

Caratterizzazione genetica del germoplasma di nocciolo europeo nel Progetto EU SAFENUT

Dna-typing of the european hazelnut germplasm within the EU SAFENUT project

Botta R.⁽¹⁾, Boccacci P.⁽¹⁾, Aramini M.⁽²⁾, Bacchetta L.⁽²⁾, Beltramo C.⁽¹⁾, Cristofori V.⁽³⁾, Drogoudi P.⁽⁴⁾, Marra F.P.⁽⁵⁾, Metzidakis I.⁽⁶⁾, Rovira M.⁽⁷⁾, Sarraquigne J.⁽⁸⁾, Silva A.P.⁽⁹⁾, Solar A.⁽¹⁰⁾, Torello Marinoni D.⁽¹⁾

¹⁾ Dipartimento di Colture arboree (Dcat), Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO), Italia

²⁾ Ente per le Nuove Tecnologie (Enea), l'Energia e l'Ambiente, Casaccia, Roma, Italia

³⁾ Dipartimento di Produzione Vegetale (DIPROV)

⁴⁾ National Agricultural Research Foundation (Nagref), Pomology Institute, Naoussa, Grecia

⁵⁾ Dipartimento Demetra, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia

⁶⁾ National Agricultural Research Foundation (Nagref), Institute of Olive Trees and Subtropical Plants, Crete, Grecia

⁷⁾ Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (Irta), Mas de Bover, Crta, Constantí (Tarragona), Spagna

⁸⁾ Association nationale des producteurs de Noisette (Anpn), Cancon, Francia

⁹⁾ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (Utad), Vila Real, Portogallo

¹⁰⁾ Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Ljubljana, Slovenia

Parole chiave: *Corylus avellana*, cultivar, DNA, SSR, biodiversità

Keywords: *Corylus avellana*, cultivar, DNA, SSR, biodiversity

Abstract

L'Italia e la Spagna rappresentano i principali Paesi produttori di nocciole dell'Unione Europea, insieme con Francia, Portogallo, Slovenia e Grecia. L'Italia, con circa 120.000 t, è il secondo produttore mondiale di nocciole con una superficie totale di circa 72.000 ha. Sebbene esista un ampio e variegato germoplasma, la coltivazione del nocciolo in Europa è basata su un numero limitato di cultivar. Il progetto AGRI GEN RES SAFENUT aveva lo scopo di conoscere e valorizzare le risorse genetiche del nocciolo e del mandorlo per ampliare la piattaforma varietale esistente, salvaguardare la biodiversità e fornire materiale interessante per i programmi di miglioramento genetico. Nel triennio 2007-2010 un totale di 295 accessioni, di cui 166 cultivar provenienti da diversi campi collezione europei e 129 cultivar minori ed ecotipi selezionati (*landraces*) individuati *on-farm*, sono state analizzate mediante l'impiego di un set di 10 marcatori molecolari microsatelliti (SSR) altamente polimorfici.

Le analisi del DNA hanno permesso di verificare l'identità genetica delle accessioni in collezione e l'esistenza di possibili sinonimie tra gli ecotipi individuati, grazie anche al confronto con i profili genetici disponibili nella banca dati del Dipartimento di Colture Arboree di Torino. L'analisi del DNA microsatellite si è rivelata un mezzo efficace per la corretta identificazione delle cultivar ma con qualche limite di fron-

te alle accessioni derivate da mutazione. Questo aspetto sottolinea l'importanza di un approccio integrato che consideri aspetti morfologici, fenologici e molecolari. Il lavoro svolto ha consentito il riordino delle principali collezioni europee e la raccolta di nuovo germoplasma che potrà essere conservato e valorizzato, una volta valutati i dati carpologici e chimici delle produzioni, attraverso l'introduzione in coltura o nel miglioramento genetico.

The European project SAFENUT was aimed at increasing the knowledge on the European germplasm of hazelnut and almond. In this paper the results of the genetic characterisation of the hazelnut germplasm are presented with particular emphasis on the Italian one. A total of 295 accessions, including 129 local landraces rescued on farm and 166 accessions with cultivar names from germplasm collections, were DNA-typed using 10 SSR loci selected for their high polymorphism. The molecular markers identified 77 unique genotypes among the 166 accessions with cultivar names due to several duplications of the same cultivar and to cases of synonymy or mislabelling. For 89 out of 295 accessions the genetic identity was confirmed, while 123 accessions were classified as mislabelled or possible new cases of synonymy. Seventy eight accessions presented a new genotype and 5 where sports of known cultivars. The results enabled the correction of the main European collections and started the process of rescue of new germplasm. Future work will also consider data obtained from chemical and carpological characterisation with the aim of using the genetic resources either for cultivation or as material in breeding programs.

1. INTRODUZIONE

Italia e Spagna sono i principali Paesi produttori di nocchie dell'Unione Europea ed occupano la seconda e quarta posizione a livello mondiale dopo rispettivamente la Turchia e gli Stati Uniti. Altri Paesi produttori sono Francia, Portogallo, Slovenia e Polonia.

In Italia, la superficie coltivata a nocciolo interessava circa 36.000 ha nel 1950, è passata a 50.000 ha nel 1970 e a 70.000 ha nel 1982. Da allora la situazione non è variata di molto fino ad oggi. L'attuale area coltivata ammonta a 72.039 ha (Istat, 2009) con una produzione di 119.344 t in guscio (media del periodo 2005-2010). Quasi tutta la superficie coltivata è ubicata in quattro regioni che rappresentano il 98% della produzione nazionale: Campania, Lazio, Sicilia e Piemonte. Il 33% della superficie nazionale si trova in Campania; le cultivar più importanti sono: “Mortarella” (38%), “San Giovanni” (37%), “Tonda di Giffoni” (12%). Nel Lazio la coltivazione rappresenta il 27% della superficie nazionale investita e si trova intorno ai mon-

ti Cimini, nel viterbese. La cultivar “Tonda Gentile Romana” rappresenta oltre l'85% della produzione locale mentre la varietà “Nocchione” è utilizzata come impollinatore principale (Bignami, 2002).

In Sicilia si trova il 21% dell'area nazionale investita a nocciolo, ma solo parte della superficie viene raccolta (3.800 ha, secondo Alberghina, 2002). La cultivar predominante (chiamata “Siciliana” da Alberghina, 1982) è conosciuta sotto nomi differenti nelle diverse aree; esiste inoltre un certo numero di cultivar minori, alcune delle quali sono utilizzate per impollinare la cultivar principale.

Il Piemonte, con circa 13.000 ha, rappresenta il 17% della superficie nazionale coltivata a nocciolo. La cultivar “Tonda Gentile delle Langhe” è praticamente l'unica diffusa in regione per le sue caratteristiche qualitative di eccellenza.

La specie è anche presente in Liguria, Sardegna, Emilia, Veneto e Calabria che insieme fanno il 2% della produzione nazionale.

In Spagna il nocciolo è coltivato prevalentemente nella provincia di Tarragona (84%). L'area totale investita è pari a circa 12.482 ha con una produzione di 22.432 t. "Negret" è la cultivar principale (80%), ma si stanno diffondendo "Pauetet", "Tonda di Giffoni" e "San Giovanni". Nei corileti sono presenti come impollinatori "Gironell", "Segorbe" e "Vermellet". Cultivar minori sono "Gironell", "Morell", "Grifoll", "Culplà", "Trenet", "Ribet" e "Vermellet".

In Francia il nocciolo è coltivato prevalentemente nelle zone di Cancon (Dipartimento Lot-et-Garonne) e Montauban (Dipartimento Tarn-et-Garonne). L'area interessata è di 3.400 ha rappresentati da corileti intensivi associati alla cooperativa Unicoque. Vi sono, inoltre, circa 100 ha gestiti da produttori indipendenti e 500 ha di impianti tradizionali presenti in Corsica. L'attuale produzione è di 7.500 t per Unicoque (in aumento per l'espansione degli impianti) e di 150-200 t in Corsica. Le cultivar principali sono "Pauetet" (26,7% dell'area), "Corabel" (25,4%), "Ennis" (19,6%), "Segorbe" (13,3%), "Fertile de Coutard" (8,4%). Sono usati come impollinatori: "Meraviglia di Bollwiller" e "Jemtegaard". Cultivar minori: "Butler" (3%) e "Tonda di Giffoni" (3%).

La coltivazione del nocciolo in Grecia è nata a seguito dell'insediamento di immigrati greci provenienti dalla regione del Ponto (Nord della Turchia). Questo è il motivo per cui cultivar di origine turca come "Sivri giaghli" e "Tombul giaghli" sono ancora oggi presenti in questo Paese. La coltivazione intensiva è iniziata nei primi anni 70, raggiungendo un massimo di 8.000 ha negli anni 80, per poi ridursi fino a soli 652 ha (2007). La produzione attuale è intorno alle 1.500 t.

In Portogallo esistono pochissimi corileti specializzati e la produzione è basata fondamentalmente su piante sparse o associate ad altre colture. Attualmente la superficie investita è di circa 600 ha con una produzione stimata di 500 t. Il nocciolo si trova prevalentemente nella zona di Beira Litoral (Regione di Viseu) e del Trás-os-Montes (Moimenta da Beira e Sernancelhe). Le cultivar più rappresentative sono "Grada de Viseu" (~60%), "Comum" (20%), "Barcelona", "Butler" e "Negret".

In Slovenia il nocciolo è coltivato prevalentemente nelle regioni di Štajerska, Celjska kotlina e Posavje. L'area investita è di circa 100 ha (1,7% della superficie con specie da frutto), con una produzione media di 200 t. Le cultivar principali sono "Istrska dolgoplodna leska" ("Istrian lunga", 90%) e "Tonda di Giffoni" (10%).

Il progetto europeo AGRI GEN RES (Genetic Resources in Agriculture) SAFENUT ("*Safeguard of almond and hazelnut genetic resources: from traditional uses to modern agro-industrial opportunities*") ha coinvolto 6 Paesi (Italia, Spagna, Portogallo, Francia, Slovenia e Grecia) e aveva lo scopo di approfondire le conoscenze sul germoplasma europeo di nocciolo e mandorlo.

Gli obiettivi prevedevano sia la descrizione delle principali cultivar nelle collezioni europee, sia il recupero e la valorizzazione del germoplasma locale a rischio di estinzione. Il lavoro di caratterizzazione è stato svolto attraverso osservazioni morfologiche, rilievi fenologici ed analisi biochimiche e molecolari, considerando anche aspetti ecologici e culturali.

In questo articolo vengono presentati alcuni risultati della caratterizzazione genetica del germoplasma di nocciolo con particolare attenzione verso quello italiano reperito in diverse aree del Paese. Per le analisi sono stati studiati i polimorfismi di 10 loci microsatelliti o SSR, un tipo di marcatore particolarmente adatto all'identificazione varietale utilizzato ormai in quasi tutte le specie vegetali. Si tratta di sequenze ripetute di DNA presenti in punti specifici del genoma (loci) che, opportunamente analizzate, consentono di distinguere gli individui in base a differenze della loro lunghezza (alleli), rese misurabili dalla tecnica di amplificazione ed elettroforesi del Dna.

In *Corylus avellana* L. sono stati isolati recentemente circa 200 loci microsatelliti (Bassil et al., 2005a, 2005b; Boccacci et al., 2005; Gurcan et al., 2010) che sono stati usati per identificare errori nelle collezioni (Gökirmak et al., 2009), verificare sinonimie (cultivar con nomi diversi che hanno il medesimo genotipo e sono quindi la stessa entità varietale), ipotesi di parentela e per studiare le relazioni filogenetiche tra cultivar (Ghanbari et al., 2005; Boccacci et al., 2006, 2008, 2009; Gö-

kirmak et al., 2009). Molti loci SSR sono stati mappati, ovvero se ne conosce la posizione sui cromosomi di nocciolo (Mehlenbacher et al., 2006). Nel progetto SAFENUT sono state caratterizzate geneticamente cultivar campionate in diverse collezioni europee, cultivar minori ed ecotipi selezionati (*landraces*) individuati con l'esplorazione del territorio.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Materiale vegetale ed analisi del Dna microsatellite

In una prima fase del lavoro sono stati scelti i 10 loci microsatelliti da impiegare per la caratterizzazione molecolare del germoplasma. La selezione è avvenuta sulla base di dati riguardanti il polimorfismo dei loci, desunti da lavori recentemente pubblicati (Bassil et al., 2005a, 2005b; Boccacci et al., 2005; Gurcan et al., 2010) e successivamente valutando 16 loci su un gruppo di 75 cultivar scelte per rappresentare 4 aree di coltivazione: Italia, Spagna, Turchia, Iran. Lo studio aveva lo scopo di individuare loci non associati tra loro integrando informazioni esistenti (posizione dei loci sulle mappe; Mehlenbacher et al., 2006) con elaborazioni statistiche dei dati ottenuti dal presente lavoro.

I 10 loci selezionati (CAT-B107, CAT-B501, CAT-B502, CAT-B503, CAT-B504, CAT-B505, CAT-B507, CAT-B508, CAC-B020 e CAC-B028) sono stati utilizzati successivamente per caratterizzare un totale di 295 accessioni, di cui 129 *landraces* e 166 accessioni appartenenti a cultivar note presenti in diversi campi collezione europei realizzati e curati da: Dipartimento di Colture Arboree di Torino (DCAT), Dipartimento Demetra (Università degli Studi di Palermo), Enea e Cra di Roma e Caserta, Irta di Reus (Spagna), Inra di Bordeaux (Francia), Biotehniška Fakulteta of Ljubljana (BF, Slovenia), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (Utad). Le *landraces* sono state individuate in aziende agricole o ai margini delle aree corilicole dei Paesi partecipanti al progetto. I campionamenti di materiale vegetale per l'estrazione del Dna sono stati eseguiti da singole piante cui è stato attribuito un

codice utilizzato per identificarle come entità uniche (accessioni). Il Dna è stato estratto da 0,2 g di foglie o amenti immaturi utilizzando il metodo di Thomas et al. (1993) modificato. La PCR e l'analisi SSR sono state eseguite da DCAT (CAT-B107, CAT-B501, CAT-B502, CAT-B504, and CAC-B028) ed ENEA (CAT-B503, CAT-B505, CAT-B507, CAT-B508, and CAC-B020) secondo la tecnica descritta da Boccacci et al. (2006).

2.2 Analisi statistiche

Per la scelta dei 10 loci SSR dai 16 preselezionati, i risultati sono stati elaborati con i software Genepop (Raymond and Rousset, 1995) ed F-Stat (Goudet, 1995) al fine di individuare associazioni tra i loci e scartare quelli meno informativi. Attraverso l'analisi delle coordinate principali (PCO) si sono studiate le relazioni genetiche tra le cultivar delle 4 aree visualizzandole su un grafico.

I dati ottenuti dalle analisi dei 10 loci SSR scelti per lo studio su 295 accessioni sono stati elaborati con il software Identity 1.0 (Wagner and Sefc, 1999) per calcolare le frequenze alleliche, l'eterozigosi attesa (H_e) e la probabilità di identità (PI). I profili genetici ottenuti sono stati confrontati con quelli delle 215 accessioni presenti nella banca dati del DCAT.

3 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Efficacia dei marcatori microsatelliti

In una fase preliminare del lavoro sono stati scelti i marcatori da utilizzare studiando 75 cultivar provenienti da 4 diverse aree geografiche. Le elaborazioni statistiche hanno consentito di selezionare 10 loci microsatelliti (CAT-B107, CAT-B501, CAT-B502, CAT-B503, CAT-B504, CAT-B505, CAT-B507, CAT-B508, CAC-B020, CAC-B028) dotati di elevato polimorfismo, facili da analizzare e non associati tra loro. Questi marcatori sono stati inseriti tra i descrittori suggeriti per il nocciolo da Bioversity International (2008) e sono stati utilizzati per caratterizzare tutte le accessioni del progetto SAFENUT.

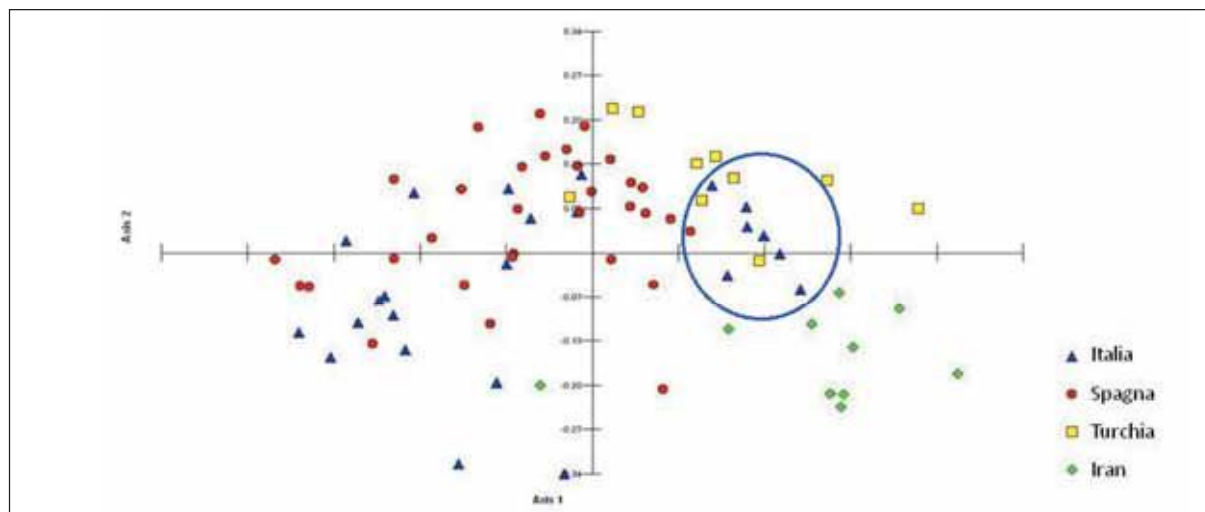


Fig. 1 Analisi PCO che raggruppa le cultivar in base alle similarità genetiche: è evidente la separazione del germoplasma delle aree geografiche più orientali da quello di Italia e Spagna. Fanno eccezione le cultivar liguri (cerchiate) che si collocano tra quelle turche (figura tratta da Boccacci e Botta, 2010, su autorizzazione Elsevier).

Dallo studio preliminare si sono anche tratte informazioni sulle relazioni genetiche tra le cultivar delle 4 aree (Fig. 1): è evidente la vicinanza tra germoplasma italiano e quello spagnolo che appare mescolato, mentre le cultivar turche ed ancor più quelle iraniane si trovano separate ad indicare una struttura genetica più distante. Solo alcune varietà locali della Liguria si posizionano nel gruppo delle turche ad indicare una possibile introduzione di germoplasma dall'Anatolia verso l'entroterra genovese, presumibilmente attraverso il porto di Genova.

3.2 Caratterizzazione genetica delle cultivar nelle collezioni europee

I 10 loci utilizzati per la caratterizzazione genetica hanno identificato 77 genotipi unici tra le 166 accessioni con nomi di cultivar provenienti da campi collezione. La sproporzione tra numero di casi analizzati e genotipi effettivi indica che erano presenti duplicazioni, nomi errati e situazioni di sinonimia. In generale, il confronto tra i profili genetici ottenuti con quelli presenti nella banca dati del DCAT ha permesso di verificare la rispondenza varietale della maggior parte delle cultivar nel-

le collezioni individuando anche alcuni errori. La probabilità di identità calcolata con metodi statistici su tutti i loci era di $3,73 \times 10^{-12}$, pertanto le accessioni con genotipo identico sono state considerate appartenenti alla stessa cultivar.

Le analisi hanno confermato alcune sinonimie riportate in bibliografia come quelle tra "Nocchione" (Lazio) e diverse cultivar siciliane tra cui "Montebello", "Comune di Sicilia", "Mansa" e "Nostrale", indicando l'esistenza di una cultivar principale diffusa in Sicilia. Hanno inoltre individuato ulteriori accessioni recanti lo stesso profilo del "Nocchione" che potrebbero quindi esserne cloni o mutazioni: "Locale di Piazza Armerina" (Sicilia), "Iannusa racinante" (Sicilia) e "Avellana speciale" (origine sconosciuta). Il confronto tra i dati di laboratorio e di campo ha consentito il recupero della collezione Slovena individuando alcuni errori e sinonimie, come quella tra "Bandnuss" (Gran Bretagna) e "Apolda" (collezione Università di Torino).

Sono stati osservati due casi di possibile mutazione: a) 'Santa Maria di Gesù' (Sicilia) è risultata un mutante clonale di "Nocchione" da cui differisce per una differenza di 2 bp ad uno degli alleli del locus CAT-B501;

b) “Negret primerenc” clone 1-77 (Spagna) presentava lo stesso genotipo di “Negret” (Spagna), tranne che per un allele del locus CAT-B502. In altri casi, al contrario, evidenti differenze clonali non sono state discriminate dall’analisi genetica. Un esempio è quello della cultivar ‘Tonda di Biglini’ (Piemonte) che ha lo stesso genotipo di “Tonda Gentile delle Langhe” per 24 loci SSR, sebbene presenti differenze carpologiche, produttive e fenologiche.

3.3 Caratterizzazione genetica di cultivar minori ed ecotipi selezionati (landraces)

Sono state analizzate un totale di 129 landraces di cui 80 erano state reperite in Italia, 17 in Portogallo, 15 in Grecia, 11 in Spagna e 6 in Slovenia. I dati genetici hanno indicato l’esistenza di numerosi casi di identità nell’ambito delle landraces e tra queste e cultivar note, ma anche la presenza di nuovi genotipi.

Nell’ambito del germoplasma italiano sono stati individuati nuovi genotipi in Liguria (“Noscello”, “Ciasetta”, “Tapparona”, “Dell’Orto”, “Gianchetta”, “Seigretta”, “Bardina”, “Del Rosso”, “Lunghera” e “Menoia”) e Lazio (“Itavex”, “Allungata”, “Madonnella”, “Casamale”, “Cappello del prete”, “Nocciola Ada”, “Lunga di Ronciglione”, “Nocciola centenaria”). Una accessione



Fig. 2 Caratteristiche delle nocciole della cultivar spagnola ‘Pauetet’

(“Meloni”) con lo stesso profilo di “Tonda Gentile Romana” è stata selezionata per la precocità di maturazione. Il materiale campionato in Piemonte si presentava geneticamente uniforme ed identico alla cultivar ‘Tonda Gentile delle Langhe’, con l’unica eccezione dell’ecotipo ‘Cavoretto’ reperito al di fuori dell’area di coltivazione tipica. In Italia sono state inoltre recuperate, in collaborazione con le Istituzioni locali, nuove accessioni in Sardegna e in Sicilia. Delle 23 accessioni siciliane 7 mostravano lo stesso profilo genetico della ‘Mansa’ (e dei suoi sinonimi) e pertanto appartenevano alla principale cultivar della Regione. Il materiale raccolto in Sardegna nei comuni di Belvi e Tonara era costituito da 6 nuovi genotipi.

Delle 11 accessioni spagnole reperite nelle Asturie, 3 sono state classificate come nuovi genotipi mentre 8 erano molto vicine geneticamente a ‘Casina’, la cultivar più diffusa in quest’area. Alcune accessioni del Portogallo risultavano identiche a cultivar note per i 10 loci SSR e sono quindi probabili sinonimi di queste: “Raul” con “Karidaty” (Turchia, sinonimo “Imperiale di Trebisonda”), “Dawton”, “Purpurea” e “Cartuxeria/Tubulosa” con “Fructo rubro”, “Provence” e “Grada de Viseu” con “Barcelona” (sinonimi: “Castanyera” in Spagna, e “Fertile de Coutard” in Francia); “Molar” presentava il profilo genetico di “Pauetet” (Spagna; fig. 2) ma aveva alcune caratteristiche morfologiche distintive che fanno supporre si tratti di una mutazione di quest’ultima cultivar. Al contrario, “Quinta Vila Nova Do Rego” è stata classificata come nuovo ed unico genotipo.

Le accessioni “Tombul Giaghli”, “Karidato” e “Palaz” recuperate in Grecia con nomi che richiamano cultivar turche si sono confermate essere cloni delle corrispondenti varietà anatoliche.

4. CONCLUSIONI

Le analisi genetiche delle accessioni di nocciolo studiate durante il progetto e reperite nei campi collezione o esplorando il territorio sono state utili per individuare ed eliminare duplicazioni ed errori e per acquisire informazioni sulla struttura genetica del germoplasma

di interesse per la coltivazione o il miglioramento genetico.

Sono stati identificati numerosi casi di sinonimia, anche in aree distanti tra loro e l'analisi dei marcatori microsatelliti si è rivelata un mezzo potente per la corretta identificazione del materiale vegetale. Tuttavia, la tecnica non è stata efficace nel distinguere diversi casi di mutazione clonale e questo sottolinea l'importanza dei rilievi sul fenotipo. La corretta identificazione di un individuo deriva dall'applicazione di una appropriata tecnica di analisi del Dna accompagnata da attente osservazioni degli aspetti morfologici e fenologici della pianta e delle produzioni.

Nel caso specifico di questo studio, i risultati ottenuti sul germoplasma italiano sono di elevato interesse dato che sono stati individuati diversi ecotipi promettenti e che la caratterizzazione delle cultivar in collezione ha consentito di eliminare errori e di identificare correttamente accessioni e nuove cultivar.

Un ulteriore sviluppo del progetto dovrebbe utilizzare queste informazioni per razionalizzare le collezioni

in Europa attraverso la raccolta di tutte le cultivar e *landraces* in un sito (campo collezione), conservando una copia delle accessioni nel Paese di origine di ciascuna. Infatti, le principali varietà coltivate in Europa, escludendo quelle turche, sono una dozzina e la maggior parte del germoplasma raccolto e descritto ha una diffusione molto limitata essendo in molti casi materiale in via di estinzione che richiede attenzione e l'applicazione immediata di strategie di conservazione.

I risultati delle analisi carpologiche e chimiche, non presentate in questo lavoro, contribuiranno a fornire elementi per selezionare quelle accessioni che hanno caratteristiche meritevoli di essere valorizzate attraverso l'introduzione in coltura o nei programmi di miglioramento genetico.

Ricerca finanziata dell'Unione Europea progetto SAFE-NUT (AGRI GEN RES 068) e dalla Fondazione CRT; la Fondazione Cassa di Risparmio di Cuneo ha contribuito con un assegno di ricerca.

Bibliografia

ALBERGHINA O. (1982) "Indagine sulla corilicoltura siciliana" Rivista Frutticoltura Ortofloricoltura 2: 27-30.

ALBERGHINA O. (2002) "La coltura del nocciolo in Sicilia" Proceedings II Convegno Nazionale sul Nocciolo. Giffoni Valle Piana (Salerno), Italia, 5 Ottobre :141-146.

BASSIL N.V., BOTTA R., MEHLENBACHER S.A. (2005a) "Microsatellite Markers in the Hazelnut: Isolation, Characterization and Cross-species Amplification in *Corylus*" Journal American Society Horticultural Science. 130 (4):543-549. BASSIL N.V., BOTTA R., MEHLENBACHER S.A. (2005b) "Additional microsatellites of the European hazelnut" Acta Horticulturae 686:105-110.

BIGNAMI C. (2002) "Attualità e problematiche della nocciolicoltura nel Lazio" Proceedings II Convegno Nazionale sul Nocciolo. Giffoni Valle Piana (Salerno), Italy 5 October. p. 122-132.

BIOVERSITY INT. (2008) "Descriptors for hazelnut (*Corylus avellana* L.)" Bioversity International, Roma, Italia 55 pp.

BOCCACCI P., BOTTA R. (2010) "Microsatellite variability and genetic structure in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars from different growing regions" Scientia Horticulturae 124: 128-133.

BOCCACCI P., AKKAK A., BASSIL N.V., MEHLENBACHER S.A., BOTTA R. (2005) "Characterization and evaluation of microsatellite loci in European hazelnut (*Corylus avellana* L.) and their transferability to other *Corylus* species" Molecular Ecology Notes 5: 934-937.

- BOCCACCI P., AKKAK A., BOTTA R. (2006) “DNA-typing and genetic relationships among European hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars using microsatellite markers” *Genome* 49: 598-611.
- BOCCACCI P., ROVINAM, BOTTA R. (2008) “Genetic diversity of hazelnut (*Corylus avellana* L.) germplasm in northeastern Spain” *Hortscience* 43, 667-672.
- BOCCACCI P., TORELLO MARINONI D., ROVIRA, M. BOTTA, R. (2009) “Genetic diversity and relationships among Italian and Spanish hazelnut cultivars” *Acta Horticulturae* 845: 127-132.
- FELSENSTEIN J. (1989) “*PHYLIP - Phylogeny Inference Package*” *Cladistics* 5: 164-166.
- GHANBARI A., AKKAK A., BOCCACCI P., TALAIE A., VEZVAI A., BOTTA R. (2005) “Characterization of hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars using microsatellite markers” *Acta Horticulturae* 686: 111-115.
- GÖKIRMAK T., MEHLENBACHER S.A., BASSIL N.V. (2009) “Characterization of European hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars using SSR markers” *Genetic Resources Crop Evolution* 56: 147-172.
- GOUDET J. (1995) “*FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics*” *Journal Heredity* 86, 485-486.
- GÜRCAN K., MEHLENBACHER S.A., BOTTA R., BOCCACCI P. (2010) “Development, characterization, segregation, and mapping of microsatellite markers for European hazelnut (*Corylus avellana* L.) from enriched genomic libraries and usefulness in genetic diversity studies” *Tree Genetics Genomes* 6: 513-531.
- ISTAT (2009) www.istat.it
- MARM 2011. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Anuario de estadística Agraria. Secretaría General Técnica. Madrid.
- MEHLENBACHER S.A., BROWN R.N., NOUHRA E.R., GÖKIRMAK T., BASSIL N.V., KUBISIAK T.L. (2006) “A genetic linkage map for hazelnut (*Corylus avellana* L.) based on RAPD and SSR markers” *Genome* 49:122-133.
- PAGE R.D.M. (1996) “*TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers*” *Computer Applications Biosciences* 12: 357-358.
- PICCIRILLO P. (2002) “Attualità e problematiche della coltura del nocciolo in Campania” *Proceedings II Convegno Nazionale sul Nocciolo*. Giffoni Valle Piana (Salerno), Italia 5 Ottobre :113-121.
- PICCIRILLO P., PETRICCIONE M., CLASADONTE A., ROSATO T., DE LUCA A. (2007) “Problematiche e prospettive di rilancio per la corilicoltura calabrese”. *Riv. di Frutticoltura* 69: 62-66.
- RAYMOND M., ROUSSET F. (1995) “*GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism*” *Journal Heredity* 86, 248-249.
- THOMAS M.R., MATSUMOTO S., CAIN P., SCOTT N.S. (1993) “*Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification*” *Theoretical Applied Genetics* 86: 173-180.
- THOMPSON M.M., LAGERSTEDT H.B., MEHLENBACHER S.A. (1996) “*Hazelnuts*” In: J. Janick and J.N. Moore (eds.). *Fruit Breeding*, Vol. 3. Nuts. Wiley, New York.
- TOUS, J.; ROVIRA; M. ROMERO, A. 2001. *El avellano*. In : *La Horticultura Española*. Sech :275-278.
- VALENTINI N., ME G. (2002) “Attualità e problematiche della coltura del nocciolo in Italia: la situazione piemontese” *Proceedings II Convegno Nazionale sul Nocciolo*. Giffoni Valle Piana (Salerno), Italia 5 Ottobre :133-140.
- WAGNER H.W., SEFC K.M. (1999) “*IDENTITY 1.0.*” <http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>