



PROGETTO DI RICERCA

# Nocciola *di* Qualità

*Martedì*

**09**

APRILE

2024 ore 9.00

**Sala convegni**  
***Palazzo Banca d'Alba***

AGRI  INNOVA  
RESEARCH BEARS ITS FRUITS



PROGETTO DI RICERCA  
**Nocciola  
di Qualità**



**Agrion**  
Agricoltura ricerca innovazione

**AGRINNOVA**

# *L' avariato e le aflatossine nelle nocciole*

**Monica Mezzalama**

**Athina Vasileiadou, Ilaria Martino, Vladimiro Guarnaccia,  
Davide Spadaro**

**AGRINNOVA**  
RESEARCH BEARS ITS FRUITS



PROGETTO DI RICERCA  
**Nocciola  
di Qualità**

 REGIONE  
PIEMONTE

 DISAFA  
Università degli Studi di Torino

**Agrion**  
Agricoltura ricerca innovazione

 AGRINNOVA

## SOTTOPROGETTO 2: L'AVARIATO E LE AFLATOSSINE NELLE NOCCIOLE

### WP 2.1

# Monitoraggio della popolazione microbica dall'allegagione alla raccolta



PROGETTO DI RICERCA  
**Nocciola  
di Qualità**



## CAMPIONAMENTI

| Località      | Anno | No. di Campionamenti | Parte del frutto | No. diisolati fungini | Totale no. Isolati |
|---------------|------|----------------------|------------------|-----------------------|--------------------|
| Monteu Roero  | 2021 | 4                    | Brattee          | 20                    | 107                |
|               |      |                      | Frutticini       | 87                    |                    |
|               | 2022 | 4                    | Brattee          | 82                    | 142                |
|               |      |                      | Frutticini       | 60                    |                    |
| Cravanzana    | 2022 | 3                    | Brattee          | 57                    | 59                 |
|               |      |                      | Frutticini       | 2                     |                    |
| Cereseto      | 2022 | 1                    | Frutticini       | 12                    | 12                 |
| <b>TOTALE</b> |      |                      |                  |                       | <b>320</b>         |

### Sintomi frequentemente incontrati:

- Necrosi
- Imbrunimento dei tessuti
- Avvizzimento della mandorla
- Mandorla ammuffita

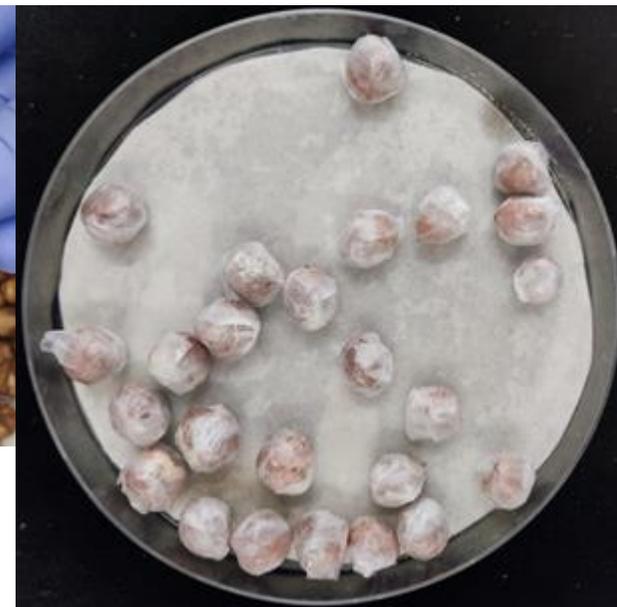




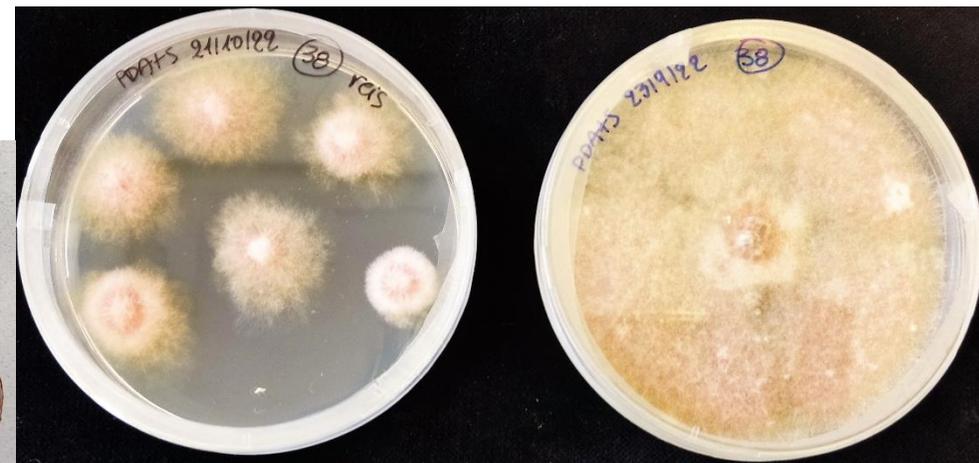
PROGETTO DI RICERCA  
**Nocciola  
di Qualità**



- **4 saggi** di patogenicità
- **50 ceppi** selezionati in base alle diverse morfologie dei funghi isolati



- **Valutazione della patogenicità** tagliando la nocciola e osservando imbrunimenti interni e
- **Reisolamenti** per verificare i postulati di Koch





## Identificazione molecolare degli agenti patogeni e periodo di rilevamento in campo

| Origine/Data isolamento | 17/05/2021                        | 04/07/2021                    | 15/09/2021             |
|-------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Monteu Roero            | <i>F.oxysporum/verticilloides</i> | <i>F. tricintum/avenaceum</i> | <i>Diaporthe rudis</i> |

PROGETTO DI RICERCA  
Nocciola  
di Qualità

| Origine/Data isolamento | 19/05/2022  | 20/07/2022                                       | 29/09/2022  | 30/11/2022  |
|-------------------------|---|--|---|---|
| Monteu Roero            | <i>A. alternata</i><br><i>A. tenuissima</i><br><i>Alternaria spp.</i> |  | <i>Fusarium spp.</i><br><i>Diaporthe eres</i><br><i>Alternaria spp.</i> |   |
| Cravanzana              |   | <i>Diaporthe rudis</i><br><i>Alternaria spp.</i> |   |   |
| Cereseto                |   |  |   | <i>F. tricintum/avenaceum</i><br><i>A. alternata/tenuissima</i> |

REGIONE  
PIEMONTE



Agrion  
Agricoltura ricerca innovazione

AGRINNOVA

## CATTURA DELLE SPORE A CRAVANZANA nel 2022

- Dal **23 marzo 2022** al **14 ottobre 2022**
- **85 campioni** catturati con un **captaspore** su nastri presiliconati sostituiti a intervalli di **tre giorni**
- I nastri così raccolti sono stati suddivisi in

Gli 85 campioni sono stati raggruppati per settimana per un totale di 27 campioni da utilizzare per le analisi di metabarcoding per funghi.

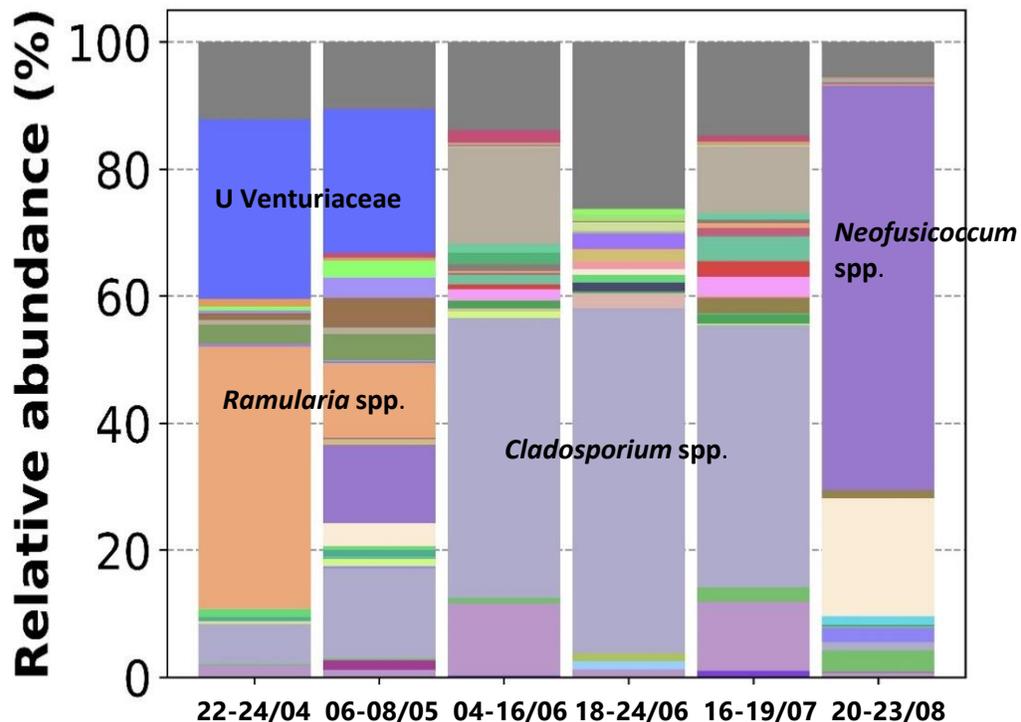
Una **capannina meteorologica** è stata posizionata nel medesimo nocciolo con registro continuo di **temperatura** e **precipitazioni** durante tutta la stagione del 2022.



PROGETTO DI RICERCA  
**Nocciola  
di Qualità**



## Analisi preliminare del microbioma di 6 campioni



**Sample**

### Fungal taxa

- |                         |                                      |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Other                   | Peniophora                           |
| unknown_Venturiaceae    | Penicillium                          |
| unknown_Sclerotiniaceae | Neofusicoccum                        |
| unknown_Pleosporales    | Metschnikowia                        |
| unknown_Peniophoraceae  | Linnemannia                          |
| unknown_Helotiales      | Leptospora                           |
| unknown_Helotiaceae     | Itersonilia                          |
| unknown_Gnomoniaceae    | Hymenoscyphus                        |
| unknown_Ganodermataceae | GS11_gen_Incertae_sedis              |
| unknown_Didymellaceae   | Fusarium                             |
| Vuilleminia             | Coprinopsis                          |
| Vishniacozyma           | Coprinellus                          |
| Venturia                | Clonostachys                         |
| Ustilago                | Cladosporium                         |
| Stemphylium             | Chaetospermum                        |
| Ramularia               | Botrytis                             |
| Pseudotaeniolina        | Aureobasidium                        |
| Podosphaera             | Amphisphaeriaceae_gen_Incertae_sedis |
| Periconia               | Alternaria                           |
|                         | Acremonium                           |



Alba, 09 aprile 2024



## Risultati del monitoraggio in campo su nocciola



### Mal dello stacco

- *Diaporthe eres*
- *Diaporthe rudis*

Journal of Plant Pathology  
<https://doi.org/10.1007/s42161-024-01595-2>

ORIGINAL ARTICLE



### Characterization and pathogenicity of fungal species associated with hazelnut trunk diseases in North-western Italy

Ilaria Martino<sup>1,2</sup> · Matteo Monchiero<sup>3</sup> · M. Lodovica Gullino<sup>2</sup> · Vladimiro Guarnaccia<sup>1,2</sup>



### Post-raccolta

### Disease Note

#### Diseases Caused by Fungi and Fungus-Like Organisms

First Report of Nut Rot Caused by *Neofusicoccum parvum* on Hazelnut (*Corylus avellana*) in Italy

M. Waqas,<sup>1</sup> V. Guarnaccia,<sup>1,2</sup> and D. Spadaro<sup>1,2,†</sup>

<sup>1</sup> Department of Agricultural, Forest and Food Sciences, University of Torino, I-10095 Grugliasco, TO, Italy

<sup>2</sup> Centre of Competence for the Innovation in the Agro-environmental Sector, AGROINNOVA, University of Torino, I-10095 Grugliasco, TO, Italy

Plant Dis. 106:1987, 2022; published online as <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-21-2249-PDN>. Accepted for publication 9 December 2021.

Plant Disease • 2024 • 0:1-9 • <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-23-0168-RE>

### Molecular Characterization and Pathogenicity of *Diaporthe* Species Causing Nut Rot of Hazelnut in Italy

Muhammad Waqas,<sup>1</sup> Vladimiro Guarnaccia,<sup>1,2</sup> S. Bardella,<sup>3</sup> and Davide Spadaro<sup>1,2,†</sup>

<sup>1</sup> Department of Agricultural, Forest and Food Sciences (DISAFA), University of Torino 10095, Grugliasco, TO, Italy

<sup>2</sup> AGROINNOVA – Centre of Competence for the Innovation in the Agro-environmental Sector, University of Torino 10095, Grugliasco, TO, Italy

<sup>3</sup> Fondazione Agrion - Via Falicetto, 24 12030, Manta, CN, Italy



PROGETTO DI RICERCA  
**Nocciola  
di Qualità**

 REGIONE  
PIEMONTE

 DISAFA  
Università degli Studi di Torino

**Agrion**  
Agricoltura ricerca innovazione

 AGRINNOVA

**SOTTOPROGETTO 2:  
L'AVARIATO E LE AFLATOSSINE NELLE NOCCIOLE**

# **WP 2.2**

## **Fattori predisponenti**



PROGETTO DI RICERCA  
**Nocciola  
di Qualità**

REGIONE  
PIEMONTE

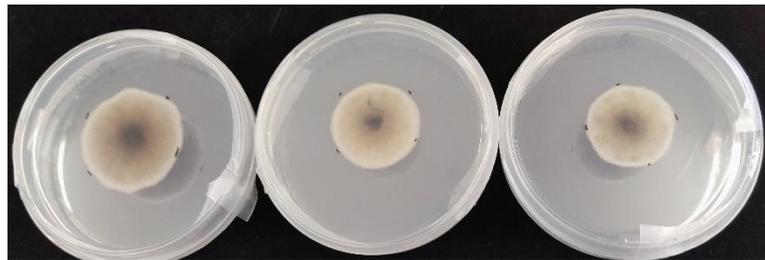
DISAFA  
Università degli Studi di Torino

Agrion  
Agricoltura ricerca innovazione

AGRINNOVA

## Prova di accrescimento a diverse temperature - Isolati ottenuti nel 2021 e nel 2022

- **17 isolati** sono stati incubati su substrato artificiale a
  - **5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C e 35°C.**
- Sono stati effettuati rilievi dal giorno 1 al giorno 8, misurando il **diametro** perpendicolare delle **colonie** (mm).
- È stata calcolata la media delle misurazioni per determinare la crescita radiale (mm/giorno).
- I dati sono stati analizzati con il programma Statistix10





PROGETTO DI RICERCA  
**Nocciola  
 di Qualità**



| Codice Ceppo | Identificazione preliminare | Temperatura ottimale ( $T_{opt}$ ) di crescita stimata ( $^{\circ}C$ ) | Crescita radiale media stimata a $T_{opt}$ (mm/giorno) |
|--------------|-----------------------------|--|--|
| 1            | <i>Alternaria</i> spp.      | 26,9   | 4,81   |
| 3            | <i>Alternaria</i> spp.      | 24,6   | 4,9  |
| 5            | <i>Alternaria</i> spp.      | 24,6   | 4,77   |
| 31           | <i>Alternaria</i> spp.      | 24,5   | 4,42   |
| 38P          | <i>Alternaria</i> spp.      | 25,3   | 6,1  |
| D1           | <i>Alternaria</i> spp.      | 26,9   | 4,75   |
| NT23         | <i>Alternaria</i> spp.      | 27,1   | 4,46   |
| 30           | <i>Diaporthe</i> spp.       | 22,1   | 5,54   |
| 42           | <i>Diaporthe</i> spp.       | 27,3   | 3,33   |
| 14P          | <i>Diaporthe</i> spp.       | 25   | 6,1  |
| 32P          | <i>Diaporthe</i> spp.       | 24,9   | 6,7  |
| 16           | <i>Fusarium</i> spp.        | 25,5   | 6,19   |
| 18           | <i>Fusarium</i> spp.        | 22,1   | 5,61   |
| 33           | <i>Fusarium</i> spp.        | 27,3   | 6  |
| 38           | <i>Fusarium</i> spp.        | 23,8   | 5,7  |
| 4P           | <i>Fusarium</i> spp.        | 24,1   | 5,1  |
| NT1          | <i>Fusarium</i> spp.        | 26,3   | 5,1  |



PROGETTO DI RICERCA  
**Nocciola  
di Qualità**

REGIONE  
PIEMONTE



**Agrion**  
Agricoltura ricerca innovazione

AGRI  
NOVA

**SOTTOPROGETTO 2:  
L'AVARIATO E LE AFLATOSSINE NELLE NOCCIOLE**

## **WP 2.3**

**Validazione del protocollo LAMP (Franco-Ortega et al. 2020) per rilevamento di ceppi di *Aspergillus* micotossigeni**



PROGETTO DI RICERCA  
**Nocciola  
di Qualità**



**Agrion**  
Agricoltura ricerca innovazione

AGRI INNOVA

- **11 campioni** di nocciole provenienti da **Monteu Roero** e **Cereseto**, campagna 2023
- Frantumazione dei campioni di nocciola sgusciati prima di procedere all'estrazione del DNA.
- **3 metodi di estrazione del DNA** per verificare l'efficienza di rilevamento nella prova molecolare LAMP

**A. Estrazione a crudo:** 2 g di ogni campione **agitati energicamente** in provetta per **1 minuto** in presenza di una biglia di tungsteno da 7 mm di diametro e 2 ml di una soluzione di PEG KOH, un buffer alcalino (pH 13,5).

**B. Estrazione a crudo modificata:** come in A ma **agitazione per 3 minuti**.

**C. Estrazione con kit commerciale** Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Düren, Germany): seguendo il protocollo descritto dal produttore, integrandolo con un ciclo di 15 minuti in Tissuelyser.





PROGETTO DI RICERCA  
**Nocciola  
di Qualità**

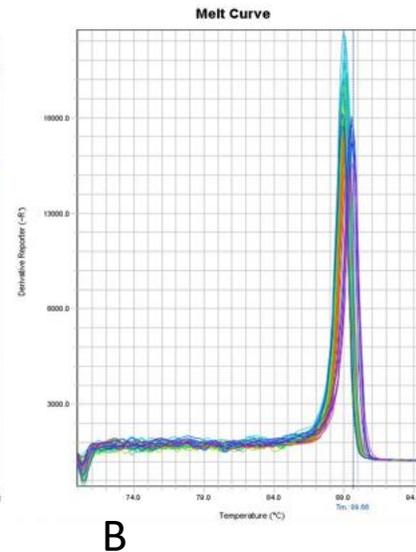
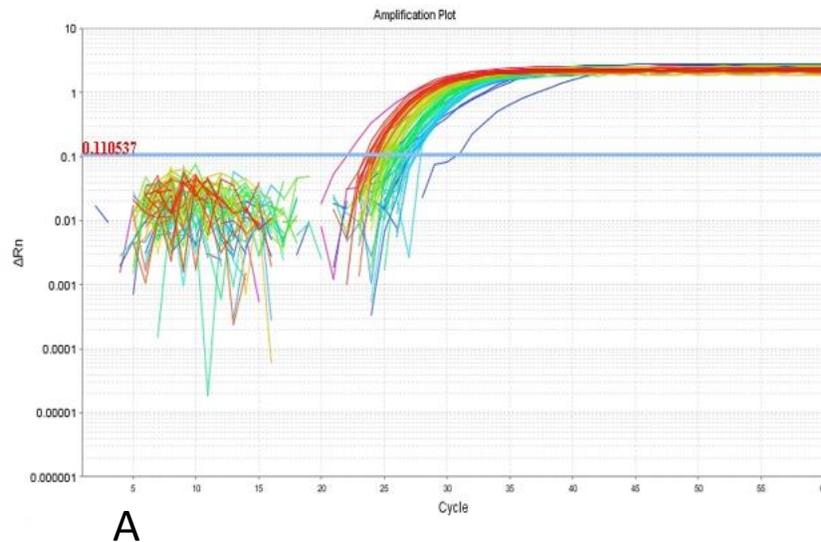
REGIONE  
PIEMONTE

DISAFA  
Università degli Studi di Torino

Agrion  
Agricoltura ricerca innovazione

AGRINNOVA

- I 3 protocolli di estrazione del DNA non hanno evidenziato differenze statisticamente significative nel rilevamento delle specie nei campioni di nocciole analizzati.
- Pertanto la possibilità di utilizzare tempi di estrazione del DNA a crudo di 1 minuto senza la necessità di utilizzare kit commerciali e l'azoto liquido **riduce i costi, tempi di l'analisi e facilita la lavorazione** di numerosi campioni giornalmente.



- (A) Grafico di amplificazione dove si osserva che tutti i campioni hanno amplificato tra il Ct 25 e 27.
- (B) Curva di melting la cui omogeneità mostra l'esito affidabile dell'analisi LAMP.



PROGETTO DI RICERCA  
**Nocciola  
di Qualità**



# GRAZIE!



PROGETTO DI RICERCA  
**Nocciola  
di Qualità**



PROGETTO REALIZZATO GRAZIE AL CONTRIBUTO DI





PROGETTO DI RICERCA  
**Nocciola  
di Qualità**

 REGIONE  
PIEMONTE

 DISAFA  
L'Università Agraria di Cuneo

 Agrion  
Agricoltura ricerca innovazione

 AGRINNOVA

PROGETTO REALIZZATO GRAZIE AL CONTRIBUTO DI



CON LA COLLABORAZIONE OPERATIVA DELLE ORGANIZZAZIONI AGRICOLE PIEMONTESI