









PROGETTO DI RICERCA NOCCIOIA Dualità

REALIZZATO CON IL CONTRIBUTO DI





















PROGETTO "Nocciola di Qualità"

INTRODUZIONE

Dal tavolo tecnico che si è riunito il 23 dicembre 2020 è emerso chiaramente come le nocciole prodotte in Piemonte della varietà Tonda Gentile rappresentino un'eccellenza produttiva da valorizzare al meglio, a tutela del territorio piemontese e della comunità agricola che lo abita.

Le caratteristiche di resa, pelabilità e, più in generale, di tipo organolettico tipiche della Tonda Gentile ne fanno una delle migliori varietà al mondo.

La Tonda Gentile, tuttavia, risulta meno produttiva di altre cultivar ed è caratterizzata da una spiccata tendenza all'alternanza di produzione. È del tutto evidente come questo aspetto possa rappresentare una criticità rilevante nel momento in cui si debbano garantire quantità costanti nel tempo all'industria di trasformazione.

Negli ultimi anni, inoltre, la diffusione di nuove avversità, quali la cimice asiatica *Halyomorpha halys*, ed il verificarsi sempre più frequente di annate climaticamente anomale hanno determinato un aumento delle alterazioni a carico dei frutti ed un peggioramento del livello qualitativo di alcune partite.

Il Tavolo tecnico ha quindi condiviso l'assoluta necessità di porre rimedio alle problematiche evidenziate consapevoli che alcuni importanti risultati sono già stati raggiunti grazie alla realizzazione di alcuni progetti che hanno visto collaborare attivamente la Regione Piemonte, l'Università di Torino, la Fondazione Agrion, le Organizzazioni di produttori, le Organizzazioni professionali, Unioncamere Piemonte, la Camera di Commercio di Cuneo, la Fondazione CRC, la Fondazione CRT ed il Gruppo "Ferrero HCo".

Il tavolo tecnico ha indicato come attività prioritarie quelle relative alla soluzione delle criticità derivanti dai danni da cimice, dall'avariato sui frutti e dalle problematiche che caratterizzano la cascola pre-raccolta.

Nel presente progetto, con respiro quadriennale 2021-2024, ci si propone di verificare, approfondire e validare:

- le diverse tipologie di difesa adottabili nei confronti di *H. halys*, allo scopo di sviluppare strategie di controllo ecosostenibili ed ecocompatibili per la salvaguardia delle produzioni agricole piemontesi e delle molteplici filiere ad esse collegate;

- i fattori predisponenti l'alterazione dei frutti riferibili all'avariato in pre e postraccolta e la contaminazione da micotossine, mediante il monitoraggio di fattori biotici e abiotici e le loro correlazioni;
- le dinamiche della cascola preraccolta, criticità multifattoriale con importante incidenza sulla produttività.

Per i primi tre anni, sono state individuate e dettagliate le attività e i rispettivi budget; per il 2024, il dettaglio delle voci di spesa sarà definito sulla base dei risultati raggiunti nelle annualità precedenti.

In Piemonte si è attivato un **gruppo di lavoro** tecnico operativo composto da Regione Piemonte - Settore Fitosanitario e Servizi Tecnico-Scientifici (SFR), Agrion - Fondazione per la ricerca, l'innovazione e lo sviluppo tecnologico dell'agricoltura piemontese e DISAFA e AGROINNOVA - Università di Torino.

COORDINAMENTO (Fondazione Agrion)

La Regione Piemonte ha incaricato Fondazione Agrion di coordinare il gruppo di lavoro per le attività indicate come priorità dalla filiera. Queste sono confluite in tre sottoprogetti in cui i diversi partner del gruppo di lavoro hanno dettagliato, nei rispettivi WP, le attività di competenza.

SOTTOPROGETTO 1: "CIMICE ASIATICA: MONITORAGGIO, AZIONI DI CONTENIMENTO E LOTTA BIOLOGICA"

WP 1.1 MONITORAGGIO REGIONALE (Agrion)

Verrà costituita, presso Agrion, una rete di monitoraggio sul territorio che coinvolga i tecnici di tutti i settori produttivi in modo da conoscere in tempo reale la situazione relativa all'insediamento di *H. halys* nelle zone di maggior presenza e agli spostamenti sul territorio regionale, al fine di concordare, con i tecnici delle Associazioni di categoria, Organizzazioni dei produttori, ecc. durante i coordinamenti settimanali (corilicolo, frutticolo, orticolo) tenuti da Agrion, le strategie d'intervento da adottare nel corso della stagione.

Nello specifico, sono previste le seguenti attività:

- suddivisione del territorio piemontese in macroaree;
- individuazione di siti caratterizzati da presenza di H. halys;
- posizionamento delle trappole di monitoraggio nei siti individuati;
- controllo settimanale delle trappole in campo;
- rilievi attivi settimanali attraverso ispezioni visive e/o *frappage* della reale presenza dell'insetto;
- comunicazione tempestiva dei dati attraverso i coordinamenti settimanali;
- analisi ed elaborazione dati e creazione di mappe di rischio.

Attività fattibili per l'anno 2021 (DISAFA-Entomologia)

WP 1.2 VALUTAZIONE DELL'IMPATTO DELLA CIMICE ASIATICA SULLA CASCOLA PRE-RACCOLTA

- rilevamento quali-quantitativo della cascola in vari siti distribuiti nel comprensorio corilicolo piemontese;
- correlazione dei dati relativi all'andamento delle popolazioni di cimice raccolti nel monitoraggio regionale (WP1.1) con l'entità di cascola accertata in quei siti.

WP 1.3 VERIFICA DELL'IMPATTO DEL CONTROLLO SIMBIOTICO SULLE CIMICI AUTOCTONE

PROVE DI LABORATORIO:

- raccolta di adulti di diverse specie di cimici autoctone per l'ottenimento di ovature;
- caratterizzazione molecolare dei simbionti specifici per ciascuna specie ospite raccolta. Studio della modalità di trasmissione verticale del simbionte primario nel coreide Gonocerus acuteangulatus.

WP 1.4 STUDIO DELL'INTERAZIONE TRA LE SOSTANZE BATTERICIDE E I LIMITATORI NATURALI DEI FITOFAGI IN CORILETO, INCLUSI I PARASSITOIDI OOFAGI RILASCIATI

- valutazione in laboratorio dell'effetto dell'applicazione di diversi prodotti ad azione battericida supredatori;
- valutazione in laboratorio dell'interferenza dei prodotti utilizzati sull'attrazione dell'ovatura di Halyomorpha halys nei confronti dei parassitoidi oofagi, attraverso saggi comportamentali- biologici.

Attività 2022/2024

WP 1.2 VALUTAZIONE DELL'IMPATTO DELLA CIMICE ASIATICA SULLA CASCOLA PRE-RACCOLTA (DISAFA)

È noto che la cascola pre-raccolta è causata da molteplici fattori. Tra questi anche i fitofagi, quali cimici e balanino, possono contribuire alla cascola in relazione al periodo di attacco. In passato in letteratura era riportato l'aborto o vuoto traumatico come effetto dalle punture delle cimici presto nella stagione. Più recentemente sono stati effettuati studi che hanno accertato il ruolo svolto dalle cimici sulla cascola in Francia e Oregon su varietà locali più tardive rispetto alla Tonda Gentile delle Langhe (TGL). Pertanto, per definire misure di contenimento adeguate merita indagare

quanto, e soprattutto in quale periodo, la cimice asiatica possa contribuire al fenomeno della cascola molto aumentato su TGL in Piemonte negli ultimi anni. Allo scopo saranno svolte le seguenti attività:

- monitoraggio della cimice asiatica a partire dalla fioritura in corileti interessati dal fenomeno della cascola negli anni precedenti;
- contestualmente monitoraggio dello stadio fenologico del nocciolo al fine di correlarlo alla presenza della cimice nei corileti;
- prove mediante isolamento in periodi successivi della cimice su rami di nocciolo a partire da comparsa dei frutticini a formazione e inizio accrescimento dei semi;
- rilevamento della cascola e nei corileti oggetto del monitoraggio e nelle prove mediante isolamento della cimice;
- correlazione dei dati relativi all'andamento delle popolazioni di cimice raccolti nel monitoraggio regionale (WP1.1) con l'entità di cascola accertata in quei siti.

WP 1.3 VERIFICA DELL'IMPATTO DEL CONTROLLO SIMBIOTICO SULLE CIMICI AUTOCTONE (DISAFA)

L'applicazione del controllo simbiotico mediante l'uso di fertilizzanti ad attività battericida, già rivelatasi efficace sulle ovature di *H. halys*, sarà valutata sulle specie di cimici autoctone comunemente rinvenute in corileto, appartenenti alla famiglia Pentatomidae (*Palomena prasina*, *Nezara viridula*, *Rhaphigaster nebulosa* e altre specie) e Coreidae (*Gonocerus acuteangulatus*). Le ricerche comprenderanno attività di laboratorio, volte a esaminare l'effetto dell'applicazione dei fertilizzanti ad attività battericida sull'eliminazione dei simbionti di ciascuna specie e sulla sopravvivenza delle neonate, e di campo, volte a valutare l'effetto dei trattamenti sulla produzione. Nello specifico, saranno svolte le seguenti attività:

PROVE DI LABORATORIO:

- raccolta di adulti di diverse specie di cimici autoctone per l'ottenimento di ovature;
- caratterizzazione molecolare dei simbionti specifici per ciascuna specie ospite raccolta. Studio della modalità di trasmissione verticale del simbionte primario nel coreide G. acuteangulatus;
- trattamento delle ovature con fertilizzanti ad azione battericida, verifica della mortalità neanidale e diagnosi molecolare per valutare l'eliminazione dei simbionti.

PROVE DI CAMPO:

- verifica dei corileti (individuati da AGRION) e definizione delle parcelle sperimentali;
- rilevamento della presenza di adulti e ovature di cimici autoctone nelle parcelle individuate per pianificare i trattamenti;

- coordinamento dell'esecuzione dei trattamenti operata da AGRION o dall'azienda;
- rilevamento dei danni.

WP 1.4 STUDIO DELL'INTERAZIONE TRA LE SOSTANZE BATTERICIDE E I LIMITATORI NATURALI DEI FITOFAGI IN CORILETO, INCLUSI I PARASSITOIDI OOFAGI RILASCIATI (DISAFA)

Saranno valutate eventuali interferenze dei prodotti ad effetto accessorio battericida sia su alcuni predatori che tengono sotto controllo fitofagi dannosi in corilicoltura sia sui parassitoidi oofagi rilasciati per limitare *H. halys*, per conoscerne le interazioni in vista del loro impiego in campo. Nello specifico, saranno svolte le seguenti attività:

- valutazione in laboratorio dell'effetto dell'applicazione di diversi prodotti ad azione battericida su predatori;
- valutazione in laboratorio dell'interferenza dei prodotti utilizzati sull'attrazione dell'ovatura di *H. halys* nei confronti dei parassitoidi oofagi, attraverso saggi comportamentali-biologici;
- campionamenti per rilevare il complesso degli ausiliari prima e dopo l'applicazione dei prodotti ad effetto accessorio battericida nei corileti;
- rilievo delle ovature di *H. halys* parassitizzate e della composizione dei parassitoidi nei corileti, in confronto a parcelle gestite con lotta chimica.

SOTTOPROGETTO 2: L'AVARIATO E LE AFLATOSSINE NELLE NOCCIOLE

WP 2.1 Monitoraggio della popolazione microbica dall'allegagione alla raccolta (AGROINNOVA e Agrion)

Gli agenti causali associati all'avariato della nocciola sono stati fino ad ora rilevati su frutti già maturi, fase in cui alcuni microrganismi agenti causali potrebbero già essere stati rimpiazzati da saprofiti. Il monitoraggio in campo della popolazione microbica dall'inizio della stagione vegetativa, dall'allegagione in poi, fornirà informazioni sulla frequenza dei microrganismi che dal campo iniziano la colonizzazione dei tessuti fiorali e del frutto in formazione fino a causare il deterioramento del frutto alla raccolta.

Si intende svolgere le seguenti attività:

- Ispezioni e raccolta campioni in due frutteti: Monteu Roero (corileto commerciale) e Cravanzana (corileto sperimentale).
- Isolamento e identificazione della microflora nelle diverse fasi di raccolta per comprendere la dinamica delle popolazioni microbiche che si succedono durante il

- ciclo colturale in relazione alla presenza dell'avariato alla raccolta in entrambe i noccioleti selezionati.
- Caratterizzazione dal punto di vista biologico e molecolare della microflora microbica. La caratterizzazione biologica include saggi di patogenicità, per verificare i postulati di Koch. La caratterizzazione molecolare mira a verificare la diversità microbica presente e si baserà sul sequenziamento ed analisi filogenetica di isolati microbici rappresentativi.
- Studio dei microbiomi eucariotico e procariotico presenti sulla superficie (epifitico) e all'interno delle nocciole (endofitico). Le nocciole saranno campionate durante la stagione vegetativa, per valutare l'evoluzione della composizione microbica a diversi stadi fenologici. Alla raccolta, le nocciole saranno raccolte ed essiccate. Le nocciole verranno campionate anche alla fine del processo di essiccazione. Il microbioma sarà caratterizzato tramite seguenziamento del metagenoma, metabarcoding per funghi e batteri. Il tessuto campionato sarà congelato in azoto liquido e quindi liofilizzato, per poi essere omogeneizzato prima di estrarne il DNA totale. La concentrazione e la qualità del DNA saranno misurate con il Nanodrop, e si genereranno degli ampliconi batterici tramite l'uso dei primer 1492F e 23Sr per l'amplificazione della regione intergenica 16S-23S dell'rRNA (Bodenhausen et al. 2017). Gli ampliconi di funghi e lieviti filamentosi saranno ottenuti usando l'ITS1, l'ITS2 e la regione D1/D2 dell'LSU, come descritto da Agler et al. (2016). Gli ampliconi saranno sequenziati tramite Illumina MySeq, e le read paired end saranno fuse con il programma PEAR, usando i parametri di default (Zhang et al., 2014). La "CLC genomics workbench V8" sarà usata per la rimozione dei primer e la pulitura della read. Le sequenze chimeriche saranno poi evidenziate e rimosse tramite VSEARCH (Rognes et al. 2016). L'algoritmo UCLUST del pacchetto software QIIME sarà usato per raggruppare le sequenze con una soglia di similarità del 97% (Caporaso et al., 2017). Le sequenze più abbondanti in ogni Unità Tassonomica Operazionale (OTU) saranno ritenute rappresentative e usate per l'attribuzione tassonomica con l'algoritmo "BLAST", implementato in QIIME. La tabella delle OTU verrà normalizzata tramite rarefazione a una profondità di sequenziamento uniforme, in modo da rimuovere l'eterogeneità dei campioni. La tabella delle OTU, così rarefatta, verrà usata per calcolare vari indici dell'alfa-diversità, tra cui le Specie Osservate (Sobs), la Chao1, e l'indice di Shannon. La somma cumulativa (CSS), eseguita con il programma "MetagenomeSeq", sarà il metodo di normalizzazione selezionato per altre analisi successive, incluse l'abbondanza relativa dei taxa, la beta-diversità e la significatività dei gruppi.

WP 2.2 Fattori predisponenti (AGROINNOVA e Agrion)

Per comprendere l'epidemiologia delle popolazioni microbiche che si vanno a monitorare nel WP2.1 nel frutteto di Cravanzana (CN) si installeranno una capannina meteorologica e un captaspore. I dati meteorologici rilevati saranno messi in relazione all'andamento delle popolazioni microbiche catturate dal captaspore e rilevate con metodi molecolari.

Le strisce di captaspore verranno sottoposte a sequenziamento del microbioma per monitorare l'evoluzione dei principali generi fungini in noccioleto durante la stagione vegetativa. Il microbioma sarà caratterizzato tramite sequenziamento del metagenoma, usando metabarcoding per funghi e batteri, come descritto nel WP2.1.

WP2.3 Validazione di protocollo LAMP per rilevamento Aspergillus micotossigeni (AGROINNOVA)

L'individuazione precoce in campo di Aspergillus appartenenti alla sezione Flavi, produttori di aflatossine, è essenziale per decidere possibili interventi di contenimento. Il saggio LAMP, in grado di individuare i ceppi produttori di aflatossine direttamente in noccioleto, sarà progettato sulla base della sequenza del gene per la pompa di efflusso delle aflatossine (afIT). Verrà sviluppato un protocollo di estrazione semplificato. L'elevata resilienza nei confronti di inibitori della reazione, caratteristica della LAMP, permette di utilizzare l'estrazione del DNA da crudo, mediante un tampone molto alcalino ed una rottura meccanica delle cellule. La validazione della LAMP sarà eseguita secondo i requisiti dello standard internazionale EPPO PM7/98 per specificità, sensibilità, selettività, ripetibilità e riproducibilità. Saggi specifici saranno eseguiti su ceppi produttori e non produttori di aflatossine comunemente trovati sulle nocciole. I saggi di sensibilità saranno eseguiti su diluizioni 1:10 seriali del DNA bersaglio e tramite inoculazione artificiale su nocciole. La sensibilità di una qPCR con sonda Tagman, sarà paragonata a quella della LAMP (Franco Ortega et al., 2020). I saggi qPCR con sonda Taqman e LAMP verranno validati in condizioni commerciali in noccioleti piemontesi.

SOTTOPROGETTO 3: "CASCOLA PRERACCOLTA, CRITICITA' MULTIFATTORIALE"

DINAMICHE DELLA CASCOLA PRERACCOLTA

La cascola pre-raccolta e la presenza di frutti vuoti alla raccolta è un problema che colpisce il nocciolo ed in modo particolare la cultivar Tonda Gentile Trilobata causando perdite produttive che in certe annate arrivano fino al 40%.

Sono indicati tra le cause della cascola diversi fattori tra cui: mancata o insufficiente impollinazione; avverse condizioni climatiche, in particolare nel periodo che intercorre tra l'impollinazione e la fecondazione (aprile-maggio-giugno); carenze nutrizionali nel periodo di ingrossamento del seme. Sono anche possibili cause, poco esplorate, gli attacchi di patogeni fungini e di insetti fitofagi.

Il lavoro prevede 3 linee di ricerca volte ad indagare:

a. la valutazione dell'efficacia dell'impollinazione utilizzando polline di diverse cultivar compatibili con TGT;

- b. lo stato nutrizionale della pianta e la fisiologia dello sviluppo del frutticino valutando l'efficacia di prodotti che favoriscano l'allegagione e la naturale fertilità del fiore, e lo sviluppo del frutto (auxine, citochinine, biostimolanti);
- c. la relazione tra l'entità della cascola e i parametri climatici

Le attività verranno svolte in aziende ubicate in località diverse del Piemonte, scelte in collaborazione con Agrion.

WP 3.1 Impollinazione (DISAFA – Agrion)

Verranno testati su Tonda Gentile Trilobata pollini di diverse cultivar compatibili con TGT e con periodo di fioritura maschile sovrapposto con quello femminile di questa. Verranno eseguite prove di impollinazione controllata su branche isolate dal polline presente nell'ambiente esterno.

Nello specifico saranno svolte le seguenti attività:

- individuazione di un impianto idoneo di TGT per la prova
- raccolta del polline da cultivar compatibili in collezione presso DISAFA o Agrion
- preparazione delle piante mediante protezione delle branche con strutture in tessuto non tessuto o di altro materiale barriera per il polline
- verifica della vitalità del polline raccolto
- impollinazione delle branche isolate e conteggio dei fiori
- valutazione quantitativa delle nocciole allegate, cascolate, piene e vuote a maturità
- elaborazione dei dati

WP 3.2 Nutrizione e fisiologia dell'accrescimento (DISAFA – Agrion)

Si studieranno lo stato nutrizionale e la condizione fisiologica della pianta durante le fasi più critiche dell'accrescimento della nucula in relazione con l'incidenza della cascola. Si valuterà l'efficacia di trattamenti con elementi minerali, biostimolanti e fitormoni nel ridurre la cascola del frutto.

Nello specifico saranno svolte le seguenti attività:

- individuazione di impianti di TGT in condizioni pedologiche diverse e scelta delle piante/parcelle in prova
- analisi fogliare e del suolo per determinare stato nutrizionale piante e contenuto elementi minerali
- rilievi morfologici e fisiologici durante lo sviluppo della nucula nel periodo tra la fecondazione e la cascola
- ➤ applicazione di elementi minerali (B, Zn), biostimolanti e fitormoni (citochinine, auxine) per favorire la fertilità dei fiori, l'allegagione e lo sviluppo regolare del frutto
- valutazione quantitativa delle nocciole allegate, cascolate, piene e vuote a maturità
- elaborazione e modellizzazione dei risultati

WP 3.3 Fattori climatici (DISAFA – Agrion)

Si eseguiranno misurazioni dei principali parametri meteorologici (temperatura, umidità, precipitazioni) in diverse aree di coltura per individuare fattori ambientali che predispongono la pianta alla cascola.

Nello specifico saranno svolte le seguenti attività:

- individuazione di impianti di TGT in diversi ambienti della regione
- raccolta dei dati meteorologici da stazioni di rilevamento presenti in zona, eventualmente integrate con misuratori tipo Hobo
- rilievi sull'incidenza della cascola e determinazioni qualitative e quantitative sulle produzioni
- > elaborazione dati e individuazione dei fattori correlati con la cascola

SOTTOPROGETTO 4: ALLEVAMENTO E RILASCIO IN CAMPO DELL'OOPARASSITOIDE TRISSOLCUS JAPONICUS (DISAFA, SFR, Agrion)

In seguito all'autorizzazione per l'allevamento e il rilascio in campo del parassitoide oofago *Trissolcus japonicus* da parte del Ministero dell'Ambiente è stato definito il programma per il controllo biologico di *H. halys*. Sono stati discussi e concordati all'interno di uno specifico gruppo di lavoro i criteri di scelta dei siti, modalità di rilascio e verifica dell'efficacia dell'intervento di controllo biologico di *H. halys* con l'impiego dell'ooparassitoide *T. japonicus*. Per ogni sito saranno effettuati due rilasci del parassitoide nel corso della stagione in zone non sottoposte a trattamenti fitosanitari.

Nello specifico saranno svolte le seguenti attività:

- produzione di grandi quantità di uova di H. halys (vedere WP1);
- moltiplicazione massale in laboratorio del parassitoide *T. japonicus*;
- individuazione sul territorio piemontese dei siti di rilascio (n. e localizzazione) nelle zone a maggior infestazione di *H. halys*;
- rilevamento della presenza di uova, ossia del momento in cui effettuare il rilascio:
- rilascio in campo dei parassitoidi ottenuti in laboratorio;
- campionamenti pre-rilascio e post-rilascio secondo le modalità concordate nell'ambito del Tavolo Cimice asiatica.