



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
TUSCIA

DIPARTIMENTO
DI SCIENZE AGRARIE
E FORESTALI

Università degli Studi della Tuscia

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE E FORESTALI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VEGETALI E ANIMALI (SPVA)

XXXIV° Ciclo

"Relazioni tra Eterotteri, funghi e nocciole: conseguenze ecologiche in ambito corilicolo"

Tutors:

Prof. S. Speranza

Prof. A. Mazzaglia

Coordinatore del corso di dottorato:

Prof.ssa R. Bernini

Candidato:

Carlo G. De Spirito

INDICE	
Riassunto/Abstract	pag. 3/4
Introduzione	pag. 5
i) <i>Cenni storici</i>	pag. 5
ii) <i>Situazione nazionale</i>	pag. 6
Cap. 1 Caratteristiche botaniche e tecnica colturale	pag. 9
1.1 Caratteristiche botaniche	pag. 9
1.2 Tecnica Colturale	pag. 11
1.2.1 <i>Scelta del sesto d’impianto, della cultivar (cv) e del materiale vegetale</i>	pag. 11
1.2.2 <i>Gestione agronomica del nocciolo</i>	pag. 12
1.2.3 <i>Concimazione</i>	pag. 13
1.2.4 <i>Irrigazione</i>	pag. 14
1.2.5 <i>Raccolta, pulitura, essiccazione.</i>	pag. 14
1.3 Caratteristiche del frutto	pag. 14
Cap. 2 Avversità biotiche del nocciolo	pag. 17
2.1 Avversità dovute all’artropodofauna	
2.1.1 <i>Hemiptera, Heteroptera - “Cimici nocciolaie”</i>	pag. 18
2.1.2 <i>Coleoptera, Curculionidae - Balanino delle nocciole</i>	pag. 22
2.1.3 <i>Coleoptera, Scolytidae - “Ambrosia Beetles”</i>	pag. 22
2.2 Avversità di natura fungina	pag. 23
2.2.1 <i>Mal dello stacco</i>	pag. 23
2.2.2 <i>Necrosi grigia del nocciolo (NGN)</i>	pag. 23
2.2.3 <i>Gleosporiosi</i>	pag. 24
2.2.4 <i>Oidio</i>	pag. 25
2.2.5 <i>Cancri rameali</i>	pag. 25
2.2.6 <i>Moniliosi del nocciolo</i>	pag. 26
2.2.7 <i>Muffe del nocciolo</i>	pag. 26
2.2.8 <i>Altre avversità fungine</i>	pag. 26
2.3 Avversità di natura batterica	pag. 27
2.3.1 <i>Necrosi batterica</i>	pag. 27
2.3.2 <i>Moria del nocciolo</i>	pag. 27
2.4 Alterazioni a carico dei frutti, relazioni insetti funghi fitopatogeni	pag. 28
Cap. 3 Obiettivi della ricerca	pag. 30
Cap. 4 Monitoraggio delle popolazioni di cimici presenti nei corileti dei Monti Cimini	pag. 32
4.1 Materiali e metodi	pag. 33
4.1.1 <i>Siti di indagine</i>	pag. 33
4.1.2 <i>Tecniche di monitoraggio delle cimici: frappage e trappole attrattive</i>	pag. 34
4.1.3 <i>Analisi statistica</i>	pag. 36
4.2 Risultati	pag. 36
4.3 Discussione	pag. 45

Cap. 5 Valutazione della diversa suscettibilità dei frutti del nocciolo all'azione trofica delle cimici: "aborto traumatico" e "cimiciato"	pag. 48
5.1 Materiali e metodi	pag. 48
5.1.1 <i>Sito di indagine</i>	pag. 48
5.1.2 <i>Identificazione stadio fenologico dei frutti</i>	pag. 49
5.1.3 <i>Manicotti ("sleeves")</i>	pag. 51
5.1.4 <i>Analisi statistica</i>	pag. 54
5.2 Risultati	pag. 55
5.3 Discussione	pag. 61
Cap. 6 "Cimici nocciolaie" "come vettori di specie fungine agenti di marciumi"	pag. 64
6.1 Materiali e metodi	pag. 65
6.1.1 <i>Raccolta in campo</i>	pag. 65
6.1.2 <i>Isolamento delle colonie e identificazione delle specie fungine</i>	pag. 67
6.2 Risultati	pag. 69
6.3 Discussione	pag. 72
Cap. 7 Genoma di Fusarium sp isolato nel comprensorio dei Monti Cimini	pag. 75
7.1 Materiali e metodi	pag. 76
7.1.1 <i>Isolamento fungino</i>	pag. 76
7.1.2 <i>Identificazione morfologica e molecolare</i>	pag. 77
7.1.3 <i>Test di patogenicità</i>	pag. 77
7.1.4 <i>Estrazione DNA ad alto peso molecolare, sequenziamento del genoma</i>	pag. 77
7.1.5 <i>Assemblaggio del genoma</i>	pag. 78
7.1.6 <i>Annotazione del genoma</i>	pag. 79
7.1.7 <i>Genomica comparata e analisi filogenetica</i>	pag. 79
7.2 Risultati	pag. 82
7.2.1 <i>Identificazione del ceppo isolato</i>	pag. 82
7.2.2 <i>Test di patogenicità</i>	pag. 83
7.2.3 <i>Assemblaggio e annotazione del genoma</i>	pag. 83
7.2.4 <i>Analisi filogenetica</i>	pag. 84
7.3 Discussione	pag. 87
Cap. 8 Conclusioni	pag. 91
Bibliografia	pag. 93
Sitografia	pag. 104
Ringraziamenti	pag. 105

Riassunto

In considerazione della forte espansione che la coltivazione del nocciolo sta vivendo, sia a livello nazionale che mondiale, la presente ricerca si è posta come obiettivo quello di analizzare aspetti riguardanti specifiche avversità di carattere entomologico e fungino in grado di limitarne la produttività. Ci si è orientati in particolare ad approfondire lo studio delle relazioni esistenti tra Eterotteri, funghi e nocciole e le conseguenze ecologiche che ne derivano, con riferimento ad un territorio storicamente vocato quale quello dei Monti Cimini. La presente tesi è stata realizzata seguendo le linee guida del progetto di dottorato, occupandosi sia di aspetti entomologici che micologici.

Gli studi di carattere entomologico hanno riguardato il monitoraggio delle specie di “cimici nocciolaie” presenti nel comprensorio dei Monti Cimini: l'utilizzo congiunto di due diverse tipologie di rilevamento (“frappage” per la cattura delle comuni “cimici nocciolaie” e trappole feromoniche, con attrattivi specifici per il rilievo degli esemplari di *H. halys*, di cui è stata valutata anche la selettività verso le altre specie), ha confermato *G. acuteangulatus* come specie maggiormente rappresentata, ed ha consentito di rilevare la progressiva diffusione della specie “aliena” *H. halys*, assai temibile per l'elevata capacità riproduttiva e la forte aggressività verso le coltivazioni. Questa metodologia attualmente può rappresentare la miglior forma di rilevamento delle diverse specie di Eterotteri presenti nei nocciolieti. Attraverso l'isolamento di branche di piante con manicotti di rete sono state prodotte condizioni di contatto forzato tra cimici e nocciole. Ciò ha consentito di verificare l'esistenza di precise relazioni tra l'attività trofica degli insetti, specifici stadi di sviluppo dei frutti, definiti secondo il protocollo IRTA adottato, e le alterazioni dei frutti consciute come “aborto traumatico” e “cimiciato”.

Aspetti di carattere micologico sono stati indagati attraverso isolamenti effettuati dalle superfici esterne dell'apparato boccale pungente succhiatore delle cimici, è stato così possibile individuare specie fungine note per essere patogeni del nocciolo, delle quali gli insetti potrebbero risultare “trasportatori” (carrier). Fra questi, in particolare, è stato individuato il genere *Fusarium*. *F. lateritium* è stato ritenuto, fino ad oggi, il principale responsabile della patologia conosciuta come Necrosi Grigia del Nocciolo (NGN). A riguardo, partendo da nocciole che presentavano chiari sintomi ascrivibili a NGN, è stato approfondito lo studio dell'intero genoma degli isolati ottenuti, giungendo ad attribuirgli, nell'ambito del genere di appartenenza, un diverso inquadramento tassonomico.

Si deve ritenere che le osservazioni derivanti da tali ricerche potranno assumere particolare rilevanza nell'immediato futuro, considerando la progressiva estensione della coltivazione del nocciolo a terreni ed agroecosistemi meno vocati rispetto a quelli in cui fino ad oggi è rimasta circoscritta la corilicoltura.

Parole chiave: Eterotteri, “cimici nocciolaie”, frappage, trappole feromoniche, *G. acuteangulatus*, *H. halys*, “aborto traumatico”, “cimiciato”, NGN, *F. lateritium*.

Abstract

In view of the strong expansion that hazelnut cultivation is experiencing, both in Italy and worldwide, the present research aimed to analyze aspects concerning specific entomological and fungal adversities capable of limiting its productivity. We were particularly oriented to study the existing relationships between Heteroptera, fungi and hazelnuts and the resulting ecological consequences, with reference to a historically vocated territory such as the Cimini Mountains. The present thesis was carried out following the guidelines of the doctoral project, dealing with both entomological and mycological aspects.

The entomological studies concerned the monitoring of the species of "hazelnut bugs" present in the Cimini Mountains district: the joint use of two different types of detection ("frappage" for the capture of common "hazel bugs" and pheromone traps, with specific attractants for *H. halys* specimens, evaluating also selectivity towards other hazelnut bug species), confirmed *G. acuteangulatus* as the most represented species and allowed to detect the progressive spread of the "alien" species *H. halys*, which is very fearsome due to its high reproductive capacity and strong aggressiveness towards crops. This methodology currently may be the best form of detection of different species of Heteroptera in hazelnut groves. Through the isolation of branches of plants with net sleeves ("sleeves"), conditions of "forced contact" between bugs and hazelnuts were produced, which made it possible to verify the existence of precise relationships between the insects' trophic activity, specific stages of fruit development, defined according to the adopted IRTA protocol, and fruit alterations consciously known as "traumatic abortion" and "cimiciato."

Mycological aspects were investigated through isolations obtained from the external surfaces of the sucking stinging mouthparts of the bugs. Thus, it was possible to identify fungal species known to be pathogens of the hazel, of which the insects could be "carriers". Among these, in particular, the genus *Fusarium* was identified. *F. lateritium* has been thought, until now, to be the main culprit of the disease known as Hazel Grey Necrosis (NGN). In this regard, starting from hazelnuts that showed clear symptoms ascribable to NGN, the study of the entire genome of the obtained isolates has been investigated in depth, arriving at a different taxonomic classification, within the *Fusarium* genus.

It must be assumed that the observations resulting from these researches may assume particular relevance in the immediate future, considering the progressive extension of hazel cultivation to soils and agroecosystems less suited than those in which coriliculture has remained confined until now.

Key words: Heteroptera, "true bugs", frappage, pheromone traps, *G. acuteangulatus*, *H. halys*, "traumatic abortion", "cimiciato", NGN, *F. lateritium*.

INTRODUZIONE

i) Cenni Storici sulla coltura del nocciolo

Il nocciolo (*Corylus avellana* L.) è una delle principali specie arboree che hanno colonizzato le terre emerse sin dall'antichità. I primi cenni storici riguardo la sua coltivazione risalgono infatti a Catone (234-149 a.c.) che ne promuove la coltivazione in "Liber de agricultura", mentre l'origine, come riportato anche da Plinio nel 60 a.c., è da ricercarsi nelle regioni dell'Anatolia e della Grecia. (Tombesi A., 1991)

La nocciola è da ritenersi, quindi, tra i primi frutti utilizzati dall'uomo per soddisfare le proprie esigenze alimentari e si può ben affermare che lo abbia accompagnato nel trascorrere dei secoli.

La sua coltivazione a fini produttivi e commerciali si è comunque diffusa ampiamente solo nel corso del 1900 grazie all'individuazione delle varietà agronomicamente più valide che, sostenute da migliori tecniche di coltivazioni, hanno consentito la realizzazione di impianti intensivi (Tombesi A., 1991).

Sebbene inizialmente venisse coltivato principalmente nell'area meridionale del mar Nero (Turchia) e nelle regioni mediterranee (Italia e Spagna), nell'ultimo decennio un crescente diffusione si è riscontrata nella regione dell'Europa Centrale (Polonia, Romania), nel continente asiatico (Azerbaijan, Georgia, Uzbekistan, Iran e Cina), nell'America del Sud (Cile), in Sud Africa ed Australia. Nella successiva tabella (Farinelli, 2017) si riportano, a solo scopo indicativo della diffusione della coltivazione del nocciolo nel mondo, le produzioni di nocciole sgusciate registrate negli anni 2015-2016 e 2016-2017 in ambito mondiale.

PRODUZIONE DI NOCCIOLE SGUSCIATE (T)		
Paese	2015/2016	2016/2017
Turchia	355.000	301.000
Italia	56.250	58.500
Georgia	25.000	20.000
Azerbaijan	20.000	17.500
USA	11.140	12.800
Spagna	10.560	10.080
Cile	5.400	5.400
Francia	4.800	4.800
Iran	4.500	4.500
China	2.250	2.250
Altri	2.250	2.250
Totale	497.150	439.080

Fonte: 35° Congresso mondiale frutta secca, San Diego, 2016

Fig. I. 1 Produzione di nocciole sgusciate (tons) nei principali paesi produttori (Farinelli, 2017)

ii) Situazione nazionale

A livello nazionale il settore corilicolo vive ormai da qualche anno una robusta e costante espansione: nell'immagine sottostante, di fonte Ismea, in cui vengono presentati i dati Istat, si evidenzia come in termini di superficie totale, nell'arco di pochi anni si sia registrato un aumento di oltre 12.000 ha.



Fig. I. 2 Superficie totale dei noccioli coltivati in Italia (ha) 2015-2019, (Ismea, 2021)

Per logiche legate alle tempistiche di allevamento, non si sono ancora registrati gli effetti di tale incremento in termini di rese unitarie e totali, come si evince dalle successive tabelle riportate.



Fig. I. 3 Resa Unitaria dei noccioleti coltivati in Italia (tons/ha) (Ismea, 2021)



Fig. I. 4 Produzione raccolta dei noccioleti coltivati in Italia (tons) (Ismea, 2021)

Si deve ritenere che, nel momento in cui entreranno in piena produzione gli impianti di più recente realizzazione, si avranno incrementi sia in termini di produzione unitaria grazie all'ottimizzazione della tecnica colturale.

In Italia, il Lazio e la Campania si contendono la prima posizione a livello regionale per produzione raccolta (seguite da Piemonte e Sicilia) mentre, per quanto riguarda le superfici totali, nel Lazio si è riscontrato negli ultimi anni, il più spiccato incremento delle superfici investite.

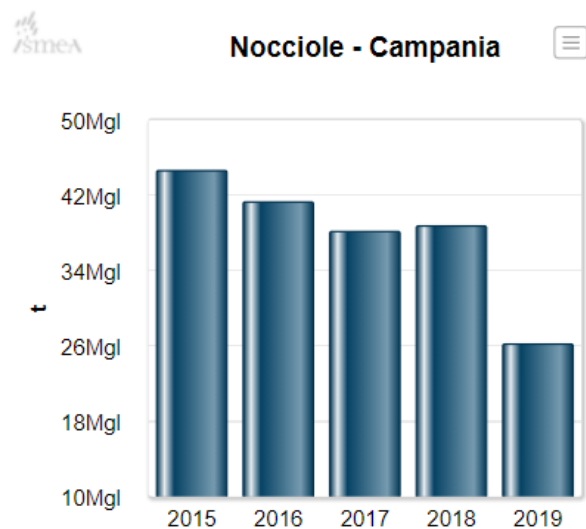
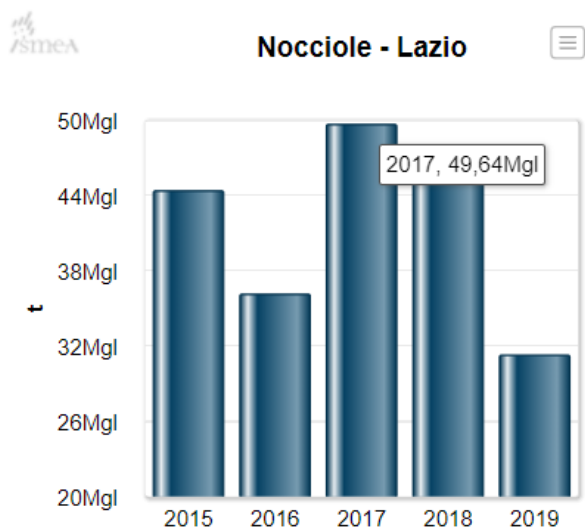


Fig. I. 5 Produzione raccolta nelle regioni Lazio e Campania (tons) (Ismea, 2021)

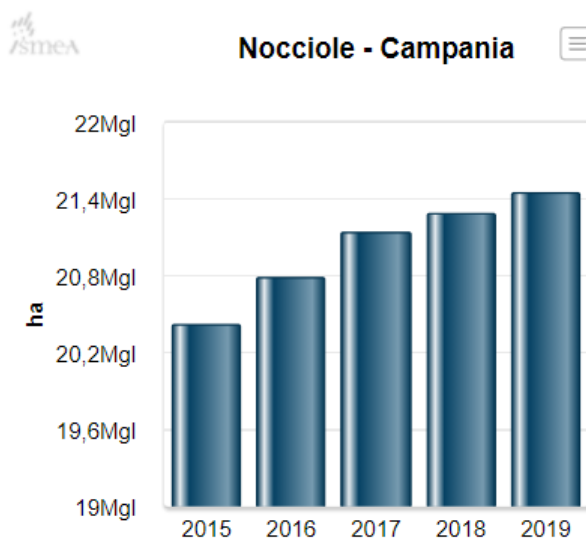


Fig. I. 6 Superficie totale coltivata nelle regioni Lazio e Campania (ha) (Ismea, 2021)

1 Caratteristiche botaniche e tecnica colturale

1.1 Caratteristiche botaniche

Appartenente alla famiglia Betulaceae e all'ordine Fagales, il genere *Corylus* comprende 25 specie (Erdogan e Mehlenbacher, 2000), tra cui le più importanti, oltre a *C. avellana* L. (il nocciolo comune), sono *C. colurna* L. (il nocciolo turco) e *C. maxima* Mill. (il nocciolo gigante).

C. avellana, cui faremo riferimento essendo la specie più coltivata in Italia, presenta un apparato radicale che si sviluppa in profondità per circa 50 cm estendendosi, in funzione del terreno e della tecnica colturale, anche oltre la proiezione della chioma: nell'immagine sottostante (Eynard e Paglietta, 1962) si riporta, ad esempio, una rappresentazione dell'apparato radicale di un esemplare di Tonda Gentile delle Langhe.

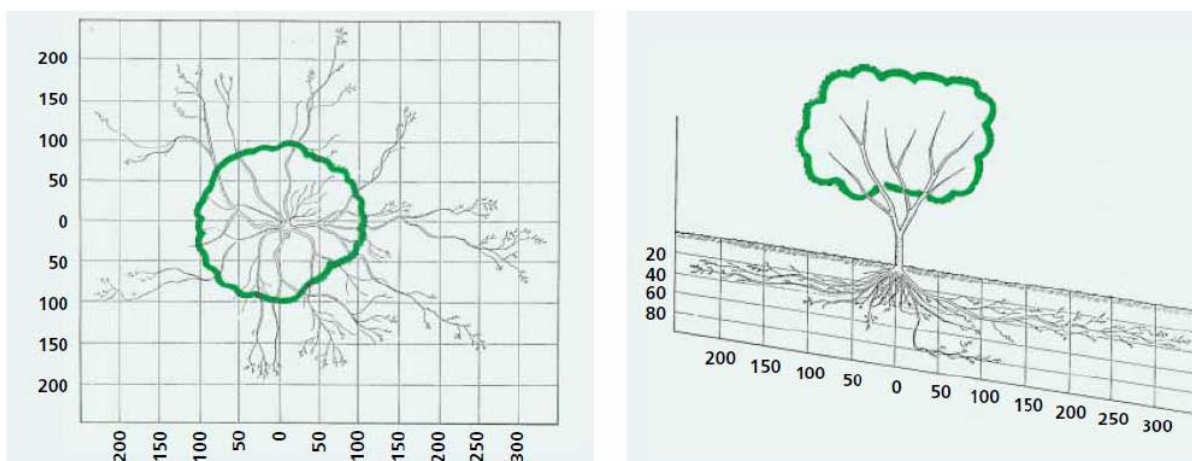


Fig. 1.1 Proiezione dell'apparato radicale e sezione trasversale di una pianta di Tonda Gentile delle Langhe (Eynard e Paglietta, 1962)

In natura la pianta, allo stato di selvatico, assume aspetto cespuglioso per i polloni che fuoriescono dall'area circostante il colletto e dalla ceppaia; negli impianti intensivi, in particolar modo se allevati a vaso cespugliato, i polloni vengono utilizzati per il rinnovamento della pianta stessa o per la riproduzione. Il tronco è provvisto di una corteccia poco scabra con rami che manifestano diffuse lenticelle mentre le foglie ovoidali, semplici e alterne, hanno margini seghettati e sono generalmente di colore verde scuro .

La specie presenta, all'ascella delle foglie e in prossimità dei nodi, gemme a legno e gemme miste;

queste ultime rappresentano la porzione riproduttiva formata da glomeruli di fiori femminili. Ogni fiore femminile, al momento della fioritura, che avviene di norma nel periodo invernale (gennaio-febbraio), manifesta stigmi rossi molto evidenti che fuoriescono dalle perule.

Anche i fiori maschili si presentano all'ascella delle foglie, riuniti in amenti che a partire dall'estate, si differenziano in piccoli gruppi e raggiungono il loro pieno sviluppo con l'emissione del polline nei mesi di dicembre-febbraio. Si tratta quindi, in realtà, di una specie monoica, ovvero con fiori maschili e femminili presenti sulla stessa pianta, ma separati e, per lo più, autoincompatibili). Nonostante ogni amento possa produrre fino a 2 milioni di granuli di polline, l'impollinazione, tipicamente anemofila, deve avvenire grazie alla presenza di cultivar diverse. Per questo motivo nei corileti si ricorre alla consociazione con varietà impollinatrici nella porzione di circa un impollinatore ogni dieci piante (Romisondo *et al.*, 1978). La loro presenza si rende necessaria considerando anche la diversa epoca di maturazione dei fiori maschili e femminili: ad esempio, la Tonda Gentile Romana che rappresenta la cultivar maggiormente diffusa nel comprensorio corilicolo laziale manifesta una tipica proterandria con i fiori maschili che rilasciano il polline prima della maturazione dei fiori femminili. La necessità di ricorrere ad individui impollinatori consente logicamente anche di mantenere elevata la variabilità genetica delle popolazioni, con indubbi vantaggi in termini di sopravvivenza e adattabilità delle specie.

Dall'impollinazione alla fecondazione può trascorrere un periodo di tempo assai variabile che va dai 2 ai 4 mesi: è questo l'arco di tempo necessario per il completamento dei processi di maturazione dell'ovario, che si realizza generalmente dopo il germogliamento primaverile.

Con la fecondazione, i tessuti che daranno vita ai frutti avviano un rapido sviluppo: in una prima fase si ha l'accrescimento nelle dimensioni, successivamente viene rinforzata la struttura e la consistenza del guscio, come ultimo passaggio si realizza il completamento del seme. Internamente l'embrione e i cotiledoni, che vanno a costituire la parte edibile del frutto, aumentano il loro contenuto di sostanza secca solo nelle ultime settimane prima della maturazione, mentre già in precedenza la parte esterna dell'ovario si è lignificata formando il guscio. Stipole di aspetto cartilagineo avvolgono solo parzialmente quest'ultimo e in conseguenza del loro rilascio, a maturazione, il frutto cade a terra, pronto per la raccolta.

1.2 Tecnica colturale

1.2.1 Scelta del sesto d'impianto, della cultivar (cv) e del materiale vegetale.

La scelta del sesto d'impianto dipende, come per tutte le coltivazioni arboree, da molteplici fattori come:

- cv prescelta;
- forma di allevamento;
- metodologia di coltivazione
- disponibilità di irrigazione
- esposizione, giacitura e fertilità complessiva del terreno.

Questi parametri sono fortemente legati l'uno con l'altro: dall'ottimizzazione dei loro rapporti dipende la realizzazione di un impianto adeguatamente produttivo.

Il nocciolo preferisce terreni sciolti mediamente profondi, acidi e sub acidi situati tra i 200 e i 500 m slm. La forma di allevamento maggiormente diffusa è il cespuglio o il vaso cespugliato, solo in poche aree si adotta la forma di allevamento monocaule a vaso regolare o alberello. I sestri d'impianto diffusi negli areali collinari italiani di maggior vocazione, con le forme di allevamento più adottate sopra indicate (cespuglio o vaso cespugliato) misurano 5 x 5 m, 4.5 x 4.5 m, 5 x 4 m, e comportano pertanto densità d'impianto comprese tra 400 e 500 piante per ettaro (Cristofori *et al.*, 2018).

Il panorama delle varietà più coltivate in Italia è in realtà limitato a poche cv, ognuna rappresentativa dei diversi areali di coltivazione: in Piemonte è prevalentemente diffusa la Tonda Gentile delle Langhe o più semplicemente Tonda Gentile (secondo il Registro Nazionale dei Fruttiferi, MiPAAF), nel comprensorio corilicolo del Lazio la Tonda Gentile Romana o Tonda Romana, in Campania la Tonda di Giffoni, oltre che le Cv Mortarella, Barrettona e (con frutti maggiormente allungati) San Giovanni (Fideghelli, 2016). La cultivar Tonda Gentile delle Langhe (già dal 2003 Igp "Nocciola Piemonte") ha ottenuto dal Mipaaf nel 2019 la definitiva denominazione "Nocciola Piemonte IGP delle Langhe"; in Campania le nocciole coltivate in alcuni comuni del salernitano possono ottenere la denominazione IGP "Nocciola di Giffoni", mentre il Disciplinare di produzione della "Nocciola Romana Dop", approvato nel 2009, che interessa principalmente le aree produttive della Tuscia, è attualmente in corso di revisione da parte degli organismi comunitari.

La cultivar utilizzata tipicamente come impollinatore negli impianti del Lazio è denominata Nocchione, mentre in Piemonte l'ampia diffusione di esemplari selvatici garantisce generalmente la necessaria attività di impollinazione.

Il materiale di propagazione più utilizzato è rappresentato da polloni autoradicali e da margotte di ceppaie, mentre da qualche anno si sta diffondendo l'utilizzo di materiale ottenuto per micropropagazione (Silvestri *et al.*, 2016). Anche il taleggio sembra poter rappresentare una valida soluzione per avere materiale di riproduzione di ottima qualità, sebbene allo stato attuale debba esser considerata ancora una metodologia sperimentale non essendo ancora convenientemente applicabile come tecnica vivaistica su ampia scala (Cristofori *et al.*, 2017; Tombesi S. *et al.*, 2017). Chiaramente ogni modalità di riproduzione presenta aspetti interessanti e criticità riguardanti sia gli aspetti operativi, che la sicurezza sanitaria e genetica del materiale ottenuto: al momento si ritiene che, una volta superate alcune difficoltà tecniche, la micropropagazione possa rappresentare la più valida via per ottenere nuove piante nelle quantità necessarie, con solide garanzie di uniformità e sanità (Cristofori *et al.*, 2017).

1.2.2 Gestione agronomica del nocciolo.

Un nocciolo coltivato seguendo la corretta tecnica colturale inizia a produrre al 5°- 6° anno dall'impianto, mentre raggiunge la piena produzione intorno al 9°-10° anno. Adottando accorte tecniche di potatura, che non siano orientate solo alla produzione ma anche alla rinnovazione delle piante, in particolare se allevate a vaso policaule, il periodo di maturità può protrarsi per alcuni decenni (Griseri, 2013). È possibile constatare, nel comprensorio corilicolo viterbese l'esistenza e la buona produttività di impianti che hanno superato i 60-70 anni dalla messa a dimora (De Spirito, osservazioni personali). In considerazione dell'elevata importanza che assume il periodo di maturità (piena produzione), rispetto al periodo di allevamento, è al primo che faremo riferimento nelle successive note inerenti alla gestione del corileto.

Nel nocciolo adulto la gestione del suolo avviene attraverso l'inerbimento naturale o spontaneo che, sottoposto a sfalci periodici, consente il mantenimento di accettabili livelli di biodiversità nell'agroecosistema, diminuisce la compattazione e l'erosione dei terreni, limita l'emissione di polveri in fase di raccolta (Bignami *et al.*, 1999).

Le operazioni colturali che richiedono un maggior impegno di manodopera nel corso di una stagione vegetativa sono sicuramente rappresentate dalla potatura e dalla spollonatura. La potatura di produzione, che si effettua a mano, ha il duplice obiettivo di contenere l'alternanza produttiva mantenendo al contempo una equilibrata vegetazione. La produzione si ottiene infatti sui rami che si sono sviluppati nell'anno precedente e l'eliminazione delle branche secche e in eccesso, oltre a

facilitare l'ingresso della luce all'interno della chioma, consente il corretto sviluppo della pianta ed una ottimale fioritura.

Recentemente sono state proposte tecniche di potatura meccanica nei nocioleti al fine di valutarne la reale efficacia e convenienza economica (Griseri, 2013): al momento si ritiene che questa pratica sia comunque destinata ad aziende di grandi dimensioni o in presenza di impianti ad alta densità (Cristofori e Rovira, 2018).

Con la spollonatura, meccanica o chimica, si contiene il numero di polloni che formano la pianta e che, per naturale attitudine, vengono prodotti alla base dei noccioli. Con una accorta esecuzione di questa operazione, che si effettua di norma 2 volte l'anno e può impegnare fino a 50 ore/ha per intervento (Farinelli, 2017), si può garantire la corretta rinnovazione delle piante, in particolare nella forma di allevamento a vaso cespugliato. Negli ultimi anni si sta inoltre diffondendo la coltivazione di alcune varietà innestate e micropropagate (varietà Volumnia, Tonda Etrusca) ed in particolare della varietà "Tonda Francese[®]", che innestata su portinnesti non polloniferi della specie *Corylus colurna* consente di limitare i costi legati a tale onerosa operazione ottenendo comunque un prodotto di buona qualità (Farinelli, 2017).

1.2.3 Concimazione.

Per la determinazione di razionali dosi di concimazioni è necessario ricorrere al calcolo delle disponibilità dei principali elementi nutritivi presenti nel terreno correlandole sia alle asportazioni legate alla produzione sia alle esigenze vegetazionali delle piante (Dell'Abate *et al.*, 2009).

Il rapporto tra i principali macroelementi (NPK) tradizionalmente utilizzati nella fertilizzazione dei nocioleti adulti, pari a 100:50:100 unità a ettaro (ovvero 10:0,5:1, che diviene 10:0,5:0,5 nei terreni vulcanici dell'alto Lazio) potrebbe essere correttamente adeguato utilizzando l'algoritmo di Szücs a circa 85-22-24 unità ad ettaro. Il frazionamento della dose complessiva in due epoche distinte (post raccolta autunnale e ripresa vegetativa di fine inverno) è auspicabile per meglio rispondere alle diverse esigenze nutrizionali legate alla fioritura e successivamente alla germogliazione (Griseri, 2013). La concimazione fogliare è in grado di rappresentare una valida integrazione nutrizionale (Roversi, 2002), utile sia a colmare le carenze che per diminuire l'apporto fertilizzante a terra. Sono state recentemente proposte strategie alternative per rendere la concimazione fogliare sostitutiva di quella al suolo (Cristofori *et al.*, 2019).

1.2.4 Irrigazione.

La disponibilità di acqua nel terreno è un importante fattore che può influenzare le caratteristiche delle nocciole prodotte, sia come rese che per la presenza di vuoti (Bignami *et al.*, 2009). Negli ultimi anni si stanno diffondendo impianti sotterranei (tecnica di sub irrigazione) in sostituzione di quelli aerei (ali gocciolanti) con indubbi vantaggi in termini di uso efficiente della risorsa.

Al momento, tuttavia, non sono stati ancora definiti dei livelli minimi irrigui in grado di garantire buoni risultati produttivi (Cristofori *et al.*, 2014).

1.2.5 Raccolta-pulitura-essiccazione.

La raccolta delle nocciole viene effettuata da terra dove il frutto cade a maturità, nel periodo che generalmente va da agosto a fine settembre. Per la raccolta sono impiegate apposite macchine raccogliatrici semoventi e/o portate che possono operare per via meccanica, per aspirazione o in modo combinato aspirazione-raccattatura (Griseri, 2013). L'abbattimento delle polveri emesse in fase di raccolta, che rappresenta una delle problematiche di maggior impatto ambientale e che genera allarme tra i non addetti ai lavori, può essere limitato mediante una corretta gestione del pratino sottostante l'impianto o mediante l'uso di mult cicloni, mentre sembrerebbe promettente l'adozione di "dispositivi" che prevedono l'utilizzo di acqua nebulizzata a basso volume (Cecchini *et al.*, 2012).

Per una ottimale conservazione, il contenuto di umidità del seme deve essere non superiore al 6%, per cui, dopo una prima pulitura effettuata utilizzando separatori per l'allontanamento delle impurità provenienti dalla raccolta, le nocciole vengono sottoposte al processo di essiccazione. Vengono a tal fine impiegati appositi essiccatoi, in cui flussi di aria calda a circa 45 °C abbassano il contenuto di acqua nelle nocciole fino al raggiungimento del tenore di umidità desiderato: la conservazione del prodotto in guscio in tal modo può avvenire in locali chiusi e freschi, a temperatura pressoché ambiente, per diversi mesi.

1.2 Caratteristiche del frutto

A completa maturazione il frutto è una nucula globoso-ovoide più o meno allungata, costituita dal guscio nella proporzione variabile del 50-60% e dal seme per il 40-50%, a seconda della cv e delle condizioni colturali (Tombesi A., 1985). In termini energetici la sua composizione può essere

rappresentata nel grafico riportato in figura 1.2 mentre nella tabella riportata in fig. 1.3 è presente la composizione in termini di macroelementi.

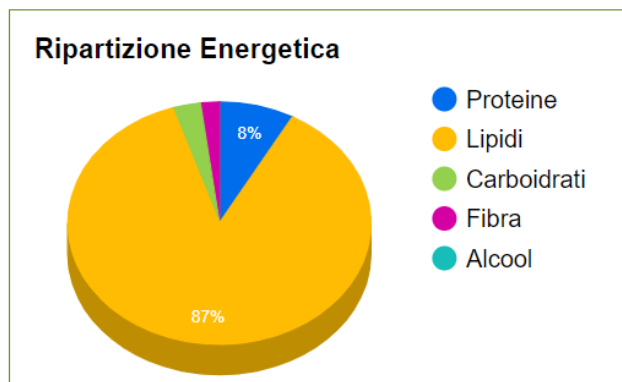


Fig 1.2 Ripartizione energetica % (CREA Alimenti e nutrizione, 2021)

Tab.1.1 Composizione in macroelementi (CREA Alimenti e nutrizione, 2021)

Descrizione Nutriente	Valore per 100 g	Valore per Porzione 30 g	Origine Dato	Metodiche
Acqua (g)	4.5	1.4	A	Drying
Energia (kcal)	671	201	C	Energy calculated according to Southgate (kcal)
Energia (kJ)	2808	840	C	Energy calculated according to Southgate (kJ)
Proteine (g)	13.8	4.1	A	Protein calculated from total nitrogen
Lipidi (g)	64.1	19.2	A	Solvent extraction
Colesterolo (mg)	0	0	S	Imputation
Carboidrati disponibili (g)	6.1	1.8	C	Carbohydrate, available calculated from sugar and starch
Amido (g)	1.8	0.5	A	Enzyme hydrolysis
Zuccheri solubili (g)	4.1	1.2	A	Colorimetric method
Alcool (g)	0	0	S	Imputation
Fibra totale (g)	8.1	2.4	A	Enzymatic-gravimetric method

La composizione nutrizionale del frutto è descritta nella tabella 1.2 in riferimento alla quale si evidenzia:

- i principali acidi grassi, che nell'insieme costituiscono oltre il 95% della frazione lipidica totale, sono acido oleico (il più rappresentato), acido linoleico, acido palmitico e acido stearico;

- è una delle varietà di frutta secca più ricca di vitamina E, antiossidante per eccellenza e la frazione oleosa lo è anche di vitamine B6, B1, B2,
- le nocciole sono inoltre un'ottima fonte di Calcio, Selenio (minerale che previene l'invecchiamento cellulare) e Flavonoidi, tra i principali polifenoli, capaci di svolgere una forte azione antinfiammatoria, antivirale e un effetto protettivo contro l'aterosclerosi, l'infarto coronarico, alcuni tipi di cancro e altre malattie vascolari (Cristofori, 2005).

Tab 1.2 Composizione nutrizionale delle nocciole (rif. 100 g di semi) (Cristofori, 2005).

Componenti principali	g	Vitamine e minerali	mg
Calorie (kcal)	672	Vitamina B1	0,3-0,6
Lipidi	55-70	Vitamina B2	0,1
Proteine	12-18	Vitamina B6	0,2-0,6
Carboidrati	16	Vitamina C	6
Fibre	1,8-6,2	Vitamina E	19-28
Profilo acidico	%	Calcio	188-195
		Ferro	3,39
Palmitico (16:0)	5,2-6,3	Magnesio	285-296
Palmitoleico (16:1)	0-0,5	Fosforo	312-323
Stearico (18:0)	1,7-2,6	Potassio	462-655
Oleico (18:1)	71,3-84,8	Manganese	6
Linoleico (18:2)	6,5-21,4	Selenio	4
Linolenico (18:3)	0,07-0,2	Zinco	2,4-3,0
Arachico (20:1)	0,1-0,2	Rame	2

Così come esistono differenze tra le cultivar in termini di vigoria, adattabilità, produttività e precocità, in realtà anche i relativi frutti si differenziano sia per le caratteristiche fisiche, ovvero per forma, dimensioni, peso, resa alla sgusciatura, che per quelle chimiche e organolettiche in particolare sapore, consistenza, aromaticità e conservabilità. Le differenti caratteristiche delle varie cultivar rendono le relative nocciole adatte ai molteplici impieghi previsti dall'industria dolciaria, cui viene destinato il 90% della produzione e che, tradizionalmente, le utilizza (per lo più dopo averle sottoposte a tostatura), intere, trasformate in granella, in farina o in pasta. (Farinelli, 2017). Sono tutti processi fisici nei quali non avviene l'aggiunta di altri ingredienti, ma che trasformano i frutti in semilavorati pronti per essere utilizzati per dare vita ad una vasta gamma di prodotti dolciari che raggiungono il consumatore finale.

2 Avversità biotiche del nocciolo

Sono molteplici le avversità che, in aggiunta ad eventi climatici avversi, possono determinare la diminuzione sia in termini quantitativi che qualitativi delle produzioni ottenibili dal nocciolo: i principali fattori biotici sono riconducibili all'attività di artropodi fitofagi, a patologie di carattere batterico e, in particolare fungino. Viene proposta, in tabella 2.1, una sintesi delle principali avversità con indicato l'apparato della pianta colpito (Moraldi, 2021).

Tab. 2.1 Principali avversità del nocciolo (Moraldi, 2021)

Apparato	Nome comune	Nome scientifico
Gemme, foglie, amenti	gleosporiosi	<i>Piggotia coryli</i>
Foglie, rami e frutti	necrosi batteriche	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>Corylina</i>
Gemme	eriofide del nocciolo	<i>Phytoptus avellanae</i>
Apparato fogliare	falena invernale	<i>Operophtheera brumata</i>
Apparato fogliare	tortricide	<i>Gypsonoma</i>
Apparato fogliare	minatrice	<i>Lithocolletis coryli</i>
Apparato fogliare	sigaraio	<i>Apoderus coryli</i>
Apparato fogliare	oidio	<i>Phyllactinia guttata</i>
Rami e branche	agrilo	<i>Agrilus viridis</i>
Parti legnose basali	rodilegno rosso	<i>Cossus cossus</i>
Parti legnose di sommità	rodilegno giallo	<i>Zeuzera pyrina</i>
Parti legnose giovani	cerambice del nocciolo	<i>Oberea linearis</i>
Fusto e branche	cancro rameale	<i>Sphaeropsis</i> sp., <i>Phomopsis</i> sp.
Rami e branche	mal dello stacco	<i>Cytospora corylicola</i>
Chioma e germogli	afide del nocciolo	<i>Myzocallis coryli</i>
Branche e fusto	moria del nocciolo	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>avellanae</i>
Frutti, foglie e germogli	avvizzimento del nocciolo	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>Corylina</i>
Frutto	balanino del nocciolo	<i>Curculio nucum</i>
Frutto	cimice nocciolaia	<i>Gonocerus acuteangulatus</i>
Frutto	cimice verde	<i>Palomena prasina</i>
Frutto	cimice grigia	<i>Rhaphigaster nebulosa</i>
Frutto	cimice asiatica	<i>Halyomorpha halys</i>
Frutto	necrosi del frutto	<i>Alternaria</i> sp, <i>Fusarium</i> sp, <i>Phomopsis</i> sp, <i>Botrytis</i> c.
Radici	marciume radicale lanoso	<i>Rosellinia necatrix</i>
Radici	marciume radicale fibroso	<i>Armillaria mellea</i>
Radici	maggolino	<i>Melolontha melolontha</i>
Radici	scarabeo	<i>Haplidia etrusca</i>

La successiva tabella 2.2, estratta dalla pubblicazione del MIPAAF "Allegato tecnico Piano del settore corilicolo 2010/2012" viene presentata a solo titolo esemplificativo per evidenziare come, nelle diverse zone di elezione della coltivazione del nocciolo, alcune delle avversità rilevate possano assumere diversa intensità e pericolosità rispetto ad altre.

Tab. 2.2 Principali avversità del nocciolo nei più importanti areali italiani di coltivazione MIPAAF “Allegato tecnico Piano del settore corilicolo 2010/2012”

AVVERSITA'	PIEMONTE	LAZIO	CAMPANIA	SICILIA
Batteriosi	No	No	No	No
Gleosporiosi	Si	No	Si	Si
Cytospora spp	Si	Si	--	Si
Oidio	No	--	--	
Carie del legno	Occasionali	Si		Si
Marciume grigio (Botritys)	da approfondire	Si	Si	Si
Necrosi grigia (Fusarium)	da approfondire	Si	Si	da approfondire
Marciume Bruno (Monilia)	No	Trascurabile	Si	No
Agrilo	Si	--	--	--
Balanino	Occasionale	Si	Si	--
Cimici	Si	Si	Si	Si
Eriofide	Si	Si	Si	Si
Cocciniglia	Occasionale	Occasionale	--	Occasionale
Acari Tetranychidi	--	Si	--	--

2.1 Avversità dovute all'artropodofauna

Nell'ambito dell'artropodofauna che popola l'ecosistema nocciolo sono sicuramente da ricordare il gruppo delle “cimici nocciolaie” ed il balanino delle nocciole per la loro attività trofica a carico dei frutti, mentre per l'attività a carico delle porzioni vegetative (branche, tronchi) vanno segnalate alcune specie di scolitidi.

Ricordiamo inoltre che le gemme del nocciolo possono essere attaccate anche da acari appartenenti alla specie *Phytoptus avellanae* (Acari: Eriophyoidea) che ne causano deformazione e mancato sviluppo (Å zman *et al.*, 1996).

2.1.1. Hemiptera, Heteroptera - “Cimici nocciolaie”

Nel gruppo delle “cimici nocciolaie” rientrano specie appartenenti all'ordine Hemiptera-sottordine Heteroptera ed in particolare alle famiglie Coreide (*G. acuteangulatus* (Goeze)) e Pentatomidae (*Nezara Viridula* L., *Palomena Prasina* L., *Halyomorpha halys* (Stål)). Tutte queste specie svolgono almeno una parte importante del loro ciclo biologico sul nocciolo e sono ritenute responsabili di

alterazioni a carico dei frutti, dando anche il nome ad un particolare difetto organolettico definito “cimiciato”.

Attività trofica degli eterotteri

La porzione più esterna dell'apparato boccale di tipo pungente succhiatore degli eterotteri presenta delle caratteristiche parti boccali conosciute come stiletti e rostro: gli stiletti, costituiti da modificazioni delle componenti mascellari e mandibolari dell'apparato boccale, penetrano il guscio per raggiungere direttamente i tessuti del frutto, mentre il rostro segmentato, rappresentato dal labbro inferiore, li “accompagna” rimanendo all'esterno. All'interno della struttura formata dagli stiletti mascellari accoppiati scorrono sia il canale salivare, attraverso il quale enzimi proteolitici vengono iniettati (ad elevata pressione) verso i tessuti dell'ospite, che il canale di suzione, attraverso il quale avviene l'alimentazione dell'insetto che sfrutta la depressione originata dall'azione dei muscoli della pompa cibaria.

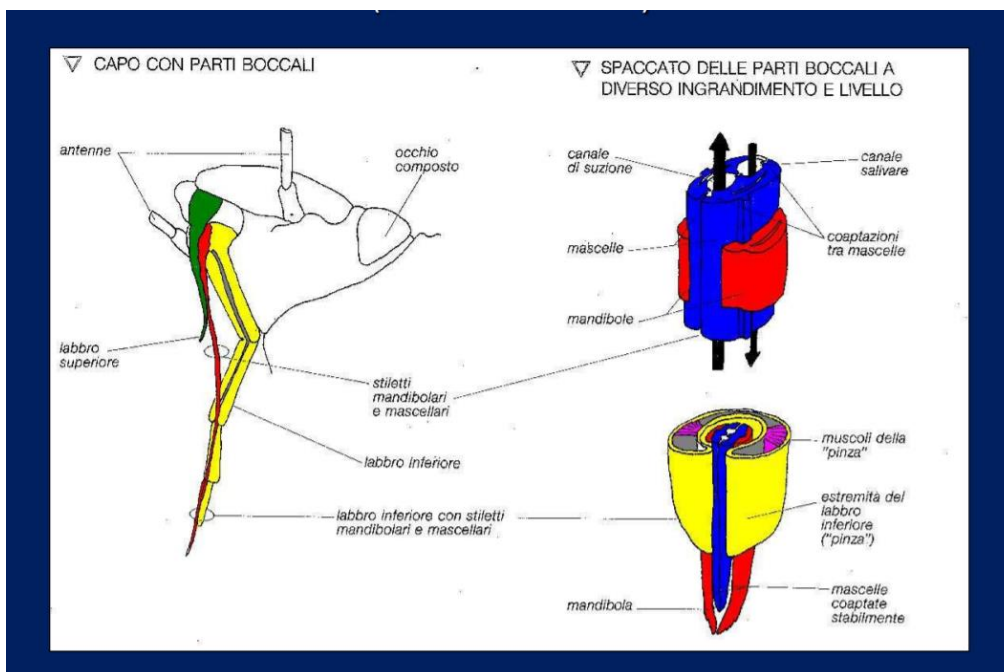


Fig. 2.1 apparato boccale pungente succhiatore degli eterotteri con evidenziati gli organi esterni (<https://www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/materiale-didattico/619850>)

Gonocerus acuteangulatus

Viene tuttora considerato uno degli insetti chiave del nocciolo, (Tavella *et al.*, 1996, 2001) perché in molti areali è stato ritenuto, almeno fino alla recente comparsa e diffusione di *Halyomorpha halys*, tra i più perniciosi (Moraglio *et al.*, 2009).

E', in Italia, una specie ubiquitaria e monovoltina con l'adulto che sverna singolarmente o in piccoli gruppi e le cui femmine depongono da 2 a 12 uova riunite in cluster sulla cupola delle nocciole. La ovideposizione può avvenire più volte nell'arco dell'anno, durante il periodo primaverile estivo. Complessivamente presenta 6 stadi preimmaginali (due come neanidi e tre come ninfa) ognuno di durata generalmente limitata, sempre in funzione delle condizioni climatiche. Il danno arrecato alle nocciole è causato dall'attività di nutrizione degli adulti che, con l'apparato boccale pungente succhiatore, possono determinare due tipologie di alterazioni:

l'"aborto traumatico" del frutto, quando impediscono lo sviluppo del seme determinando anche la caduta anticipata del frutto;

la formazione di un macchie chiare o scure sul frutto e caratteristico sgradevole sapore di "cimiciato" (Tavella e Giannetti, 2006).

Quest'ultima alterazione del gusto rappresenta un difetto che, raggiunti definiti valori percentuali, determina un forte deprezzamento delle partite di nocciole commercializzabili.

G. acuteangulatus può anche essere vettore del fungo *Eremothecium coryli* (*Nematospora Coryli*) agente della stigmamicosi del nocciolo (Tremblay, 2003) segnalato per la prima volta in Piemonte nelle stagioni 2017-2018 (Scarpari *et al.*, 2018).

Nezara viridula

E' una specie ubiquitaria che può nutrirsi sia a spese di piante coltivate che spontanee, erbacee o arboree (J.E. McPherson, 2018). Il danno che causa alle specie coltivate è del tutto simile a quanto già descritto per il *G. Acuteangulatus* con le punture di suzione che determinano l'alterazione del gusto detta cimiciato. Le femmine depongono da 42 a 114 uova, in media 78, compie generalmente due generazioni all'anno in cui alla schiusa delle uova seguono gli stadi di neanidi, ninfe ed adulto; quest'ultimo presenta due punteggiature scure ai vertici dello scutello e tre calli di colore chiaro alla base dello stesso che lo contraddistinguono (Angeli *et al.*, 2021).

Palomena prasina

Distinguibile dalla *N. viridula* per l'assenza delle punteggiature in prossimità dello scutello e per la colorazione che varia nel corso del suo ciclo annuale: da verde intenso in primavera diviene infatti bruna nel periodo autunnale. Compie generalmente due generazioni all'anno: sverna allo stadio di adulto in ripari naturali e compie una parte del suo ciclo annuale, la prima generazione, (uovo-

neanide-ninfa-adulto) su altre colture, tipicamente graminacee, da cui poi si trasferisce sul nocciolo dove di norma svolge la seconda.

La tipologia di danno è del tutto simile a quanto descritto per le specie precedentemente illustrate: in particolare è stata accertata la relazione esistente tra l'attività trofica di questa specie e l'alterazione dei tessuti del seme con comparsa di macchie bianche conosciuta come "Taca blanca", cui corrisponde, con il passare del tempo, una modificazione del gusto del frutto ed un progressivo irrancidimento. (Tavella *et al.*, 2001; Tuncer *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2009).

Halyomorpha halys

Conosciuta anche come cimice asiatica, *Halyomorpha halys* (Stål, 1855), è una specie invasiva che, originaria dell'Asia orientale, si è diffusa a partire dagli anni '90 negli Stati Uniti, dove è rapidamente divenuta il maggior responsabile di notevoli perdite a carico delle coltivazioni arboree ed erbacee presenti. Individuata per la prima volta in Svizzera nel 2007, si è quindi diffusa a partire dal 2012 con particolare rapidità in molteplici areali del Nord Italia divenendo il principale insetto fitofago causa di danno alle coltivazioni. Attualmente si sta diffondendo anche in molti altri paesi Europei dove è giunta sfruttando le vie e i mezzi di comunicazione (è considerata una specie "autostoppista"). Deve essere pertanto ritenuta una specie aliena altamente invasiva (Andreis *et al.*, 2019).

Gli adulti sono in media lunghi 15 mm (12-17 mm) ed hanno colore grigio-marrone. Per forma, dimensioni e colorazione può essere confusa con *Raphigaster nebulosa* da cui si differenzia per la conformazione del capo, per le antenne scure con banda chiara basale e apicale sul 4° segmento e solo basale sul 5° e per l'assenza della spina meta-sternale in posizione ventrale (Andreis *et al.*, 2021),

Il danno arrecato al nocciolo è simile a quello provocato dalle cimici indigene ma di entità maggiore a causa della biologia della specie. La cimice asiatica è infatti una specie multivoltina che nei paesi di origine può compiere fino a 4-6 generazioni l'anno, anche se nelle altre zone di diffusione, in particolare quelle temperate, il numero delle generazioni è limitato dal clima a una o più spesso due per anno (Costi *et al.*, 2017). Sverna l'adulto in ripari naturali o artificiali e può colonizzare facilmente aree civili divenendo visibilmente impattanti per il loro istinto gregario. A differenza delle altre cimici precedentemente descritte, piuttosto "stanziali", è in grado di spostarsi per oltre 2 km nell'arco di poche ore. È un insetto fortemente polifago (oltre 300 possibili ospiti) legato sia specie spontanee arboree ed erbacee (sambuco, rosa canina, corniolo, luppolo, acero, acacia, ailanto, viburno, biancospino e altre ornamentali) che, in particolare, coltivate come actinidia, olivo, vite, melo, pero,

ciliegio, pesco, susino, piccoli frutti; mais, soia, girasole, pomodoro, peperone e asparago (Leskey *et al.*, 2012). Gli stadi giovanili, così come quello di adulto, sono dotati di un apparato boccale pungente-succhiante estremamente specializzato che ha la capacità di penetrare cortecce e frutti anche estremamente resistenti. Nell'attività trofica è in grado di emettere, attraverso il canale formato dagli stiletto boccali, saliva particolarmente ricca di enzimi con funzione di favorire l'assorbimento attraverso la "liquefazione" dei tessuti: all'attività di questi enzimi sono associati caduta, imbrunimento e destrutturazione del frutto con diminuzione del valore commerciale, (Andreis *et al.*, 2019).

2.1.2 Coleoptera, Curculionidae - *Curculio nucum*

Conosciuto con il nome di *Balanino del nocciolo* è un coleottero della famiglia dei Curculionidi fortemente legato al nocciolo per il quale è responsabile di gravi perdite a carico dei frutti. Sverna nel terreno e in primavera le femmine, grazie al loro apparato boccale di tipo masticatore posto all'estremità del rostro particolarmente allungato (può raggiungere fino a 7,5 mm), depongono le uova all'interno dei frutti in accrescimento. Il danno è causato dalle larve che si nutrono all'interno del seme.

2.1.3 Coleoptera, Scolytidae - "Ambrosia Beetles"

Al gruppo ecologico noto come "Ambrosia beetles" appartengono Coleoptera Scolytidae conosciuti per la simbiosi nutrizionale che instaurano con i funghi del genere *Ambrosia* (Batra L. R., 1966, Beaver *et al.*, 1989). Nei corileti dei Monti Cimini sono principalmente rappresentati da *Anisandrus dispar* e *Xyleborinus saxesenii*, anche se nel corso delle osservazioni effettuate nell'anno 2020 presso alcuni nocciolieti della provincia di Viterbo è stato segnalato anche *Xylosandrus germanus*, di recente introduzione in Italia (Dutto *et al.*, 2018).

Proprio grazie al rapporto simbiotico che sono in grado di instaurare con le specie fungine, questi coleotteri xilomicetofagi riescono a colonizzare tessuti legnosi notoriamente poveri di sostanze nutritive, avvantaggiandosi del micelio fungino che invece vi trova condizioni ottimali per lo sviluppo.

Le femmine diffondono le spore del micelio fungino in specifici organi detti "micangia", trasportando all'interno delle gallerie scavate per deporre le uova nei tronchi delle piante che colonizzano con i voli primaverili.

Il danno diretto provocato è legato all'indebolimento delle piante in seguito all'attività di escavazione per la formazione delle gallerie in cui si svilupperanno le larve, e la presenza del fitofago sembra anche associabile ad altre patologie ad eziologia complessa che affliggono i corileti (Scortichini, 2002; Bucini *et al.*, 2004).

2.2 Avversità di natura fungina

2.2.1 Mal dello stacco

Riguardo le malattie fungine, tra le più diffuse nel comprensorio dell'alto Viterbese si riporta il "mal dello stacco", causata da *Cytospora corylicola* (Varvaro e Fabi, 2013). La sintomatologia è prevalentemente a carico dei rami che, quando vengono gravemente colpiti, mostrano una depressione della corteccia che si fessura in superficie e una forte perdita della resistenza meccanica: in condizioni di forte vento, ciò li rende suscettibili di improvvise rotture. Una ulteriore manifestazione del patogeno è l'emissione dalle parti necrotizzate delle branche di tipici aggregati conidici, detti cirri, sotto forma di gocce mucillaginose di colore rosso-aranciato, evidenti, in particolare, in periodi ad elevata umidità. Il patogeno penetra attraverso ferite e viene diffuso per lo più dalle piogge (Varvaro *et al.*, 2011). In passato questa fitopatia sembrava interessare quasi esclusivamente noccioleti deboli e trascurati, ma recentemente ne è stata rinvenuta la presenza anche in arboreti caratterizzati da buone condizioni generali (Tavella e Giannetti, 2006). In ogni caso, è stata dimostrata la correlazione esistente tra fattori pedoclimatici, in particolare temperatura e contenuto di sostanza organica nel suolo, e gravità della patologia (Lamichhane *et al.*, 2014).

2.2.2 Necrosi grigia del nocciolo (NGN)

Descritta nell'ultimo decennio come una nuova malattia e ritenuta causa di notevoli perdite di produzione nei noccioleti, è stata associata a "*Fusarium lateritium* Nees" [*Gibberella baccata* (Wallr.) Sacc.] come agente causale (Santori *et al.*, 2010; Vitale *et al.*, 2011). *Fusarium* è un genere di funghi ascomiceti filamentosi cosmopolita, classificato come uno dei più ricchi di specie al mondo, e che include patogeni delle piante economicamente molto rilevanti, oltre a saprofiti ed endofiti, (O'Donnell *et al.*, 2013, 2015). Tra le numerose specie, *F. lateritium* in particolare è stata segnalata su numerosi ospiti, compresi alberi da frutto legnosi, arbusti e piante erbacee, dove può indurre avvizzimento dei germogli e formazione di cancri. Sono stati condotti diversi test di patogenicità, a

supporto del coinvolgimento di questa specie nella NGN e nel cancro dei getti del nocciolo (Belisario e Santori, 2009).

Alla Necrosi Grigia del Nocciolo, sono state associate anche specie fungine appartenenti ad altri generi come *Alternaria* spp., e *Diaporthe* spp. (Duran P. 2020), sebbene *F. lateritium* sia, ad oggi, considerato l'agente patogeno principale della malattia per la virulenza dimostrata a carico di diversi organi della pianta (Belisario, 2016)

Questa patologia si manifesta inizialmente con la formazione sia di macchie bruno-grigiastre alla base di frutti di nocciolo, che in seguito progrediscono verso l'alto fino all'apice, sia di chiazze necrotiche sulle brattee e, meno spesso, sui piccioli (Belisario e Santori, 2009). In fase avanzata le necrosi possono raggiungere i tessuti dell'ovario causandone l'aborto. Allo sviluppo necrotico può seguire marcescenza per effetto combinato dell'azione di funghi del genere *Alternaria* spp (*A. arborescens*, *A. alternata*, ecc.) (Belisario 2016). La malattia si può manifestare anche a carico dei giovani germogli con la formazione di cancri rameali che presentano, in questo caso, un tipico ripiegamento ad "L" (Belisario, 2005).

2.2.3 Gleosporiosi

La patologia è causata da *Gloeosporium coryli* (sinonimi *Monostichella coryli*, *Labrella coryli*, *Piggotia coryli*), fungo capace di attaccare vari organi del nocciolo, quali le foglie, le gemme, gli amenti, i frutti e, talvolta, anche i giovani rami causandone il disseccamento (Tavella e Giannetti, 2006). Nel corso della stessa stagione vegetativa l'infezione può manifestarsi:

- precocemente in primavera, prima della germogliazione, con evidenti macchie necrotiche a carico sia delle infiorescenze maschili che dei germogli, lasciandoli deboli e stentati fino a causarne la morte;
- tardivamente, in fine primavera inizio estate, causando, sulla lamina fogliare, delle maculature di colore rosso ruggine contornate da un alone verde che possono arrivare ad interessare l'intera superficie, diminuendo significativamente l'attività fotosintetica della pianta (Contarini *et al.*, 2021).

2.2.4 Oidio

È ritenuta una malattia di importanza limitata dovuta al fungo *Phyllactinia guttata* Lev. Si manifesta per lo più nel periodo tardo estivo-autunnale sulla pagina inferiore delle foglie e può portare a filloptosi anticipate. Forma un caratteristico micelio di colore bianco sul quale, a fine stagione, sono visibili anche i cleistotecii (o casmoteci) di colore scuro, strutture riproduttive sessuali che fungono anche da organi di svernamento. Questa patologia può risultare particolarmente pericolosa in impianti ubicati in zone di pianura, in condizioni di particolari situazioni climatiche, perché vi può causare filloptosi anticipata (Mazzone e Ragozzino, 2006). In alcune regioni del Nord America, invece, è *Microsphaera ulmi* la specie responsabile di mal bianco (Mazzone e Ragozzino, 2006).

Nell'estate 2021, però, è stata segnalata, e per la prima volta riconosciuta nel Lazio, una diversa forma di oidio riconducibile al fungo *Erysiphe corylacearum*. La sintomatologia in questo caso si manifesta con la formazione del tipico micelio bianco sulla pagina superiore della foglia o su entrambe le superfici della lamina fogliare, diversamente da *P. guttata* in cui il micelio colonizza solo la pagina inferiore. A differenza di *P. guttata*, *E. corylacearum* può colpire non solo le foglie ma anche le brattee dei frutti. Inoltre, i casmoteci, che contengono gli aschi con le ascospore, risultano di dimensioni ridotte, fino a 2.5 volte più piccoli rispetto a *P. guttata*. Questa nuova forma di oidio, in precedenza già riscontrata in Austria (Voglmayr H., 2020) e Piemonte nel 2020 ed in Iran, Azerbaijan, Turchia e Georgia nel 2018, risulta molto più pericolosa di *P. guttata* perché, manifestandosi anticipatamente, può portare a una precoce caduta delle foglie con compromissione della produttività delle piante (Regione Piemonte-Agrion 2020).

2.2.5 Cancri rameali

In osservazioni di piante colpite da cancri rameali è stata riscontrata anche la presenza delle due specie fungine *Biscogniauxia mediterranea* e *Phomopsis* spp. Il coinvolgimento di queste due specie è risultato essere evidente in particolare in nocciolieti con elevata incidenza di *C. corylicola*. (Varvaro et al., 2011). Il fungo *Biscogniauxia mediterranea* è un Ascomicete appartenente alla famiglia delle Xylariaceae ed è l'agente del "cancro carbonioso" che colpisce, in particolare, il genere *Quercus* (Plutino, 2008).

2.2.6 Moniliosi del nocciolo

La moniliosi del nocciolo è attribuibile a *Monilina fructigena* che, sebbene sia associata principalmente a patologie a carico delle drupacee, può attaccare anche i frutti del nocciolo, in particolare in stagioni caratterizzate da elevati valori di temperatura associate a condizioni di elevata umidità. Colpisce generalmente nei mesi estivi attaccando i tessuti non lignificati del pericarpo e causa imbrunimenti e raggrinzimenti a carico dei frutti (Varvaro *et al.*, 2011).

2.2.7 Muffa del nocciolo

Con il termine generico di “muffa del nocciolo” viene indicata qualsiasi formazione di micelio fungino che si sviluppi internamente o esternamente al frutto. Più approfondite indagini, sia morfologiche che molecolari, hanno dimostrato che si tratta per lo più di specie appartenenti al genere *Penicillium*, sebbene sia stata segnalata anche la presenza di specie appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Diaporthe* (Pscheidt J. W. 2019). Il genere *Diaporthe*, in particolare, è ritenuto responsabile di diverse patologie a carico degli organi vegetativi del nocciolo (Lawrence D.P., 2015). Recentemente, la specie *Diaporthe eres* è stata segnalata come possibile agente causale di alcuni difetti della nocciola, quali macchie scure sulla superficie esterna e imbrunimento del frutto. Sebbene le conoscenze sull'ecologia di questo fungo siano ancora limitate, questa problematica emergente deve essere tenuta in considerazione nell'elaborazione delle strategie di protezione delle produzioni (Arciuolo, 2021). Il ruolo di *Diaporthe eres* nel determinare difetti alle nocciole sembrerebbe confermato anche da analisi effettuate su prodotto proveniente dalla regione del Caucaso ed è legato comunque al contenuto di umidità del substrato (Battilani, 2018).

2.2.9 Altre avversità fungine

Didymella corylicola sp. nov.

Recentemente è stata descritta una nuova specie fungina appartenente alla famiglia Didymellaceae, *Didymella corylicola* sp. nov., frequentemente associata ai frutti del nocciolo, in particolare durante il periodo primaverile. Restano tuttavia ancora da approfondire e chiarire le relazioni con i difetti della nocciola (Scarpari *et al.*, 2020).

2.3 Avversità di natura batterica.

Tra le principali avversità batteriche sono da ricordare la “necrosi batterica” e la “moria del nocciolo” (Cristofori, 2018).

2.3.1 Necrosi batterica.

È causata da *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* ed è anche conosciuta come “avvizzimento batterico” per via della tipica deformazione che causa alle foglie ed ai rami. Provoca, inoltre, delle caratteristiche maculature sull’involucro del frutto ed in particolare sulle brattee. Inizialmente ritenuto particolarmente pericoloso per le giovani piante in vivaio, oggi è dimostrato essere ampiamente diffuso anche in campo. Il suo sviluppo sembra essere favorito da stagioni umide e piovose (Varvaro et al., 2011).



Fig. 2.2 Necrosi batterica del nocciolo (da Agrion)

2.3.2 Moria del nocciolo.

Con questo termine viene indicata una sindrome che nel Lazio, durante il decennio 1990-2000, ha causato la morte di un elevatissimo numero di piante di nocciolo, portando alla necessità di procedere, come pratica di contenimento, all’estirpazione di innumerevoli ettari di impianti. La manifestazione iniziale tipica è a carico delle foglie che, in primavera, mostrano una colorazione assai sbiadita e successivamente, in estate, si disseccano senza cadere a terra; sono presenti anche imbrunimenti dei tessuti corticali e del cambio. Il batterio *Pseudomonas avellanae* è ritenuto il principale responsabile di tale avversità (Scortichini, 1992, Scortichini et al., 1994), anche se questa può essere considerata una patologia ad eziologia complessa in cui molteplici fattori, singolarmente

o in associazione, divengono causa di possibili stress e concorrono a determinare lo stato di malessere delle piante. È stata dimostrata infatti anche una correlazione con l'elevata acidità del terreno, come causa di squilibri nutrizionali (Scortichini, 2001). Per il controllo si consigliano corrette pratiche colturali: fertilizzazioni equilibrate, preferendo adeguati apporti di sostanza organica al terreno, corretta gestione del suolo, asportazione e distruzione del materiale vegetale infetto (Scortichini, 2006), mentre il principio attivo acibenzolar-S-metile si è dimostrato in grado di contrastare l'evolversi della malattia, se utilizzato all'insorgenza dei primi sintomi (Scortichini et al., 2000).

2.4 Alterazioni a carico dei frutti, relazioni insetti funghi fitopatogeni

Le più diffuse "alterazioni", che colpiscono la porzione edibile delle nocciole, genericamente indicate con l'espressione "rotten hazelnut" possono essere indicate come "avariato" e "cimiciato": per avariato si intende l'imbrunimento più o meno esteso dei tessuti interni con possibile presenza di marcescenza causato dall'attività di specie fungine, (Vitale *et al.*, 2020) mentre il "cimiciato" è provocato dall'attività di alimentazione degli Eterotteri specializzati, e può essere associato alla presenza di macchie e di sapore sgradevole. L'azione trofica delle cimici nocciolaie a carico del frutto può determinare inoltre l'aborto del seme detto "aborto traumatico" (Tavella *et al.*, 2001; Tavella, 2011).

Il "cimiciato" viene descritto come "un complesso di alterazioni visibili sul seme sotto forma di macchie superficiali di colore da biancastro a bruno circondate da alone più scuro e di consistenza anormale" con accentuazione del sapore amaro. Per "aborto traumatico" si intende invece l'arresto dello sviluppo del seme che determina il mancato riempimento della nocciola con conseguente caduta a terra della stessa vuota (Tavella *et al.*, 2001; Tavella, 2011).

Le modalità di alimentazione degli Eterotteri prevedono che i relativi organi (stilette) penetrino per via intracellulare nel tessuto vascolare e successivamente ne aspirino il contenuto attraverso un meccanismo di pompa osmotica, senza penetrare all'interno della membrana cellulare: non possono pertanto essere considerati tra i principali responsabili della trasmissione di potenziali agenti patogeni a carico degli organismi colpiti, ma non devono essere esclusi da tali tipologie di indagini, in particolare per quanto riguarda le specie fungine (Mitchell, 2004).

Attraverso la saliva gli eterotteri sono in grado di trasmettere enzimi idrolizzanti, in particolare proteasi, amilasi, esterasi e lipasi. Nelle nocciole "cimiciate" è stato infatti possibile rinvenire un livello più elevato di acidi grassi polinsaturi totali, con conseguente maggiore rapporto acidi

insaturi/saturi, una maggior presenza di idroperossidi, una diversa composizione dei fitosteroli e la diminuzione della loro quantità complessiva (Memoli 2017). Mentre nella fase di conservazione in post raccolta è stato descritto l'incremento dei processi ossidativi, una più veloce degradazione delle sostanze grasse con aumento del rancido, la diminuzione del dolce e del sapore di nocciola (Pezzolla 2018).

Secondo studi effettuati da Singldinger, le cimici con la loro attività trofica sono anche in grado di trasmettere ai frutti microrganismi o stimolanti chimici presenti nella saliva che inducono la produzione di asadanina, ritenuta responsabile del sapore amaro (Singldinger 2017; -2018).

Tra le possibili associazioni insetti-funghi, il tipo di relazione che si instaura è generalmente molto semplice: gli organi di diffusione del patogeno aderiscono esternamente agli organi dell'insetto o sfruttano le ferite da esso provocate per diffondersi sull'ospite ed al suo interno. (<http://www.genopomii.unina.it/genohort/files/insetti%20vettori.pdf>).

G. acuteangulatus, come già accennato, è considerato il vettore del fungo *Eremothecium coryli* (*Nematospora coryli*), agente della stigmatomiosi del nocciolo ovvero del "dry-rot" del seme della nocciola (<https://www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/materiale-didattico/619850>). È stato dimostrato, inoltre, che anche *Halyomorpha halys* può agire da vettore di *Eremothecium coryli* (Brust 2011), così come pure *Nezara viridula* (Angeli *et al.*, 2021), che è in grado anche di trasmettere alcune specie batteriche, (anche su colture erbacee diverse, come il cotone).

Dal confronto tra le specie fungine isolate da nocciole colpite da "cimiciato" con quanto ottenuto da esemplari che presentano l'alterazione individuata come "avariato" è possibile rilevare significative somiglianze in quanto diverse specie fungine (es *Alternaria* spp, *Cladosporium* spp,....) sono presenti in entrambi i casi (Vitale *et al.*, 2020).

3 Obiettivi della ricerca.

In considerazione della forte espansione che la coltivazione del nocciolo sta vivendo nel panorama agricolo nazionale (secondo i dati Ismea si registrano oltre 12.000 ha di nuovi impianti nel periodo 2015 – 2019), e nel Lazio in particolare, regione italiana nella quale si è riscontrato negli stessi anni il più spiccato incremento delle superfici investite (Ismea-dati Istat 2021), nel corso delle attività previste dal dottorato si è ritenuto opportuno approfondire alcuni aspetti riguardanti:

1. il monitoraggio delle specie di eterotteri dannose presenti nei corileti del comprensorio dei Monti Cimini, con riferimento alla valutazione della presenza delle specie autoctone e con l'intento inoltre di fornire evidenza dell'ingresso e della diffusione di specie aliene di nuova introduzione come *H. halys*: tale attività è stata svolta sia in frutteti condotti secondo il metodo dell'agricoltura biologica (Reg. Ce 834/2007) che in frutteti gestiti seguendo i principi della difesa integrata (IPM), rispettando in particolare le indicazioni presenti nei disciplinari di produzione integrata validi per la regione Lazio del Sistema di Qualità Nazionale Produzione Integrata (SQNPI) ;
2. la valutazione delle variazioni di suscettibilità dei frutti del nocciolo all'azione trofica delle cimici, studiando in particolare la relazione tra questa e lo stadio di sviluppo e maturazione del frutto ed i conseguenti diversi tipi di danno riscontrabili;
3. le interazioni esistenti tra nocciole, cimici e agenti patogeni fungini, analizzando la capacità che hanno gli eterotteri "specializzati" di agire da vettori (carrier) delle specie fungine rinvenibili sui frutti. L'obiettivo della presente ricerca è stato quello in particolare di indagare la possibilità che la trasmissione di specie fungine tra insetto e nocciola avvenga per contaminazione esterna delle porzioni superficiali dell'apparato pungente succhiatore delle cimici nocciolaie che entrano direttamente in contatto con l'ospite.
4. Come sopra ricordato, tra gli agenti responsabili della Necrosi Grigia del nocciolo (NGN) si ritiene che *Fusarium lateritium* svolga un ruolo primario. Per approfondire le conoscenze su questo microrganismo, si è voluto sequenziare il genoma di un isolato fungino ottenuto da nocciole con i tipici sintomi della NGN in un corileto specializzato ubicato nella provincia di Viterbo nel 2019.

“PANTHEON scada for agriculture”.

Molteplici attività legate alla presente ricerca, come sarà meglio indicato nel prosieguo, sono state effettuate nell’ambito delle prove sperimentali condotte per “Pantheon project”. “PANTHEON scada for agriculture” (<https://pantheon.inf.uniroma3.it/project.html>) è un progetto di durata pluriennale (2017/2021), al quale hanno partecipato 4 università europee (Università degli Studi Roma Tre, Université libre de Bruxelles, Università degli Studi della Tuscia, Universität Trier) e 2 partner industriali (Ferrero Trading Lux S.A., Sigma Consulting), realizzato nel quadro del programma di finanziamenti promosso dalla Commissione Europea denominato Horizon 2020. L’obiettivo è stato quello di sviluppare un nuovo sistema SCADA (“Supervisory Control And Data Acquisition- controllo di supervisione e acquisizione dati”), ovvero un sistema informatico distribuito per il monitoraggio e la supervisione di sistemi fisici per la coltivazione di precisione dei nocciolati. Il sistema prevede l’impiego di droni e rover terrestri automatizzati in grado di raccogliere dati ed eseguire operazioni di campo: tutte le informazioni vengono quindi convogliate in un’unità centrale che è in grado di effettuare azioni di feedback automatico e fornire supporto alle decisioni degli agronomi.

L’unità operativa dell’Unitus-Dipartimento DAFNE, coordinata dal Prof. V. Cristofori, composta anche dai gruppi di studio di Patologia vegetale ed Entomologia agraria, si è occupata in particolare della gestione delle attività di ricerca più strettamente connesse alle operazioni svolte nel campo sperimentale ubicato nel comune di Nepi, con prove che hanno interessato diversi ambiti comprendendo aspetti sia di tecnica colturale (come irrigazione, potatura, spollonatura) che di difesa dai diversi agenti di danno. La presente ricerca è stata svolta nell’ambito di queste ultime attività, con l’intento di approfondire gli studi legati alla difesa delle nocciole sia da agenti fungini che dall’azione degli “eterotteri specializzati”, ritenuti responsabili di ingenti perdite a carico delle produzioni.

4 Monitoraggio delle popolazioni di cimici presenti nei corileti dei Monti Cimini.

Il monitoraggio delle specie di eterotteri presenti nei corileti dei Monti Cimini è stato effettuato con l'obiettivo di valutare la presenza e consistenza delle popolazioni sia delle specie storicamente rilevate e più rappresentative di cimici nocciolaie sia di specie aliene come *H. halys*. La valutazione in campo della presenza degli eterotteri è comunemente condotta adottando due diverse strategie di monitoraggio: utilizzando la tecnica del frapping e mediante l'impiego di trappole innescate con sostanze attrattive.

Il metodo del *frapping* consiste nel posizionare un telo bianco sotto un numero definito di branche selezionate che vengono poi sottoposte a scuotimento per causare la caduta degli insetti presenti. I rami delle piante selezionate vengono sottoposti a scuotimento generalmente nelle prime ore del mattino, momento in cui gli esemplari di cimici, ed in particolare gli adulti, risultano meno mobili e più facilmente catturabili (Tavella *et al.*, 1996; Sonnati *et al.*, 2009). Tale tipologia di monitoraggio, riconducibile alle strategie di gestione integrata (Integrated Pest Management - IPM) del nocciolo, è altresì prevista nei disciplinari redatti sulla base delle Linee Guida nazionali e regionali cui si devono attenere le aziende che aderiscono al Sistema Qualità Nazionale Produzione Integrata (SQNPI) o alla Difesa integrata volontaria; negli stessi documenti vengono anche indicate le soglie d'intervento superate le quali possono essere effettuate azioni di contenimento del parassita in base alla forma di gestione adottata (<https://www.reterurale.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/22398>).

A seguito dei considerevoli danni che *Halyomorpha halys* ha causato, con la sua espansione in tutto il mondo, alle produzioni agricole incluse quelle corilicole, la ricerca di strategie di monitoraggio e controllo di questa avversità ha consentito l'individuazione e sintesi di un compound di sostanze feromoniche che associate a trappole di varia forma sono in grado di attirare e catturare esemplari di questa specie (Khrimian *et al.*, 2008; 2014). Tali sostanze feromoniche, ottenute dalle emissioni di un altro pentatomide, *Plautia stali* Scott, sono risultate attrattive non solo per *H. halys* ma anche per altre specie di eterotteri che normalmente popolano i noccioli (Aldrich *et al.*, 2009), consigliandone l'associazione a trappole e la conseguente messa in commercio per le consuete attività di monitoraggio di questi fitofagi. Esistono diverse tipologie di trappole in cui all'erogatore del feromone possono essere associate sia tabelle adesive che, in alternativa, contenitori di varie dimensioni, materiali costruttivi e forma, ad esempio piramidali, per trattenere gli esemplari catturati (Morrison III *et al.*, 2015).

Si riportano, in questa sezione, i risultati del monitoraggio delle cimici nocciolaie, condotto in alcuni corileti del comprensorio dei Monti Cimini nelle stagioni 2019, 2020 e 2021.

4.1 Materiali e metodi.

4.1.1 Siti di indagine

Nel 2019 le attività di ricerca sono state condotte esclusivamente nell'azienda agricola "Vignola" (42°17'23.86" N - 12°17'00.51" E) ubicata nel comune di Nepi, in provincia di Viterbo. In questa azienda, dove la coltivazione del nocciolo occupa la maggior parte della superficie disponibile, le piante hanno approssimativamente 20 anni di età, sono disposte con sesto d'impianto 5 x 5 m e sono allevate a vaso cespugliato policaule con un numero medio di 5-7 branche per esemplare. La cultivar predominante è la Tonda Gentile Romana con rappresentanti della cv Nocchione per fornire la necessaria impollinazione.

Nel 2020 e 2021 la sperimentazione è stata estesa ad altri nocciolieti appositamente scelti tra gli impianti rappresentativi della realtà corilicola dei Monti Cimini e con caratteristiche assimilabili a quelle del campo precedentemente descritto (Tab. 4.1).

Tab. 4.1 Denominazione, ubicazione, coordinate geografiche e gestione fitosanitaria delle aziende della provincia di Viterbo dove è stato condotto il monitoraggio delle cimici negli anni 2020 e 2021.

Denominazione azienda	Ubicazione sito	Coordinate GPS	Gestione fitosanitaria
Vignola	Nepi	42°17'23.8"N 12°17'00.5"E	SQNPI
Bellacima	Capranica	42°16'21.0"N 12°07'06.7"E	SQNPI
Lanzalonga	Capranica	42°14'47.0"N 12°11'16.2"E	SQNPI
Ingegneri	Vetralla	42°20'14.1"N 12°05'24.0"E	SQNPI
Imperia	Capranica	42°14'54.2"N 12°10'46.8"E	Biologico

Ricci	Capranica	42°17'03.6"N 12°07'07.1"E	Biologico
Pepponi	Viterbo	42°26'41.4"N 12°06'37.8"E	Biologico

Tali noccioleti sono stati selezionati considerando anche le diverse tipologie di gestione fitosanitaria: sono state infatti scelte tre aziende aderenti al SQNPI (Sistema di Qualità Nazionale Produzione Integrata) e tre aziende aderenti alla produzione biologica (secondo quanto previsto nel Reg. CE 834/2007). L'azienda Vignola è stata inclusa tra le aziende aderenti al sistema SQNPI.

4.1.2 Tecniche di monitoraggio delle cimici: frappage e trappole attrattive.

Frappage.

Il metodo del frappage è stato impiegato per il monitoraggio degli eterotteri nei campi sperimentali posizionando un telo bianco (3 x 3 m) sotto le branche di sei mezza piante per ettaro (corrispondenti a tre piante intere) che sono quindi state sottoposte a scuotimento per causare la caduta degli insetti presenti. Tale attività è stata condotta con cadenza settimanale, nelle prime ore del mattino, dal 12 giugno al 11 settembre nel 2019, dal 28 maggio al 27 agosto nell'anno 2020, dal 11 giugno al 27 agosto nel 2021. Il materiale raccolto è stato quindi trasportato e analizzato in laboratorio dove si è giunti all'identificazione delle diverse specie e del relativo stadio di sviluppo, con l'impiego di chiavi di riconoscimento specifiche (Angeli *et al.*, 2021).



Fig. 4.1 Telo bianco posato a terra sotto le branche di una pianta per la raccolta di insetti con il metodo frappage.

Trappole attrattive.

Il monitoraggio degli eterotteri è stato condotto anche impiegando trappole Pherocon® StinkBug (Certis Europe Italia, Saronno, Varese) attivate con esche feromoniche (Trécé, Adair, OK USA), per l'efficacia che hanno evidenziato in precedenti sperimentazioni (Acebes-Doria *et al.*, 2018). Tali trappole sono costituite da una tabella adesiva trasparente (30 x 15 cm) e da due erogatori di feromoni (murgantiolo e metil 2,4,6 decatrienoato) in grado di attirare esemplari adulti e stadi preimaginali di *H. halys*; il loro impiego è stato finalizzato inoltre a valutare la selettività nei confronti di altre specie di cimici del nocciolo.

Nel nocciolo sito nell'azienda agricola "Vignola", per ogni anno di sperimentazione, sono state disposte in campo 3 trappole feromoniche, ognuna posta al vertice di un ipotetico triangolo di circa 200 m di lato, che includeva il nocciolo dove è stato condotto il monitoraggio. Nelle restanti sei aziende monitorate è stata posizionata un'unica trappola. Il posizionamento è avvenuto il 5 giugno e le trappole sono state rimosse il 24 ottobre nel 2019, mentre in entrambi gli anni 2020 e 2021 sono state installate il giorno 11 giugno e rimosse il 1° ottobre. Tutte le trappole sono state posizionate ai confini degli appezzamenti monitorati, controllate settimanalmente e gli insetti catturati sono stati riconosciuti visivamente; gli erogatori di feromone sono stati sostituiti ogni 12 settimane, come consigliato dall'azienda produttrice, mentre le tabelle adesive ogni 6 settimane e comunque quando avevano perduto la capacità di incollare gli insetti che vi si posavano sopra.



Fig. 4.2 Trappola attrattiva Pherocon® : tabella adesiva con diffusore di feromone.

4.1.3 Analisi statistica

Tutti i dati relativi alle catture sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando i modelli lineari generalizzati (GLM) con post-hoc test di Bonferroni confrontando:

1. le catture tra gli anni (individui catturati per gli anni 2020 e 2021)
2. le catture in funzione della tipologia di gestione del nocchioleto (integrata vs biologica)
3. Il numero di catture delle diverse specie di cimici

Per tutte le analisi eseguite è stato impiegato il software R (R Core Team 2018).

4.2 Risultati.

Come detto, nel 2019 il monitoraggio è stato limitato all'azienda Vignola. Tale attività condotta sia con il metodo del frapping che con le trappole feromoniche ha portato alla raccolta di un esiguo numero di esemplari di cimici. In particolare il metodo del frapping, ha portato alla cattura di soli sei esemplari di *G. acuteangulatus* in tutta il periodo di monitoraggio. Le trappole a feromone hanno consentito la cattura di un numero massimo di 5 esemplari di *H. halys* nei campionamenti del 19 giugno e del 17 ottobre. In quest'ultima data è stato raccolto anche un numero complessivo di 5 esemplari di *P. prasina*. Nessun esemplare di *G. acuteangulatus* è stato catturato con le trappole a feromone (Fig. 4.3).

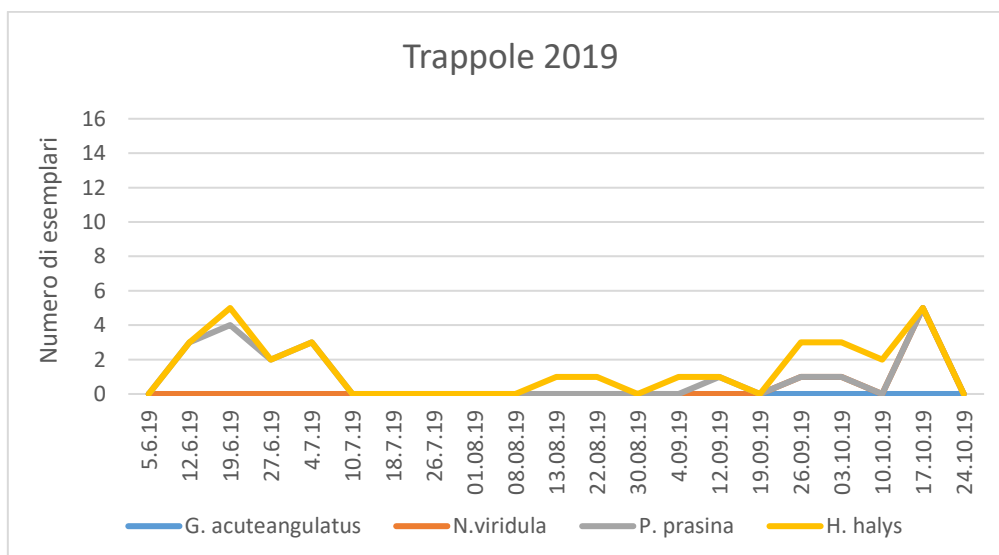


Fig. 4.3 Catture cumulative delle differenti specie di cimici, ottenute con le tre trappole a feromone posizionate nell'azienda Vignola nel 2019

Alla luce delle esigue catture ottenute con entrambi i metodi impiegati si è deciso, per i due anni successivi, di procedere al monitoraggio comprendendo altri siti come precedentemente descritto, al fine di raccogliere un maggior numero di dati e dare più ampia significatività all'indagine.

Frappage.

I risultati dei campionamenti effettuati con il metodo del "frappage" sono espressi nelle figure 4.4 e 4.5. Nell'anno 2020 *G. acuteangulatus* rappresenta la specie maggiormente intercettata, costituendo oltre il 72,4% del totale degli esemplari catturati, seguita da *N. viridula* con il 19,3% e da *P. prasina* con il 7,8%. Durante tutta la stagione è stato raccolto con questo metodo un esemplare (0,5% del totale) di *H. halys*; è necessario rilevare come sia stato riscontrato un sensibile incremento delle catture di esemplari di *G. acuteangulatus* in corrispondenza del mese di agosto. Il monitoraggio condotto nel 2021 ha evidenziato una significativa riduzione (GLM, $p < 0,05$) nel numero complessivo di cimici catturate, rispetto all'anno precedente (Fig. 4.6). La specie maggiormente catturata è risultata *N. viridula*, con un picco di presenza, pur limitato, osservato ad inizio agosto (Fig. 4.5).

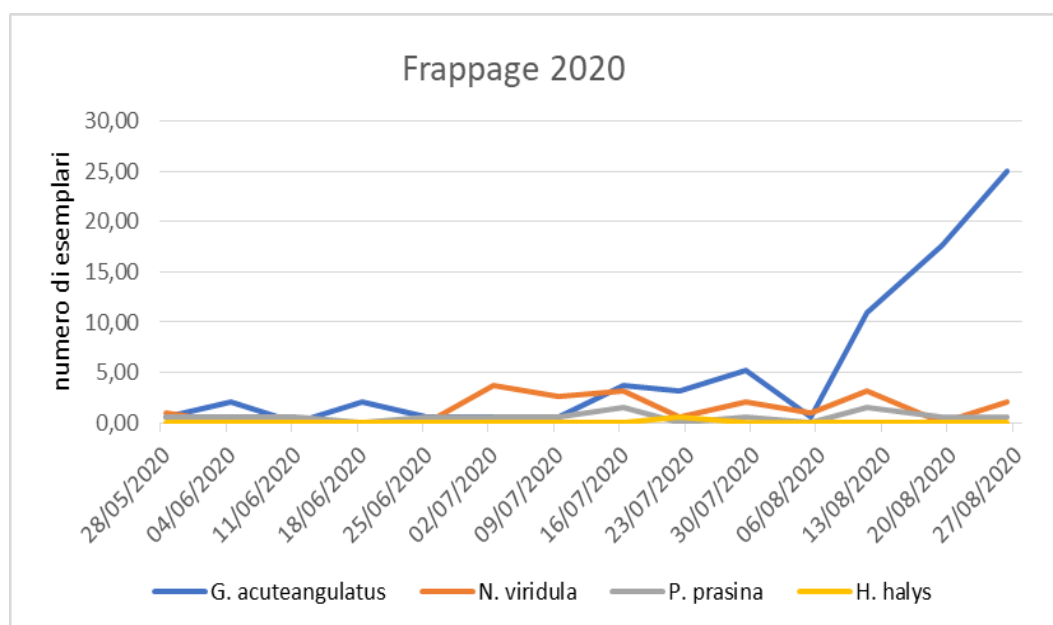


Fig. 4.4 Catture cumulative degli esemplari delle diverse specie di cimici, ottenute nell'anno 2020 con il metodo del frappage nelle 7 aziende in esame.

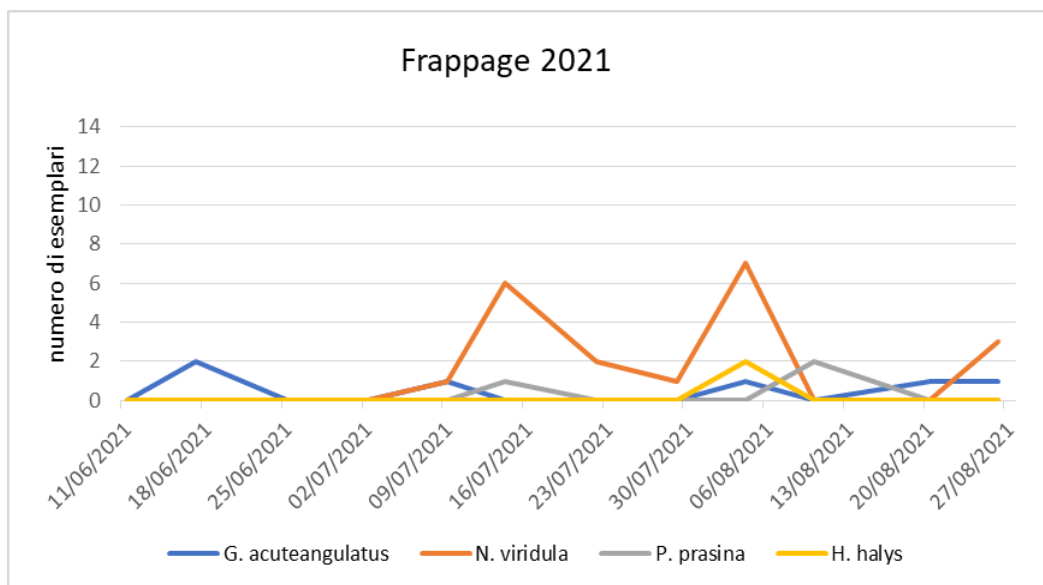


Fig. 4.5 Catture cumulative degli esemplari delle diverse specie ottenute nell'anno 2021 con il metodo del frappage nelle 7 aziende in esame.

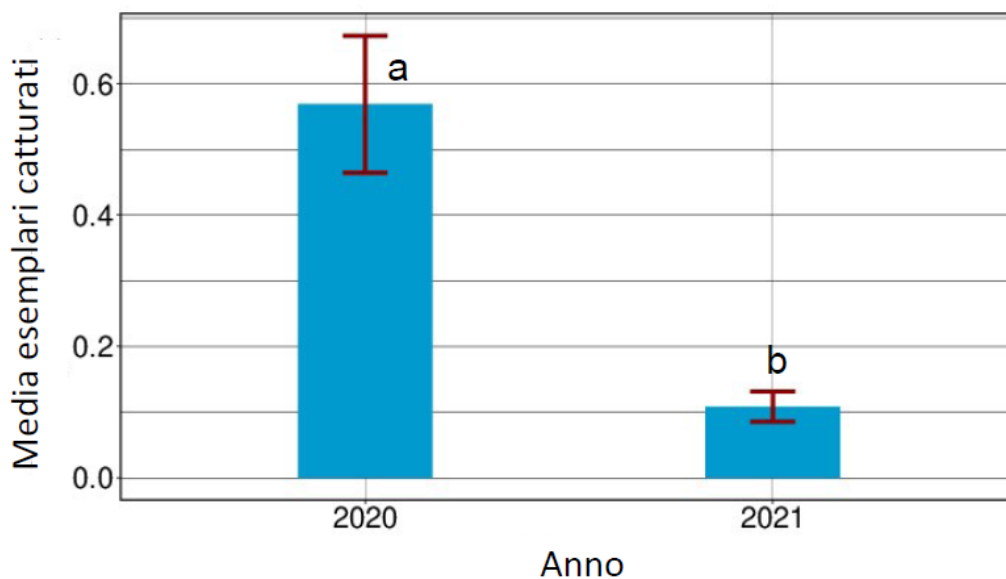


Fig. 4.6 Catture complessive di cimici (media \pm errore standard) nei due anni di monitoraggio con il metodo del frappage. Lettere differenti indicano differenze significative al test GLM ($p < 0,05$).

I risultati del frappage, eseguito nelle aziende sottoposte alle due diverse tipologie di gestione fitosanitaria, evidenziano come nell'anno 2020, le metodologie di controllo attuate secondo i principi della produzione integrata (IPM) si siano dimostrate in grado di contenere la popolazione di eterotteri (Fig. 4.7). Di contro, le catture relative all'anno 2021 non hanno evidenziato significative differenze tra le due diverse tipologie di gestione (Fig. 4.8). Complessivamente, nei due anni di monitoraggio si è osservata una maggiore presenza di cimici nelle aziende gestite con pratiche di

agricoltura biologica in confronto alle aziende SQNPI, evidenziata anche dall'analisi statistica (GLM, $p < 0,05$) (Fig. 4.9).

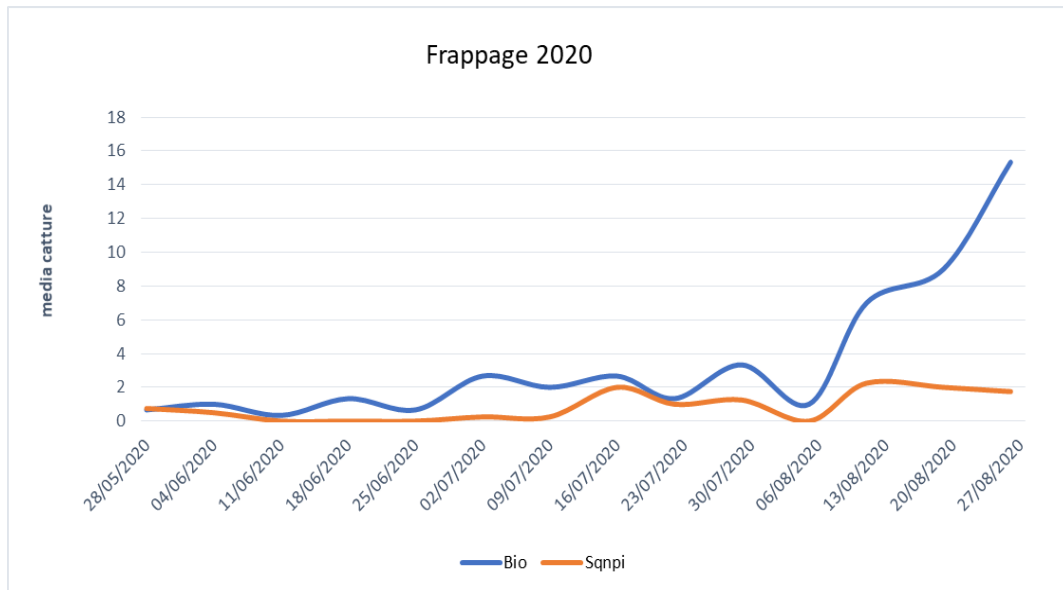


Fig. 4.7 Valori medi delle catture ottenute con il metodo del frappage nel corso dell'anno 2020 in relazione alle diverse tipologie di gestione fitosanitaria

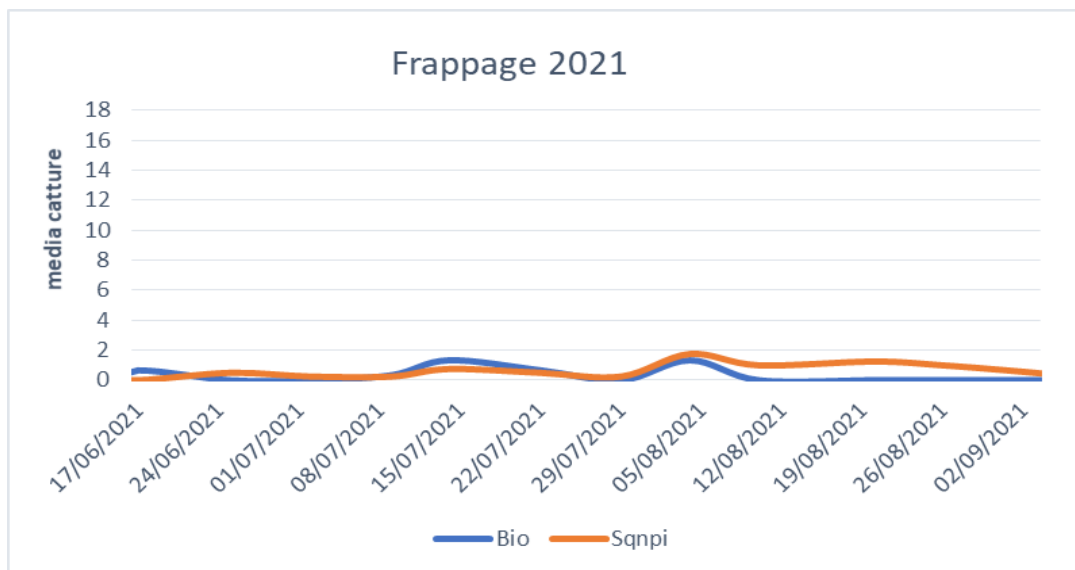


Fig. 4.8 Valori medi delle catture ottenute con il metodo del frappage nel corso dell'anno 2020 in relazione alle diverse tipologie di gestione fitosanitaria

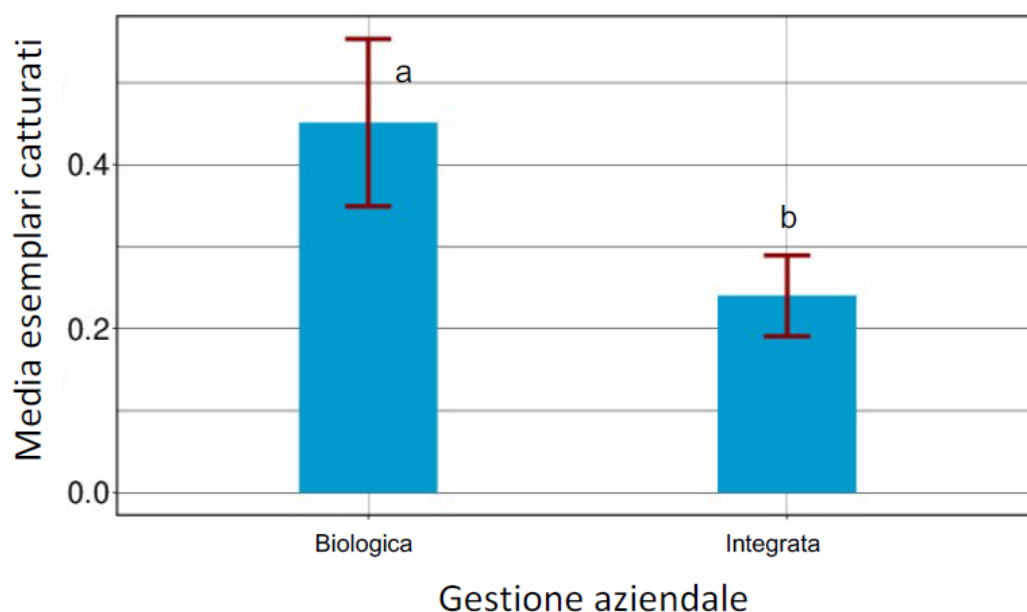


Fig. 4.9 Catture complessive di cimici (media \pm errore standard) nei due anni di monitoraggio con il metodo del frappinge, in relazione alla tipologia di gestione fitosanitaria dei nocioleti. Lettere differenti indicano differenze significative al test GLM ($p < 0,05$).

In definitiva, sulla base dei campionamenti effettuati con il metodo del “frappinge” nei due anni di studio si può affermare che *G. acuteangulatus* rappresenta la specie significativamente più raccolta, seguita dal *N. viridula* e *P. prasina* mentre *H. halys* è risultata presente in quantità assai ridotta (GLM, $p < 0,05$): questi dati sono riportati in figura 4.10.

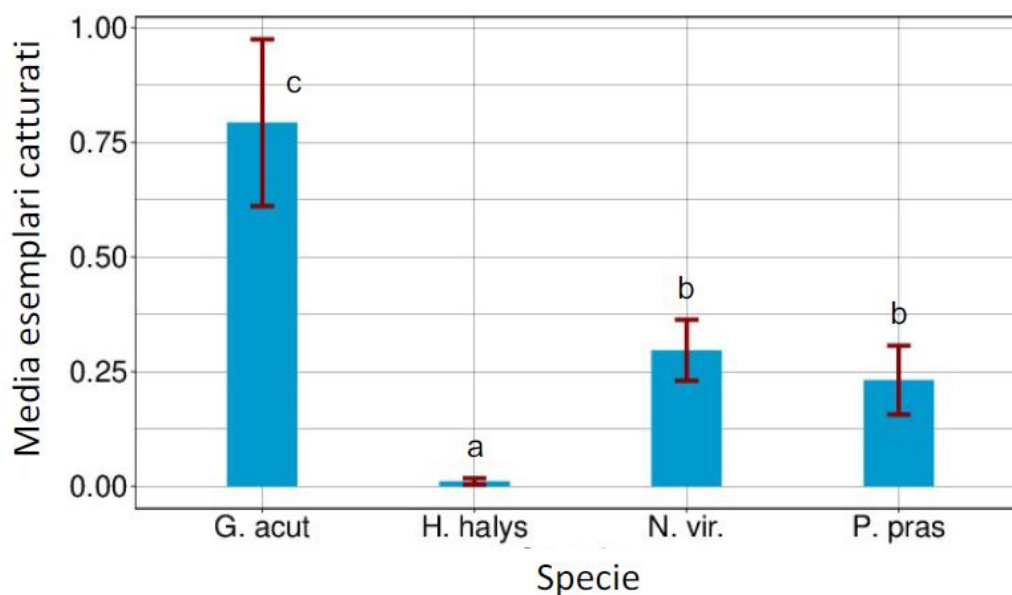


Fig. 4.10 Catture complessive di esemplari delle diverse specie (media \pm errore standard) nei due anni di monitoraggio con il metodo del frappinge. Lettere differenti indicano differenze significative al test GLM ($p < 0,05$).

Trappole attrattive.

I risultati dei campionamenti effettuati con le trappole, espressi nelle figure 4.11 e 4.12, indicano che ad una limitata presenza di *H. halys* nell'anno 2020, è seguito, nella stagione successiva, un incremento delle catture, particolarmente evidente nel mese di settembre, in corrispondenza del periodo di post raccolta (nell'areale dei monti Cimini la raccolta inizia negli ultimi giorni del mese di agosto e prosegue nelle prime settimane del mese di settembre, in funzione dello sviluppo delle piante e delle caratteristiche climatiche della stagione). Trascurabili le catture delle altre specie di cimici nel 2020 mentre nel 2021, nel mese di settembre è stata registrata una pur limitata presenza di *N. viridula*. Anche in questo caso, come in precedenza, è stato necessario utilizzare scale diverse sull'asse delle ordinate dei grafici relativi ai due anni 2020 e 2021, per meglio rappresentare la diversa numerosità delle popolazioni catturate. Tale incremento è stato confermato anche dall'analisi statistica (GLM, $p < 0,05$) come si può apprezzare dalla figura 4.13 in cui sono rappresentati graficamente i valori medi delle catture complessive nei due diversi anni.

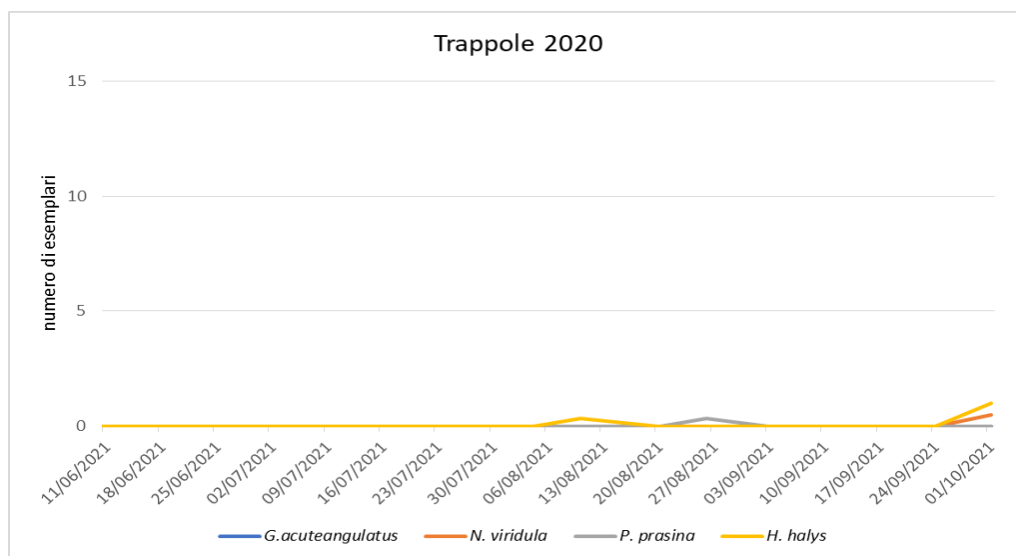


Fig. 4.11 Catture cumulative degli esemplari delle diverse specie ottenute nell'anno 2020 con l'utilizzo delle trappole nelle 7 aziende in esame



Fig. 4.12 Catture cumulative degli esemplari delle diverse specie ottenute nell'anno 2021 con l'utilizzo delle trappole nelle 7 aziende in esame

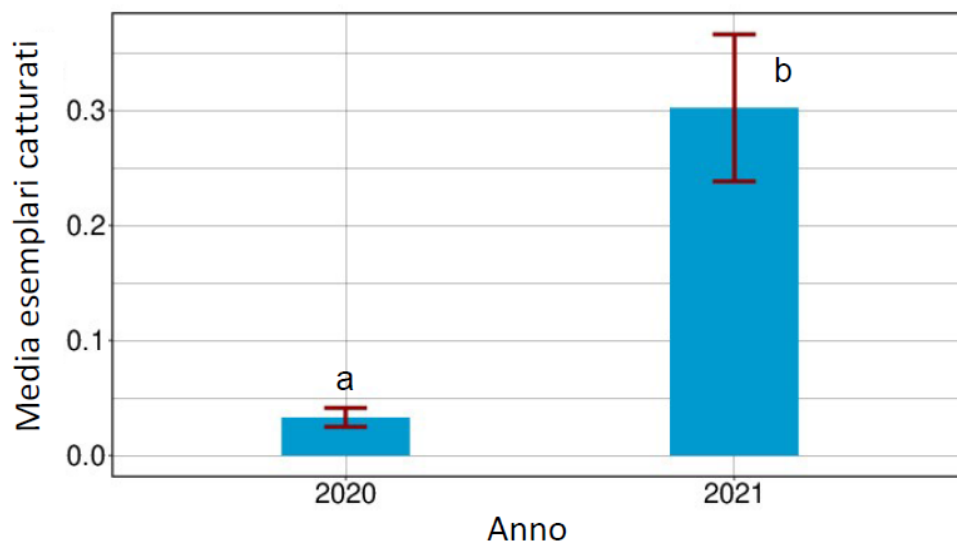


Fig. 4.13 Catture complessive di cimici (media ± errore standard) nei due anni di monitoraggio con il metodo delle trappole. Lettere differenti indicano differenze significative al test GLM ($p < 0,05$)

Mentre nell'anno 2020 (Fig. 4.14) le catture di tutte le cimici nocciolaie, sia in aziende gestite in IPM che in biologico sono state totalmente trascurabili, nel 2021 (Fig. 4.15) l'entità delle catture ha assunto valori maggiormente rilevabili, con un andamento delle curve sostanzialmente sovrapponibile. Questi risultati sono stati confermati anche dall'analisi statistica: dall'osservazione del grafico in figura 4.16 si può rilevare come il numero medio degli esemplari di cimici complessivamente intercettati nei due anni di osservazione per le diverse gestioni fitosanitarie "integrato" e "biologico" non mostra significative differenze (GLM, $p < 0,05$).



Fig. 4.14 Valori medi delle catture di cimici ottenute con l'uso delle trappole nell'anno 2020 in relazione alle diverse tipologie di gestione fitosanitaria



Fig. 4.15 Valori medi delle catture di cimici ottenute con l'uso delle trappole nell'anno 2021 in relazione alle diverse tipologie di gestione fitosanitaria

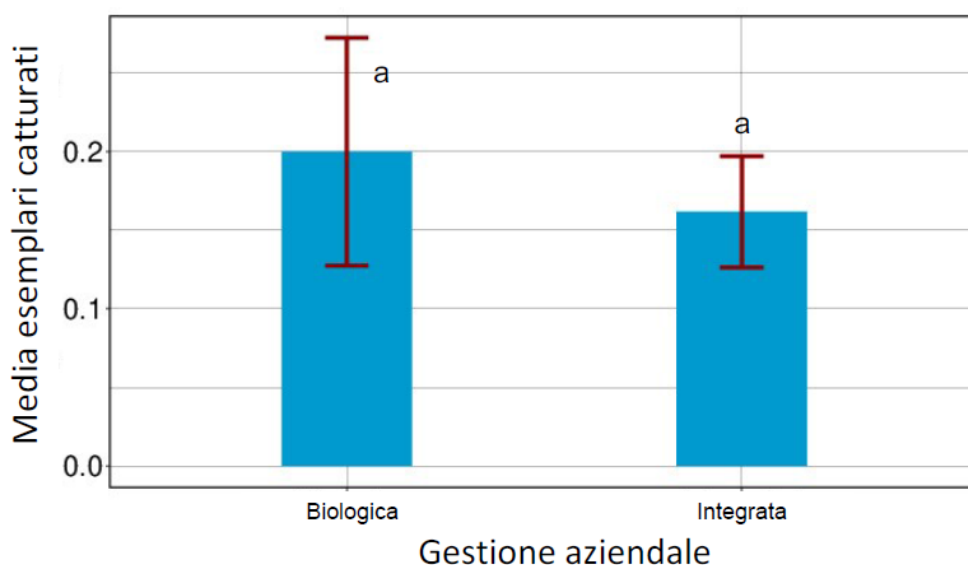


Fig. 4.16 Catture complessive di cimici (media ± errore standard) nei due anni di monitoraggio con il metodo delle trappole, in relazione alla tipologia di gestione fitosanitaria dei noccioleti. Lettere differenti indicano differenze significative al test GLM ($p < 0,05$).

L'analisi orientata a definire le specie maggiormente intercettate dalle trappole ci consente di confermare, attraverso l'osservazione della figura 4.17 in cui sono riportate le medie delle catture distinte per le diverse specie complessivamente realizzate attraverso le trappole nei due anni, come *H. halys* sia la specie più rappresentata rispetto agli altri eterotteri appartenenti al gruppo delle "cimici nocciolaie", con una differenza statisticamente significativa (GLM, $p < 0,05$).

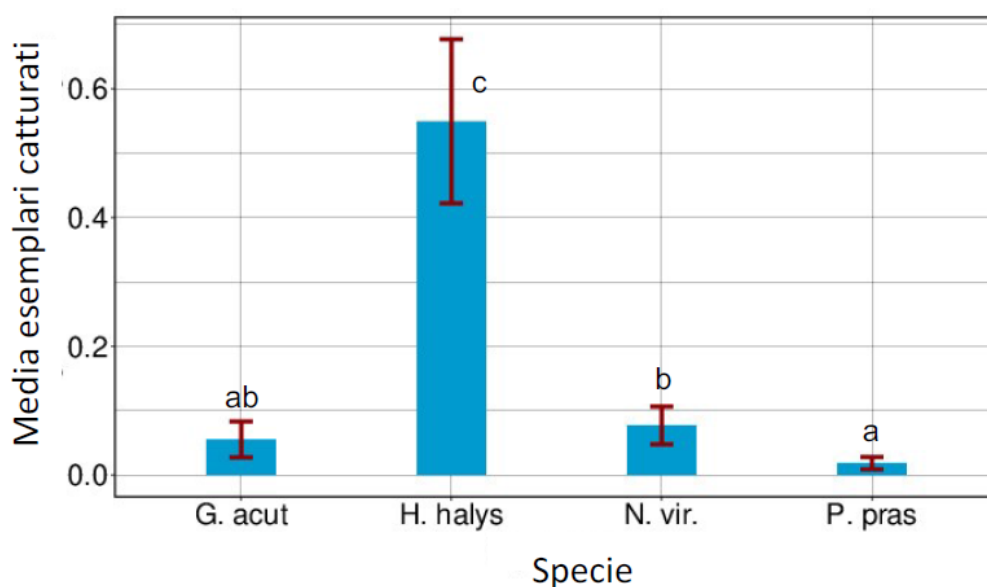


Fig. 4.17 Catture complessive di esemplari delle diverse specie (media ± errore standard) nei due anni di monitoraggio con il metodo delle trappole. Lettere differenti indicano differenze significative al test GLM ($p < 0,05$).

4.3 Discussione

Il monitoraggio delle cimici nocciolaie nell'area corilicola dei Monti Cimini condotto nelle annualità 2019, 2020 e 2021 ha offerto interessanti evidenze. L'estensione dello studio dalla sola azienda Vignola nel 2019 ad altre 6 realtà del comprensorio corilicolo viterbese, per giunta gestite in modo differente da un punto di vista fitosanitario, ha consentito di giungere a una serie di evidenze relative all'attività delle cimici nocciolaie nell'area in questione. In particolare è stato possibile evidenziare una considerevole discrepanza tra le informazioni ottenute con le due differenti strategie adottate, il metodo del frapping e le trappole feromoniche. Nello specifico, il metodo del frapping ha evidenziato una diminuzione delle catture totali di cimici tra i due anni di osservazione ed una significativa preponderanza di *G. acuteangulatus* tra gli eterotteri raccolti, mentre il monitoraggio condotto con le trappole a feromone ha fatto registrare una significativa crescita di *Halyomorpha halys* tra i due anni di osservazione. Tale risultato può aver trovato origine da una molteplicità di fattori. Uno di questi è il differente principio che sottende alle due strategie di monitoraggio impiegate cui però è necessario associare il comportamento delle specie di eterotteri coinvolte. Se da una parte, il metodo del frapping, causando la caduta di tutti gli insetti sulla branca sottoposta a scuotimento è sicuramente meno specifico nel monitorare gli eterotteri presenti nel nocciolo, le trappole, sono state testate e sviluppate in modo specifico per *H. halys* (Leskey *et al.*, 2015) che quindi è sicuramente il taxon più ricettivo a questi stimoli semiochimici. Come già osservato da Blaauw e colleghi (2016) inoltre la presenza di *H. halys* è sempre maggiormente riscontrabile lungo il confine del frutteto. Sulla base di questa indicazione, in tale area è stato concentrato il posizionamento delle trappole al fine anche di intercettare il volo degli adulti che, data l'elevata polifagia dell'insetto (Lee *et al.*, 2013), si portano, da altre coltivazioni, all'interno del nocciolo. D'altra parte, è necessario mettere in evidenza che il metodo del frapping, condotto alle prime luci del giorno su piante selezionate a caso all'interno del nocciolo, monitora più efficacemente la presenza degli eterotteri maggiormente associati alla coltivazione in questione, come per l'appunto *G. acuteangulatus*, la specie più raccolta in questi due anni di osservazioni. Ciò può avere indotto una differenza nella raccolta di esemplari delle due principali specie nei due anni di osservazione.

Il metodo del frapping, inoltre, ha consentito di ottenere alcune importanti indicazioni, utili alla gestione dei corileti dell'area dei Monti Cimini. *G. acuteangulatus* è come detto risultata la specie maggiormente osservata nei corileti viterbesi ed in particolare il suo picco di presenza è stato rilevato nel mese di agosto, in corrispondenza con lo sfarfallamento della nuova generazione di adulti, come precedentemente osservato in nocioleti turchi da Tuncer e colleghi (2014). Nel mese di agosto si entra nella fase finale del processo di maturazione delle nocciole e in questo momento della stagione i trattamenti insetticidi effettuati in campo dagli operatori contro tali avversità sono terminati. Risulta pertanto evidente l'importanza che questa osservazione assume ai fini di una corretta gestione dei nocioleti: ulteriori indagini dovranno essere effettuate al fine di poter meglio contrastare i possibili deleteri effetti a carico dei frutti, in un periodo in prossimità della raccolta in cui l'utilizzo di diversi insetticidi potrebbe risultare non consentito.

La gestione integrata è risultata essere quella che con maggiore efficacia ha consentito un contenimento delle popolazioni di cimici nei nocioleti monitorati. Esaminando più approfonditamente i dati, tale differenza è significativa nel primo anno di osservazione, il 2020, mentre nel secondo anno il ridotto numero di cimici raccolte non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra le due gestioni confrontate. A questo proposito è necessario mettere in evidenza come le anomalie termiche registrate nel mese di aprile 2021 possano aver determinato, per la stagione in esame, pesanti effetti sulla popolazione di cimici presente nei corileti: nelle notti e nelle prime ore del mattino dei giorni 7 e 8 aprile, infatti, dopo alcune settimane in cui erano state registrate temperature insolitamente elevate per il periodo, si sono verificati persistenti abbassamenti di temperatura (fino a -6 °C) che hanno pesantemente condizionato l'intero "ecosistema nocciolo", arrivando in molti casi ad azzerare l'intera produzione. Tale fenomeno, inusuale per epoca e gravità, ha fatto sì che il MIPAAF (Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali) attivasse un fondo di solidarietà nazionale in favore delle aziende colpite. La forte riduzione o assenza delle nocciole sulle piante causata dal gelo, osservata indiscriminatamente in tutte le aziende monitorate, ha probabilmente avuto un duplice impatto: da una parte ha spinto le cimici a spostarsi verso aree che per orografia o altri fattori sono risultate meno colpite dalla gelata tardiva o verso altre coltivazioni a danno delle quali esse hanno potuto alimentarsi, dall'altra ha indotto, in particolare nelle aziende a gestione integrata, un'alterazione delle consuete strategie di contenimento delle cimici con conseguente riduzione dei trattamenti chimici e come osservato in questo studio, una riduzione delle differenze in termini di presenza delle cimici nelle due gestioni considerate.

Le trappole a feromoni disposte in campo hanno, come detto, evidenziato una crescita, dal primo al secondo anno di studio, delle catture di *H. halys*. A partire dal 2018, infatti, anno della prima segnalazione di *H. halys* nei nocioleti dell'Alto Lazio, la presenza della cimice asiatica ha fatto registrare una continua espansione, come confermato anche dalle osservazioni raccolte nel presente studio. Gli abbassamenti di temperatura avvenuti nel mese di aprile 2021, al contrario di quanto osservato per le altre specie di eterotteri, sembra non abbiano causato riduzioni di densità di popolazione di *H. halys*. L'incremento delle catture riscontrato nel presente studio, nel mese di settembre 2021 potrebbe essere originato dalla capacità di questo insetto di compiere più cicli biologici nello stesso anno. La cimice asiatica, come riportato in precedenti studi condotti in Italia (Costi *et al.*, 2017), completa, infatti, due generazioni all'anno entrambe caratterizzate da elevati tassi di riproduzione. Le elevate performance riproduttive che caratterizzano *H. halys* in aggiunta alla spiccata polifagia e al comportamento degli adulti che si spostano continuamente tra piante differenti, sempre alla ricerca di nuove fonti alimentari (Bariselli *et al.*, 2016), pongono a serio rischio le produzioni di nocciole nel comprensorio dei Monti Cimini ed impongono un'attenta pianificazione delle strategie di controllo di questo dannoso organismo per gli anni a venire.

5 Valutazione della diversa suscettibilità dei frutti del nocciolo all'azione trofica delle cimici: "aborto traumatico" e "cimiciato".

In tutte le aree corilicole del mondo si possono riscontrare alterazioni a carico dei frutti in grado di determinare importanti perdite di reddito per gli operatori: tra queste le principali sono identificabili nell'"aborto traumatico" e nel cosiddetto "cimiciato": viene definito "aborto traumatico" l'arresto prematuro dello sviluppo del frutto con conseguente precoce caduta in terra del guscio vuoto; si definisce invece "cimiciato" l'alterazione del gusto delle nocciole che le porta ad assumere un sapore spiccatamente amaro, con presenza di macchie di colore bianco ("taca blanca") più o meno visibili esternamente (cimiciato visibile o occulto) (Tavella *et al.*, 1996; Tavella *et al.*, 2003; AliNiasee, 1998; Vitale *et al.*, 2020).

Secondo quanto riportato in letteratura entrambe queste tipologie di problematiche possono essere ricondotte all'azione trofica del gruppo di Eterotteri comunemente conosciuto come "cimici nocciolaie", tra cui principalmente *G. acuteangulatus*, *P. prasina*, *N. viridula*, cui recentemente si è aggiunta una nuova specie, *Halyomorpha halys* che rappresenta un ulteriore agente di danno alle produzioni corilicole mondiali (Tavella *et al.*, 2001; 2006; Romero *et al.*, 2009; Bosco *et al.*, 2018).

Obiettivo della presente ricerca, che ha avuto luogo negli anni 2019 e 2020, è stato quello di individuare le relazioni esistenti tra la fase di sviluppo del frutto al momento dell'azione trofica delle cimici e le due tipologie di alterazioni sopra descritte.

5.1 Materiali e metodi

5.1.1 Sito di indagine

Le prove sono state condotte all'interno dell'azienda agricola "Vignola" (42°17'23.86" N - 12°17'00.51" E) ubicata nel comune di Nepi, in provincia di Viterbo. In questa azienda, dove la coltivazione del nocciolo occupa la maggior parte della superficie disponibile, sono state condotte tutte le sperimentazioni del progetto Pantheon (fig 5.1). Il nocciolo in cui sono state condotte le osservazioni è costituito, come già detto nel capitolo 4, da piante di 20 anni di età, con sesto regolare 5 x 5 m, allevate a vaso cespugliato, policaule con un numero medio di 5-7 branche per esemplare. La cultivar predominante è la Tonda Gentile Romana ma sono presenti esemplari della cultivar Nocchione che forniscono la necessaria impollinazione.



Fig 5.1 Immagine satellitare del sito, posto nell'azienda agricola "Vignola" (Nepi, Viterbo) in cui è stata condotta la sperimentazione

L'appezzamento ha giacitura pianeggiante, è dotato di impianto di irrigazione sotterraneo, e, sulla base dello stato vegetazionale delle piante, si ritiene sia caratterizzato da buona fertilità, dotato di tutti gli elementi nutrizionali in grado di garantire un corretto sviluppo della coltura. Vi vengono comunque effettuati stagionalmente razionali apporti dei principali elementi nutritivi, al fine di ripristinare le asportazioni in funzione delle produzioni ottenute: la tecnica colturale è infatti quella normalmente adottata nel comprensorio dei Monti Cimini.

Gli interventi di difesa fitosanitaria si attengono ai principi della Produzione Integrata (SQNPI) previsti dal disciplinare della Regione Lazio.

Le attività della presente ricerca si sono concentrate in particolare in un appezzamento di ridotte dimensioni pari a circa 3000 mq, dove nel periodo in esame non è stato effettuato alcun trattamento di tipo insetticida e fungicida.

5.1.2 Individuazione dello stadio fenologico dei frutti

Questa attività è stata condotta per evidenziare la relazione esistente tra gli effetti dell'attività di nutrizione delle cimici sulle nocciole e lo stadio fenologico di sviluppo di queste.

A tal fine, è stato adottato un protocollo elaborato dal Centro di Ricerca IRTA (Centro di Mas Bové Constantí – Catalogna, Spagna), che attribuisce un valore numerico crescente (da 1 a 8) in funzione dei diversi stadi di sviluppo del seme nel frutto (da g a G5), secondo la seguente serie

$$g = 1; g1=2; g2 =3; G1 = 4; G2 = 5; G3 = 6; G4 = 7; G5 = 8$$

che trova una rappresentazione grafica nella figura 5.2, mentre i corrispondenti stadi fenologici sono meglio descritti nella figura 5.3.

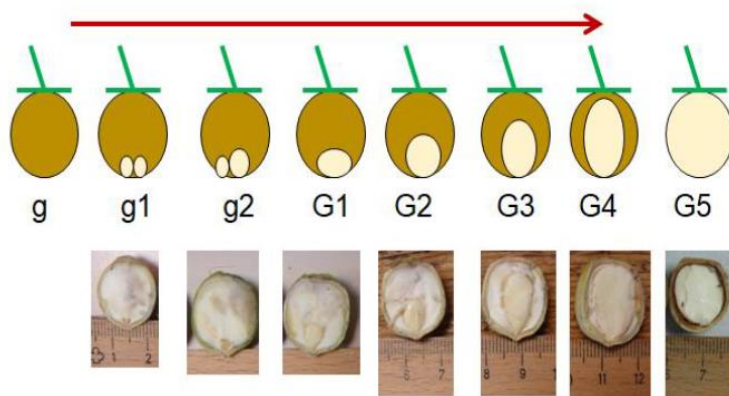


Fig. 5.2 Relazione stadio fenologico di sviluppo dei frutti/sequenza alfanumerica secondo il protocollo sviluppato da IRTA.

<i>Stadio fenologico</i>	
g	Non si osservano ovuli nel tessuto midollare dell'ovario
g1	Si osservano 2 ovuli della stessa dimensione
g2	Si osserva un ovulo più sviluppato dell'altro: inizio accrescimento
G1	Il seme occupa più di $\frac{1}{4}$ della nucula
G2	Il seme occupa tra $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ della nucula
G3	Il seme occupa tra $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ della nucula
G4	Il seme occupa più di $\frac{3}{4}$ della nucula ma non tutta
G5	Il seme occupa tutta la nucula.

Fig. 5.3 Stadi fenologici di sviluppo dei frutti identificati dal codice alfanumerico e relativa descrizione secondo il protocollo sviluppato da IRTA.

Così, dal 18 giugno al 1° agosto 2019 e dal 3 giugno al 16 luglio 2020, 50 nocciole sono state raccolte casualmente ogni settimana dalle piante, portate in laboratorio e, dopo averle sezionate a metà, classificate in base allo sviluppo del seme secondo il protocollo indicato.

5.1.3 Manicotti ("sleeves")

Le prove sperimentali sono state effettuate nelle stagioni 2019 e 2020 nella sottozona di 3000 mq all'interno dell'azienda Vignola, menzionata precedentemente.

In tale area, diciotto piante sono state selezionate e divise equamente in tre gruppi, T1 e T2, su cui sono state condotte ulteriori sperimentazioni in diversi momenti della stagione, e C che è stato utilizzato come controllo (Fig. 5.4). In particolare la tesi T1 era riferita all'individuazione della fase di suscettibilità della nocciola all'azione trofica delle cimici che determina l'insorgenza dell'"aborto traumatico" mentre la tesi T2 era riferita all'individuazione della fase di suscettibilità della nocciola all'azione trofica delle cimici che determina il "cimiciato". Le piante appartenenti a ciascun gruppo sono state numerate da 1 a 6.

Tesi	Target	N. piante	N. manicotti per pianta
T1	aborto traumatico	6	5
T2	"cimiciato"	6	5
C	controllo	6	5
	totale	18	90

Fig. 5.4 Schema riepilogativo della sperimentazione con indicazione del numero di piante interessate e dei manicotti impiegati

L'assegnazione del gruppo è stata effettuata in modo casuale, mentre la disposizione delle diciotto piante è stata concepita per formare blocchi di due alberi vicini dello stesso gruppo. Ogni blocco di due piante è stato separato da quello successivo da due piante su cui non è stata condotta alcuna sperimentazione (Fig. 5.5).

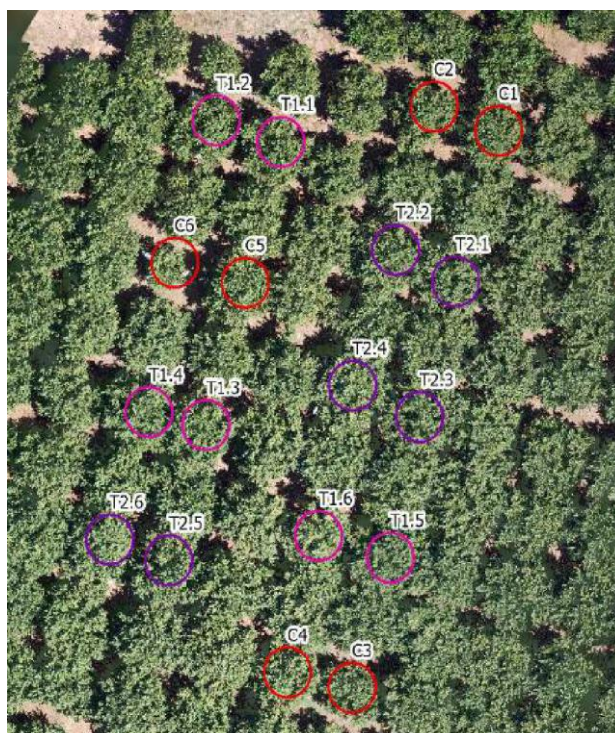


Fig 5.5 Foto satellitare del campo sperimentale con indicazione della disposizione delle piante con manicotti per le diverse tesi T1, T2, C .

Su ciascuna delle 18 piante, alla fine di maggio di entrambi gli anni, sono state selezionate 5 branche della lunghezza media di circa 70 cm. I rami sono stati quindi avvolti con sacchetti di rete di nylon con maglia di 0,2 mm, per impedire l'attività di alimentazione delle cimici ai danni delle nocciole in formazione e mantenere al contempo l'esperimento in un contesto di condizioni di campo, garantendo gli scambi gassosi e luminosi.



Fig. 5.6 Manicotti disposti sulle branche di una pianta di nocciolo nel campo sperimentale.

Prima della chiusura di ogni manicotto, avvenuta sia nel 2019 che nel 2020 nella prima settimana di giugno, è stato annotato il numero di nocciole presenti sulla relativa branca.

In entrambi gli anni, in corrispondenza con le fasi di sviluppo fenologico medio delle nocciole determinate come descritto nella sezione 5.1.2, ed in particolare g2/G1 per la tesi T1 e G4/G5 per la tesi T2, nei rispettivi manicotti sono stati introdotti esemplari di cimici in rapporto di un esemplare adulto, o due ninfe, ogni 5 nocciole precedentemente contate: l'inserimento dei fitofagi è stato effettuato rispettivamente il 27 giugno e il 18 luglio per il 2019, il 18 giugno e il 6 luglio per il 2020 e le cimici sono state mantenute all'interno 7 giorni, trascorsi i quali sono state asportate meccanicamente.

T1 Target: aborto traumatico				
Anno	Stadio sviluppo nocciole	inserimento cimici nei manicotti	allontanamento cimici dai manicotti	Epoca analisi nocciole
2019	g2/G1	27/06/2019	03/07/2019	Post raccolta
2020	g2/G1	18/06/2020	25/06/2020	Post raccolta

1 adulto ogni 5 nocciole

T2 Target: "cimiciato"				
Anno	Stadio sviluppo nocciole	inserimento cimici nei manicotti	allontanamento cimici dai manicotti	Epoca analisi nocciole
2019	G4/G5	18/07/2019	25/07/2019	Post raccolta
2020	G4/G5	06/07/2020	13/07/2020	Post raccolta

1 adulto ogni 5 nocciole

Fig 5.7 Schema riassuntivo delle modalità e delle tempistiche di esecuzione delle due prove T1 e T2

Nella figura 5.7 sono riportate in forma schematica le modalità e le tempistiche di esecuzione delle operazioni per le diverse tesi, così come previste nei due anni di esecuzione della prova.

In funzione del numero di eterotteri rinvenuti in campo ed utilizzabili nella sperimentazione, nel 2019 sono stati impiegati rispettivamente 25, 25 e 23 manicotti per le tesi T1, T2 e Controllo, mentre nel 2020 i manicotti sono stati rispettivamente 28, 24 e 25 per le tesi T1, T2 e Controllo; nel 2019 sono stati utilizzati esclusivamente esemplari di *G. acuteangulatus*, mentre nel 2020 sono stati utilizzati esemplari di *G. acuteangulatus*, *N. viridula*, *P. prasina* e *H. halys*, secondo lo schema presente in figura 5.8:

Anno	Tesi	Stadio fenologico	N. totale manicotti	N. manicotti con <i>G. acuteangulatus</i>	N. manicotti con <i>P. prasina</i>	N. manicotti con <i>N. viridula</i>	N. manicotti con <i>H. halys</i>
2019	T1	g2/G1	25	25	-	-	-
	T2	G4/G5	25	25	-	-	-
	C	-	23	-	-	-	-
2020	T1	g2/G1	28	7	6	9	6
	T2	G4/G5	24	11	13	-	-
	C	-	25	-	-	-	-

Fig. 5.8 Schema dei manicotti e delle specie di cimici nocciolaie utilizzate per le diverse tesi nei due anni di sperimentazione.

In particolare per la tesi T2 nell'anno 2020 sono stati utilizzati 11 manicotti con stadi giovanili di *G. acuteangulatus* e 13 manicotti con stadi giovanili di *P. prasina*.

In prossimità dell'epoca di raccolta delle nocciole, in corrispondenza con il raggiungimento della maturazione fisiologica dei frutti, le branche ancora avvolte nei manicotti, sono state staccate, trasferite nel "Laboratorio di lotta biologica ed integrata" del Dipartimento DAFNE dell'Università della Tuscia dove i manicotti sono stati aperti e le nocciole sottoposte ad analisi per valutare la presenza e l'incidenza percentuale delle varie alterazioni per le diverse tesi.

5.1.4 Analisi statistica

I dati ottenuti nelle due annate di studio, sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando i modelli lineari generalizzati (GLM) con post-hoc test di Sidak confrontando, entrambi gli anni:

1. Il numero di nocciole presenti nei manicotti;
2. il numero delle nocciole che, in seguito all'inserimento degli eterotteri nella fase di sviluppo del seme g2/G1 hanno manifestato "aborto traumatico";
3. il numero delle nocciole che sottoposte all'azione delle cimici in corrispondenza della fase di sviluppo G4/G5 hanno manifestato la sintomatologia definita "cimiciato".

Per tutte le analisi eseguite è stato impiegato il software R (R Core Team 2018).

Con riferimento alla tesi T2 dell'anno 2020, il confronto tra le specie nel causare il cimiciato è stato condotto con il test non parametrico Mann-Whitney.

5.2 Risultati

2019

La scelta delle branche da inserire nei manicotti è stata effettuata, non solo in funzione delle loro dimensioni e dello stato vegetativo complessivo delle piante, ma in particolare in base al numero delle nocciole in esse presenti, in modo da far sì che non vi fossero significative differenze in termini statistici tra le diverse tesi in esame, così come testimoniato nella figura 5.9 (GLM, $p < 0,05$).

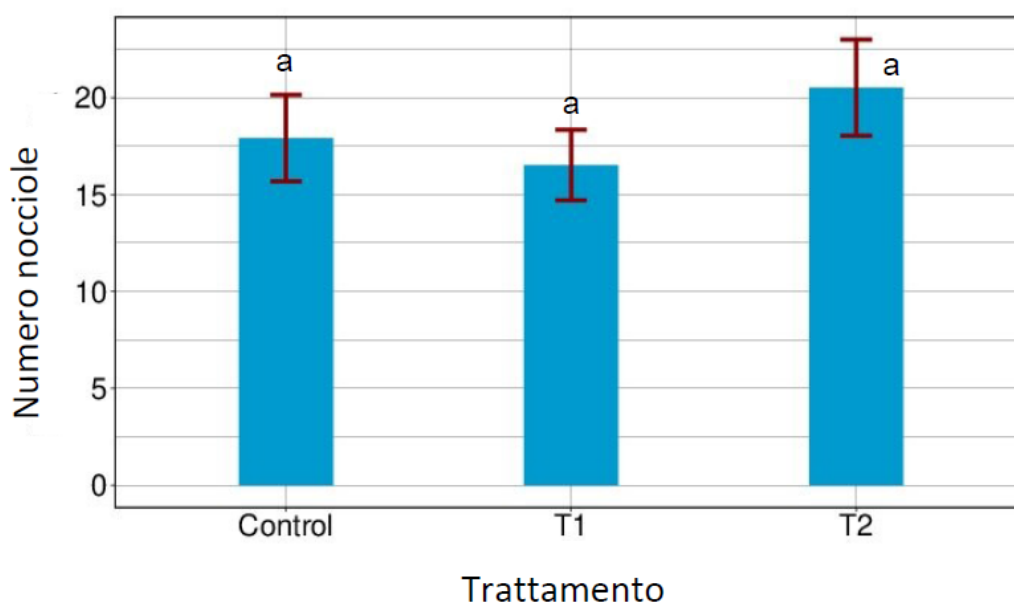


Fig. 5.9 Numero di nocciole (media \pm errore standard) presenti nei manicotti per le diverse tesi nella prova dell'anno 2019. Lettere differenti indicano differenze significative al test GLM ($p < 0,05$).

Nelle figure 5.10 e 5.11 vengono illustrati i risultati ottenuti nell'anno 2019 relativamente all'individuazione delle condizioni che determinano l'"aborto traumatico". Dall'osservazione del grafico presente nella figura 5.10, in cui sono riportati i valori medi % di nocciole colpite da "aborto traumatico" rilevati per ogni pianta distinta in base alla tesi di appartenenza (T1, T2 e C), si evince come i più elevati valori medi di nocciole abortite siano stati riscontrati in corrispondenza dell'inserimento degli insetti nei manicotti allo stadio fisiologico dei frutti g2/G1, mentre il grafico presente nella figura 5.10 conferma la validità di questa osservazione dal punto di vista statistico evidenziando l'esistenza di differenze significative tra il gruppo di piante appartenenti alla Tesi 1 rispetto ai risultati ottenuti dalle piante delle Tesi 2 e C. (GLM, $p < 0,05$).

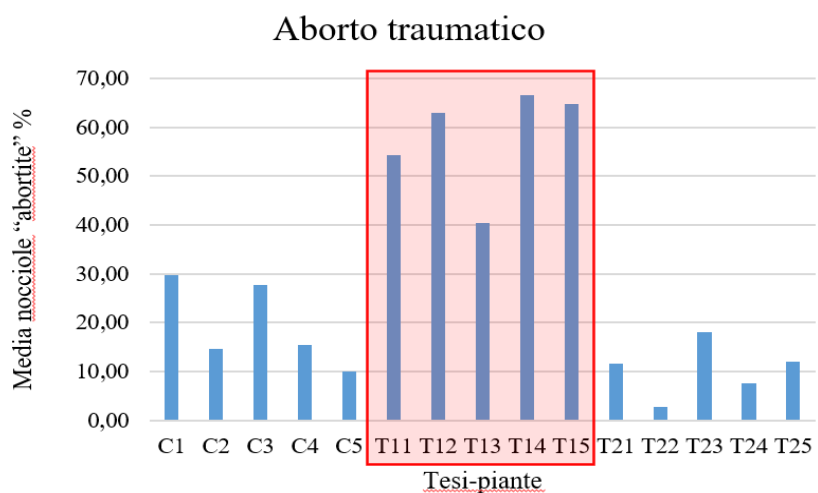


Fig. 5.10 medie % di nocciole soggette ad "aborto traumatico" in seguito ad inserimento delle cimici nei manicotti in corrispondenza dello stadio fenologico g2/G1 delle nocciole (tesi 1) nell'anno 2019.

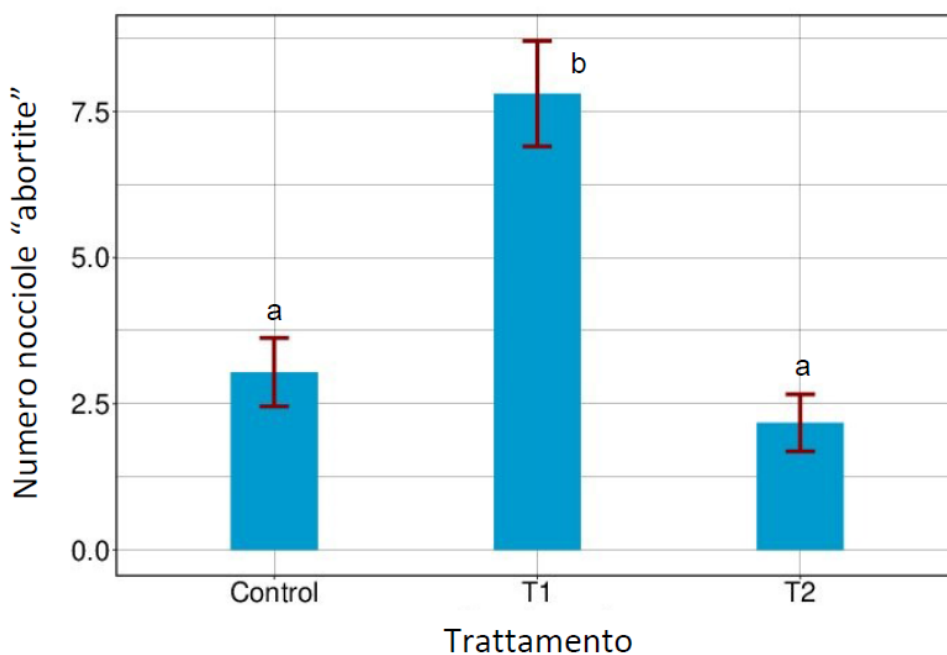


Fig. 5.11 Numero di nocciole (media \pm errore standard) soggette ad "aborto traumatico" nei manicotti per l'anno 2019 secondo la Tesi 1. Lettere differenti indicano differenze significative al test GLM ($p < 0,05$).

Con riferimento alla tesi volta all'individuazione delle condizioni che inducono l'alterazione conosciuta come "cimiciato", contraddistinta dalla caratteristica "taca blanca", i risultati ottenuti nel 2019 sono illustrati nelle figure 5.12 e 5.13: dal grafico presente in figura 5.12 si evince come i maggiori valori percentuali di nocciole affette da "cimiciato" siano stati rilevati nei manicotti posti sulle piante appartenenti alla Tesi 2, ovvero dove le cimici sono state inserite nei manicotti in corrispondenza dello stadio fisiologico dei frutti G4/G5, mentre nella figura 5.13 si può rilevare la

significatività in termini statistici delle differenze che si sono manifestate nei risultati ottenuti per questa tesi, rispetto ai valori riscontrati nei manicotti dove non era stato effettuato alcun inserimento, Tesi 1 e C (GLM, $p < 0,05$).

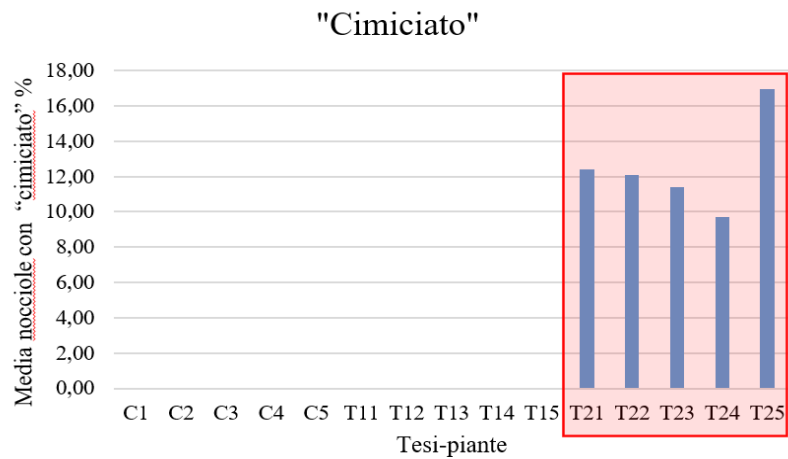


Fig. 5.12 Medie % di nocciole affette da "cimiciato" in seguito ad inserimento delle cimici nei manicotti in corrispondenza dello stadio fenologico G4/G5 delle nocciole nell' 2019.

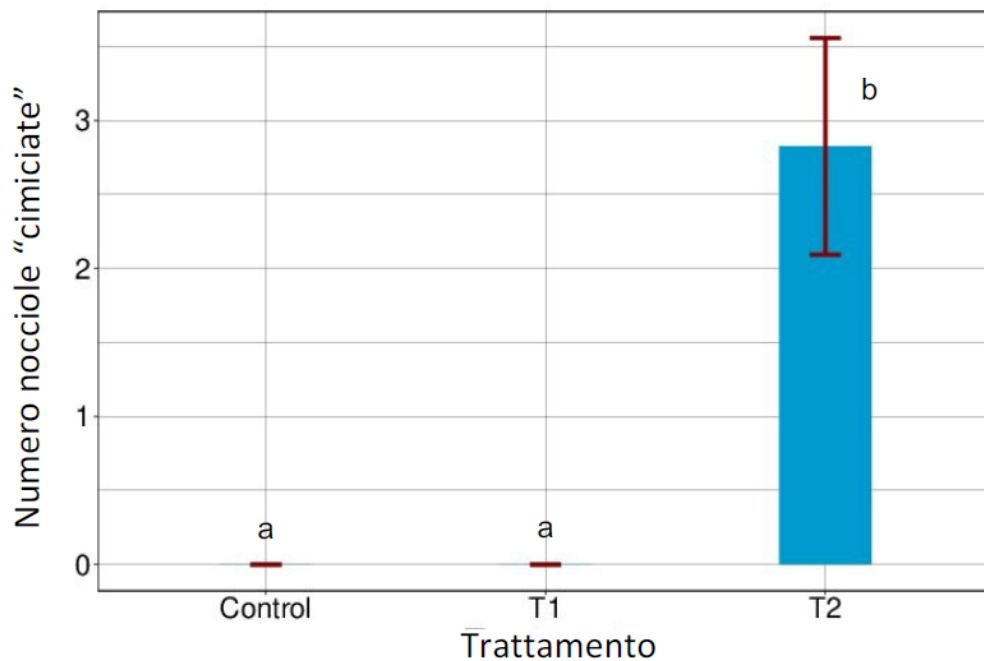


Fig. 5.13 Numero di nocciole (media \pm errore standard) soggette a "cimiciato" nei manicotti secondo la tesi 2. Lettere differenti indicano differenze significative al test GLM ($p < 0,05$).

2020

Nelle successive figure vengono presentati i risultati rilevati nella stagione 2020, ricordando che per questa stagione, a causa dell'impossibilità di rinvenire un numero di esemplari di *G. acuteangulatus*

sufficiente all'esecuzione della prova si è ricorso all'utilizzo di un pool di eterotteri composito con esemplari comunque appartenenti al gruppo delle cimici nocciolaie, come precedentemente indicato.

Analogamente a quanto realizzato per l'anno 2019, anche nell'anno 2020 sono state individuate branche di esemplari di nocciolo alle quali applicare i manicotti, in grado di garantire una sostanziale equivalenza nel numero dei frutti presenti, come si può rilevare dalla figura 5.14 (GLM, $p < 0,05$).

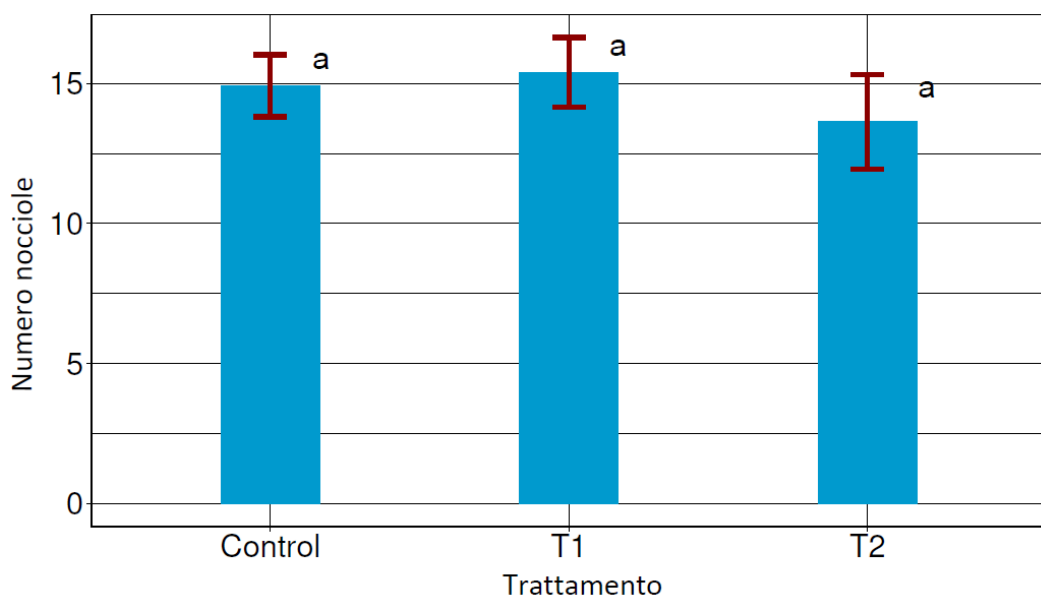


Fig. 5.14 Numero di nocciole (media \pm errore standard) presenti nei manicotti per le diverse tesi nella prova dell'anno 2020. Lettere differenti indicano differenze significative al test GLM ($p < 0,05$).

Dal grafico presentato nella figura 5.15 si evince come i più elevati valori medi di nocciole colpite da "aborto traumatico" siano stati riscontrati in corrispondenza dell'inserimento degli insetti nei manicotti allo stadio fisiologico dei frutti g2/G1 (piante T1) con valori che hanno superato per alcune piante il 40% delle nocciole presenti nei manicotti (43,65% e 46,34% ed in un caso arrivando fino al 58%), mentre il grafico presente nella figura 5.16 conferma la validità dell'osservazione, evidenziando l'esistenza di valori significativamente differenti anche in termini statistici, rispetto ai valori di "aborto traumatico" rilevati nei manicotti delle piante contraddistinte come T2 e C (GLM, $p < 0,05$).

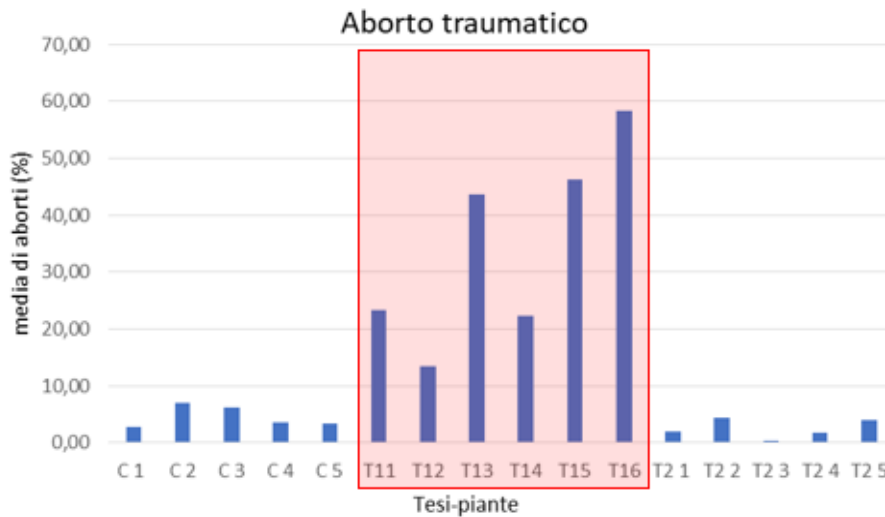


Fig. 5.15 Medie % di nocciole soggette ad "aborto traumatico" in seguito ad inserimento delle cimici nei manicotti in corrispondenza dello stadio fenologico g2/G1 delle nocciole (tesi 1) nell'anno 2020

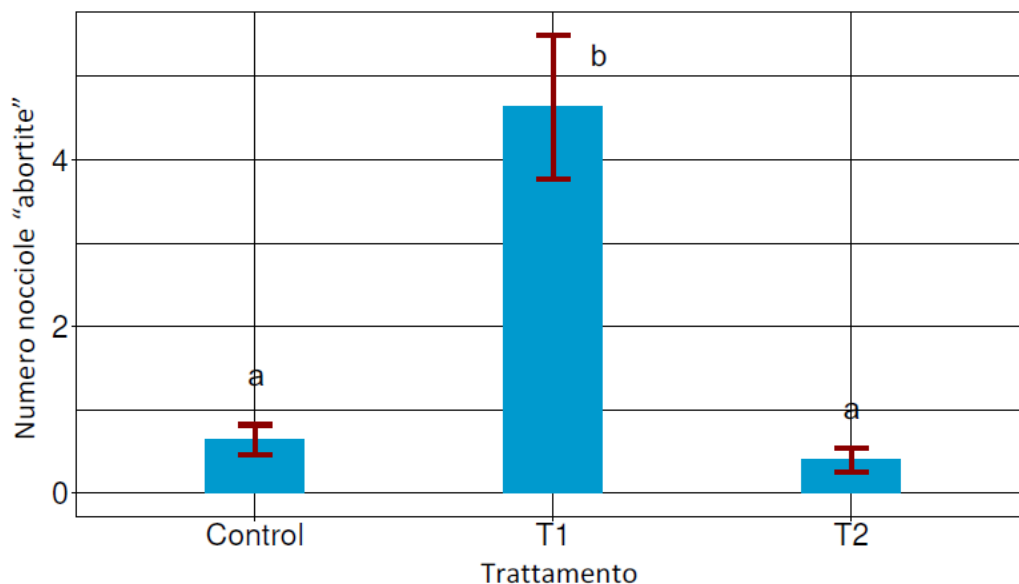


Fig. 5.16 Numero di nocciole (media \pm errore standard) soggette ad "aborto traumatico" nei manicotti per l'anno 2020, secondo la tesi 1. Lettere differenti indicano differenze significative al test GLM ($p < 0,05$).

I risultati ottenuti nell'anno 2020 relativi alla tesi per l'individuazione delle condizioni che determinano l'alterazione dei frutti nota come "cimiciato" sono espressi nei grafici delle figure 5.17 e 5.18: l'introduzione del pool di insetti utilizzati nei manicotti in corrispondenza della fase G4/G5 di sviluppo delle nocciole ha portato maggiori livelli di intensità dell'alterazione (fig. 5.17), questa osservazione viene confermata anche in termini statistici dai dati riportati nel grafico della figura 5.18 (GLM, $p < 0,05$), mentre, per la tesi T2 non risultano differenze significative riconducibili alle due diverse specie utilizzate ($P=0.4808$) (fig. 5.19).

Vale la pena far presente che il dato relativo alla pianta T15, per la quale è riportato un valore medio di nocciole cimiciate ben superiore agli analoghi valori relativi alle altre piante della serie T1 (addirittura paragonabile ad alcuni dei dati ottenuti nei manicotti presenti nei noccioli della serie T2, come ad es. T21) risulta in effetti dovuto ad un solo manicotto dove era presente un numero assai limitato (4) di nocciole.

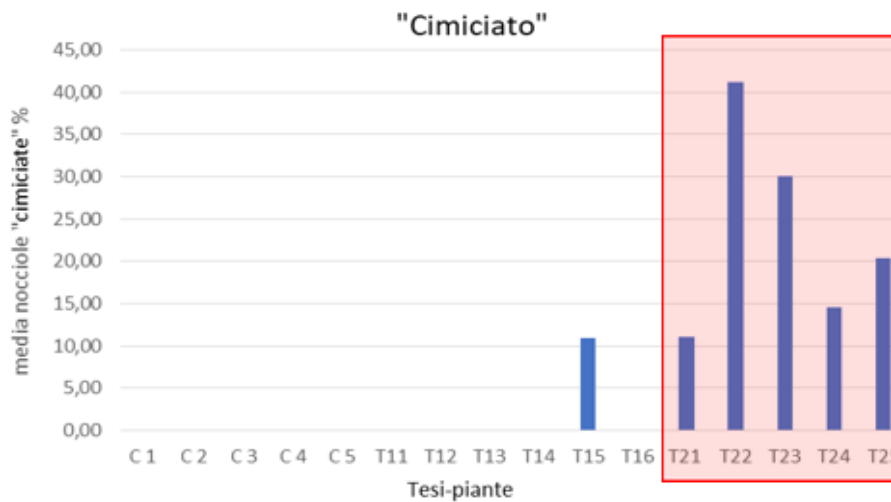


Fig. 5.17 Medie % di nocciole affette da "cimiciato" in seguito ad inserimento delle cimici nei manicotti in corrispondenza dello stadio fenologico G3/G4 delle nocciole (tesi 2) nell'anno 2020.

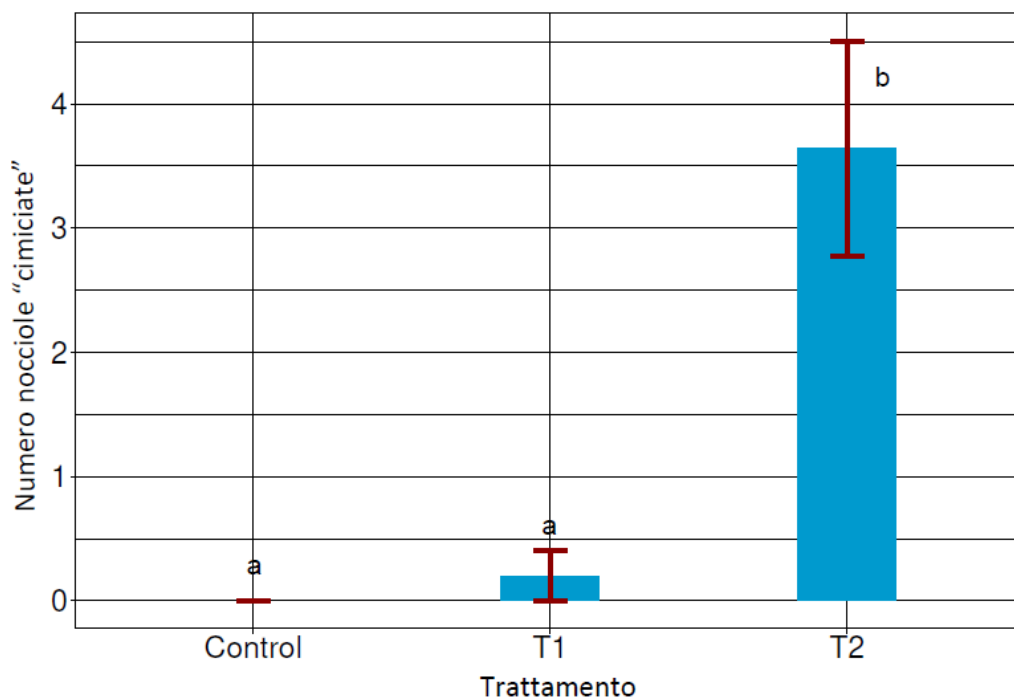


Fig. 5.18 Numero di nocciole (media ± errore standard) affette da "cimiciato" nei manicotti per l'anno 2020 secondo la tesi 2. Lettere differenti indicano differenze significative al test GLM ($p < 0,05$).

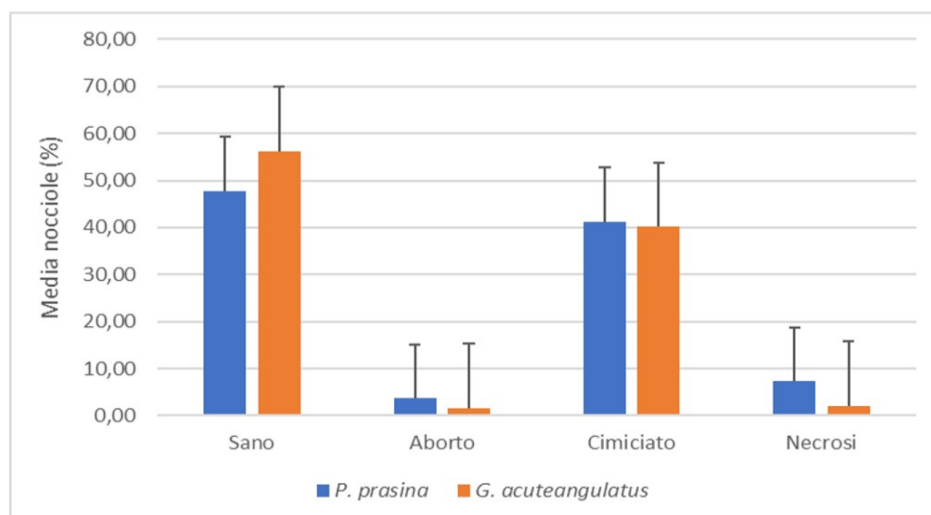


Fig. 5.19 Numero di nocciole (media \pm errore standard) affette dalle diverse alterazioni per la tesi T2 dell'anno 2020
Test non parametrico Mann-Whitney.

5.3 Discussione

Tra i molteplici fattori in grado di determinare alterazioni a carico dei frutti del nocciolo, si possono annoverare sia gli agenti abiotici, come le condizioni climatiche, che quelli biotici, come le caratteristiche genetiche e gli stress indotti da organismi viventi: le lesioni dovute all'azione degli eterotteri specializzati rappresentano uno dei principali fattori di stress biotici (Tavella *et al.*, 1996; Tuncer *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2009; Hedstrom *et al.*, 2014).

Obiettivo della presente ricerca è stato quello di approfondire le conoscenze riguardo le relazioni esistenti tra la fase di sviluppo del frutto al momento dell'azione trofica delle cimici e le due tipologie di alterazioni indicate come "aborto traumatico" e "cimiciato".

L'osservazione dei risultati derivanti dai due anni di sperimentazione all'interno di un corileto ubicato nel comune di Nepi, nel comprensorio dei monti Cimini (VT), consentono di presentare alcune riflessioni.

I dati ottenuti, come già riportato in letteratura, confermano il ruolo delle cimici come responsabili sia della caduta precoce delle nocciole, che delle alterazioni a carico del seme (Viggiani e Mazzone, 1976; Tuncer *et al.*, 2005; Tuncer *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2009).

La presenza delle cimici all'interno dei manicotti, in corrispondenza delle fasi di sviluppo delle nocciole g2/G1, secondo il protocollo adottato, ha determinato maggiori livelli di "aborto traumatico" rispetto alle altre tesi in esame. La presenza delle cimici nei manicotti in corrispondenza delle fasi di sviluppo delle nocciole G4/G5, invece, ha prodotto nei frutti, maggiori livelli di

“cimiciato”. Questa evidenza è stata osservata in entrambi gli anni di prova: nel 2019 impiegando nei manicotti esclusivamente esemplari di *G. acuteangulatus*, specie maggiormente presente nel comprensorio in esame, nel 2020 utilizzando un pool di eterotteri composto dalle diverse specie di “cimici nocciolaie” rappresentative del comprensorio.

Analoghe relazioni, tra gli effetti derivanti dall’attività trofica di *P. prasina* e i progressivi stadi di sviluppo dei frutti, sono state osservate da Pezzolla (2018), nell’ambito di una sperimentazione, svolta in Spagna presso il Centro di Ricerca IRTA (Centro di Mas Bové Constantí – Catalogna, Spagna). In questo caso, la sperimentazione è stata condotta secondo le medesime metodologie del presente studio utilizzando, però, esemplari di *P. prasina* specie “chiave” per le coltivazioni in Spagna della “Tonda di Giffoni”.

Recentemente, inoltre, sono stati pubblicati i risultati di una ricerca effettuata in Francia volta a valutare gli effetti dell’attività di alimentazione delle cimici più rappresentative, *P. prasina* e *G. acuteangulatus*, a carico della cultivar locale Petuet (Hamidi *et al.*, 2022). I risultati ottenuti, sembrano confermare che, le due tipologie di alterazione in esame risultano ancora legate agli stadi fenologici di sviluppo delle nocciole. L’attività trofica durante le fasi (*precoci*) di “pre-espansione/espansione del guscio” ha portato alla formazione di “nocciole vuote”, ovvero con “aborto traumatico”, mentre nelle successive (*tardive*) “fasi di espansione del gheriglio/maturazione dei frutti” ha prodotto nocciole “cimiciate”. E’ da far notare, tuttavia, che è stata utilizzata una diversa metodologia di classificazione degli stadi di sviluppo dei frutti rispetto al modello definito da IRTA e adottata nella presente ricerca. Hamidi e colleghi (2022) hanno rilevato come l’intensità del danno sembri essere correlata a molteplici fattori quale la specie, lo stadio di sviluppo e il sesso delle cimici. A tale riguardo, è stato attribuito un ruolo di primaria importanza agli esemplari femminili nel generare il danno ai frutti, dovuto alla loro necessità di accumulare riserve prima dell’emissione delle uova. Le nocciole rappresentano, infatti, una fonte di energia, in particolare di lipidi, disponibile in campo per un lungo periodo, generalmente dalla primavera a fine agosto.

Partendo da tale osservazione sorgono alcune considerazioni legate alla recente comparsa e alla rapida diffusione che si sta riscontrando nei nocciolieti presenti nel comprensorio dei Monti Cimini della specie aliena *H. halys*, come già illustrato nel capitolo 4. Questa specie, infatti, secondo quanto riportato in precedenti studi condotti in Italia (Costi *et al.*, 2017), completa due generazioni all’anno entrambe caratterizzate da elevati tassi di riproduzione e pertanto, qualora fosse confermato quanto osservato da Hamidi e colleghi (2022), si attribuirebbe un carattere di elevata pericolosità, in particolare, ai suoi esemplari femminili.

E' necessario inoltre evidenziare che se da una parte i risultati ottenuti nella presente sperimentazione confermano le ipotesi di Hamidi e colleghi (2022) dall'altra consentono di identificare la fase fenologica esatta dello sviluppo del frutto, in relazione alla tipologia di danno derivato da suzione da parte degli eterotteri. Si ritiene che la definizione e l'adozione di un univoco protocollo di individuazione e descrizione dei diversi stadi di sviluppo fenologico dei frutti, potrebbe garantire una più accurata identificazione delle relazioni esistenti tra l'attività di alimentazione degli eterotteri ed il danno che sono in grado di provocare. Questa futura univocità metodologica, basata sull'esatta individuazione dello stadio fenologico del frutto, consentirebbe la corretta confrontabilità tra le diverse ricerche. Sicuramente l'adozione di un unico protocollo potrebbe essere di sussidio anche nello studio delle patologie vegetali, a carico dei frutti. Questa precisa distinzione tra le fasi fenologiche dell'accrescimento della nocciola, sarà particolarmente importante nelle nuove definizioni delle linee tecniche di difesa della coltura.

6 Cimici “nociolaie” come vettori di specie fungine agenti di marciumi.

In questa parte della tesi ci si è occupati dello studio delle interazioni esistenti tra cimici ed agenti fungini di marciume delle nocciole, ovvero di analizzare la capacità che hanno gli eterotteri “specializzati” di agire da vettori delle specie fungine che vengono rinvenute sui frutti alterati di nocciolo. Si è deciso in particolare di investigare la possibilità che la trasmissione di specie di funghi fitopatogeni per le nocciole avvenga attraverso una contaminazione delle porzioni superficiali degli organi esterni dell’apparato boccale di queste specie.

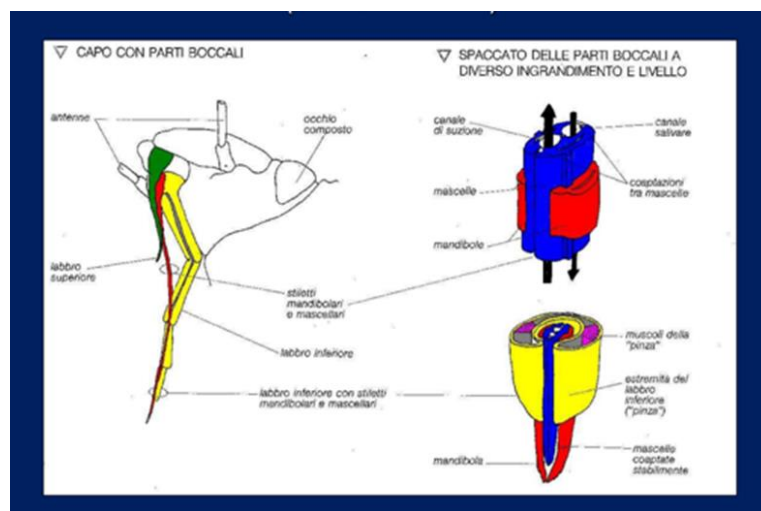


Fig 6.1 porzioni esterne dell’apparato boccale degli eterotteri specializzati con le relative modificazioni

Si è ipotizzato, infatti, che stiletto e rostro, ovvero le porzioni dell’apparato pungente succhiatore che entrano direttamente in contatto con le nocciole, possano essere quelle maggiormente indiziate di trasmettere propaguli fungini all’interno del frutto. Lo stiletto, formato da modificazioni delle mascellari e delle mandibole, penetra il guscio per raggiungere direttamente i tessuti del frutto, mentre il rostro composto per lo più dal labbro inferiore lo “accompagna” esternamente (“ginocchiandosi”) indirizzandolo verso la ferita. Si è valutata pertanto la possibile trasmissione dei patogeni fungini legata a stiletto e rostro nell’azione di nutrizione.

6.1 Materiali e metodi

6.1.1 Raccolta

La scelta dei diversi siti è stata effettuata in modo di poter essere rappresentativa della realtà corilicola locale: si tratta infatti di nocioleti in produzione con età media che va da 9 ad oltre 30 anni composti da esemplari della cv Tonda Gentile Romana e della Cv Nocchione. Il numero di piante varia da 400 a circa 600 piante per ha, secondo i sesti tipici della zona che prevedono distanze sulle file e nell'interfila che vanno da 4.00 x 4.00 mt a 5.00 x 5.00 mt. I rappresentanti della Cv Nocchione, presenti generalmente in misura pari al 10% del totale, sono utilizzati come impollinatori data la spiccata proterandria della cultivar principale.

Gli appezzamenti presso i quali è stato effettuato il prelievo degli esemplari di eterotteri da analizzare sono stati scelti nel comprensorio della provincia di Viterbo tra le aziende che effettuano coltivazione seguendo metodi di agricoltura biologica, in modo di poter escludere la possibilità che eventuali trattamenti con agrofarmaci ad azione fungicida potessero alterare gli esiti delle analisi.

Nell'immagine seguente (fig. 6.2) e nella relativa tabella 6.1 sono indicati i siti di prelievo con i relativi dati di riferimento

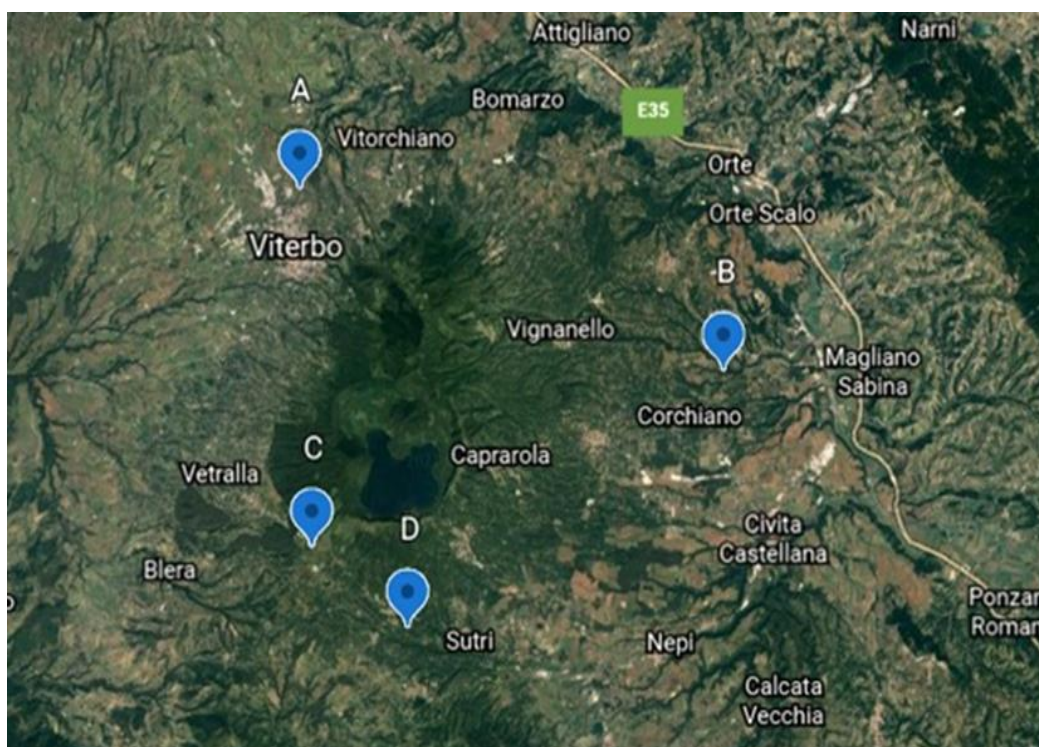


Fig. 6.2 Mappa con la localizzazione dei siti di raccolta degli eterotteri

Tab. 6.1 Coordinate geografiche dei siti di raccolta degli eterotteri

<i>Sito</i>	<i>Coordinate GPS</i>	<i>Altezza slm mt</i>
<i>A</i>	42°26'41''N 12°06'41''E	357
<i>B</i>	42°21'46''N 12°22'49''E	147
<i>C</i>	42°17'04''N 12°07'06''E	467
<i>D</i>	42°14'54''N 12°10'46''E	375

Il campionamento è stato effettuato adottando il metodo del frappage: sono state sottoposte a scuotimento due branche per pianta scegliendo 5 piante per ogni appezzamento, stendendo al di sotto di esse un telo bianco (dimensioni 3 x 3 m) per la raccolta. Gli esemplari raccolti sono stati trasferiti presso il “Laboratorio di lotta biologica ed integrata” dell’Università della Tuscia, dove è stato effettuato il riconoscimento. Quindi, gli stessi sono stati conservati in contenitori sterili (provette Falcon) in condizioni di temperatura controllata (-4°C) fino al momento in cui sono stati sottoposti ad analisi.

Raccolta e riconoscimento sono stati effettuati con cadenza settimanale (compatibilmente con le condizioni meteorologiche), nel periodo che va dalla prima settimana di luglio 2020 (primo campionamento 7 luglio) a ottobre 2020 (ultimo campionamento 20 ottobre).

Tab. 6.2 Suddivisione delle specie di cimici raccolte in base all’epoca di campionamento

<i>data</i>	<i>Ga</i>	<i>Nv</i>	<i>Pp</i>
17/07/2020	21		
21/07/2020	12	8	4
29/07/2020	15		
03/08/2020	12		3
11/08/2020	6	6	
21/08/2020		3	
08/09/2020	6	3	
17/09/2020	8	1	
22/09/2020	4	3	
27/09/2020	11	1	2
01/10/2020	4		3
20/10/2020	7	2	

L’attività di laboratorio è iniziata nel settembre 2020, in ottemperanza a quanto consentito delle limitazioni previste dalle normative emanate sia a livello nazionale che di Ateneo per il

contenimento della pandemia Covid-19, ed è stata realizzata nel pieno rispetto delle prescrizioni e delle indicazioni da queste indicate.

6.1.2 Isolamento delle colonie e identificazione delle specie fungine

L'analisi è stata limitata agli esemplari adulti per le difficoltà di conservazione e di sezionamento delle forme giovanili, peraltro rinvenute, nella maggior parte dei casi, quando si trovavano ai primi stadi pre-immaginali.

È stata effettuata una prova preliminare per individuare la corretta metodologia operativa. Un primo campione composto da 40 esemplari di eterotteri è stato equamente suddiviso in due tesi in cui:

- A) 20 esemplari non sono stati sottoposti ad alcuna sterilizzazione;
- B) 20 esemplari sono stati sottoposti ad un ciclo di sterilizzazione volto ad evitare lo sviluppo di funghi presenti sulle superfici esterne dell'apparato boccale degli insetti.

La sterilizzazione è stata effettuata sottoponendo i campioni ad immersione in soluzione acquosa al 2% di ipoclorito di sodio per 10", seguita da 3 lavaggi in acqua distillata della durata di un minuto l'uno. I campioni venivano quindi lasciati asciugare sotto cappa per almeno 3-5 minuti.

Per ogni esemplare delle due tesi si è poi provveduto a separare, con l'ausilio di uno stereomicroscopio (Nikon SMZ128) e di bisturi e pinze da laboratorio sterili, il rostro e lo stiletto dal resto del corpo dell'esemplare. Il 50% del materiale così ottenuto per ogni tesi è stato quindi posto ad incubare per 10 gg a 24°C su terreno di coltura PDA (Potato Dextrose Agar), mentre la restante quota è stata posta ad incubare, secondo gli stessi parametri, su PDA cui erano stati aggiunti 200 ppm di L⁻¹ streptomina solfato (PDA+S), al fine di evitare lo sviluppo di colonie batteriche.

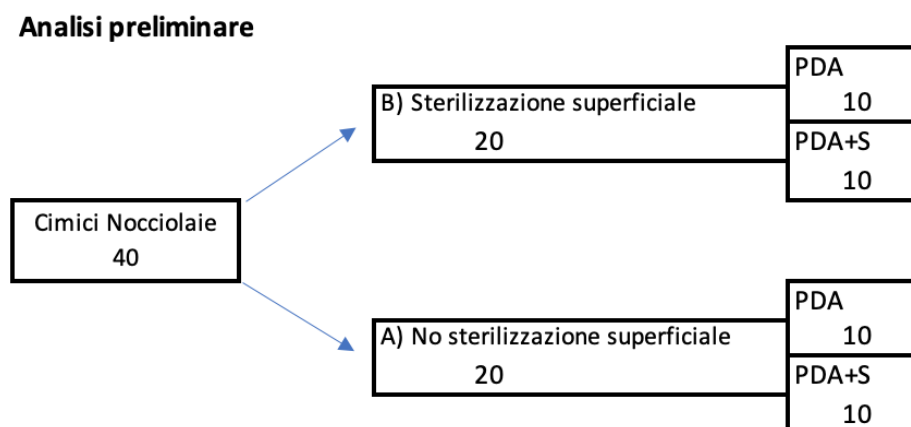


Fig 6.3 Schema riepilogativo dell'analisi preliminare effettuata per la definizione della metodologia di indagine.

Sulla base dei risultati di questa prova sono stati effettuati gli isolamenti di tutti gli esemplari rimanenti di cimici. Alla fase di isolamento come sopra descritta, è seguita la purificazione su PDA delle diverse colonie sviluppatesi da tutti gli isolati. Sulla base di osservazioni macroscopiche delle colonie fungine ottenute (forma delle colonie, colorazione, forma dei conidi) sono stati quindi identificati i principali morfotipi. Per ciascuno di essi è stato effettuato il riconoscimento molecolare attraverso l'estrazione del DNA genomico, l'amplificazione della regione contenente gli Spaziatori Interni trascritti (ITS) del DNA ribosomale ed il relativo sequenziamento.

Per l'estrazione del Dna genomico è stato usato il protocollo CTAB come descritto da Saito *et al.* (2013), con alcune modifiche. I tamponi di estrazione basati su CTAB sono ampiamente utilizzati durante la purificazione del DNA da colture fungine. Polisaccaridi e polifenoli sono due classi di biomolecole che devono essere allontanate quando si isola il DNA, perché come contaminanti possono interferire con le successive operazioni: l'uso di CTAB, cetil trimetilammonio bromuro, un detergente cationico, facilita la separazione dei polisaccaridi durante la purificazione (i polisaccaridi vengono poi allontanati per precipitazione differenziale) mentre gli additivi, come il polivinilpirrolidone, consentono la rimozione dei polifenoli legandosi ad essi.

Il materiale genetico estratto dai miceli fungini è stato sottoposto a Polymerase Chain Reaction, comunemente conosciuta come PCR: è questa una tecnica di biologia molecolare attraverso la quale frammenti di acidi nucleici vengono moltiplicati partendo da sequenze di acidi nucleici iniziali e terminali conosciute. La PCR rappresenta il metodo più usato in laboratorio per ottenere materiale genetico in quantità sufficiente da sottoporre a successive ulteriori analisi.

La metodologia adottata prevede che quantità note di Dna genomico vengano poste in una soluzione contenente gli oligonucleotidi di innesco della reazione (primers), una Taq Polimerasi ed i nucleotidi necessari alla costituzione dei nuovi filamenti di sintesi. La miscela di reazione viene quindi sottoposta a 30-40 cicli termici adeguati mediante un termociclatore. Come sequenze di innesco della reazione, nello specifico, sono stati utilizzati i primer ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Il termociclatore è lo strumento in grado di condurre i diversi cicli temperature/tempo necessari a far sì che avvenga l'amplificazione del materiale genetico..

Una volta effettuata la PCR, gli ampliconi ottenuti sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio per verificare la corretta esecuzione dell'amplificazione. Dopo aver verificato i risultati tramite elettroforesi, i prodotti della PCR sono stati inviati per il sequenziamento con metodo Sanger a Eurofins genomics. (Eurofins Genomics GmbH, Costanza, Germania). Le sequenze ottenute sono

state editate manualmente e ricostruite utilizzando programmi specifici (Bio-edit; Chromas). Quindi si è proceduto all'individuazione delle specie fungine per comparazione con sequenze analoghe nel database NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA), usando il tool di ricerca BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) attraverso il portale <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

6.2 RISULTATI

Sono stati analizzati complessivamente 145 esemplari appartenenti alle tre specie di cimici nocciolaie: *G. acuteangulatus* (G.a.), *Nezara viridula* (N.v.) e *Palomena prasina* (P.p.) rispettando le proporzioni derivanti dai dati raccolti nei campionamenti dell'anno (si vedano i capitoli precedenti), così come descritte nella successiva tabella 6.3

Tab. 6.3 Composizione del campione di cimici analizzato

Specie	Num. esemplari	%
<i>G. acuteangulatus</i>	106	73,10
<i>N. viridula</i>	27	18,62
<i>P. prasina</i>	12	8,28

Poiché nella prova preliminare da tutti i campioni analizzati sottoposti a sterilizzazione non si è sviluppata alcuna colonia fungina ed da quelli non sterilizzati messi a crescere su PDA senza streptomina lo sviluppo di colonie batteriche prendeva il sopravvento sugli eventuali miceli presenti, si è deciso di proseguire le indagini utilizzando il protocollo che prevedeva l'isolamento dei miceli eventualmente presenti senza alcuna sterilizzazione superficiale ed incubando il materiale in esame su terreno di coltura artificiale PDA con aggiunta di 200 ppm di streptomina solfato (PDA+S) per evitare la crescita di contaminanti batterici (Fig. 6.4).

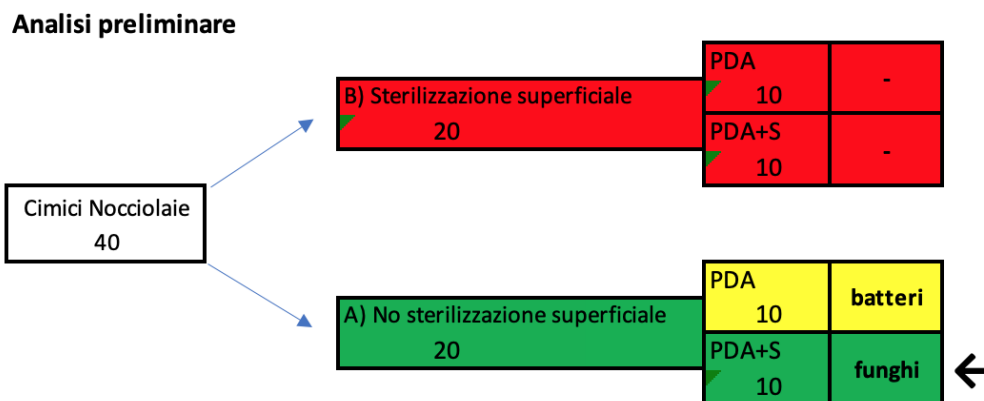


Fig. 6.4 Schema del protocollo adottato (Prot. A)

In totale sono dunque effettuati isolamenti con il protocollo corretto su 115 cimici (escludendo dalle 145 iniziali le 20 usate per i protocolli con sterilizzazione e le 10 su PDA senza streptomycina). Da queste sono state ottenute complessivamente 255 colonie fungine che, sulla base delle caratteristiche morfologiche (forma, colore e aspetto delle colonie), sono state suddivise in 13 morfotipi, codificati in ordine alfabetico da A ad O.

Quindi, un campione di colonie appartenente a ciascun morfotipo pari al 10% del loro numero complessivo (o comunque almeno a 2 colonie per morfotipo), è stato sottoposto ad estrazione del DNA ed al successivo sequenziamento per la determinazione della specie di appartenenza: i dati così ottenuti sono presentati nella figura 6.5 in cui sono riportate le diverse specie fungine riconosciute, con le relative %, indicando la relazione con i gruppi precedentemente assegnati

Morfotipo	Genere Fungino	Isolati (numero)	Isolati (%)
A	<i>Chaetomium</i> sp.	15	5,88
B	<i>Aspergillus</i> sp.	55	21,57
C	<i>Diplodia</i> sp.	10	3,92
D	<i>Paecilomyces</i> sp.	15	5,88
E	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	20	7,84
F	<i>Alternaria</i> sp.	50	19,61
G	<i>Penicillium</i> sp.	5	1,96
H	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	20	7,84
I	<i>Verticillium</i> sp.	10	3,92
L	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	10	3,92
M	<i>Fusarium</i> sp.	25	9,80
N	<i>Torula</i> sp.	10	3,92
O	<i>Coprinellus</i> sp.	10	3,92
	<i>Totale</i>	255	100

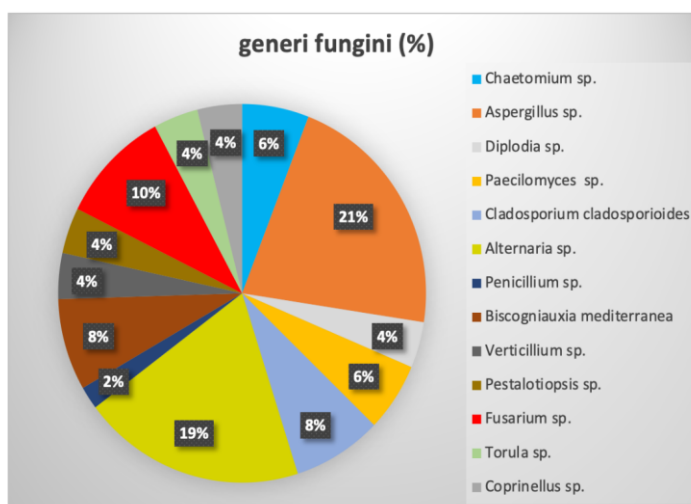


Fig. 6.5 Frequenza % delle diverse specie fungine riconosciute

Tab 6.4 Numero e frequenza % dei diversi generi/specie fungine riconosciuti

Genere fungino	Numero (isolati)	Isolati (%)
<i>Aspergillus spp.</i>	55	21,57
<i>Alternaria spp.</i>	50	19,61
<i>Fusarium spp.</i>	25	9,80
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	20	7,84
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	20	7,84
<i>Paecilomyces spp.</i>	15	5,88
<i>Chaetomium spp.</i>	15	5,88
<i>Verticillium spp.</i>	10	3,92
<i>Pestalotiopsis spp.</i>	10	3,92
<i>Diplodia spp.</i>	10	3,92
<i>Torula spp.</i>	10	3,92
<i>Coprinellus spp.</i>	10	3,92
<i>Penicillium spp.</i>	5	1,96
TOTALE	255	100

Dall'osservazione dei dati presenti nella tabella 6.4 (elaborazione di quanto riportato nelle figure 6.5) risulta che il genere fungino maggiormente rinvenuto è *Aspergillus* presente per il 21,57% del totale, seguito dai generi *Alternaria* (19,61 %), *Fusarium* (9,80%), *Biscogniauxia* (7,80%) e *Cladosporium* (7,80%). Mettendo in relazione gli isolati fungini con l'epoca di cattura delle cimici che li trasportavano si è ottenuta la distribuzione riportata nella seguente figura 6.6

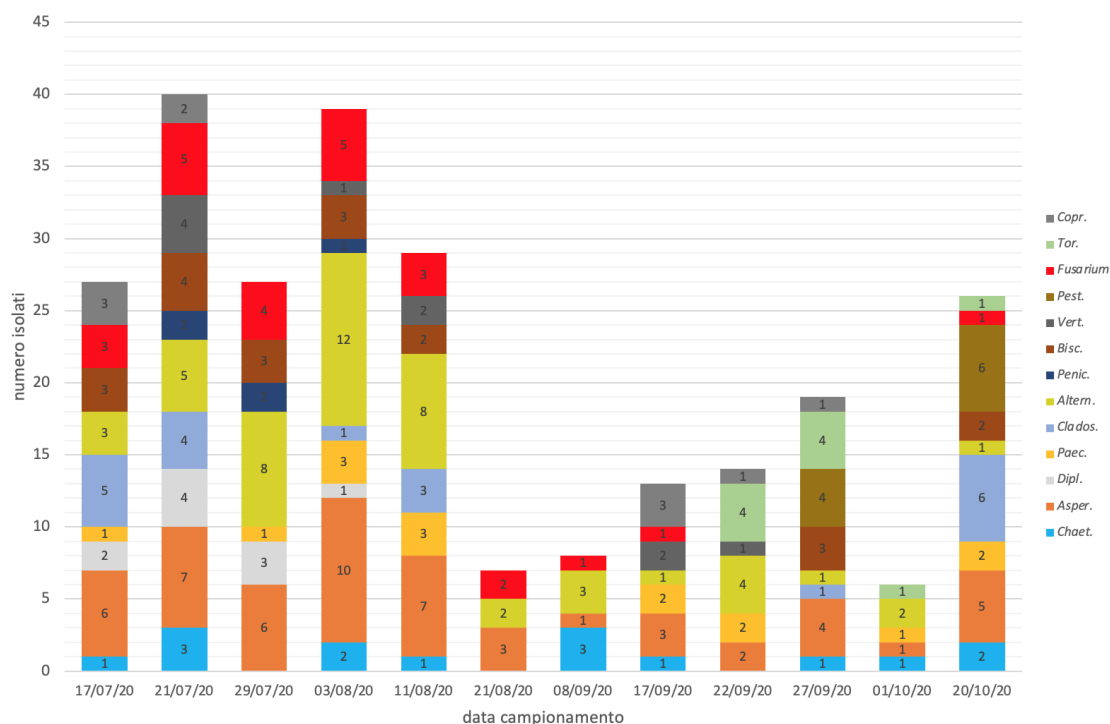


Fig 6.6 Distribuzione dei generi fungini in relazione alla data di raccolta delle cimici da cui sono stati isolati

Di questo risultato si evidenzia:

- il maggior numero di isolati è stato ottenuto nei primi 5 campionamenti (dal 17 luglio all'11 agosto)
- i generi *Aspergillus* ed *Alternaria* sono gli unici che sono stati isolati dalle cimici raccolte in tutte le date di campionamento;
- i generi *Diplodia*, *Cladosporium*, *Biscogniauxia* e *Penicillium* sono stati isolati prevalentemente nei primi 5 campionamenti;
- Il genere *Fusarium* è risultato presente in tutti i primi 8 campionamenti per poi praticamente scomparire dalla 2° metà di settembre (Figura 6.7).

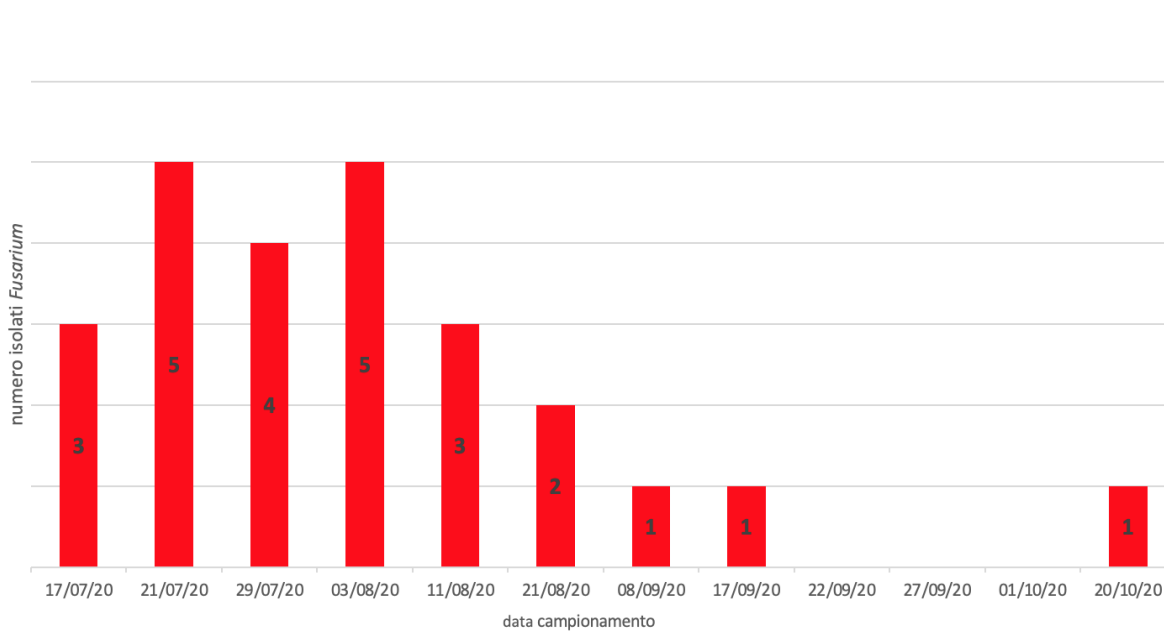


Fig. 6.7 Distribuzione temporale degli isolati ottenuti del gen. *Fusarium* in relazione alla data di raccolta delle cimici da cui sono stati isolati.

6.3 Discussione

Come si è già accennato nell'introduzione, sono molti i generi fungini che possono essere ritenuti causa di fitopatie sul nocciolo, in particolare quelli responsabili di alterazioni a carico dei frutti.

L'analisi effettuata ha dimostrato che numerosi microrganismi fungini contaminano l'apparato boccale esterno degli eterotteri appartenenti al raggruppamento delle "cimici nocciolaie". Questo dato, seppur preliminare, costituisce un primo passo nello studio di un loro potenziale ruolo come vettori dei patogeni fungini delle nocciole che, trasportati sulla superficie di rostro e stiletto, potrebbero più facilmente colonizzare il frutto sfruttando le ferite causate dall'attività edafica.

Nel corso delle indagini è stato possibile notare come la composizione delle specie fungine rilevate si modificano nell'arco temporale preso in esame: si evidenzia infatti una significativa maggiore numerosità degli isolati durante il mese di luglio fino agli inizi di agosto. Ad essa fa seguito una consistente diminuzione ai primi di settembre ed una sensibile ripresa solo nel mese di ottobre. Certamente questo dato è in correlazione con il numero di esemplari catturati nei diversi momenti della stagione, ma si può anche ipotizzare che vi sia una relazione con le diverse condizioni ambientali riscontrate nei diversi mesi di indagine che possono favorire o meno lo sviluppo dei microrganismi.

Certamente interessante è il dato che, tra i generi fungini rinvenuti sugli apparati boccali degli eterotteri considerati, accanto a comuni muffe ambientali saprotrofe (*Chetomium*, *Paecilomyces* e *Cladosporium*), ad un lievito (*Torula*) e ad un basidiomicete (*Coprinellus*), siano stati rinvenuti anche dei taxa noti per essere patogeni del nocciolo.

Tra questi ultimi alcuni, quali *Diplodia* spp e *Biscogniauxia mediterranea*, sono noti agenti causali di cancri a carico dei tessuti legnosi delle branche di nocciolo, ma anche di altre specie arboree. Altri possono causare problematiche meno note, come *Pestalotiopsis*, che è un genere principalmente considerato un endofita, ma che in alcune zone della Turchia è stato riportato su nocciolo come agente causale di avvizzimento dei germogli e, soprattutto, come causa di danni al frutto. Pure *Verticillium* è un genere noto per causare problemi vascolari, anche su nocciolo, soprattutto con le specie *V. dahliae* e *V. albo-atrum*.

Interessante è invece il ritrovamento di generi quali *Aspergillus*, *Penicillium* ed *Alternaria*. Infatti, ad esempio, anche nello studio condotto da Vitale e colleghi nel 2020 su campioni di nocciole affette dall'alterazione conosciuta come "avariato" (visibile o occulto) alcuni generi fungini quali *Alternaria*, *Cladosporium* e *Fusarium* sono stati isolati dai frutti, analogamente a quanto ottenuto nella presente ricerca. Il lavoro citato è stato condotto negli anni dal 2016 al 2020 in Campania e in Piemonte analizzando campioni di nocciole prelevati sia in fase di raccolta che nel post raccolta.

Analogamente, nelle ricerche effettuate da Arciuolo *et al.* (2020) riguardo le specie fungine associate ai marciumi delle nocciole in Turchia, e da Pscheidt *et al.* (2018) in Oregon, sono stati prevalentemente isolati funghi appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Diaporthes*. Queste importanti analogie tra ricerche condotte in aree geografiche e tempi molto distanti tra loro sembrano mostrare una certa omogeneità nei microrganismi che interessano le nocciole avariate e che probabilmente ne provocano le alterazioni. Rimane tuttavia da approfondire il ruolo che ciascuno di essi svolge nell'indurre le varie alterazioni osservate (avariato, cimiciato...),

con l'obiettivo di arrivare a proporre delle valide metodologie di contenimento, volte a garantire il mantenimento di elevate caratteristiche organolettiche delle produzioni.

Dai risultati di questo studio, in ogni caso, si può ipotizzare anche un altro aspetto, ovvero che le cimici, nei loro spostamenti lungo le porzioni aeree della chioma delle piante alla ricerca di nutrimento, vengano in contatto con le strutture riproduttive dei diversi patogeni, sporcandosi con le loro spore.

Il dato che ci sembra più interessante, almeno ai fini di questa tesi, è certamente la presenza, piuttosto abbondante, di isolati appartenenti al genere *Fusarium* sugli apparati boccali delle cimici raccolte. Come noto, infatti, ad esso appartiene la specie *F. lateritium* ritenuta, secondo diversi studi l'agente principale della Necrosi Grigia del Nocciolo (NGN). I risultati ottenuti, naturalmente, non permettono ancora di collegare direttamente l'azione trofica delle cimici sui frutti con l'insorgenza della malattia, ma di sicuro rafforzano l'ipotesi che ciò avvenga. Saranno assolutamente necessari futuri studi ad hoc, in ambiente controllato, per poter dimostrare definitivamente il ruolo di questi insetti come vettori di una malattia così rilevante per la corilicoltura.

A tal proposito, la ricerca che verrà dettagliatamente illustrata nel successivo capitolo 7, ha avuto come obiettivo proprio l'approfondimento delle conoscenze relative a questa patologia ed al microrganismo fungino che la causa attraverso l'ottenimento del genoma di un ceppo appartenente al genere *Fusarium* isolato da nocciola sintomatica nell'areale dei monti Cimini.

Cap 7 Genoma di *Fusarium. sp* isolato nel comprensorio dei Monti Cimini.

Nell'estate 2019 è stata effettuata un'indagine sullo stato di salute di un nocciolo situato nella Tuscia (provincia di Viterbo, Lazio, Italia), nell'ambito del Progetto Horizon 2020 "Pantheon". Durante il monitoraggio in campo, sono stati individuati dei frutti con sintomi evidentemente riconducibili alla Necrosi Grigia del Nocciolo (NGN).



Fig. 7.1 Nocciola colpita da NGN (Nocciolare-fonte CRA Roma)

La NGN è una malattia fungina ad oggi associata alla presenza di *Fusarium lateritium*, i cui sintomi includono macchie marroni e grigiastre alla base dei frutti che progrediscono verso l'alto fino all'apice e macchie necrotiche sulle brattee e sui piccioli (Belisario e Santori, 2009). I campioni sintomatici individuati in campo sono stati raccolti per ulteriori analisi di laboratorio al fine di valutare l'effettiva presenza di *Fusarium lateritium* tramite caratterizzazione molecolare e sequenziare per la prima volta il genoma completo. Per la ricostruzione del genoma completo è stata utilizzata una tecnologia di assemblaggio definita ibrida perché prevede l'utilizzo di sequenze ottenute da due diverse tecnologie di sequenziamento: Illumina che produce sequenze corte e Oxford Nanopore Technologies che produce sequenze più lunghe.

7.1 Materiali e metodi

7.1.1 Isolamento fungino

Le nocciole (Tonda Gentile Romana cv) sono state raccolte da un nocciolo adulto situato nella zona di Viterbo (VT) (Lazio, Italia; latitudine 42°16'00.0", longitudine 12°17'00.0", altitudine 275 m) presso l'azienda agricola "Vignola" (Nepi, VT). Piccoli frammenti di circa 2 mm² sono stati prelevati dalla superficie e posti in piastra su terreno di coltura (PDA) integrato con 0,2 g·L⁻¹ di streptomicina solfato. Le piastre Petri sono state quindi incubate a 25°C fino a quando le colonie fungine sono cresciute abbastanza da essere ulteriormente trasferite singolarmente su nuove piastre PDA per ottenere infine isolati monosporici.

7.1.2 Identificazione morfologica e molecolare

Per la caratterizzazione morfologica, le colture sono state coltivate su Spezieller Nährstoffarmer agar (SNA), un terreno selettivo che contiene macro e micronutrienti essenziali per i funghi e inibisce invece la crescita di altri microrganismi (es. batteri). Dopo 10 giorni, le colture sono state esaminate utilizzando uno stereomicroscopio Nikon SMZ128 (Tokyo, Giappone) e le immagini sono state acquisite utilizzando la fotocamera CMOS Alexasoft TPS5000H (Firenze, Italia). Per l'analisi microscopica, i campioni sono stati preparati miscelandoli con colorante blu lattofenolo ed utilizzando il microscopio ottico Leica DM6 B (Wetzlar, Germania), le immagini sono state catturate utilizzando la fotocamera Leica DFC 7000 T (Wetzlar, Germania), elaborate utilizzando il programma Leica Application Suite X (versione 4.12) (Wetzlar, Germania), e tutte le caratteristiche morfologiche sono state valutate secondo le indicazioni contenute in "The Fusarium Laboratory Manual" (Leslie e Summerell, 2006).

Per ogni isolato, circa 100 mg di micelio sono stati posti in una microprovetta sterile da 2 ml con 1 ml di tampone di lisi (1 mM EDTA pH 8, 10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, SDS 1%) per l'estrazione del DNA. Dopo 5 minuti di centrifugazione a 12.000 rpm, il surnatante è stato trasferito in una nuova microprovetta e il DNA è stato precipitato con isopropanolo ed etanolo al 70%.

Per caratterizzare gli isolati a livello di genere/specie, sono stati amplificati due geni utilizzando due specifiche coppie di primers, una mirata all'amplificazione della porzione del DNA ribosomale contenente gli Internal Transcribed Spacers (ITS) (White *et al.*, 1990) e la seconda, specifica per il genere *Fusarium*, mirata all'amplificazione di una parte del gene Elongation Factor 1-alfa (EF 1 ALFA) (Edel-Hermann *et al.*, 2015). Gli ampliconi ottenuti sono stati sequenziati con la tecnica Sanger presso Eurofins genomics (Eurofins Genomics GmbH, Costanza, Germania).

7.1.3 Test di patogenicità

Tra gli isolati ottenuti, ne è stato selezionato uno casualmente, denominato PT, per il sequenziamento genomico. Per confermare che l'isolato in oggetto fosse effettivamente responsabile della malattia e che quindi riproducesse i sintomi osservati sui frutti, sono stati effettuati dei test di patogenicità. Per la preparazione dell'inoculo, l'isolato PT è stato fatto crescere su SNA a 25°C per 10 giorni (Leslie e Summerell, 2006). Quindi, i conidi sono stati raschiati dalle colture fungine e filtrati attraverso strati di garza per rimuovere ogni frammento di micelio. La sospensione conidica risultante è stata quantificata utilizzando un emocitometro e diluita ad una concentrazione finale di 10^6 conidi/ml. Le inoculazioni sono state eseguite utilizzando due tecniche: (i) inoculazione di frutti (a vario stadio di sviluppo, da giovani a completamente formati) depositando 20 μ l di sospensione conidica (10^6 conidi/ml) tra la nucula e le brattee; (ii) inoculazione del mesocarpo delle nocciole con 20 μ l della medesima sospensione conidica. I frutti inoculati e quelli di controllo, inoculati con acqua distillata sterile, sono stati posti in una camera umida a temperatura ambiente per 12 giorni. La comparsa di eventuali sintomi è stata monitorata quotidianamente.

7.1.4 Estrazione del DNA ad alto peso molecolare e sequenziamento del genoma

L'isolato PT selezionato è stato fatto crescere per 3 giorni a 25°C in coltura liquida, in 100 ml di Czapek Dox inoculato con $\sim 1 \times 10^6$ conidi inoculati (Leslie e Summerell, 2006). Successivamente, il DNA genomico è stato estratto seguendo il protocollo CTAB con opportune modifiche (Graham e Henry, 1997), come descritto di seguito.

Il micelio cresciuto in coltura liquida è stato liofilizzato utilizzando una pompa da vuoto. Un'aliquota di 250 mg di micelio liofilizzato è stata macinata finemente in azoto liquido utilizzando un pestello e un mortaio e trasferita in una provetta da 2 ml. Quindi, al campione sono stati aggiunti 500 μ l di tampone CTAB (10% CTAB, 25 mM EDTA pH 8,0, 200 mM Tris-HCl pH 8,0, 2,50 M NaCl) e 5 μ l di proteinasi K (20 mg/ml) e la soluzione è stata miscelata delicatamente e incubata per una notte a 56°C. Dopo 5 min di incubazione in agitazione con 500 μ l di fenolo:cloroformio:alcool isoamilico (25:24:1) e 10 min di centrifugazione a 12.000 rpm, la fase acquosa limpida è stata trasferita in una nuova provetta e incubata con 500 μ l di cloroformio:alcool isoamilico (24:1). Dopo 10 min di centrifugazione a 12.000 rpm, la fase acquosa è stata raccolta in una nuova provetta e sono stati aggiunti 0,6 VOL di isopropanolo freddo, facendo seguire 30 min di centrifugazione a 12.000 rpm per la precipitazione del DNA. Sono state eseguite due fasi di pulizia/precipitazione utilizzando 1 ml

di etanolo freddo al 70% mediante 10 min di centrifugazione a 12.000 rpm. Il pellet è stato essiccato, risospeso in 100 µl di acqua sterile ultrapura e trattato con RNasi a 37 ° C per 30 minuti.

L'integrità del DNA è stata valutata con una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%, mentre la purezza del DNA è stata controllata utilizzando lo spettrofotometro Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific).

Per il sequenziamento del DNA effettuata su un dispositivo MinION Mk1b (Oxford Nanopore Technologies, ONT, Regno Unito) utilizzando una flowcell R9.4.1 (ONT), il campione è stato preparato utilizzando il kit SQK-RBK004 Rapid Barcoding Kit (ONT) e seguendo le istruzioni da manuale. Un'aliquota dello stesso campione di DNA è stata sequenziata presso Eurofins Genomics (Eurofins Genomics GmbH, Konstanz tramite tecnologia Illumina).

7.1.5 Assemblaggio del genoma

Per assemblare il genoma, sono stati utilizzati separatamente quattro diversi software in diverse prove per valutarne l'efficienza di assembly: SPAdes versione 3.11.1 (Nurk *et al.*, 2013), Minimap2 versione 2.12-r849-dirty (Li, 2018) in combinazione con Miniasm versione 0.3-r179 (Li , 2016), MaSuRCA versione 3.4.2 (Zimin *et al.*, 2013) e Canu versione 2.1.1 (Koren *et al.*, 2017).

SPAdes è stato usato in una prima prova con le sole reads Illumina ed in una seconda prova in un assembly ibrido utilizzando entrambe le reads, sia Illumina che Nanopore. In una terza prova, un assembly ibrido è stato effettuato utilizzando MaSuRCA, mentre nelle restanti quarta e quinta prova rispettivamente con Miniasm-Minimap2 e Canu, sono state utilizzate solo reads Nanopore. Per tutti i software sono stati utilizzati i parametri di default, ad eccezione di Canu che richiede una stima della dimensione attesa del genoma, che è stata settata a 40Mb.

La qualità dell' assembly è stata valutata, per ciascuna delle cinque prove, tramite QUILT (Gurevich *et al.*, 2013) e il genoma con i parametri migliori è stato ulteriormente verificato tramite allineamento delle reads Illumina e scelto per le successive analisi.

7.1.6 Annotazione del genoma

Pertanto, il genoma assemblato da Canu è stato annotato strutturalmente utilizzando la pipeline MAKER (Holt e Yandell, 2011), che utilizza RepeatModeler per mascherare gli elementi ripetitivi, SNAP e AUGUSTUS per una predizione *ab initio* dei geni, Est2Genome e Protein2Genome per perfezionare ulteriormente i confini degli introni e degli esoni, Exonerate e tRNAscan-SE per identificare i geni correlati alla biosintesi del tRNA. I trascritti e le proteine di quattro specie di *Fusarium* (*F. fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *F. verticillioides*) sono stati usati come modelli per l'identificazione delle proteine nel ceppo in esame, mentre la dimensione massima per gli introni è stata fissata a 2.500 bp. L'annotazione funzionale è stata eseguita utilizzando BLASTp e SwissProt come database.

7.1.7 Genomica comparata e analisi filogenetica

Le sequenze dei genomi di altre 27 specie di *Fusarium*, insieme alla relativa annotazione (quando disponibile), sono state scaricate da NCBI ed utilizzate per l'analisi filogenetica e per la genomica comparativa (Tab. 7.1). Deve essere sottolineato che l'unico genoma di *Fusarium lateritium* disponibile su NCBI è relativo ad un ceppo isolato da un olmo sintomatico a Pineville, Louisiana, Stati Uniti (Kim *et al.*, 2020).

La stessa pipeline di annotazione di MAKER è stata applicata per annotare i genomi di *F. culmorum*, *F. circinatum*, *F. oxysporum* f.sp. *koae* 44, *F. pseudograminearum* CS3270, *F. solani* IISc-1, *F. tricinctum* INRA104, *F. tricinctum* NRRL25481, *F. tricinctum* T6, *F. verticilloides* BRIP 53263, BRIP 53590 e tutti gli isolati di *F. avenaceum*, ad eccezione del già annotato Fa05001 utilizzato per la seguente analisi genomica comparativa.

Tab. 7.1 Elenco delle specie di *Fusarium* utilizzate per i confronti del genoma a coppie e l'analisi filogenetica.

Species	Strain	Accession number
<i>Fusarium acuminatum</i>	F829	GCA_013363215.1
<i>Fusarium avenaceum</i>	F156N33	GCA_018282135.1
<i>Fusarium avenaceum</i>	Fa05001	GCA_000769215.1
<i>Fusarium avenaceum</i>	FaLH03	GCA_000769305.1
<i>Fusarium avenaceum</i>	FaLH27	GCA_000769295.1
<i>Fusarium avenaceum</i>	NRRL 13321	GCA_013753855.1
<i>Fusarium avenaceum</i>	S18/60	GCA_019055295.1
<i>Fusarium avenaceum</i>	S18/70	GCA_019055285.1
<i>Fusarium avenaceum</i>	S18/74	GCA_019055275.1
<i>Fusarium circinatum</i>	FSP34	GCA_497325.3
<i>Fusarium culmorum</i>	-	GCA_900074845.1
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Augusto2	GCA_9663095.1
<i>Fusarium fujikuroi</i>	CSV1	GCA_9663055.1
<i>Fusarium graminearum</i>	-	GCA_900073075.1
<i>Fusarium graminearum</i>	PH-1	GCA_900044135.1
<i>Fusarium lateritium</i>	NRRL 13622	GCA_14898835.1
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>koae</i>	44	GCA_14857105.1
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	4287	GCA_149955.2
<i>Fusarium pseudograminearum</i>	CS3096	GCA_303195.2
<i>Fusarium pseudograminearum</i>	CS3270	GCA_974265.2
<i>Fusarium solani</i>	IISc-1	GCA_13168735.1
<i>Fusarium tricinctum</i>	INRA104	GCA_900382705.2
<i>Fusarium tricinctum</i>	NRRL 25481	GCA_012977725.1
<i>Fusarium tricinctum</i>	T6	GCA_003045085.1
<i>Fusarium venenatum</i>	A3-5	GCA_900007375.1
<i>Fusarium verticillioides</i>	BRIP53263	GCA_3317015.2
<i>Fusarium verticillioides</i>	BRIP53590	GCA_3316995.2

Per una prima analisi filogenetica, le sequenze nucleotidiche di sei geni housekeeping (EF-1 α , RPB1, RPB2, beta tubulina, ITS e LSU) sono state estrapolate da ciascun genoma, concatenate e allineate utilizzando MUSCLE (Edgar, 2004). L'allineamento risultante è stato utilizzato per costruire un albero di filogenetico di Maximum Likelihood (ML) utilizzando raxmlHPC (Stamatakis, 2014), poi visualizzato utilizzando FigTree versione 1.4.43.

Un secondo albero filogenetico ML è stato costruito utilizzando raxmlHPC sugli SNPs (Polimorfismi a singolo nucleotide) del core genome (genoma in comune fra tutti i ceppi in esame), come identificato da Panseq (Laing et al., 2010).

Per discriminare meglio tra gli isolati appartenenti al *F. tricinctum* species complex (FTSC), è stato anche costruito un albero filogenetico ML basato sull'allineamento della sequenza concatenata dei geni RPB1 e RPB2, codificanti per le due subunità della RNA polimerasi II, come precedentemente effettuato da O'Donnell *et al.* (2013); Ponts *et al.* (2020), e Crous *et al.* (2021). MUSCLE e RAxML sono stati utilizzati come descritto in precedenza ed i 63 isolati di *Fusarium* utilizzati in questa analisi sono riportati nella tabella 7.2.

Tab. 7.2 isolati di *Fusarium* utilizzati per allineamento della sequenza concatenata dei geni RPB1 e RPB2

Species	strain name	RPB1	RPB2	Assembly
<i>F. acuminatum</i>	NRRL 28449	MG282373	MG282402.1	
<i>F. acuminatum</i>	NRRL 45994	KC808324.1	GQ505496.1	
<i>F. acuminatum</i>	NRRL 52789	JF741010.1	MH582367	
<i>F. acuminatum</i>	F829			GCA 013363215.1
<i>F. acuminatum</i>	NRRL 28652	MG282384	MG282414.1	
<i>F. avenaceum</i>	NRRL 26911	MG282372.1	MG282401.1	
<i>F. avenaceum</i>	NRRL 54939	JX171551.1	JX171663.1	
<i>F. avenaceum</i>	Fa05001			GCA 000769215.1
<i>F. avenaceum</i>	542020KK			GCA 019055345.1
<i>F. avenaceum</i>	562020KK			GCA 019055315.1
<i>F. avenaceum</i>	F156N33			GCA 018282135.1
<i>F. avenaceum</i>	KA13			GCA 012959155.1
<i>F. avenaceum</i>	FaLH03			GCA 000769305.1
<i>F. avenaceum</i>	FaLH27			GCA 000769295.1
<i>F. avenaceum</i>	NRRL 13321			GCA 013753855.1
<i>F. avenaceum</i>	S18/60			GCA 019055295.1
<i>F. avenaceum</i>	S18/70			GCA 019055285.1
<i>F. avenaceum</i>	S18/74			GCA 019055275.1
<i>F. avenaceum</i>	INRA112	MH667521.1	MH667546.1	
<i>F. avenaceum</i>	INRA494	MH667522.1	MH667548.1	
<i>F. avenaceum</i>	INRA495	MH667523.1	MH667549.1	
<i>F. avenaceum</i>	INRA496	MH667524.1	MH667550.1	
<i>F. avenaceum</i>	INRA497	MH667525.1	MH667551.1	
<i>F. avenaceum</i>	INRA498	MH667526.1	MH667552.1	
<i>F. avenaceum</i>	INRA499	MH667527.1	MH667553.1	
<i>F. avenaceum</i>	INRA6	MH667520.1	MH667545.1	
<i>F. avenaceum</i>	INRA611	MH667528.1	MH667543.1	
<i>F. avenaceum</i>	NRRL 25128	JF740962	MH582355.1	
<i>F. avenaceum</i>	INRA612	MH667529.1	MH667544.1	
<i>F. flocciferum</i>	NRRL 25473	JX171514	JX171627.1	
<i>F. flocciferum</i>	NRRL 45999	HM347195	MH582362.1	
<i>F. flocciferum</i>	NRRL 52714	JF740977	MH582363.1	
<i>F. flocciferum</i>	NRRL 52933	JF741019.1	MH582368.1	
<i>F. flocciferum</i>	NRRL 54147	HM347200	MH582369.1	
<i>F. petersiae</i>	JW14004	MG386138	MG386149	
<i>F. petersiae</i>	JW14005	MG386139	MG386150	
<i>F. sp</i>	PT			from this work
<i>F. sp</i>	NRRL 34036	HM347173	GQ505483.1	
<i>F. sp</i>	NRRL 36147	HM347174	GQ505484.1	
<i>F. sp</i>	NRRL 52722	JF740980	JF741130.1	
<i>F. sp</i>	NRRL 52726	JF740981.1	MH582364.1	
<i>F. sp</i>	NRRL 52727	JF740982	JF741133.1	
<i>F. sp</i>	NRRL 52730	JF740984	JF741135.1	
<i>F. torulosum</i>	NRRL 22748	JX171502.1	JX171615.1	
<i>F. torulosum</i>	NRRL 52772	JF741003.1	MH582377.1	
<i>F. tricinatum</i>	24E	MT232473.1	MT250638.1	
<i>F. tricinatum</i>	CBS 253.50	MW928802.1	MW928823.1	
<i>F. tricinatum</i>	NRRL 25481			GCA 012977725.1
<i>F. tricinatum</i>	INRA104			GCA 900382705.2
<i>F. tricinatum</i>	T6			GCA 003045085.1
<i>F. tricinatum</i>	INRA105	MH667531.1	MH667565.1	
<i>F. tricinatum</i>	INRA106	MH667532.1	MH667566.1	
<i>F. tricinatum</i>	INRA521	MH667533.1	MH667554.1	
<i>F. tricinatum</i>	INRA522	MH667534.1	MH667555.1	
<i>F. tricinatum</i>	INRA523	MH667535.1	MH667556.1	
<i>F. tricinatum</i>	INRA524	MH667536.1	MH667557.1	
<i>F. tricinatum</i>	INRA525	MH667537.1	MH667558.1	
<i>F. tricinatum</i>	INRA526	MH667538.1	MH667559.1	
<i>F. tricinatum</i>	INRA527	MH667539.1	MH667560.1	
<i>F. tricinatum</i>	INRA528	MH667540.1	MH667561.1	
<i>F. tricinatum</i>	INRA529	MH667541.1	MH667562.1	
<i>F. tricinatum</i>	INRA610	MH667542.1	MH667563.1	
<i>F. tricinatum</i>	INRA86	MH667530.1	MH667564.1	

Le proteine ortologhe sono state identificate utilizzando OrthoFinder e i risultati sono stati utilizzati per costruire un quarto albero filogenetico, visualizzato utilizzando FigTree (Emms e Kelly, 2019).

L'analisi dell'identità media dei nucleotidi (ANI) è stata eseguita utilizzando lo script pyani e ANIb come algoritmo per l'allineamento (Pritchard *et al.*, 2016).

7.2 Risultati

7.2.1 Identificazione del ceppo

Come riportato anche nei Materiali e Metodi, il ceppo appartenente a *Fusarium* sp., isolato da frutti sintomatici e scelto per le analisi genomiche è stato denominato "PT" (Figura 7.4 A,B). L'analisi morfologica eseguita per esaminarne le caratteristiche macroscopiche e microscopiche ha evidenziato:

- un colore del micelio variabile dal bianco nei primi 3-4 giorni, all'arancione pallido.
- abbondanti macroconidi medio-lunghi, sottili con pareti parallele per la maggior parte della lunghezza delle spore,
- assenza di microconidi e rari monofialidi.

Queste caratteristiche rientrano tra quelle che caratterizzano la specie *F. lateritium* (Leslie e Summerell, 2006). Le sequenze dell'ITS e del gene EF-1 α hanno mostrato un'elevata identità di sequenza (rispettivamente 98,22 e 99,69%) con le sequenze di *F. lateritium*, supportando l'ipotesi iniziale relativa all'identificazione specifica.

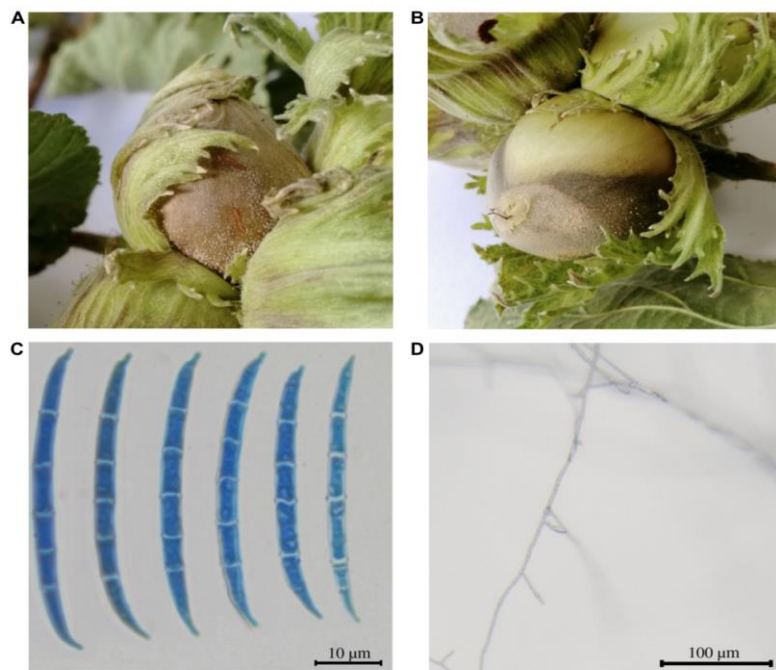


Figura 7.2. Nocchie sintomatiche e caratteristiche microscopiche dell'isolato *Fusarium* sp. PT. (A,B) I frutti sintomatici erano caratterizzati da una macchia necrotica marrone grigiastra sul guscio della noce, sulle brattee e meno spesso sui piccioli.(C) Macroconidi e (D) monofialidi del fungo isolato visualizzati al microscopio ottico.

7.2.2 Test di patogenicità

Tutti i frutti, tranne il controllo negativo, hanno sviluppato sintomi simili a quelli osservati nel campo (Fig. 7.5). Il patogeno è stato costantemente reisolato dalle nocciole inoculate ma non dai frutti di controllo. Il fungo così ottenuto dai frutti inoculati ha mostrato la stessa morfologia dell'isolato originale così come sono risultate identiche le sequenze ITS, LSU e β -tubulina e EF-1 α rispetto a quelle ottenute precedentemente dal ceppo inoculato, rispettando così i postulati di Koch che ne confermano la patogenicità.



Figura 7.3. Re-inoculazione del patogeno. Il patogeno isolato è stato re-inoculato in nocciole sane, che hanno sviluppato gli stessi sintomi della nocciola raccolta nel campo dell'azienda agricola "Vignola" (VT)

7.2.3 Assemblaggio e annotazione del genoma

È stato ottenuto un DNA genomico pulito e ad alto peso molecolare, con rapporti di 260/230 nm e 260/280 nm compresi tra 1,8 e 2,0. Il genoma è stato sequenziato utilizzando entrambe le tecnologie ONT e Illumina. Il sequenziamento Nanopore ha prodotto ~701 mila reads (1,92 Gbp; con coverage ~73 \times), con una lunghezza media delle reads di 2.740 bp e un N50 di 4.588. Il sequenziamento con Illumina NovaSeq 6000 ha prodotto 2x ~2,5 M di paired-end reads (2 Mbp \times 385 Mbp; 20 \times coverage), per un totale quindi di circa 4,8 M di reads, con una lunghezza media di 151 bp e un contenuto GC del 47%.

La lunghezza media delle reads Nanopore, seppur negativamente influenzata dalla frammentazione del materiale genetico di partenza, è risultata comunque di 2.740 bp, con un contenuto di GC del 47%.

Sulla base dei risultati di QUASt, che valuta diversi parametri per la completezza e qualità del genoma assemblato, l'assemblaggio ottenuto da Canu è risultato il migliore, con una lunghezza totale del genoma di 40,51 Mb disposti in soli 27 contig.

Il genoma è stato quindi annotato usando la pipeline MAKER e depositato su NCBI con l'accession number JAHMRZ000000000.

7.2.4 Analisi filogenetica

Le sequenze concatenate e allineate dei geni EF-1 α , RPB1, RPB2, beta tubulina, ITS e LSU (circa 7.100 nucleotidi) degli isolati di *Fusarium* in esame, hanno mostrato differenze evidenti, perfettamente rappresentate dall'albero ML in [Figura 7.4A](#). È interessante notare come il nostro isolato di *Fusarium* risulti raggruppato insieme a quelli appartenenti al *Fusarium tricinctum* species complex (FTSC) e non direttamente con l'unico altro ceppo di *F. lateritium*, come ci si attendeva dalla caratterizzazione morfologica e dalla sintomatologia indotta, associabile al NGN. Questo clustering inatteso è confermato però dalla relativamente bassa similarità di sequenza (dall'82 all'86%, rispettivamente), tra i geni EF-1 α , RPB1, RPB2 e beta-tubulina dell'isolato PT ed il *F. lateritium* scaricato da NCBI (che ricordiamo essere stato ottenuto da olmo in Louisiana, USA), nonostante, effettivamente le sequenze ITS e LSU risultino identiche al 100 e al 98%. Al contrario, la similarità di sequenza di questi geni con quelli degli isolati riconducibili al FTSC risulta essere più alta, anche se mai al 100%.

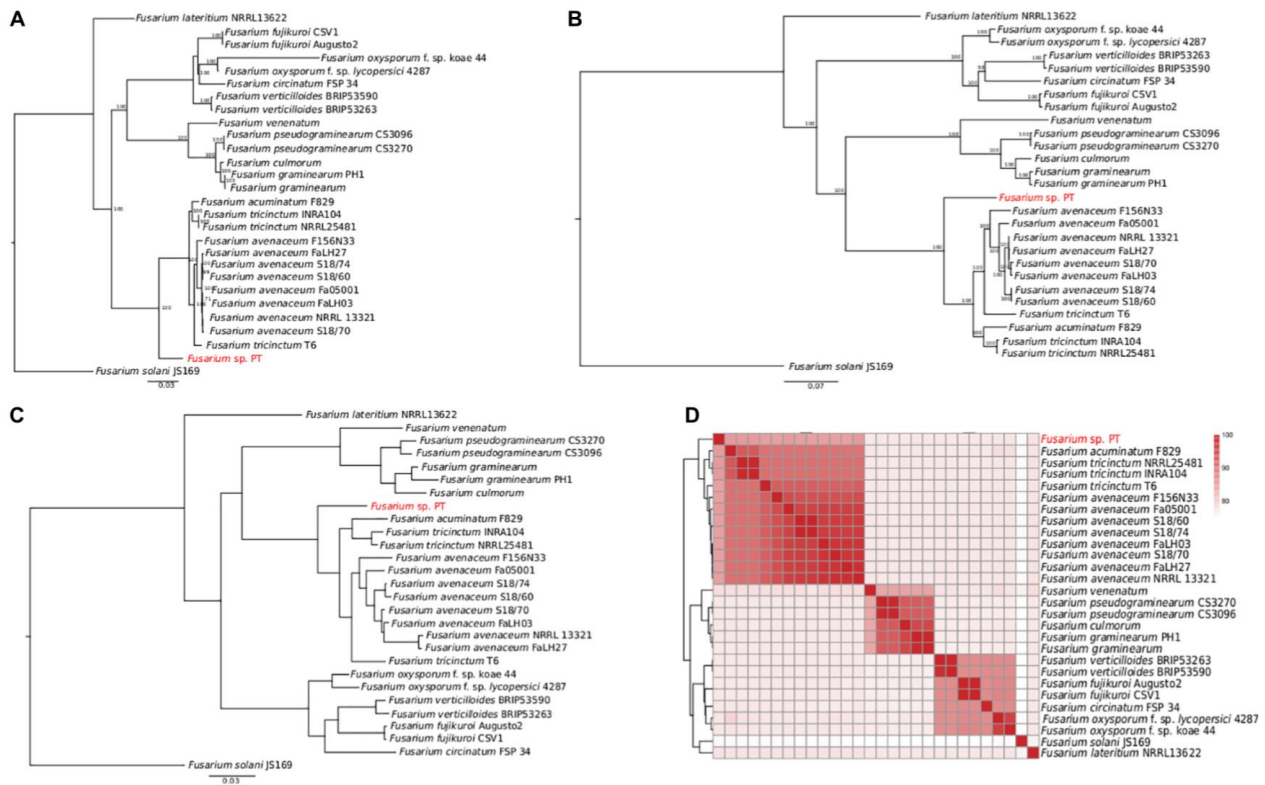


Figura 7.4. Analisi filogenetica di 28 ceppi di *Fusarium*. (A) Albero filogenetico ML basato sull'allineamento delle sequenze nucleotidiche concatenate EF-1 α , RPB1, RPB2, beta tubulina, ITS e LSU. Vengono mostrati solo i valori bootstrap superiori a 70. (B) Albero filogenetico ML basato sui 4.319 SNPs del genoma del nucleo identificati utilizzando Panseq. Viene indicato anche il numero di bootstrap. (C) Albero filogenetico ML delle proteine ortologhe identificate utilizzando OrthoFinder. Nei pannelli (A–C) *Fusarium solani* JS169 è stato utilizzato come outgroup. (D) Heatmap dell'identità nucleotidica media (ANI) eseguita utilizzando blastn che mostra la percentuale di identità di sequenza tra i diversi ceppi di *Fusarium*.

Di conseguenza, per chiarire ulteriormente la relazione filogenetica tra i ceppi di *Fusarium* in esame, è stato costruito un albero ML su 4.319 SNP trovati nel core genome identificato da Panseq. Come mostrato nella Figura 7.4B, il raggruppamento dell'isolato PT all'interno del FTSC è stato confermato. La stessa clusterizzazione è stata ottenuta con le proteine ortologhe costruendo un albero con OrthoFinder (Figura 7.4C). Analogamente, l'identità nucleotidica media (ANI) eseguita utilizzando blastn ha fornito un quadro generale dell'identità di sequenza tra i ceppi di *Fusarium* a confronto, mostrato dalla heatmap in Figura 7.4D, con l'isolato PT nuovamente riconducibile agli isolati del FTSC.

Da queste analisi filogenetiche è risultata evidente l'appartenenza dell'isolato PT al gruppo FTSC. Un'ulteriore analisi è stata effettuata paragonando le sequenze nucleotidiche dei geni RPB1 e RPB2 fra l'isolato PT e quelle di una selezione di 63 isolati di *Fusarium* appartenenti al FTSC. *Fusarium solani* è stato utilizzato ancora una volta come outgroup. Il risultato è mostrato in Figura 7.5. Ancora

7.3 Discussione

Fusarium è un genere fungino assai vasto che comprende numerose specie, con una gamma di ospiti altrettanto ampia. La sua classificazione è stata tradizionalmente basata su caratteri morfologici, come i macroconidi distintivi a forma di banana (Leslie e Summerell, 2006). Tuttavia, negli ultimi decenni, gli approcci molecolari hanno permesso di fare delle distinzioni più accurate che hanno portato alla descrizione di oltre 300 specie filogeneticamente distinte (O'Donnell *et al.*, 2004; Druzhinina *et al.*, 2006). Nella maggior parte dei casi, l'analisi molecolare alla base dell'identificazione delle specie e dell'assegnazione dei ceppi a specie definite è stata, ed è tuttora, basata sul confronto di sequenza multilocus (Multiple Locus Sequence Typing - MLST), ovvero sulla comparazione di sequenze complete o parziali di un gruppo di geni "housekeeping", utilizzato, ad esempio, in FUSARIUM-ID (Geiser *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2010) e Fusarium MLST (O'Donnell *et al.*, 2010). Tuttavia, come già ampiamente discusso in diversi articoli (O'Donnell *et al.*, 2015), anche questo approccio nel tempo ha cominciato a mostrare alcuni limiti. Ad esempio, in *Fusarium*, le sequenze ITS e LSU risultano essere scarsamente informative a livello di specie, e per questo dovrebbero essere evitate, dando la preferenza a geni più efficaci, quali EF1, RPB1 e RPB2.

Inoltre, bisogna tenere in considerazione che la oggettiva complessità del genere da una parte e le citate criticità nella selezione dei geni per l'identificazione delle specie dall'altra, hanno talvolta portato a un'errata identificazione dei ceppi e, di conseguenza, all'assegnazione delle specie in sequenze corrispondenti quando depositate nei database molecolari.

Da queste considerazioni, risulta evidente come le nuove tecnologie che permettono il sequenziamento ed il confronto dell'intero genoma (WGS) siano uno strumento molto più potente ed efficace per avere indicazioni affidabili e risolvere questi malintesi. Peraltro esse non solo consentono un'analisi filogenetica accurata, ma forniscono anche le basi per una comprensione approfondita dei meccanismi patogenetici molecolari coinvolti nell'interazione pianta-patogeno, come, ad esempio, l'identificazione dei geni effettori (Plissonneau *et al.*, 2016, Möller e Stukenbrock, 2017). Conoscere meglio la fisiologia di questi microrganismi patogeni permetterà di chiarire quali sono gli strumenti principali di aggressione e, di conseguenza, sviluppare strategie di controllo più efficaci.

Infine, anche nelle strategie di sequenziamento vi è stato negli ultimi anni un progresso costante che permette oggi di ottenere dei genomi completi e di alta qualità, passo essenziale da compiere soprattutto per quelle specie che non sono state ancora sequenziate.

In questo studio, abbiamo sequenziato il genoma di un ceppo di *Fusarium* denominato PT, isolato da un nocciolo situato nei monti Cimini, in provincia di Viterbo. Inizialmente si è ritenuto fosse *F. lateritium* (Belisario e Santori, 2009; Santori *et al.*, 2010; Vitale *et al.*, 2011). L'osservazione al microscopio ottico dei tipici macroconidi settati a forma di banana di *F. lateritium* (Leslie e Summerell, 2006) e le sequenze di ITS e EF 1-alfa supportavano coerentemente questa prima ipotesi. Il nostro scopo era infatti quello di ottenere un genoma con la massima qualità possibile per approfondire le conoscenze scientifiche su questo patogeno.

A tale scopo, sono stati utilizzati cinque diversi tipi di approccio di assembly, utilizzando sia reads lunghe ottenute da ONT MinION, sia reads corte ottenute tramite sequenziamento Illumina, sia una combinazione di entrambi in un assembly ibrido. Il vantaggio di utilizzare reads lunghe, come quelle generate da sequenziamento ONT, consiste principalmente nel consentire una più corretta ricostruzione della reale struttura del genoma, come è stato ampiamente dimostrato, in particolare per genomi più complessi ricchi di trasposoni o ripetizioni in tandem (Goodwin *et al.*, 2016; van Dijk *et al.*, 2018). D'altro canto, le reads lunghe hanno ancora problemi di scarsa accuratezza nella lettura dei singoli nucleotidi con un tasso di errore che si avvicina al 10%. Le reads generate dal sequenziamento Illumina, invece, hanno una maggior precisione nel leggere le sequenze ma risultano poi troppo corte per garantire una ricostruzione affidabile della struttura del genoma. Ne consegue che, un assembly ibrido consente di sfruttare entrambe le caratteristiche migliori dei due metodi (Chen *et al.*, 2020). I risultati ottenuti con tale approccio, sia all'interno del complesso dei *Fusarium* (Million *et al.*, 2019; Degradi *et al.*, 2021; Fan *et al.*, 2021) che per altre specie (Faino *et al.*, 2015; Saud *et al.*, 2021) hanno dimostrato quanto esso possa essere efficace nell'assemblaggio del genoma fungino.

Questi risultati sono stati confermati anche per l'assembly dell'isolato oggetto dello studio. Infatti, il genoma assemblato con SPAdes utilizzando le sole reads Illumina ha restituito il numero più alto di contigs ma anche tutta una serie di regioni con nucleotidi indeterminati (N). Probabilmente queste lacune sono da attribuire a regioni con sequenze ripetute che le reads Illumina non sono riuscite a colmare. All'opposto, Canu, la cui pipeline include un assemblaggio *de novo* che usa le reads lunghe ONT per ricostruire la struttura del genoma, seguito da una correzione puntuale delle sequenze con le reads Illumina, ha dato i risultati migliori, anche quando confrontati con quelli degli altri assemblaggi ibridi tentati con MaSuRCA e Miniasm-Minimap2. Infatti, Canu ha prodotto solo 27 contigs (meno di tutti gli altri assembly testati con il più alto N50 (2.955.107 bp) e senza basi incerte (Ns). Anche in letteratura sono riportate le buone prestazioni di Canu in *F. musae* (Degradi

et al., 2021), *F. oxysporum* f.sp. *capsici* (Xingxing et al., 2021), ed in *F. oxysporum* f. sp. (Krasnov et al., 2020).

Le diverse analisi filogenetiche fatte utilizzando il genoma ricostruito con Canu, hanno dimostrato che il ceppo PT di *Fusarium* è più strettamente correlato al FTSC rispetto all'iniziale ipotizzato *F. lateritium*. Questi risultati sono stati ulteriormente confermati anche dall'analisi basata sulle proteine ortologhe e sul dendrogramma basato sui risultati ANI.

Considerando tutti insieme questi risultati, si può affermare che è stato ancora una volta dimostrato che l'utilizzo di solo uno o due geni housekeeping non è sufficiente a garantire una classificazione affidabile e può portare a un'assegnazione errata delle specie, come già mostrato per la regione ITS in funghi come *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Raja et al., 2017).

L'approccio tassonomico polifasico, come quello riportato in questo studio, fornisce invece una classificazione più robusta delle specie in esame, anche nel "complicato" raggruppamento dei *Fusarium* (Das et al., 2014; Crous et al., 2021). Come limite attuale a questo approccio, deve essere tenuta in conto la disponibilità ancora limitata di WGS nei database internazionali che può restringere l'intervallo di confronto. Tuttavia, grazie al calo del prezzo del sequenziamento e al costante aumento della potenza di calcolo, il sequenziamento genomico, seguito da una adeguata analisi comparativa, sta diventando la scelta migliore per un'identificazione tassonomica precisa. Ogni sforzo compiuto per aumentare la disponibilità nei database contribuisce a colmare le lacune nella conoscenza dei funghi, soprattutto per un genere variegato come quello di *Fusarium*.

Allo stesso tempo, non è stato ritenuto opportuno tentare di assegnare un nome di specie all'isolato in oggetto, lasciandolo almeno per il momento allo stato di specie indefinita. Ciò concorda con il concetto descritto da Summerell (2019), secondo cui la rappresentazione di una nuova specie deve richiedere lo studio di un numero di ceppi con caratteristiche genetiche coerenti che deve essere sufficiente per descrivere anche la gamma di variabilità genetica all'interno della nuova specie.

Da un punto di vista strettamente fitopatologico, si tratta della prima segnalazione di un isolato di *Fusarium* riconducibile al *Fusarium tricinctum* specie complex associato alla già nota Necrosi Grigia della Nocciola (NGN). L'unico altro report di specie riconducibili al FTSC associato alla nocciola proviene dall'Iran e si riferisce a un generico deperimento della pianta (Ghasemi e Davari, 2019). La NGN è stata ripetutamente attribuita all'azione patogena di *F. lateritium* (Belisario e Santori, 2009; Santori et al., 2010; Vitale et al., 2011), con un ruolo secondario per *Alternaria* spp. Recentemente, la stessa malattia è stata segnalata per la prima volta a La Araucanía, Cile, e ancora una volta diversi funghi sono stati isolati da frutti malati: *Fusarium* sp., attribuito alla specie *F. sporotrichioides*

secondo la sequenza ITS, ma anche *Alternaria alternata*, *Diaporthe* sp., *Phomopsis* sp. e *Neofusicoccum* sp. (Duran *et al.*, 2020).

Diversi lavori scientifici hanno dimostrato ormai la complessità dei fenomeni di marciume delle nocciole che vede il simultaneo coinvolgimento di diversi agenti patogeni nell'espressione della malattia. Recentemente, Arciuolo *et al.* (2020), studiando le specie fungine associate ai marciumi delle nocciole in Turchia, hanno dimostrato che i funghi prevalenti erano *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botryosphaeria*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Pestalotiopsis*, proponendo un ruolo primario per il genere *Diaporthe*. In un altro precedente lavoro, è stato dimostrato che la specie *D. eres* è il motivo principale della comparsa di macchie brune sulla superficie esterna della nocciola e degli imbrunimenti interni del frutto (Battilani *et al.*, 2018).

Ancora, in Oregon, Pscheidt *et al.* (2018), studiando i funghi coinvolti nei marciumi delle nocciole, hanno riportato che i generi *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium*, nonché *Diaporthe rudis* sono frequentemente isolati, insieme a *F. lateritium*, identificato tramite le sequenze ITS e EF-1 α .

Tutti questi studi dimostrano inequivocabilmente che più funghi possono contemporaneamente invadere e danneggiare la nocciola generando varie espressioni di difetti esterni ed interni. Tra queste, le specie del genere *Fusarium* hanno senza dubbio un ruolo chiave in questo tipo di malattie. Resta certamente da valutare la rilevanza specifica di ciascuna di queste specie nella progressione della malattia e quali fattori ambientali influenzano l'evoluzione della malattia. Studiarne i genomi come abbiamo fatto in questo studio, oltre a far luce sulla tassonomia delle specie fungine, particolarmente significative per il genere *Fusarium*, dovrebbe consentire di identificare le caratteristiche genetiche dei patogeni coinvolti nella patogenicità, ponendo quindi le basi per la comprensione della evoluzione della malattia ed eventualmente pianificare strategie di controllo efficaci per proteggere una coltura italiana di fondamentale importanza come *C. avellana*.

8 Conclusioni

In considerazione della forte espansione che la coltivazione del nocciolo sta vivendo sia a livello nazionale che mondiale, la presente ricerca si è posta come obiettivo quello di approfondire le conoscenze riguardo alle specifiche avversità di carattere entomologico e fungino in grado di limitare la produttività dei corileti, con riferimento ad un territorio storicamente vocato per la coltura quale quello dei Monti Cimini.

Dal punto di vista entomologico, il monitoraggio delle “cimici nocciolaie” condotto con due diverse tipologie di rilevamento, il “frappage” e le trappole feromoniche, ha evidenziato, da una parte come la prima metodologia rappresenti attualmente la miglior forma di rilevamento delle specie autoctone, confermando *G. acuteangulatus* come specie maggiormente rappresentata, e dall'altra come le trappole siano state efficaci nell'evidenziare la crescita delle popolazioni e la diffusione della specie “aliena” *H. halys*, assai temibile per la sua elevata capacità riproduttiva e la forte aggressività verso le coltivazioni. Inoltre, l'osservazione dell'esistenza di precise relazioni tra l'attività trofica delle cimici, gli specifici stadi di sviluppo dei frutti in cui questa avviene e le alterazioni dei frutti conosciute come “aborto traumatico” e “cimiciato” rappresenta un importante punto di partenza nella definizione di più precise e quindi più sostenibili strategie di controllo degli eterotteri autoctoni e dell' *H. halys*, alla luce dei devastanti danni che questa specie sta causando alle produzioni corilicole italiane e mondiali.

Aspetti di carattere patologico sono stati indagati attraverso isolamenti effettuati dalle superfici esterne dell'apparato boccale pungente succhiatore delle cimici. E' stato così possibile individuare specie fungine note per essere patogeni del nocciolo, delle quali gli insetti potrebbero risultare “trasportatori” (carrier): tra questi, in particolare, è stato individuato il genere *Fusarium*. *F. lateritium* è stato ritenuto, fino ad oggi, il principale responsabile della patologia conosciuta come Necrosi Grigia del Nocciolo (NGN). A tal proposito, partendo da nocciole che presentavano chiari sintomi ascrivibili a NGN, è stato approfondito lo studio dell'intero genoma degli isolati ottenuti giungendo ad attribuirgli, nell'ambito del genere di appartenenza, un diverso inquadramento tassonomico.

I risultati derivanti dalle sperimentazioni e dalle analisi condotte nella presente ricerca ci hanno portato inoltre ad indicare la necessità di approfondire determinati aspetti legati alle criticità fitopatologiche in esame, fornendo osservazioni che potranno risultare utili ad ulteriori studi e valutazioni, anche in considerazione della progressiva estensione attesa nell'immediato futuro della

coltivazione del nocciolo che inevitabilmente interesserà terreni ed agroecosistemi meno vocati rispetto a quelli in cui fino ad oggi è rimasta circoscritta la corilicoltura.

Bibliografia

AAVV MIPAAF “Allegato tecnico Piano del settore corilicolo 2010/2012” Gruppo di lavoro: “Tecniche di produzione, ricerca e difesa” Sottogruppo: “Difesa ed Avversità”, pp 70-90;

Acebes-Doria AL, Morrison WR, Short BD, Rice KB, Bush HG, Kuhar TP, Duthie C, Leskey TC (2018) “Monitoring and biosurveillance tools for the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae).” *Insects* 9(3), e 82).

Aldrich, J. R., Khimian, A., Chen, X., & Camp, M. J. (2009). “Semiochemically based monitoring of the invasion of the brown marmorated stink bug and unexpected attraction of the native green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) in Maryland.” *Florida Entomologist*, 483-491.

AliNiasee, M. T. (1998). “Ecology and management of hazelnut pests.” *Annual Review of Entomology*, 43(1), 395-419.

Andreis, D., Anfora, G., Berti, M., Chiesa, S., Corradini, S., Eriksson, A., ... & Zapponi, L. (2019). “Cimice asiatica: biologia, diffusione e controllo in Provincia di Trento.” (No. 4). Fondazione Edmund Mach.

Angeli G., Borri G., Chiesa S. G., Chini L., Gallimbeni, L., Marchesini A., ... & Zapponi, L. (2021). “Cimici: guida al riconoscimento delle specie di interesse agrario nel Nord Italia.” Fondazione Edmund Mach.

Arciuolo R., Camardo Leggieri M., Castello G., Genova G, Spigolon N., Battilani P. (2021) “Ecologia di *Diaporthe eres*, l'agente causale dei difetti della nocciola” *PLoS One* 2021 Mar 10;16(3):e0247563

Arciuolo R., Santos C., Soares C., Castello G., Spigolon N., Chiusa G. *et al.* (2020). “Molecular characterization of *Diaporthe* species associated with hazelnut defects” *Frontier Plant Science* 11:1956.

Armenteros, J. J. A., Salvatore M., Emanuelsson O., Winther O., Heijne G. von, *et al.* (2019b). “Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning” *Life Science Alliance* vol. 2, no. 5, pp. 1-14.

Armenteros, J. J. A., Tsirigos, K. D., Sønderby C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak S., *et al.* (2019a). “SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks” *Nature Biotechnology*, Vol. 37, No. 4, 420-423

Äzman S. K., & Toros S. (1996), “Damage caused by *Phytoptus avellanae* Nal. and *Cecidophyopsis vermiformis* Nal. (Eriophyoidea: Acarina) in hazelnut” In *IV International Symposium on Hazelnut 445* (pp. 537-544).

Bariselli, M., Bugiani, R. and Maistrello, L. (2016), “Distribution and damage caused by *Halyomorpha halys* in Italy.” *EPPo Bull*, 46: 332-334.

Battilani P, Chiusa G, Arciuolo R, Somenzi M, Fontana M, Castello G, *et al.* (2018) “*Diaporthe* come causa principale dei difetti delle nocciole nella regione del Caucaso” *Fitopatologia Mediterranea*. 2018;57(2):320–33.

Batra L. R. (1966). “Ambrosia fungi: extent of specificity to ambrosia beetles”. *Science*, 153(3732), 193-195.

- Battilani P., Chiusa G., Arciuolo, R., Somenzi M., Fontana M., Castello G., *et al.* (2018). "Diaporthe as the main cause of hazelnut defects in the Caucasus region" *Phytopathologia Mediterranea* vol 57, 320–333.
- Beaver, R. A., Wilding N., Collins N., Hammond P. & Webber, J. (1989) "Insect-fungus relationships in the bark and ambrosia beetles." *Insect-fungus interactions*, 121, 143.
- Belisario A., Maccaroni A., Coramusi A. (2005) "First report of twig canker of hazelnut caused by *Fusarium lateritium* in Italy". *Plant Disease*, 89: 106.
- Belisario A., Santori A. (2016) "Approfondimenti sulla eziologia ed epidemiologia della necrosi grigia della nocciola" *Nocciolare* 2016/03 pp 183-190
- Belisario A., Santori, A. (2009) "Necrosi grigia del frutto della nocciola: una malattia fungina che causa la caduta dei frutti." *Acta Hortic.* 845, pp 501-506.
- Blaauw, B. R., Jones, V. P., & Nielsen, A. L. (2016) "Utilizing immunomarking techniques to track *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) movement and distribution within a peach orchard." *PeerJ*, 4, e1997.
- Bignami C., De Salvador R. F. & Strabbioli, G. (1999). "Aspetti agronomici e prospettive di valorizzazione della corilicoltura nel Lazio" *Rivista di frutticoltura* 11: 16-27.
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G. P., Medema, M. H., *et al.* (2021). "antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities" *Nucleic Acids Res.* 49, W29–W35
- Bolger A. M., Lohse M., and Usadel B. (2014) "Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data" *Bioinformatics* 30, 2114–2120.
- Bosco, L., Moraglio, S. T., & Tavella, L. (2018). "Halyomorpha halys, a serious threat for hazelnut in newly invaded areas." *Journal of Pest Science*, 91(2), 661-670.
- Botta R., & Valentini N. (2018). "Il nocciolo. Progettazione e coltivazione del corileto" (pp. 1-189). Edagricole–Edizioni Agricole New Business Media srl.
- Brust G.E., Rane K.K., (2011) "First report of the yeast *Eremothecium coryli* associated with Brown Marmorated Stink Bug feeding injury on tomato and apple". *Phytopathology*, 101, S22
- Bucini D. (2006). "Biologia e dinamica di *Anisandrus dispar* F. (Coleoptera, Scolytidae) e suo possibile ruolo nella diffusione dei batteri agenti causali della moria del nocciolo." *Unitus Dottorato di ricerca in protezione delle piante – XVIII° Ciclo*
- Bucini D., Balestra G. M., Pucci C., Paparatti B., Speranza S., Proietti Zolla C., & Varvaro L. (2004, June). "Bioethology of *Anisandrus dispar* F. and its possible involvement in dieback (Moria) diseases of hazelnut (*Corylus avellana* L.) plants in central Italy." In VI International Congress on Hazelnut 686 (pp. 435-444).
- Burrows M. and Wheeler D. (1994) "A Block-Sorting Lossless Data Compression Algorithm" Palo Alto, CA: Digital, Systems Research Center.

- Cecchini M., Monarca D., Colantoni A., Cavariani F., Bedini, L. De Rossi M., .. & Guerrieri, M. (2012). "Study of a Device for Reducing the Dust Concentration During Mechanized Harvesting of Hazelnuts". In *Ergonomics, Safety, and Health. International Conference of Agricultural Engineering-CIGR-AgEng 2012: Agriculture and Engineering for a Healthier Life*, Valencia, Spain, 8-12 July 2012. CIGR-EurAgEng.
- Chen Z., Erickson D. L., and Meng J. (2020) "Benchmarking hybrid assembly approaches for genomic analyses of bacterial pathogens using Illumina and Oxford Nanopore sequencing" *BMC Genomics* 21:631.
- Contarini M., Lippi M., Drais I. M., Speranza S., Mazzaglia A. (2021) "Precision Farming of Hazelnut Orchards Pantheon" Horizon 2020 Deliverable 5.4 "Pests and diseases monitoring and control"
- Costi E., Haye T., Maistrello L. (2017) "Biological parameters of the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*, in southern Europe. *Journal of Pest Science* 90: 1059-1067
- Cristofori V., (2005) "Fattori di qualità della nocciola" tesi di dottorato di ricerca XVIII ciclo Università degli studi della Toscana
- Cristofori, V., Bizzarri S., Silvestri C., & De Salvador F. R. (2014). "First evaluations on vegetative and productive performance of many hazelnut cultivars in Latium region" *Acta Horticulturae*, 1052, 91-97.
- Cristofori V., Botta R., Caboni E., Catalano L., Consalvo G., Dradi G., ... & Zuccherelli K., (2017). "Organizzazione della filiera vivaistica e certificazione delle piante". *Rivista di frutticoltura* 5: 16-22
- Cristofori V. – Rovira M. Editors (Editor-in-chief A. Islam) 2018 "Hazelnut cultivation in Europe"- (Hazelnut cultivation in Italy) European +Project scope book "Examination modern and traditional applications in hazelnut production"; pp 61-129
- Crous, P. W., Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Seifert, K. A., Schroers, H. J., Chaverri, P., *et al.* (2021). "Fusarium: more than a node or a foot-shaped basal cell" *Stud. Mycol.* 98:100116.
- Dash S., Dash H. R., Mangwani N., Chakraborty J., and Kumari S. (2014). "Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms". *Journal of microbiological methods* 2014 v.103 pp. 80-100
- Dell'Abate M. T., Benedetti A., Nardi P., Bartolomeo E. D. & Fabrizio, G. (2009). "Soil-plant relationships in the Cimini-Sabatini hazelnut district: plant nutrition and soil fertility status". *Acta Horticulturae*, (845), 391-398.
- Degradi, M. L., Tava, M. V., Kunova, D. A., Cortesi, D. P., Saracchi, P. M., and Pasquali, D. M. (2021). "Telomere to telomere genome assembly of *Fusarium musae* F31, causal agent of crown rot disease of banana". *Mol. Plant Microbe Interact.* [Epub ahead of print].
- Druzhinina I. S., Kopchinskiy A. G., and Kubicek C. P. (2006). "The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data" *Mycoscience* 47, 55–64.
- Duran P., Barra PJ., de la Luz Mora M., Morina F., Viscardi S., Meriño-Gergichevich C. (2020). "First report of fungal complex causing grey necrosis of hazelnut in Chile". *New Disease Reports* 42, 7

- Duran, P., Barra, P. J., de la Luz Mora, M., Morina, F., Viscardi, Sh, and Meriño-Gergichevich, C. (2020). "First report of fungal complex causing grey necrosis of hazelnut in Chil". *New Disease Report*. 42:7
- Dutto M., Ferracini C., Faccoli M. (2018) " Serious infestations of *Xylosandrus germanus* (Blandford, 1894) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) in chestnut plantations of North-Western Italy" *Forest@ - Journal of Silviculture and Forest Ecology*, Volume 15, Pages 112-116 (2018).
- Dvorianinova E. M., Pushkova E. N., Novakovskiy R. O., Povkhova L. V., Bolsheva N. L., Kudryavtseva L. P., *et al.* (2021) "Nanopore and illumina genome sequencing of *Fusarium oxysporum* f. sp. lini strains of different virulence" *Frontiers in Genetics* 12:662928.
- Edel-Hermann V., Gautheron N., Mounier A. and Steinberg C. (2015). "Fusarium diversity in soil using a specific molecular approach and a cultural approach." *Journal of Microbiological Methods* 111, 64–71.
- Edgar, R. C. (2004) "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." *Nucleic Acids Research* 32, 1792–1797.
- Elia M. (1964). "La "fusariosi" delle olive in Puglia". *Phytopathol. Mediterr.* 3, 34–37.
- Emms D. M., and Kelly S. (2019). "OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics". *Genome Biology* 201, 1–14.
- Erdogan, V., & Mehlenbacher, S. A. (2000)."Phylogenetic relationships of *Corylus* species (Betulaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS region and chloroplast matK gene sequences." *Systematic Botany*, 25(4), 727-737.
- Eynard I., and Paglietta R. (1962) "Ricerche sull'apparato radicale del nocciolo. Primo contributo" *Atti Conv, Nocciolo Alba*
- Faino, L., Seidl, M. F., Datema, E., Van Den Berg, G. C. M., Janssen, A., Wittenberg, A. H. J., *et al.* (2015). "Single-molecule real-time sequencing combined with optical mapping yields completely finished fungal genome". *mBio* 6:e00936-15.
- Fan S., Wang Q., Dai J., Jiang J., Hu X., and Subbarao K. V. (2021) "The whole genome sequence of *Fusarium redolens* strain YPO4, a pathogen that causes root rot of american ginseng." *Phytopathology* doi: 10.1094/PHYTO-03-21-0084-A [Epub ahead of print].
- Farinelli D. (2017) "Scelte tecniche ed economiche nella coltivazione del nocciolo in Umbria" presentazione seminario giugno 2017 Rocca di Casalina Casalina di Deruta (Cesar-Fondazione per l'istruzione agraria-DSA3 con il patrocinio di Soc. Italiana di Ortofloricoltura)
- Fideghelli C. "Atlante dei fruttiferi autoctoni italiani." Crea—Centro di frutticoltura: Roma, Italy (2016).
- Fraeyman S., Croubels S., Devreese M., and Antonissen G. (2017). "Emerging *Fusarium* and *alternaria* mycotoxins: occurrence, toxicity and toxicokinetics." *Toxins* 9:228.
- Ghasemi S., and Davari M. (2019) "Report of some *Fusarium* species associated with hazelnut decline in Ardabil," in *Proceedings of the 4th Iranian Mycological. Congress*, 26–28 Aug., Sari Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran.

- Goodwin S., McPherson J. D., and McCombie W. R. (2016). "Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies." *Nature Reviews Genetics*. 17, 333–351.
- Graham G. C., and Henry R. J. (1997). "Preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis," in *Fingerprinting Methods Based on Arbitrarily Primed PCR*, ed. Springer Lab Manual (Berlin: Springer Berlin Heidelberg), 29–34.
- Griseri G. – Sez. Corilicola Creso (2013) "La coltivazione del nocciolo" manuale pratico Confagricoltura Alessandria 2013
- Guerrero J. A. & Pérez S. M. (2013). "First report of shoot blight and canker caused by *Diplodia coryli* in hazelnut trees in Chile." *Plant Disease*, 97(1), 144-144)
- Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., and Tesler G. (2013). "QUAST: quality assessment tool for genome assemblies." *Bioinformatics* 29, 1072–1075.
- Hamidi R., Calvy M., Valentie E, Driss L., Guignet J., Thomas M. & Tavella L (2022) "Symptoms resulting from the feeding of true bugs on growing hazelnuts". *Entomologia Experimentalis et Applicata* 00: 1-11.
- Hedstrom CS, Shearer PW, Miller JC & Walton VM (2014) "The effects of kernel feeding by *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) on commercial hazelnuts." *Journal of Economic Entomology* 107: 1858–1865.
- Holt C., and Yandell M. (2011) "MAKER2: an annotation pipeline and genome-database management tool for second-generation genome projects". *BMC Bioinform.* 12:491.
- Moraglio S., Guidone L., Tavella L., Valentini N. and Me G. (2009). "Susceptibility of hazelnut to the attacks of the nut weevil and other pests." *Acta Hortic.* 845, 445-450
- Joshi N., and Fass J. (2011). "Sickle: A Sliding-Window, Adaptive, Quality-Based Trimming Tool for FastQ Files (Version 1.33)." Available online at: <https://github.com/najoshi/sickle> (accessed September 30, 2021).
- Khrimian, Ashot, *et al.* "Discovery of the aggregation pheromone of the brown marmorated stink bug (*Halyomorpha halys*) through the creation of stereoisomeric libraries of 1-bisabolen-3-ols." *Journal of natural products* 77.7 (2014): 1708-1717.
- Khrimian, Ashot, *et al.* "Field trapping of the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*, with geometric isomers of methyl 2, 4, 6-decatrienoate." *Journal of agricultural and food chemistry* 56.1 (2008): 197-203.
- Kim H.-S., Lohmar J. M., Busman M., Brown D. W., Naumann T. A., Divon H. H., *et al.* (2020). "Identification and distribution of gene clusters required for synthesis of sphingolipid metabolism inhibitors in diverse species of the filamentous fungus *Fusarium*." *BMC Genomics* 21:712.
- Koren S., Walenz B. P., Berlin K., Miller J. R., Bergman N. H., and Phillippy A. M. (2017). "Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k -mer weighting and repeat separation." *Genome Research*. 27, 722–736.

- Krasnov G. S., Pushkova E. N., Novakovskiy R. O., Kudryavtseva L. P., Rozhmina T. A., Dvorianinova E. M., *et al.* (2020). "High-quality genome assembly of *Fusarium oxysporum* f. sp. lini." *Frontiers in Genetics* 11:959.
- Krogh A., Larsson B., Von Heijne G., and Sonnhammer, E. L. (2001) "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." *Journal of Molecular biology* 305, 567–580.
- Laing C., Buchanan C., Taboada E. N., Zhang Y., Kropinski A., Villegas A., *et al.* (2010) "Pan-genome sequence analysis using Panseq: an online tool for the rapid analysis of core and accessory genomic regions." *BMC Bioinformatics* 11:461.
- Lamichhane J.R., Fabi A., Varvaro L. (2014) "Summer Heat and Low Soil Organic Matter Influence Severity of Hazelnut *Cytospora* Canker" *Ecology and Epidemiology Phyto* 05-13-0136- Vol. 104, No. 4, 2014 pp 387-395
- Lawrence D.P., Travadon R., Baumgartner K. (2015) "Diversità delle specie di Diaporthe associate ai cancri del legno delle colture di frutta e noci nel nord della California". *Micologia*. 2015;107(5):926–40. Epub 2015/08/05. 10.3852/14-353.
- Lee D-H, Short BD, Joseph SV *et al.* (2013) Review of the biology, ecology, and management of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) in China, Japan, and the Republic of Korea. *Environ Entomol* 42:627–641
- Leslie J. F., and Summerell B. A. (2006). "The *Fusarium* Laboratory Manual." Hoboken, NJ: Blackwell Publishing Ltd.
- Leskey, T. C., Agnello, A., Bergh, J. C., Dively, G. P., Hamilton, G. C., Jentsch, P., ... & Zaman, F. (2015). "Attraction of the invasive *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) to traps baited with semiochemical stimuli across the United States." *Environmental entomology*, 44(3), 746-756.
- Leskey T. C., Short B. D., Butler B. R., & Wright, S. E. (2012). "Impact of the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål), in mid-Atlantic tree fruit orchards in the United States: case studies of commercial management." *Psyche*, 2012 535062
- Li H. (2016). "Minimap and miniasm: fast mapping and de novo assembly for noisy long sequences." *Bioinformatics* 32, 2103–2110.
- Li H. (2018). "Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences." *Bioinformatics* 34, 3094–3100.
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., *et al.* (2009) "The Sequence Alignment/Map format and SAMtools." *Bioinformatics* 25, 2078–2079.
- Loman N. J., Quick J. and Simpson J. T. (2015) "A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data". *Nature Methods* 12, 733–735.
- Lombard V., Golaconda Ramulu H., Drula E., Coutinho P. M., and Henrissat B. (2014). "The carbohydrate-active enzymes database (CAZy)" in 2013. *Nucleic Acids Research* 42, D490–D495.
- Ma L.-J., van der Does H. C., Borkovich K. A., Coleman J. J., Daboussi M.-J., Di Pietro A., *et al.* (2010) "Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*." *Nature* 464, 367–373.

- Mazzone P. & Ragozzino A. (2006). "Le principali avversità del nocciolo in Campania". *Petria*, 16(1), 19-30.
- McPherson, J. E. (Ed.). (2018). "Invasive stink bugs and related species (Pentatomoidea): biology, higher systematics, semiochemistry, and management." CRC Press.
- Medrano E.G, Esquivel J., Bell A., Greene J., Roberts P. Bacheler, J., Marois, J., Wright D., Nichols R., Lopez, (2009) "Potential for *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) to Transmit Bacterial and Fungal Pathogens into Cotton Bolls" *Current Microbiology* Volume 59, Issue 4, October 2009, Pages 405-412
- Memoli A., Albanese D., Esti M., Lombardelli C., Crescitelli A., Di Matteo M., Benucci I., (2017) "Effect of bug damage and mold contamination on fatty acids and sterols of hazelnut oil" *European Food Research and Technology* volume 243, pages 651–658 (2017)
- Million C. R., Wijeratne S., Cassone B. J., Lee S., Rouf Mian M. A., McHale L. K., *et al.* (2019). "Hybrid genome assembly of a major quantitative disease resistance locus in soybean toward *Fusarium graminearum*." *Plant Genome* 12:180102.
- Mitchell P. L. (2004) "Heteroptera as Vectors of Plant Pathogens" *Forum Neotropical Entomology* 33(5):519-545 (2004)
- Möller M., and Stukenbrock E. H. (2017) "Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens." *Nature Reviews Microbiology* 15, 756–771.
- Moraldi M. (2021) "Il Nocciolo. Impianto e gestione della coltivazione da frutto" Centro stampa Giunta Regionale Regione Umbria.
- Morra G. (1993) "Dinamica della popolazione di Eterotterofauna (Rhyncota, Heteroptera) di un nocciolo del Viterbese e analisi del cimiciato: sperimentazione condotta nel biennio 1992-1993" Tesi di laurea Unitus
- Morrison III, W. R., Cullum, J. P., & Leskey, T. C. (2015). "Evaluation of trap designs and deployment strategies for capturing *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae)." *Journal of economic entomology*, 108(4), 1683-1692.
- Nocciolare 2019 "Prima segnalazione in Piemonte del fungo *E. Coryli* (*Nematospora Coryli*) agente del Kernel dry root delle nocciole (nocciolare.it)
- Nurk S., Bankevich A., Antipov D., Gurevich A., Korobeynikov A., Lapidus A., *et al.* (2013). "Assembling genomes and mini-metagenomes from highly chimeric reads," in *Lecture Notes in Computer Science* (including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics, eds M. Deng, R. Jiang, F. Sun, and X. Zhang (Berlin: Springer), 158–170.
- O'Donnell K., Rooney A. P., Proctor R. H., Brown D. W., McCormick S. P., Ward T. J., *et al.* (2013). "Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria." *Fungal Genetics and Biology* 52, 20–31.
- O'Donnell K., Sutton D. A., Rinaldi M. G., Sarver B. A. J., and Balajee S. A. (2010). "Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections." *Journal of Clinical Microbiology* 48, 3708–3718.

- O'Donnell K., Ward T. J., Geiser D. M., Kistler H. C., and Aoki, T. (2004). "Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade." *Fungal Genetics and Biology* 41, 600–623.
- O'Donnell K., Ward T. J., Robert V. A. R. G., Crous P. W., Geiser D. M. and Kang, S. (2015) "DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions." *Phytoparasitica* 43, 583–595.
- Park B., Park J., Cheong K.-C., Choi J., Jung K., Kim D., *et al.* (2010). "Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics, and knowledge sharing." *Nucleic Acids Research*. 39, D640–D646.
- Park D. M., del Mar Jiménez-Gasco M., Kang S., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T. J., *et al.* (2004) "FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*." *European Journal of Plant Pathology* 110, 473–479.
- Pezzolla A. (2018) "Palomena prasina L., innovazioni sulle vere interazioni con l'ospite *Corylus avellana* L. - il caso studio dell'area di Tarragona (Catalogna, Spagna)" Tesi di laurea Unitus 2018.
- Plissonneau C., Stürchler A. and Croll D. (2016) "The evolution of orphan regions in genomes of a fungal pathogen of wheat." *mBio* 7:e01231-16.
- Plutino M. (2008). "Struttura e dinamica evolutiva dei boschi in stato di abbandono gestionale: il caso delle fustaie di cerro nell'Alto Lazio." tesi dottorato di ricerca XIX ciclo Università Degli Studi Della Tuscia Dipartimento di Scienze dell'ambiente forestale e delle sue risorse
- Ponts N., Gautier C., Gouzy J., Pinson-Gadais L., Foulongne-Oriol M., Ducos C., *et al.* (2020). "Evolution of *Fusarium tricinctum* and *Fusarium avenaceum* mitochondrial genomes is driven by mobility of introns and of a new type of palindromic microsatellite repeats." *BMC Genomics* 21:358.
- Ponts N., Richard-Forget F., Zhang H., Barroso G., and Zhao C. (2018) "Genome sequence of the emerging mycotoxin-producing filamentous fungus *Fusarium tricinctum* strain INRA104." *Genome Announcements* 6, e509–e518.
- Pritchard L., Glover R. H., Humphris S., Elphinstone J. G. and Toth I. K. (2016). "Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens." *Analytical Methods* 8, 12–24
- Pscheidt J. W., Heckert S., Wiseman M., and Jones L. (2018). "Fungi associated with and influence of moisture on development of kernel mold of hazelnut." *Plant Disease* 103, 922–928.
- Pscheidt J. W., Heckert S., Wiseman M., Jones L. (2019) "Fungi Associated with and Influence of Moisture on Development of Kernel Mold of Hazelnut" *Plant Disease* 2019 103:922-928
- Raja H. A., Miller A. N., Pearce C. J., and Oberlies N. H. (2017) "Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community." *Journal of Natural Products* 80, 756–770.
- Regione Piemonte – Agrion (2020) "Nuovo oidio su nocciolo" ottobre 2020
- Romero, A., Tous, J. and Martí, E. (2009). White spots in hazelnut kernel: symptoms, causes and quality loss. *Acta Hort.* 845, 607-612)

- Romisondo P., G. Me, F. Limongelli and L. Radicati. (1978): "Indagini Sull'impollinazione Del Nocciuolo Tonda Gentile Delle Langhe." *Rivista Di Ortoflorofruitticoltura Italiana* 62, no. 6 : 662–68.
- Roversi A. (2002). "Esigenze nutrizionali e concimazione del nocciuolo". *Atti Il Convegno Nazionale sul Nocciuolo, Giffoni Valle Piana*, 5, 28-42.
- Santori, A., Vitale, S., Luongo, L., and Belisario, A. (2010). "First report of *Fusarium lateritium* as the agent of nut gray necrosis on hazelnut in Italy." *Plant Disease* . 94, 484–484.
- Saud Z., Kortsinoglou A. M., Kouvelis V. N., and Butt T. M. (2021) "Telomere length de novo assembly of all 7 chromosomes and mitogenome sequencing of the model entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, by means of a novel assembly pipeline." *BMC Genomics* 22:22.
- Scarpari M., Vitale S., Di Giambattista G., Luongo L., De Gregorio T., Schreiber G., Petrucci M., Belisario M., Voglmay H., (2020) "*Didymella corylicola* sp. nov., a new fungus associated with hazelnut fruit development in Italy" *Mycological Progress* vol. 19, pages 317–328
- Scarpari M., Di Giambattista G., Vitale S., Luongo L., Belisario A., De Gregorio T., & Schreiber G. (2018). "First report of kernel dry rot caused by *Eremothecium coryli* on hazelnut in northwestern Italy." *Plant Disease*, 102(12), 2652-2652.
- Scortichini M., 1992."Moria del nocciuolo: grave attacco di *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae*." *L'Informatore Agrario*, XLVIII (49), 60-63.
- Scortichini M. (2002)."Bacterial canker and decline of European hazelnut." *Plant Disease*, 86(7), 704-709.
- Scortichini M. (2006) "Le principali avversità del nocciuolo nel Lazio" *PETRIA* 16 (1), 31-44 (2006)
- Scortichini M., Liguori R., Nobile M., Moretti D., Valentini B., Egitto M., Leonelli A., (2000). "Moria del nocciuolo: un triennio di prove di campo con acibenzolar-S-methyl, induttore di resistenza sistemica acquisita". *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 379-384.
- Scortichini M., Rossi M. P., Lazzari M., Valentini B., Testa F., Micheli R., (1994). "Moria del nocciuolo nel Viterbese: indagine sulla presenza di *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae*." *Informatore Fitopatologico*, XLV (1), 58-60.
- Scortichini M., Sbaraglia M., Di Prospero P., Angelucci L., Petricca P., Tromboni R., Mazzuca T., Lucci E., Moretti D., Cirica B., Trucca L., (2001). "Moria del nocciuolo nel Viterbese e terreni acidi". *L'Informatore Agrario*, LVII (21), 85-88.
- Servadei A, Zangheri S, Masutti L. (1972) "Entomologia generale ed applicata." CEDAM: Padova. ; 320–321.
- Silvestri C., Cristofori V., Ceccarelli M., Caceres M. E., Escribà-Lacuesta J. & Rugini E. (2016). "Adventitious shoot organogenesis from leaf and petiole explants of European hazelnut." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126(1), 59-65.
- Simão F. A., Waterhouse R. M., Ioannidis P., Kriventseva E. V. and Zdobnov, E. M. (2015) "BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs." *Bioinformatics* 31, 3210–3212.

- Singldinger B., Dunkel A., Bahmann D., Bahmann C., Kadow D., Bisping B., Hofmann T. (2018). "New taste-active 3-(O- β -d-glucosyl)-2-oxoindole-3-acetic acids and diarylheptanoids in cimiciato-infected hazelnuts." *Agric. Food. Chem.*, 66: 4660-4673
- Singldinger B., Dunkel A., Hofmann T. (2017). "The cyclic diarylheptanoid Asadanin as the main contributor to the bitter off-taste in hazelnuts (*Corylus avellana* L.)". *J. Agric. Food. Chem.*, 65: 1677-1683
- Sonnati, C., Molinari, F. and Ughini, V. (2009). "Seven years of observation of the presence of different plant bug species in the hazelnut orchards of cultivar 'Tonda Gentile delle Langhe' in piedmont". *Acta Hort.* 845, 543-548
- Stamatakis A. (2014) "RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies." *Bioinformatics* 30, 1312–1313.
- Summerell B. A. (2019) "Resolving *Fusarium*: current status of the genus." *Annual Review of Phytopathology*. 57, 323–339.
- Tavella L. (2011) "Le cimici nocciolaie tecniche di riconoscimento monitoraggio e mezzi di controllo" *Ecostenibilità della coltivazione del nocciolo in Campania* seminario 24/11/2011
- Tavella L., Arzone A., Miaja M.L., Sonnati C. (2001). "Influence of bug (heteroptera, coreidae and pentatomidae) feeding activity on hazelnut in northwestern italy". *Acta Hort.* 556, 461-468
- Tavella L., Arzone A., Sargiotto C. and Sonnati C. (1996) "COREIDAE AND PENTATOMIDAE HARMFUL TO HAZELNUTS IN NORTHERN ITALY (RHYNCHOTA HETEROPTERA)". *Acta Hort.* 445, 503-510
- Tavella L., Giannetti G. (2006) "Le avversità del nocciolo in Italia - Le principali avversità del nocciolo in Piemonte" *PETRIA* 16 (1), pp 45-58
- Tavella L., Migliardi M., Sonnati C., Miaja M.L. (2003) "Effetti dell'attività trofica delle cimici in funzione al periodo di attacco" *Informatore fitopatologico* 53 (11): 47-51
- Tombesi A. (1985). "Il nocciolo: manuale pratico." Reda
- Tombesi A. (1991) "Nocciolo." *Frutticoltura speciale*. Reda, Roma. Pp. 614-631
- Tombesi S. and Farinelli D. (2017). "Modelling of pruning technique effects on branch architecture and subsequent year shoot flowering in hazelnut." *Acta Hort.* 1160, 141-144
- Tremblay E. (2003) "Entomologia applicata." Liguori Editore: Napoli.
- Tuncer C., Saruhan I., Akça I. 2009. "Chemical control of true bugs (Heteroptera: Pentatomidae Acanthosomatidae and Coreidae) to prevent kernel damage in hazelnut orchards of Turkey." *Acta. Hort.*, 845(75): 487-494.
- Tuncer C., Saruhan I., Akça I. 2005. "The insect pest problem affecting hazelnut kernel quality in Turkey." *Acta. Hort.*, 686: 367-375

- Tuncer, C., Saruhan, I., & Akca, I. (2014). "Seasonal occurrence and species composition of true bugs in hazelnut orchards." *Acta horticulturae* 1052: 263-268.
- Turco S., Grottoli A., Drajs M. I., De Spirito C., Faino L., Reverberi M., Cristofori V. and Mazzaglia A. (2021) "Draft Genome Sequence of a New Fusarium Isolate Belonging to Fusarium tricinctum Species Complex Collected From Hazelnut in Central Italy" *Frontiers in Plant Science* 12: 788584
- Urban M., Cuzick A., Seager J., Wood V., Rutherford K., Venkatesh, S. Y., *et al.* (2019) "PHI-base: the pathogen–host interactions database." *Nucleic Acids Research* 48, D613–D620.
- van Dijk E. L., Jaszczyszyn Y., Naquin D. and Thermes, C. (2018). "The third revolution in sequencing technology". *Trends in Genetics* 34, 666–681.
- Varvaro L., Fabi A. (2013) "Criteri di lotta integrata alle malattie del nocciolo nell'ambito della progettazione di recupero del lago di Vico" *Corylus &Co* 1.2013, pp 11-17;
- Varvaro L., Fabi A., Magro P., Paparatti B. (2011) "Aspetti fitosanitari della corilicoltura nel Viterbese" *Atti del convegno "Corilicoltura viterbese: dalla realtà locale alla dinamica europea"* *Corylus &Co* 1.2011 pp 21-37;
- Vaser R., Sović I., Nagarajan N. and Šikić M. (2017) "Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads." *Genome Research* 27, 737–746.
- Vitale S., Santori A., Wajnberg E., Castagnone-Sereno P., Luongo L. and Belisario, A. (2011)." Morphological and molecular analysis of *Fusarium lateritium*, the cause of gray necrosis of hazelnut fruit in Italy." *Phytopathology* 101, 679–686.
- Vitale S., Scarpari M, Luongo L, Galli M., Belisario A., Schreiber G., Petrucci M., Fontaniello G., De Gregorio T., Castello G. (2020) "Nocciola avariata, un fenomeno in aumento che abbatte la qualità" *Rivista di Frutticoltura e orto floricoltura* 18 maggio 2020 (<https://rivistafrutticoltura.edagricole.it/post-raccolta/nocciola-avariata-un-fenomeno-in-aumento-che-abbatte-la-qualita/>)
- Viggiani G., Mazzone P. 1976. "Osservazioni sugli Eterotteri dannosi alle nocciole in Campania." *Boll. Lab. Ent. Arg. Portici*, XXXIII (1976): 241-258.
- Voglmayr H., Zankl T., Krisai-Greihuber I., Kirisitis T., (2020) First report of *Erysiphe corylacearum* on *Corylus avellana* an *C. Colurna* in Austria *New Disease Reports* (2020) 42,14
- Walker B. J., Abeel T., Shea T., Priest M., Abouelliel A., Sakthikumar S. *et al.* (2014) "Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement." *PLoS One* 9:e112963.
- White T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990) "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics," in *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications*, eds M. A. I. D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (New York, NY: Academic Press), 315–322.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. (1990) "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics". In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editor."PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" New York: Academic Press Inc;. pp. 315–322.

Wollenweber H. (1931) "Fusarium on Walnut". Mitt. Deutsch. Dendrol. Gesellsch., XLIII (Jahrbuch). Berlin: Deutsche Dendrologische Gesellschaft.

Xingxing P., Khan R. A. A., Yan L., Yuhong Y., Bingyan X., Zhenchuan M. *et al.* (2021). "Draft genome resource of *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici*, the infectious agent of pepper Fusarium wilt." *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 34, 715–717.

Zimin A. V., Marçais G., Puiu D., Roberts M., Salzberg S. L., and Yorke J. A. (2013). "The MaSuRCA genome assembler." *Bioinformatics* 29, 2669–2677.

Sitografia

<https://www.agraria.org/entomologia-agraria/cimice-del-nocciolo.htm> Atlante di entomologia agraria

<https://www.agraria.org/entomologia-agraria/cimice-verde.htm>

<http://www.agricoltura.regione.lazio.it/sfr/94/difesa-integrata-volontaria/disciplinare>

<https://www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/materiale-didattico/619850 ppt>

<http://www.confagricolturalessandria.it/documenti/cimice-asiatica/Guida-al-riconoscimento-delle-cimici-del-nocciolo>.

<http://www.genopomii.unina.it/genohort/files/insetti%20vettori.pdf> (Insetti vettori di agenti patogeni vegetali)

<https://www.nocciolare.it/wp-content/uploads/2016/03/Creso-06>

<https://www.reterurale.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/22398>

RINGRAZIAMENTI

Intraprendere un corso di dottorato di ricerca all'età di 50 anni, a più di 20 anni di distanza dalla laurea, dopo esperienze lavorative ben lontane dal mondo accademico, ha rappresentato per me una sfida, una "montagna da scalare". I devastanti eventi che sono avvenuti nel corso del triennio, con la loro drammaticità, hanno inoltre cambiato, più o meno consapevolmente, ognuno di noi.

Giunto alla fine di questo impegnativo periodo di studi desidero ringraziare "in primis" la Prof.ssa R. Bernini, che sapientemente dirige le attività del dottorato, il Prof. S. Speranza, che mi ha dato questa straordinaria opportunità, ed il Prof. A. Mazzaglia, per la sua sempre cortese disponibilità; con esperienza e professionalità hanno guidato la mia ricerca e solo grazie al loro sostegno sono arrivato alla conclusione di questo percorso.

I miei ringraziamenti vanno inoltre, ed in particolare:

alla Prof.ssa Guglielmino, nei nostri incontri ho potuto riconoscere in lei i caratteri di una docente di rara sensibilità e cultura;

al dott. M. Contarini, con il quale ho potuto lavorare "spalla a spalla", e che, con il suo esempio, mi ha "ricordato" i compiti del ricercatore, aiutandomi ad affrontare e risolvere le difficoltà quotidiane che si presentavano;

alla dott.ssa I. M. Drais, grazie ai suoi insegnamenti sono riuscito a non far "saltare in aria il laboratorio" (ipotesi, dopo tanti anni, assai più che probabile), a lei vanno i miei migliori auguri affinché possa raggiungere i successi professionali e personali che merita, (possa il suo futuro essere così brillante come è scritto nel nome che porta);

al dott. L. Rossini e alla dott.ssa S. Turco per la pazienza, gli ottimi consigli e il tempo che mi hanno dedicato;

a tutte gli amici che ho avuto modo di conoscere (Riccardo, Chiara, Federica, Dania, Edoardo e Mariangela...);

da ognuno ho avuto modo di apprendere qualcosa di importante, a tutti auguro il raggiungimento dei propri obiettivi.

Grazie, naturalmente, a Roberto, che sopporta un collega per lo più assente, ed ai miei amici "di sempre".

Un ultimo pensiero lo dedico alla mia famiglia: a chi non è più con me, ma che con il suo insegnamento segna il mio vivere quotidiano, ed a mio figlio Francesco, nei suoi occhi di adolescente rivedo anni trascorsi, a lui auguro un futuro pieno di soddisfazioni e, soprattutto, di serenità.

Viterbo, maggio 2022