



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA  
VITERBO**

FACOLTÀ DI AGRARIA  
DIPARTIMENTO DI PROTEZIONE DELLE PIANTE

DOTTORATO DI RICERCA IN PROTEZIONE DELLE PIANTE  
- XVIII CICLO -

**BIOLOGIA E DINAMICA DI *ANISANDRUS DISPAR* F. (COLEOPTERA,  
*SCOLYTIDAE*) E SUO POSSIBILE RUOLO NELLA DIFFUSIONE DEI  
BATTERI AGENTI CAUSALI DELLA MORIA DEL NOCCIOLO**

AGR/12

Dottorando

DOTT. DANILO BUCINI

Coordinatore

CHIAR.MO PROF. NALDO ANSELMI

Tutore

CHIAR.MO PROF. BRUNO PAPARATTI

Co-tutore

CHIAR.MO PROF. LEONARDO VARVARO

TRIENNIO 2003-2005

## INDICE

<b>I. INTRODUZIONE</b>	<b>pag. 5</b>
<b>I.1 IL NOCCIOLO</b>	<b>pag. 5</b>
I.1.1 Inquadramento sistematico e biologia florale	pag. 6
I.1.2 Produzioni nocciolo	pag. 9
I.1.3 La produzione corilicola nel Viterbese	pag. 11
<b>I.2 ANISANDRO E ALTRI FITOFAGI DEL NOCCIOLO</b>	<b>pag. 13</b>
I.2.1 <i>Anisandrus dispar</i> F. (Coleoptera, Scolytidae)	pag. 13
I.2.2 Acaro Eriofide galligeno o “Bufone”	pag. 18
I.2.3 <i>Xyleborinus saxesenii</i> Ratz. (Coleoptera, Scolytidae)	pag. 19
I.2.4 <i>Balaninus nucum</i> L. (Coleoptera, Curculionidae)	pag. 19
I.2.5 Maggiolino ( <i>Melolontha melolontha</i> L.); Aplidia ( <i>Haplidia etrusca</i> Kraatz); Anomala ( <i>Anomala juni</i> Duft) (Coleoptera, Scarabaeidae)	pag. 20
I.2.6 Il Cerambicide del nocciolo ( <i>Obera linearis</i> L.) (Coleoptera, Cerambycidae)	pag. 20
I.2.7 Cimici nocciolaie (Rhynchota, Heteroptera Coreidae e Pentatomidae)	pag. 20
I.2.8 Afidi (Rhynchota, Homoptera)	pag. 21
I.2.9 La Falena invernale ( <i>Operophtera brumata</i> L.) (Lepidoptera, Geometridae)	pag. 21
I.2.10 Il Rodilegno giallo ( <i>Zeuzera pyrina</i> L.) (Lepidoptera, Cossidae)	pag. 22
<b>I.3 LA MORIA E ALTRE FITOPATIE DEL NOCCIOLO</b>	<b>pag. 23</b>
I.3.1 La moria del nocciolo	pag. 23
I.3.2 Batteriosi del nocciolo	pag. 27
I.3.3 Mal dello stacco	pag. 27
I.3.4 Marciume radicale fibroso	pag. 28
I.3.5 Seccume fogliare	pag. 28
I.3.6 Mal bianco	pag. 28
I.3.7 Stigmatosi	pag. 28
I.3.8 Marciume bruno dei frutti	pag. 28
I.3.9 Cancro del nocciolo	pag. 29
I.3.10 Botrite	pag. 29
I.3.11 Macchie brune	pag. 29
<b>II. PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>pag. 30</b>
II.1 Scopo del lavoro	pag. 30
<b>II.2 MATERIALI E METODI</b>	<b>pag. 31</b>
II.2.1 Analisi dei dati climatici	pag. 31
II.2.2 Campionamenti di <i>A. dispar</i>	pag. 31
II.2.3 Ciclo biologico e voli giornalieri	pag. 34
II.2.4 Spermateca	pag. 35
II.2.5 Isolamento, identificazione e conservazione della microflora batterica	pag. 36
II.2.6 Substrati colturali	pag. 38
II.2.7 Conservazione degli isolati batterici a – 80°C	pag. 42
II.2.8 Saggi biochimici e fisiologici	pag. 42
II.2.9 Saggi diagnostici classici	pag. 43

II.2.9.1 Saggio di solubilità in KOH	pag. 45
II.2.9.2 Fluorescenza su substrato B di King	pag. 45
II.2.9.3 Formazione di colonie levaniformi su ANS	pag. 46
II.2.9.4 Saggio dell'ossidasi	pag. 47
II.2.9.5 Catalasi	pag. 48
II.2.9.6 Saggio della marcescenza su fettine di patata	pag. 48
II.2.9.7 Saggio dell'arginina deidrolasi	pag. 49
II.2.9.8 Saggio dell'ipersensibilità su tabacco	pag. 50
II.2.9.9.T.S.I.	pag. 51
II.2.10 Microlog System Biolog	pag. 52
II.2.11 Saggi molecolari	pag. 54
II.2.11.1 Sequenziamento delle colonie batteriche	pag. 54
II.2.11.2 PCR con primer specifici	pag. 54
II.2.12 Prove di patogenicità	pag. 56
II.3 RISULTATI	pag. 58
II.3.1 Campionamenti di <i>A. dispar</i>	pag. 58
II.3.1.1 Campionamenti entomologici 2003	pag. 58
II.3.1.2 Campionamenti entomologici 2004	pag. 61
II.3.1.3 Campionamenti entomologici 2005	pag. 66
II.3.1.4 Confronto tra le catture effettuate con le trappole Rebell® Rosso nel triennio 2003-2005	pag. 71
II.3.1.5 Confronto tra le catture effettuate con le trappole Rebell® Rosso e le Mastrap® L	pag. 73
II.3.1.6 Catture effettuate in bosco	pag. 75
II.3.2 Ciclo biologico di <i>A. dispar</i>	pag. 76
II.3.3 Voli giornalieri	pag. 77
II.3.4 Spermateca	pag. 78
II.3.5 Isolamento, identificazione e conservazione della microflora batterica	pag. 79
II.3.5.1 Analisi qualitativa delle popolazioni batteriche	pag. 79
II.3.5.1.1 Saggi diagnostici classici	pag. 79
II.3.5.1.1a Saggio di solubilità in KOH	pag. 80
II.3.5.1.1b Fluorescenza su substrato B di King	pag. 80
II.3.5.1.1c Formazione di colonie levaniformi su ANS	pag. 80
II.3.5.1.1d Saggio dell'ossidasi	pag. 80
II.3.5.1.1e Catalasi	pag. 80
II.3.5.1.1f Saggio della marcescenza su fettine di patata	pag. 81
II.3.5.1.1g Saggio dell'arginina deidrolasi	pag. 81
II.3.5.1.1h Saggio dell'ipersensibilità su tabacco	pag. 81
II.3.5.1.1i T.S.I.	pag. 81
II.3.5.1.2 Microlog System Biolog	pag. 81
II.3.5.1.3 Saggi molecolari	pag. 82
II.3.5.1.3a Sequenziamento delle colonie batteriche	pag. 82
II.3.5.1.3b PCR con primer specifici	pag. 83
II.3.5.1.4 Prove di patogenicità	pag. 84
II.3.5.2 Analisi quantitativa delle popolazioni batteriche	pag. 85
II.3.5.2.1 Prove condotte durante il 2004	pag. 85
II.3.5.2.2 Prove condotte durante il 2005	pag. 91

<b>II.4 DISCUSSIONE</b>	
<b>II.5 BIBLIOGRAFIA</b>	

<b>pag. 97</b>
<b>pag. 101</b>

## I. INTRODUZIONE

### I.1 IL NOCCIOLO

Il nocciolo (*Corylus avellana* L.) (Fig. 1) è una delle principali specie arboree che hanno colonizzato le terre emerse dopo l'ultima glaciazione.

Il nocciolo è stato tra i primi fruttiferi utilizzati e poi coltivati dall'uomo per soddisfare le proprie esigenze alimentari (Tombesi, 1991).

Plinio nel 60 a.C. dichiarò: "Il nocciolo e le nocciole...sono un tipo di noce chiamato finora Abillinae, dal loro luogo nativo...queste vengono da Pontus in Anatolia e dalla Grecia e perciò saranno chiamate noci pontiche" (AliNiazee, 1998).

L'approfondimento delle tecniche di coltivazione e di propagazione è avvenuto fin dal IV° secolo a.C., ma la coltivazione e la diffusione delle varietà più interessanti ai fini produttivi e commerciali è diventata popolare solo dopo il 1900, quando incominciò ad essere coltivato in maniera intensiva (Tombesi, 1991).

*C. avellana*, originario dell'area del Mediterraneo e dei Balcani si è diffuso in coltura in Europa e nel Nord America, raggiungendo elevate produzioni tra la frutta secca, seconde, a livello mondiale, solo al mandorlo (Bignami *et al.*, 1999).

La coltivazione è localizzata in quattro aree principali: una delle più importanti è localizzata sulla costa meridionale del Mar Nero, la seconda in Italia, la terza in Spagna e la quarta nella parte occidentale del Nord America (Tombesi, 1991).



**Fig. 1. Veduta parziale di un nocciolo in provincia di Viterbo**

### **I.1.1 Inquadramento sistematico e biologia florale**

Il nocciolo appartiene all'ordine delle Fagales, alla famiglia delle *Betulaceae* al genere *Corylus* il quale comprende 25 specie.

Le più importanti risultano: *C. avellana* L. (nocciolo comune), *C. maxima* Miller (nocciolo gigante), *C. colurna* L. (nocciolo turco) e *C. pontica*.

Il nome del genere *Corylus* deriva dal greco *corus* = piccola noce, mentre quello della specie *avellana*, dai centri di maggiore coltivazione: Avellino in Italia ed Abella in Turchia (Tombesi, 1991).

Il nocciolo è una specie monoica diclina cioè si caratterizza dall'avere fiori maschili e femminili separati, ma presenti sulla stessa pianta. Questi sono raggruppati in infiorescenze, i maschili negli amenti, ed i femminili in una sorta di piccole spighe. L'induzione della differenziazione delle gemme a fiore inizia approssimativamente da maggio per il sesso maschile e giugno-luglio per il sesso femminile; successivamente si ha la differenziazione degli organi florali dei pistilli nelle gemme miste e delle antere negli amenti.

Le gemme miste dalle quali si ottengono i frutti sono situate o direttamente sui rami o alla base dei rametti che portano gli amenti, queste si differenziano dalle gemme a legno per avere nella porzione apicale un ciuffo di stili rosso scuro che emergono dalle perule verso dicembre-febbraio. Da queste si originano dei germogli con 4-5 foglie che portano all'estremità infiorescenze di 8-10 pistilli bifidi. I primi amenti appaiono verso giugno e si accrescono sino a dicembre-gennaio quando si ha l'emissione del polline che dura una settimana circa, mentre la recettività degli stigmi si conserva per circa un mese, dall'uscita dalle perule all'essiccazione degli stili.

Il polline trasportato dal vento giunge sul fiore femminile ove una volta germinato raggiunge in 2-3 giorni, con il tubetto pollinico, la base del pistillo; in questa sede induce lo sviluppo dell'ovario che si completa verso maggio, momento questo della fecondazione caratterizzata come visto da spiccata proterandria. Per questo motivo aggiunto al fatto che tutte le cultivar sono autosterili bisogna consociare alla cultivar principale delle cultivar interfertili per assicurare un'impollinazione sufficiente.

Il frutto si accresce molto rapidamente giungendo alla dimensione definitiva alla fine di giugno. Inizia ora l'incremento di sostanza secca che termina quando i frutti maturi si disarticolano dagli involucri e cadono sul terreno con inizio da metà agosto.

Il nocciolo richiede temperature medie annuali comprese tra i 12 e 16°C ed ha un'esigenza in freddo pari a 700-1.200 ore per le gemme a legno, 700 ore per le gemme miste e di 500 ore per le gemme che origineranno gli amenti.

Il terreno preferito dal nocciolo è quello sciolto, permeabile, (in quanto l'apparato radicale non sopporta l'umidità), fertile, con un pH compreso tra 5,5 e 7,8, ricco di sostanza organica e con un calcare attivo non superiore al 7-8% per evitare fenomeni di clorosi.

Terreni vulcanici come quelli ai piedi dell'Etna, dei Monti Cimini e dell'Avellinese sono ottimi per la coltivazione del nocciolo, infatti, terreni di origine alluvionale sabbiosi e quelli derivanti dal disfacimento dei terreni calcarei carsici (terre rosse) sono destinati a questa coltura. La specie teme i terreni argillosi e l'asfissia radicale. (Tombesi, 1985).

L'apparato radicale del nocciolo è per la maggior parte situato ad una profondità compresa tra 0 e 60 cm, ciò unito al fatto che il modello attuale di coltivazione prevede un totale grado di copertura del terreno evidenzia la necessità di un discreto e costante apporto d'acqua.

Infatti, sebbene come media risultino necessari 800 mm di acqua regolarmente distribuiti durante l'anno e con periodi di siccità inferiori al mese si è visto come adottando una razionale irrigazione a goccia si ottengano aumenti di resa compresi tra il 20 ed il 100%.

La propagazione per pollone radicato è la più diffusa in quanto consente il mantenimento delle caratteristiche della pianta madre e sfrutta la naturale predisposizione pollonifera della specie. Questo metodo risulta semplice ed economico anche se lento e non perfettamente in linea con l'aspetto sanitario in quanto si opera con la pianta in riposo vegetativo e si rischia di prelevare i polloni da soggetti malati o di prelevare piante nate casualmente da semi caduti al piede del cespuglio (Tombesi, 1991). Attualmente, nella provincia di Viterbo, sia per la realizzazione di nuovi impianti che per la sostituzione di piante malate o morte, viene utilizzato materiale ottenuto dai corilicoltori o dai vivaisti locali mediante il prelievo di polloni radicati dagli impianti

esistenti. Sino a qualche anno fa, invece, il problema era localmente poco avvertito mentre attualmente, a causa dei pericolosi focolai di moria, la coscienza dei rischi legati alla modalità di propagazione per pollone radicato è notevolmente cresciuta. L'allestimento di un campo di piante madri sicuramente sane, ricorrendo a tecniche di coltura *in vitro*, e lo sviluppo di un'attività vivaistica razionale sono da ritenere premesse indispensabili per una futura corilicoltura di qualità (Bignami, 2002).

Oggi nei razionali vivai viene adottata la tecnica della propaggine a trincea che riesce a fornire tra le 20-30.000 piante per ettaro e per anno, invece dei due necessari con il metodo del pollone radicato.

Altri metodi sono possibili anche se più difficili e costosi come ad esempio l'innesto, la margotta aerea e le talee. Per quanto riguarda la moltiplicazione degli apici vegetativi *in vitro* esistono ancora problemi da risolvere prima che si possa utilizzarlo come metodica economicamente valida.

Due sono le forme di allevamento più usate, il monocaule ed il policaule.

Il monocaule risulta il più razionale facilitando le operazioni colturali e creando condizioni per una migliore illuminazione della chioma.

L'orientamento attuale prevede l'allevamento a monocaule contestualmente all'utilizzo delle cultivar in cui l'attitudine pollonifera risulti minore presenti sia nella specie *C. avellana* che *C. colurna*.

La piantagione si esegue a fine autunno utilizzando astoni recisi a circa 50 cm da terra ed utilizzando i futuri germogli apicali per la costituzione di tre branche principali.

Le distanze di allevamento sono subordinate al tipo di terreno, alla vigoria della pianta, alla presenza di impianti irrigui e al fatto che le macchine richiedano distanze minime tra le file di 4.5-5 metri. Si adottano i sestri 5 x 5 o 5 x 6 m nel caso di coltura irrigua e di 5 x 3 m e 5 x 4 m nel caso di coltura asciutta rispettivamente per cultivar deboli o vigorose.

Al fine di migliorare l'intercettazione della radiazione solare e quindi l'efficienza fotosintetica sono da preferire le disposizioni a rettangolo avendo cura di indirizzare la chioma più verso l'interfilare che lungo la fila, adottando quindi una disposizione ad epsilon trasversale (Tombesi, 1991).

La potatura del nocciolo è un'operazione necessaria e indispensabile per avere produzioni costanti e di qualità. Lo scopo delle potature è infatti quello di ottimizzare



l'utilizzazione della luce solare, di agevolare le successive operazioni colturali e, soprattutto, di regolarizzare lo sviluppo dei rami fruttiferi in maniera omogenea (Cecchini *et al.*, 2002). Questa consiste principalmente nel rinnovare i rami fruttiferi, con tagli su branche di 2-3 anni per stimolare la formazione dei rami di un anno (Piccirillo, 2002). Solitamente viene effettuata una potatura di mantenimento annuale con asportazione della chioma intorno al 10-15% della massa totale, mentre ogni due anni ne viene praticata una più energica (Cecchini *et al.*, 2002).

La durata per quanto riguarda una produttività economicamente remunerativa per il nocciolo è di 30 anni circa durante i quali la produttività varia con inizio della produzione verso il quarto anno e raggiungimento della piena produzione verso il quattordicesimo anno; il picco produttivo si ha verso il ventiduesimo anno (Tombesi, 1991).

### **I.1.2 Produzioni nocciole**

La produzione mondiale di nocciole nel 2004/2005 stimata intorno alle 700.000 tonnellate risulta essere distribuita principalmente tra i seguenti paesi :

- Turchia 425.000 tonnellate
- Italia 134.161 tonnellate
- Stati Uniti 33.570 tonnellate
- Azerbaijan 20.000 tonnellate
- Spagna 14.225 tonnellate

Seguono con produzioni minori ma significative: Cina (13.000 t), Iran (13.000 t), Georgia (8.800 t) e Francia (5.725 t) (Fonte FAO).

Nell'ambito dell'Unione Europea l'Italia risulta il maggior produttore con circa l'80% del totale, seguita a notevole distanza dalla Spagna. Per quanto riguarda invece il mercato internazionale la Turchia risulta essere il primo paese produttore che da solo fornisce il 62% del totale della produzione mentre l'Italia appena il 19%. I maggiori importatori europei risultano essere l'Inghilterra per il prodotto sgusciato e la Germania per il prodotto con guscio.

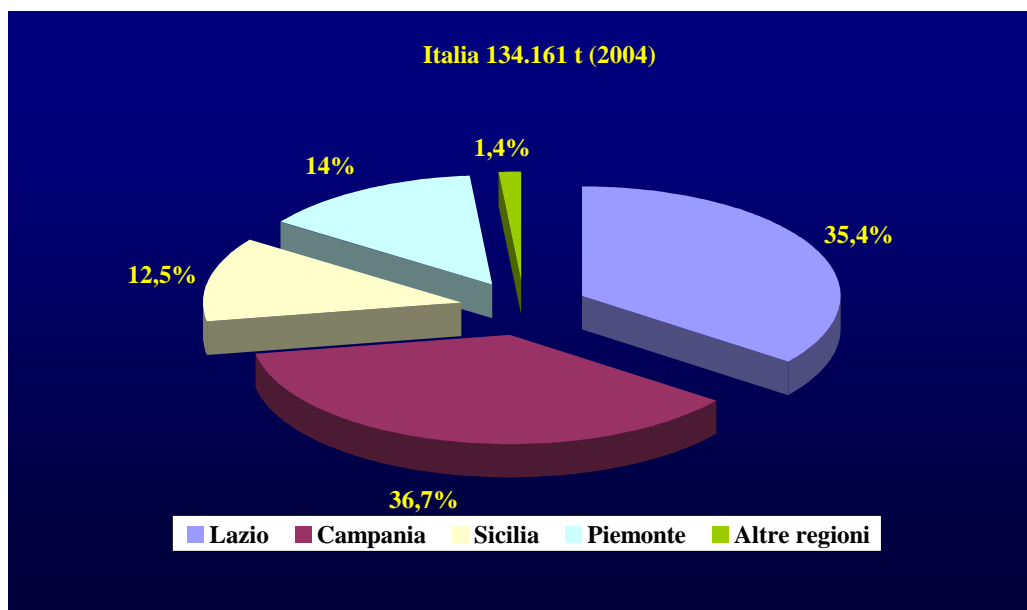
La produzione nazionale di nocciole ha subito un incremento notevole negli ultimi quaranta anni passando dalle 55.379 tonnellate nel 1961 alle 134.161 tonnellate nel 2004.

Nell'ambito regionale (Tab. I) le produzioni risultano così suddivise :

<b>Regione</b>	<b>Superficie Totale (ha)</b>	<b>Produzione per ha (t)</b>	<b>Produzione Totale (t)</b>	<b>Produzione (t)</b>
<b>Lazio</b>	18.996	3,35	62.973,6	50.724,1
<b>Campania</b>	22.872	2,37	53.613,4	52.672,9
<b>Piemonte</b>	9.519	2,25	20.036,6	20.036,6
<b>Sicilia</b>	15.146	1,19	18.002	17.945,4
<b>ITALIA</b>	68.623	2,32	156.730,6	143.355,9

**Tab. I. Superfici a nocciolo e produzioni nelle principali regioni italiane (fonte: ISTAT 2005).**

Con il 35,4% (Fig. 2) della produzione nazionale, il Lazio risulta essere nel 2004 al secondo posto in Italia dopo la Campania (36,7%), ma prima del Piemonte (14%) e della Sicilia (12,5%).



**Fig. 2 Produzione di nocciole in Italia nel 2004. (fonte: ISTAT).**

Caratteristica peculiare della corilicoltura laziale è la sua estrema concentrazione territoriale. Il 97% della produzione regionale è fornita dalla provincia di Viterbo (Tab.II), con una produzione che ha raggiunto nel 2004 le 49.075 tonnellate.

Viterbo è così da alcuni anni, con il 34% della produzione nazionale (nel 2004), la prima provincia italiana per produzione di nocciole, con 30 Comuni interessati e 15000 operatori coinvolti, anche se spesso part time (Bignami, 2002). Le enormi rese, che oggi superano le 3,5 t ad ettaro sono motivate sia dalle ottime condizioni pedoclimatiche della zona che dal miglioramento delle tecniche colturali.

Nelle restanti 4 province (Roma, Rieti, Frosinone, Latina) la coltivazione del nocciolo concorre per una produzione ed un'area irrilevante (ISTAT, 2005).

<b>Provincia</b>	<b>Superficie Totale (ha)</b>	<b>Produzione per ha (t)</b>	<b>Produzione Totale (t)</b>	<b>Produzione raccolta (t)</b>
<b>Viterbo</b>	17.543	3,52	61.061,7	49.075,3
<b>Rieti</b>	185	0,5	92,5	75
<b>Roma</b>	1.161	1,42	1.650,4	1.431,3
<b>Latina</b>	3	1	3	2,5
<b>Frosinone</b>	163	17,58	2.620	2.346

**Tab. II. Superfici a nocciolo e produzioni nelle province del Lazio (fonte: ISTAT 2005).**

Le cultivar più diffuse sono: Tonda di Giffoni, Mortarella e S. Giovanni in Campania; Tonda Gentile Romana e Nocchione nel Lazio, e Tonda Gentile delle Langhe in Piemonte (Bignami *et al.*, 1999).

### **I.1.3 La produzione corilicola nel Viterbese**

Nel viterbese, è investita a nocciolo una superficie di circa 18.000 ha, che rappresenta la quasi totalità della corilicoltura regionale, questa interessa quasi 12.000 aziende in 30 Comuni e costituisce così, sia in termini di superficie che di forza lavoro, un'attività agricola di primaria importanza.

Dal dopoguerra ad oggi c'è stato un incremento della produzione del nocciolo considerevole considerando che le superfici destinate a questa coltura si sono decuplicate. Questo fenomeno è riconducibile alle favorevoli condizioni pedoclimatiche

che caratterizzano la zona dei Monti Cimini che permettono di ottenere buone produzioni sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo. L'importanza della coltura del nocciolo nella provincia di Viterbo è stata riconosciuta anche a livello nazionale con l'insediamento presso la Camera di Commercio di Viterbo, su designazione di METEORA (Società per azioni promossa dal Sistema Camerale) della sede del Comitato Nazionale di Vigilanza sulla nocciola a cui sono assegnati importanti compiti di garanzia, trasparenza e promozione del prodotto. I principali problemi della produzione corilicola provinciale derivano dal confrontarsi con un mercato aperto a livello internazionale, nel quale il livello dei prezzi è fortemente influenzato dall'andamento del raccolto in Turchia, la cui concorrenza ha fatto crollare il prezzo negli ultimi anni di circa il 50%.

Vari, tuttavia sono i problemi del comparto e tra questi stanno assumendo particolare importanza quelli legati ai parassiti animali e vegetali che possono provocare notevoli danni alle colture, tra questi l'anisandro e una fitopatìa, denominata "moria".

A seguito del Piano di Miglioramento Aziendale presentato sul finire del 1997, l'associazione corilicola di Caprarola ASSOFRUTTI, dal 1998 ha iniziato ad usufruire di un indennizzo per l'estirpazione e successivo reimpianto delle piante morte a causa della "moria".

Successivamente questa iniziativa è stata tramutata in legge (n° 307 del 17/8/99), ed anche l'Associazione APRONVIT (Vico Matrino – Capranica), oggi usufruisce dei medesimi benefici, così come l'Associazione APNAL.

Il problema moria, come dimostrato dalle migliaia di piante estirpate, è quanto mai attuale e pertanto si presta ad un suo approfondimento volto a promuovere iniziative scientifiche, tecniche ed operative, aventi lo scopo di contribuire fattivamente ad un miglioramento della situazione fitosanitaria corilicola viterbese (Gianlorenzo, 2003).

## I.2 ANISANDRO E ALTRI FITOFAGI DEL NOCCIOLO

### I.2.1 *Anisandrus dispar* F. (Coleoptera, Scolytidae)

L'entomofauna rinvenibile su nocciolo è molto ricca di specie (Viggiani, 1984). Sulle branche affette da moria però sono stati riscontrati solo i coleotteri scolitidi *Xyleborinus saxesenii* Ratz, *Scolytus carpini* Ratz e *Anisandrus dispar* F.

*X. saxesenii*, coleottero di piccole dimensioni, attacca numerose specie arboree, ma con danni di scarsissimo rilievo in quanto si riproduce su piante deperite o morte per altre cause. Per tale ragione il suo ruolo è da escludere quale causa o concausa della moria. Anche *S. carpini* non rappresenta un problema come la specie precedente (Aloj *et al.*, 1987).

Tra i fattori coinvolti negli aspetti epidemiologici della moria, il sospetto di un ruolo dell'insetto scolitide *Anisandrus dispar* F. (Figg. 3a e 3b) è stato sempre ipotizzato (Paparatti com. pers.), ma sino ad oggi nessuno studio specifico era stato effettuato al riguardo (Balestra *et al.*, 2003).



Fig. 3a. Femmina di *Anisandrus dispar* F.



Fig. 3b. Vista ventrale di una femmina di *Anisandrus dispar* F. al S.E.M.

L'anisandro è un Coleottero Scolitide compreso nel gruppo ecologico conosciuto come “ambrosia beetles” (Omroa Bhagwandin, 1994).

Negli “ambrosia beetles”, o xilomicetofagi, si sono instaurate complesse simbiosi con funghi e batteri che permettono all'insetto di svilupparsi nei tessuti legnosi, notoriamente poveri di sostanze nutritive (Barras & Perry, 1975; Norris, 1975; 1979).

Negli xilomicetofagi le femmine scavano in profondità nel legno lunghe gallerie che si ramificano o dilatano a formare vere e proprie camere entro le quali verranno deposte le uova. Le larve non si cibano direttamente del legno, nutrimento assai povero, ma di funghi simbionti introdotti nell'albero ospite dalla madre. All'interno del legno vi sono infatti le ottimali condizioni di luce, temperatura e umidità per lo sviluppo dei funghi che tappezzano le pareti delle gallerie degli scolitidi. Al termine dello sviluppo larvale i nuovi adulti emergono dai sistemi riproduttivi ripercorrendo a ritroso le gallerie scavate dagli individui della generazione parentale. In questo modo, nutrendosi del micelio fungino presente, oltre a completare la maturazione delle gonadi, si imbrattano delle spore che poi trasporteranno in un nuovo albero ospite (Balachowsky, 1949; Chararas, 1962).

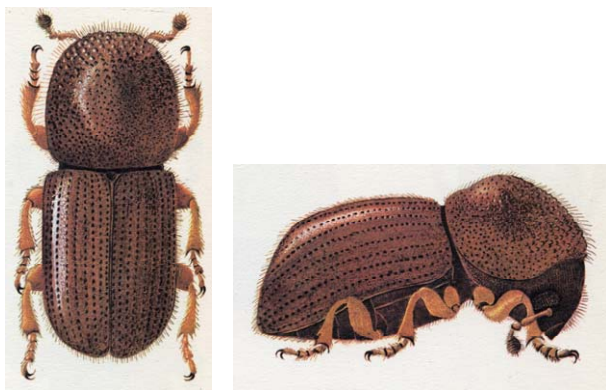
*A. dispar* è indubbiamente tra gli insetti più dannosi per il nocciolo ed attacca sia piante giovani e in buono stato vegetativo, sia piante deperite. Si può verificare anche una dannosità indiretta dovuta all'apertura di ferite con la trasmissione passiva di agenti patogeni che possono favorire l'insorgere di malattie (Viggiani *et al.*, 1979).

Questo Coleottero instaura una relazione ectosimbiontica con il fungo *Ambrosiella hartigii* Batra (Fungi Imperfecti) che introduce nelle piante ospiti (Omroa Bhagwandin, 1994). Il fungo viene trasportato in una tasca specializzata e coltivato sulle pareti delle gallerie materne.

Lo Scolitide sverna allo stato adulto all'interno delle gallerie scavate nelle piante infestate. Gli adulti di questo Coleottero Scolitide sono abbastanza caratteristici, soprattutto per lo spiccato dimorfismo sessuale.

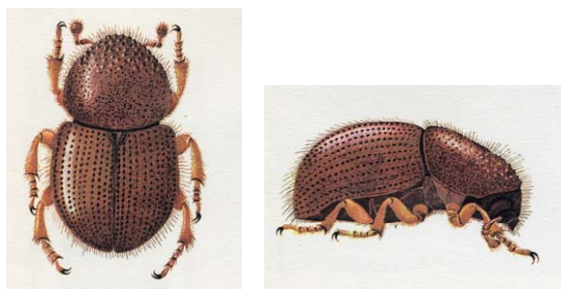
La femmina (Fig. 4) ha l'aspetto di un parallelepipedo ed è lunga circa 3,5 mm; il pronoto è di colore bruno-nerastro, lungo circa quanto largo, fortemente convesso, anteriormente arrotondato e provvisto di numerose piccole creste laminari dirette in alto e all'indietro, disposte a raggiera, a partire dal centro del pronoto medesimo; le elitre sono leggermente più chiare e brillanti, con serie longitudinali regolari di grossi punti

ravvicinati e con intervalli larghi, ciascuno con due file di setoline fini e giallicce; le antenne, i palpi e le zampe sono di colore ferrugineo chiaro.



**Fig. 4. Femmina di *Anisandrus dipar***  
(da: Novàk *et al.*, 1976).

Il maschio (Fig. 5), di forma rotondeggiante è dello stesso colore della compagna, è lungo circa 2 mm, ha il pronoto cordiforme, schiacciato ed inclinato in avanti e ornato di piccole carene poco rilevate; le elitre sono lunghe circa come il pronoto ed hanno la scultura simile a quella della femmina, ma con la peluria più lunga e grigiastra ai lati e mancante o quasi sul dorso; le ali membranacee sono assenti; le zampe sono relativamente più lunghe che nella femmina.



**Fig. 5. Maschio di *Anisandrus dispar***  
(da: Novàk *et al.*, 1976).

Le uova (Fig. 6), di colore bianco-giallastro, sono molto piccole, ovoidali, lunghe 0,8–0,9 mm e larghe 0,4 mm circa.



**Fig. 6.** Uova di *Anisandrus dispar* nella galleria di nocciolo.

Le larve (Fig. 7) sono subcilindriche e alquanto allungate, apode, biancastre, col capo bruno chiaro e relativamente piccolo, con il torace un po' ingrossato e l'addome gradualmente attenuato posteriormente; sono lunghe a maturità 4 mm circa.



**Fig. 7.** Larve di *Anisandrus dispar* nella galleria di nocciolo.

Le pupe (Fig. 8) che non sono protette da un involucro (anoiche) hanno un colore giallo-arancio e mostrano già il dimorfismo sessuale degli adulti (Solinas, 1966).



**Fig. 8.** Pupa di *Anisandrus dispar*.



Lo scolitide è diffuso in tutta la regione paleartica, dall'Atlantico al Pacifico, attraverso la Siberia, nonché in Nord Africa, Vicino e Medio Oriente. In Italia è presente in tutte le regioni (Pollini, 1998).

Le piante ospiti dell'anisandro sono numerosissime, sia fra le essenze forestali (querce, faggi, betulle, ontani, tigli, salici, frassini, platani, aceri, robinie, sambuco e perfino tuja e pino) che fra gli alberi e arbusti fruttiferi (melo, pero, pesco, albicocco, ciliegio, susino, noce, castagno, nocciolo, ribes e vite) (Solinas, 1966).

Osservazioni in campo indicano che gli "ambrosia beetles" sono stimolati a volare sopravvento e nella direzione della fonte in risposta ad un'attrazione di tipo olfattivo.

Il volo in *A. dispar* è effettuato dalle femmine pioniere in quanto i maschi sono incapaci di volare e spendono la loro intera vita nelle gallerie o in prossimità delle entrate di queste. Gli stimoli chimici attrattivi sono sostanze volatili prodotte dall'ospite, di cui il principale componente è l'etanolo. Le singole piante sono selezionate dall'insetto in questa prima fase di attacco sulla base del loro stato fisiologico. Se la pianta è in una fase di stress produce una quantità maggiore di etanolo. In caso di successo della prima fase di attacco, le femmine pioniere emettono feromoni di aggregazione. Questo feromone stimola le femmine a convergere in massa sull'ospite ed incominciare la colonizzazione (Omroa Bhagwandin, 1994).

Sembra possibile una migrazione delle femmine di qualche centinaio di metri a partire dall'essenza forestale verso nuovi ospiti ([www.faw.ch/shop/merkblaetter/m\\_009/009\\_f.htm](http://www.faw.ch/shop/merkblaetter/m_009/009_f.htm)).

Le femmine dell'insetto a partire dal mese di marzo (Moretti, 1994; Bucini *et al.*, 2004) fuoriescono scalarmente dalle gallerie e, avvenuto l'accoppiamento, infestano nuove piante.

La femmina scava una galleria con un breve tratto normale all'asse della pianta che decorre poi, a destra o a sinistra formando un semi anello intorno al cilindro legnoso (Fig. 9).



**Fig. 9. Galleria di *Anisandrus dispar* su nocciolo.**

Da questa, verso l'alto e il basso, partono gallerie parallele all'asse della branca o del fusto. Entro queste ultime l'insetto depone circa cinquanta uova. Le larve nascono dopo pochi giorni e si nutrono esclusivamente del micelio del fungo simbionte trasportato dalla femmina, che cresce all'interno delle gallerie. Raggiunta la maturità larvale in 30-40 giorni, si impupano. Questo stadio dura in media 15 giorni. Gli adulti neoformati restano entro le gallerie fino alla primavera successiva. L'insetto attacca preferibilmente i rami ed il fusto con diametro di 1-3 cm. I danni provocati sulle giovani piante, se intensi, possono portare a morte le stesse (Pollini, 1998).

Il contenimento delle infestazioni appare molto difficoltoso poiché l'insetto trascorre gran parte della vita dentro le gallerie scavate nei rami e nel tronco delle piante ospiti.

E' innanzi tutto buona norma tagliare e bruciare i rami deperiti, entro i quali sono presenti le covate o gli adulti, o eliminare l'intera pianta nei casi più gravi al fine di sopprimere pericolose fonti d'infestazione (Pollini, 1998).

La lotta chimica appare improponibile a causa del lungo periodo di volo dell'adulto (marzo-giugno).

### **I.2.2 Acaro Eriofide galligeno o “Bufone”**

L'Eriofide galligeno delle gemme (*Phytoptus avellanae* Nal.) è un acaro di piccolissime dimensioni che penetra nelle gemme del nocciolo non appena esse si formano in primavera e le trasforma lentamente in galle (Viggiani, 1979). Durante

l'inverno l'acaro si trova in numero notevole soprattutto sotto forma di femmine ovideponenti nelle gemme trasformate in false galle. Si tratta di gemme ipertrofiche con tutti gli elementi morfologici trasformati in squame carnose (Viggiani *et al.* 1984). Con la ripresa vegetativa, all'apertura delle squame carnose delle galle, si assiste alla migrazione dell'Eriofide nelle nuove gemme in formazione (Bianco *et al.*, 2002). Le gemme infestate dall'acaro sono perdute (Viggiani, 1979). Le infestazioni di Eriofide galligeno delle gemme possono creare danni al nocciolo, sia in termini di produttività che di sviluppo delle piante. Queste ultime in impianti giovani possono essere seriamente compromesse.

### **1.2.3 *Xyleborinus saxesenii* Ratz. (Coleoptera, Scolytidae)**

All'*Anisandrus dispar* si associa sovente un altro Scolitide, di piccole dimensioni, denominato *X. saxesenii* Ratz. Il maschio è simile alla femmina, è di colore bruno scuro con le zampe giallastre, ma più stretto ed allungato. Come l'anisandro attacca numerose piante, comprese alcune conifere (*Pinus sylvestris*, *Cedrus atlantica*), ma i danni provocati sono di scarso rilievo poiché l'insetto si riproduce solo su piante deperite o morte per altre cause. La femmina di *X. saxesenii* scava una galleria di penetrazione che raggiunge il legno e quindi si biforca in una o due branche trasversali opposte, ove sono deposte le uova. Anche questa specie è associata ad un fungo del gruppo "*Ambrosia*" che si sviluppa nelle gallerie larvali. La comparsa degli adulti avviene un poco più in ritardo rispetto ad *A. dispar*. Compie una sola generazione l'anno (Viggiani, 1984).

### **1.2.4 *Balaninus nucum* L. (Coleoptera, Curculionidae)**

L'insetto che nel Lazio può essere considerato il fitofago chiave della coltura, è il Balanino [*Balaninus nucum* L. (Coleoptera, Curculionidae)] (Paparatti, 1990). Questo coleottero è dotato di un lungo rostro che nella femmina è lungo quanto la restante parte del corpo. Gli adulti si nutrono praticando numerose punture di alimentazione sulle giovani noccioline (Bianco, 2002). Questa attività del Balanino provoca danni di rilievo. Si è osservato che una femmina per nutrirsi può danneggiare anche 150 noccioline. Avvenuto l'accoppiamento la femmina depone un uovo, generalmente nel terzo basale del frutto quando il guscio non è ancora indurito (Viggiani *et al.*, 1979). Le larve si nutrono del seme, svuotando completamente la nocciolina (Bianco, 2002). A maturità le

larve lasciano il frutto caduto al suolo, si approfondiscono nel terreno dove preparano una celletta terrosa in cui si impupano per un periodo che varia da 1 a 3 anni prima di trasformarsi in un nuovo adulto (Viggiani *et al.* 1979).

#### **I.2.5 Maggiolino (*Melolontha melolontha* L.); Aplidia (*Haplidia etrusca* Kraatz); Anomala (*Anomala juni* Duft) (Coleoptera, Scarabaeidae)**

Il maggiolino (*Melolontha melolontha* L.) può risultare localmente dannoso al nocciolo. E' un coleottero scarabeide di medie dimensioni, circa 2 cm. Ha una generazione ogni tre anni. Gli adulti sono defogliatori molto attivi e le larve rizofaghe (Viggiani *et al.*, 1984). Gravi sono i danni causati dalle larve che vivono nel terreno nutrendosi a spese del capillizio radicale. Due o tre larve di Maggiolino possono causare la morte di una pianta di nocciolo. Inoltre, le ferite causate alle radici possono favorire la diffusione del marciume radicale.

L'Aplidia (*Haplidia etrusca* Kraatz) e l'Anomala (*Anomala juni* Duft), hanno una sola generazione l'anno e rispetto al Maggiolino risultano di dimensioni inferiori, misurando circa 1,5 cm (Bianco *et al.*, 2002). Anche queste due specie sono molto dannose allo stato larvale, poiché possono danneggiare irrimediabilmente l'apparato radicale soprattutto delle piante giovani (Viggiani, 1979).

#### **I.2.6 Il Cerambicide del nocciolo (*Obera linearis* L.) (Coleoptera, Cerambycidae)**

L'adulto ha il corpo nero stretto e lungo. Compie erosioni fogliari in corrispondenza delle nervature fogliari.

Le larve di questo insetto, subcilindriche e giallastre, scavano gallerie longitudinali nei rametti che disseccano. Non provocano danni di rilievo (Viggiani, 1979).

#### **I.2.7 Cimici nocciolaie (Rhynchota, Heteroptera Coreidae e Pentatomidae)**

Le cimici nocciolaie sono insetti che si possono trovare nel nocciolo da fine maggio a inizio giugno; il mese di luglio quello nel quale si può riscontrare la massima presenza delle forme giovanili (Bianco *et al.*, 2002). Il fenomeno è ben noto e studiato da tempo, diffuso ovunque la coltivazione sia presente (Süss, 1997). I danni causati dalle cimici sono di due tipi: l'aborto (o vuoto traumatico) e il cimiciato. Il primo si verifica quando la puntura avviene nelle prime fasi di sviluppo del seme

determinandone l'aborto traumatico; il cimiciato si ha quando la puntura avviene a seme ormai sviluppato. Esso si rileva sezionando il seme. Le noccioline "cimiciate" presentano delle aree marginali del seme più chiare in corrispondenza delle aree raggiunte dagli stiletti delle cimici (Viggiani, 1979). Il cimiciato determina l'alterazione del gusto caratteristico delle noccioline, che assume un sapore amarognolo. Le noccioline così danneggiate sono praticamente incommestibili e vengono scartate anche dall'industria dolciaria (Bianco *et al.*, 2002). Tra le più comuni cimici nocciolaie si ricordano: il Gonocero *Gonocerus acuteangulatus* Goeze, la cimice verde *Palomena prasina* L., la cimice verdognola *Piezodorus lituratus* F., la cimice grigiastra *Raphigaster nebulosa* Poda e la cimice verdognola *Nezara viridula* L. (Viggiani, 1979). Le cimici nocciolaie svernano nello stadio adulto in ripari vari (siepi di piante sempreverdi, piante spontanee, anfrattuosità di costruzioni rurali, etc.), da cui fuoriescono in primavera. In autunno le cimici ritornano nei ricoveri di svernamento. Solo il Gonocero depone le uova esclusivamente sul nocciolo, principalmente sulle brattee del frutto; su quest'ultimo si alimentano sia gli adulti sia le forme giovanili. Le altre specie possono deporre le uova sul nocciolo, ma gli stadi giovanili si portano su piante spontanee per alimentarsi e quindi ritornano sul nocciolo solo quando hanno raggiunto gli ultimi stadi preimmaginali (Viggiani, 1979).

#### **I.2.8 Afidi (Rhynchota, Homoptera)**

Le specie afidiche più diffuse che infestano il nocciolo sono l'Afidone verde [*Corylobium avellanae* (Shrank)] e l'Afide piccolo cremeo [*Myzocallis coryli* (Goeze)].

La prima specie attacca soprattutto i polloni e i teneri germogli, mentre la seconda si può trovare anche su foglie completamente sviluppate o addirittura prossime alla caduta autunnale. Allo stato attuale queste specie sono sufficientemente contenute da diversi predatori e parassiti naturali. (Viggiani, 1979).

#### **I.2.9 La Falena invernale (*Operophtera brumata* L.) (Lepidoptera, Geometridae)**

Gli adulti di questa farfalla presentano uno spiccato dimorfismo sessuale in quanto le ali delle femmine (brachittere) sono ridotte a dei moncherini frangiati mentre il maschio presenta ali anteriori di colore nocciola con linee traverse più scure e ali posteriori più chiare.

Gli adulti fuoriescono dal terreno ove le larve si erano incrisalidate entro un bozzolo sericeo l'anno precedente. Le femmine si portano camminando sui tronchi delle piante ove i maschi le ricercano e le fecondano. Quindi, proseguono la salita verso i rami più alti deponendo lungo il percorso circa 300 uova isolate od in gruppi di 2 o 3. Le larve compaiono alla ripresa vegetativa delle piante e raggiunta la maturità verso maggio si lasciano cadere appese ad un filo sericeo sul terreno per poi incrisalidarsi per un periodo che a volte è di due anni.

I danni sono causati dalle erosioni di gemme , fiori, germogli e foglie (Pollini, 1998).

#### **I.2.10 Il Rodilegno giallo (*Zeuzera pyrina* L.) (Lepidoptera, Cossidae)**

Essendo questo lepidottero altamente polifago lo troviamo presente quasi ovunque. Attacca infatti piante arboree sia da frutto che da legno oltre a numerose arbustive ad eccezione delle conifere.

Gli adulti di questo lepidottero, una farfalla biancastra con numerose piccole macchie nerastre sulle ali, compaiono a fine maggio e continuano a volare sino ad ottobre. Le femmine depongono diverse centinaia di uova, anche 1000 – 2000, sulla corteccia di branche e del tronco, in vecchie gallerie scavate nella corteccia e perfino nel terreno. Le larve neonate tessono inizialmente un nido sericeo in cui restano raggruppate per 1 – 2 giorni, dopo di che migrano verso l'estremità dei rametti (Viggiani, 1979).

I danni sono causati dalle larve che penetrano all'interno della pianta. Il punto di attacco è di solito la nervatura principale delle foglie da dove attraverso il picciolo giungono al germoglio che risulta così irrimediabilmente compromesso. Segue poi lo scavo di una galleria all'interno della zona midollare dei rami e del tronco sempre con direzione ascendente. E' questo comportamento a determinare forti deperimenti vegetativi e la rottura dei rami indeboliti sotto l'azione del vento (Pollini, 1998).

### **I.3 LA MORIA E ALTRE FITOPATIE DEL NOCCIOLO**

Sulla base di precedenti approfondite indagini fitopatologiche sul territorio (Viggiani, 1979; Viggiani *et al.* 1984; Granata, 1985; Varvaro, 1993) è oggi possibile avere un quadro completo sulla presenza e diffusione delle principali malattie crittogamiche nei noccioli del viterbese. Le più importanti e/o frequenti fitopatie riscontrate fino ad oggi sono state riportate in seguito.

#### **I.3.1 La moria del nocciolo**

Le avversità, le malattie ed i fitofagi del nocciolo sono numerosi (Noviello, 1968; Viggiani, 1984). Negli ultimi vent'anni nell'area corilicola dei Colli Cimini si è verificato un deperimento più o meno progressivo delle piante di nocciolo che, a volte, ha assunto proporzioni preoccupanti e, data la repentinà dell'evoluzione sintomatologica, la fitopatia venne chiamata "moria" (Aloj *et al.*, 1987).

Fin dal 1976 nel nord della Grecia fu notata una malattia di origine batterica che andava seriamente diffondendosi causando disseccamenti di branche e rami. Il batterio agente causale della malattia, il cui quadro sintomatologico fu denominato cancro batterico del nocciolo, sulla base di saggi biochimici fu identificato inizialmente come *Pseudomonas* sp. (Psallidas *et al.* 1979), qualche anno più tardi fu classificato come *P. syringae* pv. *avellanae* (Psallidas, 1984). Sulla base di ulteriori approfonditi ed estesi studi di tassonomia batterica (analisi dei plasmidi, profilo degli acidi grassi, analisi delle proteine, ibridazione DNA/DNA, sequenziamento della regione ipervariabile del ribosoma 16S, caratterizzazione biochimica, fisiologica, nutrizionale e colturale) fu riclassificato come *Pseudomonas avellanae* (Janse *et al.*, 1996).

A partire dagli anni '80 in una delle aree a maggior densità corilicola della provincia di Viterbo comparve una malattia che si manifestava con sintomi simili a quella descritta da Psallidas in Grecia.

Nel 1985 la Regione Lazio ha costituito, in base alla legge regionale 27/78, art. 5, una Commissione di studio con il compito d'indagare sulle cause della "moria" del nocciolo dei Colli Cimini e di fornire eventuali indicazioni necessarie per il controllo dell'alterazione. Gli studi in merito hanno permesso di escludere che funghi, virus, insetti, nematodi o fattori biotici (avversità climatiche, terreni compatti, composizione

chimica anomale del terreno, valori estremi di pH), possano essere ritenuti tra gli agenti causali della “moria” del nocciolo (Aloj *et al.*, 1994).

La malattia fu associata a un batterio appartenente alle *Erwiniae* del gruppo *amylovora* (Varvaro *et al.*, 1990; Varvaro, 1992; Varvaro, 1993) e successivamente la stessa patologia fu anche ascritta a *Pseudomonas avellanae* (Scortichini *et al.*, 1994).

Questa patologia di origine batterica (Aloj *et al.*, 1994) incide notevolmente sulla produzione corilicola viterbese. I primi sintomi della malattia compaiono in primavera. Nelle prime fasi dell'infezione le branche presentano una crescita stentata e le foglie sono di colore verde pallido, cosicché riesce molto facile individuarle (Fig. 10).



**Fig. 10. Sintomi iniziali di Moria su piante di nocciolo cv Tonda Gentile Romana in provincia di Viterbo.**

In estate le branche infette seccano e le loro foglie ed eventualmente i frutti presenti rimangono attaccati (Fig. 11) anche dopo la caduta autunnale delle foglie sane (Aloj *et al.*, 1994; Varvaro, 1994). Le piante colpite, nel giro di poco tempo vanno incontro a morte.





**Fig. 11. Disseccamenti di rami e branche di nocciolo affetti da Moria.**

L'epidermide delle piante affette dalla malattia può presentare delle aree idropiche ed umide al tatto; sezionando le branche in corrispondenza di tali aree si possono osservare imbrunimenti della zona corticale e del cambio (Varvaro, 1994; Varvaro *et al.*, 1990).

Anche sull'apparato radicale si possono evidenziare delle necrosi ed un annerimento della corteccia che risulta priva di capillizio. La necrosi può estendersi anche alla ceppaia e da qui alle branche sane. Le piante malate o morte emettono, normalmente, polloni apparentemente sani e vigorosi che comunque sono anch'essi destinati a morire entro 2-3 anni (Varvaro, 1987; Varvaro 1994; Varvaro *et al.*, 1990; Aloj *et al.*, 1994).

Il batterio penetra nella pianta prevalentemente in autunno attraverso le cicatrici fogliari non ancora suberificate in concomitanza di forti temporali accompagnati da vento. Una volta penetrato il batterio si moltiplica diffondendosi in senso basipeto per via sistemica nell'albero durante i mesi invernali. Durante questo periodo si assiste all'avvizzimento degli amenti maschili che non raggiungono la fase di apertura e la formazione del polline (Scortichini, 1998).

In seguito, in concomitanza del risveglio vegetativo il batterio migra verso l'alto aiutato dal flusso ascendente della linfa grezza (Scortichini, 1996).

Durante la primavera il batterio può penetrare nelle piante in seguito alle gelate tardive che provocano ferite da gelo. I danni più considerevoli sono causati

prevalentemente in seguito alle gelate primaverili di fine marzo-aprile, quando il risveglio vegetativo è iniziato da poco. Va ricordato che nell'area dei colli Cimini le gelate primaverili sono piuttosto frequenti (6 anni su 10, secondo le rilevazioni statistiche) e le temperature minime possono raggiungere i  $-5^{\circ}\text{C}$ . Quando per più giorni consecutivi le minime termiche scendono al di sotto di  $0^{\circ}\text{C}$ , si possono osservare fenditure longitudinali anche molto allungate (Scortichini, 1992).

La fase “latente” può durare per un periodo molto lungo, anche anni, senza che si avvertano esternamente i sintomi della malattia.

Nel caso in cui il patogeno si moltiplichi e si diffonda nel periodo invernale, si possono osservare in primavera, nel giro di poche settimane, avvizzimenti di rami, branche e interi alberi. Nel caso in cui la moltiplicazione del batterio avvenga in primavera la morte repentina della pianta si osserva in piena estate.

Oltre alle modalità d'infezione primarie menzionate, il batterio può penetrare nelle piante in seguito a tutte le operazioni colturali che provocano ferite alla pianta (lavorazioni del terreno che possono danneggiare i tronchi, spollonature, etc.) contribuendo alla diffusione del patogeno, soprattutto nei periodi caratterizzati da notevole umidità ambientale (primavera e tardo autunno) (Scortichini, 1998).

Tra i fattori abiotici che sembrano essere correlati con la moria del nocciolo la piovosità, le temperature (soprattutto la frequenza e i valori degli eventi minimi), le caratteristiche del suolo e alcune pratiche agronomiche, quali per esempio l'irrigazione, influiscono notevolmente sulla predisposizione e sull'incidenza della malattia (Fabi *et al.*, 2004).

Anche l'acidità del suolo, sembrerebbe svolgere un ruolo significativo. Nei Colli Cimini esistono aree dove l'acidità del terreno raggiunge valori vicini a pH 4. L'elevata acidità è sempre associata ad un aumento di alluminio nel complesso assorbente del terreno. Quando l'alluminio è presente in maniera elevata come catione scambiabile nel suolo, questo può passare molto facilmente in soluzione inibendo la crescita del capillizio radicale, bloccando o riducendo l'assorbimento del fosforo, dell'acqua, del calcio, del magnesio e del potassio (Foy *et al.*, 1978; Malquori, 1979).

Negli ultimi dieci anni a causa di questa batteriosi, sono state espiantate più di 15.000 piante per un totale di oltre 400 ha sui circa 20.000 ha coltivati a nocciolo in provincia di Viterbo, soprattutto nella zona dei Colli Cimini (Fabi *et al.*, 2004).

Un ruolo importante nella diffusione del batterio potrebbe essere rivestito dagli insetti, in particolare dal Coleottero Scolitide *Anisandrus dispar* F. che scavando gallerie sul fusto e sulle branche di piante anche in buone condizioni vegetative potrebbe trasportare cellule batteriche anche su vaste aree (Balestra *et al.*, 2003, Bucini *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda la lotta, gli unici prodotti al momento efficaci per il controllo delle batteriosi del nocciolo sono quelli a base di rame. Il periodo migliore per intervenire è quello autunnale, alla caduta delle foglie, in primavera alla ripresa vegetativa, ed immediatamente dopo violenti temporali e gelate tardive (Vuono *et al.*, 2002, 2003; Balestra, 2003; Balestra *et al.*, 2004).

### **I.3.2 Batteriosi del nocciolo**

L'agente responsabile è *Xanthomonas arboricola (campestris)* pv. *corylina* (Miller *et al.*) Dye. Il batterio attacca gemme, frutti, rami e foglie. Sulle foglie e sulla cupula dei frutti compaiono macchie irregolari brunastre (Varvaro, 1993). Sui rami e/o sui tronchi possono formarsi aree necrotiche, depresse, dalle quali fuoriesce un essudato (Granata, 1985). Le parti più colpite vanno soggette a morte (Viggiani, 1984).

### **I.3.3 Mal dello stacco**

L'agente causale è *Cytospora corylicola* Sacc. Il fungo si insedia su piante vecchie e che vegetano stentatamente a causa di cattive condizioni di coltivazione, attacchi parassitari, ecc. (Bianco, 2002); attacca i tessuti corticali e successivamente passa a quelli legnosi. Le prime manifestazioni esterne della malattia consistono in macchie irregolari, di colore bruno con sfumature rossastre sulla corteccia dei tronchi e branche infette. All'esterno della corteccia si sviluppano in condizioni di umidità favorevoli, grumetti vitrei di colore rosso-rubino, costituiti dai conidi del parassita (Viggiani, 1979). La resistenza della zona colpita risulta compromessa cosicchè un'azione meccanica qualsiasi (per es. il vento) può determinare la rottura di rami e branche (Varvaro, 1993).

### **I.3.4 Marciume radicale fibroso**

L'agente causale è il fungo *Armillaria mellea* (Vahl. Ex Fr.) Kummer. Il sintomo iniziale della malattia è dato da vegetazione stentata e foglie che ingialliscono e disseccano. Le piante colpite, progressivamente disseccano completamente (Bianco, 2002).

Sotto la corteccia delle grosse radici e della zona del colletto si nota un feltro miceliare compatto di colore bianco (Varvaro, 1993). In autunno, se le condizioni sono favorevoli, al piede delle piante malate nascono i funghi comunemente chiamati “chiodini” che sono i corpi fruttiferi di *A. mellea* (Bianco, 2002).

### **I.3.5 Seccume fogliare**

L'agente responsabile è il fungo *Labrella coryli* (Desm. E Rab.) Sacc. Sulle foglie compaiono delle aree necrotiche, rotondeggianti dapprima verde scuro, poi bruno rossastre. Le chiome delle piante colpite vanno precocemente incontro a filloptosi (Varvaro, 1993).

### **I.3.6 Mal bianco**

L'agente causale è il fungo *Phyllactinia guttata* (Wallr. ex Fr.) Lev. Sulla pagina superiore delle foglie compaiono delle aree clorotiche, in corrispondenza delle quali, sulla pagina inferiore sono presenti aree coperte da un micelio biancastro.

Le foglie colpite si staccano e possono verificarsi defogliazioni molto anticipate (Viggiani, 1979).

### **I.3.7 Stigmatosi**

E' una malattia causata da diverse specie fungine quali: *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Phomopsis* spp. (Vannini com. per.). Le nocciole colpite presentano un guscio integro ma leggermente imbrunito; i semi appaiono necrotici, brunastri e possiedono un gusto amaro (Varvaro, 1993).

### **I.3.8 Marciume bruno dei frutti**

La malattia è causata dal fungo *Monilia fructigena* (Aderh. E Ruhl.) Honey. I frutti interessati dalla sintomatologia presentano un imbrunimento delle brattee e del

pericarpo dell'achenio. L'infezione provoca la cascola prematura dei frutti che possono rimanere anche attaccati sulla pianta (Granata, 1985; Cecchini *et al.*, 2002).

### **I.3.9 Cancro del nocciolo**

La malattia è causata dal fungo ascomicete polifago *Nectria ditissima* Fr. Si manifesta con depressioni imbrunite della corteccia dei rami già in primavera. La corteccia interessata dall'alterazione si fessura e si ha la formazione di cancri. Infezioni gravi possono portare a morte più o meno velocemente il ramo o l'intera pianta. Sugli organi morti, in condizioni di elevata umidità, in autunno compaiono dei cuscinetti stromatici di colore giallognolo.

### **I.3.10 Botrite**

L'agente patogeno è il fungo *Botrytis cinerea* Pers. Le nocciole che hanno il guscio ancora non lignificato, assumono rapidamente il colore della maturità e presentano il caratteristico micelio grigiastro del fungo. La penetrazione di quest'ultimo nelle nocciole è favorito soprattutto dalle ferite praticate dal Balanino (Viggiani, 1984).

### **I.3.11 Macchie brune**

Si tratta di un'alterazione di natura abiotica a carico delle branche e del tronco. Si manifesta con macchie bruno scuro di forma circolare che possono interessare ampie porzioni del tronco, soprattutto nel tratto basale. I tessuti al di sotto delle macchie imbruniscono e si possono osservare essudati acquosi che fuoriescono dalle zone alterate. L'albero non muore e solitamente riesce a circoscrivere l'alterazione nel giro di uno o due anni.

## **II. PARTE SPERIMENTALE**

### **II.1 Scopo del lavoro**

Dal 2002, la Regione Lazio, in collaborazione con le associazioni corilicole della provincia di Viterbo, ha finanziato un progetto sulla moria del nocciolo. L'obiettivo di questo Dottorato di ricerca è stato quello di chiarire la biologia di *A. dispar* e il suo coinvolgimento (diretto e/o indiretto) nella epidemiologia della moria nonché verificare l'influenza dell'ambiente sulla biologia dell'insetto e sullo sviluppo della malattia.

I campionamenti sono stati effettuati all'interno di aree in cui l'incidenza della malattia è risultata molto alta. La sperimentazione è stata concentrata quindi in noccioli situati all'interno e all'esterno della caldera del Lago di Vico in particolare nei comuni di Caprarola e Capranica (Viterbo).

## II.2 MATERIALI E METODI

### II.2.1 Analisi dei dati climatici

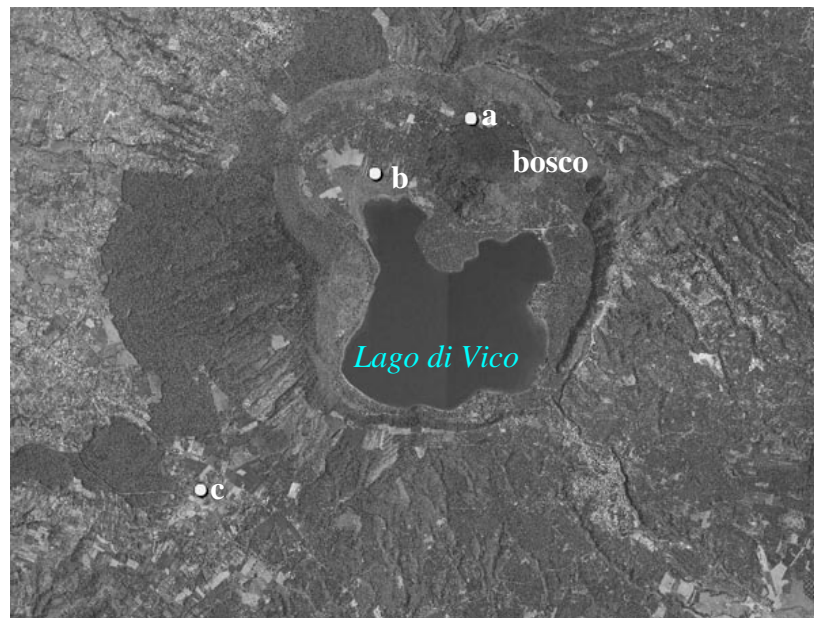
Nelle due aree in cui è stata condotta la sperimentazione sono stati elaborati ed analizzati i dati relativi ai parametri climatici (temperatura minima, massima e piovosità) di principale interesse in relazione allo scopo del lavoro.

Il rilevamento dei dati è stato effettuato settimanalmente con apposite capannine meteorologiche. I dati sono stati forniti grazie alla collaborazione con Assofrutti e A.R.S.I.A.L.

Per evidenziare eventuali differenze climatiche, significative nei siti sperimentali, i dati (giornalieri ed orari) sono stati elaborati in modo da ottenere le temperature minime e massime medie e la piovosità durante i mesi di campionamento.

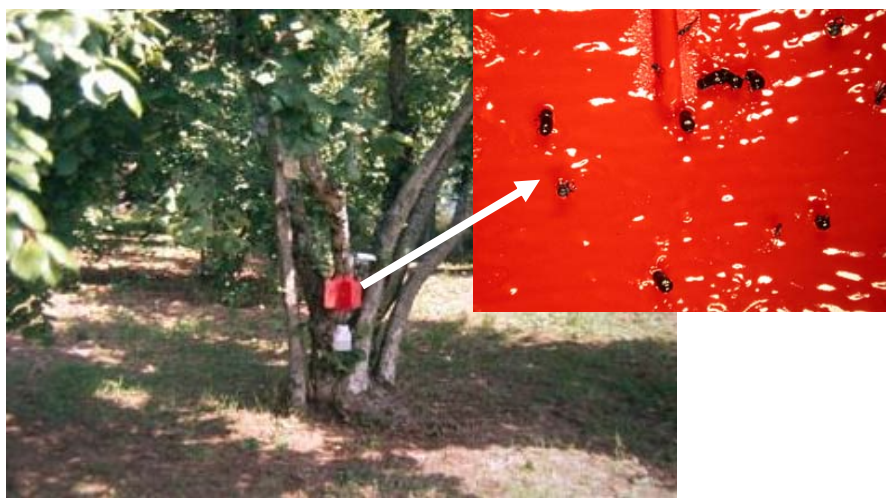
### II.2.2 Campionamenti di *A. dispar*

I campionamenti effettuati nel corso del 2003 sono stati eseguiti in due noccioleti (“a”, “b”) con piante mostranti i tipici sintomi della moria, situati all’interno della caldera del Lago di Vico nel comune di Caprarola (Viterbo) (Fig. 12).



**Fig. 12.** Immagine satellitare dei noccioleti sperimentali nei Comuni di Caprarola (“a” e “b”) e di Capranica (“c”).

Durante questo primo anno di campionamento, sulle piante scelte per la sperimentazione, sono state installate 5 trappole chemio-cromotropiche Rebell® rosso (Fig. 13) prodotte dalla Station Fédérale de Recherches en arboriculture, viticulture et horticulture de Wädenswil (Svizzera), specifiche per la cattura delle femmine di *A. dispar*. Queste sono state innescate con alcool etilico e toluolo all'1%; la miscela è stata poi diluita con acqua al 50%. Le trappole sono state invischiate con colla non idrosolubile (Temocid della Ditta Kollant di Padova).



**Fig. 13. Trappola tipo Rebell® rosso e particolare delle femmine invischiate morte.**

Le trappole sono state installate il 12 (nocchioleto “a”) e il 19 marzo 2003 (nocchioleto “b”) e controllate con cadenza settimanale. Ad ogni controllo, le trappole utilizzate, sono state portate in laboratorio allo scopo di scollare, contare e preparare entomologicamente gli insetti catturati.

Nel corso del 2004 e del 2005 sono stati effettuati i campionamenti all'interno della caldera del lago di Vico solo nel nocchioleto “a” (località Canale, comune di Caprarola) e un altro nocchioleto fuori la caldera, in località Vico Matrino nel comune di Capranica (“c”) (Viterbo) (Fig. 12).

Durante il secondo e il terzo anno di campionamento sono state utilizzate 15 trappole del tipo Mastrap® L della ditta ISAGRO (Fig. 14) [specifiche per la cattura della processionaria del pino, *Traumatocampa pityocampa* (Den. & Schiff)] modificate dal nostro gruppo di ricerca per la cattura delle femmine vive di anisandro. La modifica è consistita sia nel colorare di rosso (attraente per lo Scolitide) le alette interne della trappola stessa che nel forare il contenitore di raccolta degli insetti ed applicare sul foro



una rete plastica al fine di permettere all'acqua meteorica di fuoriuscire dalla trappola stessa.



**Fig 14. Trappola tipo Mastrap® L e particolare delle femmine catturate vive.**

Le trappole sono state installate all'interno dei noccioleti oggetto d'indagine, sia in zone con piante apparentemente sane sia in zone con piante sofferenti. La scelta delle tesi Sano e Malato è stata effettuata utilizzando sia foto aeree dei due noccioleti sperimentali che indagini in campo. Entrambi i noccioleti sono stati suddivisi in due aree corrispondenti alla tesi Sano (dove apparentemente non erano evidenti sintomi riconducibili alla fitopatia) e alla tesi Malato (area in cui c'era la presenza di piante con i tipici sintomi della moria o in cui erano presenti reimpianti di piante precedentemente morte a causa della malattia) (Fig. 15). Le aree sono state definite in base all'incidenza (percentuale di reimpianti e di piante sintomatiche) e alla distribuzione spaziale della malattia (numero di trapianti e di piante sofferenti) all'interno dei noccioleti. E' risultato che nel noccioleto "a" nella tesi Sano (circa 1,4 ettari) su un totale di circa 560 piante l'incidenza era di circa il 10%. Nella tesi Malato (circa 0,9 ettari) invece, su un totale di 340 piante l'incidenza risultava essere approssimativamente del 77%. Nel noccioleto "c" nella tesi Sano (circa 2,5 ettari) su un totale di circa 1000 piante l'incidenza era di circa il 11% . Nella tesi Malato (circa 2,6 ettari), su un totale di 1040 piante risultava un'incidenza pari a circa il 45%. Considerata la notevole polifagia dell'insetto, sono state posizionate anche 3 trappole all'interno del bosco (tesi Bosco; dove sono presenti:

cerro, faggio, castagno, acero, carpino, orniello e olmo) adiacente al nocciolo “a” (Fig. 15).

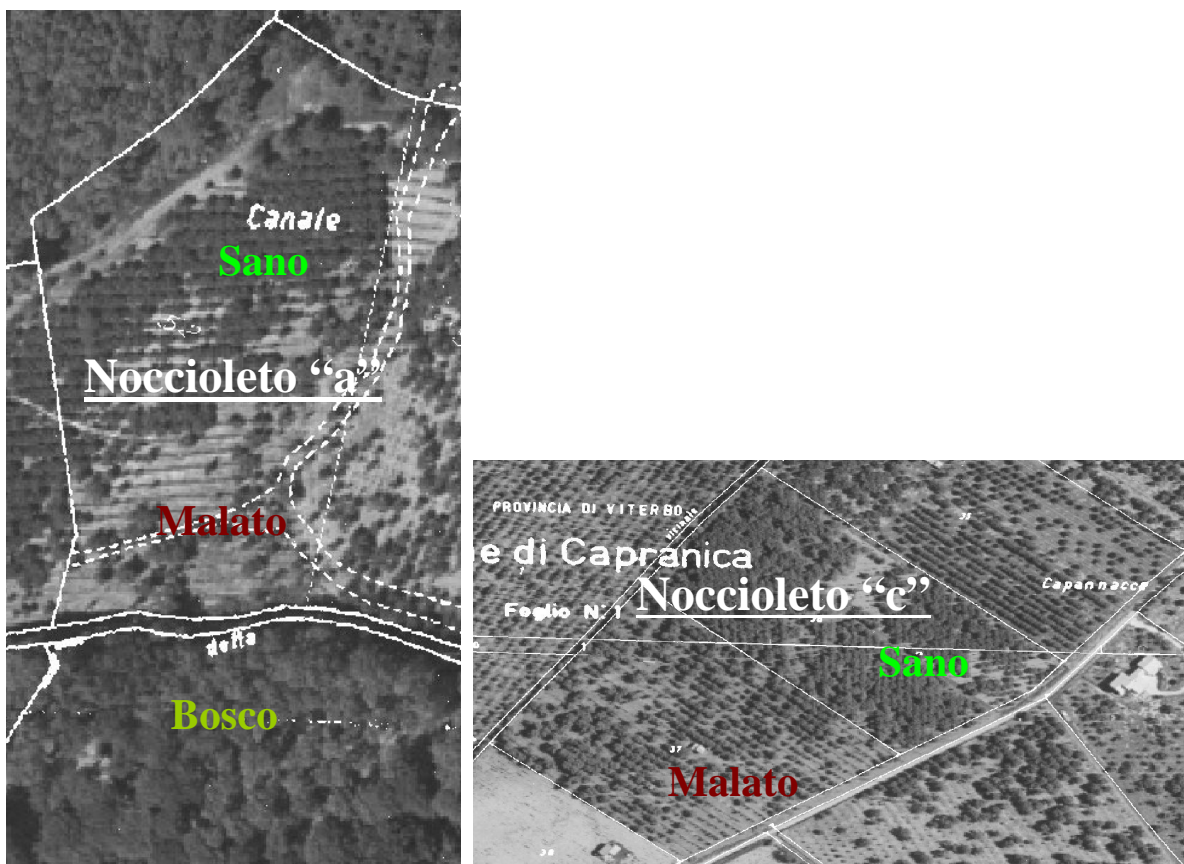


Fig. 15. Foto aerea del nocciolo “a” e “c” con le rispettive aree “Sano” e “Malato”.

### II.2.3 Ciclo biologico e voli giornalieri

Durante i tre anni di sperimentazione, con cadenza settimanale, sono stati effettuati monitoraggi riguardanti il ciclo biologico dell’insetto. Si è operato incidendo e aprendo, in modo opportuno, le gallerie scavate dall’insetto nelle piante di nocciolo situate all’interno delle aree sperimentali controllando lo stadio di sviluppo dello scolitide.

Nel nocciolo “a”, il 28 e 29 aprile 2005, durante il periodo di massima presenza in campo dell’insetto sono state installate e monitorate per l’intero arco delle 24 ore ulteriori 3 trappole del tipo Rebell® rosso. I controlli, effettuati con cadenza oraria, sono iniziati alle ore 6:00 a.m. del 28 aprile e sono terminati la stessa ora del giorno seguente. Questa operazione è stata effettuata allo scopo di individuare l’andamento dei voli delle femmine di *A. dispar* nell’arco delle 24 ore

## II.2.4 Spermateca

Allo scopo di appurare se le femmine di anisandro si accoppiano all'interno o all'esterno delle gallerie di riproduzione sono state prelevate e osservate, nel corso del 2005, le spermateche di femmine prelevate sia all'interno delle gallerie prima della fuoriuscita che dopo (febbraio-marzo).

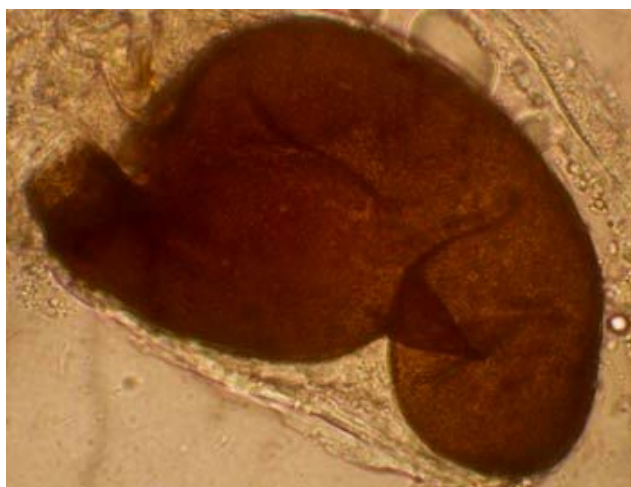
La spermateca è un ricettacolo dove gli spermatozoi vengono conservati fino alla loro utilizzazione, anche per lungo tempo, e mantenuti in vita o dalle secrezioni ghiandolari situate nelle pareti della spermateca o dal secreto di particolari ghiandole (ghiandole spermofile) (Servadei *et al.*, 1972). Durante il mese di febbraio e di marzo 2005, nei due noccioli sperimentali, sono state catturate all'interno delle gallerie femmine dello scolitide ancora in fase di svernamento. La stessa operazione è stata ripetuta nei mesi di marzo e aprile in seguito alla fuoriuscita degli adulti dalle gallerie. I campioni sono stati portati in laboratorio e le femmine sono state sezionate al fine di estrarne la spermateca (Fig. 16).



**Fig. 16. Estrazione della spermateca da femmine di *Anisandrus dispar*.**

Una volta estratta, questa è stata posta su di un vetrino portaoggetti (Fig. 17) sul quale era stata aggiunta una goccia di soluzione fisiologica al 5% di NaCl. Successivamente è stato posizionato il vetrino coprioggetti ed esercitata una leggera pressione su di esso al fine di rompere la spermateca. Questa è stata osservata al microscopio ottico (Axioskop, Zeiss) per individuare l'eventuale presenza di spermatozoi. Sono state prelevate all'interno delle gallerie ed esaminate in laboratorio, in totale, 20 femmine tra il mese di febbraio e i primi giorni del mese di marzo. Durante

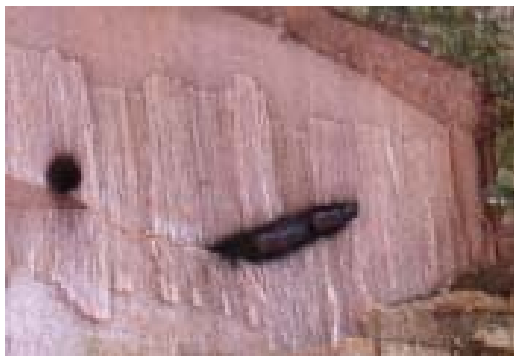
il mese di marzo e aprile sono state esaminate 20 femmine fuoriuscite dalle gallerie e catturate con le trappole Mastrap<sup>®</sup> L.



**Fig. 17. Spermateca di *Anisandrus dispar* al microscopio ottico.**

#### **II.2.5 Isolamento, identificazione e conservazione della microflora batterica**

Nel corso del 2003, è stata eseguita la cattura “manuale” dei diversi stadi di sviluppo dell’insetto (larve, pupe e femmine adulte) presenti in piante di nocciolo sofferenti. Questa operazione, finalizzata all’isolamento della microflora batterica presente esternamente e/o internamente allo Scolitide, è stata effettuata utilizzando attrezzi sterilizzati tagliando e/o incidendo localmente le branche o i fusti delle piante in campo, in corrispondenza dei fori praticati dalle femmine (Fig. 18). I campioni prelevati con questa tecnica sono stati portati, in provette sterili, in laboratorio per eseguire gli isolamenti batterici. Questa operazione è stata effettuata dal 5 maggio sino al 30 giugno 2003.



**Fig. 18. Adulti all’interno delle gallerie su piante di nocciolo.**

Durante il secondo e il terzo anno di ricerca è stato possibile, grazie alle nuove trappole utilizzate (Mastrap<sup>®</sup> L), analizzare la microflora presente su un più elevato numero di insetti. Le femmine adulte di *A. dispar* utilizzate, provenienti ogni volta dalle differenti aree di studio (“a”, “c” e bosco), sono state analizzate a gruppi di 10.

In tutte e tre le annate, per l’isolamento della microflora presente esternamente, gli insetti sono stati lavati in un opportuno volume di acqua distillata sterile (1 ml x ogni insetto) e posti in agitazione orbitale a 100 giri/minuto per 2 ore a 25°C. Successivamente, 0,1 ml della soluzione ottenuta dal lavaggio, è stata piastrata su un substrato nutritivo agarizzato contenente il 5% di saccarosio (ANS) in 5 aliquote. Queste piastre sono state poste in incubazione per 48 ore a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e quindi, mediante stereomicroscopio, le colonie batteriche sviluppatesi sul substrato nutritivo sono state descritte, contate, il loro numero mediato, e purificate. Queste sono state infine conservate su un substrato nutritivo agarizzato contenente il 2% di glicerolo (ANG) a 4°C.

Per l’isolamento della microflora interna all’insetto si è proceduto alla disinfezione esterna in una soluzione di NaClO al 3% per 3 minuti. Successivamente, in condizioni di sterilità, ogni insetto è stato sciacquato 2 volte con acqua distillata sterile e omogeneizzato con un pestello in 1 ml di acqua distillata. Per ogni insetto (o gruppo) sono state quindi piastrate singolarmente su ANS 5 aliquote da 0,1 ml dell’omogeneizzato. Le piastre ottenute sono state quindi incubate in un termostato per 48 ore a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e osservate sotto stereomicroscopio. Anche le colonie batteriche ottenute dagli isolamenti interni all’insetto sono state descritte morfologicamente, contate, il loro numero mediato e conservate su ANG a 4°C (Natali *et al.*, 1994).

Il conteggio delle u.f.c./insetto ottenute sia dagli isolamenti della microflora esterna che interna all’insetto è stato effettuato sulle piastre in cui era possibile contare tra 30 e 300 colonie (Meynell e Meynell, 1970). Su ANS venivano quindi studiate le tipologie batteriche considerate “più frequenti”, ossia quelle che venivano individuate durante tutti i campionamenti effettuati nei tre anni di ricerca (2003-2005).

In seguito, per l’identificazione, tutte le colonie batteriche ottenute sono state sottoposte a saggi morfologici, fisiologici, biochimici e molecolari ed infine conservate a  $-80^\circ\text{C}$ .

Durante il primo anno di campionamento (2003) grazie alla collaborazione con il Dott. J. L. Vanneste (Hort Research, Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand), le colonie batteriche isolate da *A. dispar* (interno/esterno) sono state sottoposte dal suo gruppo di ricerca all'analisi molecolare con i primer del 16S rDNA.

## II.2.6 Substrati colturali

Durante la sperimentazione sono stati utilizzati i seguenti substrati colturali:

- substrato agarizzato nutritivo al 5% di saccarosio (**ANS**);
- substrato agarizzato nutritivo al 2% di glicerina (**ANG**);
- substrato agarizzato nutritivo al 1% di D-glucosio (**AND**);
- substrato B di King (King *et al.*, 1954) (**KB**);
- substrato **2A di Thornley** (1960);
- **YDC**
- **T.S.I.**
- **LB**
- **BUG**

Questi substrati presentano le seguenti composizioni per litro e modalità di preparazione:

- **ANS** (substrato per la crescita):

Nutrient Broth	8 g
Saccarosio	50 g
Agar tecnico	18 g
Acqua distillata	1000 ml

La miscela dopo essere stata sciolta sull'agitatore magnetico con piastra riscaldante è stata sterilizzata in autoclave a 121°C per 20 minuti. Successivamente il substrato è stato posto in un bagno termostato fino a raggiungere una temperatura di 50°C.

Infine, in condizioni di sterilità, è stato versato in piastre Petri da 10 cm di diametro fino a formare uno strato di 3-4 mm. Le piastre, avvenuta la solidificazione, sono state conservate a temperatura ambiente.

- **ANG** (substrato di crescita e di conservazione):

Nutrient Broth	8 g
Glicerina	20 g
Agar tecnico	18 g
Acqua distillata	1000 ml

Per la crescita, il substrato è stato preparato con le stesse modalità descritte per l'ANS.

Per la conservazione delle colonie batteriche, il substrato, dopo essere stato sciolto a caldo, è stato distribuito in tubi da batteriologia in ragione di 5 ml per tubo o in vials in ragione di 1,5 ml ciascuna.

Successivamente i tubi sono stati sterilizzati in autoclave a 121°C per 15 minuti e, infine, lasciati raffreddare in posizione inclinata per permettere la solidificazione del substrato a “becco di clarino”.

- **AND** (substrato di crescita per il saggio dell'ossidasi):

Nutrient Broth	8 g
D-Glucosio	10 g
Agar tecnico	18 g
Acqua distillata	1000 ml

Il substrato è stato preparato con le stesse modalità descritte per l'ANS.

- **KB** (substrato per evidenziare la produzione di pigmenti fluorescenti):

Glicerina	10 g
Bacto triptone	10 g
Proteose peptone	10 g
Fosfato potassio diidrogeno	1,5 g
Magnesio solfato	1,5 g
Agar	15 g
Agar tecnico N. 3 Oxoid	10 g
Acqua distillata	1000 ml

Il substrato è stato preparato con le stesse modalità descritte per l'ANS.

- **Thornley 2A** (substrato di crescita per il saggio dell'arginina deidrolasi):

Proteose peptone	1 g
Cloruro di sodio	5 g
Fosfato potassio di idrogeno	0,3 g
Agar tecnico	3 g
Rosso fenolo	0,01 g
Arginina HCl	10 g
Acqua distillata	1000 ml

Al substrato, dopo essere stato sciolto a caldo, è stato aggiunto acido cloridrico 1N al fine di portare il pH a 7,2 ed è stato distribuito in tubi da batteriologia, in ragione di 5 ml per tubo. I tubi, poi, sono stati sterilizzati in autoclave a 121°C per 10 minuti e, subito dopo la solidificazione del substrato, sono stati posti in stufa per due ore per eliminare l'eventuale condensa formatasi.

- **YDC** (substrato di conservazione per le *Enterobacteriaceae*):

Destrosio	20 g
Estratto di Lievito	10 g
CaCO <sub>3</sub>	20 g
Agar tecnico	12 g
Acqua distillata	1000 ml

Il substrato è stato preparato con le stesse modalità descritte per l'ANG in tubi.

Per evitare la precipitazione del carbonato di calcio, i tubi sterilizzati, contenenti il substrato, sono stati posti nel bagnetto termostato fino a raggiungere la temperatura di 46°C, agitati nel vortex e rapidamente posti inclinati, per ottenere il “becco di clarino”, in una vaschetta contenente ghiaccio. Il substrato è stato conservato a 4°C in frigorifero.



- **T.S.I.** (Triple sugar iron agar):

Peptone da caseina	15 g
Peptone da carne	5 g
Estratto di carne	3 g
Estratto di lievito	3 g
Cloruro di sodio	5 g
Lattosio	10 g
Saccarosio	10 g
D(+) – Glucosio	1 g
Ammonio ferro (III) citrato	0,5 g
Tiosolfato di sodio	0,5 g
Rosso fenolo	0,024 g
Agar-agar	12 g
Acqua distillata	1000 ml

Il substrato è stato preparato con le stesse modalità descritte per l'ANG in tubi.

- **LB** (Brodo di crescita e di conservazione a – 80°C):

NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Estratto di lievito	5 g
Acqua distillata	1000 ml

Il substrato liquido è stato preparato con le stesse modalità utilizzate nella preparazione di ANG in tubi.

- **BUG** (substrato per l'analisi del profilo nutrizionale):

Bug Agar (Biolog 70101)	57 g
Acqua distillata	1000 ml

Il substrato è stato preparato con le stesse modalità descritte per l'ANS.

### **II.2.7 Conservazione degli isolati batterici a -80°C**

Al fine di conservare per un lungo periodo i ceppi batterici più caratteristici si è scelto di congelarli a -80°C. Si è proceduto preparando due soluzioni (Schaad, 1988).

Nella soluzione n° 1 sono stati miscelati 7 ml di LB (par. II.2.6) e 3 ml di glicerolo sterili.

Nella soluzione n° 2, costituita da LB sterile in tubi da batteriologia, sono stati fatti crescere i batteri per una notte a 28°C tenendoli in agitazione. Infine sono stati miscelati, all'interno di eppendorf, 0,5 ml della soluzione n° 1 con 0,5 ml della soluzione n° 2 ed il campione è stato riposto rapidamente nel congelatore a -80°C.

### **II.2.8 Saggi biochimici e fisiologici**

Al fine di identificare le colonie batteriche isolate dall'anisandro durante la sperimentazione, è stato ritenuto di fondamentale importanza saggiare le colonie sia utilizzando saggi diagnostici di tipo tradizionale che utilizzare il metodo di identificazione biochimica Microlog System Biolog.

Le colonie saggiate sono state solamente quelle ritenute, in seguito a prove preliminari (morfologiche, biochimiche e molecolari), potenzialmente coinvolte nella moria.

Tra i numerosi saggi diagnostici di tipo tradizionale, sono stati scelti quelli che permettevano, nel modo più rapido e semplice, e sulla base di precedenti lavori (Psallidas, 1993; Varvaro, 1994) (Tab. III) di individuare le principali caratteristiche delle colonie batteriche isolate dall'insetto.

Ciascun saggio è stato effettuato su batteri in fase esponenziale di crescita. Operativamente questo è stato ottenuto effettuando un prelievo di patina, in condizioni di sterilità, da ogni isolato selezionato, precedentemente conservato in frigorifero a 4°C. Quindi la patina batterica è stata strisciata su ANS e posta ad incubare in termostato a 25°C per 48 ore. Da questa è stata poi effettuata una seconda sottocoltura su ANG che è stata nuovamente posta ad incubare a 25°C per 24 ore.

<b>COLONIA</b> <b>SAGGI</b>	<i>Pseudomonas avellanae</i> (Psallidas, 1993)	<i>Erwinia</i> del gruppo <i>amylovora</i> (Varvaro, 1994)
Levano	+(a)	m
Ossidasi	-	-
Patata	-	w
Catalasi	+	w
Arginina Deidrolasi	-	
King B	+	-
Tabacco	+	

**Tab. III. Profilo biochimico e fisiologico di *P. avellanae* e del patogeno del nocciolo appartenente alle *Erwiniae* gruppo *amylovora*.**

<sup>(a)</sup> + = reazione positiva; - = reazione negativa; w = reazione debole; m = colonia mucosa.

## II.2.9 Saggi diagnostici classici

Per il lavoro di ricerca effettuato, sono stati utilizzati ceppi batterici isolati da *A. dispar* (interno e/o esterno). Per i controlli (positivi e negativi) dei vari saggi effettuati sono stati utilizzati isolati batterici appartenenti alla batterioteca della sezione di Patologia Vegetale del Dipartimento di Protezione delle Piante della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi della Tuscia di Viterbo.

Sulla base dei risultati preliminari ottenuti sono state scelte 17 colonie rappresentative, isolate dall'insetto, riportate nella Tabella IV:

<b>Numero identificativo della colonia</b>	<b>Data isolamento</b>	<b>Isolamento Interno/Esterno Insetto</b>	<b>Località/Tesi</b>	<b>Sigla originale</b>
<b>1</b>	5.4.04	Interno	Canale/Sano	5.4.04 VS <i>Int.</i> B
<b>2</b>	5.4.04	Interno	Vico Matrino/Malato	5.4.04 M <i>Int.</i> A
<b>3</b>	5.4.04	Esterno	Vico Matrino/Malato	5.4.04 M <i>Ex</i> A
<b>4</b>	17.5.04	Interno	Canale/Sano	17.5.04 VS <i>Int.</i> A
<b>5</b>	26.4.04	Interno	Canale/Malato	26.4.04 VM <i>Int.</i> A
<b>6</b>	26.4.04	Esterno	Vico Matrino/Malato	26.4.04 M <i>Ex</i> C
<b>7</b>	26.4.04	Esterno	Vico Matrino/Sano	26.4.04 S <i>Ex</i> B
<b>8</b>	10.5.05	Interno	Canale/Malato	10.5.04 VM <i>Int.</i> A
<b>9</b>	16.5.05	Interno	Bosco	16.5.05 Bosco <i>Int.</i> A
<b>10</b>	18.4.05	Esterno	Canale/Malato	18.4.05 VM <i>Ex</i> C
<b>11</b>	21.3.05	Esterno	Canale/Malato	21.3.05 VM <i>Ex</i> B
<b>12</b>	6.6.05	Esterno	Canale/Sano	6.6.05 VS <i>Int.</i> A
<b>13</b>	26.4.05	Esterno	Vico Matrino/Sano	26.4.05 S <i>Ex</i> A
<b>14</b>	26.4.05	Interno	Bosco	26.4.05 Bosco <i>Ex</i> A
<b>15</b>	22.3.04	Esterno	Vico Matrino/Malato	22.3.04 M <i>Est.</i> A
<b>16</b>	26.4.04	Interno	Vico Matrino/Malato	26.4.04 M <i>Int.</i> A
<b>17</b>	2.5.05	Esterno	Vico Matrino/Sano	2.5.05 S <i>Ex</i> A
<b>18</b>	4.4.05	Esterno	Vico Matrino/Sano	4.4.05 S <i>Ex</i> A

**Tab.IV. Colonie batteriche utilizzate durante la sperimentazione.**

Le colonie batteriche utilizzate per il controllo sono di volta in volta elencate.

I saggi diagnostici classici effettuati sono di seguito riportati:

- **saggio di solubilità in KOH;**
- **fluorescenza su substrato B di King;**
- **formazione di colonie levaniformi su ANS;**
- **ossidasi;**
- **catalasi;**
- **saggio della marcescenza su fettine di patata;**
- **arginina deidrolasi;**
- **ipersensibilità su tabacco;**
- **T.S.I.**

### II.2.9.1 Saggio di solubilità in KOH

Questo metodo, descritto per la prima volta nel 1938 (Ryu, 1938), rappresenta un'alternativa alla colorazione di Gram in quanto consente di distinguere rapidamente i batteri (Gram positivi e Gram negativi) trattati con una soluzione al 3% di idrossido di potassio. Questa soluzione è in grado di distruggere rapidamente la parete cellulare dei Gram negativi, e ciò si manifesta con un aumento della viscosità della soluzione stessa.

Su un vetrino portaoggetti opportunamente pulito, è stata posta una goccia della soluzione di idrossido di potassio (KOH al 3% in acqua distillata sterile). Mediante un'ansa sterilizzata, è stata prelevata un po' di patina batterica che è stata strisciata sul vetrino fino ad ottenere un miscuglio omogeneo. Nel caso di Gram negativi il miscuglio risulta essere filamentoso (Fig. 19).

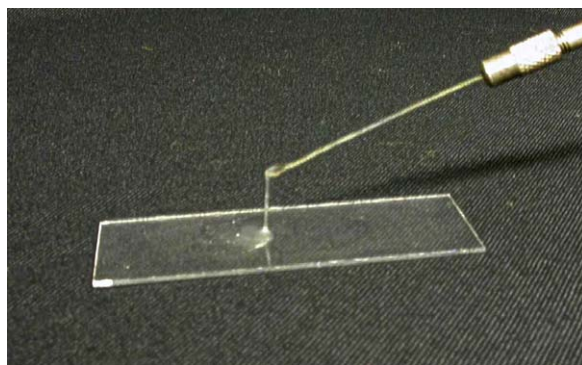


Fig. 19. Saggio di solubilità in KOH.

In questa prova è stato utilizzato come controllo Gram positivo il batterio *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cm21); come controllo Gram negativo *Pseudomonas viridiflava* (NCPBP 3225).

### II.2.9.2 Fluorescenza su substrato B di King

Diverse specie batteriche, appartenenti al genere *Pseudomonas*, sono in grado di produrre una sostanza chiamata fluoresceina. Si tratta di un pigmento fluorescente (celeste o verde), che si manifesta sotto l'effetto dei raggi UV (365 nm), coltivando i batteri su un particolare terreno di coltura (King *et al.*, 1954).

Utilizzando un'ansa sterile è stato effettuato un prelievo di patina da ciascuna coltura batterica selezionata e quindi strisciata su terreno B di King (par. II.2.6). Le piastre sono state poste ad incubare in termostato a 25°C per 24-48 ore ed infine osservate sotto i raggi di una lampada UV (mod. Chromato-VUE® C-70G) (Fig. 20).



**Fig. 20. Fluorescenza su substrato B di King.**

In questa prova è stato utilizzato come controllo negativo *C. m. subsp. michiganensis* (Cm21) come controllo positivo *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (NCPBP 2365).

### **II.2.9.3 Formazione di colonie levaniformi su ANS**

Il levano è un polisaccaride extracellulare (polimero del  $\beta$ -D-fruttosio) prodotto da molte specie batteriche fluorescenti, appartenenti al genere *Pseudomonas*. Questi batteri, grazie all'azione dell'enzima levano saccarasi, sono in grado di scindere il saccarosio nei suoi due zuccheri semplici: glucosio e fruttosio. Il primo viene utilizzato come fonte di carbonio mentre il fruttosio viene polimerizzato all'esterno della cellula formando così la capsula di levano.

Questa caratteristica è messa in evidenza dalla particolare morfologia delle giovani colonie levaniformi (Fig. 21) che appaiono mucose e con un distinto innalzamento convesso (a cupola) (Klement *et al.*, 1990).



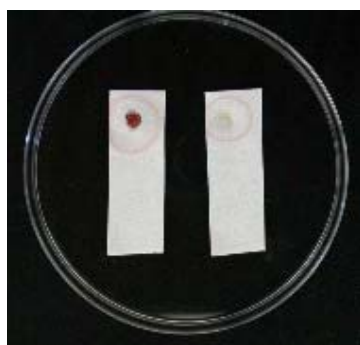
**Fig. 21. Colonie levaniformi su ANS.**

Le colonie batteriche strisciate su ANS (par. II.2.6) sono state poste ad incubare in termostato a 25°C per un periodo variabile da 2 a 5 giorni, osservando allo stereomicroscopio le caratteristiche morfologiche delle singole colonie.

In questo saggio è stato utilizzato come controllo negativo *C. m.* subsp. *michiganensis* (Cm21) mentre come controllo positivo *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (NCPPB 2365).

#### II.2.9.4 Saggio dell'ossidasi

In alcuni batteri è stata riscontrata la presenza di un enzima, la citocromo ossidasi, che ha il compito di trasferire gli elettroni all'ossigeno. Quest'ultimo, infatti, rappresenta l'accettore finale di elettroni in alcune catene di trasporto di energia. Pertanto l'enzima ossidasi agisce come riduttore del citocromo consentendo il trasferimento di energia. La presenza dell'enzima nella cellula batterica, è rilevabile mediante l'impiego di sostanze, di solito tetrametil-p-fenilendiammina dicloridrato, che agiscono come donatori di elettroni nei confronti dell'enzima. Il reagente è posto su un pezzetto di carta assorbente dove, successivamente, è strisciato il batterio: se la carta assorbente diventa color porpora, il test è positivo, cioè è avvenuta l'ossidazione (Klement *et al.*, 1990) (Fig. 22).



**Fig. 22. Saggio dell'ossidasi.**

Per effettuare il saggio dell'ossidasi i batteri selezionati anziché fatti crescere su ANG, sono stati strisciati su AND (par. II.2.6) e posti ad incubare per 24 ore a 25°C come per i precedenti saggi. Al termine di tale periodo, mediante un'ansa di platino sterile, è stata prelevata della patina batterica che è stata strisciata su carta da filtro impregnata con la soluzione acquosa all'1% (peso/volume) di tetrametil-p-fenilendiammina dicloridrato.

Per il suddetto saggio è stato utilizzato come controllo positivo *Pseudomonas fluorescens* (NCPBP 3008); per il controllo negativo è stato utilizzato *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (NCPBP 2365).

#### **II.2.9.5 Catalasi**

La catalasi è un enzima capace di decomporre il perossido di idrogeno ad acqua ed ossigeno. Per effettuare questo saggio è stata aggiunta una goccia di una soluzione al 3% di perossido di idrogeno direttamente sulla colonia batterica cresciuta su ANG (par. II.2.6). Nel caso di esito positivo la colonia saggiata manifesta effervescenza (Klement *et al.*, 1990). Come controllo positivo è stato utilizzato *Pseudomonas avellanae* (NCPBP 4226).

#### **II.2.9.6 Saggio della marcescenza su fettine di patata**

Un certo numero di batteri, tra cui diverse specie del genere *Pseudomonas*, è in grado di causare marciumi molli su vari organi carnosì delle piante. La pectolisi delle fette di patata non è di per sé un saggio di patogenicità, ma rappresenta un valido strumento tassonomico per individuare potenziali patogeni.

Per eseguire il saggio (Dickey *et al.*, 1988) sono stati utilizzati comuni tuberi di patata sani, lavati accuratamente per eliminare eventuali residui di terra. Operando in condizioni di sterilità questi sono stati prima disinfettati con alcool etilico e passati su fiamma, poi sbucciati e tagliati a fette dello spessore di 7-8 mm. Le fette così ottenute, sono state poste in piastre Petri sterili di vetro, contenenti carta bibula imbevuta di acqua distillata sterile e, sul lato superiore di ciascuna fetta, è stata praticata un'incisione. Qui sono state inoculate le colonie batteriche selezionate per il saggio.

Le piastre sono state incubate e tenute sotto osservazione per 48 ore, al fine di rilevare la presenza di marcescenza (Fig. 23).





**Fig. 23. Saggio della marcescenza su patata.**

Il saggio è stato eseguito utilizzando come controllo negativo il batterio *C. m. subsp. michiganensis* (Cm21); il controllo positivo selezionato è stato *Pseudomonas viridiflava* (NCPPB 3225).

#### **II.2.9.7 Saggio dell'arginina deidrolasi**

Questo saggio consente di rilevare la presenza di due enzimi che permettono, ad alcuni batteri del genere *Pseudomonas*, di crescere in condizioni anaerobiche. Il sistema enzimatico di questi batteri produce ATP dalla degradazione dell'arginina con formazione di  $\text{CO}_2$  e  $\text{NH}_3$ . Il saggio, in particolare, rileva la reazione alcalina dovuta alla presenza dell'  $\text{NH}_3$ : il colore del substrato vira da rosa all'arancione-rosso (Klement *et al.*, 1990) (Fig. 24).



**Fig. 24. Saggio dell'arginina deidrolasi.**

Dalla sospensione batterica di  $10^8$  u.f.c./ml è stata ottenuta, mediante diluizione decimale, una sospensione di  $10^7$  u.f.c./ml. A questo punto, una goccia di sospensione batterica di ciascun isolato selezionato, è stata posta in tubi di vetro sterili contenenti il substrato di Thornley 2A (par. II.2.6).

Sul substrato di ciascun tubo, è stato praticato, mediante una lancetta sterile, un foro per consentire alla sospensione batterica di penetrare all'interno del substrato stesso e, in un secondo momento, sono stati aggiunti 3 ml di olio di vaselina sterile. I tubi sono stati posti in termostato a 25°C e controllati giornalmente.

Il controllo negativo utilizzato è stato *C. m. subsp. michiganensis* (Cm21); il controllo positivo utilizzato è stato *Pseudomonas viridiflava* (NCPB 3225).

#### **II.2.9.8 Saggio dell'ipersensibilità su tabacco**

La reazione di ipersensibilità è un meccanismo di difesa attiva che la pianta mette in atto nei confronti di un organismo patogeno. Essa consiste in una risposta immediata della pianta all'infezione attraverso la morte dei tessuti invasi dal patogeno il quale viene così circoscritto in una zona necrotica molto limitata (Klement, 1982) (Fig. 25).



**Fig. 25. Prova dell'ipersensibilità su tabacco.**

Gli isolati selezionati per la prova sono stati preparati in modo da poter raggiungere una concentrazione di inoculo sufficiente a scatenare la reazione di ipersensibilità sulla pianta di tabacco.

I batteri in fase esponenziale di crescita sono stati posti in tubi da centrifuga sterili, sospesi in 6 ml di acqua distillata sterile e centrifugati a 12.000 rpm, per 10 minuti alla temperatura di 8°C (Vidaver *et al.*, 1977). Eliminato il surnatante, è stato sospeso di nuovo il centrifugato in 5 ml di acqua distillata sterile. Prelevando 3 ml di sospensione si è proceduto, tramite un turbidimetro (Spectronic 21 Mylton Roy Company), ad una lettura della densità ottica a 600 nm. Con le opportune diluizioni è stata ottenuta una concentrazione di  $1 \times 10^8$  u.f.c./ml corrispondente ad una densità ottica di 0,13 (Varvaro e Surico, 1978).

La sospensione batterica di  $10^8$  u.f.c./ml di ogni isolato batterico, scelto per il saggio, è stata iniettata mediante una siringa da insulina con ago da 0,3 x 13 mm, nel parenchima fogliare di piantine di tabacco della cv White Burley allo stadio di quarta-quinta foglia vera (Klement, 1963). Osservando le piante dopo 24 ore è stato possibile verificare la presenza o meno di aree necrotiche nelle porzioni di foglia inoculate.

Il controllo negativo utilizzato è stato *C. m. subsp. michiganensis* (Cm21); il controllo positivo saggiato è stato *Pseudomonas viridiflava* (NCPFB 3225).

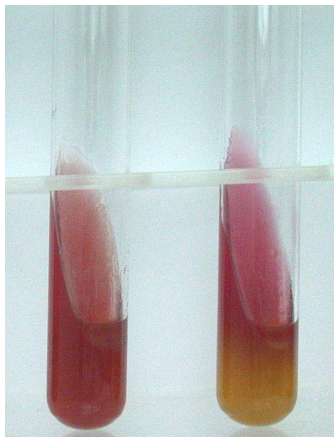
#### **II.2.9.9 T.S.I.**

Il T.S.I. (par. II.2.6) è un substrato utilizzato per l'identificazione di enterobatteri Gram-negativi (Sulkin *et al.*, 1940). Il terreno misura l'abilità di un batterio ad utilizzare tre zuccheri: glucosio, saccarosio e lattosio alle concentrazioni di 0,1%, 1% e 1% rispettivamente. Un indicatore di pH incluso nel substrato rende visibile la produzione di acidi dalla fermentazione di questi carboidrati. Un viraggio del colore del terreno, inizialmente rosso scuro, al giallo indica una reazione acida (A) mentre una reazione alcalina (K) è indicata da un non cambiamento del colore del substrato (Edwards *et al.*, 1972).

Per il saggio si è operato strisciando con l'ansa sterile un po' di patina batterica sullo slant del terreno e forandolo poi nella parte bassa del tubo. Il terreno è poi stato posto ad incubare a 30°C per 48 ore.

Se lo slant del TSI mostra una reazione K/K (slant alcalino/ porzione basale alcalino) o K/A<sup>W</sup> (slant alcalino/porzione basale debolmente acido), il microrganismo saggiato è un non-enterobatterio.

Se lo slant del TSI mostra una reazione A/A (acido/acido) o K/A (alcalino/acido), il microrganismo saggiato è un enterobatterio (Fig. 26).



**Fig. 26. Saggio del T.S.I.  
(Triple Sugar Iron Agar).**

Per il suddetto saggio è stato utilizzato come controllo positivo (enterobatterio): *Brenneria quercina* (NCPBP 1852); come controllo negativo (non-enterobatterio): *Pseudomonas avellanae* (NCPBP 4226).

#### **II.2.10 Microlog System Biolog**

Tale metodo si basa sull'utilizzo di una serie di 95 fonti di carbonio da parte del microrganismo.

La sospensione microbica viene inoculata in microplates a 96 pozzetti a fondo piatto ognuno contenente una fonte di carbonio differente. L'eventuale utilizzo del substrato è evidenziato da una reazione redox a carico di un indicatore che riducendosi cambia colore. I sali di tetrazolio (Bochner, 1989) possono, infatti, essere utilizzati come indicatori colorimetrici dell'attività respiratoria a livello cellulare. L'ossidazione biologica di un substrato organico da parte di un microrganismo origina NADH ridotto. Se gli elettroni sono donati ad una catena di trasporto, il sale di tetrazolio può funzionare come accettore finale artificiale, riducendosi e formando un prodotto colorato, il formazano.

Dopo un idoneo periodo di incubazione sulla base dei test biochimici risultati positivi o negativi si ricava il profilo biochimico del microrganismo. La lettura della piastra colorata viene eseguita tramite uno spettrofotometro per piastre a 96 pozzetti in grado di leggere alla lunghezza d'onda di circa 590 nm (specifica per il tipo di colorazione del sale di tetrazolio utilizzato). Ad ogni ceppo batterico saggiato corrisponde un profilo metabolico (o profilo di utilizzo dei substrati). La somiglianza o l'equivalenza del profilo ottenuto, con i profili registrati in un database della Biolog Inc., permette di risalire al genere, alla specie del batterio o, nella migliore delle ipotesi, alla pathovar.

I database disponibili riguardano microrganismi gram positivi e gram negativi sia aerobi che anaerobi, lieviti, muffe e contengono profili biochimici di più di 2100 microrganismi.

Il suddetto metodo di identificazione è stato utilizzato solo per le colonie batteriche che in seguito ad un'analisi morfologica ed ai risultati ottenuti dai precedenti saggi biochimici classici risultavano essere ascrivibili al genere *Pseudomonas*. Questa scelta è stata condizionata dal fatto che il database della Biolog Inc. risulta essere molto aggiornato per quanto riguarda i microrganismi della patologia umana, ma molto scarso per la fitopatologia (per alcune *Pseudomonas* spp. è stato effettuato un oneroso aggiornamento del database dal nostro gruppo di ricerca).

Le colonie scelte per l'identificazione sono state inizialmente strisciate su piastre contenenti ANS (par. II.2.6) e lasciate incubare in termostato a 25°C per 48 ore. Successivamente i batteri sono stati piastrati su BUG agar (par. II.2.6) e lasciati in incubazione per 24 ore, in modo da ottenere colonie batteriche in fase esponenziale di crescita. A questo punto utilizzando un batuffolo di cotone sterile è stata prelevata della patina batterica che è stata sospesa in una soluzione fisiologica sterile (Biolog 72101).

È stata misurata la densità di questa sospensione con l'aiuto di un turbidimetro (Biolog 3531), effettuando la lettura alla lunghezza d'onda di 590 nm e, mediante opportune diluizioni, la sospensione è stata portata ad una densità ottica (D.O.) pari a 0,52 nel caso di non enterobatteri. Successivamente, mediante una micropipetta multicanale, sono stati inoculati 150 µl della sospensione batterica in ognuno dei 96 pozzetti di ciascuna microplate. Le microplate infine sono state poste ad incubare per 24 ore, ad una temperatura di 30°C.

La lettura delle piastre è stata effettuata tramite uno spettrofotometro (Biolog microsistem) alla lunghezza d'onda di 590 nm.

### **II.2.11 Saggi molecolari**

Oltre ai sistemi di identificazione biochimici, le colonie batteriche di maggior interesse, isolate dall'insetto nel biennio 2004-2005, sono state sottoposte ad un'analisi identificativa di tipo molecolare.

#### **II.2.11.1 Sequenziamento delle colonie batteriche**

Le cellule batteriche, isolate dall'insetto, cresciute su ANS (par. II.2.6) per 24 ore, sono state sospese in 10 µl di acqua distillata sterile e bollite per 10 minuti a 99,9°C. Le cellule batteriche sono quindi state centrifugate per 2 minuti a 14.000 rpm e il surnatante trasferito in un tubo da PCR con 40 µl di reazione di PCR consistente di 1X PCR buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,5 mM di ogni primer ribosomiale (6F, 1510R) e 1'unità di Taq DNA polymerasi (Pharmacia Biotech, Sweden). La reazione di PCR è stata effettuata su un 2400 Thermocycler (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Warrington, UK) sotto le seguenti condizioni: un'iniziale denaturazione a 94°C per 2 minuti, seguita da 30 cicli a 94°C per 1 minuto, 55°C per 1 minuto, 72°C per 1 minuto e 30 secondi e una finale polimerizzazione a 72°C per 10 minuti.

I prodotti amplificati con la PCR sono stati purificati utilizzando filtri Microcon-PCR come descritto nelle istruzioni della ditta (Millipore S.p.A.) e analizzate utilizzando il sequenziatore automatico ABI PRISM 310 (Applied Biosystems Inc., Foster City, California). Le sequenze sono state analizzate con il programma FastA dal EMBL database, per l'allineamento e la percentuale d'identità.

#### **II.2.11.2 PCR con primer specifici**

Sulla base dei risultati ottenuti dalle precedenti analisi (morfologiche, fisiologiche, biochimiche e molecolari) le colonie batteriche, isolate da *A. dispar* durante il 2004 e il 2005, ascrivibili al genere *Pseudomonas*, sono state sottoposte ad una diagnosi molecolare (PCR) utilizzando primer specifici per l'identificazione rapida di *Pseudomonas avellanae*.

Nel corso del 2004, per l'identificazione di ceppi virulenti di *P. avellanae* sono stati utilizzati i seguenti primer:

WA (forward primer: 5'-TCCACAGGACGCCAGCAAGA-3')

WC (reverse primer: 5'-TGCGGTGTTACGCCACCATC-3')

Le condizioni di amplificazione e le miscele di reazione sono quelle indicate da Loreti *et al.* (2002); I cicli di amplificazione sono stati programmati secondo lo schema seguente :

Denaturazione iniziale	94°C per 3 minuti	
Denaturazione	94°C per 1 minuto	} x 30 cicli
Appaiamento dei primer	62°C per 1 minuto	
Polimerizzazione	72°C per 1,5 minuti	
Estensione finale	72°C per 5 minuti	

I batteri isolati dall'insetto (interno/esterno) durante il 2004 e il 2005 ascrivibili al genere *Pseudomonas* sono stati sottoposti ad analisi molecolare utilizzando primer specifici per *P. avellanae* costruiti dalla Dottoressa Cristina Proietti Zolla durante la sua Tesi di Dottorato (XVIII° Ciclo):

6F (forward primer: 5'-GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG-3')

1510R (reverse primer: 5'- GTGCTGCAGGGTTACCTTGTTACGACT-3')

Le condizioni di amplificazione e le miscele di reazione sono riportate nella Tesi di Dottorato della Dott.ssa Proietti Zolla (Proietti Zolla, 2005); I cicli di amplificazione sono stati programmati secondo lo schema seguente :

Denaturazione iniziale	94°C per 2 minuti	
Denaturazione	94°C per 1 minuto	} x 30 cicli
Appaiamento dei primer	55°C per 1 minuto	
Polimerizzazione	72°C per 1,5 minuti	
Estensione finale	72°C per 10 minuti	

In ogni esperimento è stato incluso un controllo negativo in cui il DNA è stato sostituito con acqua distillata sterile per verificare la presenza di eventuali contaminazioni e un controllo positivo: *Pseudomonas avellanae* (NCPB 4226).

### **II.2.12 Prove di patogenicità**

Durante la primavera e nuovamente nell'inverno del 2004, al fine di stabilire la patogenicità delle colonie batteriche più rappresentative isolate dall'insetto e non, sulla base anche dei risultati emersi dai saggi precedenti, sono state effettuate prove di patogenicità su piante di nocciolo della cultivar "Tonda Gentile Romana" di 1 anno sia in serra che in cella climatica.

La prova è stata effettuata utilizzando colonie batteriche in fase esponenziale di crescita piastrate su ANG (par. II.2.6). Utilizzando un bisturi opportunamente sterilizzato è stata prelevata una parte della patina batterica ed è stata effettuata una ferita all'altezza del cambio, sia lungo il fusto principale che su un rametto. Sono state eseguite due ripetizioni per ogni campione. Infine le ferite sono state sigillate con del parafilm da laboratorio (Fig. 27).



**Fig.27. Prove di patogenicità.**

Il test di patogenicità ha bisogno di almeno 6 mesi per il manifestarsi dei sintomi (Scortichini, 1998).

Per il reisolamento dei batteri inoculati si è provveduto, in condizioni di sterilità a disinfettare esternamente i campioni vegetali con alcool etilico a 95°C. Successivamente i campioni sono stati flambati e decorticati utilizzando un bisturi sterile. Nella zona di avanzamento della necrosi batterica si è provveduto ad asportare porzioni di legno che sono state triturate finemente in una goccia di acqua distillata sterile. Dalla sospensione ottenuta è stata infine strisciata un'aliquota su un terreno di crescita agarizzato (ANS).



Le piastre sono state ). Le piastre sono state poste ad incubare in termostato a 26°C per 48-72 ore.

Nella prova effettuata in primavera, oltre a colonie isolate da materiale vegetale è stata inoculata anche una colonia isolata nel 2003 da *A. dispar* identificata come *Brenneria quercina* (sigla: 16.05.03 F1C1A).

Nel test eseguito durante il mese di dicembre 2004 sono stati utilizzati i seguenti ceppi isolati da insetto: n°2 (*Pseudomonas* sp.), 3 (*Pseudomonas* sp.), 5 (*Erwinia* sp.) e 7 (*Pseudomonas* sp.) (Tab. IV).

## **II.3 RISULTATI**

### **II.3.1 Campionamenti di *A. dispar***

Dai campionamenti effettuati durante il triennio di ricerca 2003-2005 sono state catturate in totale 12.316 femmine di *A. dispar*.

#### **II.3.1.1 Campionamenti entomologici 2003**

Nel corso del 2003, le catture di femmine, effettuate esclusivamente con le trappole del tipo Rebell<sup>®</sup> Rosso, sono iniziate il 19 marzo e si sono concluse il 25 giugno nel nocciolo "a"; nel nocciolo "b" le catture hanno interessato il periodo compreso tra il 26 marzo ed il 2 luglio (Figg. 28 e 29). Le femmine complessivamente catturate sono state 4.123.

Nella settimana precedente la data di inizio delle catture le temperature massime registrate hanno toccato valori di 15°C il 12 marzo (Fig. 30).

Nel periodo considerato, le catture hanno presentato un tipico andamento gaussiano con un massimo in data 30 aprile di 288 femmine media/trappola nel nocciolo "a" e, nella stessa data, si è registrato un picco di 208 femmine media/trappola nel nocciolo "b". Come si evidenzia dai grafici (Figg. 28, 29 e 30), la riduzione dei voli dello Scolitide nel campionamento del 9 aprile 2003 sembra essere strettamente correlata sia alle basse temperature (minimo assoluto -3,9°C), sia alle forti piogge (33,6 mm) nella settimana di monitoraggio (2-9 aprile). Anche in data 28 maggio si può osservare un leggero decremento, anch'esso dovuto alle avverse condizioni meteorologiche.

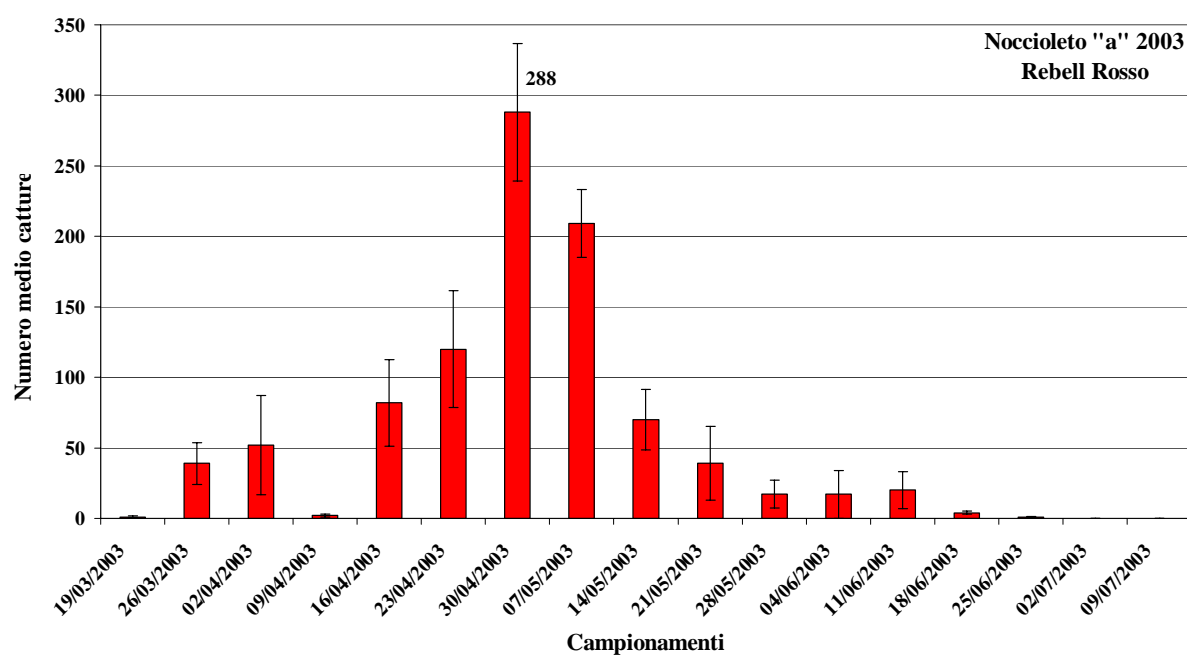


Fig. 28. Catture effettuate con le trappole Rebel® Rosso nei campionamenti del 2003 nel noccioleto sperimentale "a".

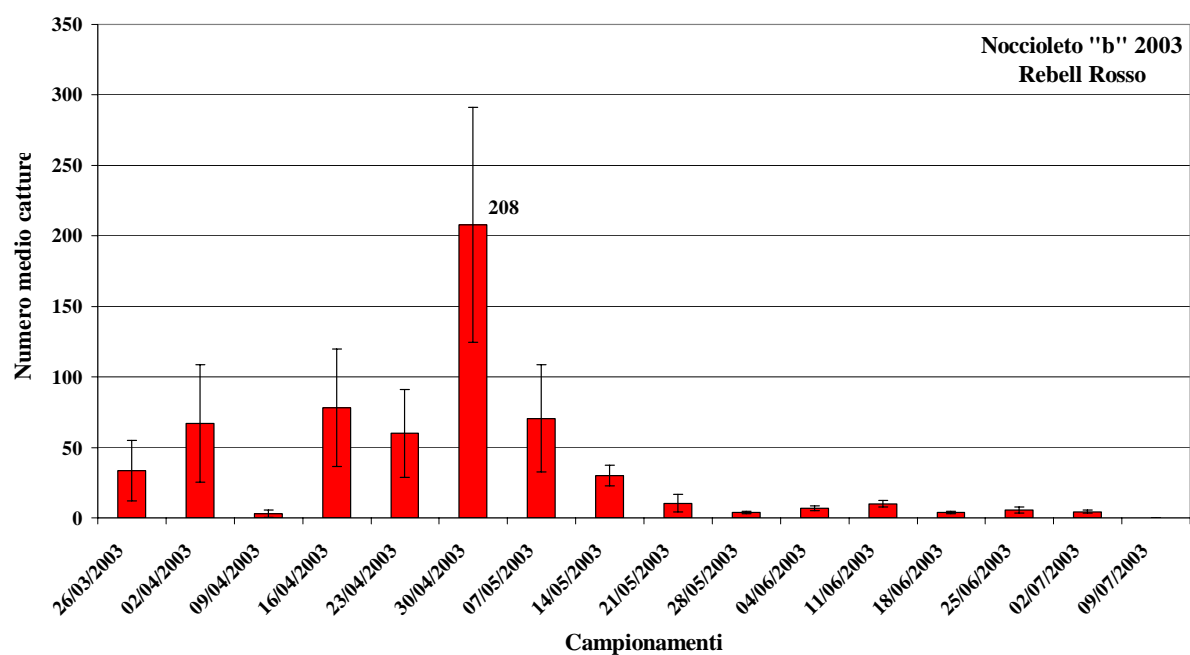
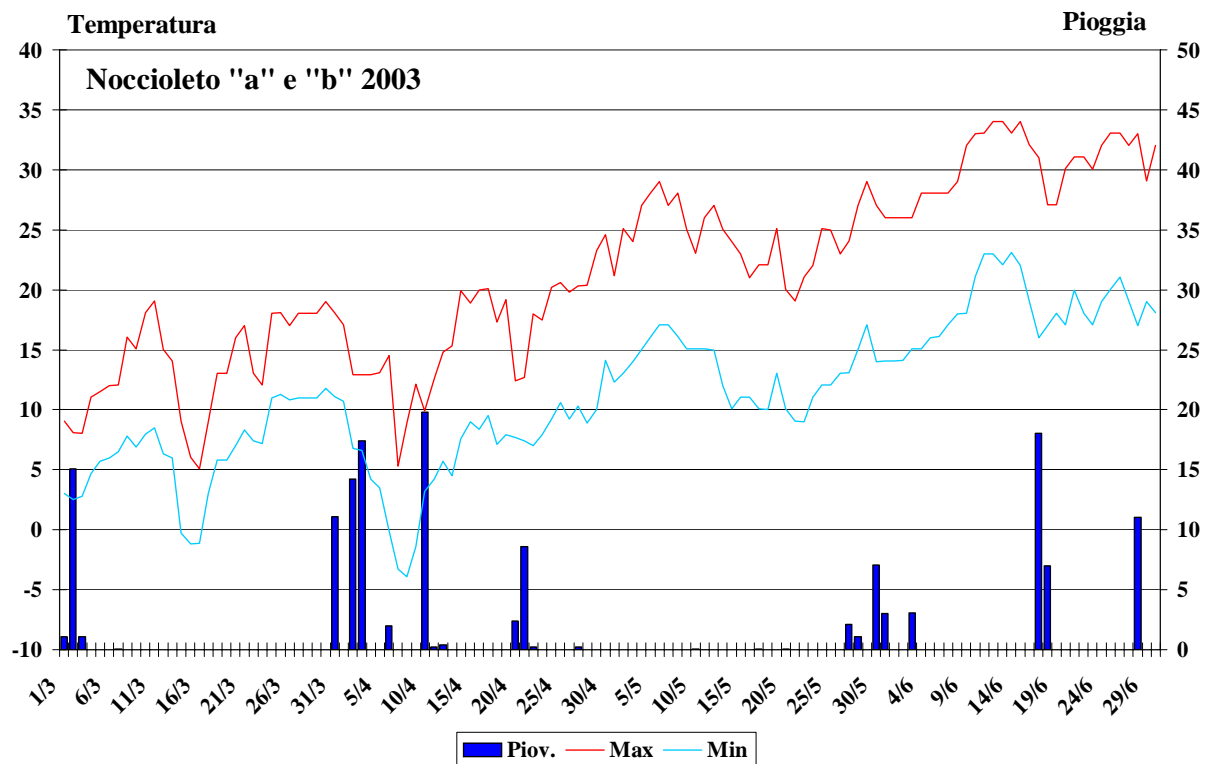


Fig. 29. Catture effettuate con le trappole Rebel® Rosso nei campionamenti del 2003 nel noccioleto sperimentale "b".



**Fig. 30. Andamento climatico nei nocchieletti “a” e “b” durante la stagione 2003.**

### II.3.1.2 Campionamenti entomologici 2004

Le catture effettuate nel corso del 2004 sono iniziate il 15 marzo sia in entrambi i nocciuoleti sperimentali (“a” e “c”) che nel bosco e si sono concluse, il 19 luglio nel nocciuoleto “a”, il 28 giugno nel nocciuoleto “c” e il 5 luglio nel bosco (Figg. 31, 32, 33 e 34).

Come si evince dai grafici meteo (Figg. 35 e 36), nella settimana che ha preceduto le prime catture (7-15 marzo) sono state registrate temperature massime di 16,3°C nel nocciuoleto “a” il 14 marzo e di 12,7°C nel nocciuoleto “c” il giorno 15 marzo.

Le femmine di *A. dispar* catturate nel nocciuoleto “a” in totale, utilizzando le trappole Mastrap<sup>®</sup> L (Fig. 32), sono state rispettivamente 725 nella zona con piante apparentemente sane e 265 in quella con piante sofferenti. Nel nocciuoleto “c” (Fig. 33) sono stati catturati complessivamente 56 insetti su piante sane e 60 su piante sofferenti. Le femmine di anisandro catturate nelle 3 trappole posizionate nel bosco (Fig. 34) sono state in totale 751.

I picchi di volo (Figg. 32, 33 e 34), delle femmine di *A. dispar*, sono stati registrati, in tutte e tre le tesi (Sano, Malato e Bosco), il giorno 26 aprile. Nel nocciuoleto “a” sono state catturate per mezzo delle trappole Mastrap<sup>®</sup> L (Fig. 32): 124 femmine, media/trappola, nella zona con piante sane e 23 femmine nell’area con piante sofferenti. Sempre nel nocciuoleto “a”, il picco di catture (valore medio) utilizzando le trappole Rebell<sup>®</sup> Rosso (Fig. 31) è stato di 114 femmine/trappola; nel bosco limitrofo al nocciuoleto menzionato sono state registrate nella stessa data 65 femmine media/trappola (Fig. 34).

Nel nocciuoleto “c” (Fig. 33) il picco delle catture utilizzando le trappole Mastrap<sup>®</sup> L è stato di 10 femmine media/trappola nella zona con piante sane e 9 nella zona con piante sofferenti.

Nei campionamenti effettuati in entrambi i nocciuoleti (“a” e “c”) e nel bosco, il 13 e 19 aprile, non sono state registrate catture. Anche in questo caso, le condizioni meteorologiche (Figg. 35 e 36) sono state, molto probabilmente, il fattore limitante il volo dell’insetto. In particolare le temperature massime registrate nelle due settimane di cattura (6-19 aprile) sono state relativamente basse con un valore massimo di 15°C nel nocciuoleto “a” e di 11,7°C nel nocciuoleto “c”. Anche i valori delle temperature minime sono stati piuttosto bassi rispetto la media del periodo con un minimo assoluto di 2°C

(19 aprile) e  $-1,6^{\circ}\text{C}$  (10 aprile) registrati rispettivamente nel noccioleto “a” e “c” (Figg. 35 e 36).

Nel noccioleto “c” è stata registrata una totale assenza di catture nei campionamenti del 31 maggio, del 7 e del 14 giugno (Fig. 33). Dall’analisi statistica (t di Student) risulta che nel noccioleto “a” vi è una differenza significativa tra le catture (tesi Sano-tesi Malato) solo in data 22 marzo. La stessa analisi effettuata sulle catture (Sano-Malato) non evidenzia differenze significative nel noccioleto “c”.

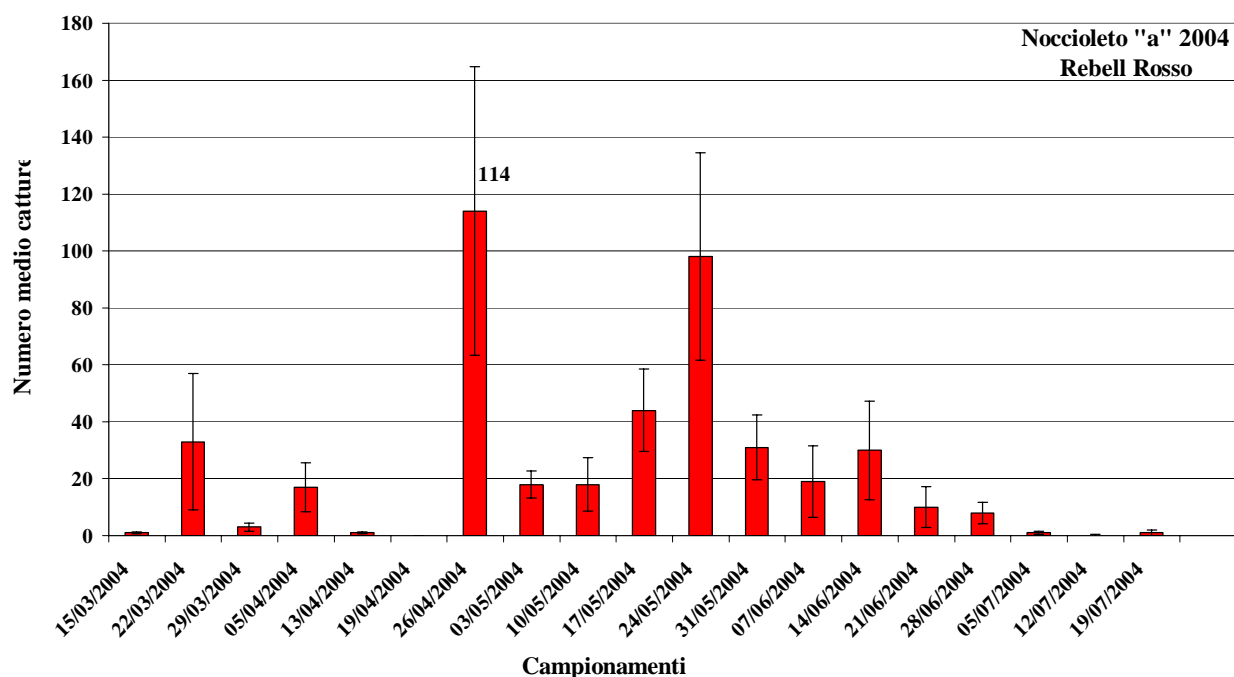


Fig. 31. Catture effettuate con le trappole Rebell Rosso® nel 2004 nel nocciolo “a”.

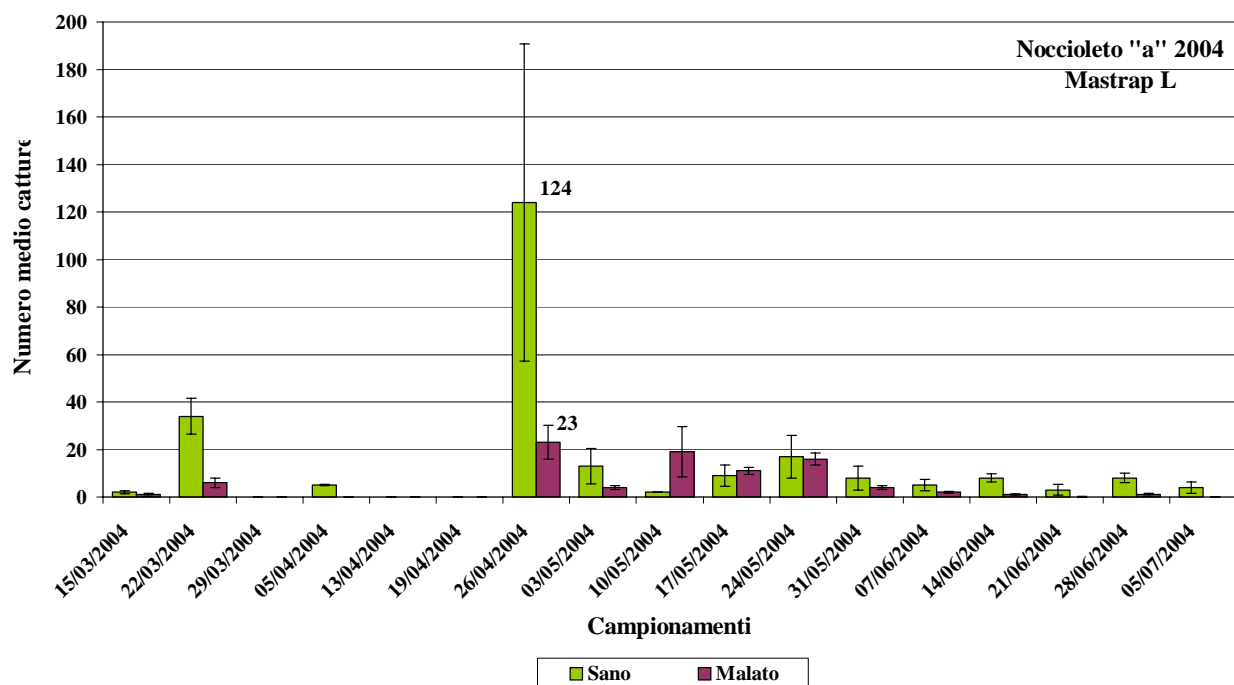
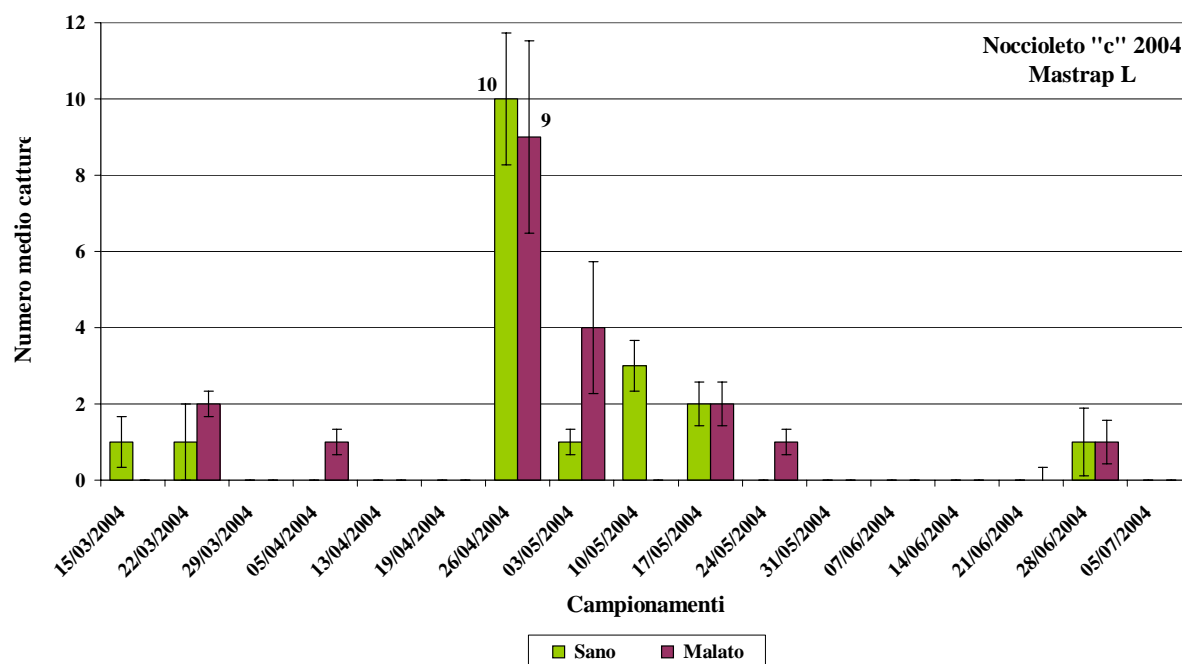
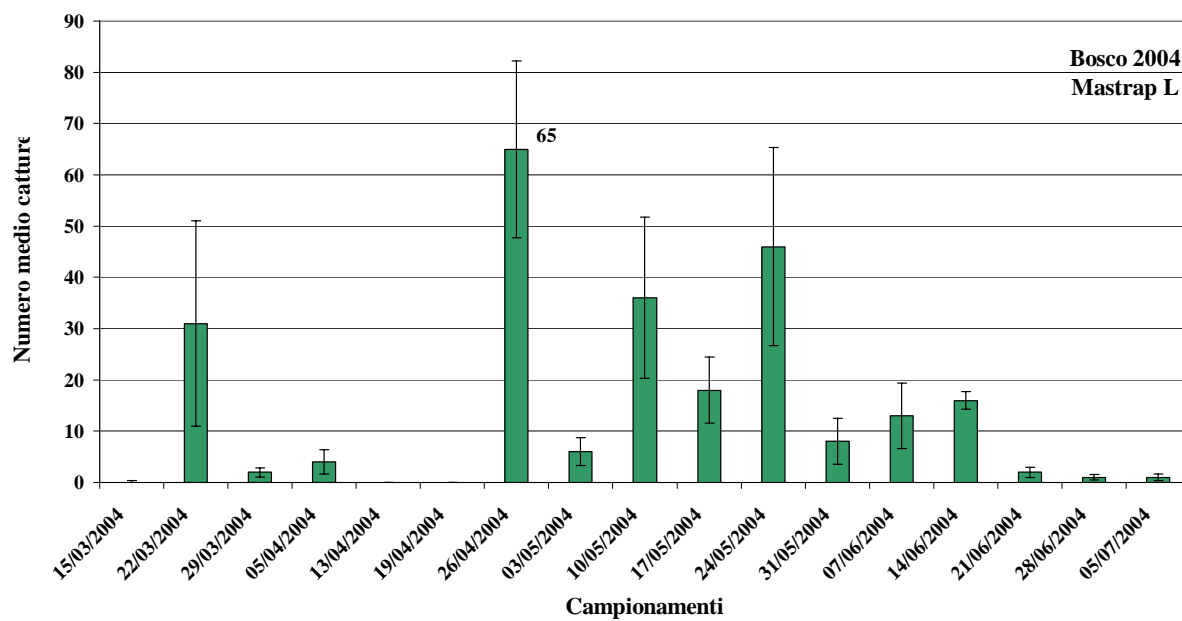


Fig. 32. Catture effettuate con le trappole Mastrap L® nei campionamenti del 2004 nel nocciolo sperimentale “a”.



**Fig. 33.** Catture effettuate con le trappole Mastrap L® nei campionamenti del 2004 nel noccioleto sperimentale “c”.



**Fig. 34.** Catture effettuate con le trappole Mastrap L® nei campionamenti del 2004 nel bosco.



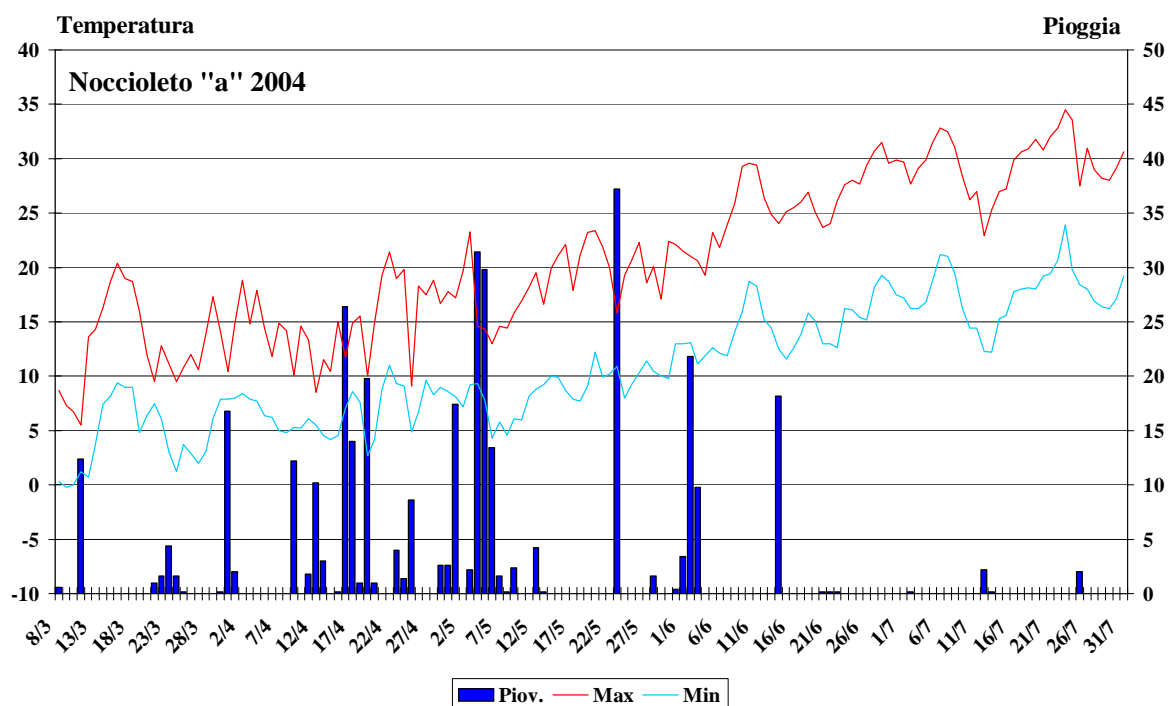


Fig. 35. Andamento climatico nel noccioleto “a” e nel bosco durante la stagione 2004.

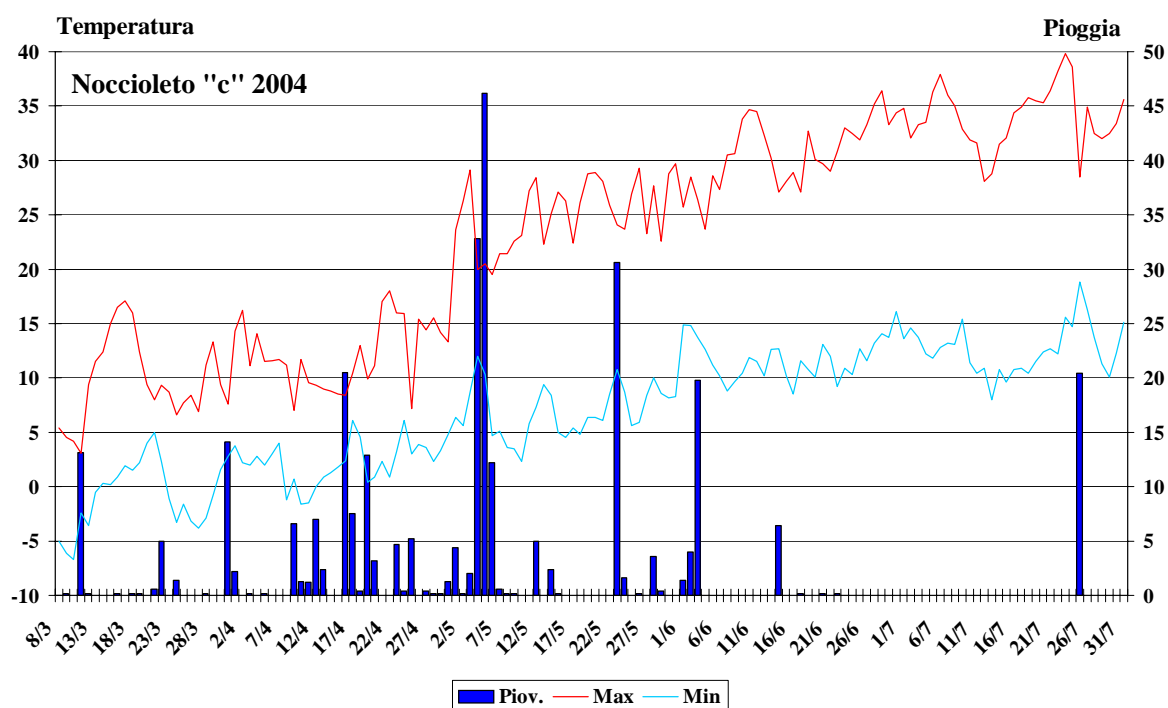


Fig. 36. Andamento climatico nel noccioleto “c” durante la stagione 2004.

### II.3.1.3 Campionamenti entomologici 2005

Le catture effettuate nel 2005, di femmine di anisandro, sono iniziate in data 21 marzo e si sono concluse il 20 giugno in tutti e tre i siti d'indagine (noccioletto “a”, “c” e bosco) (Figg. 37, 38, 39 e 40).

Come si evince dai grafici (Figg. 41 e 42) nella settimana che precede le prime catture (14-21 marzo 2005) sono stati registrati valori di temperatura massima di circa 23°C nel noccioletto “a” il 16 marzo e 20°C nel noccioletto “c” il giorno 18 marzo.

Il totale delle catture effettuate nel corso del 2005 ammonta a 4.987.

Le catture totali di femmine di *A. dispar* avvenute nel noccioletto “a” utilizzando le trappole Mastrap<sup>®</sup> L (Fig. 38) sono state di 2.250, di cui 1.530 (68%) effettuate nella zona con piante apparentemente sane e 720 (32%) nella zona con piante sofferenti.

Nel noccioletto “c” (Fig. 39) sono state catturate in totale 446 femmine di cui 187 (42%) su piante apparentemente sane e 259 (58%) su piante sofferenti. Gli insetti catturati nelle trappole installate nel bosco (Fig. 40) sono risultati essere 1.125.

Le femmine catturate utilizzando le trappole Rebell<sup>®</sup> Rosso (Fig. 37) sono state in totale 1.166.

Come si evince dai grafici (Figg. 37, 38, 39 e 40) il picco dei voli delle femmine è stato registrato in data 2 maggio in tutte e tre le tesi. Nel noccioletto “a”, nel campionamento del 2 maggio, sono state catturate, utilizzando le trappole Mastrap<sup>®</sup> L (Fig. 38), 322 femmine (valore medio) nella zona con piante sane e 232 femmine nella zona con piante sofferenti. Il picco della catture (valore medio) registrato utilizzando le trappole Rebell<sup>®</sup> Rosso (Fig. 37) è risultato essere di 238 femmine catturate. Nel bosco (Fig. 40), limitrofo al noccioletto “a”, sono state registrate nella stessa data 256 catture.

Nel noccioletto “c” (Fig. 39) il picco delle catture (valori medi) è stato di 30 insetti nella zona con piante sane e 45 insetti nella zona con piante sofferenti.

La dinamica dei voli delle femmine nelle tre aree sperimentali risulta essere molto simile. Come è evidenziato dai grafici (Figg. 38, 39 e 40) le catture risultano avere un trend piuttosto regolare fino al campionamento del 25 aprile. Nel campionamento del 2 maggio si registra invece un repentino ed elevato numero di catture in tutti e tre i siti d'indagine. Dal campionamento del 9 maggio si nota nuovamente una notevole riduzione delle catture che prosegue regolarmente fino al 20 giugno. Analizzando i dati

meteorologici (Figg. 41 e 42) si nota che il picco delle catture registrato il 2 maggio si ha in corrispondenza di un significativo aumento delle temperature e assenza di precipitazioni. E' da notare che nel lungo periodo prima del picco si sono registrate sia temperature (minime e massime) piuttosto basse che elevate piovosità. Nella settimana subito precedente il picco non sono state registrate piogge e le temperature massime hanno presentato valori relativamente elevati per il periodo (circa 30°C nel noccioleto “a” e circa 26°C nel noccioleto “c”).

L'analisi statistica (t di Student) evidenzia che ci sono differenze significative ( $p < 0,05$ ), nel noccioleto “a”, tra le catture effettuate nella tesi Sano e in quella Malato solo nel campionamento del 18 aprile. Nel noccioleto “c” non ci sono differenze significative tra le due tesi.

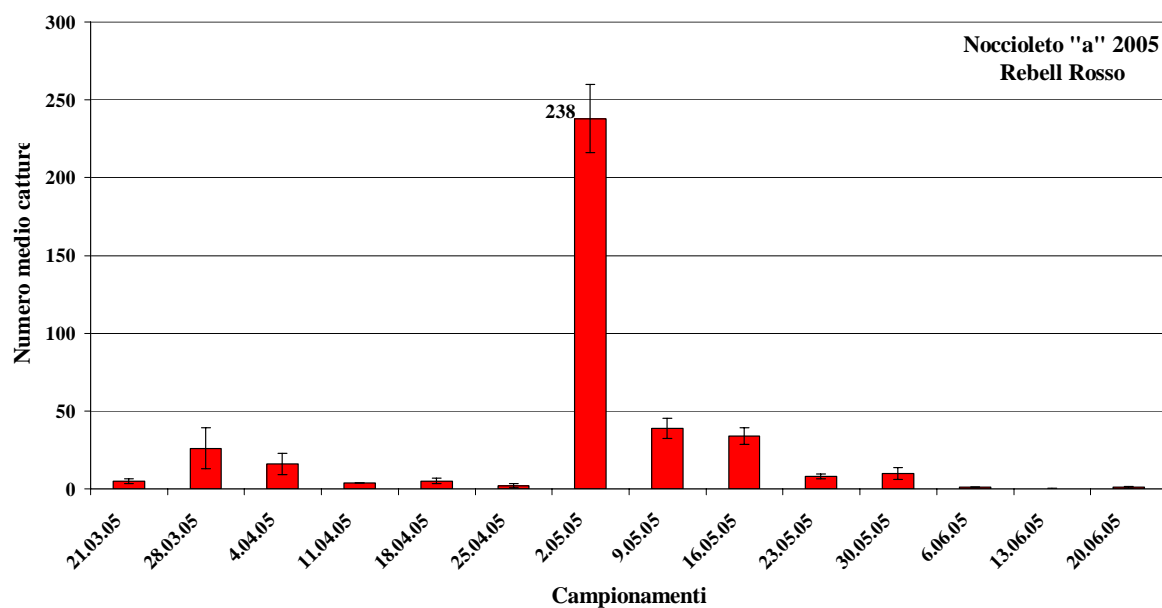


Fig. 37. Catture effettuate con le trappole Rebell® Rosso nel 2005 nel nocciolo “a”.

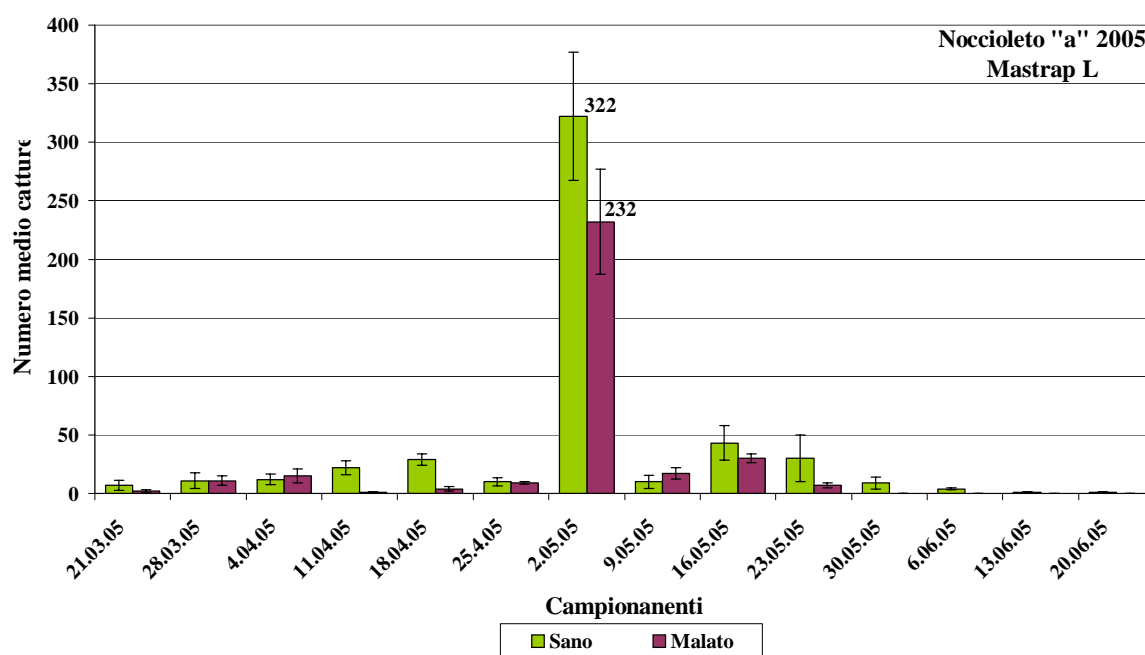


Fig. 38. Catture effettuate con le trappole Mastrap L® nei campionamenti del 2005 nel nocciolo sperimentale “a”.

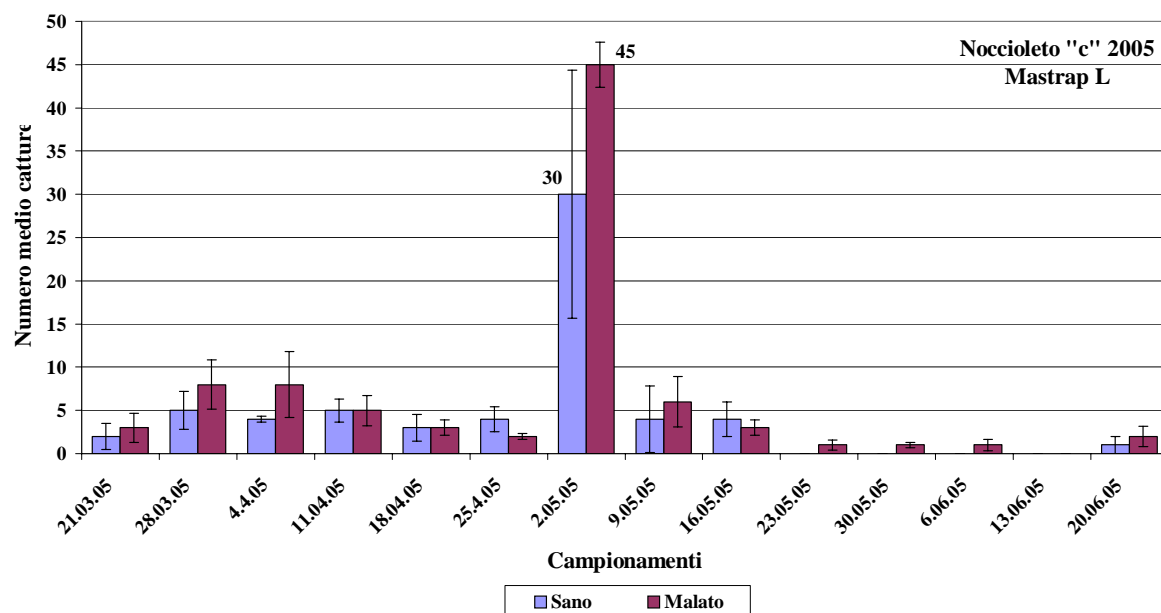


Fig. 39. Catture effettuate con le trappole Mastrap L<sup>®</sup> nei campionamenti del 2005 nel noccioleto sperimentale "c".

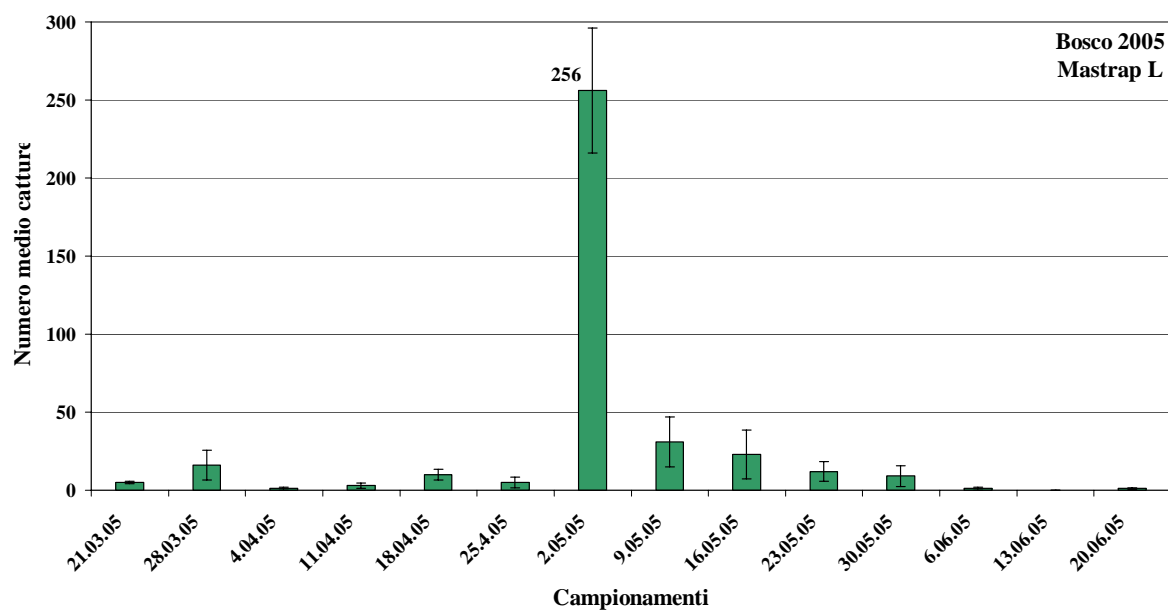


Fig. 40. Catture effettuate con le trappole Mastrap L<sup>®</sup> nei campionamenti del 2005 nel bosco.

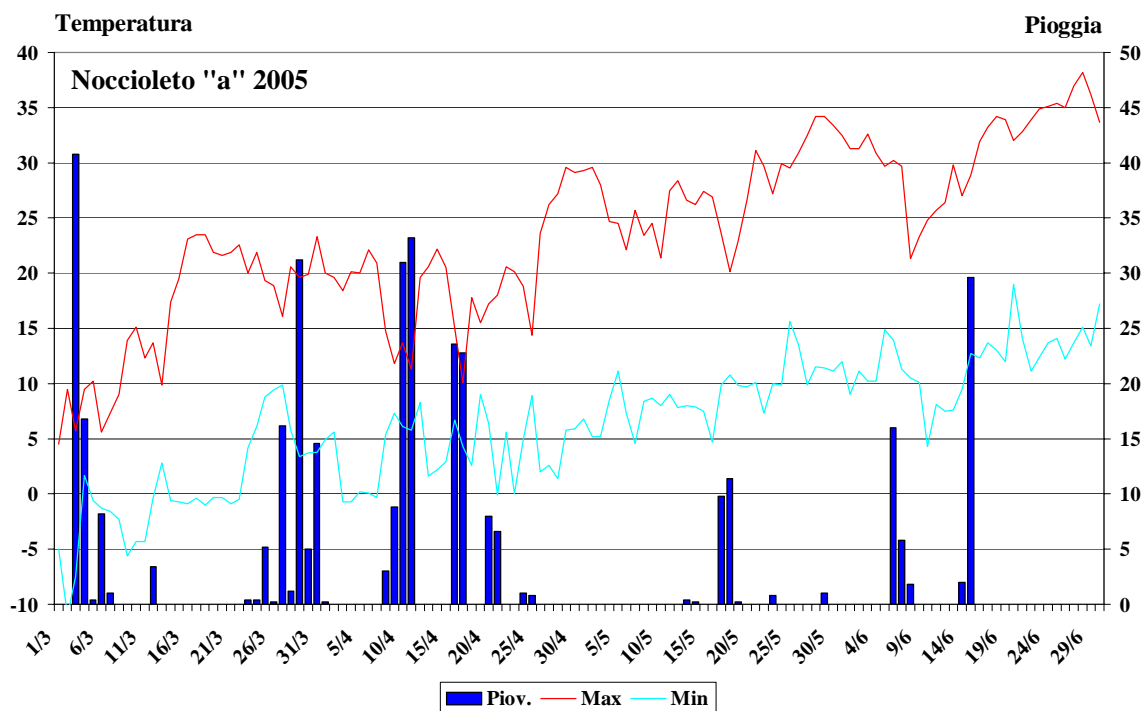


Fig. 41. Andamento climatico nel noccioleto “a” e nel bosco durante la stagione 2005.

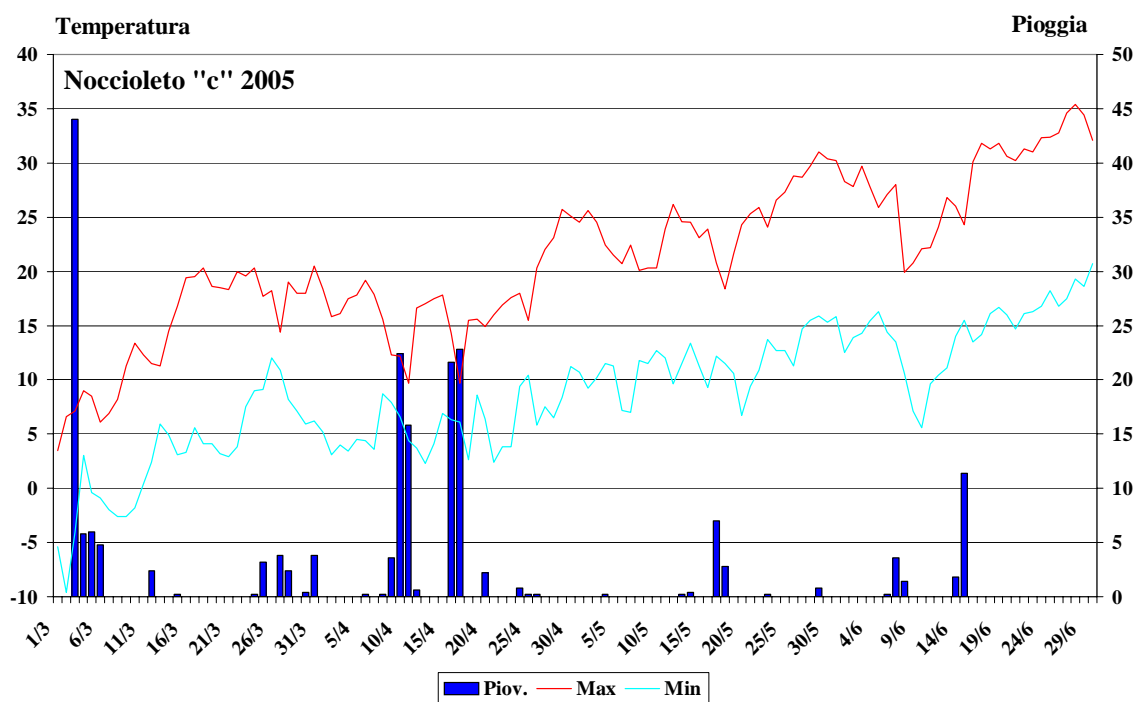
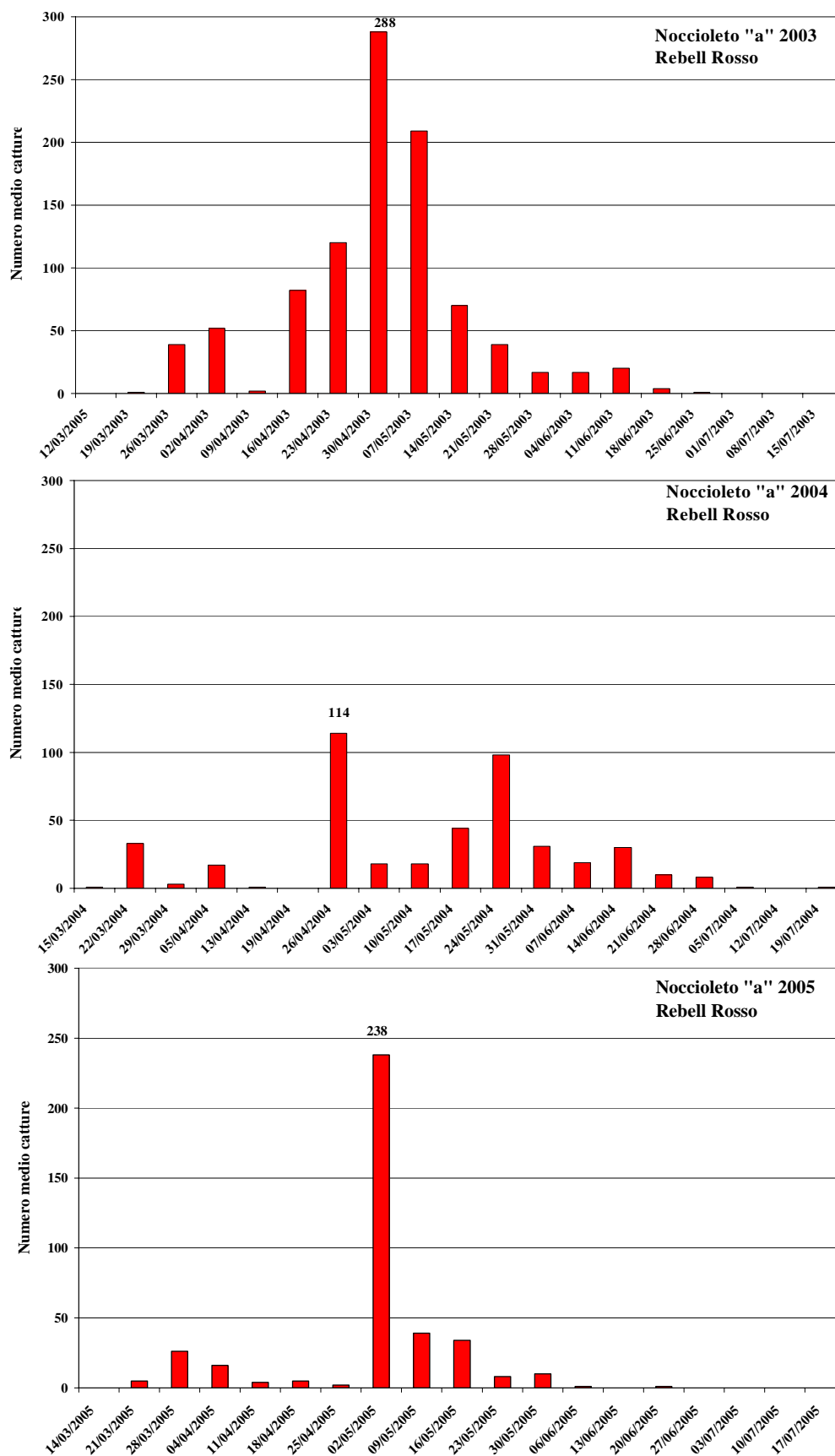


Fig. 42. Andamento climatico nel noccioleto “c” durante la stagione 2005.

#### **II.3.1.4 Confronto tra le catture effettuate con le trappole Rebell<sup>®</sup> Rosso nel triennio 2003-2005**

Comparando il totale delle catture effettuate con le trappole del tipo Rebell<sup>®</sup> Rosso nel nocciolo "a" nei tre anni di campionamento (Fig. 43) si nota che su un totale assoluto di 5.447 femmine catturate, circa il 54% delle catture è stato effettuato nel primo anno (2003), il 25% nel secondo anno (2004) e il restante 21% nel terzo anno (2005). Questo dato può essere spiegato analizzando le condizioni meteorologiche (Figg. 30, 35 e 41) nel periodo di cattura (1 marzo-30 giugno) durante i tre anni di monitoraggio. Le piogge hanno fatto registrare valori totali di 146 mm nel 2003, di 345 mm nel 2004 e di 363 mm nel 2005; le temperature, nei valori medi (minima e massima), sono risultate più alte nel 2003 (11,6°C e 22°C) rispetto al 2004 (9°C e 18,5°C) ed al 2005 (6,2°C e 20°C).



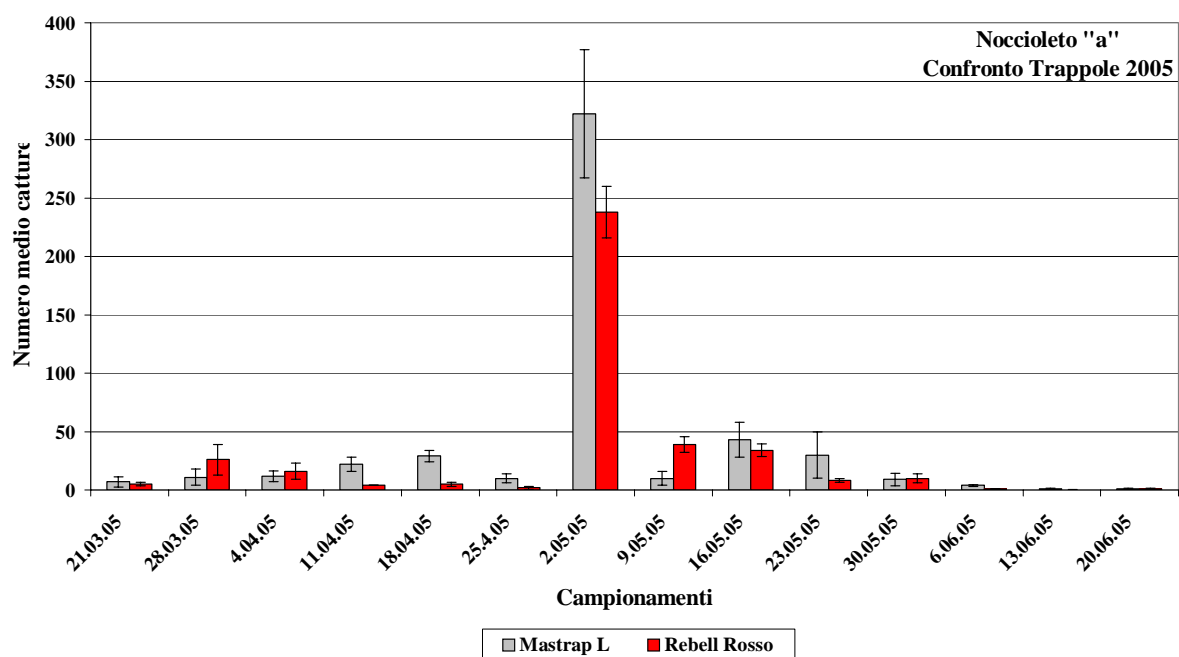
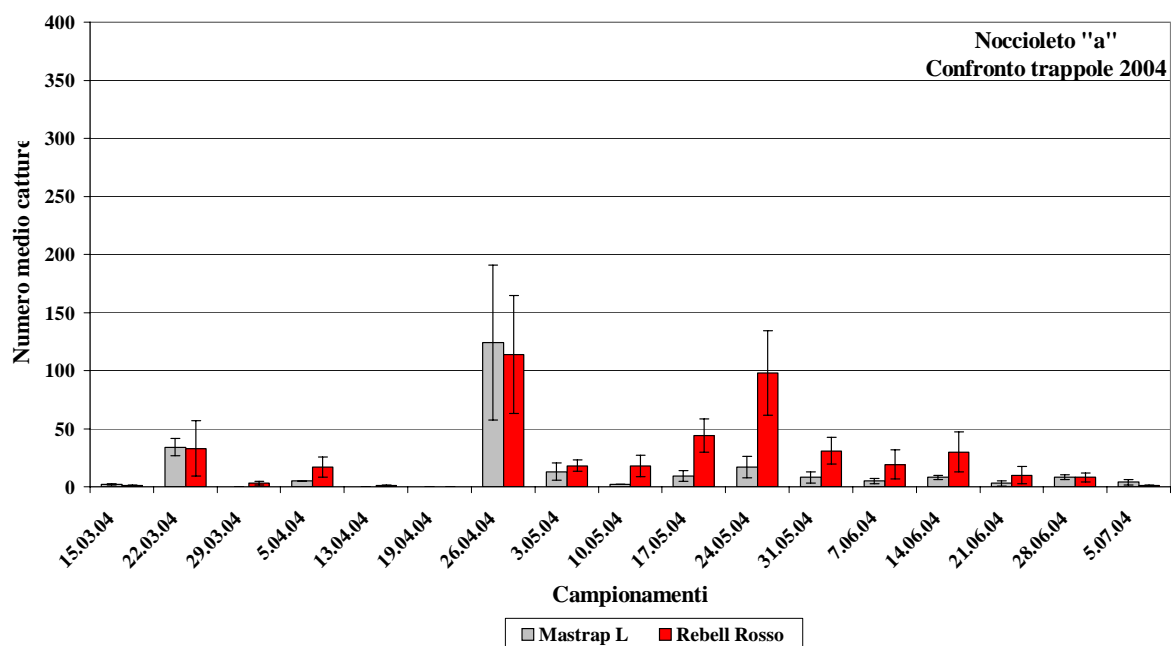
**Fig. 43. Confronto tra le catture effettuate con le trappole Rebell® Rosso nel triennio 2003-2005.**



### **II.3.1.5 Confronto tra le catture effettuate con le trappole Rebell<sup>®</sup> Rosso e le Mastrap<sup>®</sup> L.**

Nel secondo e terzo anno di sperimentazione, sono state utilizzate, nel nocciololetto “a” sia le trappole Rebell<sup>®</sup> Rosso che le trappole Mastrap<sup>®</sup> L. Confrontando le catture effettuate nel corso del 2004 con le due tipologie di trappola (Fig.44) si può notare che le Rebell<sup>®</sup> Rosso hanno catturato un maggior numero di insetti in quasi tutte le date di campionamento; infatti queste hanno catturato complessivamente 1.339 femmine, mentre le Mastrap<sup>®</sup> L solo 725 insetti. Nel corso del terzo anno (2005) invece, le catture effettuate con le trappole Rebell<sup>®</sup> Rosso sono risultate inferiori (1.166) a quelle registrate con le Mastrap<sup>®</sup> L (1.535). L’andamento delle catture nei due anni, effettuate con i due tipi di trappola, è risultato simile. E’ da tener presente però che, ai fini sperimentali le Mastrap<sup>®</sup> L catturano insetti vivi mentre gli insetti catturati con le Rebell<sup>®</sup> Rosso si rinvenivano morti e collati sulle trappole. Dall’analisi statistica (t di Student) effettuata sulle catture con le due tipologie di trappola nel corso del 2004 risulta che non ci sono differenze significative. Nel corso del 2005 l’analisi statistica rileva differenze significative ( $P < 0,05$ ) nei campionamenti del 18 aprile e del 6 giugno.

Dal confronto tra le catture effettuate con i due tipi di trappola (Rebell<sup>®</sup> Rosso e Mastrap<sup>®</sup> L) si nota che complessivamente per i due anni sono state catturate un numero simile di femmine (2.505 nelle Rebell<sup>®</sup> Rosso e 2.260 nelle Mastrap<sup>®</sup> L).



**Fig. 44. Confronto tra le catture effettuate con le trappole Rebell® Rosso e le Mastrap® L nel corso del biennio 2004-2005.**

### II.3.1.6 Catture effettuate in bosco

Confrontando le catture (Fig. 45) registrate nella tesi Bosco, nel corso del biennio 2004-2005, risulta che nel secondo anno sono stati catturati complessivamente 751 insetti nel 2004 e 1.125 insetti nel 2005. Confrontando i due anni si nota che le catture risultano avere un andamento simile, tranne che nel campionamento del 2 maggio 2005, data in cui si evidenzia un picco di 256 femmine media/trappola.

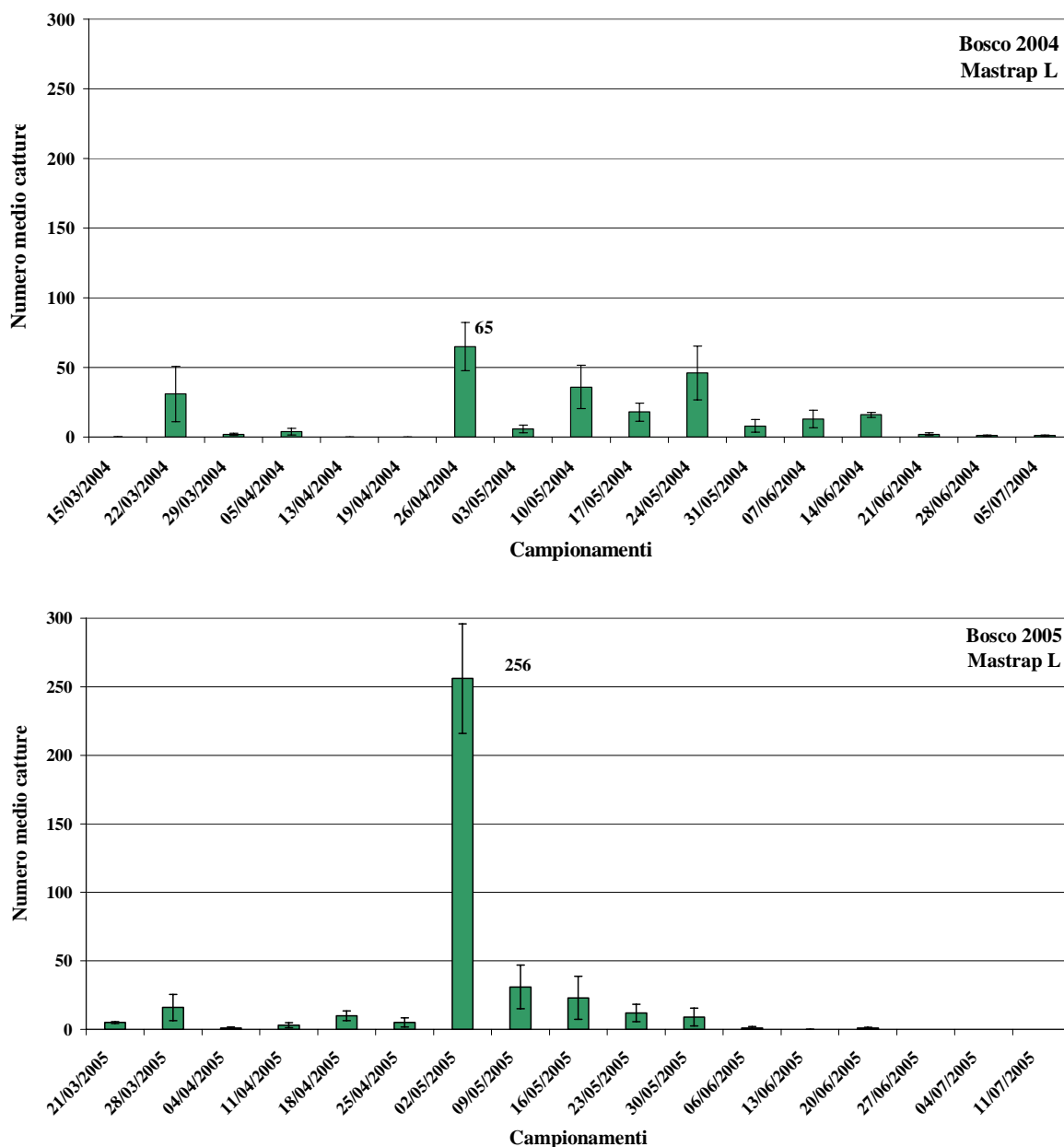


Fig. 45. Confronto tra le catture effettuate nel bosco nel biennio 2004-2005.

### II.3.2 Ciclo biologico di *A. dispar*

Dai dati rilevati si evidenzia che l'insetto, nei biotopi considerati (Fig. 46), sverna allo stadio adulto, all'interno delle gallerie, a partire dal mese di luglio sino al mese di marzo dell'anno successivo. Le uova si rinvencono dopo circa dieci giorni la fuoriuscita degli adulti dalle gallerie; questa si verifica a partire dalla metà del mese di marzo e si protrae sino alla fine della prima decade di luglio. Durante tutto il mese di aprile si rinvencono nelle gallerie, oltre agli adulti, uova e larve. Dal mese di maggio alla metà del mese di luglio, all'interno delle gallerie, sono presenti tutti gli stadi di sviluppo (adulti, uova, larve e pupe). Dalla metà del mese di luglio non si rinvencono più uova nelle gallerie. Nel mese di agosto si ritrovano solo adulti e pupe. Infine dall'inizio del mese di settembre alla metà del mese di marzo dell'anno successivo sono presenti solo adulti. Come si evidenzia dalla figura, l'insetto è monovoltino.

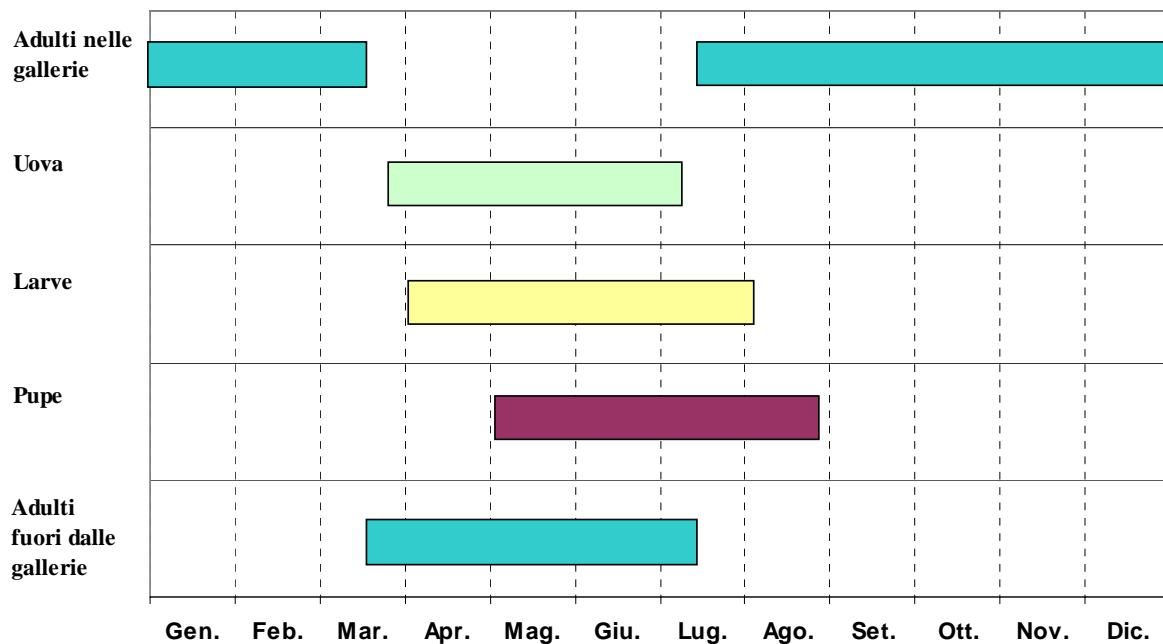


Fig. 46. Ciclo biologico di *A. dispar* nei nocioleti sperimentali.

### II.3.3 Voli giornalieri

Durante il terzo anno di sperimentazione sono stati effettuati controlli orari sulle catture delle femmine per mezzo delle trappole Rebell<sup>®</sup> Rosso (Fig. 47).

La dinamica delle catture, in relazione ai dati meteorologici, dimostra che l'insetto inizia a volare nelle ore diurne con temperature medie di 13-14 °C (ore 9:00 a.m.). Come si vede dalla figura, nelle ventiquattro ore di campionamento non sono state registrate piogge. Le catture sono iniziate alle ore 9:00 e sono aumentate progressivamente fino alle ore 12:00 con un picco medio di insetti catturati pari a 28. In corrispondenza del picco di cattura è stata registrata una temperatura massima che ha toccato i 26,4 °C e una minima di 25,2 °C. Le catture sono progressivamente diminuite fino alle ore 16:00 (8 insetti catturati in media). Nel controllo delle ore 17:00 si è verificato un lieve aumento (10 insetti catturati). Successivamente le catture degli insetti sono diminuite fino alle ore 19:00, ora in cui è stata registrata l'ultima cattura. Complessivamente, nell'arco delle ventiquattro ore, sulle tre trappole sono state catturate 303 femmine.

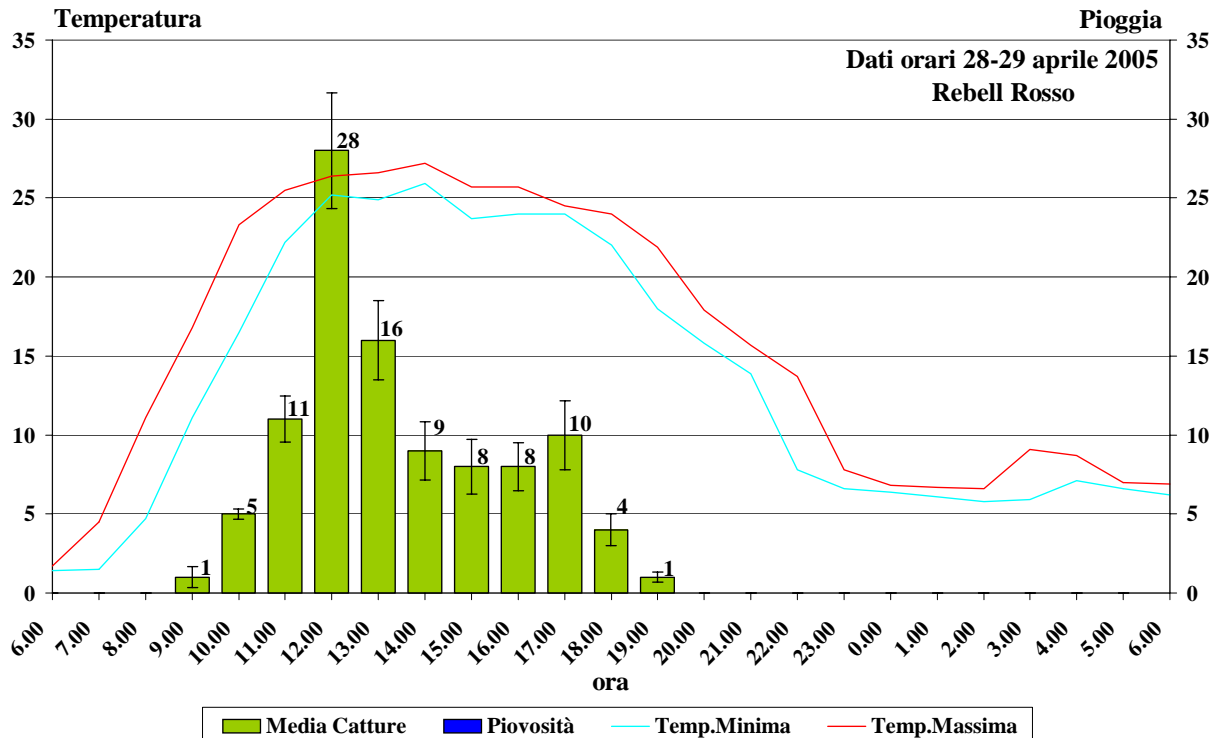
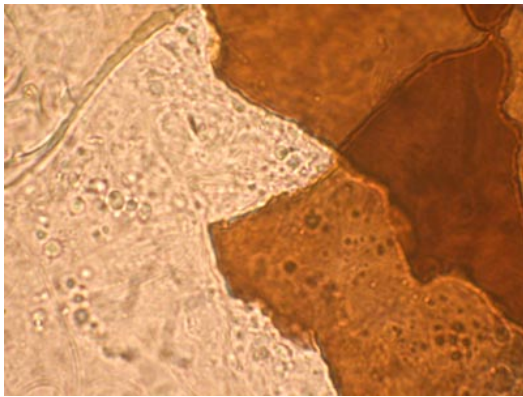


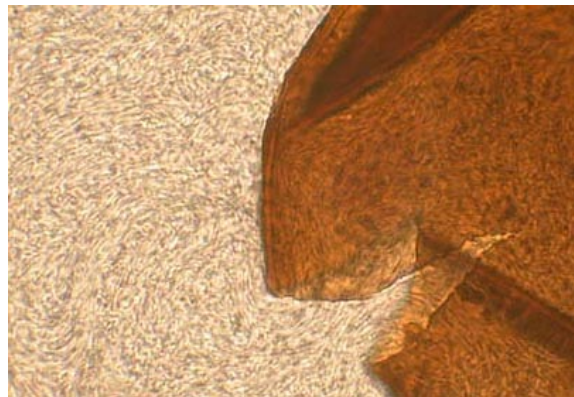
Fig. 47. Voli giornalieri di *A. dispar* nei nocioleti sperimentali, durante il periodo di massima presenza in campo dell'insetto.

### **II.3.4 Spermateca**

Dall'osservazione delle spermateche prelevate da femmine di *A. dispar* presenti all'interno delle gallerie tra il mese di febbraio e l'inizio del mese di marzo è risultato che nessuna delle spermateche estratte conteneva al proprio interno spermatozoi (Fig. 48). Mentre quelle estratte da femmine catturate dopo la fuoriuscita dalle gallerie hanno quasi sempre mostrato (nel 90% dei campioni analizzati) al loro interno un elevato numero di spermi (Fig. 49).



**Fig. 48.** Foto al microscopio ottico della spermateca rotta senza spermatozoi all'interno (ingrandimento 100x).



**Fig. 49.** Foto al microscopio ottico della spermateca rotta con numerosi spermatozoi all'interno (ingrandimento 100x).

## II.3.5 Isolamento, identificazione e conservazione della microflora batterica

### II.3.5.1 Analisi qualitativa delle popolazioni batteriche

Gli insetti catturati vivi, per mezzo delle Mastrap<sup>®</sup> L, sono stati di 5.678. Di questi, più del 16% (916) è stato sottoposto a saggi microbiologici per analizzare la microflora batterica presente.

Dalle prove di identificazione le popolazioni batteriche maggiormente associate ad A. dispar sono risultate essere ascrivibili alle famiglie delle *Enterobacteriaceae* e delle *Pseudomonadaceae*.

Molti dei ceppi batterici isolati e identificati sono risultati essere microrganismi saprofiti; alcuni ceppi, quali *Erwinia* spp., *Brenneria quercina*, *Pseudomonas* spp. potenzialmente coinvolti nella malattia sono stati sottoposti ad approfondite analisi al fine di valutarne la patogenicità.

#### II.3.5.1.1 Saggi diagnostici classici

Tutti i risultati dei saggi biochimici e fisiologici effettuati sono riportati nella Tabella V:

COLONIE SAGGI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Levano	+	+	+	+	m	+	+	+	+	+	+	+	+	m
Catalasi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ossidasi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Patata	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
Arginina Deidrolasi	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
King B	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Tabacco	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
T.S.I.	K/K	K/K	K/K	K/K	K/A	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/A
Gram (KOH)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

**Tab. V. Prove biochimiche tradizionali.**

+ = reazione positiva; - = reazione negativa; m = colonia mucosa; K/K = reazione alcalino/alcalino; K/A = reazione alcalino/acido.

#### **II.3.5.1.1a Saggio di solubilità in KOH**

E' stata verificata una notevole viscosità (reazione positiva = Gram negativi) in tutte le colonie saggiate, manifestata da “filamenti” del miscuglio della soluzione di idrossido di potassio, tra il vetrino e l'ansa sterile (Fig. 19).

#### **II.3.5.1.1b Fluorescenza su substrato B di King**

Al termine di 24 e 48 ore di incubazione le piastre sono state osservate ai raggi di una lampada UV. Nel caso di fluorescenza (Fig. 20), la reazione è stata considerata positiva. Gli isolati saggiati sono risultati tutti positivi, tranne l'isolato n° 5 e 14 che non hanno manifestato fluorescenza.

#### **II.3.5.1.1c Formazione di colonie levaniiformi su ANS**

Le singole colonie cresciute su ANS, dopo un periodo di incubazione di 48-96 ore, hanno mostrato tutte la tipica capsula di levano (levano positive), esclusa la colonia n° 5 e 14.

#### **II.3.5.1.1d Saggio dell'ossidasi**

Sono stati considerati ossidasi positivi i batteri che, nel termine di 10 secondi, hanno dato una reazione colorimetrica tendente al rosso porpora; debolmente positivi nel caso in cui il cambiamento di colore è avvenuto nel termine di 60 secondi; mentre nei casi in cui il viraggio di colore si è manifestato oltre il limite di 60 secondi o non è avvenuto affatto, sono stati considerati ossidasi negativi (Kovacs, 1956). Tutte le colonie batteriche saggiate sono risultate essere ossidasi negative (Tab. V).

#### **II.3.5.1.1e Catalasi**

Tutte le colonie saggiate (Tab.V) hanno mostrato una reazione positiva (effervescenza).



#### **II.3.5.1.1f Saggio della marcescenza su fettine di patata**

Al termine delle 48 ore di osservazione, le specie batteriche che hanno provocato la marcescenza della fettina di patata (Fig. 23), sono state classificate come positive. Tali specie batteriche, come si evince dai dati riportati in Tabella V, sono risultate essere la colonia n°: 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 e 13. Le colonie che non hanno mostrato, al termine delle 48 ore, marcescenza sono state la n°: 1, 5, 7, 12 e 14.

#### **II.3.5.1.1g Saggio dell'arginina deidrolasi**

Sono state considerate positive le colonie batteriche che, al termine di 5 giorni, hanno prodotto un cambiamento del colore del substrato da rosa all'arancione-rosso (Fig. 24). Come è stato riportato nella Tabella V i campioni che sono risultati essere positivi al saggio sono stati il n°: 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 e 13; mentre il campione n° 5, 7, 12 e 14 sono risultati negativi.

#### **II.3.5.1.1h Saggio dell'ipersensibilità su tabacco**

Le piante di tabacco sono state osservate al termine di 24 ore. Le colonie batteriche che hanno causato una reazione di ipersensibilità (necrosi) sulla porzione di foglia in cui sono state inoculate, sono state classificate come positive. Come si evince dalla Tabella V gli isolati risultati positivi sono stati il n° 4, 7 e 12. Quelli che non hanno dato reazione di ipersensibilità sono risultati essere il n°: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13 e 14.

#### **II.3.5.1.1i T.S.I.**

Le uniche colonie batteriche risultate essere appartenenti alla Famiglia delle *Enterobacteriaceae* (reazione K/A) sono state la n° 5 e 14, isolate rispettivamente dall'interno e dall'esterno dell'insetto nel nocciolo "a" e dal bosco, mentre tutte le altre colonie saggiate sono risultate essere Non- *Enterobacteriaceae* (Tab. V).

#### **II.3.5.1.2 Microlog System Biolog**

Il profilo metabolico delle colonie sottoposte all'identificazione per mezzo del Biolog (n° 1, 4, 8 e 15) è stato identificato come genere *Pseudomonas*. Purtroppo i risultati ottenuti non hanno reso possibile identificare la specie.

### **II.3.5.1.3 Saggi molecolari**

#### **II.3.5.1.3a Sequenziamento delle colonie batteriche**

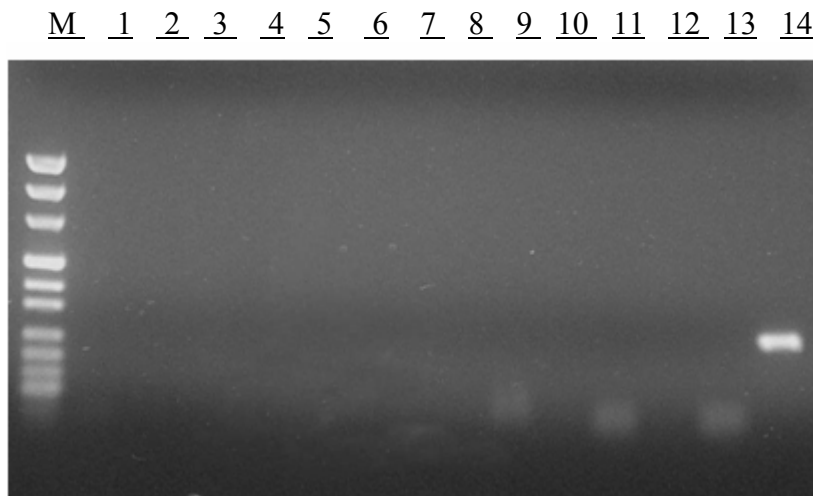
I campioni saggiati dal Dott. J. L. Vanneste nel 2003 sono stati identificati come: *Pseudomonas* sp., *Plantibacter* sp., *Brenneria quercina*, *Erwinia billingae* e *Pantoea cedenensis*.

Anche le colonie batteriche ottenute da (esterno/interno) *A. dispar* nel 2004 sono state analizzate, dal nostro gruppo di ricerca, utilizzando il sequenziatore. Le sequenze sono state infine analizzate con il programma FastA, per l'allineamento e la percentuale d'identità.

I campioni saggiati sono risultati essere ascrivibili ai generi *Pseudomonas* (colonia n° 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13) ed *Erwinia* (colonia n° 5 e 14). Oltre ai suddetti campioni sono state analizzate altre colonie, morfologicamente diverse dalle altre saggate, identificate come: *Rhanella acquatilis*, *Pantoea cedenensis* e *Paenibacillus polymyxa*.

#### II.3.5.1.3b PCR con primer specifici

Le colonie, isolate durante il 2004, saggiate per la prova sono state la n° 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 e 10. I primer utilizzati per la prova (Loreti *et. al.*, 2002) non hanno consentito di discriminare eventuali colonie di *P. avellanae*. Nel 2005 le stesse colonie (n° 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 15 e 16), e quelle isolate nel medesimo anno (n° 9, 10, 11, 12, 13, 17 e 18), sono state saggiate con gli altri primer specifici . E' risultato che nessuna delle colonie saggiate risulta ascrivibile a *P. avellanae* (Fig. 50) (Proietti Zolla, 2005).



**Fig. 50 Risultato dell'amplificazione ottenuto con i primer SCAR250F e SCAR250R. Linea 1: colonia n°4; linea 2: colonia n°17; linea 3: colonia n°9; linea 4: colonia n°6; linea 5: colonia n°1; linea 6: colonia n°8; linea 7: colonia n°15; linea 8: colonia n°18; linea 9: colonia n°10; linea 10: colonia n°11; linea 11: colonia n°12; linea 12: colonia n°13; linea 13: controllo negativo; linea 14: *Pseudomonas avellanae* NCPPB 3872.**

#### II.3.5.1.4 Prove di patogenicità

Le prove effettuate in primavera non hanno dato esito (nessuna pianta inoculata si è ammalata). Le piante inoculate nel mese di dicembre, con le colonie n° 2 (*Pseudomonas* sp.), 5 (*Erwinia* sp.) e 7 (*Pseudomonas* sp.), hanno mostrato in primavera (marzo 2005) sintomi del tutto paragonabili a quelli tipici della moria, su alcune delle piantine inoculate (Fig. 51). Il successivo reisolamento non ha però evidenziato la presenza di alcuna specie batterica. È stato quindi impossibile associare con sicurezza, i sintomi rilevati, alle specie batteriche inoculate.



**Fig. 51. Esito delle prove di patogenicità effettuate durante il mese di dicembre 2004.**

### II.3.5.2 Analisi quantitativa delle popolazioni batteriche

Un numero rappresentativo di campioni entomologici è stato utilizzato per isolare ed identificare le popolazioni batteriche presenti internamente e/o esternamente all'insetto. Su un totale di 5.678 insetti catturati vivi, più del 16% (915) è stato sottoposto ad analisi microbiologiche.

Dal conteggio su piastra delle colonie batteriche è risultato che il loro numero/insetto varia tra l'interno (da  $7,4 \times 10^4$  a  $2 \times 10^5$  u.f.c./insetto nel 2004; da  $1,9 \times 10^5$  a  $8,1 \times 10^5$  u.f.c./insetto nel 2005) e l'esterno (da  $1,8 \times 10^4$  a  $6,6 \times 10^4$  u.f.c./insetto nel 2004; da  $2,9 \times 10^4$  a  $6,2 \times 10^4$  u.f.c./insetto nel 2005) del campione. I valori registrati all'interno di ogni sito (noccioleto "a" e "c") sono risultati dello stesso ordine di grandezza considerando i campioni provenienti dalla tesi Sano e da quella Malato (ordine di grandezza intorno a  $10^4$  u.f.c./insetto). Dall'analisi delle colonie batteriche isolate nel secondo e terzo anno di ricerca, internamente e esternamente all'insetto, è risultato che circa il 60% è ascrivibile al genere *Erwinia* (*Erwinia* sp. e *Pantoea cedenensis*), il 14% al genere *Pseudomonas* e il restante 26% ad altri generi (*Plantibacter* sp., *Rhanella* sp. *Paenibacillus* sp.).

#### II.3.5.2.1 Prove condotte durante il 2004

Nel corso del 2004, nel noccioleto "a", come si può osservare dal grafico (Fig. 52), la carica batterica per insetto (interno ed esterno), nelle due tesi Sano e Malato, mostra un andamento piuttosto regolare con valori compresi prevalentemente tra  $1 \times 10^2$  e  $1 \times 10^3$  u.f.c./insetto. Il valore più alto è stato rilevato nel campionamento del 14 giugno con  $3,9 \times 10^4$  u.f.c./insetto ottenuto nella tesi Malato dall'isolamento della microflora interna all'anisandro, mentre il valore più basso è stato ottenuto nella stessa area dall'isolamento esterno dell'insetto nei campionamenti del 17 maggio e 7 giugno. Nei campionamenti del 29 marzo, 5, 13, 19 aprile, 21 giugno e 5 luglio l'assenza di istogrammi nella tesi Malato e/o Sano è dovuta (Fig. 32) a una mancanza di catture di *A. dispar*. Dal grafico (Fig. 52) si può osservare che la carica batterica interna all'insetto è maggiore di quella esterna nella maggioranza degli isolamenti. Analizzando statisticamente i dati (esterno/interno) con il test t di Student risulta che, nella tesi Malato, non c'è significatività nel campionamento del 15, 22 marzo e 10 maggio ( $P > 0,05$ ) mentre nelle altre date P è compreso tra 0,05 e 0,001.

Nella tesi Sano la stessa analisi mostra valori di  $P > 0,05$  in data 5, 26 aprile e 10, 24 maggio.

Dall'analisi quali-quantitativa (Fig. 53) emerge che durante il 2004 nel nocciololetto “a” sono state isolate complessivamente  $4,9 \times 10^5$  u.f.c. ascrivibili al genere *Erwinia*;  $1,5 \times 10^5$  u.f.c. ascrivibili al genere *Pseudomonas*;  $1,15 \times 10^5$  u.f.c. ascrivibili ad altri generi (*Rhanella* sp., *Plantibacter* sp. e *Paenibacillus polymyxa*). Il valore più elevato di *Erwinia* spp. è stato ottenuto dagli isolamenti interni alle femmine di *A. dispar* effettuati nella tesi Malato con  $6,3 \times 10^4$  u.f.c./insetto. Nella stessa tesi sono state ottenute  $4 \times 10^3$  u.f.c./insetto/interno di batteri ascrivibili al genere *Pseudomonas*. Nel corso del 2004, le pseudomonadi risultano maggiormente isolate all'interno dell'insetto nella tesi Sano con valori che hanno raggiunto le  $2,8 \times 10^4$  u.f.c./insetto. Nella tesi Malato, dagli isolamenti effettuati all'esterno dell'insetto, le pseudomonadi risultano in numero maggiore rispetto alle Erwinie con valori che hanno raggiunto rispettivamente le  $2,3 \times 10^4$  e  $3,8 \times 10^3$  u.f.c./insetto. Dalla tabella (Tab. VI) in cui vengono riportate le percentuali dei vari generi isolati (esterno/interno) nelle due tesi (Sano/Malato), nel corso del 2004, si evince che nella tesi Malato (interno), *Erwinia* sp. ha una percentuale di isolamenti pari al 65% del totale contro il 5,5% di *Pseudomonas* spp. Nella stessa tesi, dagli isolamenti effettuati all'esterno delle femmine dell'insetto, risulta che il 73% del totale è ascrivibile al genere *Pseudomonas* e solo il 7% a *Erwinia* sp. Nella tesi Sano, internamente all'insetto sono risultati maggiormente isolati i seguenti ceppi batterici: *Pantoea cedenensis* (35%), *Pseudomonas* spp. (33%) e *Erwinia* sp. (14,5%) e *Paenibacillus polymyxa* (12,5%); esternamente, *Erwinia* sp., raggiunge una percentuale di isolamento pari al 43% del totale, *P. cedenensis* il 24,5%, *Rhanella aquatilis* il 18,5% e infine *Pseudomonas* spp. l'11%.

Genere o specie batterica	Noccioleto "a"				Noccioleto "c"				Bosco	
	<i>Sano</i>		<i>Malato</i>		<i>Sano</i>		<i>Malato</i>		Int.	Est.
	Int.	Est.	Int.	Est.	Int.	Est.	Int.	Est.		
<i>Erwinia sp.</i>	14,5%	43%	65%	7%	3,5%	54%	47%	28,5%	40%	23%
<i>Plantibacter sp.</i>	5%	24,5%	0	3%	1,5%	3%	0	1,3%	0	33%
<i>Pantoea cedenensis</i>	35%	0	23%	7%	88%	13%	26%	0,2%	41%	8%
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	12,5%	3%	0	2%	6%	0	0	0,3%	6%	11%
<i>Rhanella acquatilis</i>	0	18,5%	6,5%	8%	0	6%	2%	3,7%	5%	7%
<i>Pseudomonas spp.</i>	33%	11%	5,5%	73%	1%	24%	25%	66%	8%	18%

**Tab. VI. Generi e specie batteriche (valori percentuali) isolate durante il 2004 dall'insetto (esterno e interno).**

Nel nocchioleto "c" nel corso del 2004 (Fig. 54) sono stati rilevati valori di carica batterica compresi tra  $1 \times 10^2$  e  $1 \times 10^4$  u.f.c./insetto. L'andamento appare irregolare con numerosi dati nulli. L'assenza di istogrammi nel corso della stagione di sperimentazione è dovuta ad una mancata presenza dell'insetto in campo nelle varie tesi (Sano/Malato) (Fig. 33). I valori più alti di unità formanti colonia sono stati ottenuti durante il mese di maggio con un picco di  $5,5 \times 10^4$  u.f.c./insetto nella tesi Sano dall'isolamento interno all'insetto (Fig. 54). Valori elevati sono stati rilevati anche in data 3 e 17 maggio rispettivamente nella tesi Malato (isolamento esterno) e Sano (isolamento interno) con valori pari a  $4,5 \times 10^4$  e  $3,8 \times 10^4$  u.f.c./insetto. I valori più bassi di carica batterica/insetto sono stati registrati in data 15 marzo e 24 maggio con  $1,5$  e  $1,2 \times 10^2$  u.f.c. rispettivamente nella tesi Sano e Malato entrambi dagli isolamenti esterni. Anche in questo nocchioleto (Fig. 54) nel corso della stagione, sono stati isolati un numero maggiore di batteri all'interno rispetto all'esterno dell'insetto. L'analisi statistica dei dati ottenuti dagli isolamenti interni e esterni nella tesi Malato mostra valori di  $P > 0,05$  (non significativi) nella data del 5 aprile e 17 maggio.

Nella tesi Sano la stessa analisi evidenzia valori di  $P > 0,05$  il 22 marzo; valori di  $P < 0,001$  il 26 aprile; compresi tra 0,05 e 0,001 il 15 marzo e il 3, 10 e 17 maggio.

Dal grafico quali-quantitativo (Fig. 53) si nota che nel nocchioleto "c", nel corso del 2004, sono state isolate complessivamente  $2 \times 10^5$  u.f.c./insetto del genere *Erwinia*,  $6,7 \times 10^4$  u.f.c./insetto del genere *Pseudomonas spp.*,  $1,8 \times 10^4$  u.f.c./insetto di altre tipologie batteriche. Nella tesi Malato sono state isolate esternamente più colonie ascrivibili al genere *Pseudomonas* ( $4,3 \times 10^4$  u.f.c./insetto) rispetto a quelle del genere

*Erwinia* ( $1,9 \times 10^4$  u.f.c./insetto); dagli isolamenti interni emerge invece che le *Erwiniae* ( $5,4 \times 10^4$  u.f.c./insetto) sono maggiormente presenti delle *Pseudomonadaceae* ( $1,9 \times 10^4$  u.f.c./insetto). Nella tesi Sano le Erwinie risultano maggiori delle Pseudomonadi sia negli isolamenti interni che quelli esterni all'insetto. Dalla tabella (Tab. VI) si evince che nella tesi Malato la percentuale maggiore risulta ascrivibile rispettivamente ad *Erwinia* sp. dagli isolamenti interni (47%) e a *Pseudomonas* spp. (66%) da quelli esterni. Nella tesi Sano, dagli isolamenti interni emerge che l'88% del totale è ascrivibile a *Pantoea cedenensis*; da quelli interni il 54% è ascrivibile ad *Erwinia* sp., il 13% a *P. cedenensis*, 24% a *Pseudomonas* spp., il 6% a *Rhanella acquatilis* e il restante 3% a *Plantibacter* sp.

Confrontando la carica batterica isolata dall'insetto (esterno e interno) nella tesi Sano e nella tesi Malato dei due noccioli, nel corso del 2004, risulta che i valori ottenuti sono dello stesso ordine di grandezza (circa  $10^3$  u.f.c./insetto). All'interno della tesi Malato sono state rilevate complessivamente, dagli isolamenti esterni all'insetto,  $2,8 \times 10^3$  u.f.c. nel nocciolo "a" e  $8,2 \times 10^3$  u.f.c. nel nocciolo "c", mentre da quelli interni  $6,7 \times 10^3$  u.f.c. nel nocciolo "a" e  $9,4 \times 10^3$  u.f.c. nel nocciolo "c". Nella tesi Sano dei due noccioli, sono state isolate complessivamente  $4,1 \times 10^3$  u.f.c. e  $2,9 \times 10^3$  u.f.c. dall'esterno dell'anisandro rispettivamente nel nocciolo "a" e "c". Dall'interno dell'insetto, è risultato che nella tesi Sano sono presenti  $6,4 \times 10^3$  u.f.c. nel nocciolo "a" e  $2,1 \times 10^4$  u.f.c. nel nocciolo "c".

Nel bosco (Fig. 55) l'andamento dei valori della carica batterica ottenuta dagli isolamenti dall'insetto (esterni e interni) mostra un andamento irregolare. Come per i precedenti noccioli, risulta una carica batterica interna maggiore di quella esterna. Il valore più alto è stato ottenuto in data 14 giugno con  $4,2 \times 10^4$  u.f.c./insetto, mentre il valore più basso è stato rilevato nei campionamenti del 15 marzo e del 28 giugno con  $9 \times 10$  u.f.c./insetto. Dall'analisi statistica del t di Student tra gli isolati ottenuti all'esterno e quelli all'interno risultano valori di P compresi tra 0,05 e 0,001 in tutti i campionamenti tranne in quello del 26 aprile in cui  $P < 0,001$ .

Dalla tabella (Tab. VI) riguardante le percentuali dei vari generi e specie isolati dall'esterno e dall'interno dell'insetto si nota la presenza di *Erwinia* sp. rispettivamente per il 23% e il 40% della carica batterica totale. Le pseudomonadi risultano con valori



percentuali bassi (8%) negli isolamenti della microflora interna all'insetto; dal totale degli isolamenti esterni è risultato un valore pari al 18% di pseudomonadi.

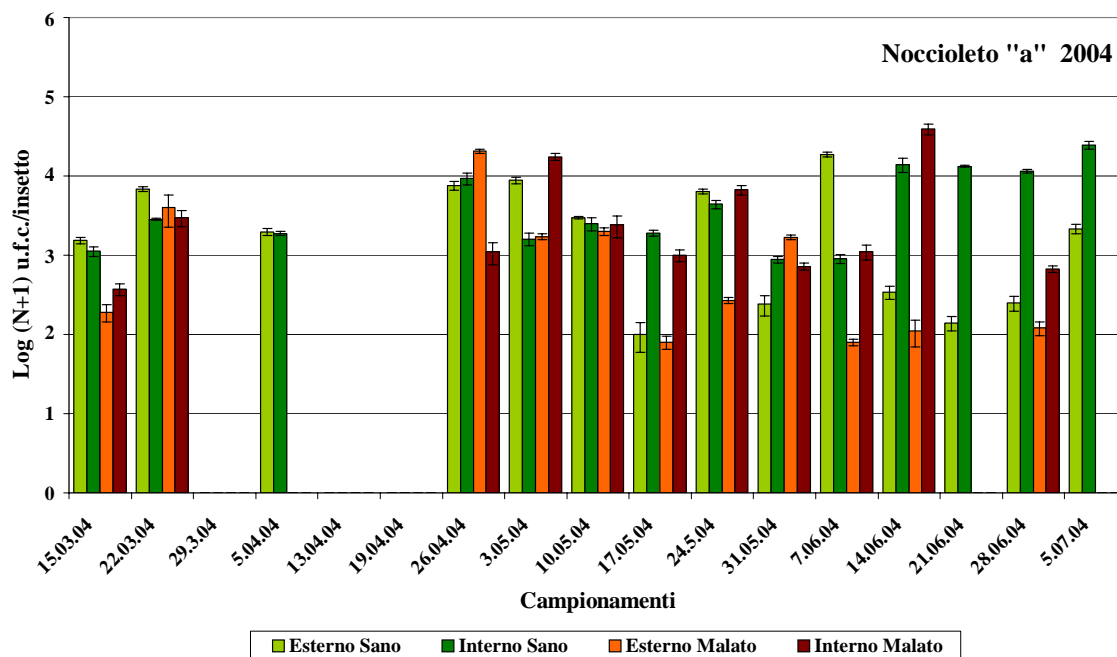


Fig. 52. Carica batterica per insetto (interno ed esterno), nelle due tesi Sano e Malato nel noccioleto "a" nel corso del 2004.

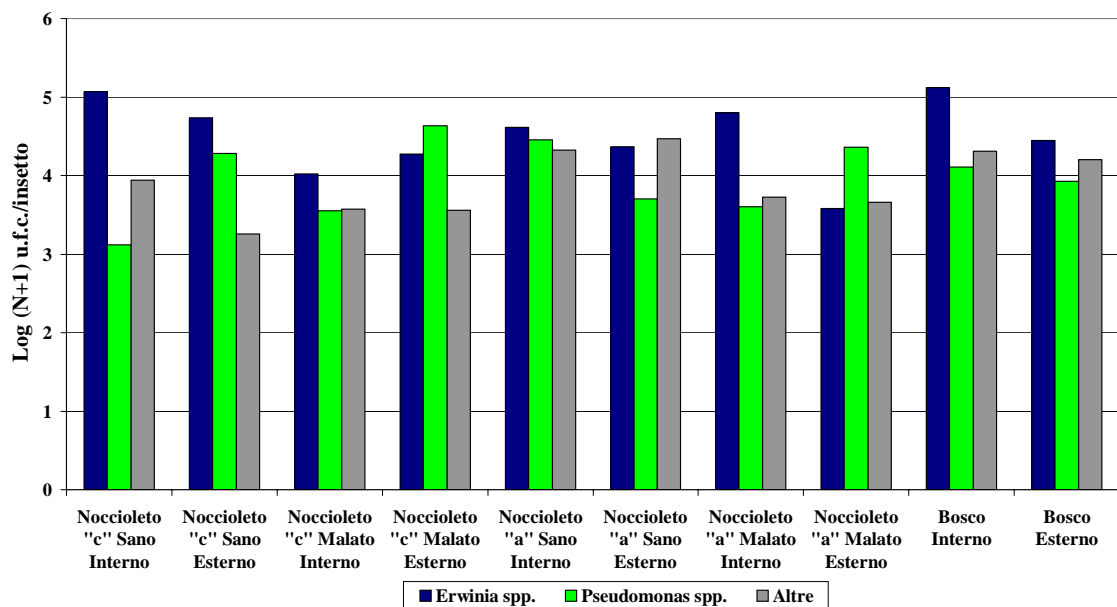


Fig. 53. Analisi quali-quantitativa delle colonie batteriche isolate dall'insetto (interno-esterno) nel corso del 2004 nei due noccioleti sperimentali e nel bosco.

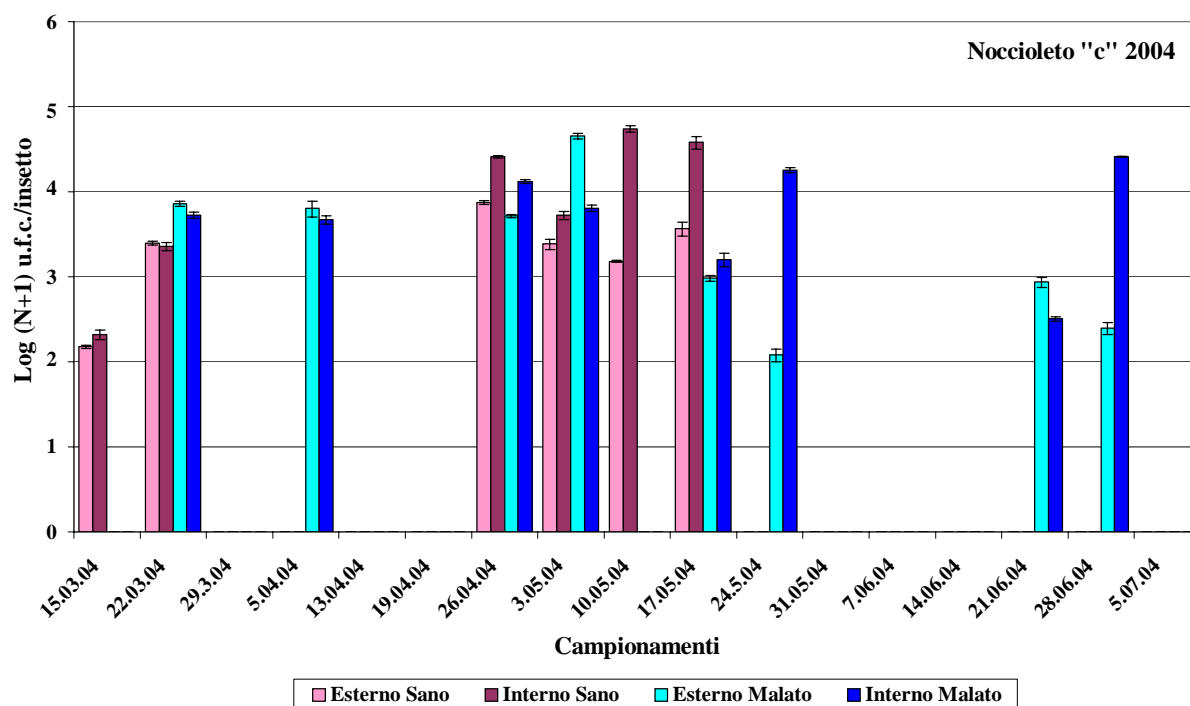


Fig. 54. Carica batterica per insetto (interno ed esterno), nelle due tesi Sano e Malato nel nocciolo "c" nel corso del 2004.

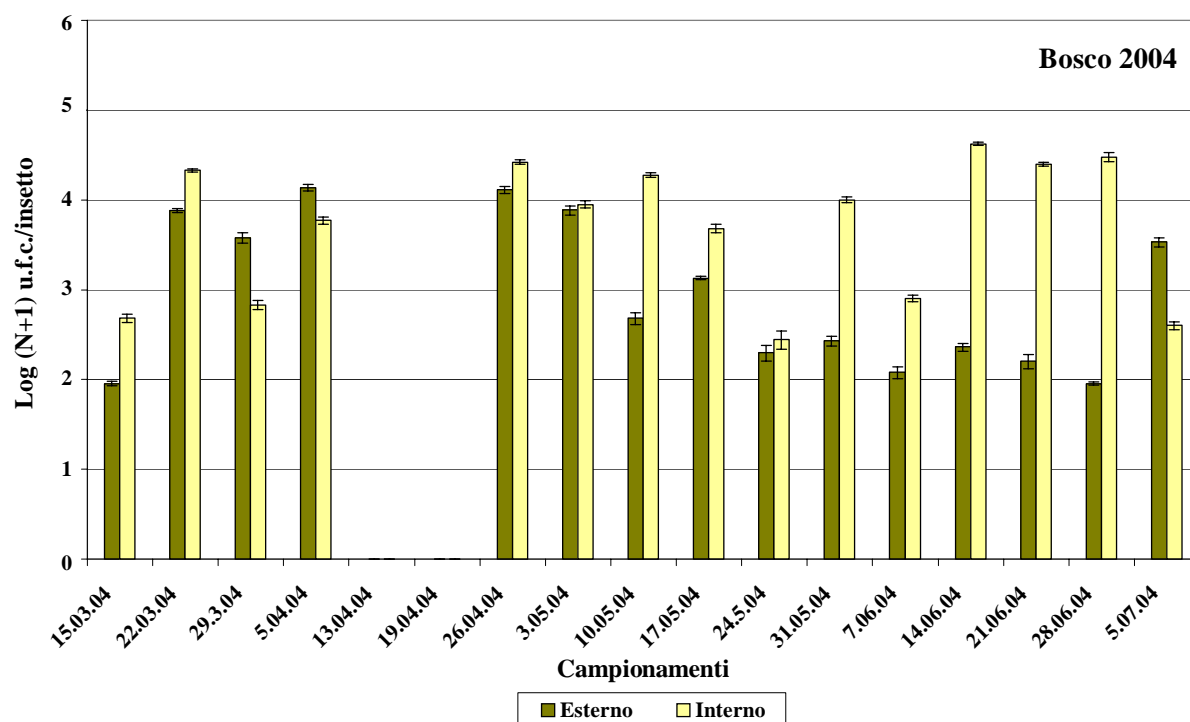


Fig. 55. Carica batterica per insetto (interno ed esterno), nel bosco nel corso del 2004.

### II.3.5.2.2 Prove condotte durante il 2005

Nel nocciuolo “a” (Fig. 56), nel corso del 2005, si nota un andamento irregolare dei valori della carica batterica isolata dall’insetto (esterno/interno). I valori oscillano da  $1,2 \times 10^2$  (26 aprile) a  $3,9 \times 10^5$  (13 giugno) u.f.c./insetto, entrambi nella tesi Sano, rispettivamente dagli isolamenti esterni e internidell’anisandro. L’assenza di istogrammi registrati nella tesi Malato, nei campionamenti del 12 aprile, 30 maggio e del 6, 13 e 20 giugno (Fig. 56) corrispondono, come si può notare dal grafico (Fig. 38) ad un’assenza di catture dell’insetto nella suddetta area. Dal grafico (Fig. 56) risulta inoltre che i valori di carica batterica/insetto sono maggiori all’interno rispetto a quelli ottenuti dagli isolamenti esterni, sia nella tesi Sano che in quella Malato. Nella tesi Sano, solo nei campionamenti del 30 maggio e del 6 giugno, la carica batterica esterna è risultata maggiore che all’interno, mentre nella tesi Malato questo si è verificato solo in data 21 marzo. Dall’analisi statistica, utilizzando il t di Student, effettuata confrontando i valori ottenuti dall’esterno e dall’interno di *A. dispar* nella tesi Sano, risultano valori di P compresi tra 0,05 e 0,01 in tutte le date di campionamento tranne il 18 aprile con valori di  $P > 0,05$ .

La stessa analisi effettuata nella tesi Malato ha mostrato valori di P compresi tra 0,05 e 0,01 in tutti i campionamenti.

Il grafico (Fig. 57) e la tabella VII mostrano, complessivamente, una prevalenza di colonie ascrivibili al genere *Erwinia* ( $8,2 \times 10^5$  u.f.c.) rispetto a quelle del genere *Pseudomonas* ( $1,28 \times 10^5$  u.f.c.). Nella tesi Sano, dall’isolamento della microflora interna, sono stati raggiunti valori di  $6,9 \times 10^5$  u.f.c del genere *Erwinia*. I valori più alti per il genere *Pseudomonas* sono stati ottenuti dagli isolamenti interni dei campioni catturati nella tesi Malato ( $5,7 \times 10^4$  u.f.c.). Dagli isolamenti esterni, nella tesi Sano e nella tesi Malato, le colonie del genere *Pseudomonas* sono risultate essere rispettivamente  $2 \times 10^3$  e  $1,5 \times 10^4$  u.f.c.; quelle del genere *Erwinia* risultano avere rispettivamente valori di  $1,6 \times 10^4$  nella tesi Sano e  $9,8 \times 10^3$  u.f.c. nella tesi Malato. Dalla tabella (Tab. VII) si evince che sul totale della carica batterica ottenuta dagli isolamenti della microflora esterna all’insetto, nella tesi Malato, il 26% è ascrivibile a *Erwinia* sp. e il 53% a *Pseudomonas* spp. I valori ottenuti dall’interno raggiungono il 27% e il 32% rispettivamente per *Erwinia* sp. e *Pseudomonas* spp. Nella tesi Sano, sia negli isolamenti dall’esterno che dall’interno, risulta notevolmente maggiore la presenza

di *Erwinia* sp. rispetto a *Pseudomonas* spp. con valori che raggiungono il 78% (interno) e il 29,5% (esterno) per la prima specie e 6,5% e 4% per il secondo gruppo. Le altre colonie isolate (*Plantibacter* sp., *Rhanella* sp., *Paenibacillus polymyxa*) risultano avere percentuali piuttosto basse. Unica eccezione è la notevole presenza (34,5%) di *Paenibacillus polymyxa* negli isolamenti esterni effettuati nella tesi Sano.

Genere o specie batterica	Noccioleto "a"				Noccioleto "c"				Bosco	
	Sano		Malato		Sano		Malato		Int.	Est.
	Int.	Est.	Int.	Est.	Int.	Est.	Int.	Est.		
<i>Erwinia</i> sp.	78%	29,5%	27%	26%	19%	0	21%	39,5%	31%	52,5%
<i>Plantibacter</i> sp.	3%	12%	0	11%	3,5%	4%	27,5%	35%	0	10,5%
<i>Pantoea cedenensis</i>	7,5%	0	29%	8%	29%	14%	46%	0,5%	27%	0
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	5%	34,5%	5%	2%	29,5%	10%	0,5%	25%	10%	13%
<i>Rhanella acquatilis</i>	0	20%	7%	0	0	2%	0	0	11%	23%
<i>Pseudomonas</i> spp.	6,5%	4%	32%	53%	19%	70%	5%	0	21%	1%

**Tab. VII. Generi e specie batteriche (valori percentuali) isolate durante il 2005 dall'insetto (esterno e interno).**

Analizzando l'andamento dei valori della carica batterica nel noccioleto "c", nel corso del 2005 (Fig. 58) si nota un trend piuttosto regolare con valori compresi maggiormente tra  $1 \times 10^2$  e  $1 \times 10^4$  u.f.c./insetto. Il picco massimo si è registrato nel campionamento del 9 maggio con una carica batterica totale di  $6,9 \times 10^4$  u.f.c./insetto ottenute dall'isolamento della microflora interna all'insetto nella tesi Sano. Nella stessa data si è registrato anche il valore minimo di carica batterica con un valore pari a  $1,1 \times 10^2$  u.f.c./insetto ottenuto dall'isolamento dei batteri esterni ad *A. dispar* catturati nella tesi Malato. L'assenza di istogrammi nei campionamenti del 23 e 30 maggio e 6 e 13 giugno (Fig. 58) corrispondono, come si può notare dal grafico (Fig. 39) ad un'assenza di catture dell'insetto. Analizzando i valori ottenuti dagli isolamenti interni ed esterni nell'area "sana" ed in quella "malata" si nota che la carica batterica totale risulta maggiore all'interno dell'insetto rispetto a quella presente al suo esterno. Solo nel campionamento del 12 aprile, nella tesi Malato, i valori della carica batterica risultano significativamente maggiori all'esterno con valori rispettivamente pari a  $1,2 \times 10^4$  u.f.c./insetto/esterno e  $6,2 \times 10^2$  u.f.c./insetto/interno. Dal confronto dei valori ottenuti esternamente all'insetto nella tesi Sano e nella tesi Malato non risultano differenze significative. Come si evince dal grafico (Fig. 57) nel noccioleto "c", durante la stagione

di campionamento, sono state isolate complessivamente un numero maggiore di u.f.c./insetto ascrivibili al genere *Erwinia* ( $3,9 \times 10^5$ ) rispetto a quelle del genere *Pseudomonas* ( $1,1 \times 10^5$ ). Si nota inoltre che, all'interno della tesi Malato, non sono mai state isolate Pseudomonadi dall'esterno dell'insetto. All'interno della tesi Sano dagli isolamenti effettuati sull'esterno dell'insetto si osserva un numero maggiore di ceppi del genere *Pseudomonas* ( $3,4 \times 10^4$  u.f.c./insetto) rispetto a quelli del genere *Erwinia* ( $6,8 \times 10^3$  u.f.c./insetto). Il numero maggiore di colonie ascrivibili al genere *Erwinia* risulta isolato nella tesi Malato dall'interno dell'insetto con un numero di u.f.c./insetto pari a  $2 \times 10^5$ . Le pseudomonadi sono state isolate maggiormente nella tesi Sano con un valore pari a  $6,3 \times 10^4$  u.f.c./insetto/interno. Le colonie non ascrivibili ad *Erwinia* spp. e ad *Pseudomonas* spp. definite come "altre" (*Plantibacter* sp., *Rhanella acquatilis*, *Paenibacillus polymyxa*) mostrano valori maggiori nella tesi Sano e Malato ( $2,1$  e  $2,2 \times 10^5$  u.f.c./insetto) dagli isolamenti ottenuti dall'interno dell'insetto. Nella tabella (Tab. VII) vengono riportate le percentuali dei vari generi isolati dall'insetto (interno/esterno) nelle varie tesi. Nel nocciolo "c", all'interno della tesi Sano, non è stata mai isolata *Erwinia* spp. dall'esterno mentre le pseudomonadi sono presenti per il 70% del valore totale di carica batterica. Dagli isolamenti interni all'insetto sia *Erwinia* sp. che *Pseudomonas* spp. sono presenti per il 19%. Nella tesi Malato, esternamente all'insetto è risultato un valore pari al 39,5% di *Erwinia* sp., mentre non sono state isolate pseudomonadi. Internamente sono stati isolati maggiormente batteri ascrivibili a *Pantoea cedenensis* (46%) mentre *Erwinia* sp. e *Pseudomonas* spp. sono presenti rispettivamente al 21% e 5%. Dall'analisi statistica risulta che, nella tesi Sano, P è compreso tra valori di 0,05 e 0,001 in tutti gli isolamenti tranne il 12 aprile in cui P risulta maggiore di 0,05.

La stessa analisi nella tesi Malato evidenzia che P risulta avere valori compresi tra 0,01 e 0,001 in tutti i campionamenti. Nel campionamento del 12 aprile P risulta minore di 0,001.

Confrontando le unità formanti colonia complessivamente isolate dall'insetto nei due noccioli ("a" e "c") all'interno delle due tesi (Sano e Malato), nel corso del 2005, non si rilevano differenze tra i due siti. Risulta infatti che complessivamente, nei due noccioli, nella tesi Malato sono state isolate dall'esterno dell'insetto  $3,3 \times 10^3$  u.f.c. e  $3,6 \times 10^3$  u.f.c. rispettivamente nel nocciolo "a" e "c". Anche le u.f.c. isolate

internamente all'anisandro, catturato nella tesi Malato, risultano dello stesso ordine di grandezza ( $2,2 \times 10^4$  u.f.c. nel nocciolo "a" e  $2,6 \times 10^4$  u.f.c. nel nocciolo "c"). Nella tesi Sano sono state isolate complessivamente  $4 \times 10^3$  u.f.c. dall'esterno dell'insetto nel nocciolo "a" e  $4,9 \times 10^3$  u.f.c. nel nocciolo "c". Internamente all'insetto, nella tesi Sano, è risultato un valore di u.f.c. pari a  $5,8 \times 10^4$  e  $3,3 \times 10^4$  rispettivamente nel nocciolo "a" e "c".

Dal grafico (Fig. 59) del bosco si nota un andamento irregolare sia nei valori della carica batterica esterna che di quella interna all'insetto. Anche in questa tesi la carica batterica totale interna risulta maggiore di quella esterna. Il picco più alto risulta essere di  $5,1 \times 10^4$  u.f.c./insetto/interno ottenuto nel campionamento del 16 maggio, mentre il valore più basso si registra in data 20 giugno con  $4 \times 10$  u.f.c./insetto/esterno. Dall'analisi statistica, effettuata utilizzando il t di Student, risulta che tra esterno ed interno P ha valori compresi tra 0,05 e 0,001 in tutti i campionamenti tranne il 18 aprile in cui P risulta maggiore di 0,05.

Dalla tabella (Tab. VII) riguardante le percentuali dei vari generi e specie isolati dall'esterno dell'insetto si nota la presenza di *Erwinia* sp. per il 52,2% della carica batterica totale. Le pseudomonadi risultano praticamente assenti (1%) all'esterno degli insetti analizzati. Anche all'interno dell'insetto il gruppo delle *Erwinie* spp. (*Erwinia* sp. e *Pantoea* sp.) risultano preponderanti sulle altre specie con il 58% (31% *Erwinia* sp.; 27% *Pantoea cedenensis*) contro il 21% delle pseudomonadi.

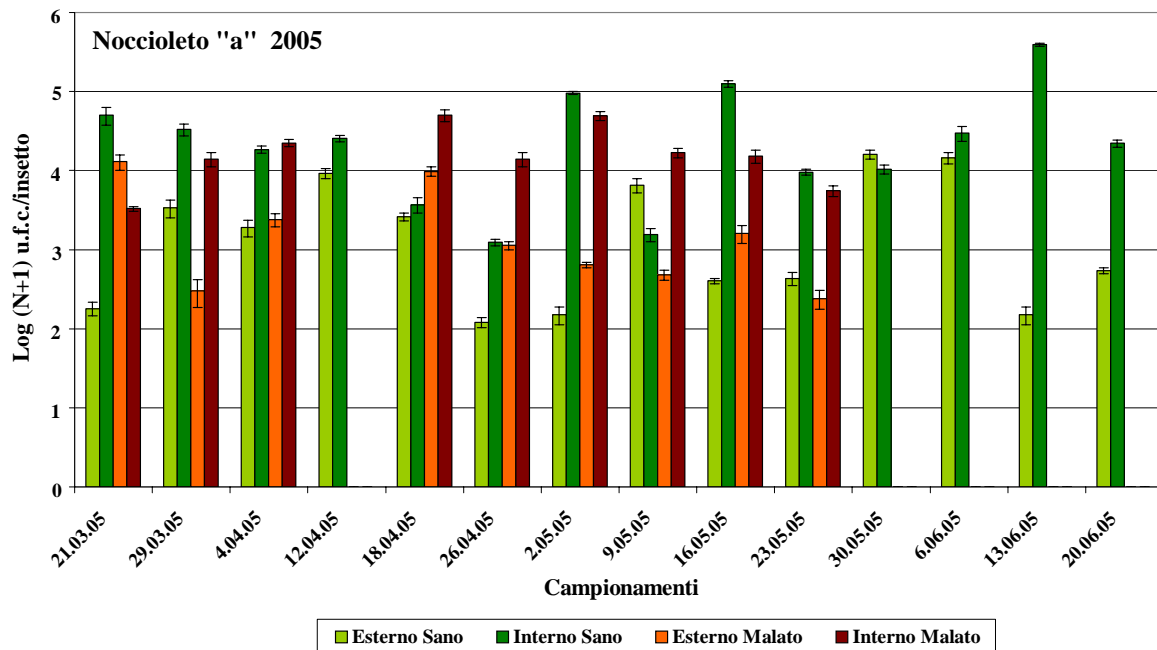


Fig. 56. Carica batterica per insetto (interno ed esterno), nelle due tesi Sano e Malato nel nocciolo "a" nel corso del 2005.

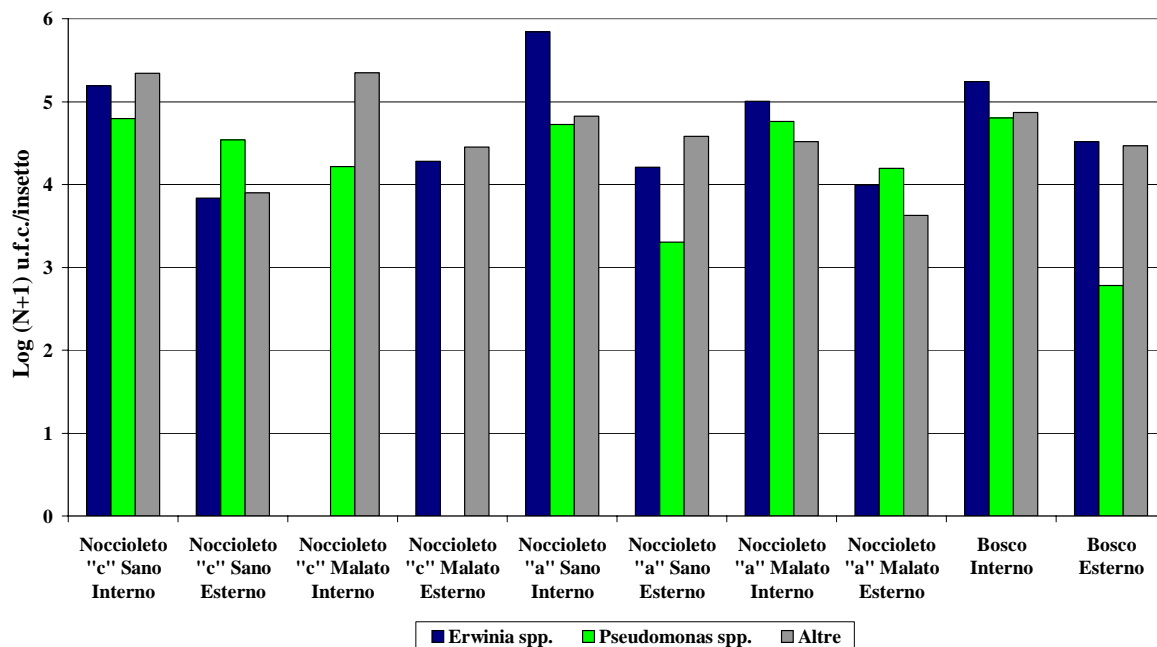


Fig. 57. Analisi quali-quantitativa delle colonie batteriche isolate dall'insetto (interno-esterno) nel corso del 2005 nei due noccioli sperimentali e nel bosco.

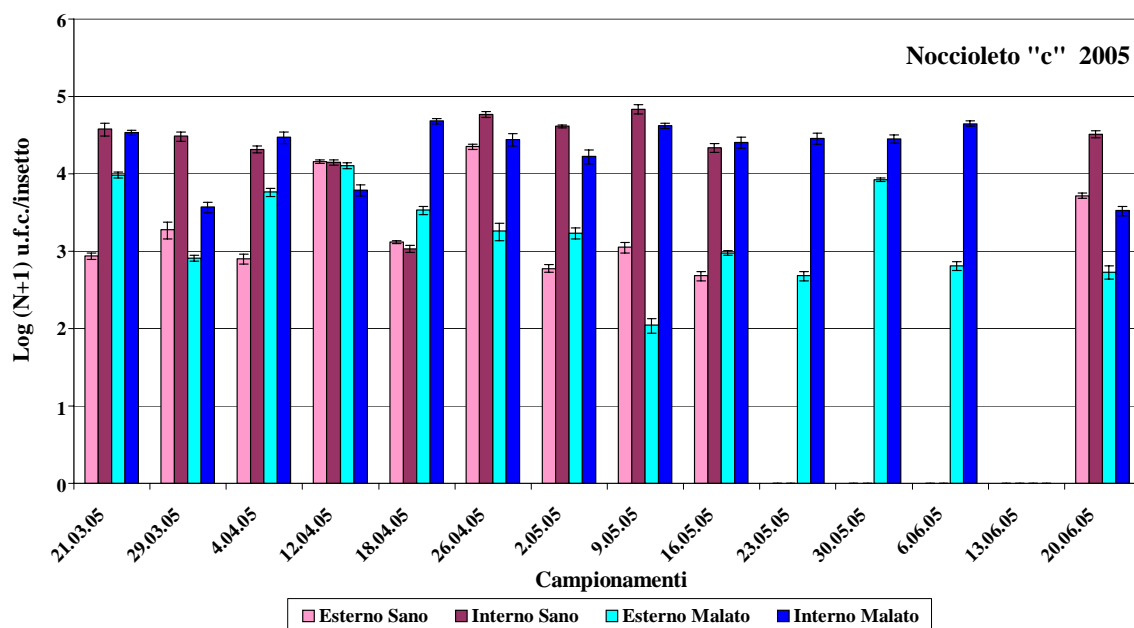


Fig. 58. Carica batterica per insetto (interno ed esterno), nelle due tesi Sano e Malato nel nocciolo "c" nel corso del 2005.

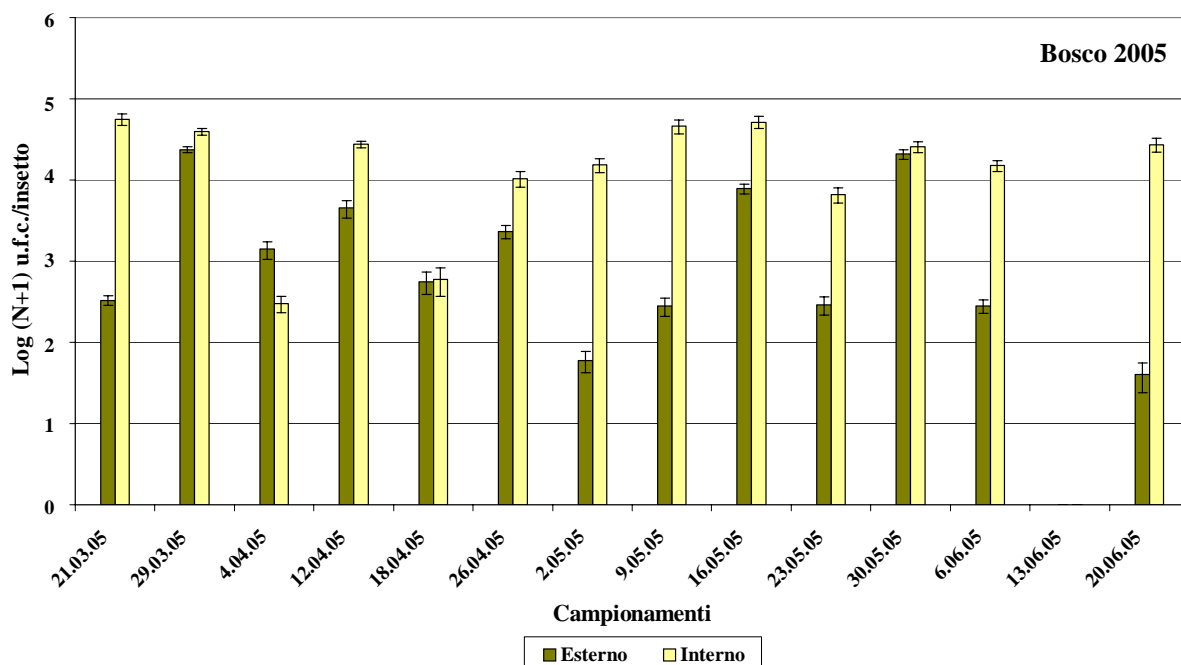


Fig. 59. Carica batterica per insetto (interno ed esterno), nel bosco nel corso del 2005.



## II.4 DISCUSSIONE

Il volo dell'insetto risulta essere notevolmente influenzato dalle precipitazioni e dalle temperature (minime e massime). Dai risultati infatti si evince che nei periodi di pioggia e/o di freddo il volo dell'insetto si interrompe per riprendere quando le condizioni meteorologiche migliorano. In tutti e tre gli anni considerati il picco di volo delle femmine si registra sempre nel periodo compreso tra l'ultima settimana di aprile e la prima di maggio. Non si registrano differenze tra le catture effettuate in aree in cui sono presenti piante di nocciolo in buono stato vegetativo e quelle in cui sono presenti piante poste in aree colpite dalla "moria".

Non si notano differenze nel numero complessivo di catture effettuate con i due tipi di trappola utilizzate. Si può concludere quindi che le Mastrap<sup>®</sup> L da noi modificate potrebbero essere anch'esse utilizzate in programmi di controllo delle popolazioni che implicano il mass trapping. Le trappole da noi modificate risultano inoltre, molto più facilmente gestibili in quanto non necessitano di collante per trattenere gli insetti catturati. Ulteriori ricerche sono in atto allo scopo di perfezionare ulteriormente dette trappole.

Dalle consistenti catture effettuate con trappole posizionate all'interno del bosco adiacente ad un nocciolo si conferma la notevole polifagia dell'insetto. In programmi di controllo delle popolazioni che utilizzano la tecnica del mass trapping si deve quindi tener presente che il bosco rappresenta un potenziale serbatoio di infestazione; questa tecnica, di conseguenza, dovrà includere anche una fascia di bosco adiacente al nocciolo da proteggere.

Poiché sino ad ora le notizie sul ciclo biologico dell'insetto risultavano frammentarie e incomplete, questo studio triennale, che contiene osservazioni originali, ha permesso di chiarire meglio la biologia dello scolitide.

Con questa ricerca si riferisce, per la prima volta, sulla dinamica delle catture circadiane dell'insetto effettuate con trappole Rebell<sup>®</sup> Rosso. La ricerca mette in risalto che l'insetto inizia a volare con temperature di 13-14°C, al contrario di quanto affermato da altri Autori che riferiscono che il volo dell'insetto inizia con temperature di 20-22°C. Questo dato è una ulteriore conferma che l'insetto inizia a volare durante il mese di marzo, quando appunto si hanno temperature massime di 13-14°C. E' all'inizio di

questo mese quindi, che devono essere installate le trappole per la cattura di massa dell'insetto.

Dall'osservazione delle spermateche si deduce che l'insetto si accoppia all'esterno delle gallerie di proliferazione. Questo dato è confermato dall'assenza, in questa specie, di una camera di accoppiamento nel sistema di gallerie. La sezione delle gallerie infatti, essendo dello stesso diametro delle femmine non permette la copula.

Dall'analisi quantitativa dei batteri totali isolati dall'anisandro risulta che l'andamento, pur fluttuando nei vari campionamenti, presenta nel complesso un aumento progressivo dovuto all'aumento delle temperature che si è verificato a partire dall'inizio del mese di marzo fino alla fine del mese di giugno. Questo andamento è particolarmente evidente per quanto riguarda i batteri isolati esternamente all'insetto in quanto è verosimile che essi risultino maggiormente suscettibili alle variazioni di temperatura rispetto a quelli isolati internamente.

Sulla base della biologia dell'insetto, particolare attenzione è stata posta sugli isolati batterici ottenuti dall'esterno dei campioni entomologici analizzati. L'anisandro, infatti, potrebbe imbrattarsi e trasportare attivamente batteri patogeni all'interno delle piante di nocciolo causandone l'infezione. L'isolamento della microflora interna dei campioni entomologici è stato effettuato per evidenziare la possibile presenza di cellule batteriche patogene nel primo tratto dell'apparato digerente dell'insetto, in particolare nell'apparato boccale, in quanto probabilmente i batteri fitopatogeni non sopravvivono nel tratto più profondo. Particolarmente interessante sarebbe approfondire questo aspetto, mai affrontato prima, al fine di comprendere in modo più esaustivo le potenzialità dell'anisandro nel trasmettere batteri fitopatogeni. In futuro, grazie anche alla costruzione dei primer specifici per *Pseudomonas avellanae* (Proietti Zolla, 2005) sarà possibile individuare ed eventualmente localizzare la presenza del batterio direttamente sull'insetto con un notevole risparmio di tempo e di denaro.

Il numero di batteri isolati internamente all'anisandro è risultato più alto rispetto a quello ottenuto dagli isolamenti della microflora batterica esterna. Questo dato presumibilmente è dovuto alla presenza di batteri presenti normalmente nell'apparato digerente dell'insetto. La flora batterica degli insetti varia in funzione sia della specie che delle condizioni ambientali in cui quella particolare specie vive (Yamvrias *et al.*, 1970). I lavori riguardanti lo studio delle associazioni batteriche con coleotteri Scolitidi

risultano al momento estremamente scarse, ma, come riportato per altri insetti quale la *Bactrocera oleae* Gmelin (Diptera, Tephritidae) nel canale alimentare dell'insetto sono presenti batteri gram-negativi appartenenti sia alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* che al genere *Pseudomonas* (Yamvrias *et al.*, 1970).

Le scarse differenze tra le variazioni quantitative all'interno dei noccioli nelle varie tesi (Sano e Malato) o tra i vari noccioli ("a" e "c"), fanno ritenere che l'anisandro non rivesta un ruolo di particolare rilievo come vettore di batteri patogeni del nocciolo.

Analizzando dal punto di vista qualitativo le specie batteriche isolate complessivamente dall'anisandro, nel corso del triennio 2003-2005, si è rilevata una prevalenza di colonie ascrivibili a *Erwinia* spp. (60%) rispetto a *Pseudomonas* spp. (14%). Per quanto concerne i batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, l'analisi della sequenza del 16S rRNA ha evidenziato per la maggior parte degli isolati una identità di sequenza tra il 96 e il 98% con *Erwinia amylovora* e del 90% con *Pantoea cedenensis* (Proietti Zolla, 2005) e, per un solo isolato, il 98% di identità con *Brenneria quercina*. Quest'ultima sequenza è stata effettuata presso il laboratorio del Dott. Vanneste. Per quanto riguarda le specie appartenenti alla famiglia delle *Pseudomonadaceae* la maggior parte delle sequenze mostra un'identità di sequenza da 92 fino al 98% con ceppi di *Pseudomonas* spp. Sulla base dei risultati ottenuti con i primer specifici nessuna di esse però è risultata ascrivibile a *P. avellanae* (Proietti Zolla, 2005).

Si evince quindi che l'insetto è potenzialmente in grado di trasportare, in modo non specifico, gli agenti patogeni come documentato per altri insetti (Mitchell, 2004). Dalle analisi di identificazione comunque, i potenziali batteri patogeni sono risultati numericamente scarsi, quindi non in grado, probabilmente, di innescare la malattia. Sarà importante in futuro verificare in laboratorio la capacità dell'insetto a trasportare cellule batteriche patogene per il nocciolo in prove di inoculazione artificiale.

Sulla base dei risultati ottenuti si può ipotizzare inoltre che l'insetto trasporti batteri ascrivibili al genere *Erwinia* dal bosco all'ecosistema nocciolo apportando una spinta naturale su questi batteri che si sarebbero adattati ad attaccare una nuova specie quale il nocciolo.

Sia per le *Erwinia* spp. che per le *Pseudomonas* spp. in grado, dalla letteratura, di poter provocare sintomi di moria, c'è da notare la difficoltà di ottenere i sintomi per mezzo delle prove di patogenicità in serra, sia utilizzando isolati ottenuti dall'insetto, sia da piante con sintomi di moria isolati nei noccioli dei Monti Cimini (Vuono, 2005), che da ceppi noti depositati nelle collezioni (nazionali e internazionali). Tutto questo, alla luce dei risultati ottenuti da studi epidemiologici effettuati in relazione a fattori pedoclimatici (Fabi *et al.*, 2004), sembra far propendere per una malattia ad eziologia complessa. Nel caso specifico della moria del nocciolo sembra che tra i fattori predisponenti e scatenanti (Manion, 1991) un ruolo di primo piano spetti alle temperature, in particolare le minime invernali, alle gelate tardive e agli sbalzi termici diurni (Fabi *et al.*, 2004). Questa ipotesi è avvalorata anche dal fatto che la diffusione della malattia risulta maggiormente localizzata in aree ben definite (caldera del lago di Vico e nel comune di Capranica) mentre noccioli situati in comuni limitrofi, seppur con le stesse condizioni agronomiche, non mostrano un'incidenza elevata della malattia. Sarà quindi importante in futuro approfondire gli studi per verificare quali fattori assumono maggiore importanza nell'innescare stress nella pianta di nocciolo rendendola più suscettibile all'attacco di patogeni.

## II.5 BIBLIOGRAFIA

AliNiazee M. T. (1998) – Ecology and management of hazelnut pests. Annual Reviews of Entomology **43**, 395-419.

Aloj B., Bartoletti F., Caporossi U., D’Errico F.P., Di Dato F., Grande C., Olmi M., Paparatti B., Tombesi A., Varvaro L. (1987) – Una “moria” del nocciolo di natura ignota nel Viterbese. Informatore Agrario **26**, 55-57.

Aloj B., D’Errico F., Olmi M., Paparatti B., Ragozzino A., Tombesi A., Varvaro L. (1994) - “Moria del nocciolo” dei Colli Cimini: aspetti diagnostici e consigli di profilassi e terapia. Informatore Agrario **10**, 65-67.

Balachowsky A. (1949) - Faune de France n° 50: Coléoptères Scolytides. Libraire de la Faculté des Sciences. Lechevalier, Paris. 1-320.

Balestra G. M., Pucci C., Paparatti B., Bucini D., Vanneste J. L., Cornish D., Varvaro L. (2003) - Indagini sulla correlazione tra microflora batterica, l’insetto *Anisandrus dispar* F. e la Moria del nocciolo nella provincia di Viterbo. X Congresso Nazionale SIPaV, 1-3 Ottobre 2003, Sorrento (NA), pag. 90.

Balestra G.M., Vuono G., Gentili A., Fabi A., Varvaro L. (2004) - Importance of agronomical practices on dieback (moria) of Hazelnut (*Corylus avellana* L.) plants in central Italy. Atti del XI Congresso Nazionale SIPaV. Milano 29 settembre-2 ottobre.

Barras S.J., Perry T.J. (1975) - Interrelationships among microorganisms, bark or ambrosia beetles, and woody host tissue: an annotated bibliography, 1965-1974. USDA Forest Service General Technical Report SO, **10**, 1-34

Bergey D. H., Harrison F. C., Breed R. S., Hammer B. W., Huntoon F. M. (1923). Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, William and Wilkins.

Bianco M., Danise B. (2002). La difesa fitosanitaria del nocciolo. II° Convegno Nazionale sul Nocciolo, 5 Ottobre 2002, Giffoni Valle Piana (SA), 52-61.

Bignami C., De Salvador F.R., Strabbioli G. (1999) - Aspetti agronomici e prospettive di valorizzazione della corilicoltura italiana. *Rivista di Frutticoltura* **11**, 16-27.

Bignami C. (2002) – Attualità e problematiche della nocciolicoltura nel Lazio. II° Convegno Nazionale sul Nocciolo, 5 Ottobre 2002, Giffoni Valle Piana (SA), 122-132.

Bochner B. (1989) - “Breathprints” at the microbial level. *ASM News* **55**, 536-539.

Bucini D., Balestra G. M., Pucci C., Paparatti B., Speranza S., Proietti Zolla C., Varvaro L. (2004) - Bio-ethology of *Anisandrus dispar* F. and its Possible Involvement in Dieback (Moria) Diseases of Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Plants in Central Italy. VI<sup>th</sup> International Hazelnut Congress 14-18 Giugno, Tarragona (Spagna). *Acta Horticulture* **686**, 435-444.

Carbone A., Franco S., Pancino B., Senni S. (2004) - Dinamiche territoriali e profili produttivi dell'Agricoltura del Lazio. Quaderni di Informazione Socioeconomica **11**, Assessorato all'agricoltura. Regione Lazio Ed., Roma, pp.149

Cecchini M., Mordacchini Alfani M. L., Antonelli D. (2002). La gestione meccanizzata delle operazioni colturali: esperienze nella provincia di Viterbo. II° Convegno Nazionale sul Nocciolo, 5 Ottobre 2002, Giffoni Valle Piana (SA), 213-228.

Chararas C. (1962) - Scolytides des conifères, Editions P. Lechevalier-Paris.

Dickey R.S., Kelman A. (1988) – “Carotovora” or soft rot group. In Laboratory guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria. Schaad N.W. (ed) pp. 44-55. APS, St. Paul, MN.

Edwards P. R., Ewing W. H. (1972) - Identification of *Enterobacteriaceae*. 3<sup>rd</sup> Edn. Burgess Publishing Co. Minneapolis, USA.

Fabi A., Belli C., Vuono G., Balestra G. M., Varvaro L. (2004) – Innovative strategies in epidemiological studies of hazelnut dieback by using G.P.S./G.I.S. and A.Sp.I.S technology. VI<sup>th</sup> International Hazelnut Congress 14-18 Giugno, Tarragona (Spagna). Acta Horticulture **686**, 427-433.

Foy C.D., Chaney R.L., White M.C., (1978) - The physiology of metal toxicity in plants. Annual Review of Plant Physiology **29**, 511–566.

Gianlorenzo M. (2003) – L'agricoltura e l'agroalimentare nel Viterbese. Forum Provinciali sui sistemi agroalimentari del Lazio. Alimentiamo la qualità. Report, 3-4.

Granata G. (1985) – Le principali malattie del nocciolo in Italia. Informatore fitopatologico **4**, 19-22.

Hauben H., Moore R.B.E., Vauterin L., Steenackers M., Mergaert J., Verdonck L., Swings J. (1998) - Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. Systemic Appl. of Microbiology, **21**, 384-397.

<http://www.assofrutti.com/index.asp>

[http://www.faw.ch/shop/merkblaetter/m\\_009/009\\_f.htm](http://www.faw.ch/shop/merkblaetter/m_009/009_f.htm)

Janse J.D., Rossi P., Angelucci L., Scortichini M., Derks J.H.J., Akkermans A.D.L., De Vrijer R., Psallidas P.G. (1996) - Reclassification of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* as *Pseudomonas avellanae* (spec. Nov.), the bacterium causing canker of hazelnut (*Corylus avellana* L.) System. Appl. Microbiol. **19**, 589-595.

King E.O., Ward M.K., Raney D.E. (1954) - Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **44**, 301-307.

Klement Z. (1963) - Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic *pseudomonas*. *Nature*, **199**, 299-300.

Klement Z. (1982) - Hypersensitivity. In: *Phytopathogenic prokaryotes*. Mount M.S. and Lacy G.H. (eds). Vol. **2**, 149-177. Academic Press, New York, London.

Klement Z., Rudolph K., Sands D. C. (1990) – *Methods in phytobacteriology*. Akadémiai Kiadó. Bucarest.

Loreti S., Gallelli A. (2002) - Rapid and specific detection of virulent *Pseudomonas avellanae* strains by PCR amplification. *European journal of Plant Pathology* **108**, 237-244.

Malquori A. (1979) – *Prontuario di chimica agraria*, Edagricole, Bologna.

Manion P.D. (1991) – *Tree disease concepts*. Englewood Cliffs. Prentice Hall.

Meynell G.G., Meynell E. (1970) – *Theory and practice in experimental bacteriology*. 2<sup>nd</sup> ed., University Press, Cambridge, UK, pp.347.

Microlog<sup>TM</sup> System, Release 4.2 (2001) - User Guide. Biolog, Inc. Printed in the United States of America. Sez. 4, 3.

Mitchell P.L. (2004) – Heteroptera as Vectors of Plant Pathogens. *Neotropical Entomology* **33** (5), 519-545.



Moretti D. (1994) – Controllo integrato dei fitofagi infeudati all'agroecosistema corilicolo dei Monti Cimini e Sabatini: ricerche condotte nell'areale dei Monti Cimini e Sabatini nel triennio 1992-1994. Tesi di Laurea. Facoltà di Agraria, Università degli Studi della Toscana. Relatore Prof. B. Paparatti. pp. 134

Natali V., Paparatti B., Canganella F. (1994) - Microorganisms carried by *Xyleborus dispar* F. (Coleoptera, Scolitidae) females, collected on European Hazel trees in the area surrounding the Lake of Vico (Viterbo, Central Italy). Redia, **77**, 285-295.

Novák V., Hrozinka F., Stary B. (1976) - Atlas of insects Harmful to Forest Trees. Volume I. Elsevier scientific publishing company Amsterdam-Oxford-New York.

Noviello C. (1968) – Osservazioni sulle malattie parassitarie del nocciolo, con particolare riferimento alla Campania. Ann. Fac. Sc. Agr. Univ. Napoli – Portici, **3**, 3-31.

Norris D.M. (1975) - Chemical interdependence among *Xyleborus* spp. ambrosia beetle and symbiotic microbes. Materials und Organismen, **3**, 479-488.

Norris D.M. (1979) - The mutualistic fungi of Xyleborini beetles. In: L.R. Batra - Insect-fungus symbiosis: nutrition, mutualism and commensalism. Montclair: Allanheld, Osmun & Co. 53-63.

Omroa Bhagwandin H., Jr. (1994) - The shothole borer: an ambrosia beetle of concern for chestnut orcharding in the Pacific northwest. Proceedings of the International Chestnut Conference, Morgantown, West Virginia July 10-14, 205-209.

Paparatti B. (1990) – *Balaninus nucum* L. (Coleoptera: Curculionidae). Catture di adulti ed analisi dell'infestazione condotte nell'areale del lago di Vico (Viterbo) nel biennio 1989-90. Frustula entomologica, **13**, 93-112.

Piccirillo P. (2002) – Attualità e problematiche della coltura del nocciolo in Campania. II° Convegno Nazionale sul Nocciolo, 5 Ottobre 2002, Giffoni Valle Piana (SA), 113-120.

Pollini A. (1998) - Manuale di Entomologia applicata.. Ed. Agricole, Bologna, pp. 1462.

Proietti Zolla C. (2005) – Analisi genetica e molecolare dei batteri coinvolti nella moria del nocciolo. Tesi di Dottorato. Facoltà di Agraria, Università degli Studi della Tuscia. Relatore Prof. L. Varvaro.

Psallidas P.G. (1984) - The problem of bacterial canker of hazelnut in Greece caused by *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin **17**, 257-261.

Psallidas P.G. (1993) - *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* pathovar nov., the bacterium causing canker disease on *Corylus avellana*. Plant Pathology **42**, 358-363.

Psallidas P. G., Panagopoulos C. G. (1979) – A bacterial canker of *Corylus avellana* in Greece, Phytopathological Z., **94**, 103-111.

Ryu E. (1938) - On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. Japanese Journal of Society Veterinary Science, **17**, 31.

Schaad N.W. (1988) - Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2<sup>nd</sup> edn. American Phytopathological Society Press. St Paul, MN.

Scortichini M. (1998) - Response of *Corylus avellanae* L. germplasm to artificial inoculation with *Pseudomonas avellanae* (Psallidas) Janse *et al.* Agricoltura Mediterranea **128**, 153-156.

Scortichini M. (1998) – *Pseudomonas avellanae* su nocciolo nei colli Cimini. L'informatore Agrario, **44**, 71-75.

Scortichini M., Rossi M.P., Lazzari M., Valentini B., Testa F., Micheli R. (1994) - Moria del nocciolo nel viterbese: indagine sulla presenza di *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae*. *Informatore Fitopatologico*, **1**, 58-60.

Scortichini M. e Lazzari M. (1996) - Systemic migration of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* in twigs and young trees of hazelnut and symptom development, *Journal of Phytopathology* **144**, 215-219.

Servadei A., Zangheri S., Masutti L. (1972) – Entomologia generale ed applicata. Ed. Cedam, Padova, pp.715.

Solinas M. (1966) – L'*Anisandrus* (*Xyleborus*) *dispar* L. (Coleoptera, *Scolytidae*) sul pesco nel piacentino. *Entomologica. Annuali di Entomologia Generale e Applicata* pubblicati dall'Istituto di Entomologia Agraria dell' Università di Bari. Vol. **II**, 121-132.

Sulkin E. S., Willet J. C. (1940) – A triple Sugar-Ferrous Sulphate Medium for use identification of enteric organism. *J. Lab. Clin. Med.* **25**, 649.

Süss L. (1997) – Problematiche della difesa dai parassiti animali delle colture minori in Italia. *Informatore Fitopatologico*, **2**, 37-42.

Thornley M.J. (1960) - The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *Journal of Applied Bacteriology* **1**, 37-52.

Tombesi A. (1985) – Il nocciolo. Reda, Roma.

Tombesi A. (1991) – Nocciolo. *Frutticoltura speciale*. Reda, Roma. Pp. 614-631.

Varvaro L. (1987) – Le batteriosi del nocciolo. Atti convegno su “ Le problematiche del nocciolo”, 65-73.

Varvaro L., Costa A., Balestra G.M., (1990) - A new bacterial disease of *Corylus avellana*. Pp. 469-471. 8<sup>th</sup> Int. Congress Mediterranean Phytopathology Union. Agadir, Marocco, 28 Oct.-3 Nov.

Varvaro L. (1992) - A dieback of hazelnut (*Corylus avellana* L.) in the north of Latium: etiology and control. III International Congress on Hazelnut, Alba (CN) 14-18 september.

Varvaro L. (1993) - Le fitopatie del nocciolo nell'alto Lazio: un triennio di osservazioni e strategie di lotta. Informatore fitopatologico **2**, 54-58.

Varvaro L. (1994) – A dieback of hazelnut (*Corylus avellana* L.) in the north of Latium: etiology and control. Acta Horticulturae **351**, 559-565.

Varvaro L., Surico G. (1978) – Comportamento di diverse cultivars di olivo (*Olea europaea* L.) alla inoculazione artificiale con *Pseudomonas savastanoi* (E.F. Smith) Stevens. Phytopathologia mediterranea, **17**, 174-177.

Varvaro L., Costa A., Balestra G. M. (1990) - A new bacterial disease of *Corylus avellana*. In: Actes (ed.). Proceedings 8th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Agadir (Morocco) 28<sup>th</sup> Oct.-3<sup>rd</sup> Nov., 469-471.

Vidaver A. e Buckner S., (1977) - Typing of fluorescent phytopathogenetic pseudomonads by bacteriocin production. Canadian journal of Microbiology, **24**, 14-18.

Viggiani G. (1984) – Avversità, malattie e fitofagi del nocciolo. Regione Campania. Serie Manuali **7**, pp. 152.

Viggiani G., Ragozzino A., Grande C. (1979) - La difesa fitosanitaria del nocciolo. Regione Lazio. Assessorato Agricoltura e Foreste, pp. 47.

Vuono G. (2005) – Aspetti biologici, patogenetici e biochimici di specie batteriche coinvolte nella moria del nocciolo. Tesi di Dottorato. Facoltà di Agraria, Università degli Studi della Tuscia. Relatore Prof. L. Varvaro.

Vuono G., Balestra G.M., Varvaro L. (2002) - The control of a dieback of hazelnut using different copper compounds. *Journal of Plant Pathology* **83** (3), 199.

Vuono G., Balestra G.M., Varvaro L. (2003) - Evaluation of different copper compounds to control the bacterial dieback of hazelnut. *Proc. of 8<sup>th</sup> International Congress of plant pathology*, 2-7 feb. Christchurch, New Zealand Vol II, 66.

Yamvrias C., Panagopoulos C.G., Psallidas P.G. (1970) – Preliminary study of the internal bacterial flora of the olive fruit fly (*Dacus oleae* Gmelin). *Annls. Inst. Phytopath.*, Benaki, N.S. **9**, 127-134.