 al gruppo degli zucchini che comprendono due accessioni considerate linee isogeniche alla cultivar "True French", ottenute attraverso circa 6 generazioni di backcross con la selezione per la resistenza ad ogni generazione, una è l'accessione denominata ZU-381, resistente allo ZYMV (Paris e Cohen, 2000), e l'altra, designata ZU-968, è resistente al PM (Sf) (Cohen et al., 2003) e 13 ibridi commerciali ottenuti da diverse ditte sementiere. L'elenco del germoplasma è riportato nella Tabella 2.

A maturazione sono stati valutati un numero di caratteri morfologici importanti per agricoltori e consumatori utilizzando alcuni descrittori riportati dalle schede CPVO.

La maggior parte ha mostrato il portamento a cespuglio con internodi corti che facilita la gestione dei campi e la raccolta. Circa il 70% ha mostrato la mancanza di ramificazioni. Questo carattere è molto importante perché rende la raccolta dei frutti più veloce. Molte accessioni analizzate hanno mostrato foglie con medie o deboli incisioni e presenza di chiazze argentee. Per la forma e il colore del frutto, hanno predominato la forma cilindrica e il colore verde (Tabella 8).

I genotipi che hanno evidenziato i caratteri più interessanti per il mercato sono stati selezionati per iniziare un programma di miglioramento genetico.

Tab. 8. Scheda di valutazione del germoplasma reperito

<i>Codice</i>	<i>Pianta</i>		<i>Lembo fogliare</i>		<i>Frutto</i>	
	<i>Accresc.</i>	<i>Ramif.</i>	<i>Inci.</i>	<i>chiazze</i>	<i>forma</i>	<i>colore</i>
CO-2386	cespuglio	assenti	medie	assenti-presenti	cilindrica	verde
CO-ODF	cespuglio	assenti	profonde	presenti	cilindrica	verde
CO-LBS	cespuglio	presenti	medie-profonde	assenti-presenti	cilindrica	crema
CO-SPQ	cespuglio	assenti-presenti	profonde	presenti	cilindrica	verde
CO-VAL	strisciante	assenti	profonde a molto profonde	presenti	cilindrica	verde
CO-LUF	cespuglio	assenti	medie	assenti-presenti	cilindrica	verde
CO-ROM	semi strisciante	presenti	medie	assenti-presenti	cilindrica	verde
CO-BDT	semi strisciante	assenti-presenti	medie	assenti	cilindrica	crema
CO-ALT	cespuglio	assenti	profonde	presenti	cilindrica	verde
VM-CAR	cespuglio	presenti	medie	presenti	clavata	crema
VM-TON	cespuglio	presenti	profonde	presenti	clavata	verde
ZU-AFR	cespuglio	assenti	medie	presenti	cilindrica	verde
ZU-GIO	cespuglio	presenti	profonde	presenti	clavata	verde
ZU-MIK	cespuglio	assenti	superficiali	presenti	cilindrica	verde
ZU-NVM	cespuglio	assenti	medie	presenti	cilindrica	verde
ZU-QUI	cespuglio	assenti	superficiali-medie	presenti	cilindrica	verde
ZU-TRF	cespuglio	assenti	profonde	assenti-presenti	cilindrica	verde
ZU-PAN	cespuglio	assenti	molto profonde	presenti	cilindrica	verde
ZU-1805	cespuglio	assenti	medie-profonde	presenti	cilindrica	verde
ZU-DIA	cespuglio	assenti	profonde	presenti	cilindrica	verde
ZU-PRE	cespuglio	assenti	profonde	presenti	cilindrica	verde
ZU-OBS	cespuglio	assenti	profonde	presenti	cilindrica	verde
ZU-381	cespuglio	assenti	profonde	assenti	cilindrica	verde
ZU-968	cespuglio	assenti	profonde	assenti	cilindrica	verde
PU-TOP	cespuglio	presenti	superficiali	assenti	tonda	verde
PU-TON	semi strisciante	presenti	medie	assenti	tonda	verde

Per lo studio della variabilità genetica nel genere *Cucurbita*, alla caratterizzazione della precedente collezione, sono state caratterizzate presso il COMAV di Valencia circa 27 delle 31 accessioni di zucchini della collezione spagnola (Tabella 3). La caratterizzazione morfologica ha permesso di raggruppare le accessioni nei diversi gruppi in accordo al loro morfotipo. Esse appartengono ai gruppi pumpkin, zucchini, cocozelle, vegetable marrow, acorn, crookneck e scallop. I primi 4 gruppi sono di *C. pepo* subsp. *pepo* e i restanti della subsp. *texana*.

Tab. 9. Scheda di valutazione delle 27 accessioni spagnole

<i>Codice</i>	<i>Pianta</i>		<i>Lembo fogliare</i>		<i>Frutto</i>	
	<i>Accresc.</i>	<i>Ramif.</i>	<i>Inci.</i>	<i>chiazze</i>	<i>forma</i>	<i>colore</i>
CL-CU21	semistrisciante	presenti	superficiali	assenti	cilindrica larga	crema
E-CU-27	cespuglio	assenti	profonde	presenti	cilindrica	verde
V-CU-10	semistrisciante	presenti	superficiali	presenti	clavata	verde
MU-CU-16	cespuglio	assenti	medie	presenti	cilindrica	verde
V-CU-74	strisciante	presente	superficiali	presenti	cilindrica	verde
CM-CU-47	semistrisciante	presenti	superficiali a medie	assenti/presenti	clavata	verde
949	strisciante	presenti	superficiali	presenti	clavata	crema
A-CU-13	semistrisciante/strisciante	assenti/presenti	medie	presenti	cilindrica	crema
CL-CU-19	strisciante	presenti	medie	assenti/presenti	clavata	verde
AN-CU-113	semistrisciante/strisciante	presenti	medie	presenti	clavata	verde
AN-CU-23	semistrisciante	presenti	superficiali a medie	assenti/presenti	/	/
A-CU-2	semistrisciante	presenti	medie	presenti	cilindrica	crema
AFR-CU-12	semistrisciante	presenti	profonde	presenti	clavata	verde
AN-CU-75	strisciante	presenti	superficiali	presenti	cilindrica	crema
V-CU-185	cespuglio	assenti	medie	presenti	cilindrica	verde
A-CU-12	semistrisciante/strisciante	presenti	medie	presenti	clavata	verde
C-CU-9	semistrisciante/strisciante	presenti	medie	presenti	cilindrica	verde
MU-CU-20	semistrisciante/strisciante	presenti	medie	presenti	cilindrica	verde
V-CU-116	strisciante	presenti	superficiali	presenti	cilindrica	verde-crema
CM-CU-32	strisciante	presenti	medie	presenti	cilindrica larga	crema
PAS-15834	semistrisciante	presenti	medie	presenti	cilindrica	verde-crema
ECU-227	cespuglio	presenti	medie	assenti	cilindrica	verde
E-CU-10	cespuglio/semistrisciante	presenti	medie	presenti	cilindrica	verde
AN-CU-27/1	semistrisciante	presenti	medie	presenti	clavata	verde-crema
Styrian	cespuglio/strisciante	presenti	profonde	assenti	a forma di disco-tonda	/
PJI71628	strisciante	presenti	profonde	assenti	a forma di disco-trottola	/
V-CU196	semistrisciante	presenti	superficiali	assenti	ellittica trasv.larga	verde chiaro

Come si può osservare dalla Tabella 9 la maggior parte ha mostrato portamento strisciante con ramificazioni. Le foglie presentano prevalentemente incisioni medie con chiazze argentee. Il colore e la forma del frutto sono state variabili. Sono state identificate varietà commerciali appartenenti al gruppo zucchini come E-CU-27 e MU-CU-16 con un portamento eretto, senza spine e ramificazioni e varietà come E-CU-10, ECU-227, MU-CU-20 e A-CU-13 con caratteristiche poco favorevoli quali presenza di spine e ramificazioni ed un portamento da semistrisciante a strisciante. Inoltre vanno a fiore più tardivamente con i fiori femminili meno abbondanti. Tutte le accessioni afferenti al gruppo di vegetable marrow (V-CU-10, CM-CU-47, 949, CL-CU-19, AN-CU-113, CM-CU-32, A-CU-12, AFR-CU-12 e CL-CU-21) mostrano un portamento semi a strisciante, molte spine e ramificazioni e AN-CU-27 ha mostrato variabilità anche nel colore del frutto da verde a crema. Le cultivar V-CU-185, V-CU-74, A-CU-2, PAS-15834, AN-CU-75, V-CU-116 e C-CU-9 che hanno mostrato un portamento eretto, semi-strisciante o strisciante e con o senza ramificazioni sono state identificate come cocozelle. V-CU-185 è la sola varietà spagnola del gruppo cocozelle ad avere un portamento eretto senza ramificazioni. Appartengono al gruppo pumpkin PJI71628 e Styrian.

4.2 Valutazione per resistenza a malattie

Durante la coltivazione è stata effettuata una prima valutazione dell'incidenza delle diverse malattie sulle cultivar raccolte in Italia, in condizione di infezione naturale. Alcune delle accessioni con dichiarata tolleranza/resistenza non hanno mostrato manifestazioni di attacchi virali, quali ZU-QUI, ZU-MIK e ZU-OBS. Anche le linee isogeniche resistenti non hanno mostrato manifestazioni di attacchi a differenza della linea suscettibile.

Successivamente per valutare l'effettiva tolleranza/resistenza di alcune accessioni, sono stati effettuati saggi di resistenza all'oidio e ai virus ZYMV e WMV.

Per il test dell'oidio, è stato utilizzato solo uno dei due funghi responsabili della malattia, *Erisyphe chicoracearum* eseguendo due rilievi visivi dopo l'inoculazione (Tabella 10).

Tab. 10. Risultati del test a *Erisyphe chicoracearum*

<i>Codice</i>	<i>N° piante testate</i>	<i>I rilievo^a 7gg</i>	<i>II rilievo^a 18gg</i>	<i>^a Percentuale di superficie fogliare coperta da feltro fungino</i>
CO-SPQ	5	76-100	100	76-100
ZU-GIO	5	76-100	100	75
CO-2386	5	100	100	26-50
VM-TON	5	76-100	100	11-25
ZU-NVM	5	26-50	100	1-10
CO-LBS	5	76-100	100	
ZU-QUI	5	76-100	100	
ZU-MIK	5	76-100	100	
ZU-PRE	5	26-50	100	
CO-ALT	2	51-75	100	
VM-CAR	5	51-75	100	
ZU-968	3	0	100	
ZU-OBS	5	26-50	100	
ZU-AFR	4	26-50	100	
ZU-PAN	4	26-50	100	
ZU-1805	5	26-50	100	

Sulla base della percentuale di superficie fogliare coperta da feltro fungino al primo rilievo è stato osservato che il feltro fungino aveva colonizzato la superficie fogliare con una percentuale variabile dal 26% al 100% tranne per la linea isogenica ZU-968 mentre al 18 giorno tutte le piante presentavano il 100% della superficie fogliare coperta da oidio anche per cultivar commerciali per la quale la tolleranza/resistenza ad *Erisyphe chicoracearum* è indicata da catalogo.

Per quanto riguarda i saggi virali, sono stati utilizzati isolati locali di ZYMV, WMV-2 e CMV eseguendo sia i rilievi visivi che saggi immunologici (Tabella 11).

Tab. 11. Risultati del test allo ZYMV

<i>Codice</i>	<i>N° piante testate</i>	<i>I rilievo^a 5gg</i>	<i>II rilievo^a 15gg</i>	<i>E.L.I.S.A 15gg</i>	<i>^aScala di valutazione dei sintomi</i>
CO-SPQ	6+1 controllo	3	4	6/7	0= Immune
ZU-GIO	5+1	2	4	5/6	1= Assenza di sintomi
CO-2386	14+1	2	3	14/15	2= Sintomi leggeri
VM-TON	10+1	4	4	10/11	3= Sintomi medi
ZU-NVM	13+1	3	4	13/14	4= Sintomi forti
CO-LBS	10+1	3	4	10/11	
ZU-QUI	11+1	1	1	11/12	
ZU-MIK	6+1	3	2	6/7	
ZU-PRE	16+1	4	4	16/17	
CO-ALT	3+1	3	4	3/4	
VM-CAR	5+1	2	4	5/6	
ZU-OBS	9+1	3	4	9/10	
ZU-AFR	1+1	2	2	1/2	
ZU-PAN	2+1	3	4	2/3	
ZU-1805	2+1	2	4	2/3	

Come si può osservare dalla Tabella 11 la maggior parte dei genotipi testati ha mostrato sintomi medio-alti quando inoculati con ZYMV. La linea ZU-QUI dall'esame visivo non ha presentato sintomi anche se il test ELISA è risultato positivo, indicando una tolleranza delle piante e la linea ZU-MIK ha mostrato solo sintomi leggeri confermando la tolleranza riportata al virus. Per alcune linee sono state testate solo poche piante perché morte durante l'esecuzione dei test, di conseguenza il risultato del test non è stato considerato attendibile. La linea ZU-381 resistente allo ZYMV non è stata testata per insufficienza di semi.

Anche per il WMV sono stati eseguiti due rilievi visivi (Tabella 12).

Tab. 12. Risultati del test al WMV

<i>Codice</i>	<i>N° piante testate</i>	<i>I rilievo^a</i>	<i>II rilievo^a</i>	<i>E.L.I.S.A</i>
		<i>5gg</i>	<i>15gg</i>	<i>15gg</i>
CO-SPQ	6+1 controllo	1	2	6/7
ZU-GIO	3+1	1	4	3/4
CO-2386	14+1	1	3	14/15
VM-TON	10+1	1	2	10/11
ZU-NVM	13+1	1	3	13/14
CO-LBS	10+1	1	3	10/11
ZU-QUI	11+1	1	2	11/12
ZU-MIK	6+1	1	3	6/7
ZU-PRE	16+1	1	4	16/17
CO-ALT	3+1	1	4	3/4
VM-CAR	0	/	/	/
ZU-OBS	9+1	1	1	9/10
ZU-AFR	0	/	/	/
ZU-PAN	2+1	1	4	2/3
ZU-1805	1+1	1	4	1/2

La maggior parte dei genotipi è risultato suscettibile al virus. La linea ZU-OBS non ha mostrato sintomi visivi nonostante il test ELISA abbia confermato la presenza del virus. Le linee VM-TON e ZU-QUI hanno mostrato solo sintomi leggeri. Anche l'ecotipo San Pasquale ha mostrato sintomi leggeri.

I saggi per valutare la resistenza al CMV sono stati eseguiti valutando i sintomi visivi ad intervalli maggiori rispetto ai test precedenti. Dopo 26 giorni dall'inoculazione tutte le linee saggate sono risultate suscettibili tranne la linea ZU-QUI che tuttavia ha mostrato la presenza del virus dopo saggio ELISA confermando la tolleranza indicata (Tabella 13).

Tab. 13. Risultati del test al CMV

<i>Codice</i>	<i>N° piante testate</i>	<i>I rilievo^a 11gg</i>	<i>II rilievo^a 26gg</i>	<i>E.L.I.S.A 15gg</i>
CO-SPQ	16+1control	2	4	16/17
ZU-GIO	7+1	2	4	7/8
CO-2386	8+1	2	4	8/9
VM-TON	6+1	2	4	6/7
ZU-NVM	16+1	2	4	16/17
CO-LBS	15+1	2	4	15/16
ZU-QUI	16+1	0	0	16/17
ZU-MIK	17+1	2	4	17/18
ZU-PRE	17+1	2	4	17/18
VM-CAR	2+1	2	4	2/3
ZU-OBS	7+1	2	4	7/8

4.3 Ottenimento di linee in avanzata fase di selezione per caratteri agronomici

Una volta individuati nel germoplasma di partenza genotipi interessanti per caratteri agronomici, è stato avviato un processo di autofecondazioni e selezione seguendo lo schema riportato nella Figura 6.

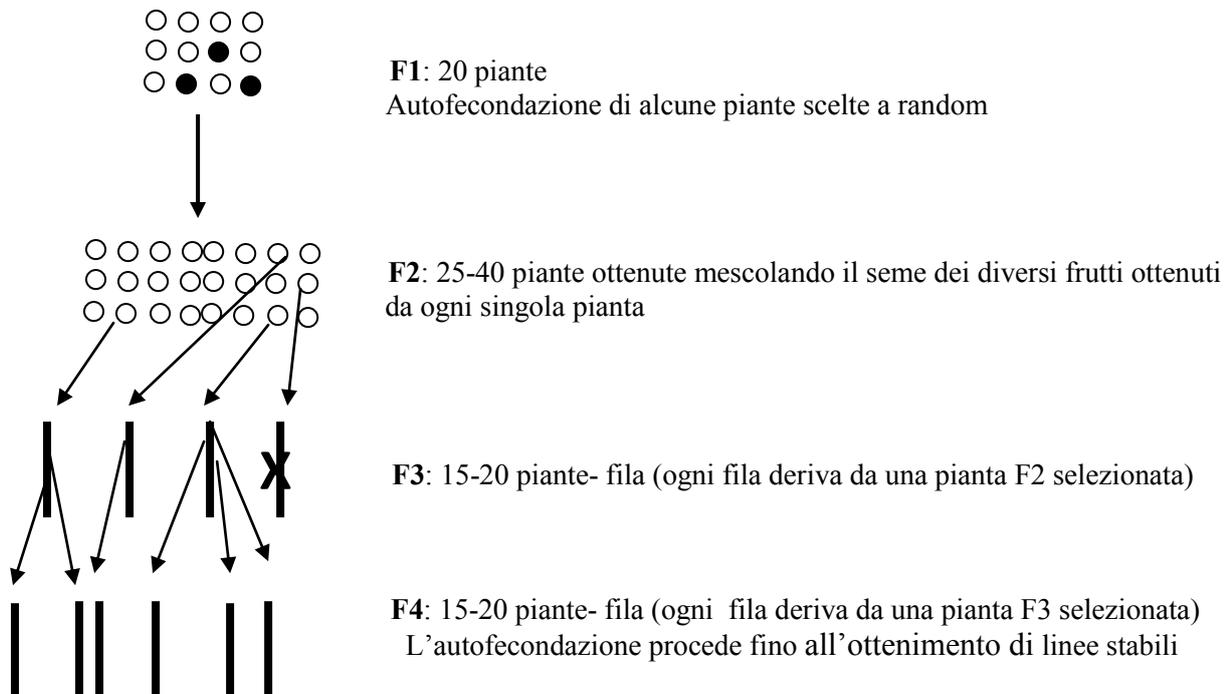


Fig. 6. Schema di selezione per ogni singolo ibrido

L'attenzione è stata rivolta alle varietà commerciali che hanno mostrato i caratteri morfologici di interesse anche se per alcuni le resistenze a patogeni riportate non sono state confermate.

Purtroppo molti dei frutti ottenuti dalle prime autofecondazioni sono marciti o non hanno dato semi maturi.

In Tabella 14 sono riportati il numero di frutti e semi ottenuti dalle successive autofecondazioni.

Tab. 14. Frutti e semi ottenuti dal primo ciclo di autofecondazione degli ibridi commerciali.

<i>Codice</i>	<i>N° frutti</i>	<i>N° semi</i>
ZU-OBS	3	> 100
CO-2386	2	> 100
ZU-MIK	2	> 100
ZU-DIA	1	> 100
CO-ALT	2	> 100
VM-CAR	2	> 100
ZU-AFR	1	> 100
ZU-PAN	1	> 100
VM-TON	5	> 100
ZU-PRE	3	> 100
ZU-QUI	4	> 100
ZU-GIO	2	± 80
ZU-1805	2	> 100

Allo scopo di poter effettuare una selezione per resistenza a ZYMV la progenie F2, prima del trapianto in campo, è stata saggiata per la resistenza mediante test in vivo identificando le piante F2 resistenti riportate in Tabella 15.

Tab. 15. Risultati del test allo ZYMV condotto su alcune progenie segreganti

<i>Codice</i>	<i>N° pt testate</i>	<i>N° pt senza sintomi</i>	<i>N° pt con sintomi incerti</i>	<i>N° pt con sintomi leggeri</i>	<i>N° pt con sintomi medi</i>	<i>N° pt con sintomi forti</i>
CO-2386	17+1 controllo	0	1	1	4	9
VM-CAR	40+1 controllo	0	0	0	2	36
ZU-MIK	19+1 controllo	11	1	2	3	0
ZU-OBS	40+1 controllo	3	1	2	29	5
ZU-PAN	40+1 controllo	0	0	0	1	39
ZU-1805	40+1 controllo	0	0	0	0	40
ZU-QUI	19+1 controllo	6	1	3	7	2
CO-SPQ	5	/	/	/	/	5
ZU-TRF	5	/	/	/	/	5

Come si può osservare dalla Tabella 15 è stato impiegato nelle inoculazioni un minimo di 17 ad un massimo di 40 piante per popolazione segregante. Le diverse popolazioni analizzate hanno mostrato una segregazione diversa per la resistenza allo ZYMV. La popolazione F2 più interessante è quella ottenuta dall'autofecondazione dell'ibrido ZU-MIK. Infatti per questa su 19 piante testate 11 non hanno mostrato sintomi e le restanti hanno evidenziato solo sintomi leggeri–medi, anche 6 e 3 piante F2 ottenute rispettivamente dall'autofecondazione dell'ibrido ZU-QUI e ZU-OBS, non hanno dato sintomi.

La valutazione delle 13 progenie segreganti, seguendo i parametri riportati dalle schede CPVO, è stata eseguita in campo a Sarno utilizzando circa 30 piante per progenie. In particolare, è stato valutato: il tipo di accrescimento della pianta e la presenza o l'assenza delle ramificazioni; l'intensità delle incisioni del lembo fogliare e la presenza o l'assenza di chiazze argentee; la forma del frutto, la presenza o l'assenza di coste, il colore principale con o senza striature, il colore del peduncolo e sono state prese delle note sulla lunghezza di quest'ultimo, sulla presenza o assenza di spine, sulla presenza di un fiore persistente, sulla produttività, sul vigore e sull'evidenza di sintomi o resistenza a qualche malattia. Per ogni popolazione segregante sono state scelte da 1 a 7 piante che presentano i caratteri ritenuti interessanti per l'ottenimento di linee pure da impiegare nella costituzione di ibridi commerciali. La valutazione del materiale è riportata in Tabella 16. Le piante selezionate di CO-2386 e di CO-ALT hanno mostrato l'attaccatura del fiore più persistente, carattere ricercato dai mercati locali perché indice di freschezza. Una delle piante di VM-CAR è risultata compatta con gli internodi più corti come anche due delle piante di ZU-1805. Una pianta della linea ZU-OBS si è distinta per un portamento aperto ideale per una raccolta veloce. Inoltre, due piante delle linee VM-TON e ZU-QUI hanno mostrato un altro carattere di interesse, il peduncolo del frutto leggermente più lungo rispetto alla norma. Anche questo carattere è importante perché permette il distacco del frutto con più facilità. Tutte le piante selezionate hanno comunque mostrato un buon vigore e una buona produttività. Successivamente le singole piante selezionate sono state autofecondate manualmente per fissare i caratteri e ottenere una progenie F3.

Tab. 16. Schede di caratterizzazione delle piante selezionate nelle progenie segreganti F2

Codice	N°pt sel.	Pianta		Lembo fogliare			Frutto		
		Accresc.	Ramif.	Incisioni	chiazze	forma	coste	colore	striature
CO-2386	3	cespuglio	assenti	profonde a molto profonde	lievi	cilindrica	assenti o lievi	verde chiaro	presenti
VM-CAR	2	cespuglio	assenti	medie a profonde	assenti	cilindrica a clavata	assenti	verde chiaro	assenti
ZU-MIK	5	cespuglio	assenti	medie	lievi	cilindrica	assenti	verde scuro	assenti
ZU-OBS	2	cespuglio	assenti	medie	medie	cilindrica	assenti	verde scuro	assenti
ZU-AFR	1	cespuglio	assenti	medie	medie	cilindrica	assenti	verde scuro	assenti
ZU-PAN	2	cespuglio	assenti	medie a molto profonde	assenti o medie	cilindrica	assenti	verde medio-scuro	assenti
ZU-1805	4	cespuglio	assenti	profonde a molto profonde	assenti	cilindrica a clavata	assenti	verde scuro	assenti
ZU-DIA	2	cespuglio	assenti	profonde	lievi	cilindrica	assenti	verde medio-scuro	assenti
CO-ALT	1	cespuglio	assenti	molto profonde	assenti	cilindrica	assenti	verde chiaro	assenti
ZU-PRE	2	cespuglio a semistr.	assenti	medie a profonde	forti	cilindrica	assenti	verde marezzato	assenti
ZU-GIO	3	cespuglio	assenti	profonde	medie	cilindrica	assenti	verde	assenti o presenti
VM-TON	4	cespuglio a semistr.	assenti o presenti	medie a profonde	assenti o presenti	clavata	assenti	verde chiaro	assenti
ZU-QUI	7	cespuglio	assenti	superf. a medie a profonde	assenti o presenti	cilindrica	assenti	verde scuro	assenti

Nella primavera 2010 sono state seminate nei campi sperimentali dell'azienda Semiorto, le linee F3 (circa 15 pt per linea) derivate dall'autofecondazione delle singole piante selezionate (Figura 7).

**Fig. 7.** Linee F3 trapiantate nel campo sperimentale

Le linee sono state caratterizzate sulla base dei descrittori CPVO e valutate per omogeneità e rispondenza con la descrizione del genotipo precedentemente selezionato.

Il 30% delle linee analizzate sono risultate abbastanza omogenee a loro interno, indicando che già in F3 si può ottenere una certa stabilità per alcuni caratteri. In particolare sono risultate più stabili le linee derivate da piante ZU-MIK, ZU-QUI, ZU-OBS e ZU-PRE. La caratterizzazione è riportata in Tabella 17.

Tab. 17. Scheda di caratterizzazione delle 10 linee più omogenee in F3

<i>Codice +N°pt F2</i>	<i>Pianta</i>		<i>Lembo fogliare</i>			<i>Frutto</i>		
	<i>Accresc.</i>	<i>Ramif.</i>	<i>Incis.</i>	<i>chiazze</i>	<i>forma</i>	<i>coste</i>	<i>colore</i>	<i>striature</i>
ZU-MIK5	cespuglio	assenti	medie	lievi	cilindrica	assenti	verde scuro	assenti
ZU-MIK18	cespuglio	assenti	medie	medie	cilindrica	assenti	verde scuro	assenti
ZU-MIK22	cespuglio	assenti	medie	medie	cilindrica	assenti	verde scuro	assenti
ZU-OBS4	cespuglio	assenti	medie	medie	cilindrica	assenti	verde scuro brill.	assenti
ZU-OBS5	cespuglio	assenti	medie	medie	cilindrica	assenti	verde scuro brill.	assenti
ZU-QUI1	cespuglio	assenti	superf.	assenti	cilindrica	assenti	verde scuro	assenti
ZU-QUI2	cespuglio	assenti	superf.	assenti	cilindrica	assenti	verde scuro	assenti
ZU-QUI12	cespuglio	assenti	superf.	assenti	cilindrica	assenti	verde scuro	assenti
ZU-QUI18	cespuglio	assenti	superf.	assenti	cilindrica	assenti	verde scuro	assenti
ZU-PRE6	cespuglio	assenti	medie	forti	cilindrica	assenti	verde marez.	assenti



Fig. 8. Linea ZU-MIK5 con il frutto di una pianta selezionata

Alcune linee hanno presentato variabilità nel colore del frutto e nella presenza o assenza delle chiazze argentee sulle foglie. Altre sono state eliminate perché hanno mostrato caratteri non graditi. Nelle linee stabili sono state scelte delle piante e autofecondate per fissare ulteriormente i caratteri mentre, in quelle non stabili è stata effettuata una selezione delle piante seguendo gli stessi criteri seguiti per la selezione nella F2. Le piante selezionate sono state autofecondate. Nella primavera 2011 si procederà alla valutazione delle linee F4. Nella Figura 8 è mostrata la linea ZU-MIK5 e un frutto di una pianta scelta per la successiva autofecondazione. Come si può osservare le piante presentano un buon portamento eretto e il frutto è perfettamente cilindrico.

Contemporaneamente al lavoro di autofecondazione per l'ottenimento di futuri parentali stabili, sono stati effettuati incroci tra 11 diverse cultivar di zucchini al fine di valutare il risultato di tali combinazioni di incrocio.

Sono stati effettuati manualmente 21 combinazioni di incrocio, di queste solo 12 hanno dato un frutto (Figura 9).

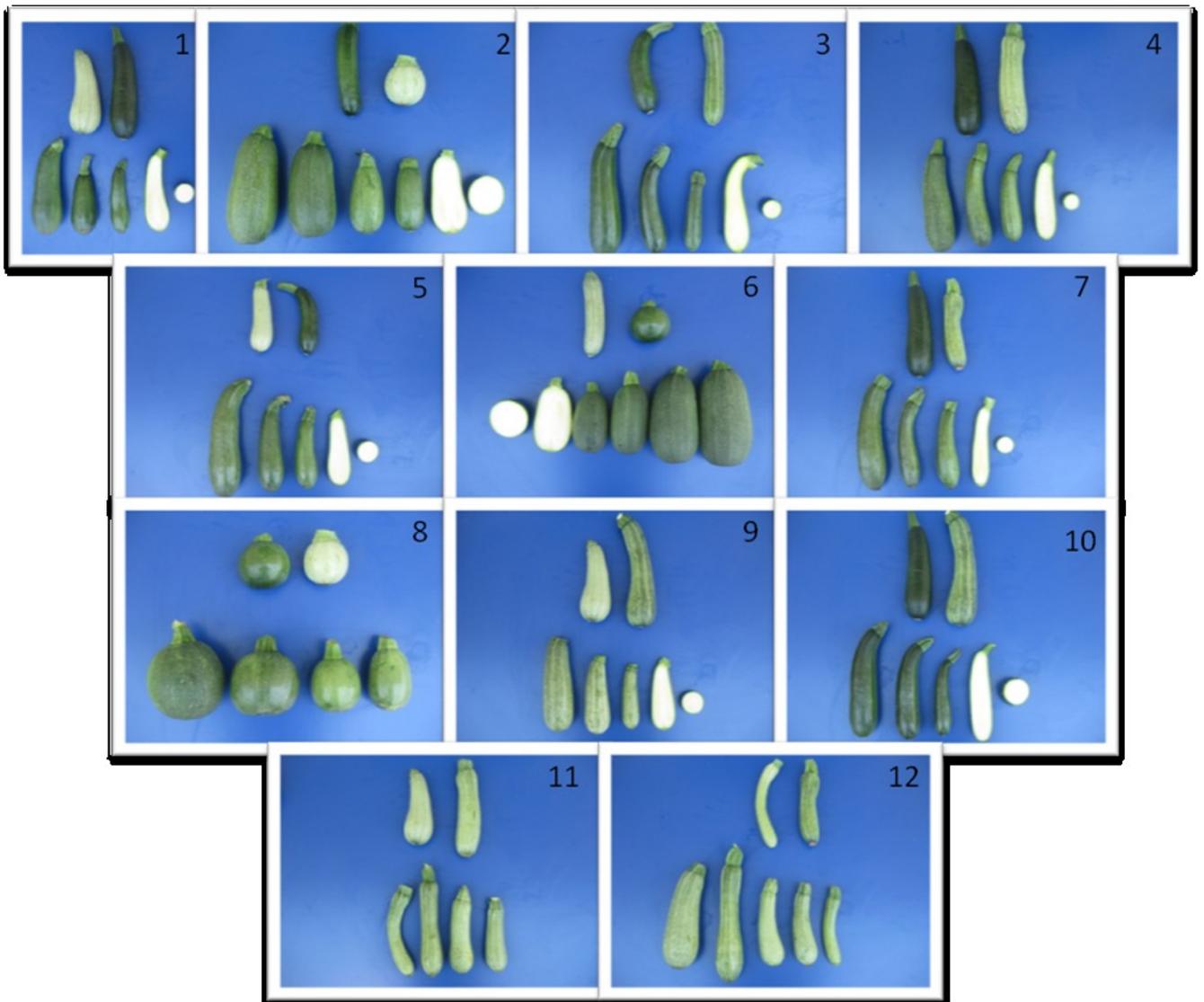


Fig. 9. Rappresentazione dei 12 incroci effettuati mostrando i due parentali di origine

Gli incroci sono stati valutati fenotipicamente in campo e le descrizioni sono riportate in Tabella 18.

Tab. 18. Scheda di caratterizzazione dei 12 incroci

<i>Codice</i>	<i>Pianta</i>		<i>Leombo fogliare</i>			<i>Frutto</i>		
	<i>Accresc.</i>	<i>Ramif.</i>	<i>Incis.</i>	<i>chiazze</i>	<i>forma</i>	<i>coste</i>	<i>colore</i>	<i>striature</i>
1	cespuglio	assenti	prof.	forti	clavata	assenti	verde medio	assenti
2	cespuglio	assenti/presenti	superf.	assenti	globosa	assenti	verde medio	assenti
3	cespuglio	assenti	medie	assenti	legg.clavata	lievi	verde scuro	assenti
4	cespuglio	assenti	superf.a medie	assenti/presenti	clavata	lievi	verde medio	assenti
5	cespuglio	assenti	prof.	forti	clavata	assenti	verde medio	assenti
6	cespuglio	assenti	superf.a medie	assenti/presenti	globosa	lievi	verde medio	assenti
7	cespuglio	assenti	medie	assenti	clavata	lievi	verde medio	assenti
8	cespuglio	assenti	superf.	assenti	globosa a ovale	lievi	verde medio	assenti
9	cespuglio	assenti	superf.a medie	assenti/presenti	clavata	lievi	verde medio	assenti
10	cespuglio	assenti	superf.a medie	assenti/presenti	clavata	lievi	verde scuro	assenti
11	cespuglio	assenti	superf.a prof.	assenti/presenti	cilindrica a clavata	assenti/presenti	verde medio	assenti
12	cespuglio	assenti	superf.a prof.	assenti/presenti	cilindrica a clavata	lievi a forti	verde chiaro	assenti

Di questi solo l'incrocio 3 è stato selezionato per effettuare prove agronomiche in quanto presentava un frutto e una pianta interessanti. Gli altri incroci non sono stati presi in considerazione per la forma del frutto o per la variabilità di alcuni caratteri come la stessa forma del frutto negli incroci 8, 11 e 12. L'incrocio 7 è stato scartato per le dimensioni delle piante troppo grandi indipendentemente dal giudizio positivo sul frutto.

4.4 Miglioramento della varietà locale di zucchini San Pasquale

Negli ultimi anni è aumentata la coltivazione di varietà locali. Questa pratica può costituire un efficace difesa dell'economia locale in quanto il ruolo giocato dal legame tra territorio e prodotto non è riproducibile altrove. Per questo motivo uno degli obiettivi di questa tesi è stato il miglioramento genetico dello zucchini San Pasquale, un'ecotipo dell'Agro-mariglianese. La varietà presenta un frutto cilindrico di colore verde medio con mazzatura biancastra a polpa bianca e di eccezionale sapore ma deficiente per resistenze ai virus e all'oidio.

Per valutare la varietà, sono state trapiantate 40 piante in campo per effettuare l'analisi fenotipica sulla base dei caratteri riportati dalla scheda ufficiale di iscrizione della varietà. Dalla valutazione è stata riscontrata una perdita dell'omogeneità della stessa. In particolare molte delle piante presentavano delle ramificazioni. Di conseguenza per il mantenimento in purezza della stessa si è proceduto all'autofecondazione di 3 piante selezionate sulla base dei caratteri tipici della varietà. Nella primavera 2010 sono state trapiantate 2 delle progenie ed entrambe hanno mostrato una buona omogeneità dei caratteri. Inoltre, le piante mostravano un'asse unico e l'assenza di ramificazioni, come si può osservare nella Figura 10. Questo materiale omogeneo è stato utilizzato per il trasferimento delle principali resistenze a malattie mediante incrocio con varietà resistenti.



Fig. 10. Frutti e piante dell'ecotipo San Pasquale

4.5 Analisi molecolare in cultivar commerciali

Per iniziare un programma di miglioramento genetico, un requisito importante è conoscere la natura della diversità genetica all'interno e tra i diversi gruppi della specie *C. pepo*. Informazioni sulla variabilità molecolare possono risultare molto utile per organizzare una collezione di germoplasma, caratterizzare accessioni e genotipi e identificare cultivar.

4.5.1 Analisi AFLP

Per l'identificazione dei polimorfismi sono state utilizzate 17 linee di zucchini scelte tra le diverse cultivar reperite in Italia alle quali sono state aggiunte quelle fornite dal Dott. Paris. Le linee sono

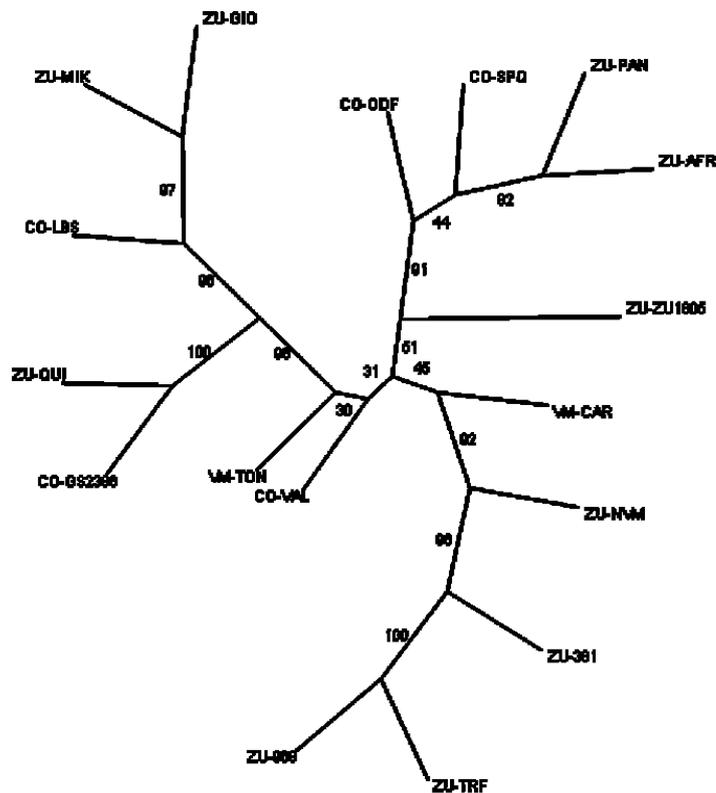
state analizzate mediante l'analisi AFLP, utilizzando il metodo descritto da Vos et al. (1995). Delle 17 piante analizzate 16, come descritto in precedenza, presentano un portamento eretto e internodi corti, come atteso dalle moderne cv di zucchini. L'unica ad avere un portamento prostrato e internodi abbastanza lunghi è la varietà "Alberello sel. Valery". Ciascuna delle 17 accessioni sembrano essere uniformi, ma variano tra di loro per alcuni tratti fenotipici come, la presenza o l'assenza di ramificazioni e di chiazze argentee sulle foglie, la profondità delle incisioni della lamina fogliare e il colore dei frutti. Tutte le accessioni sono state classificate in base alla forma dei frutti, come riportato precedentemente nelle Tabella 2 e 3.

Dall'analisi sono state identificate circa 644 bande che vanno da 76 bp a 498 bp, usando 4 combinazioni di primer. In particolare, 632 bande (97%) hanno mostrato polimorfismo. Il numero di frammenti rilevato da una singola coppia di primer varia da 126 a 217 con una media di 161 bande. Inoltre, sono state rilevate diverse bande specifiche che sono presenti in una cultivar e assenti in tutte le altre. Il numero di tali bande varia da 15 a 45 con una media di 27 (Tabella 19).

Tab. 19. Numero di bande totali, polimorfiche e accessioni-specifiche identificate usando 4 combinazioni di primer.

<i>Primer</i>	<i>N° totale di bande</i>	<i>% di bande polimorfiche</i>	<i>N° di bande accessioni specifiche</i>
E-AGC M-CAG	126	98	28
E-AGC M-CAC	217	100	45
E-ACT M-CAT	154	98	15
E-ACT M-CAC	147	94	19
Totale	644	/	107
Media	161	97	27

Il dendrogramma costruito usando il programma PHYLIP 3.62 (Felsenstein, 1993) consiste di tre rami principali (Figura 11) e la posizione delle accessioni all'interno di ogni ramo è supportata da un valore bootstrap che supera il 90%. Un ramo include le due cv a libera impollinazione "Nero di Milano" e "True French" e le due linee isogeniche di True French, 381e resistente allo ZYMV e 968Rb resistente all'oidio. Gli altri due rami raggruppano 4 delle 5 cultivar cocozelle e 7 dei 9 ibridi, includendo tutte quelle cv che hanno la forma dei frutti cilindrica degli zucchini. Le restanti tre accessioni, quali una cocozella con portamento prostrato e due ibridi del gruppo vegetable marrow, occupano la parte centrale del dendrogramma, con un valore del bootstrap minore del 50%.



_10

Fig. 11. Dendrogramma derivato dall'analisi di 17 accessioni di *C. pepo*, basata su 644 bande AFLP. I codici dei nomi sono riportati in tabella X, con le doppie lettere riferite al gruppo di appartenenza: (CO, Cocozelle; ZU, Zucchini e VM, Vegetable marrow) e le triple riferite all'accessione. I numeri ai nodi sono i valori bootstrap (%). Sono indicati solo i valori ≥ 50 .

L'indice di similarità genetica varia da 0.42 a 0.88 (Tabella 20). Le cv a libera impollinazione del gruppo cocozelle hanno similarità, relativamente elevate tra di loro, variando dallo 0.59 allo 0.67, e le due cv del gruppo zucchini hanno un indice di similarità ancora più elevato dello 0.70. le similarità tra le cv dei differenti gruppi sono relativamente basse, variando allo 0.43 allo 0.62. La cv "True French" e le due linee isogeniche 381e e 968Rb, presentano un'alta similarità, dello 0.76 e 0.79 rispettivamente, ma questi valori sono considerevolmente bassi se si considerano che le due

linee derivano da 6 generazioni di backcross con “True French” come parentale ricorrente. Alte similarità sono state osservate tra gli ibridi resistenti alle malattie, variando dallo 0.72 allo 0.88, indipendentemente dalla forma del frutto e dalla ditta sementiera costituttrice. Infatti, la più alta similarità, 0.88, è stata ottenuta tra lo zucchini ibrido “Giove” e l’ibrido vegetable marrow “Tonya” sviluppati da due ditte sementiere diverse.

Tab. 20. Matrice di similarità genetica tra 17 cultivar di *C. pepo* basata su 644 bande AFLP.

	CO- SPQ	ZU- NVM	CO- VAL	CO- LBS	CO- ODF	ZU- GIO	CO- 2386	VM- TON	ZU- QUI	ZU- MIK	VM- CAR	ZU- AFR	ZU- PAN	ZU- 1805	ZU- TRF	ZU- 968	ZU- 381
CO-SPQ	1.00																
ZU-NVM	0.60	1.00															
CO-VAL	0.67	0.61	1.00														
CO-LBS	0.67	0.61	0.64	1.00													
CO-ODF	0.67	0.49	0.63	0.59	1.00												
ZU-GIO	0.70	0.57	0.70	0.78	0.71	1.00											
CO-2386	0.69	0.62	0.80	0.73	0.70	0.84	1.00										
VM-TON	0.65	0.59	0.72	0.71	0.70	0.88	0.80	1.00									
ZU-QUI	0.74	0.67	0.80	0.74	0.66	0.79	0.87	0.77	1.00								
ZU-MIK	0.69	0.63	0.73	0.77	0.67	0.85	0.81	0.78	0.79	1.00							
VM-CAR	0.66	0.66	0.72	0.67	0.69	0.76	0.81	0.75	0.78	0.74	1.00						
ZU-AFR	0.69	0.54	0.76	0.63	0.75	0.80	0.78	0.85	0.76	0.76	0.81	1.00					
ZU-PAN	0.65	0.48	0.61	0.67	0.77	0.82	0.72	0.83	0.68	0.75	0.69	0.80	1.00				
ZU-1805	0.66	0.62	0.67	0.67	0.74	0.85	0.76	0.83	0.74	0.79	0.79	0.81	0.77	1.00			
ZU-TRF	0.53	0.70	0.62	0.61	0.43	0.58	0.58	0.64	0.61	0.60	0.65	0.48	0.44	0.61	1.00		
ZU-968	0.49	0.67	0.66	0.58	0.49	0.56	0.61	0.64	0.64	0.59	0.70	0.47	0.42	0.58	0.77	1.00	
ZU-381	0.60	0.70	0.74	0.66	0.55	0.70	0.71	0.76	0.72	0.72	0.78	0.61	0.56	0.75	0.79	0.76	1.00

Il dendrogramma UPGMA, costruito usando il programma statistico NTSYS-pc (Rohlf, 1998) (non mostrato) consiste di due cluster principali. Il primo comprende le due cv a libera impollinazione “Nero di Milano” e “True French” e le due linee isogeniche 381e e 968Rb, lo stesso risultato ottenuto con PHYLIP. Le restanti accessioni, quali le 4 cv. cocozelle e gli ibridi, indipendentemente dalla loro forma del frutto, formano un grande cluster. Questo cluster include due subcluster nei quali si distribuiscono gli ibridi.

4.5.2. Analisi RAPD

I risultati RAPD sono mostrati nella Tabella 21. Dall’analisi, condotta con 7 primer secondo le condizioni PCR descritte da Stif e al. 2003, sono state ottenute 104 bande delle quali 70 (66,5%) sono polimorfiche. Ciascun primer produce in media 14 bande, che vanno da 300 bp a 2000 bp. Il livello di polimorfismo tra le 17 accessioni è moderatamente alto e varia dal 36% al 100% per primer. Il numero di bande specifiche per primer varia da 0 a 2.

Tab. 21. Sintesi dei risultati dell'analisi RAPD con 7 primer

<i>Primer</i>	<i>N° totale di bande</i>	<i>% di bande polimorfiche</i>	<i>N° di bande accessioni specifiche</i>
OPAA17	15	47	2
OPG02	13	69	1
OPK15	17	70	0
OPN20	11	36	0
OPV20	14	86	0
OPAJ03	15	100	0
OPM03	19	58	0
Totale	104	/	3
Media	14	66	0,4

I *primer* producono bande polimorfiche tra i diversi campioni. In particolare, 2 *primer*, OPAA17 e OPAJ03 producono una banda polimorfica nella linea isogenica ZU-381 resistente allo ZYMV mancante nella linea suscettibile ZU-TRF, di circa 650 bp e 1200 bp rispettivamente (Figura 12). La banda di 650 bp è presente anche negli ibridi 7, 8 e 11, CO-2386, VM-TON e VM-CAR rispettivamente. La banda di 1200 bp è presente anche negli ibridi 7 e 8, CO-2386 e VM-TON, rispettivamente. Questi ibridi sono indicati da catalogo come tolleranti allo ZYMV ma non è mai stata confermata dai vari test effettuati in vivo.

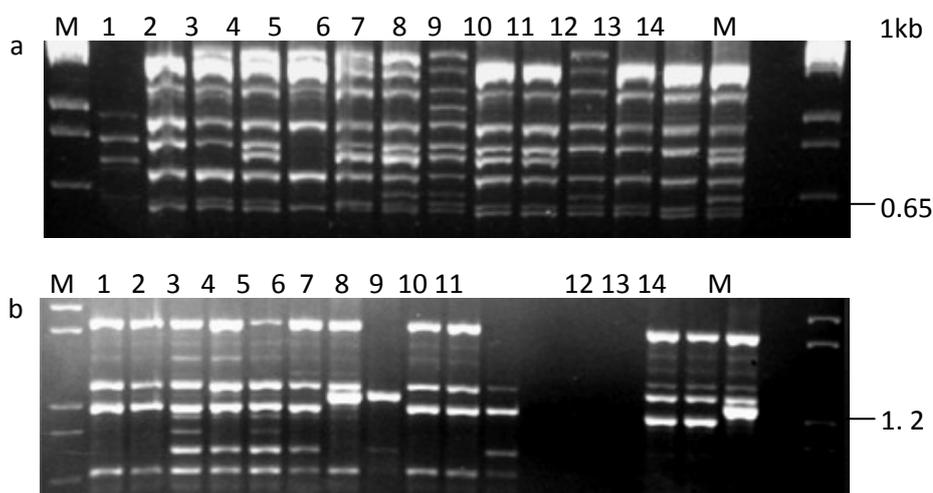


Fig. 12. Profilo elettroforetico RAPD: a) OPAA17 e b) OPAJ03 1= CO-SPQ; 2= ZU-NVM; 3=CO-VAL; 4=CO-LBS; 5=CO-ODF; 6=ZU-GIO; 7=CO-2386; 8=VM-TON; 9=ZU-QUI; 10=CO-MIK; 11=VM-CAR; 12=ZU-TRF; 13=ZU-968; 14=ZU-381; M= marcatore di peso molecolare

Il frammento di 650 bp è stato tagliato, purificato e clonato ma non sono state ottenute colonie. Il frammento polimorfico di 1200 bp, ottenuto con OPAJ03, è stato tagliato dal gel in corrispondenza dei campioni 7, 8 e 14, purificato e clonato. Le colonie sono state analizzate con i primer T7 e SP6. Dalle colonie risultate positive è stato estratto il plasmide che è stato riamplicato con gli stessi primer. I frammenti clonati sono stati sequenziati con entrambi i primer SP6 e T7. Dall'allineamento delle sequenze è stato visto che i frammenti dei tre campioni clonati presentano la stessa sequenza. Su tale sequenza sono stati disegnati due primer che amplificano un frammento di 300 bp, ma dall'analisi PCR è stata ottenuta amplificazione anche nelle linee suscettibili ZU-TRF e ZU-968 come si può osservare nella Figura 13.

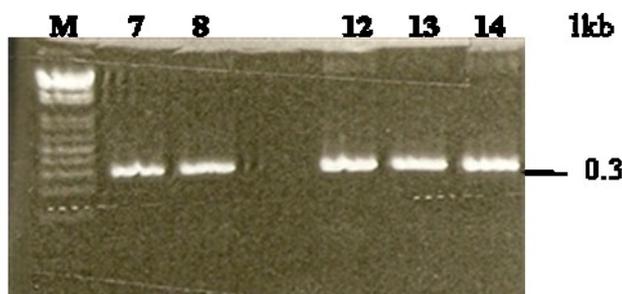


Fig. 13. Profilo elettroforetico PCR: 7=CO-2386; 8=VM-TON; 12=ZU-TRF; 13=ZU-968; 14=ZU-381; M=marcatore di peso molecolare

La banda di 300bp presente nel campione ZU-TRF è stata tagliata, purificata e sequenziata. Allineando tale sequenza con quella della linea isogenica resistente ZU-381 sono stati osservati dei polimorfismi (Figura 14). È stata fatta una mappa di restrizione al fine di trovare un'enzima che tagliasse in una sequenza e non nell'altra ed è risultato che l'enzima BclI (sito di taglio CCATC) dovrebbe tagliare nel frammento di ZU-TRF e non nella resistente.

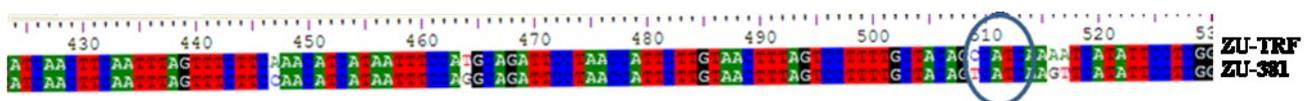


Fig. 14. Allineamento sequenze SCAR della linea suscettibile ZU-TRF e della resistente ZU-381 mostrando nel riquadro il sito di taglio dell'enzima BclI

Purtroppo da esperimenti in laboratorio l'enzima ha tagliato anche nelle piante resistenti.

Contemporaneamente sono stati disegnati altri due primer in modo che il forward e il revers presentano le 10 basi del primer RAPD OPAJ03 più rispettivamente 10 e 13 basi adiacenti sulla sequenza. I campioni CO-2386, VM-TON, ZU-381, ZU-968 e ZU-TRF sono stati amplificati con gli SCAR ed non è stata osservata amplificazione nel campione suscettibile ma la banda è presente solo nei campioni CO-2386, VM-TON e ZU-381 (Figura 15).

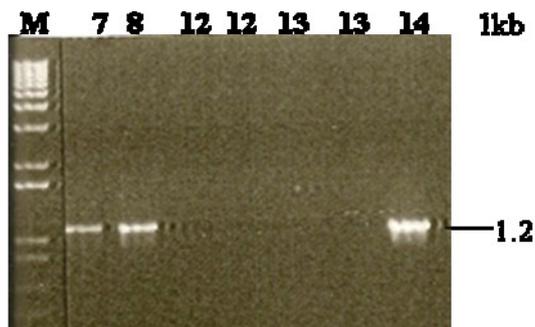


Fig. 15. Profilo elettroforetico PCR SCAR: 7=CO-2386; 8=VM-TON; 12=ZU-TRF; 13=ZU-968; 14=ZU-381; M= marcatore di peso molecolare

4.5.3 Analisi SSR

Undici accessioni locali di derivazione italiana, 31 di derivazione spagnola e 6 varietà commerciali sono state analizzate con 60 marcatori SSRs (micro satelliti: simple sequence repeat).

In particolare nel laboratorio del COMAV, come risultato di un progetto di sequenziamento su larga scala con la tecnologia 454, erano stati già individuati 49,610 unigeni che rappresentano il primo trascrittoma di *C. pepo*. L'intera collezione è stata analizzata con 30 SSR sviluppati da queste sequenze EST (Blanca et al., 2010). Inoltre, è stata effettuata un'analisi con altri 30 SSR sviluppati da altri gruppi di ricerca su una libreria genomica (Gong et al., 2008).

I risultati dell'analisi con gli SSR genomici sono mostrati in Tabella 22 dove è riportato il gruppo di linkage, il motivo, il numero di ripetizioni del microsatellite e il range (bp) delle dimensioni. Inoltre, è stato confrontato il risultato osservato con quello ottenuto in letteratura (Gong et al., 2008). Nel 20% dei casi il risultato è coinciso con quello atteso. Nel 40% si sono osservati molti più

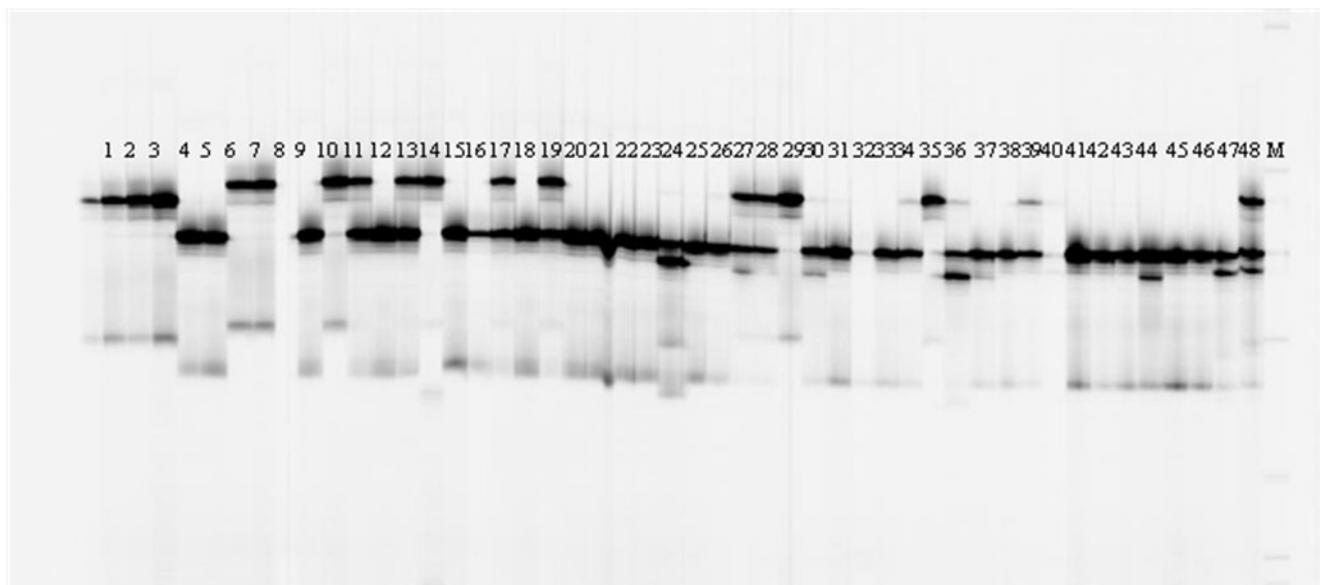
alleli di quelli attesi. Nel caso specifico di CMTp231 non è stato possibile interpretare il risultato. Sono stati individuati 109 alleli per il 90% polimorfici. Il numero di alleli rilevati da una singola coppia di primer varia da 1 a 9 con una media di circa 4 alleli. Inoltre, sono state rilevati 14 alleli specifici che sono presenti in un'accessione e assenti in tutte le altre. Il numero di tali bande varia da 1 a 3 con una media di 0,5. In particolare dall'analisi dei dati è emerso che 5 primer quali, CMTp256, CMTp63, CMTp245, CMTp86, CMTp98 mostrano un allele specifico presente solo nelle tre accessioni appartenenti a *C. pepo* subsp. *texana*.

In Figura 16 sono mostrati due profili elettroforetici ottenuti con SSR genomici corsi su gel di acrilammide al Li-cor. Come si può osservare dalla figura molto spesso un campione presenta più di 2 alleli probabilmente dovuto al fatto che ogni campione è un pool di 5 piante dello stesso genotipo.

Tab. 22. Marcatori SSR genomici

<i>SSR</i>	<i>gruppo di linkage</i>	<i>alleli attesi</i>	<i>alleli osservati</i>	<i>motivo</i>	<i>N°ripetizioni</i>	<i>dimensioni attese (bp)</i>	<i>dimensioni osservate + coda (bp)</i>
CMTp193	1	5	2	ga	18	186	177-200
CMTp98	2	3	6	aag	9	213	224-255
CMTp131	3a	3	3	ccg	7	117	109-135
CMTp187	3b	3	2	cag+caa	6+4	189	200-300
CMTp63	4	3	4	ttc	10	152	145-175
CMTp88	5	5	3	tc	12	167	178-197
CMTp235	5	6	9	ggt	12	148	145-200
CMTp256	6	2	3	atc	5	154	175-200
CMTp224	6	5	3	caa	7	151	169-175
CMTp248	7	4	1	gga	5	154	145-200
CMTp142	8	7	6	tc	12+5	158	145-240
CMTp257	9	3	5	cgt	11	138	100-200
CMTp58	9	2	1	ga+t	6+10	102	100
CMTp145	10a	4	4	cat	7	100	117-128
CMTp66	10a	3	4	gaa	9	128	120-175
CMTp260	11	4	4	cat	7	155	140-174
CMTp245	11	5	3	gcg	9	134	100-200
CMTp36	12	3	4	aac	5	151	164-185
CMTp69	13	3	4	tatt	4	70	77-92
CMTp176	14	4	4	tc	12	111	100-145
CMTp33	14	4	3	gaa	3+4	171	189-210
CMTp86	15	3	3	cca	9	133	151-192
CMTp169	15	2	4	gaa	11	158	175-200
CMTp231	16	9	/	ag	38	170	
CMTp208	17	2	4	ggt	5	117	133-136
CMTp209	17	3	3	ggt	6	116	100-145
CMTp183	18	3	5	cat	6	196	216-303
CMTp188	18	2	4	cat	7	147	145-350
CMTp132	19	4	5	gat	12	151	145-200
CMTp47	20	3	3	ag	9	154	165-173
Totale			109	/	14		
Media			3,6	90	0,5		

a



b

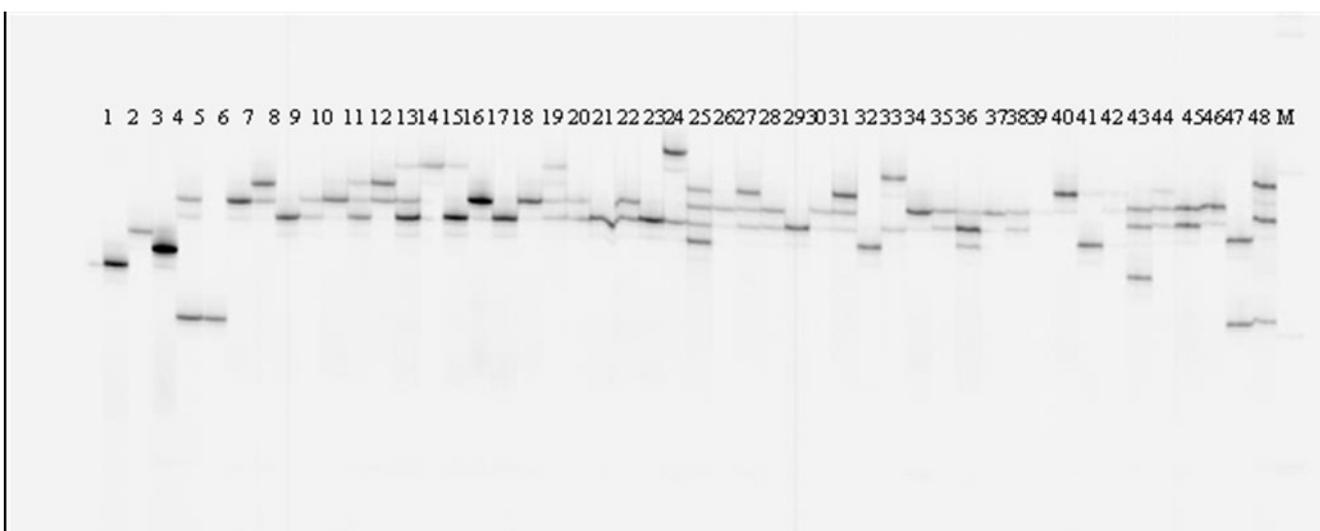


Fig. 15. Profilo elettroforetico con SSR genomici a) CMTp63 e b) CMTp235: 1=BGU8238; 2=NLS5227; 3=VU-CU196; 4=PU-TON; 5=PU-TOP; 6=PJI71628; 7=STYRIAN; 8=VM-TON; 9=V21; 10=CO-ROM; 11=CO-LUF; 12=CO-ODF; 13=CO-LBS; 14=CO-BDT; 15=SPQ; 16=CO-VAL; 17=CO2386; 18=ZU-TRF; 19=ZU-NVM; 20=ZU-GIO; 21=ZU-1805; 22=ZU-MIK; 23=ZU-QUI; 24=A-CU2; 25=A-CU12; 26=A-CU13; 27=AFR-CU12; 28=AN-CU23; 29=AN-CU75; 30=AN-CU113; 31=C-CU9; 32=CL-CU19; 33=E-CU227; 34=CL-CU21; 35=CM-CU32; 36=CM-CU47; 37=E-CU27; 38=MU-CU16; 39=MU-CU20; 40=V-CU10; 41=V-CU74; 42=V-CU116; 43=V-CU185; 44=949; 45=BBC6; 46=PAS15834; 47=E-CU10; 48=AN-CU27/1; M= marcatore di peso molecolare

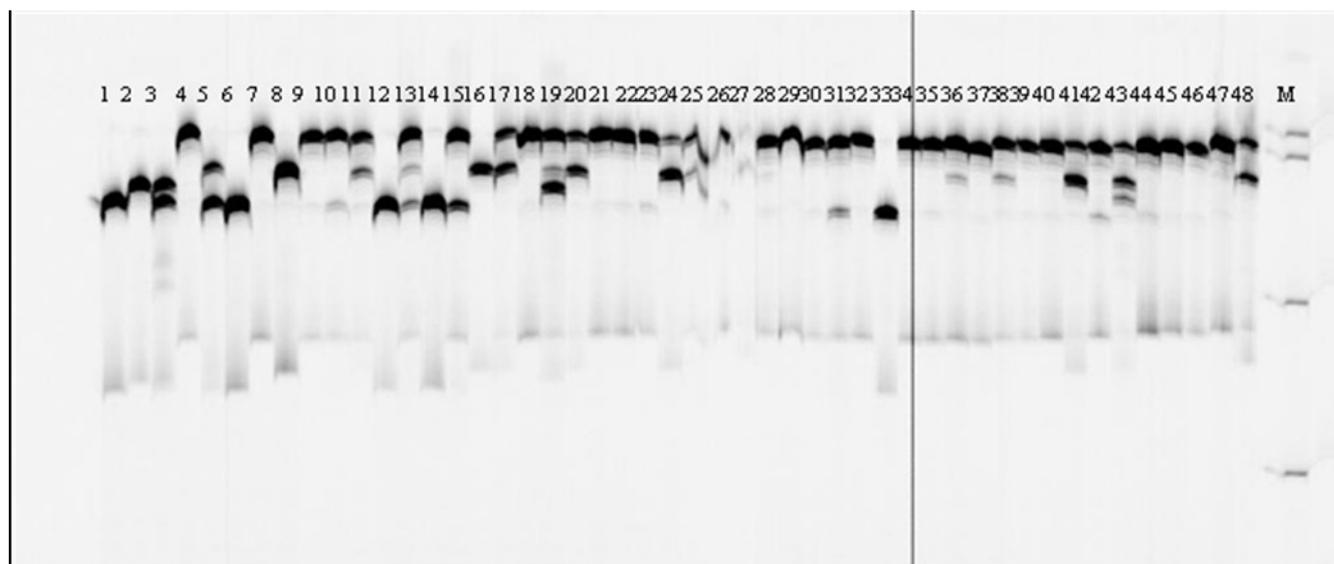
La Tabella 23 mostra i risultati ottenuti con i 30 SSR-EST. Dall'analisi sono stati identificati circa 84 alleli che vanno da 120 bp a 320 bp con un polimorfismo medio dell'83%. Il numero di alleli rilevati da una singola coppia di primer varia da 1 a 5 con una media di circa 3 alleli. Il numero di

alleli specifici ad un'accessione varia da 1 a 2 con un totale di 5. In questo caso un primer, CUTC00430, ha evidenziato un allele specifico per le accessioni di *texana* e un altro, CUTC012342, invece, un allele presente solo nelle accessioni di *C. pepo* subsp. *pepo*. Le sequenze di ogni locus sono state comparate in banca dati ed è stata annotata la funzione genica. In Figura 16 sono mostrati due profili elettroforetici ottenuti con SSR-EST.

Tab. 23. Marcatori SSR-EST

SSR	N° alleli osservati	motivo	N°ripetizioni	dimensioni attese (bp)	dimensioni osservate (bp)	simile a	descrizione genica
CUTC004307	4	aag	8*	100	120-145	AT5G20190	Binding
CUTC002749	4	tgc	10	183	175-200	AT1G60030	similar to transporter
CUTC005739	2	aag	8	194	200-204	AT5G11270	overexpressor of cationic peroxidase 3 transcription factor
CUTC020992	3	aag	10	156	175	BHLH147	Transcription factor
CUTC008357	3	acc	8	136	156	AT1G23860	RS containing zinc finger protein 21
CUTC046645	4	atc	9	194	200-240	ACBP2	ACBP2 (Acyl-CoA binding protein ACBP2)
CUTC001906	3	acgg	7	198	200-255	AT2G36320	zinc finger (AN1-like)family protein
CUTC015525	/	aag	7	173	/	AT2G33510	protein binding
CUTC006209	3	aac	9	200	200-300	AT3G04930	Transcription regulator
CUTC006891	3	ag	12	154	145-175	AT2G44620	Mitochondrial acyl carrier protein 1
CUTC011336	5	agg	9	149	145-175	AT3G15070	zinc finger (C3HC4 Type RING FINGER) family protein
CUTC017708	4	agc	8	223	250-300	NAT6	Transporter (A. thaliana)
CUTC005800	5	aag	12	189	200-240	AT2G47460 MYB12	domain protein 12
CUTC007942	5	aac	8	152	175-200	BLH1	BLH1 (BEL1-LIKE homeodomain 1)
CUTC022867	5	agc	8	140	145-175	BTF3	similar to factor BTF3
CUTC010796	/	aag	8	223	/	AT5G35620	eukariotic initiation factor iso4E
CUTC008409	3	tgc	8	107	120-145	AT3G12920	protein binding
CUTC004991	4	agc	7	173	175-200		hydratase, cytoplasmatic, Cucurbita maxima
CUTC009607	4	ag	11	146	145-200	AT3G13510	unknown protein
CUTC004158	2	aag	7	188	200-204	AT4G19100	unknown protein
CUTC004399	3	acgg	7	165	175-200	AT1G12830	unknown protein
CUTC004782	2	agg	8	164	175-200	AT4G24275	unknown protein
CUTC008659	1	aag	7	221	241	AT1G64770 NDF2	NDH-dependent cyclic electron flow 1
CUTC006703	2	acc	7	123	145	AT2G42260 UV14	UV-B-insensitive 4
CUTC018879	2	aag	7	164	175-200	AT3G13980	unknown protein
CUTC012342	2	aag	7	182	200-204	AT4G34630	unknown protein
CUTC009316	2	gca	7	300	320	U2AF35B	U2AF35B RNA binding
CUTC009760	2	aac	7	159	179	BAB64344	EIN3- like protein (Cucumis melo)
CUTC008419	/	aag	6	214	/	AT3G60580	zinc finger (C2H2 Type) family protein
CUTC023363	2	agc	7	244	264	AT3G09070	glycine-rich protein
Totale	84	/	5				
Media	2,8	83	0,2				

a



b

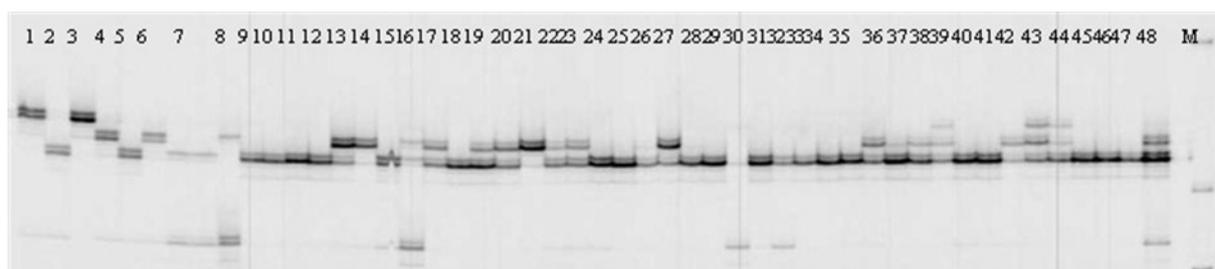


Fig. 16. Profilo elettroforetico con SSR-EST a) CUTC002749 e b) CUTC008409: 1=BGU8238; 2=NLS5227; 3=VU-CU196; 4=PU-TON; 5=PU-TOP; 6=PJI71628; 7=STYRIAN; 8=VM-TON; 9=V21; 10=CO-ROM; 11=CO-LUF; 12=CO-ODF; 13=CO-LBS; 14=CO-BDT; 15=SPQ; 16=CO-VAL; 17=CO2386; 18=ZU-TRF; 19=ZU-NVM; 20=ZU-GIO; 21=ZU-1805; 22=ZU-MIK; 23=ZU-QUI; 24=A-CU2; 25=A-CU12; 26=A-CU13; 27=AFR-CU12; 28=AN-CU23; 29=AN-CU75; 30=AN-CU113; 31=C-CU9; 32=CL-CU19; 33=E-CU227; 34=CL-CU21; 35=CM-CU32; 36=CM-CU47; 37=E-CU27; 38=MU-CU16; 39=MU-CU20; 40=V-CU10; 41=V-CU74; 42=V-CU116; 43=V-CU185; 44=949; 45=BBC6; 46=PAS15834; 47=E-CU10; 48=AN-CU27/1; M= marcatore di peso molecolare

Unendo i dati ottenuti con gli SSR genomici e in EST sono state ottenuti circa 193 alleli con un polimorfismo medio dell'87%. È stata calcolata la distanza genetica di Nei (Nei e Li, 1979) usando il software Phyltools 1.32 (Buntjer, 2000). Successivamente, è stato costruito un albero filogenetico con neighbour-joining usando Phylip 3.62 (Felsenstein, 1993) (Figura 17).

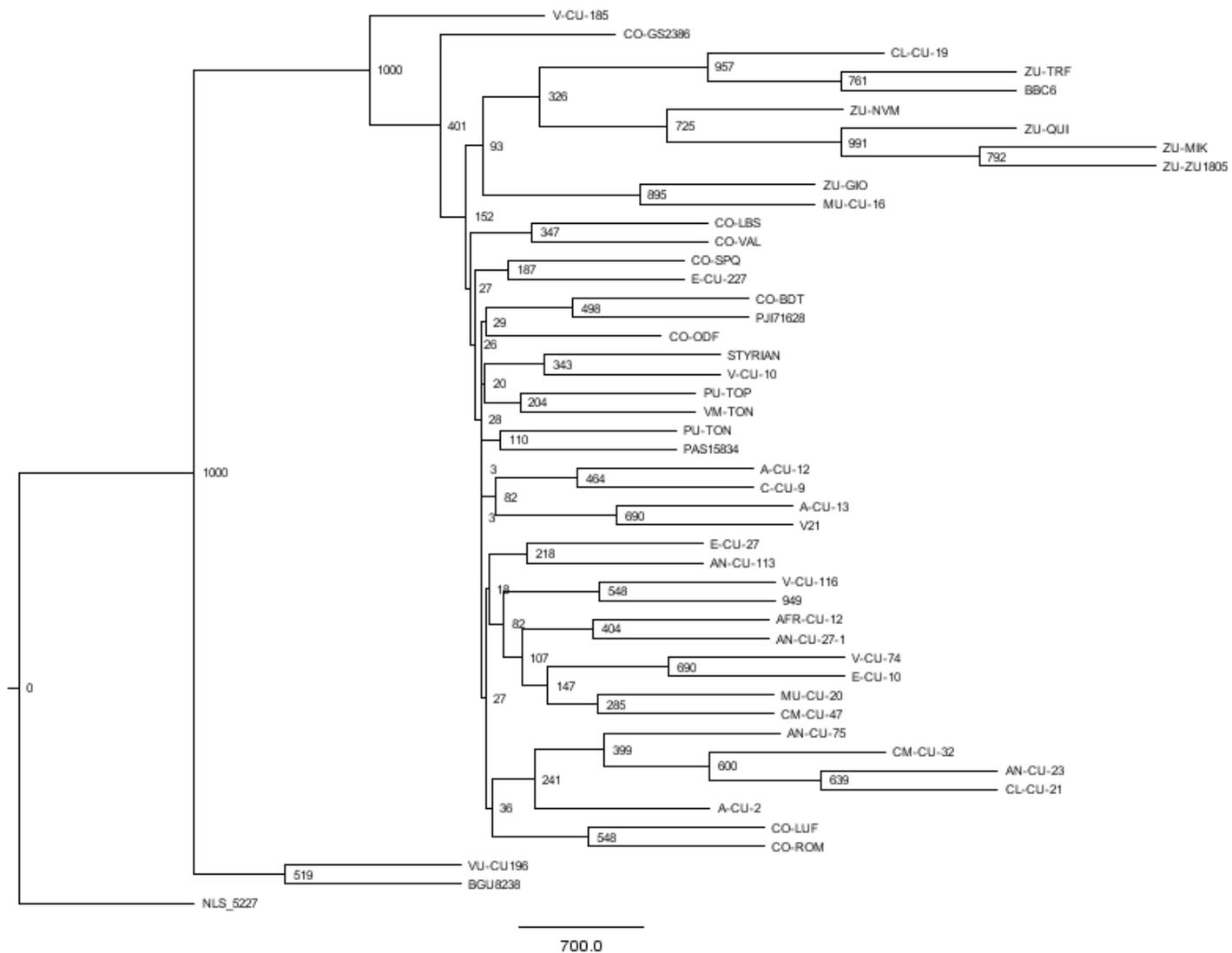


Fig. 17. Dendrogramma derivato dall'analisi di 48 accessioni di *Cucurbita*, basata su 193 bande SSR. I numeri ai nodi sono i valori bootstrap.

Il dendrogramma consiste di due gruppi principali. Il primo gruppo contiene le accessioni VU-CU196 (Scallop) e BGU8238 (Acorn) appartenenti a *C. pepo* subsp. *texana*. L'altro gruppo presenta tutte le accessioni appartenenti a *C. pepo* subsp. *pepo* ed è suddiviso a sua volta in diversi sottogruppi. Un sottogruppo raggruppa le accessioni CL-CU19, ZU-TRF, BBC6, ZU-NVM, ZU-QUI, ZU-MIK, ZU1805, ZU-GIO e MU-CU16 la cui posizione è supportata da un valore bootstrap che supera 700. Tutte queste accessioni appartengono al gruppo zucchini tranne CL-CU19 che appartiene, per la forma del frutto al gruppo dei vegetable marrow. Gli altri sottogruppi sono costituiti indifferentemente da accessioni, appartenenti a zucchini, cocozelle, vegetable marrow e pumpkin, con un valore bootstrap basso. Esternamente ai due gruppi principali si trova l'altra accessione della subsp. *texana*, NLS5227 (Crookneck), che sembra essere più ancestrale.

4.6 Studio genetico della resistenza allo ZYMV: analisi della popolazione segregante

Al fine di verificare la putativa associazione di un marcatore con la resistenza allo ZYMV è stata costituita un'appropriata popolazione segregante.

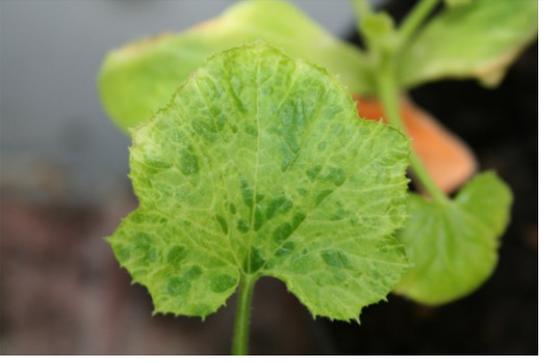
È stato effettuato l'incrocio tra la varietà ZU-TRF e la linea isogenica ZU-381 portante la resistenza allo ZYMV. Si è poi proceduto all'autofecondazione di una pianta F1 per ottenere la progenie segregante F2.

Poiché la resistenza al virus sembra essere dovuta all'interazione di tre geni (Paris e Cohen, 2000) i saggi in vivo sono stati effettuati su una progenie di 204 piante F2 ottenute dall'incrocio.

A partire da 7 giorni dopo l'inoculo, sono stati effettuati i controlli valutando la comparsa dei sintomi sulle foglie vere di tutte le piante F2 e dei due parentali, utilizzati come controllo.

I primi sintomi, riconducibili a sicure risposte all'infezione virale, sono comparsi con intensità e caratteristiche diverse sulle tre tesi:

<p style="text-align: center;">ZU-381 <i>Controllo tollerante</i></p> <p>Lieve maculatura puntiforme gialla o aree clorotiche o clorosi nervale</p>	
<p style="text-align: center;">ZU-TRF <i>Controllo suscettibile</i></p> <p>Malformazione fogliare o mosaico con bollosità o mosaico paranervale</p>	

<p style="text-align: center;">Progenie F2 Caso A</p> <p>Malformazione fogliare o mosaico con bollosità o mosaico paranervale</p>	
<p style="text-align: center;">Progenie F2 Caso B</p> <p>Maculatura gialla clorotica, di intensità variabile, o assenza di sintomi</p>	

L'andamento dell'infezione è stata monitorata fino allo sviluppo della 6-7^a foglia vera per esprimere un giudizio sulla *performance* delle piante F2, in particolare per quelle piante che hanno mostrato un comportamento di tolleranza simile al controllo ZU-381.

È stato eseguito il saggio sierologico ELISA e tutte le piante delle tre tesi, indipendentemente dalla presenza o meno dei sintomi, sono risultate infette da ZYMV sviluppando un'intensa reazione sierologica (colorazione gialla) rispetto al controllo sano (pianta di zuccina 'Romanesca' allevata nella serra CRAPAV).

Il risultato ottenuto non conferisce indicazioni significative sulla valutazione delle piante; esso conferma comunque la caratteristica di "tolleranza" piuttosto che di resistenza a ZYMV da parte delle piante F2 che sono apparse asintomatiche o mostranti sintomi lievi.

Sulla base delle reazioni all'infezione di ZYMV da parte dei due parentali ZU-381 (tollerante) e ZU-TRF (suscettibile) per le piantine F2 oggetto di valutazione, sono stati individuati tre tipologie comportamentali verso l'infezione. Come schematizzato in Tabella 24 circa il 30% della progenie F2 (55 piante) ha mostrato lo stesso comportamento del parentale suscettibile ZU-TRF con malformazioni, mosaico e riduzione dello sviluppo. Il restante 70% (127 piante) è stato classificato come tollerante con la seguente distinzione: un primo gruppo di 107 piante ha mostrato lo stesso comportamento dell'altro parentale tollerante ZU-381 con alternanza di foglie asintomatiche e foglie sintomatiche con maculature clorotiche e/o lievi malformazioni oppure sviluppo sintomatico

iniziale (1-3^a foglia) e successivo sviluppo di foglie asintomatiche; l'altro gruppo di 20 piante non ha mostrato sintomi macroscopici su tutte le foglie osservate.

La segregazione nella F2 è in accordo ($P=0.01$) con il rapporto atteso di 45 resistenti su 19 suscettibili. Questo rapporto 45:19 è stato ottenuto assumendo che sono coinvolti 3 geni complementari dominanti nella resistenza allo ZYMV (Tabella 24).

Tab. 24. Segregazione e suscettibilità allo ZYMV nell'incrocio tra ZU-TRF con ZU-381

<i>Generazione</i>	<i>Descrizione</i>	<i>Totale</i>	<i>Resistenti</i>	<i>Suscettibili</i>	<i>Rapporto atteso</i>	χ^2	<i>P</i>
	♀x♂						
F2	ZU-TRF	204	127	55	45:19	6.34	0.01
	x			+			
	ZU-381			22 morti			

La progenie è stata campionata al termine dei saggi di resistenza in vivo ed è stato estratto il DNA. Di conseguenza è stata analizzata con i marcatori SCAR e non è stata trovata un'associazione tra il marcatore e la resistenza perché in alcune piante risultate tolleranti o resistenti non si ha la presenza della banda di 1200 bp.

5. Discussioni

Per iniziare un programma di miglioramento genetico in zucchini è importante conoscere la natura della diversità genetica all'interno e tra i diversi gruppi della specie *C. pepo*. Lo studio della diversità genetica è stato da sempre un obiettivo centrale del miglioramento genetico delle specie coltivate in quanto consente l'analisi della variabilità genetica intracultivar e la loro identificazione, l'introggressione di geni utili dal germoplasma disponibile alle specie coltivate, la ricostruzione della storia evolutiva e del processo di domesticazione delle specie e la definizione delle distanze genetiche tra di esse.

Inoltre, il lavoro per valutare le relazioni genetiche tra i gruppi di cultivar è essenziale per individuare le popolazioni di origine al fine di generare nuove linee che potrebbe produrre ibridi superiori massimizzando l'espressione di eterosi. Si assume che la superiorità della combinazione ibrida è maggiore se i due genitori sono geneticamente più distanti (Hallauer e Miranda, 1988). La prima fase per ottenere ibridi con caratteri migliorati prevede il reperimento di una popolazione di partenza che presenta i geni in grado potenzialmente di contribuire al raggiungimento dell'ideotipo di interesse cioè l'identificazione di una popolazione dalla quale derivare linee pure. In questa tesi sono stati valutati diversi caratteri morfologici riportati nelle linee guida delle schede del CPVO di Cucurbita. Queste schede riportano i descrittori fondamentali richiesti dalla legge del 76, che ha previsto l'istituzione obbligatoria dei registri di varietà per le specie ortive aventi lo scopo di permettere l'identificazione delle stesse. La scheda ufficiale del CPVO per lo zucchini prende in considerazione ben 81 caratteri e ai fini dell'iscrizione bisogna accertarsi che ogni varietà si distingua per uno o più caratteri importanti dalle altre varietà iscritte, che essa sia sufficientemente omogenea e stabile nei suoi caratteri essenziali e che abbia un valore agronomico e di utilizzazione soddisfacente.

Di questi caratteri sono stati considerati solo quelli morfologicamente importanti per gli agricoltori e i consumatori, che permettono di dividere le varietà in gruppi e che rimangono stabili indipendentemente dal luogo di coltivazione. Alcuni riguardano lo stadio vegetativo e altre le caratteristiche del frutto.

Il portamento eretto con gli internodi corti facilita il lavoro di campo e la raccolta. Tutte le piante reperite in questo lavoro in Italia mostrano tale portamento indicando l'importanza del carattere. Sembra che la selezione e la stabilizzazione del gene per il portamento eretto sia iniziato 200 anni fa nel gruppo cocozelle. L'altra caratteristica vegetativa valutata è stata la mancanza di ramificazioni che comporta una più veloce raccolta dei frutti, che altrimenti sarebbe intralciata dal fogliame. Questo carattere sembra essere assente in molte delle cultivar analizzate. La maggior parte delle

accessioni analizzate differisce per la presenza o l'assenza di ramificazioni e macchie argentee sulle foglie, la profondità delle incisioni delle lamine fogliari e il colore dei frutti. Queste caratteristiche sono sotto il controllo monogenico o oligogenico (Paris e Brown, 2005) e quindi, non dovrebbe essere reali indicatori dell'affinità genetica. Altre importanti componenti della qualità dei frutti di zucchini sono la forma e il colore, che variano in funzione dell'uso culinario dei consumatori delle diverse regioni. Genotipi soddisfacenti sono stati identificati anche per questo carattere. La forma dei frutti è un carattere poligenico che può riflettere le relazioni genetiche esistenti (Paris, 1986).

Al fine di produrre ibridi economicamente validi, alcune cultivar reperite, caratterizzate e ritenute di maggiore interesse sono state autofecondate operando una selezione secondo lo schema riportato in Figura 6. Le progenie F3 sono state allevate a pianta-fila e ogni fila ha costituito una famiglia. A partire dalla F3 molti loci hanno raggiunto l'omozigosi e di conseguenza, molte famiglie si sono presentate omogenee, mentre altre hanno mostrato una variabilità genetica residua da analizzare ulteriormente. In questo modo si sono delineate le prime differenze tra le famiglie. Alla fine dei tre anni sono state valutate 38 famiglie e 10 sono risultate omogenee. Il processo di autofecondazione continuerà fino ad ottenere delle linee pure. Tale processo è favorito dal fatto che non è stata riportata in *Cucurbita pepo*, depressione da inbreeding in seguito ad autofecondazioni (Haber, 1928; Scott, 1934). Nella fase finale del programma le linee pure verranno valutate mediante prove di progenie per l'attitudine alla combinazione generale (ACG) e specifica (ACS). L'eterosi rilevata in *C. pepo* ha spinto le aziende agricole ad orientarsi verso l'uso di ibridi di zucchini che garantisce livelli produttivi elevati e costanti (Wehner, 1999). Infatti, molti di questi ibridi superano i loro equivalenti a libera impollinazione, appartenenti allo stesso gruppo, per tutte le caratteristiche agronomiche quali resa, precocità, vigore, uniformità ed adeguata resistenza ad alcune malattie in campo (Paris, 2008).

Tuttavia, negli ultimi anni si è affermato per i mercati locali un diverso orientamento rivolto alla valorizzazione dei prodotti tipici in quanto la coltivazione di ibridi commerciali ha portato alla standardizzazione delle produzioni, l'omologazione degli aspetti qualitativi ed organolettici, la perdita del tradizionale legame fra territorio, tradizioni e abitudini alimentari. Questi ecotipi rappresentano prodotti di nicchia caratterizzati dall'aver un sapore intenso peculiare e conservano caratteristiche qualitative che si stanno perdendo nelle moderne cultivar. Per questo motivo un obiettivo della presente tesi è stato quello di intraprendere un programma di miglioramento genetico dello zucchini San pasquale, ecotipo con caratteristiche organolettiche generalmente elevate che presenta una buona fetta di mercato in Campania ma la sua suscettibilità rappresenta oggi il limite principale della difficile coltivazione. L'introduzione di resistenze ai principali patogeni in questi ecotipi potrebbe salvaguardarne la loro coltivazione futura. Le varietà resistenti a patogeni

producono notevoli vantaggi non solo economici ma anche ecologici in quanto riducono gli apporti di fitofarmaci e meglio si adattano ai sistemi produttivi biologici. Il processo di introduzione di resistenza a patogeni nelle varietà coltivate richiede tempi lunghi. In particolare, è indispensabile conoscere la base genetica di tali resistenze, identificare le fonti di resistenza e pianificare lo schema di incroci. Inoltre, alcuni tipi di resistenza a determinazione poligenica sono di difficile introduzione e le resistenze introdotte non sono sempre stabili nel tempo. Il raggiungimento di un buon livello di omogeneità nella varietà San Pasquale, attuando due cicli di autofecondazione, ha dato l'avvio ad un programma di incroci per trasferire la resistenza a ZYMV, WMV e oidio che continuerà nei prossimi anni.

L'identificazione della resistenza ai patogeni è molto importante nei materiali di partenza per effettuare programmi di miglioramento genetico. Tuttavia, effettuare saggi in vivo per la resistenza risulta particolarmente difficile e laborioso. Infatti, è necessario disporre del patogeno e selezionare i ceppi più diffusi nelle principali regioni di coltivazione della coltura. Inoltre, per la moltiplicazione del patogeno è spesso obbligatorio disporre di piante suscettibili il che richiede enormi spazi come nel caso del fungo responsabile dell'oidio. I saggi in vivo devono essere condotti su piante in particolari fasi fenologiche e in ambiente controllato per il mantenimento di temperature, umidità e luce necessario per lo sviluppo del patogeno.

Una prima caratterizzazione per la resistenza a *Erysiphe chicoracearum*, ZYMV, WMV e CMV, è stata effettuata sul germoplasma in studio. Purtroppo solo 3 genotipi hanno mostrato sintomi lievi o assenza di sintomi a uno o più patogeni e per questo motivo particolare cura è stata data alla selezione di progenie derivanti da questi genotipi. In esecuto ai rilievi visivi sulle piante inoculate con i virus, per tutte le piante sono stati effettuati i saggi immunologici. Tutte le piante indipendentemente dalla presenza o meno dei sintomi sono risultate infette, indice questo di "tolleranza" piuttosto che di resistenza ai virus. La tolleranza permette ad una varietà di limitare o recuperare gli eventuali danni causati dall'attività di uno specifico patogeno. La valutazione della tolleranza non sempre si può effettuare usando le inoculazioni artificiali. Infatti, con questo procedimento viene trasferito un numero di particelle virali di molto superiore a quello che si verifica in natura mediante la trasmissione per afide. Una elevata carica virale sottopone la pianta a elevate condizioni di stress limitando gli effetti dei meccanismi di difesa naturale posseduti dalla stessa. Pertanto, è sempre necessario procedere a valutazioni in ambienti naturali per stimare il reale grado di tolleranza ai patogeni saggiati.

I moderni strumenti della genetica molecolare e della genomica hanno contribuito agli studi della diversità genetica, permettendo di affiancare ai dati tradizionalmente usati, quali dati morfologici, quelli dei marcatori molecolari del DNA, estremamente informativi.

Nel presente lavoro di tesi sono stati utilizzati tre classi di marcatori: AFLP, RAPD e SSR.

L'analisi AFLP ha mostrato la più alta percentuale di bande polimorfiche, circa il 97%, molto di più di quello osservato con la stessa tecnica in studi precedenti in accessioni di *C. pepo* (Ferriol et al., 2003; Paris et al., 2003). Questo risultato potrebbe essere attribuito alla diversa sensibilità del metodo di visualizzazione usato. Nel nostro lavoro è stata utilizzata l'elettroforesi capillare che ha sicuramente una risoluzione maggiore dell'elettroforesi su gel di acrilammide. Il numero di bande specifiche alle singole accessioni osservate con questa tecnica è variato da 15 a 45 con una media di 27 per primer. Questo dato è molto interessante in quanto, queste bande specifiche sono potenzialmente utili per identificare e caratterizzare varietà (Ercolano et al., 2008).

Come si può osservare dal dendrogramma, ottenuto con l'analisi AFLP (Figura 11), le cultivar a libera impollinazione appartenenti al gruppo delle cocozelle, con frutti lunghi e bulbosi, si raggruppano separatamente da quelle con frutti uniformemente cilindrici appartenenti al gruppo zucchini. La separazione tra cocozelle e zucchini è stata mostrata anche in precedenti studi (Katzir et al., 2000; Ferriol et al., 2003; Paris et al., 2003, 2004). Nessuno dei 6 zucchini ibridi si raggruppa con le cultivar a libera impollinazione appartenente allo stesso gruppo e con le linee isogeniche resistenti; infatti, essi formano un cluster con le cocozelle a libera impollinazione indicando che il loro genoma è più simile alle cocozelle che al gruppo zucchini. Le linee isogeniche ZU-381, la cui resistenza allo ZYMV, dovuta a tre geni, è stata introgressa da *C. moschata* "Menina", e ZU-968, resistente all'oidio, sono state sviluppate mediante 6 generazioni di re-incroci (Paris e Cohen 2000; Cohen et al., 2003). Sebbene si raggruppano con il parentale ricorrente ZU-TRF, la loro similarità è risultata essere minore dell'80%. Questa è minore della similarità che ci si dovrebbe aspettare dopo 6 cicli di re-incrocio, indicando che il genoma dei parentali donatori è presente in una quantità maggiore di quella aspettata, ma sufficiente a mostrare una localizzazione nello stesso raggruppamento.

Anche l'analisi morfologica ha mostrato delle differenze tra ciascuna delle due linee isogeniche con il parentale ricorrente, come una minore uniformità nella forma cilindrica dei frutti e una maggiore punteggiatura dei frutti stessi.

Un altro risultato sorprendente è l'alta similarità tra gli ibridi resistenti, indipendentemente dalla forma del frutto e dalla ditta sementiera di provenienza. Ciò può essere attribuito, in parte, all'uso della stessa fonte di resistenza da parte delle diverse ditte sementiere. Gli ibridi resistenti allo ZYMV e al WMV sono stati sviluppati utilizzando la stessa accessione resistente "Nigerian Local" di *C. moschata* (Provvidenti, 1997). Tuttavia, questa da sola non può spiegare il loro elevato grado di similarità genetica, dato che la resistenza ai diversi virus è conferita da un singolo gene dominante (Munger e Provvidenti, 1987; Brown et al., 2003). Se una porzione

considerabile del genoma di *C. moschata* è presente in tutti i genotipi resistenti, allora, l'alta similarità degli ibridi resistenti e la similarità inferiore al previsto delle linee isogeniche resistenti al loro parentale ricorrente indica che c'è una certa difficoltà ad eliminare il background del parentale donatore. In pomodoro, i marcatori AFLP rilevano preferenzialmente polimorfismi intorno alle regioni centromeri e telomeriche dove la ricombinazione tende ad essere soppressa (Haanstra et al., 1999; Saliba-Colombani et al., 2000). I geni per le resistenze alle malattie in *Cucurbita* potrebbero essere concentrati in queste porzioni del genoma.

Di conseguenza, la caratterizzazione molecolare potrebbe essere utile non solo per l'identificazione e lo studio delle comuni origini del germoplasma ma anche per valutare lo stadio di introgressione di caratteri di interesse, e fornire possibili vie per superare le difficoltà di introgressione.

Un buon livello di polimorfismo tra le 17 cultivar è stato osservato anche con marcatori RAPD. In studi precedenti condotti in *Cucurbita* è stato riportato un livello simile di polimorfismo mediante RAPD. Baranek et al. (2000) ha trovato un polimorfismo medio di 42,5% e 64,1% tra 6 genotipi australiani di *C. pepo* e in una collezione di accessioni di *C. moschata*, rispettivamente. Anche nelle specie di *Cucumis* per questa classe di marcatori è stato riportato un polimorfismo da moderato ad alto (Garcia et al. 1998). Come nel caso degli AFLP, sono state identificate un buon numero di bande cultivar-specifiche. Questi risultati confermano che i RAPD possono essere usati per effettuare un'analisi preliminare per stimare la variabilità genetica tra e all'interno delle specie *Cucurbita* (Stachel et al. 1998; Baranek et al. 2000).

L'analisi con i marcatori SSR è stata condotta su una collezione più ampia con l'obiettivo di quantificare la diversità genetica e conoscere le relazioni genetiche tra le accessioni di una collezione di landrace spagnole e cultivar italiane appartenenti entrambi a *C. pepo*.

L'analisi SSR ha mostrato un polimorfismo medio del 97% tra le accessioni di *C. pepo*. Sono stati ottenuti 193 alleli totali con in media di 3,2 alleli per coppia di primer. Come si può osservare dal dendrogramma (Figura 17), ci sono due distinti gruppi. Il primo gruppo include le accessioni della subsp. *texana* mentre il secondo include tutte quelle della subsp. *pepo*. Questi risultati supportano l'ipotesi di una domesticazione indipendente per le differenti sottospecie di *C. pepo*, suggerita da Decker (1988) e Kirkpatrick e Wilson (1988), e confermata da precedenti studi molecolari usando alloenzimi (Decker, 1985), marcatori RAPD (Decker-Walters et al., 2002) e comparando il DNA cloroplastico (Wilson et al., 1992) e quello mitocondriale (Sanjur et al., 2002).

Anche con questa classe di marcatori è stata evidenziata un'elevata similarità tra gli ibridi resistenti appartenenti al gruppo zucchini, come con l'analisi AFLP, indipendentemente dalla ditta sementiera di provenienza. Ciò può essere attribuito, come discusso in precedenza, all'uso della stessa fonte di resistenza, "Nigerian Local" di *C. moschata*, da parte delle diverse ditte sementiere. Inoltre, le

accessioni di pumpkin che è il morfotipo più antico e variabile, sono risultate disperse lungo tutto il dendrogramma. In generale, all'interno della sottospecie *pepo*, non è stato osservato un raggruppamento in base al morfotipo in accordo con il risultato riportato da Ferriol et al., (2003).

I microsatelliti sono molto abbondanti nel genoma e permettono di rilevare alti livelli di polimorfismo, sono codominanti, iperallelici e adatti all'automazione, e quindi ideali per un ampio spettro di applicazioni nel campo vegetale. Gli unici svantaggi risiedono nei costi e nelle difficoltà a svilupparli perché il disegno dei primer non sempre è possibile a causa della posizione del microsatellite. L'utilizzo degli EST come fonte di identificazione di SSR è stato proficuo in numerose specie, come grano, arabidopsis, riso, mais (Scott et al., 2000; Eujayl et al., 2002; Holton et al., 2002; Morgante et al., 2002). Gli EST costituiscono un'ottima fonte di marcatori perché sono associati fisicamente con regioni codificanti del genoma, e questo può migliorare la valutazione del germoplasma poiché analizzano la variabilità a livello di geni trascritti con funzione nota.

Le collezioni di EST di Cucurbita sono molto limitate. Fin ora nelle repository pubbliche sono disponibili solo 120 EST di *Cucurbita*, 9 dei quali includono un SSR nella sequenza (Gong et al., 2008) per cui i dati ottenuti in questa tesi aggiungono informazioni molto importanti per l'analisi genomica di questa specie.

I marcatori SSR-EST hanno mostrato un livello di polimorfismo simile agli SSR genomici (83% vs 90%), sebbene è ben documentato che gli SSR-EST sono meno polimorfici (Cho et al., 2000; Thiel et al., 2003; Eujayl et al., 2002). Questi, contrariamente a quelli genomici che non sono facilmente trasferibili ad altre specie (Roder et al., 1995; Sourdille et al., 2001a) presentano un più alto livello di trasferibilità (26-55%, Holton et al., 2002). Inoltre, è stato visto che il numero di ripetizioni non incrementa il livello di polimorfismo in accordo con Nicot et al. (2004).

Comparando i risultati ottenuti dalle analisi effettuate con i tre marcatori AFLP, SSR e RAPD, sembra che i primi due metodi sono più efficienti nel rilevare polimorfismi (97 e 87% vs 66% rispettivamente), nell'automazione del sistema, nell'interpretazione dei dati e nella loro riproducibilità. Infatti, la bassa riproducibilità dei RAPD rappresenta uno dei limiti del sistema (Karp et al., 1997). Inoltre, le bande putativamente simili originate dai RAPD in differenti individui non sono necessariamente omologhe sebbene hanno la stessa dimensione in coppia di basi. Questa situazione potrebbe portare a risultati non corretti nell'analisi delle relazioni genetiche. I dati riportati da altri autori confermano i nostri risultati (Garcia-Mas et al. 2000; Gupta et al., 2003). In particolare, i marcatori AFLP sono abbastanza ben distribuiti nel genoma di due Cucurbita, melone (Perin et al., 2000) e cetriolo (Bradeen et al., 2001). Gli SSR hanno anche, una più alta probabilità di essere in linkage disequilibrium con geni/QTL che controllano caratteri economici, dimostrando così di essere più utili in studi di associazione.

L'informazione sui polimorfismi ottenuta usando AFLP, RAPD e SSR potrà essere utile per studiare le relazioni genetiche tra genotipi agronomicamente importanti e predire incroci che potrebbero produrre ibridi con elevate caratteristiche in futuri lavori di miglioramento genetico. L'uso dei marcatori molecolari ha suscitato notevole interesse anche nella selezione assistita (MAS) in quanto permette una selezione precoce per il carattere di interesse, non più a livello fenotipico ma a livello genotipico.

In particolare, l'analisi mediante i marcatori RAPD ha permesso di individuare una banda presente nella linea isogenica ZU-381, tollerante allo ZYMV, e mancante in quella suscettibile ZU-TRF. Tale marcatore RAPD è stato convertito in SCAR e utilizzato per analizzare la progenie segregante F2 ottenuta dall'incrocio tra la linea suscettibile con quella tollerante al fine di valutarne l'associazione con la resistenza al virus. La progenie è stata saggiata in vivo per la resistenza. Alcuni studi hanno mostrato che la resistenza a ZYMV in *C. moschata* è conferita da un singolo gene dominante, *Zym* (Gilbert-Albertini et al., 1993; Paris et al., 1988). Tuttavia, i risultati di segregazione nella progenie F2, non fittano con questa ipotesi ma confermano l'ipotesi formulata da Paris e Cohen (2000). I due autori ipotizzano che la resistenza a ZYMV è controllata da tre geni dominanti che segregano in rapporto di 45 resistenti:19 suscettibili. Uno di questi geni, *Zym-1*, deve essere presente per l'espressione della resistenza. Gli altri due geni dominanti, *Zym-2* e *Zym-3*, sono complementari allo *Zym-1*. È evidente che solo la presenza in contemporanea di *Zym-1* e *Zym-2* e/o *Zym-3* determina la resistenza. La presenza del marcatore SCAR, solo in alcune delle piante F2 risultate tolleranti al saggio in vivo, potrebbe essere spiegata dall'ipotesi che tale marcatore è associato a uno dei due geni secondari *Zym-2* e *Zym-3*, non sempre presenti in contemporanea nella progenie. È stato anche riportato in letteratura che piante considerate resistenti, dopo 20-22 giorni dall'inoculazione hanno mostrato sintomi gravi. La possibile spiegazione è che per l'espressione completa della resistenza è necessaria la presenza in contemporanea dei tre geni. Anche in melone, *Cucumis melo*, sono stati identificati tre geni che conferiscono resistenza allo ZYMV (Danin-Poleg et al., 1997). In questa specie, un gene dominante "major gene" conferisce la resistenza (Pitrat e Lecoq, 1984) ma, a seconda dell'incrocio, è stato osservato che sono necessari altri geni dominanti addizionali per l'espressione della stessa (Danin-Poleg et al., 1997). Ulteriori caratterizzazioni saranno necessarie per chiarire il meccanismo di funzionamento della resistenza a ZYMV nelle Cucurbitaceae.

Trovare un marcatore associato al carattere resistenza potrebbe offrire notevoli vantaggi quali effettuare l'analisi di resistenza su DNA di giovani piantine senza prove distruttive e senza aspettare la fase fenologica specifica e inoltre, permetterebbe di analizzare i campioni contemporaneamente

per più resistenze, accelerando i tempi di selezione e riducendo gli spazi necessari per effettuare i saggi di resistenza in vivo.

6. Conclusioni

La ricerca si è focalizzata sul miglioramento genetico dello zuchino per caratteri morfologici e di resistenza a stress biotici. In particolare:

1. Sono state caratterizzate diverse accessioni di zuchino raccolte durante lo svolgimento della tesi per caratteri morfologici rilevanti. La caratterizzazione fenotipica ha permesso di raggrupparle in base al morfotipo.
2. Sono state valutate la resistenza o tolleranza ai virus, ZYMV, WMV e CMV e all'oidio, in alcune delle accessioni raccolte. Tre genotipi, ZU-MIK, ZU-QUI, e ZU-OBS, hanno mostrato sintomi lievi o assenza di sintomi a uno o più virus.
3. È stato sviluppato un programma di selezione basato su autofecondazioni che ha permesso di ottenere 10 linee omogenee in F3 da utilizzare nella costituzione di ibridi commerciali. A tal fine è stato utilizzato un metodo di selezione fenotipica specifico per i diversi caratteri analizzati.
4. Le accessioni raccolte sono state analizzate mediante marcatori AFLP, RAPD e SSR permettendo di analizzare le potenzialità dei tre metodi molecolari. Il metodo AFLP ha mostrato un livello di polimorfismo più elevato (97% vs 87 e 66% degli SSR e RAPD). Il metodo SSR-EST ha permesso di ottenere dati sull'organizzazione genomica di geni specifici.
5. Sono stati ottenuti alberi filogenetici per valutare la variabilità genetica e le relazioni genetiche presenti tra le diverse accessioni analizzate. Il livello di introgressione di porzioni selvatiche contenenti geni di resistenza è stato maggiore di quello atteso.
6. È stato identificato un marcatore RAPD putativamente associato con la resistenza a ZYMV convertito successivamente in marcatori CAPS e SCAR.
7. È stata ottenuta e caratterizzata per resistenza a ZYMV una progenie segregante F2 tra una linea suscettibile e una isogenica resistente. Tale progenie ha confermato il rapporto di segregazione atteso quando sono coinvolti tre geni dominanti e complementari nel meccanismo della resistenza. Purtroppo l'analisi con i marcatori SCAR non ha mostrato associazione con la resistenza ma ulteriori studi devono essere effettuati per poter valutare l'effettivo ruolo dei geni coinvolti.

7. Bibliografia

- Allard, R.W. 1960. *Principles of Plant Breeding*, John Wiley & Sons, New York, pp. 43-49
- Andres, T. C. 1987. *Cucurbita fraterna*, the closest wild relative and progenitor of *C. pepo*. Cucurbit Genet Coop. Rep. 10: 69-71
- Baggett, J. R. 1972. Open growth habit in summer squash, HortScience 7:288
- Baranek, M., Stift, G., Vollmann, J., Lelley, T. 2000. Genetic diversity within and between the species *Cucurbita pepo*, *C. moschata* and *C. maxima* as revealed by RAPD markers. CGC Rpt 23:73-77
- Blanca, J., Canizares, J., Ziarsolo, P., Roig, C., Gomez, P., Nuez, F., Pico, B. 2010. High-throughput gene and SNP discovery in *Cucurbita* ssp. Congreso 2nd International Symposium on Genomics of Plant genetic resources. Bolonia. Libro de abstract
- Bradeen, J.M., Staub, J.E., Wye, C., Antonise, R., Peleman, J. 2001. Towards an expanded and integrated linkage map of cucumber (*Cucumis sativum* L.). Genome 44:111-119
- Brown R.N., Myers J.R. 2000. Searching for molecular markers linked to ZYMV resistance in squash. Cucurbit Genet Coop Rep 23:69-70
- Brown, R.N., Bolanos-Herrer, A., Myers, J.R., Jahn, M.M. 2003. Inheritance of resistance to four cucurbit viruses in *Cucurbita moschata*. Euphytica 129:253-258
- Buntjer J.B. 2000. Phylogenetic computer tools, version 1.2 Wageningen University, The Netherlands
- Cho, Y.G., Ishii, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, L., McCouch, S.R., Park, W.D., Ayres, N., Cartinhour, S. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GeneBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 100:713-722
- Cohen, R., Hanan, A., Paris, H.S. 2003. Single-gene resistance to powdery mildew in zucchini squash (*Cucurbita pepo*). Euphytica 130:433-441
- Cohen, R., Leibovich, G., Shtienberg, D., and Paris, H. S. 1993. Variability in the reaction of squash (*Cucurbita pepo*) to inoculation with *Sphaerotheca fuliginea* and methodology of breeding for resistance, Plant Pathology 42: 510-516
- Contin, M. E. 1978. *Interspecific Transfer of Powdery Mildew Resistance in the Genus Cucurbita*. Ph.D. thesis, Cornell University, Ithaca, New York
- Culpepper, C.W. 1937. Composition of summer squash and its relationship to variety, stage of maturity, and use as a food product, Food Res. 2: 289-303
- Curtis, L. C. 1939. Heterosis in summer squash (*Cucurbita pepo*) and the possibilities of producing F₁ hybrid seed for commercial planting. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 37: 827-828

- Danin-Poleg, Y., Paris, H.S., Cohen, S., Rabinowitch, H.D., Karchi, Z. 1997. Oligogenic inheritance of resistance to zucchini yellow mosaic virus in melons. *Euphytica* 93:331-337
- Decker, D.S. 1985. Numerical analysis of allozyme variation in *C. pepo*. *Econ Bot* 39:300-309
- Decker, D.S. 1988. Origin(s), evolution, and systematics of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Econ Bot* 42:4-15
- Decker-Walters D.S., Walters T.W., Posluzny U, Kevan P.G. 1990. Genealogy and gene flow among annual domesticated species of *Cucurbita*. *Can J Bot* 68: 782-789
- Decker-Walters, D.S., Staub, J.E., Chung, S.M., Nakata, E., Quemada, H.D. 2002. Diversity in free-living populations of *C. pepo* (Cucurbitaceae) as assessed by Random Amplified Polymorphic DNA. *Syst Bot* 27:19-28
- Diez, M. J., Pico, B., and Nuez, F. (Compilers), 2002. *Cucurbit Genetic Resources in Europe*, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 58pp
- Emerson, R. A. 1910. The inheritance of sizes and shapes in plants. *Amer. Nat.* 44: 739-746
- Ercolano, M.R., Carli, P., Soria, A., Cascone, A., Fogliano, V., Frusciante, L., Barone, A. 2008. Biochemical, sensorial and genomic profiling of traditional Italian tomato varieties. *Euphytica* 164:571-582
- Eujayl, I., Sorrells, M.E., Baum, M., Wolters, P., Powell, W. 2002. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theor Appl Genet* 104:339-407
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle
- Ferriol, M. Picò, B., Nuez, F. 2003. Genetic diversity of a germoplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 107:271-282
- Fulton, T.F., Chunwongse, J., Tanksley, S.D. 1995. Micropep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13:207-209
- Garcia, E., Jamilena, M., Alvarez, J.I., Arnedo, T., Oliver, J.L., Lozano, R. 1998. Genetic relationships among melon breeding lines revealed by RAPD markers and agronomic traits. *Theor Appl Genet* 96:878-885
- Garcia-Mas, J., Oliver, M., Gomez-Paniagua, H., Vicente, M.C. 2000. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theor Appl Genet* 101:860–864
- Gilbert-Albertini, F., Lecoq, H., Pitrat, M., Nicolet, J.L. 1993. Resistance of *Cucurbita moschata* to Watermelon mosaic virus type 2 and its genetic relation to resistance to zucchini yellow mosaic virus. *Euphytica* 69:231-237
- Gong, L., Stift, G., Kofler, R., Pachner, M., Lelley, T. 2008. Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L. *Theor Appl Genet* 117:37-48

- Gray, A., and Trumbull, J.H. 1883. Review of DeCandolle's origin of cultivated plants, Amer. J.Sci. 25:370-379
- Gupta, P.K., Rustgi, S., Sharma, S., Singh, R., Kumar, N., Balyan, H.S. 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. Mol Gen Genomics 270:315-323
- Gwanama C., Labuschagne M.T., Botha A.M. 2000. Analysis of genetic variation in *Cucurbita moschata* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, Euphytica 113: 19-24
- Haanstra, J.P.W., Wye, C., Verbakel, H., Meijer-Dekens, F., Van den Berg, P., Odinet, P., Van Heusden, A.W., Tanksley, S.D., Lindhout, P., Peleman, J. 1999. An integrated high density RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicon esculentum* x *L. Pennellii* F2 populations. Theoretical and Applied Genetics 99:254-271
- Haber, E.S. 1928. Inbreeding the table Queen (Des Moines) squash. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 25:111-114
- Hallauer, A.R., Miranda Filho, J.B. 1988. Quantitative Genetics in maize Breeding 2nd. Iowa State University Press, Ames
- Holton, T.A., Christopher, J.T., McClure, L., Harker, N., Henry, R.J. 2002. Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequenced of barley and wheat. Mol Breed 9:63-71
- Ignart F, Weeden N.F. 1984. Allozyme variation in cultivars of *Cucurbita pepo* L. Euphytica 33: 779-785
- ISTAT 2007. Coltivazioni agrarie – Anno 2007. Istituto nazionale di statistica
- Jahn, M., Murger, H. M. and McCreight, J. D. 2002. Breeding cucurbit crops for powdery mildew resistance, pp 239-248 in: Bélanger, R. R., Bushnell, W. R., Dik, A. J., and Carver, T. L.W., *The powdery mildews a comprehensive treatise*. APS Press, St. Paul, Minnesota
- Karp, A., Edwards, K., Bruford, M., Vosman, B., Morgante, M., Seberg, O., Kremer, A., Boursot, P., Arctander, P., Tautz, D., Hewitt, G. 1997. Newer molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges. Nat Biotechnol 15:625-628
- Katzir, N., Tadmor, Y., Tzuri, G., Leshzeshen, E., Mozes-Daube, N., Danin-Poleg, Y., Paris, H.S. 2000. Further ISSR and preliminary SSR analysis of relationships among accessions of *Cucurbita pepo*. In: Katzir N, Paris H.S (eds) proceedings of the cucurbitaceae 2000. Acta Horti 510:433-439
- Kirkpatrick, K.J., and Wilson, H.D. 1988. Interspecific gene flow in *Cucurbita*: *Cucurbita texana* vs *C. pepo*. Am J Bot 75:517-525
- Lira Saade, R., and Montes Hernandez, S. 1994. Cucurbits (*Cucurbita* spp.), In: *Neglected crops: 1492 from a different perspective*, Hernandez Bermejo, J. E., and Leon, J., eds. FAO Plant Production and Protection Series No. 26. FAO, Rome

- McGrath, M. T., and Staniszewska, H. 1996. Management of powdery mildew in summer squash with host resistance, disease threshold-based fungicide programs, or an integrated program. *Plant Disease* 80: 1044-1052
- Merrick, L. C. 1995. Squashes, pumpkins and gourds, in: Smartt, J., and Simmonds, N. W., eds., *Evolution of Crop Plants. 2^{ed} ed.*, Longman Scientific & Technical, London, pp. 97-105.
- Michelmore, R.W., Paran, I., Kesseli, R. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:9828-9832
- Morgante, M., Hanafey, M., Powell, W. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet* 30:194-200
- Munger, H.M., and Provvidenti, R. 1987. Inheritance of resistance to zucchini yellow mosaic virus in *Cucurbita moschata*. *Cucurbit genetics Cooperative Report* 10:80-81
- Murger, H. M. 1990. Availability and use of interspecific population involving *Cucurbita moschata* and *C. pepo*. *Cucurbit Genet Coop. Rep.* 13:49
- Naudin, C. 1856. Nouvelles recherches sur les caracteres specifiques et les varietes des plantes du genre *Cucurbita*. *Ann. Sci. Nat. Bot.* IV 6:5-73, pl. 1-3
- Nei, M., and Li, WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76:5269-5273
- Nicot, N., Chiquet, V., Gandon, B., Amilhat, L., Legeai, F., Leroy, P., Bernard, M., Sourdille, P. 2004. Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs). *Theor Appl Genet* 109:800-805
- Pachner, M., and Lelley, T. 2004. Different genes for resistance to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) in *Cucurbita moschata*, in: *Progress in cucurbit genetics and breeding research, Proceedings of Cucurbitaceae 2004*. Lebeda, A., and Paris, H.S., eds., pp. 237-243
- Paris, H.S. 1986. A proposed subspecific classification for *Cucurbita pepo*. *Phytologia* 61:133-138
- Paris, H.S. 1996. Summer squash: history, diversity, and distribution. *HortTechnol.* 6:6-13
- Paris, H.S. 2000. History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*, in *Horticultural Reviews* 25(2001):71-170, 4 pl., J. Janick, ed., Wiley, New York
- Paris, H.S. 2008. Summer squash. In: J. Prohens, F. Nuez (eds) *Handbook of Plant Breeding, Vegetables I*. New York Springer 351-379
- Paris, H.S., and Brown, R.N. 2005. The genes of pumpkin and squash. *HortScience* 40:1620-1630
- Paris, H.S., and Cohen, S. 2000. Oligogenic inheritance for resistance to zucchini yellow mosaic virus in *Cucurbita pepo*. *Ann. Appl. Biol.* 136:209-214

- Paris, H.S., Cohen, S., Burger, Y., Yoseph, R. 1988. Single-gene resistance to zucchini yellow mosaic virus in *Cucurbita moschata*. *Euphytica* 37:27-29
- Paris, H.S., Portnoy, V., Mosez-Daube, N., Tzuri, G., Katzir, N., Yonash, N. 2004. AFLP, ISSR, and SSR polymorphisms are in accordance with botanical and cultivated plant taxonomies of the highly polymorphic *Cucurbita pepo*. In: Davidson CG and Trehane P (eds), Proceedings of the 26th international Horticultural Congress, 4th International Symposium on the Taxonomy of Cultivated Plants. *Acta Horticulturae* 634:167-173
- Paris, H.S., Yonash, N., Portnoy, V., Mozes-Daube, N., Tzuri, G., Katzir N. 2003. Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) using DNA markers. *Theor Appl Genet* 106:971-978
- Passmore, S.F. 1930. Hybrid vigour in reciprocal crosses in *Cucurbita pepo*. *Ann. Bot.* 48: 1029-1030
- Perin, C., Hagen, L., Dogimont, C., Conto, V., Lecomte, L., Pitrat, M. 2000. Construction of a reference genetic map of melon. In: Katzir, N., Paris, H.S. (eds) Proc Cucurbitaceae 2000. *Acta Hort* 510:367-374
- Perrino, P., Laghetti, G., and Hammer, K. 1988. Collection of plant genetic resources in Italy. 1987. *Kulturpflanze* 36: 377-390
- Pitrat, M., and Lecoq, H., 1984. Inheritance of zucchini yellow mosaic virus resistance in *Cucumis melo* L. *Euphytica* 33:57-61
- Provvidenti, R. 1997. New American summer squash cultivars possessing a high level of resistance to a strain of zucchini yellow mosaic virus from China. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 20:57-58
- Rhodes, A. M. 1964. Inheritance of powdery mildew resistance in the genus *Cucurbita*. *Plant Disease Rptr.* 48: 54-55
- Roder, M.S., Plaschke J., Konig, S.U., Borner, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D., Ganal, M.W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol Gen Genet* 246:327-333
- Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate system, ver. 2.0. Exeter Software publisher, New York
- Saliba-Colombani, V., Causse, M., Gervais, L., Philouze, J. 2000. Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. *Genome* 43:29-40
- Sanjur, O.I., Piperno, D.R., Andres, T.C., Wessel-Beaver, L. 2002. Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of *Cucurbita* (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: implications for crop plant evolution and areas of origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:535-540
- Scott, G. W. 1934. Observation on some inbred lines of bush types of *Cucurbita pepo*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 32:480

- Scott, K.D., Egger, P., Seaton, G., Rossetto, M., Ablett, E.M., Lee, L.S., Henry, R.J. 2000. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theor Appl Genet* 100:723-726
- Sinnott, E. W., and Kaiser, S. 1934. Two types of genetic control over the development of shape. *Bull. Torrey Bot. Club* 61: 1-7
- Smith, B.D. 1997. The initial domestication of *Cucurbita pepo* in the Americas 10,000 years ago. *Science* 276:932-934
- Sokal R.R., and Michener C.D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationship. *University of Kansas Science Bulletin* 38: 1409-1438
- Sourdille, P., Tavaud, M., Charmet, G., Bernard, M. 2001a. Transferability of wheat microsatellites to diploid Triticeae species carrying the A, B, and D genome. *Theor Appl Genet* 103:346-352
- Stachel, M., Csanadi, G., Vollmann, J., Lelley, T. 1998. Genetic diversity in pumpkins (*Cucurbita pepo* L.) as revealed in inbred lines using RAPD markers. *CGC Rpt* 21:48-50
- Stift, G., Pachner, M., Lelley, T. 2003. Comparison of RAPD fragment separation in agarose and polyacrylamide gel by studying *Cucurbita* species. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* 26:62-65
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R.K., Graner, A. 2003. Exploiting EST database for the development and characterization of gene derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 106:411-422
- Torres Ruiz R.A., Hemleben V. 1991. Use of ribosomal DNA spacer probes to distinguish cultivars of *Cucurbita pepo* L. and other Cucurbitaceae. *Euphytica* 53: 11-17.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van der Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414
- Wehner, T.C. 1999. Heterosis in important US vegetable crop. In: J.G. Coors & S. Pandey (eds) *The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops*. ASA-CSSA and SSSA Inc, Madison, Wisconsin 387-397
- Whitaker, T.W. 1947. American origin of the cultivated cucurbits. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 34:101-111
- Wilson, H.D., Doebley, J., Duvall, M. 1992. Chloroplast DNA diversity among wild and cultivated members of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Theor Appl Genet* 84:859-865
- Zraidi, A., Stift, G., Pachner, M., Shojaeiyan, A., Gong, L., Lelley, T. 2007. A consensus map for *Cucurbita pepo*. *Mol. Breed.* 20:375-388