

# **FACOLTÁ DI AGRARIA**

Dipartimento di Scienze Agrarie (DipSA)

## **DOTTORATO DI RICERCA IN ECOLOGIA MICROBICA E PATOLOGIA VEGETALE**

**Ciclo XXV°**

**SCIENZE AGRARIE E VETERINARIE**

**Settore/i scientifico-disciplinare/i di afferenza:**

**AGR/12 PATOLOGIA VEGETALE**

# **NUOVE BIOTECNOLOGIE PER LA PRODUZIONE DI PIANTE MICORRIZATE CON TARTUFO**

**Tutore:**

Prof. Alessandra Zambonelli

**Coordinatore:**

Prof. Paolo Bertolini

**Relatori:**

Dott. Mirco Iotti

Dott.ssa Piattoni Federica

**Tesi di dottorato di:**

**Siham BOUTAHIR**

Aprile 2013  
Bologna - Italia



*Questa tesi é dedicata a un pezzo del mio cuore che non c'è più e da sempre ha voluto vedermi un giorno dottoranda. Questo giorno é arrivato e spero con tutto il mio cuore che lei da lassù possa guardarmi ed essere fiera di me.*

*Alla mia preziosa e amata Sorella, Fatima.*

*Grazie per aver creduto nelle mie scelte*

*Sei e sarai sempre nel mio cuore.*



## RINGRAZIAMENTI

Il presente lavoro è il risultato di un impegno durato tre anni. Durante questo periodo ho avuto la fortuna di lavorare con persone che mi hanno trasmesso uno straordinario patrimonio di valori e conoscenze. A tutti loro vanno i miei ringraziamenti.

Ringrazio la Prof.ssa Alessandra Zambonelli, mia Tutrice del Dottorato di Ricerca, che ha investito la sua conoscenza ed il suo tempo in interessanti confronti e determinanti contributi sull'intero lavoro svolto, consigliandomi e guidandomi costantemente. Ringrazio la Prof.ssa Zambonelli soprattutto per avermi trasmesso la metodologia di lavoro, la rapidità e la capacità di affrontare problematiche diverse. Desidero ringraziare Dott. Mirco Iotti e la Dott.ssa Federica Piattoni per la costante disponibilità e appoggio che mi hanno fornito durante tutto il corso del Dottorato, i loro preziosi insegnamenti e consigli. Il loro aiuto è stato fondamentale nello svolgimento di questa ricerca.

Vorrei anche ringraziare la Dott.ssa Antonella Amicucci e la dottoranda Valentina Sparvoli per la collaborazione e l'aiuto nelle analisi.

La mia esperienza all'estero presso l'INRA di Nancy in Francia (Unità Interazioni Alberi-Microrganismi, IAM) è stata breve ma intensa e per questo posso solo ringraziare il Dott. Claude Murat e la Dott.ssa Annegret Kohler per i consigli preziosi, per il tempo e per l'interesse che mi hanno dedicato.

Infine, l'ultimo ringraziamento va alle persone che mi sono state vicine e hanno creduto in me per tutto questo tempo e che hanno fatto in modo che questa "avventura" assumesse il giusto significato e la giusta luce nella nostra vita insieme.

Un ringraziamento speciale a mia madre Mahjouba per essere stata al mio fianco sempre e che, quando mi guarda negli occhi, non vede che la sua bambina. A mio padre Mohammed, ai miei due fratelli Khalid e Rachid, ed alla mia seconda sorella Monique per avermi saputo comunicare la loro vicinanza emotiva ed il loro incrollabile sostegno morale, senza i quali non avrei mai intrapreso questa strada e raggiunto questo traguardo.

Un ringraziamento particolare va ad Andrea, mio marito, per essermi stato sempre vicino e per avermi dato la sua profonda fiducia e la partecipazione costante ad ogni mia difficoltà, come solo lui sa fare, e per avermi incoraggiata in quei momenti in cui non si è certi di potercela fare. Condensare in qualche riga tutto quello che ho ricevuto da voi in questi anni non è umanamente possibile e sarebbe riduttivo ed ingiusto, perciò mi limiterò a dire che avete continuato a crederci anche quando non ci credevo più nemmeno io e di questo non vi sarò mai abbastanza grata.

*A tutti voi va il mio **GRAZIE MILLE DI CUORE.***



# Sommario

<b>1. INTRODUZIONE</b>	13
<b>1.1. Generalità sui funghi</b>	13
<b>1.2. Importanza ecologica dei funghi negli ecosistemi forestali</b>	15
<b>1.3. Interazione pianta- microrganismi</b>	15
1.3.1. La simbiosi micorrizica	16
1.3.2. L'importanza della simbiosi micorrizica per la pianta	19
1.3.2.1. Nutrizione minerale	20
1.3.2.2. Tolleranza ai metalli pesanti nel suolo	21
1.3.2.3. Protezione dagli stress salini	22
1.3.2.4. Protezione dagli stress idrici	22
1.3.2.5. Protezione dalla malattie	23
<b>1.4. Generalità su tartufo</b>	24
<b>1.4.1. Il ciclo biologico</b>	26
<b>1.4.2. Tassonomia</b>	27
1.4.3. L'ecologia dei tartufi	30
1.4.4. Caratteristiche ecologiche delle principali specie di tartufi	32
1.4.5. Il tartufo e i batteri del suolo	33
<b>1.5. La coltivazione del tartufo</b>	33
1.5.1. La micorrizzazione con tartufo e controllo delle piante tartufigene	35
1.5.2. Metodi di micorrizzazione	35
<b>1.6. Metodi molecolari e l'identificazione dei funghi del genere <i>Tuber</i></b>	37
<b>1.7. <i>Tuber magnatum</i> Pico</b>	38
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b>	42

## Capitolo 3

<b>3. Isolamento e caratterizzazione morfologica di ceppi di <i>Tuber magnatum</i></b>	
<b>3.1. Introduzione</b>	45
<b>3.2. Materiali e metodi</b>	46
3.2.1. Isolamento dei miceli	46
3.2.2. Caratterizzazione morfologica dei ceppi isolati	47
3.2.3. Identificazione molecolare	48

<b>3.3. Risultati e discussione</b>	48
<b>3.4. Conclusioni</b>	51

## **Capitolo 4**

<b>4. Miglioramento dello sviluppo del micelio di <i>T. magnatum</i></b>	
<b>4.1. Introduzione</b>	54
<b>4.2. Materiali e metodi</b>	55
4.2.1. Ceppi fungini	55
4.2.2. Condizioni di coltura	55
<b>4.3. Risultati e discussione</b>	56
<b>4.4. Conclusioni</b>	57

## **Capitolo 5**

<b>5. Effetto degli estratti radicali e miceliari sullo sviluppo di miceli di <i>Tuber</i></b>	
<b>5.1. Introduzione</b>	59
<b>5.2. Materiali e metodi</b>	60
5.2.1. Ceppi fungini e materiale vegetale	60
5.2.2. Preparazione dell'estratto radicale di nocciolo	61
5.2.3. Preparazione dell'estratto miceliare di specie <i>Tuber</i>	61
5.2.4. Prove di crescita del micelio di <i>T. borchii</i> in substrato arricchito dell'estratto radicale di nocciolo	62
5.2.5. Analisi morfologica dei miceli di <i>T. borchii</i> cresciuti con l'estratto radicale di nocciolo	62
5.2.6. Analisi degli estratti radicali di nocciolo e raccolta delle frazioni mediante HPLC-DAD	63
5.2.7. Prova di crescita di <i>T. borchii</i> con le frazioni dell'estratto radicale raccolte mediante HPLC	64
5.2.8. Analisi morfologiche dei miceli di <i>T. borchii</i> con le frazioni dell'estratto radicale raccolte mediante HPLC	65
5.2.9. Elaborazione statistica dei risultati dell'analisi morfologica	65
5.2.10. Analisi molecolari dei miceli di <i>T. borchii</i> trattati con gli estratti radicali di nocciolo e con le singole frazioni dell'estratto	65
5.2.10.1. Prelievo dei miceli ed estrazione dell'RNA totale	65

5.2.10.2. Sintesi del cDNA	66
5.2.10.3. Real time PCR	66
<b>5.3. Risultati e Discussione</b>	67
5.3.1. Analisi morfologiche dei miceli di <i>T. magnatum</i> incubati nell'estratto miceliare di specie <i>Tuber</i>	67
5.3.2. Analisi morfologiche dei miceli di <i>T. borchii</i> trattati con gli estratti radicali di nocciolo	68
5.3.3. Analisi morfologiche dei miceli di <i>T. borchii</i> trattati con le frazioni dell'estratto radicale raccolte mediante HPLC	70
5.3.4. Analisi molecolari dei miceli di <i>T. borchii</i> trattati con gli estratti radicali di nocciolo e con le singole frazioni dell'estratto	73
<b>5.4. Conclusioni</b>	76

## Capitolo 6

<b>6. Produzione di piantine micorizzate con <i>T. magnatum</i> ed altre specie di tartufo e studio della dinamica della colonizzazione radicale</b>	
<b>6.1. Introduzione</b>	78
<b>6.2. Materiali e metodi</b>	79
6.2.1. Ceppi fungini e specie arboree	79
6.2.2. Preparazione degli inoculi sporali e miceliari, allevamento e controllo delle piante micorizzate	80
6.2.3. Identificazione molecolare e descrizione delle micorrize	82
6.2.4. Verifica e quantificazione del micelio di <i>T. magnatum</i>	83
6.2.4.1. Prelievo dei campioni di suolo	83
6.2.4.2. Real time PCR	84
6.2.4.3. PCR qualitative sulle radici delle piante madri	85
<b>6.3. Risultati e discussione</b>	85
6.3.1. Colonizzazione radicale con <i>T. magnatum</i> , <i>T. borchii</i> e <i>T. oligospermum</i>	85
6.3.2. Caratterizzazione morfologica delle micorrize delle tre specie studiate	89
6.3.3. Verifica e quantificazione del micelio di <i>T. magnatum</i>	93
<b>6.4. Conclusioni</b>	94

## Capitolo 7

<b>7. Messa a punto di protocolli di conservazione per il mantenimento delle colture di <i>Tuber</i> spp., per la crezione di una banca di germoplasma per tartufi</b>	
<b>7.1. Introduzione</b>	97
<b>7.2. Materiali e metodi</b>	101
7.2.1. Ceppi fungini utilizzati	101
7.2.2. Ultracongelamento a – 80 °C	102
7.2.3. Crioconservazione in azoto liquido (-196°C)	102
7.2.3.1. Fase di congelamento del micelio	103
7.2.3.2. Fase di scongelamento del micelio	103
7.2.4. Prove di verifica dell'infettività del micelio	104
<b>7.3. Risultati e discussione</b>	104
7.3.1. Ultracongelamento a -80°C	104
7.3.2. Crioconservazione in azoto liquido	105
<b>7.4. Conclusioni</b>	109
<b>Conclusioni generali</b>	111
<b>Bibliografia</b>	115

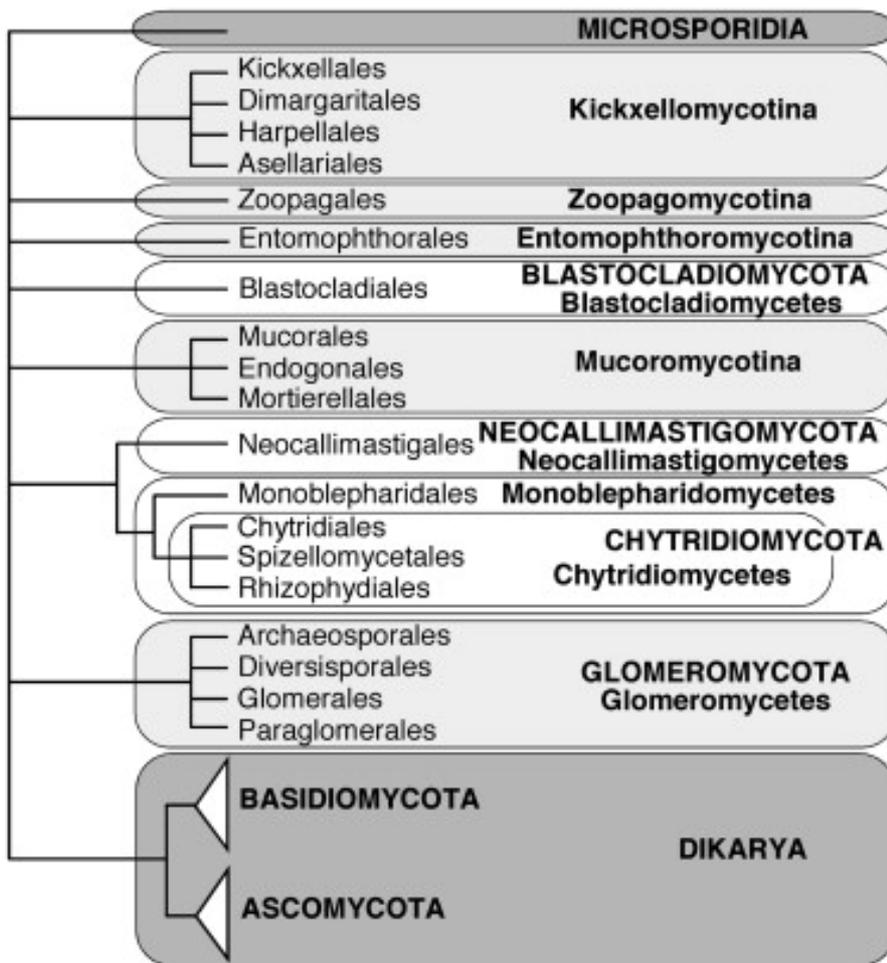


# 1. Introduzione

## 1.1. Generalità sui funghi

Il mondo dei funghi sia macroscopici che microscopici è un mondo vasto, in gran parte sconosciuto, fondamentale per l'economia umana, e per l'equilibro degli ecosistemi. I funghi sono organismi eucariotici appartenenti al regno *Fungi*. Sono privi di clorofilla e pertanto sono eterotrofi, ossia usano la materia organica già sintetizzata da altri organismi comportandosi da saprotrofi, parassiti o simbiotici mutualistici di piante, come nelle micorrize o nelle associazioni licheniche. I funghi nutrono per assorbimento e hanno la parete cellulare costituita da chitina, il loro tallo è costituito da cellule allungate filamentose (le ife) (che nel loro insieme costituiscono il micelio) e sono capaci di riprodursi sessualmente e/o agamicamente (Alexopoulos *et al.* 1996). I funghi più semplici sono organismi unicellulari come lieviti, ma la maggior parte sono in forma miceliale e pluricellulari (Redecker, 2002). La forma miceliale permette al fungo di avere una crescita radiale e colonizzare rapidamente e uniformemente un ambiente. La forma miceliale fornisce quindi una superficie massima di contatto e permette l'esplorazione e la ricerca delle sostanze nutritive in tre dimensioni (Jennings e Lysek, 1996). Essi si nutrono secernendo enzimi nel terreno che digeriscono i composti organici riducendoli a piccole molecole solubili (digestione extracellulare), queste molecole si diffondono poi all'interno delle loro ife attraverso la parete (Alexopoulos *et al.*, 1996). Generalmente la stima accreditata del numero di specie di funghi sulla terra è 1,5 milioni (Hawksworth, 1991; Hawksworth, 1993; Heywood, 1995), di cui si ritiene che sia stato scoperto solo il 5% delle specie esistenti (70,000) (Hawksworth e Rossman, 1997); ciò significa che rimangono 1,43 milioni di specie ancora sconosciute alla scienza.

Riportiamo in questo schema la recente classificazione dei funghi di Hibett *et al.* (2007).



**Fig. 1-** Classificazione del regno dei Funghi (da Hibett *et al.*, 2007)

I funghi superiori sono compresi fra i Dikarya e sono divisi in due divisioni: Ascomiceti, Basidiomiceti.

In questa tesi sono stati studiati esclusivamente gli ascomiceti ed in particolare il genere *Tuber*. La divisione *Ascomycota* costituisce il più grande gruppo di funghi finora conosciuti, questa divisione comprende oltre 32.000 specie, corrispondenti a circa il 40% di quelle fino ad ora descritte (Hawksworth, 1991). Essi vivono in differenti habitat, infatti si possono trovare sia in ambiente acquatico che terrestre, inoltre riescono a sopravvivere in condizioni di moderato stress (Ahmed e Abdel Azeem, 2010), Molte specie di ascomiceti sono economicamente importanti (Damm *et al.*, 2009), mentre poche di queste specie devono la loro importanza al fatto che sono commestibili come spugnone e i tartufi (Ahmed e Abdel

Azeem, 2010), molte altre sono utilizzate a scopi biotecnologici come la produzione di alimenti, bevande, acidi organici, biofungicidi, biofertilizzanti fungini, cosmetici e ormoni (Hyde *e al.* 2010). Gli ascomiceti sono in grado di comportarsi da saprotrofi, da parassiti o simbionti mutualistici.

## **1.2. Importanza ecologica dei funghi negli ecosistemi forestali**

I funghi sono organismi chiave nel funzionamento degli ecosistemi e mentre noi possiamo ammirare il loro gran numero, la conoscenza della loro "diversità funzionale" è fondamentale per comprendere la loro importanza nella salute dell'ecosistema. Nell'ambito dei bioriduttori o decompositori si ritrovano una miriade di organismi viventi che hanno il compito di degradare la materia organica proveniente dai livelli trofici precedenti. Tutti questi organismi non devono essere considerati come singoli elementi scollegati, ma come componenti di un sistema vitale complesso, dove gli organismi presenti intrecciano rapporti e relazioni sociali di vario genere ed interagiscono tra loro e con l'ambiente che li circonda, determinandone caratteristiche ed equilibri che contribuiscono a mantenerne la loro biodiversità. In questo contesto i funghi rivestono un ruolo fondamentale nei cicli naturali per le loro peculiari modalità di nutrimento. In particolare sono fondamentali per la degradazione e la mobilitazione dei recalcitranti composti organici del legno morto. I funghi non solo contribuiscono al riciclo dei nutrienti attraverso la loro decomposizione, ma anche riescono a trattenere i nutrienti all'interno della loro biomassa vivente nel suolo, riducendo così la perdita di nutrienti attraverso la lisciviazione. Il micelio nel suolo è una presenza molto importante, la biomassa fungina è infatti una fonte primaria di cibo per molti altri organismi (Molina, 1994).

## **1.3. Interazione pianta- microrganismi**

Nelle ultimi anni la ricerca ha dimostrato con sempre maggiore evidenza che la conoscenza delle relazioni microorganismi - pianta è essenziale per un corretto funzionamento di tutti gli

ecosistemi terrestri al fine di ottimizzare le rese e nello stesso tempo salvaguardare l'ambiente. I rapporti reciproci tra piante e microrganismi possono essere simbiotici mutualistici o antagonistici; la maggior parte degli studi ha mostrato che molti microrganismi hanno un effetto benefico per la pianta: essi promuovono la decomposizione e la mineralizzazione dei residui organici e facilitano così l'assorbimento dei nutrienti, promuovono la crescita, fissano l'azoto, e possono proteggere le piante dall'attacco dei patogeni.

### **1.3.1. La simbiosi micorrizica**

A livello della rizosfera possono instaurarsi molteplici tipi di interazioni (Fig.2) tra cui quelle simbiotiche. Si definisce associazione micorrizica un'interazione simbiotica mutualistica tra funghi micorrizici e piante superiori e costituisce la forma di simbiosi più diffusa su scala globale (Jennings e Lysek, 1996). La simbiosi micorrizica, venne osservata per la prima volta dall'italiano Gibelli (1879, 1883), ma la considerò come uno stato patologico, successivamente solo il tedesco Frank (1885) ha dimostrato la natura simbiotica di queste strutture, a cui ha dato il nome di micorrize.

Il termine micorriza deriva dal greco *mykes* = fungo e *rhiza* = radice e descrive un'associazione intima strutturale e funzionale tra gli apici delle radici di una pianta e le ife fungine. Come già detto la micorriza è una forma di simbiosi principalmente mutualistica, per cui i due organismi portano avanti il loro ciclo vitale vivendo a stretto contatto e traendo benefici reciproci. Si stima che circa il 90% delle piante effettuano spontaneamente questa associazione (Smith e Read, 1997), in generale, sono presenti nell'83% delle dicotiledoni, nel 79% delle monocotiledoni ed in tutte le gimnosperme (Wilcox, 1991). Hanno un ruolo cruciale nello sviluppo e nel mantenimento di comunità di piante e perciò sono considerate come "ecologicamente obbligate" e influenzano fortemente la diversità e la produttività delle foreste e possono anche esercitare una pressione selettiva sui microrganismi del suolo, sia sulla loro diversità genetica che sulla loro diversità funzionale (Klett *et al.*, 2005). Una

pianta può essere micorrizzata con diversi funghi ed un singolo fungo può infettare diverse piante. Quindi, la complessità delle possibili combinazioni dalla simbiosi micorrizica è enorme. Le micorrize vengono tradizionalmente classificate in base alle modalità di colonizzazione (Fig.2), in:

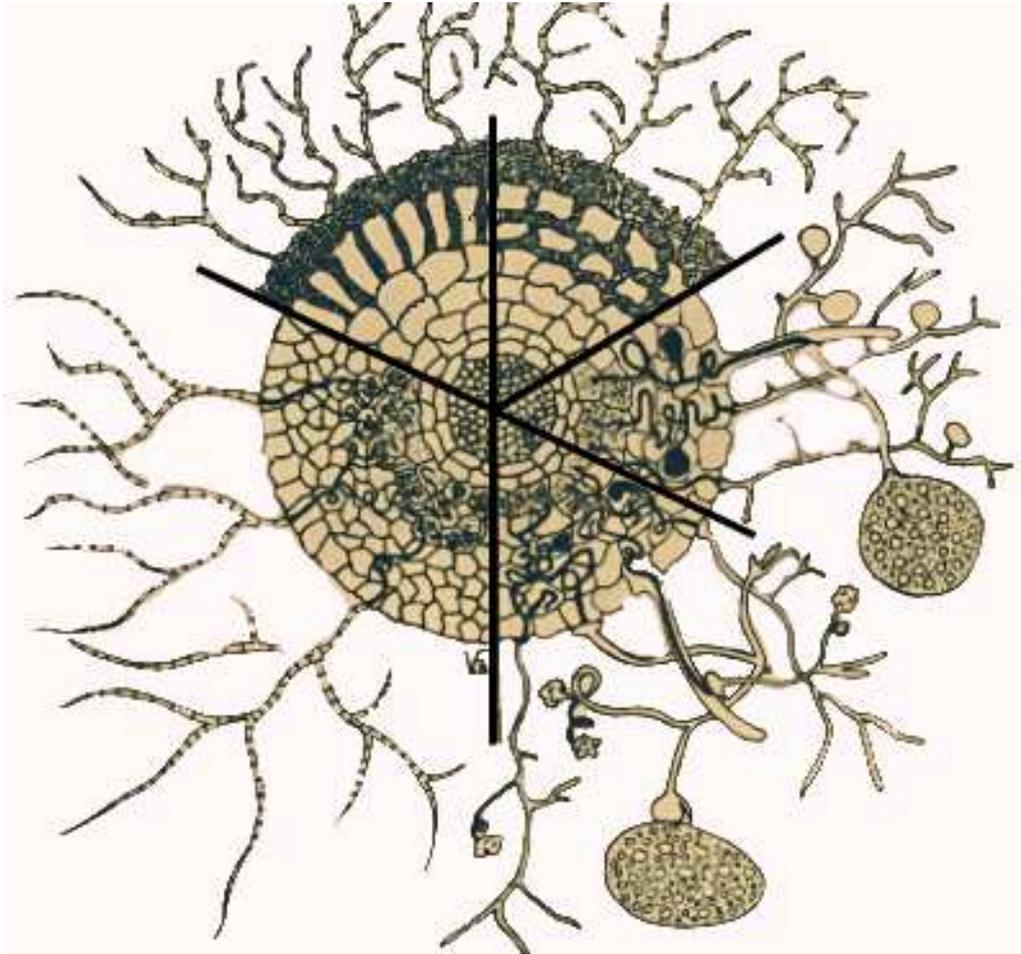
**endomicorrize** [micorrize (VAM) arbuscolo – vescicolari o (AM) arbuscolari] quando il fungo penetra all'interno dei tessuti e delle cellule corticali dell'ospite ma non forma un mantello fungino esterno, le ife fungine s'insediano sulla parte corticale della radice penetrandone le cellule e riempiendone gli spazi intercellulari senza però invadere mai il cilindro centrale. All'interno delle cellule possono formare delle strutture ovoidali dette vescicole e delle strutture ramificate dette arbuscoli. Gli arbuscoli penetrando nelle cellule dell'ospite superano la parte cellulare ma non la membrana citoplasmatica che si invagina seguendone lo sviluppo. Le micorrize VA sono le più diffuse nel mondo vegetale mentre i funghi che formano micorrize VA sono esclusivamente Glomeromycota.

**Le ectomicorrize** (ECM) costituiscono l'altro principale tipo di associazione micorrizica. Esse sono caratteristiche delle piante forestali e di funghi come i Basidiomiceti e gli Ascomiceti (Buscot *et al.*, 2000). Nelle ectomicorrize il fungo si sviluppa internamente alle radici solo nell'apoplasto originando il cosiddetto reticolo di Hartig e forma un mantello fungino ricoprente l'apice radicale detto micoclona. Esse inoltre sviluppano una rete miceliare che si diparte dal mantello e esplora il terreno circostante da cui si sviluppa il corpo fruttifero che può essere epigeo o ipogeo (nei cosiddetti tartufi). I funghi ECM hanno un ruolo importante per piante ospiti sia negli ecosistemi naturali sia in quelli forestali (Grove e Le Tacon, 1993). Le ectomicorrize interessano il 3% delle fanerogame (Meyer, 1973). Molina *et al.* (1992) hanno stimato che circa 5.500 specie vegetali e circa 20,000-25,000 specie fungine sono in grado di formare la simbiosi ectomicorrizica (Rinaldi *et al.* 2008). Attualmente non è stato ancora chiarito con certezza quando le ectomicorrize siano comparse sulla terra; basandosi su dati molecolari, Berbee e Taylor (1993) hanno suggerito che i

funghi ectomicorrizici siano comparsi per la prima volta durante il cretaceo inferiore (130 milioni di anni fa), questa ipotesi è stata confermata dalle prime esame delle testimonianze fossili di ectomicorrize in radici di *Pinus* (Alvin, 1960).

Nelle ectomicorrize il mantello fungino di spessore variabile (20-60  $\mu\text{m}$ ) costituisce dal 20 al 40% della massa totale di un'ectomicorriza (Vogt *et al.*, 1991). Esso è considerato come un sito di immagazzinamento per i nutrienti del fungo acquisiti dal suolo (Smith e Read, 1997) e come una protezione della radice. Nei tessuti fungini infatti le concentrazioni di N e P sono più alte da 4 a 5 volte rispetto a costituite presenti nelle piante (Vogt *et al.*, 1981). Il reticolo di Hartig è costituisce da un interfaccia tra i due simbionti quindi ha un ruolo chiave nella micorriza funzionalmente attiva (Bonfante, 2001); esso é formato da ife che dal mantello si estendono verso l'interno della radice, tra l'epidermide e le cellule corticali e che si organizzano a formare un tessuto pseudoparenchimatoso che avvolge completamente le cellule radicali. Questa struttura é molto importante poiché permette al fungo di mantenere la continuità dello scambio di fotoassimilati, nutrienti e acqua tra la pianta ospite ed il suo partner fungino. Le ife extraradicali formano un ponte di connessione fondamentale della micorriza col suolo, da cui traggono i nutrienti. (Martin e Tagu, 1999) (Fig.2).

## Ectomicorrize



## Endomicorrize

**Fig. 2** - I principali tipi di associazione micorrizica (da Selosse e Le Tacon, 1998).

### 1.3.2. L'importanza della simbiosi micorrizice per la pianta

Il termine rizosfera è stato introdotto nel 1904 da Lorenz Hiltner (Linser *et al.*, 2006) e definito come una regione di terreno direttamente influenzata dalle radici e dai microrganismi associati; questa piccola porzione è considerata come una zona ecologica ricca di elementi nutritivi, microflora, microfauna. Fra i microrganismi della rizosfera i funghi micorrizici hanno un ruolo fondamentale per lo sviluppo della pianta. Nella micorrizosfera le micorrize incrementano notevolmente le capacità di esplorazione del suolo

dell'apparato radicale delle piante ospiti e creano condizioni particolarmente favorevoli per le piante. A livello di ecosistema, l'effetto delle micorrize si traduce in un'importante influenza, sui cicli dei nutrienti, sulle popolazioni microbiche, su un miglioramento della struttura del suolo. L'uso di funghi micorrizici può ridurre l'uso di agrofarmaci, perché la loro presenza protegge le radici contro agenti patogeni. A lungo termine, il loro uso riduce i costi associati alla coltivazione, essendo un'ottima alternativa ai prodotti chimici, sia nei paesi in via di sviluppo sia nei paesi industrializzati (Dechamplain e Gosselin, 2002).

Inoltre le piante micorrizzate si presentano spesso più competitive e più tolleranti nei confronti degli stress ambientali rispetto alle piante non micorrizzate.

#### **1.3.2.1. Nutrizione minerale**

Dal punto di vista nutritivo il partner fungino svolge un ruolo fondamentale, perché le ife si espandono nel terreno circostante per diversi metri, questa ricerca porta ad un aumento della superficie del sistema radicale della pianta (1000 metri di micelio per ogni metro di radice) (Plassard *et al.* 2000) e consente di esplorare volumi maggiori di terreno con minore dispendio energetico e quindi con una maggiore efficienza. Perciò possono estrarre dal suolo una maggiore quantità di nutrienti minerali. In particolare i funghi micorrizici sono in grado di assorbire i composti azotati e fosforici trasformarli in molecole facilmente utilizzabili dalla radice della pianta ospite; questo si traduce in una maggiore crescita della pianta. L'“effetto crescita” è evidente soprattutto nei terreni poveri di elementi minerali. Il fungo inoltre può solubilizzare composti insolubili presenti nel terreno, aumentando la disponibilità di elementi nutritivi. Dal punto di vista selettivo, perciò le piante micorriziche hanno un vantaggio nei confronti delle piante non micorriziche essendo in grado di adattarsi anche in terreni particolarmente poveri di elementi nutritivi.

L'instaurarsi delle simbiosi micorriziche tra fungo e pianta è favorita dalle scarsità di azoto nel suolo. Infatti se l'azoto è in eccesso, la pianta è in grado di assorbirne da sola una sufficiente quantità senza l'aiuto del fungo e pertanto non mette a disposizione

del fungo (Buscot *et al.*, 2000).

Da molto tempo é stato dimostrato che tra i simbionti micorrizici si verifica una traslocazione bidirezionale di sostanze diverse. Già nei primi studi sulle micorrize alcuni autori, che avevano somministrato alle ife fungine sostanze nutritive marcate isotopicamente (ioni fosfato, ammonio, nitrato, sodio, calcio etc.) e le hanno ritrovate nelle foglie dei loro ospiti (Melin e Nilsson, 1958; Melin e Nilsson, 1952; Melin e Nilsson, 1953). Oltre al miglioramento della nutrizione minerale, le micorrize offrono altri benefici come la tolleranza allo stress idrico (Lamhamedi *et al.*, 1992), la tolleranza ai metalli pesanti (Read, 1999) e la protezione contro gli agenti patogeni (Aguilar-Azcon e Barea, 1996).

### **1.3.2.2. Tolleranza ai metalli pesanti nel suolo**

All'interno del biota del suolo, i funghi micorrizici hanno evidenziato caratteristiche uniche di assorbimento e tolleranza ai metalli pesanti e sono in grado di colonizzare aree che presentano altissime concentrazioni di ioni metallici quali  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ . Questo meccanismo non è facile da spiegare e presenta una notevole specificità a seconda del metallo e della specie di fungo coinvolta (Hall, 2002). La resistenza ai metalli pesanti può essere acquisita attraverso l'assorbimento dell'inquinante da parte delle ife e la chelazione da parte di sostanze secrete dai funghi come la glomalina (Hall, 2002), o attraverso meccanismi che permettono al fungo di tollerare e sopravvivere in presenza di concentrazioni elevate dell'elemento tossico (Turnau *et al.*, 1996). Essi non possono essere chimicamente degradati e si accumulano nella biosfera, questi metalli possono essere sequestrati dal mantello fungino, possono altresì accumularsi nei corpi fruttiferi dei funghi, rendendoli inadatti al consumo. L'unica soluzione per un completo biorisanamento è utilizzare tecniche di immobilizzazione e di estrazione del metallo dal suolo (Leyval *et al.*, 1997). Nei suoli inquinati è stato mostrato che i funghi AM, influenzano in più modi l'assorbimento e alleviano gli effetti della tossicità del metallo tossico (Leyval *et al.*, 1997). Dixon e Buschema, (1988) hanno dimostrato che piante di *Pinus banksiana* e di *Picea glauca*

inoculate con il fungo ectomicorrizico *Suillus luteus*, erano protette dalla tossicità dei metalli pesanti e la loro crescita era favorita. Le micorrizze sono stati proposte come anche bioindicatori della presenza di inquinanti nel suolo, infatti alcune specie o ceppi fungini ectomicorrizici sono più sensibili di altre possono essere utilizzate come uno strumento integrativo alle procedure chimiche di estrazione dei metalli dal suolo per verificarne la presenza a livelli tossici..

### **1.3.2.3. Protezione dagli stress salini**

Il beneficio delle micorrizze verso le piante non si concretizza solamente nei confronti dell'assorbimento di nutrienti e tolleranza ai metalli pesanti. Infatti le piante micorrizzate mostrano spesso una maggiore resistenza/tolleranza agli stress biotici (attacchi di funghi patogeni e nematodi) e abiotici (stress idrico e salino). L'eccessiva salinità rappresenta spesso una delle principali cause di stress limitanti la crescita e la produttività delle piante coltivate. I funghi micorrizici hanno un ruolo positivo nella tolleranza della pianta alla salinità. Questa resistenza viene indotta tramite una limitazione nell'assorbimento degli ioni Na e Cl presenti nel terreno circostante, tramite il miglioramento delle condizioni osmotiche della pianta (Azcon *et al.*, 1996) e tramite un bilanciamento tra gli ioni meno facilmente disponibili, quali il fosfato (Graham, 1986). Bedini *et al.* (2004) hanno scoperto una recente glicoproteina denominata, glomalina prodotta di due specie specie di funghi micorrizici arbuscolari (AM), *Glomus mosseae* e *Glomus intraradices* che è in grado di chelare fortemente non solo il ferro, ma anche metalli pesanti potenzialmente tossici, incluso il sodio.

### **1.3.2.4. Protezione dagli stress idrico**

Le micorrizze possono essere considerate un prolungamento dell' apparato radicale, per cui garantiscono un resistenza allo stress idrico anche in condizioni di estrema secchezza; ciò é dovuto a moltissimi fattori come l'aumento della conduttività idrica della pianta, la diminuzione della resistenza al flusso dell'acqua che attraversa la pianta, ma soprattutto al

maggior assorbimento dell'acqua da parte delle ife extraradicali che si estendono oltre la zona esplorata dalle radici. Coleman *et al.*, (1990) hanno dimostrato che la conducibilità idrica del sistema suolo – pianta é migliore nelle piante micorrizzate.

#### **1.3.2.5. Protezione della malattia**

Molti microrganismi (funghi, batteri) come i funghi micorrizici possono proteggere la pianta ospite attraverso meccanismi diversi quali la competizione con i patogeni per i siti di infezione e per i nutrienti, la formazione di una barriera fisica intorno alle radici, l'induzione di meccanismi di difesa. Nelle cellule contenenti gli arbuscoli, vengono infatti attivati di geni codificanti per la resistenza ai patogeni. Inoltre, l'applicazione di funghi micorrizici è in grado di attivare nei tessuti della pianta una resistenza sistemica efficace oltre che contro i patogeni radicali, anche nei confronti di quelli della parte aerea e di organismi sistemici quali i fitoplasmi (Romanazzi *et al.*, 2009). I funghi micorrizi possono ridurre la gravità di alcune avversità biotiche causate da nematodi e soprattutto da patogeni tellurici (*Sclerotium cepivorum*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Pythium* spp., ecc.) (Whipps, 2004), alterando la fisiologia dell'ospite e rendendo le radici più resistenti ai patogeni stessi. Le piante micorrizzate resistono meglio all'attacco di agenti patogeni e crescono meglio rispetto quelle non micorrizzate (Andrade *et al.* 2009). Si stima che le micorrize possono portare ad una riduzione della patologie fungine compresa tra il 55% ed il 70% (Dehne, 1982). Infatti le radici micorrizzate costituiscono una barriera fisica contro i patogeni e possono secernere alcuni antibiotici che inibiscono i patogeni radicali (Perrin, 1985). Pozo e Azcón-Aguilar (2007) hanno dimostrato, che la formazione delle micorrize induce nella pianta una resistenza di tipo sistemico (ISR), simile a quella indotta a seguito di risposta di ipersensibilità. In particolare alcuni enzimi idrolitici prodotti a seguito dell'infezione micorrizica, quali chitinasi e  $\beta$ - glucanasi hanno un ruolo protettivo; essi infatti sono riconosciuti per la loro attività antifungina (Dalpé, 2005). In alcune associazioni fungo - pianta si vede inoltre un aumento del livello di lignificazione della parete cellulare

dell' endoderma, dei tessuti vascolari e un accumolo di callosio, questo permette la formazione di una barriera contro la penetrazione di patogeni (Dalpé, 2005).

## **1.4. Generalità sul tartufo**

### **Cenni storici**

Il tartufo è un frutto della terra già conosciuto dai tempi più antichi; alcuni storici fanno risalire la prima menzione del tartufo come alimento ai tempi di Giacobbe, circa milleseicento anni prima di Cristo.

In un libro intitolato "Storia delle piante", Plinio il Vecchio afferma che i tartufi sono piante senza radici originali dalla terra. Altri autori antichi pensavano che l'origine di questo prezioso fungo fosse dovuta all'azione dell'acqua, del calore e dei fulmini (Pacioni, 1986).

Secondo Ravel (in Moigno, 1856) il tartufo nasce dalla puntura fatta da una mosca alla radice di alcune specie di alberi, soprattutto querce. Solo recentemente Alfonso Ciccarello nel 1564 in un piccolo libro, intitolato "l'opusculum de Tuberibus" considera per la prima volta il tartufo come uno speciale tipo di fungo. Infine solo 19 ° secolo, (Frank, 1885) scopre le micorrize.

### **Caratteristiche generali**

Dal punto di vista della collocazione sistematica, il tartufo è un fungo ipogei appartenente alla classe degli Ascomiceti, che forma ectomicorrize, come tutti i funghi non è in grado, per la mancanza di clorofilla, di compiere la fotosintesi che produce le sostanze necessarie all'accrescimento della pianta, cosicché per crescere e svilupparsi ha la necessità di trarre il nutrimento da altre piante (piante simbiotici): querce, pioppi, salici, noccioli, faggi, conifere.

Come tutti gli ascomiceti, i tartufi sono caratterizzati dalla presenza di strutture microscopiche (aschi) che contengono spore (ascospore), cioè gli organi per la riproduzione sessuata del fungo.. Le esigenze ecologiche dei tartufi sono molto specifiche . In generale, i tartufi di maggiore pregio sono anche i più esigenti in fatto di temperatura, di quantità e distribuzione delle piogge, di tipo di suolo, mentre quelli di minor pregio sono adattabili ad

una maggiore varietà di habitat. Nel mondo ci sono circa 60 specie di tartufi (Trappe, 1979), di cui circa 20 crescono in Europa (RiOUSset *et al.*, 2001) tutte presenti in Italia. In base alla legge nazionale 752 del 16 dicembre 1985, che regola la raccolta, la conservazione e la commercializzazione dei tartufi in Italia, sono solo 9 i taxa (corrispondenti a 7 specie) che possono essere commercializzati (fig.3).

SPECIE RACCOLTE E COMMERCIALIZZATE IN ITALIA <sup>(*)</sup>	
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Tartufo bianco pregiato
<i>Tuber melanosporum</i> Vittad.	Tartufo nero pregiato
<i>Tuber aestivum</i> Vittad.	Tartufo d'estate o Scorzone
<i>Tuber uncinatum</i> Chatin	Tartufo uncinato o Tartufo nero di Fragno
<i>Tuber brumale</i> Vittad.	Tartufo nero d'inverno o Trifola nera
<i>Tuber brumale</i> var. <i>moschatum</i> De Ferry	Tartufo moscato
<i>Tuber borchii</i> Vittad.	Bianchetto o Marzuolo
<i>Tuber macrosporum</i> Vittad.	Tartufo nero liscio
<i>Tuber mesentericum</i> Vittad.	Tartufo nero ordinario

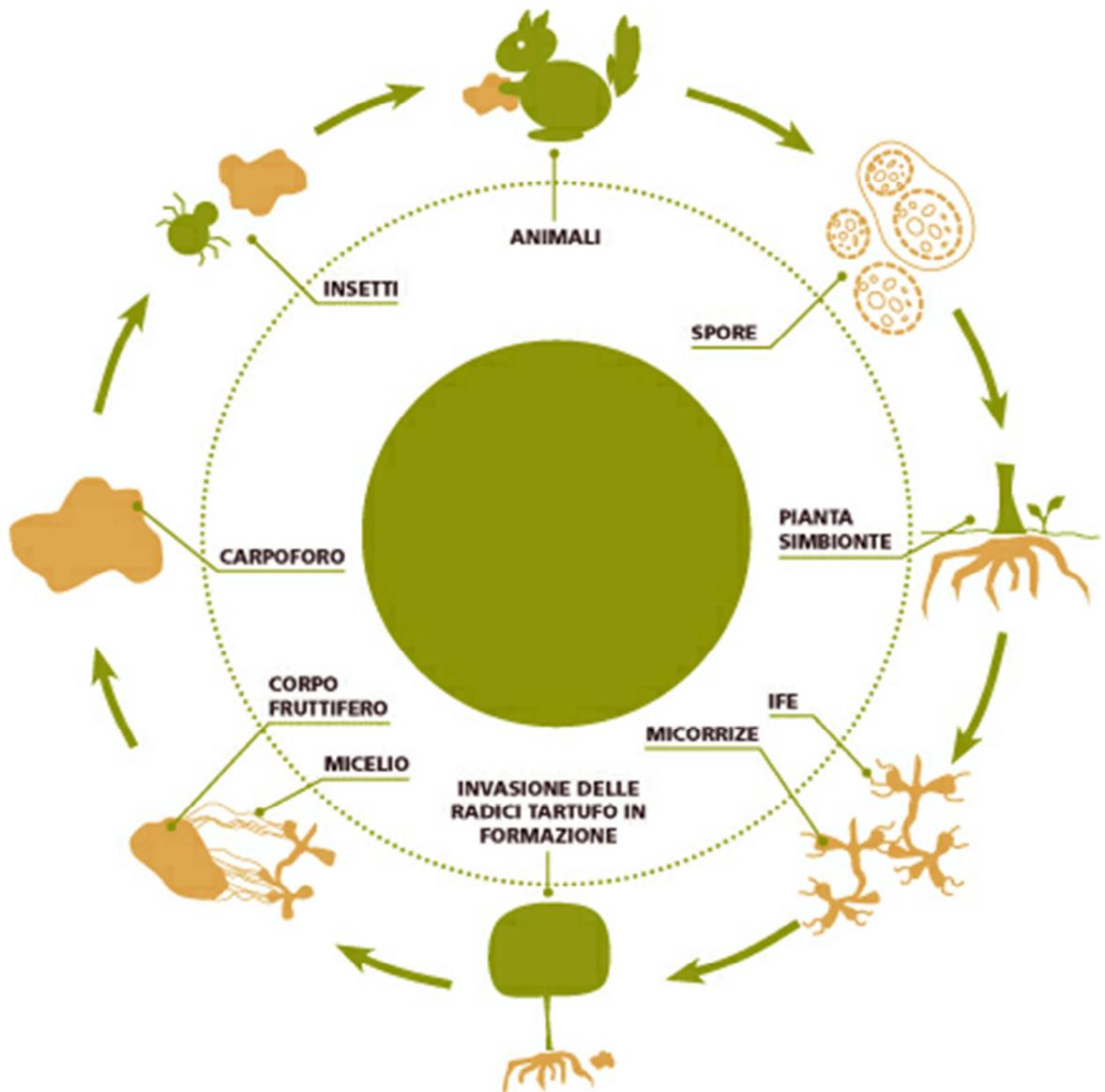
**Fig. 3:** Tartufi che possono essere raccolti e commercializzati in Italia

*Tuber magnatum* Pico ( il tartufo bianco pregiato) all'estero conosciuto come "Italian white truffle" e *Tuber melanosporum* Vittad. (il tartufo nero pregiato), "the black diamond of Perigord" sono le specie che raggiungono il più elevato valore commerciale e economico a livello mondiale, mentre altre (*Tuber borchii* Vittad., *Tuber macrosporum* Vittad., *Tuber aestivum* Vittad., *Tuber. brumale* Vittad. e *Tuber. mesentericum* Vittad.) sono meno pregiate, ma hanno importanza a livello locale. Esistono inoltre altre specie di tartufi provenienti da altri continenti e che sono localmente consumate, alcune delle quali hanno di

scarso valore commerciale, come *Terfezia arenaria*, (soprattutto nel nord dell’Africa e Siria), *Tuber oligospermum* (Marocco), *Tuber oregonense*, *Tuber griseum*, *Leucangium carthusianum* (nord America), *Tuber indicum* e *Tuber pseudoexcavatum* (Cina). Alcune di queste specie in particolare *T. indicum* e *T. oligospermum* vengono importate clandestinamente in Italia e commercializzate come i tartufi più pregiati.

#### **1.4.1. Il ciclo biologico**

Il ciclo biologico dei tartufi è particolarmente complesso e presenta alcune fasi ancora non del tutto chiarite. Sulla base di studi condotti principalmente su *T. melanosporum* è possibile identificare tre fasi: la fase vegetativa, quella riproduttiva e quella simbiotica,; dopo un periodo variabile di quiescenza e in condizioni pedoclimatiche più favorevoli, le spore disseminate nel terreno da animali idnofagi cominciano a germinare, emettendo prima un micelio mononucleato (**micelio primario, fase vegetativa**) che si accresce verso le giovani radici delle piante formando le micorrize (**fase simbiotica**). In condizioni ecologiche ideali quando la pianta ospite ha raggiunto la maturità fisiologica, la micorriza smettono di crescere e si sviluppano il primordio del corpo fruttifero a seguito della gamia fra due miceli di mating type diverso (**fase di fruttificazione**). In seguito il corpo fruttifero si rende indipendente dalla pianta e continua il suo sviluppo, in modo autonomo mediante l’assorbimento di nutrienti dal terreno con il proprio micelio peritrofico fino alla completa maturazione. Parguey-Leduc *et al.*, (1984) hanno dimostrato che quando l’ascocarpo raggiunge le dimensioni di 1 mm di diametro, e circa 3 mg di peso, esso presenta già il peridio formato e la gleba costituita da vene fertili e sterili.

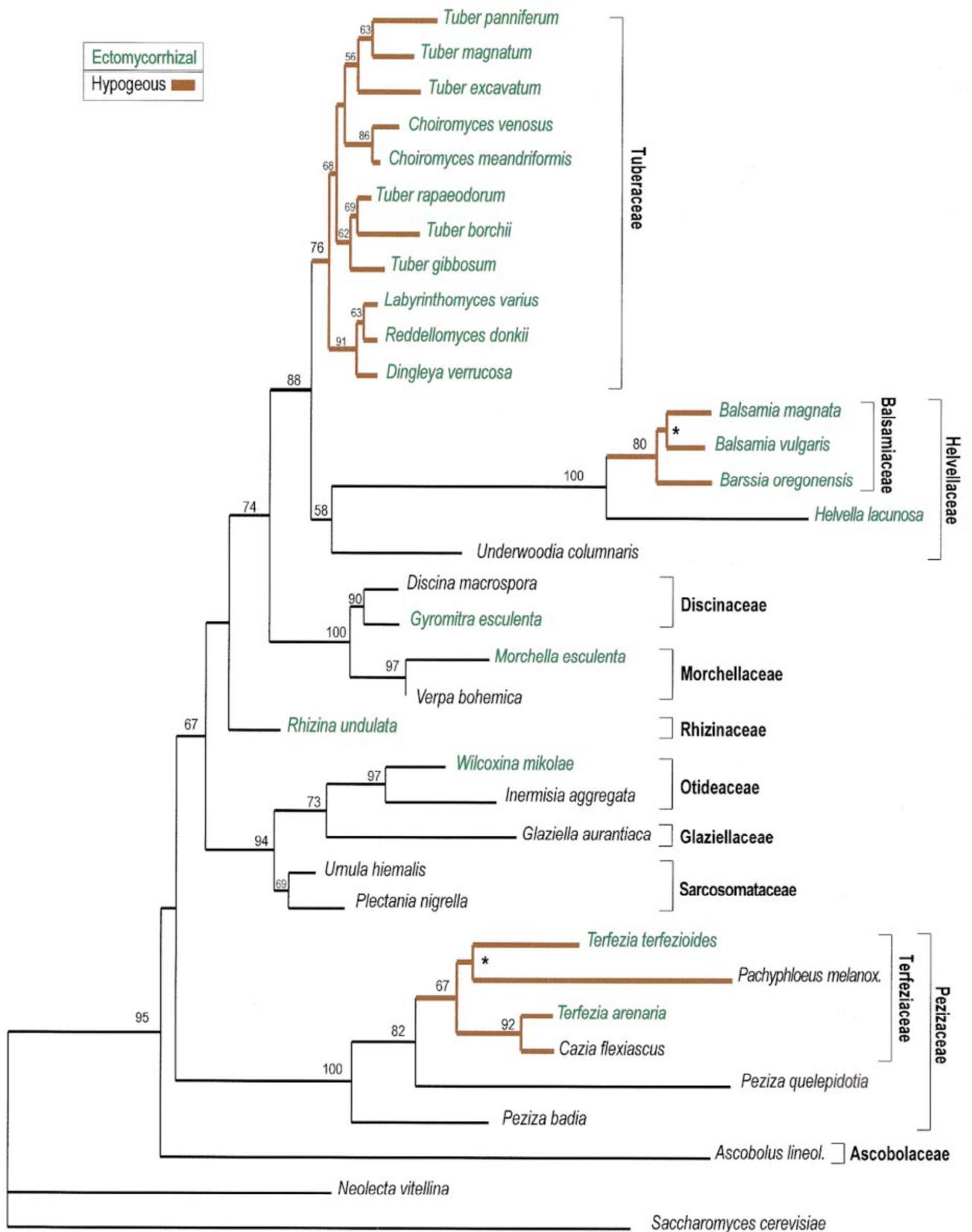


Ciclo biologico del tartufo ([www.tuber.it](http://www.tuber.it))

### 1.4.2. Tassonomia

Dopo il Rinascimento, l'Italia divenne la culla del lavoro di ricerca sul tartufo. De Borsch, (1780) pubblicò a Milano un primo libro sul tartufo in cui riconosce tre specie di *Tuber*. Sempre a Milano, nel 1787, il torinese Vittorio Pico, nella sua mirabile tesi di laurea in medicina, intitolata “Melethemata inauguralia - Exphysica de fungorum generatione et propagatione”, descrisse, per la prima volta i caratteri morfologici macro - e microscopici di *T. magnatum*, e di *T. rufum* e *T. albidum* che sarà poi chiamato *T. borchii* (Riousset *et al.*,

2001). Carlo Vittadini (1800-1865), medico milanese e naturalista dell'Orto Botanico dell'Università di Pavia, nella sua opera "*Monographia tuberacearum*" (1831), fece notevoli progressi nella tassonomia dei tartufi e descrisse ben 51 specie. I tartufi sono stati considerati in un primo tempo appartenenti all'ordine delle Tuberales. Nel 1979, basandosi su criteri morfologici e biochimici, Trappe inseriva la famiglia delle Tuberaceae, di cui fanno parte i tartufi, nell'ordine delle Pezizales, insieme alle famiglie delle Helvellaceae, Pezizaceae, Ascobolaceae, ecc . In seguito le analisi filogenetiche condotte sulle regioni 18S e 28S del DNA ribosomale da Percudani *et al.* (1999) hanno confermato la collocazione sistematica dei tartufi nell'ordine delle Pezizales (fig.4). In fig.5 è riportata la più recente classificazione dell'ordine Pezizales di Hansen e Pfister (2006).



**Fig.4.** Albero filogenetico dell'ordine delle Pezizales secondo Percudani *et al.*, (1999)



un ecosistema; essi interagiscono sia fra di loro sia con l'ambiente che li circonda).

Le ricerche ecologiche sui tartufi hanno permesso di studiare i caratteri degli ambienti dove i tartufi nascono e si sviluppano spontaneamente; questi risultati hanno permesso di capire le loro principali esigenze di cui tenere conto per la loro coltivazione e di individuare i più importanti fattori ecologici responsabili della loro fruttificazione. Le esigenze ecologiche dei tartufi riguardano il clima, con tutti i suoi componenti (altitudine, latitudine, venti, temperature, precipitazioni, umidità dell'aria). Fra questi fattori climatici l'andamento delle precipitazioni e le temperature, hanno un effetto notevole sugli ecosistemi condizionando la distribuzione e la composizione delle biocenosi e determinano condizioni favorevoli sull'attività del micelio del tartufo, lo sviluppo e la formazione delle micorrize ed in particolare influenzano la composizione delle comunità fungine ectomicorriziche. Lo studio dei suoli è estremamente importante. Il suolo infatti è la porzione interposta tra l'atmosfera e la litosfera, che ospita sia la pianta sia il tartufo; in particolare i tartufi esigono terreno basico (pH superiore a 7) e calcareo; se il pH è inferiore a 6 nessun tipo di tartufo potrà svilupparsi. Le specie microbiche del suolo possono inoltre influenzare la composizione delle comunità fungine ectomicorriziche come sarà illustrato nel paragrafo successivo.

#### 1.4.4. Caratteristiche ecologiche delle principali specie di tartufi

	<b>Distribuzione geografica</b>	<b>caratteristiche del suolo</b>	<b>Piante Simbionti</b>
<i>T. magnatum</i>	Principale paese produttore di questo tartufo è l'Italia, ma possiamo trovarlo in Istria, Croazia, e in piccole aree del sud est della Francia, Ungheria, Serbia, Slovenia e Canton Ticino (Hall <i>et al.</i> , 2007)	Terreno preferibilmente marnoso-calcareo, povero di fosforo e di azoto ma ricco di potassio, con scarsa dotazione di sostanza organica, con pH tra 7-8,5. I terreni favorevoli a <i>T.magnatum</i> sono ben drenati (Riousset <i>et al.</i> , 2001)	Si ritrova sotto pioppo (in particolare pioppo bianco), salice, tiglio, querce (roverella, leccio, farnia, e cerro), altri simbionti sono il nocciolo ( <i>Corylus avellana</i> ), il carpino nero ( <i>Ostrya carpinifolia</i> ), (Riousset <i>et al.</i> , 2001)
<i>T. borchii</i>	Ha una vasta distribuzione geografica in Europa, della Sicilia fino al sud della Finlandia (Riousset <i>et al.</i> , 2001)	Caratterizzato da terreni sabbiosi e calcarei tipici delle pinete litoranee, ma vegeta anche nei terreni argillosi e debolmente acidi (Riousset <i>et al.</i> , 2001)	Si trova sotto , pino domestico ( <i>Pinus pinea</i> ), pino marittimo ( <i>Pinus pinaster</i> ), pino d'Aleppo ( <i>Pinus halepensis</i> ), simbionti sono anche le querce sia rovere ( <i>Quercus sessiflora</i> ), cerro ( <i>Quercus cerris</i> ) e roverella ( <i>Quercus pubescens</i> )
<i>T.melanosporum</i>	Areale di diffusione molto vasto, si trova in Francia, Italia e Spagna. è stato trovato trovato anche in Gran Bretagna, Svizzera, Portogallo, Serbia, Grecia, Bulgaria e Turchia. (Riousset <i>et al.</i> , 2001)	Terreno calcareo breccioso (permeabile), con pH tra 7,5 e 8,0. È stato trovato nei suoli dell'era primaria, secondaria, terziaria e quaternaria (Riousset <i>et al.</i> , 2001)	Si trova sotto le piante di roverella , di leccio, di nocciolo, di carpino, di pino domestico e di cisto

#### **1.4.5. Il tartufo e i batteri del suolo**

Il suolo è l'habitat d'elezione dei funghi, le comunità microbiche in esso presenti potrebbero avere un impatto nella colonizzazione delle radici delle piante da parte dei funghi micorrizici e alterare gli effetti che i funghi hanno sulla crescita della pianta stessa (Piculell, 2008). Alcuni batteri presenti nella rizosfera sono in grado di favorire l'instaurarsi della micorrizzazione e di stimolare la capacità di infezione fra fungo e pianta (Frey-klett *et al.*, 2007). Una ricerca condotta da Hodge *et al.* (2000), che riguarda le micorrize arbuscolari, dimostra che la comunità microbica del suolo è in grado di influenzare la crescita del fungo e lo stabilirsi del rapporto simbiotico con la pianta ospite in maniera positiva, negativa o neutra. In particolare, gli effetti negativi sul fungo si traducono con la riduzione del numero di spore germinanti, della lunghezza delle ife, del grado di colonizzazione della radice della pianta ospite. Gli effetti positivi indotti dalla componente microbica si esplicano in una maggior crescita del micelio fungino e in un aumento della capacità iniziale del fungo di colonizzare le radici della pianta, contribuendo quindi a migliorare lo sviluppo e il funzionamento della simbiosi micorrizica.

#### **1.5. La coltivazione del tartufo**

Coltivare i tartufi è sempre stata l'aspirazione di molti studiosi a causa dell'alto valore gastronomico e commerciale che hanno questi preziosi funghi. Nel tempo sono state provate varie tecniche di coltivazione. All'inizio del XIX secolo i primi tentativi di coltivazione risalgono ad un agricoltore francese Joseph Talon. Egli scoprì che era possibile creare nuove tartufaie seminando ghiande in terreni idonei allo sviluppo del tartufo (Singer e Harris, 1987). Verso la fine del XIX secolo, la produzione di tartufi in Francia aumentò notevolmente (Chatin, 1892). In Italia tali ricerche furono riprese da Mattiolo (1928), che aveva già ben chiaro il significato biologico delle micorrize; egli sosteneva che per coltivare il tartufo bisognava rimboschire terreni adatti con determinate specie arboree, quali querce, salici e noccioli. Nel 1931 Francolini, suggerì che per realizzare tartufaie artificiali bisognava

distribuire direttamente nel terreno frammenti di carpofori maturi (Francolini, 1931). Purtroppo, gli impianti effettuati da Francolini non dettero i risultati produttivi attesi a causa dei funghi ectomicorrizici antagonisti presenti nelle aree del impianto. Lorenzo Mannozi Torini Ispettore del Corpo Forestale dello Stato) (Mannozi-Torini, 1976) può essere considerato il padre della tartuficoltura moderna, infatti fu il primo ad ottenere, in laboratorio, piantine micorrizzate in condizioni controllate con *Tuber* spp. Nel corso degli ultimi anni, grazie agli studi di numerosi ricercatori italiani e francesi, le tecniche di coltivazione del tartufo si sono sempre più perfezionate. Oggi la tartuficoltura è un'importante realtà produttiva per molte specie di tartufo. L'Italia è ricca di ambienti in cui varie specie di tartufo potenzialmente possono essere coltivate con successo. Infatti, le specie commercialmente più importanti sono presenti in tutte le regioni d'Italia: *T. magnatum* è presente in tutta la penisola, *T. melanosporum* in tutto il centro-nord e nel sud, *T. aestivum* e *T. borchii* si possono trovare oltre che in tutta la penisola anche in Sicilia e Sardegna. In Italia, si stima che ogni anno siano messe a dimora circa 120000 piante micorrizzate con *T. melanosporum* (80%) e con *T.aestivum* (15%), il numero di piante micorrizzate con *T. magnatum*, *T. brumale*, *T. borchii* invece è minimo (solo il 5%) (Bencivenga *et al.*, 2009).

La coltivazione del tartufo si configura come attività agricola produttiva in grado di contribuire significativamente allo sviluppo socio-economico rurale, in particolare nei terreni collinari e montani. Solo la coltivazione di *T. magnatum* presenta ancora notevoli problemi sia per le difficoltà di ottenere le sue micorrize in serra, sia per le problematiche che si incontrano a pieno campo. Le sue micorrize in campo, infatti, sembrano scomparire e vengono sostituite da quelle di altri funghi ectomicorrizici. Una migliore conoscenza della biologia del tartufo ed in particolare la comprensione dei meccanismi molecolari che portano alla formazione delle micorrize e del carpoforo, l'individuazione dei fattori biotici ed abiotici che attivano questi meccanismi è indispensabile per poter sviluppare moderne tecnologie per la produzione di piantine micorrizzate e per incrementare la produttività delle tartufaie di

*T.magnatum*.

### **1.5.1. La micorrizzazione con tartufo e controllo delle piante tartufigene**

La micorrizzazione é fondamentale per la tartuficoltura. I problemi più rilevanti della produzione vivaistica di piantine micorrizzate con tartufo riguardano la contaminazione con funghi simbiotici antagonisti. In serra i contaminanti più comuni sono gli ascomiceti *Sphaerosporella brunnea* e *Pulvinula constellatio* (Amicucci *et al.*, 2001). Le contaminazioni sono molto più pericolose quando sono causate da funghi ectomicorrizici del genere *Tuber* di scarso pregio che possono essere presenti nell'inoculo. Infatti alcune specie di tartufo danno luogo a micorrize molto simili tra loro difficilmente distinguibili morfologicamente; per questo é importante effettuare un accurato controllo dell'inoculo ed in seguito delle piantine prima della loro messa in pieno campo. L'identificazione delle micorrize con il metodo morfologico é importante, ma non permette un riconoscimento sicuro del fungo simbiote, per esempio alcune specie di scarso pregio quali *T. maculatum* e *T. indicum* si possono facilmente confondere rispettivamente con quelle di *T. magnatum* e di *T. melanosporum* (Zambonelli *et al.*, 1999; Zambonelli *et al.*, 1997) e micorrize di *T.borchii* e *T. maculatum* con quelle di *T. magnatum* (Mello *et al.*, 2001; Rubini *et al.*, 2001)

### **1.5.2. Metodi di micorrizzazione**

Per ottenere delle piantine micorrizzate è importante avere un ambiente il più possibile simile a quello naturale ed eliminare la competizione di altri funghi micorrizici. Il processo richiede la produzione delle piantine in serra in condizioni controllate. Le metodologie utilizzate per la produzione di piante micorrizzate sono diverse e sono rappresentate dall'inoculazione sporale, per approssimazione radicale e miceliare.

#### **➤ Inoculazione sporale**

Questo metodo è il più antico, ma ancora il più diffuso per la sua semplicità per produzione di piantine micorrizzate con tartufo. Secondo questa tecnica, piantine ottenute da seme o da talea sono inoculate con corpi fruttiferi maturi spappolati con un pestello e un mortaio o con

un frullatore miscelati ad acqua sterile.

I semi delle piante ospiti devono essere sterilizzati prima del loro impiego per evitare le contaminazioni; anche i carpofori dei tartufi impiegati per l'inoculazione devono essere lavati e la superficie deve essere sterilizzata con un veloce passaggio alla fiamma. Le spore contenute nel tartufo spappolato vengono messe a contatto con le radici, mediante immersione degli organi radicali nella sospensione sporale o mescolando la sospensione in terreno. In seguito le piantine sono devono essere allevate in serra in vasi opportuni per favorire il processo di micorrizzazione. Il metodo di inoculazione sporale è particolarmente idoneo per la produzione di piantine micorrizzate con *T. borchii*, *T. melanosporum* *T. aestivum*, mentre non è facile ottenere piantine ben micorrizzate con *T. magnatum*, in quanto le spore di questo tartufo germinano con difficoltà (Tibiletti e Zambonelli, 2000).

#### ➤ **Approssimazione radicale**

Questo metodo di inoculazione è meno costoso, permette di risparmiare sul costo d'acquisto dei carpofori. Per l'applicazione di questo metodo si utilizza come fonte di inoculo o piante madri micorrizzate con la metodologia precedentemente descritta, le quali sono trapiantate in grandi vasche riempite con del terreno sterile, circondate da giovani piantine che possono provenire dai semenzali, da talee radicate o anche da colture in vitro. Il metodo si basa sulla capacità del micelio di propagarsi per infettare le radici non micorrizzate. In alternativa si prelevano porzioni di radici ben micorrizzate dalla pianta madre che sono avvolte sempre in ambiente sterile, attorno a quelle di giovani piantine ottenute in condizioni di sterilità. Questa procedura è molto laboriosa ed è necessario che questo metodo sia applicato solo da personale specializzato, in grado di riconoscere le micorrize di tartufo presenti nella pianta madre e valutare l'assenza di funghi ectomicorrizici, per evitare il rischio di propagare micorrize di funghi inquinanti al posto di quelle del tartufo.

#### ➤ **Inoculazione miceliare**

La germinazione delle spore di tartufo è aleatoria, dipende da molti fattori biotici ed abiotici

ancora sconosciuti e il costo degli ascomi utilizzati per le inoculazioni è elevato. Solo attraverso l'utilizzo delle nuove biotecnologie di micorrizzazione miceliare che si stanno sperimentando nel nostro laboratorio, si possono notevolmente migliorare le tecniche di produzione delle piantine micorrizzate con tartufo. Esse offrono la possibilità di utilizzare per le inoculazioni, miceli in coltura pura geneticamente selezionati, sia per la loro affinità la pianta ospite prescelta, sia per la loro adattabilità alle diverse condizioni ecologiche delle zone di impianto e sia per la loro precocità produttiva. In passato sono stati fatti numerosi tentativi di isolamento del micelio di *Tuber* spp in coltura pura, ma spesso i miceli ottenuti crescevano troppo lentamente per riuscire ad inoculare le piantine. I primi tentativi utilizzare colture pure miceliari per la produzione di piante tartufigene risalgono agli anni 70 (Chevalier 1973, Chevalier *et al.*, 1973). Recentemente nei nostri laboratori sono state ottenute colture pure di *T. borchii*, di *T. macrosporum*, di *T. aestivum*, di *T. melanosporum*, di *T. brumale* e di *T. rufum* (Iotti *et al.*, 2002) sufficientemente vigorose per essere utilizzate per ottenere micorrize in serra (Zambonelli e Iotti, 2006). Questo procedimento offre numerosi vantaggi (oltre a quelli economici e produttivi già citati) tra cui quello di produrre piantine con un grado di micorrizzazione elevato e costante ed esenti da inquinamenti (Zambonelli e Iotti, 2006). Infine poiché le piante vengono coltivate in laboratorio, si possono produrre tutto l'anno.

#### **1.6. Metodi molecolari e l'identificazione dei funghi del genere *Tuber***

L'identificazione di tartufi è tradizionalmente basata sulle caratteristiche morfologiche del corpo fruttifero (aspetto, colore, dimensione), delle spore (forma, ornamentazioni) e delle micorrize (Pegler, 1993). Spesso, tuttavia non è risolutiva, poiché la valutazione di tali caratteri richiede operatori di notevole esperienza soprattutto per le micorrize. Le micorrize che si trovano nel terreno sono infatti generalmente a diversi stadi di sviluppo e raramente presentano tutte le caratteristiche necessarie per una corretta identificazione morfologica, rendendo spesso impossibile l'identificazione morfologica. Inoltre come già detto alcune

specie presentano caratteristiche simili (Zambonelli *et al.*, 1993). Per questo per confermare l'appartenenza di micelio e micorrize ad una determinata specie è necessario utilizzare altri metodi, come quelli molecolari che sono più affidabili, infatti permettono l'identificazione delle varie specie di tartufo in tutte le fasi del ciclo biologico.

A partire da 1983, le tecniche molecolari hanno permesso di fare enorme passi avanti nella comprensione del mondo dei funghi del genere *Tuber*. Le sequenze degli spaziatori interni trascritti (ITS) del DNA ribosomale nucleare sono le più utilizzate, perché ci sono una serie di primer universali per amplificare (White *et al.*, 1990) e si ripetono nel genoma facilitandone l'amplificazione (Cassidy *et al.*, 1984). Il sequenziamento di questa regione genica ha permesso inoltre di disegnare primers specifici da utilizzarsi in PCR semplice o in PCR multiplex per una identificazione più rapida delle diverse specie di tartufo (Amicucci *et al.*, 1998; Amicucci *et al.*, 2000)., E' già stata sequenziata la regione ITS di ben 29 specie del genere *Tuber*. L'analisi e la conoscenza di queste sequenze ha permesso, infatti, lo sviluppo di queste tecniche molecolari permettono di identificare il tartufo utilizzato anche nei cibi, per evitare una frodi commerciale a danno del consumatore. Per esempio, *Tuber brumale* o *T. indicum* vengono spesso utilizzati al posto di *T. melanosporum* per cui Douet *et al.* (2004), hanno designato primer PCR specifici per *Tuber brumale*, *T. indicum* e *T. melanosporum*.

### **1.7. *Tuber magnatum* Pico**

E' il tartufo di maggior pregio come confermano anche i prezzi di mercato che per questa specie sono da una a dieci volte superiori a quelli degli altri tartufi. E un tartufo tipicamente italiano, si rinviene in quasi tutte le Regioni d'Italia, dal Piemonte alla Basilicata. Nonostante sia la specie più pregiata a tutt'oggi le conoscenze acquisite non sono ancora in grado di comprendere completamente la sua biologia e ecologia. Queste carenze conoscitive sono dovute a difficoltà oggettive legate alle caratteristiche eco-fisiologiche di questa specie che ne rendono difficile lo studio sia in laboratorio sia in campo. *T. magnatum* è infatti un

fungo strettamente biotrofico che non sviluppa in assenza della pianta ospite. Inoltre le zone di produzione naturale sono infatti estremamente eterogenee per produttività, solo alcune piante sono micorrizzate e la produzione di ascomi varia notevolmente nel tempo a seconda delle condizioni climatiche stagionali. Altro aspetto da considerare è che nelle tartufaie di *T. magnatum*, coltivate o naturali, oltre alla produzione di tartufi si verificano fruttificazioni di altre specie fungine micorriziche e saprotrofe e generalmente i funghi ectomicorrizici presenti sono ritenuti competitori nei confronti dei *Tuber*.

*T. magnatum* è caratterizzato da un ascoma di forma molto variabile da sferica a lobata. Il corpo fruttifero ha dimensioni variabili da quella di un pisello a quella di una grossa arancia e raramente è ancora più grande (sono stati raccolti carpofori di eccezionale grandezza e del peso di oltre 2 kg) (Fig.6). Il peridio è liscio, di colore variabile dall'ocra pallido al giallo chiaro al verde tenue e talora con sfumature rossastre. Anche la gleba è di colore variabile dall'ocra chiaro al nocciola più o meno intenso ed è solcata da numerose vene bianche e sottili che scompaiono con la cottura. Gli aschi sono globosi od obovati, sub-pedunculati, contengono 1-4 spore e misurano in media 60-70 x 40-65 µm. Le spore sono di tipo alveolato, rotonde o lievemente ellittiche, il diametro è mediamente di 21-30 µm e gli alveoli sono grandi (10-20 µm di diametro), all'osservazione microscopica se ne contano 3-4. Il periodo di fruttificazione si colloca da ottobre fino a dicembre. Il tartufo bianco è in grado di svilupparsi solo in pedoambienti molto circoscritti. Il terreno delle tartufaie naturali deriva da substrati composti da marne, calcari marnosi, marne argillose, arenarie, con pH neutro o alcalino.



**Fig.6.** (a)-(b) Ascomi di *Tuber magnatum*

Dal punto di vista climatico, preferisce le aree con clima continentale, anche se talora si trova in ambiente con clima mediterraneo. I cercatori di tartufi sanno che esiste una correlazione molto significativa fra la pioggia estiva (mesi di giugno e luglio) e la produzione dei tartufi. Le tartufaie si localizzano di preferenza nei fondi valle freschi e lungo i fossati in una fascia altimetrica ottimale da 100 a 600 m slm. In terreni umidi le piante ospiti sono il pioppo (*Populus* spp., in particolare pioppo bianco) e salice (*Salix* spp.), in pianura si trova spesso associato al tiglio (*Tilia* spp.) e, nei terreni di collina si lega spesso con la roverella (*Quercus pubescens*) e talora al leccio (*Quercus ilex*). Altri simbionti sono il nocciolo (*Corylus avellana*), il carpino nero (*Ostrya carpinifolia*), la farnia (*Quercus robur*) e il cerro (*Quercus cerris*).



## Scopo della tesi

I tartufi sono funghi ascomiceti caratterizzati da ascomi ipogei indeiscenti di forma sferica più o meno regolare (Trappe *et al.*, 2009). Da un punto di vista sistematico sono collocati in numerose famiglie dell'ordine delle Pezizales (*Pezizaceae*, *Morchellaceae*, *Discinaceae*, *Helvellaceae*, *Tuberaceae* e *Pyronmataceae*). I tartufi possono essere coltivati in pieno campo attraverso la produzione di piantine micorrizzate e la loro messa a dimora in terreni idonei (Hall *et al.*, 2007). La produzione di piante micorrizzate con tartufo è pertanto il primo passo per poter realizzare la tartuficoltura. Purtroppo però, dal punto di vista sperimentale, il genere *Tuber* presenta notevoli difficoltà di studio di ordine pratico che coinvolgono anche i processi d'infezione delle piantine. Il *T. magnatum*, tartufo bianco pregiato, è la specie di maggior pregio sia per il limitato areale di sviluppo, rappresentato solo dall'Italia ed alcune aree dei Balcani, sia per le difficoltà che si incontrano nella sua coltivazione (Hall *et al.*, 2007). Gli studi su questa specie sono estremamente complessi in quanto finora era impossibile disporre del suo micelio *in vitro* e per le difficoltà di ottenere piantine micorrizzate in serra. Per tali motivi i biologi hanno sempre fatto riferimento ad altre specie fungine, da impiegare come modelli nello studio delle simbiosi ectomicorriziche, poiché queste offrivano una maggiore certezza e rapidità nell'ottenimento dei risultati scientifici. Una delle specie modello più impiegata è *Tuber borchii*, tartufo bianchetto, il cui micelio, a differenza di quello delle altre specie, si coltiva facilmente *in vitro* (Iotti *et al.*, 2002). Per questo motivo spesso è stato utilizzato per lo studio della biologia dei tartufi e delle interazioni con la pianta ospite.

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di sperimentare nuove biotecnologie per migliorare le tecniche di micorrizzazione delle piantine con tartufo ed in particolare con *T. magnatum* che come già menzionato sopra è la specie più difficile da coltivare.

La parte sperimentale delle presente tesi è stata articolata in 5 capitoli ciascuno inerente al conseguimento dei seguenti obiettivi:

1. Isolamento e caratterizzazione di ceppi di *T. magnatum*;
2. Miglioramento dello sviluppo delle colture pure di *T. magnatum*;
3. Valutazione di estratti radicali sullo sviluppo dei miceli di *Tuber*;
4. Produzione di piantine miccorizzate con *T. magnatum* ed altre specie di tartufo e verifica delle dinamiche d'infezione radicale;
5. Messa a punto di protocolli di conservazione a bassa temperatura per il mantenimento nel tempo delle colture di *Tuber* spp;



# Capitolo 3

## 3. Isolamento e caratterizzazione morfologica di colture pure di *T. magnatum*

### 3.1. Introduzione

I funghi del genere *Tuber* sono funghi strettamente biotrofici, per cui non sono in grado di completare il loro ciclo vitale in assenza della pianta ospite. Lo studio e l'approfondimento della biologia e della fisiologia di un microrganismo traggono notevole vantaggio dall'avere a disposizione miceli in coltura pura che producono un'adeguata quantità di biomassa. In passato sono stati fatti molti tentativi per isolare i miceli dei tartufi e produrre una quantità adeguata di inoculo per infettare le piante (Fontana, 1971), ma essi crescevano molto lentamente. Diverse specie di *Tuber* sono già state isolate in coltura pura ed utilizzate a scopi sperimentali, come è riportato da Sisti *et al.* (1998). Il micelio di *T. borchii* è stato prodotto in sufficiente quantità per la produzione di micorrize *in vitro* (Giomaro *et al.*, 2000). Altre specie di tartufi come *T. maculatum*, *T. melanosporum*, *T. aestivum*, *T. macrosporum*, *T. rufum* e *T. brumale* sono state successivamente isolate e caratterizzate con metodi morfologici e molecolari (Iotti *et al.*, 2002). Isolare e successivamente mantenere in coltura pura il micelio di *T. magnatum* rappresenterebbe il primo importante passo per studiarne in laboratorio le caratteristiche fisiologiche e l'espressione di geni funzionali, sia durante la fase saprotrofica sia durante la fase simbiotica e pre simbiotica. Infatti, il micelio di *T. magnatum*, diversamente da quello di altre specie di *Tuber*, è molto più difficile da isolare in coltura pura. Il primo tentativo d'isolamento del micelio di *T. magnatum*, a partire dalle micorrize, è stato realizzato da Mischiati e Fontana (1993). Tuttavia, successivamente, fu dimostrato, attraverso l'analisi genetica, che il micelio ottenuto non apparteneva a *T. magnatum* ma a *T. maculatum* (Mello *et al.*, 2001). Attualmente nessun ricercatore è stato in

grado di isolarlo e mantenerlo in coltura pura. Solamente Buee e Martin (2009) hanno sviluppato un metodo per mantenere *in vitro* i miceli di *T. magnatum* utilizzando le radici delle piante trasformate con *Agrobacterium rhizogenes* in coltura mista con batteri.

Per questi motivi la prima fase della sperimentazione si è basata sul tentativo d'isolamento e moltiplicazione in coltura pura del micelio di *T. magnatum* e sulla sua caratterizzazione morfologica e molecolare.

## **3.2. Materiali e metodi**

### **3.2.1. Isolamento dei miceli**

I corpi fruttiferi di *T. magnatum* (Tabella 1) impiegati in questa prova sono stati raccolti nel periodo compreso fra il 18 agosto 2010 e il 24 dicembre 2011 ed identificati in base alle loro caratteristiche anatomo-morfologiche secondo Pegler (1993). Una parte di ciascun corpo fruttifero è stata essiccata e depositata presso l'erbario del Centro di Micologia di Bologna (CMI-Unibo). L'isolamento è stato eseguito in condizioni asettiche asportando, dalle zone più interne di ciascun carpoforo, piccole porzioni di gleba, successivamente mantenute sul substrato nutritivo "Woody Plant Medium" (WPM), modificato secondo Iotti *et al.* (2002) relativamente alla componente zuccherina (10 g/l di saccarosio) (Tabella 2). Le colture sono state mantenute in termostato, all'oscurità, a 22 °C.

**Tabella 1** - N° d'erbario, località e data di raccolta degli ascomi

<b>Specie</b>	<b>Numero erbario</b>	<b>Località di raccolta</b>	<b>Data di raccolta</b>
<i>Tuber magnatum</i>	3882	Argenta (Fe)	18-08-2010
<i>Tuber magnatum</i>	3992	Cotignola (Ra)	25-08-2010
<i>Tuber magnatum</i>	4101	Pianoro (Bo)	07-10-2010
<i>Tuber magnatum</i>	4112	Pianoro (Bo)	12-10-2010
<i>Tuber magnatum</i>	4115	Bologna (Bo)	19-11-2010
<i>Tuber magnatum</i>	4119	S. Agostino (Fe)	23-11-2010
<i>Tuber magnatum</i>	4120	S. Agostino (Fe)	23-11-2010
<i>Tuber magnatum</i>	4121	S. Agostino (Fe)	23-11-2010
<i>Tuber magnatum</i>	4118	Molinella (Fe)	26-11-2010
<i>Tuber magnatum</i>	4142	S. Agostino (Fe)	06-12-2010
<i>Tuber magnatum</i>	4145	Bologna (Bo)	10-12-2010
<i>Tuber magnatum</i>	4162	Argenta (Fe)	17-12-2010
<i>Tuber magnatum</i>	4199	S. Agostino (Fe)	03-01-2011
<i>Tuber magnatum</i>	4184	S. Agostino (Fe)	07-01-2011
<i>Tuber magnatum</i>	4280	S. Agostino (Fe)	09-12-2011
<i>Tuber magnatum</i>	4281	S. Agostino (Fe)	09-12-2011
<i>Tuber magnatum</i>	4282	S. Agostino (Fe)	09-12-2011
<i>Tuber magnatum</i>	4283	S. Agostino (Fe)	09-12-2011
<i>Tuber magnatum</i>	4204	S. Agostino (Fe)	15-12-2011
<i>Tuber magnatum</i>	4341	S. Agostino (Fe)	24-12-2011

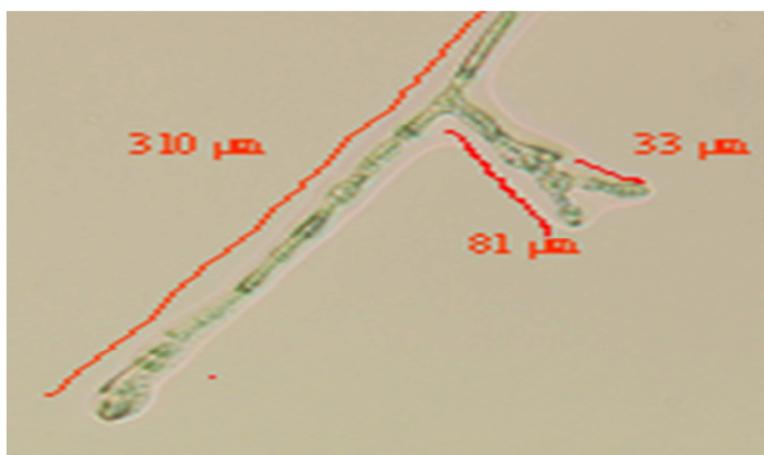
**Tabella 2-** composizione del mezzo nutritivo Woody Plant Medium

<b>Costituenti</b>	<b>Concentrazione</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0.2 g/l
<b>Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O</b>	0.5 g/l
<b>CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	0.1 g/l
<b>MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	0.3 g/l
<b>MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O</b>	22.3 mg/l
<b>K<sub>2</sub> SO<sub>4</sub></b>	0.9 g/l
<b>NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub></b>	0.4 g/l
<b>F<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	0.014 mg/l
<b>ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	8.6 mg/l
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6.2 mg/l
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	0.25 mg/l
<b>CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O</b>	0.025 mg/l
<b>NaEDTA 2H<sub>2</sub>O</b>	37.3 mg/l
<b>Myo-inositol</b>	0.1g/l
<b>D(+)-Saccarosi</b>	10 g/l
<b>Agar</b>	10 g/l

### 3.2.2. Caratterizzazione morfologica dei ceppi isolati

Gli accrescimenti delle colonie sono stati analizzati e misurati con uno stereomicroscopio (50X). La caratterizzazione morfologica è stata eseguita misurando l'indice d'accrescimento ifale (Hyphal Growth Unit – HGU) (Trinci, 1973), il diametro delle ife e la distanza fra i setti. Questi parametri sono dei validi indicatori della crescita ifale già utilizzati in letteratura per la caratterizzazione morfologica dei miceli di *Tuber* spp. (Iotti *et al.*, 2002). L'indice HGU è stato calcolato come rapporto fra la sommatoria delle lunghezze di ciascuna ramificazione e quella dell'asse principale ed il numero di apici.

$$\text{HGU} = (\text{lunghezza ifa centrale} + \sum \text{lunghezze ramificazioni}) / (\text{n}^\circ \text{ di ramificazioni} + 1)$$



Le osservazioni sono state effettuate utilizzando un microscopio ottico Laborlux 12 (Leitz) (100X e 420X), dotato di video camera JVC e di programma di elaborazione di immagini Axio Vision 2.05 (Zeiss).

### 3.2.3. Identificazione molecolare

I micelio di ciascuno dei ceppi isolati è stato amplificato con un approccio di PCR diretta seguendo la procedura proposta da Bonuso *et al.* (2006). Sono stati impiegati i primer specie specifici TMGI e TMGII e le condizioni di amplificazione individuate da Amicucci *et al.* (1998).

## 3.3. Risultati e discussione

Fra tutti i corpi fruttiferi impiegati, è stato possibile isolare in coltura pura il micelio di *T. magnatum* solo per quelli contrassegnati con il numero d'erbario 3882 (identificato come ceppo Tmg2) e 4101 (Tmg5). I tentativi d'isolamento effettuati con tutti gli altri carpofori sono falliti, principalmente a causa d'inquinamenti batterici endogeni agli ascomi stessi che, probabilmente, hanno inibito lo sviluppo miceliare di *T. magnatum*. E' noto, infatti, che all'interno dei corpi fruttiferi di *T. magnatum* si sviluppano numerose specie batteriche, coltivabili e non, presenti anche negli ascomi immaturi (Barbieri *et al.*, 2010). I due ceppi isolati con successo sono stati ottenuti entrambi da corpi fruttiferi completamente immaturi, ossia privi di spore già formate all'interno degli aschi. Addirittura, il ceppo Tmg5 è stato isolato prelevando ciuffi miceliari da cavità interne alla gleba in formazione. Al contrario, tutti gli altri ascomi impiegati per gli isolamenti avevano spore già formate all'interno degli aschi, con morfologia tipiche della specie, anche se in numero ridotto. L'amplificazione di ampliconi di 173 bp, effettuata con i primer specifici TMAGI e TMAGII, ha confermato l'appartenenza di entrambi i ceppi a *T. magnatum*. Le loro colonie mostravano un accrescimento di tipo globulare (isodiametrico) in tutte le successive subculture, con un aspetto, quindi, differente ed anomalo rispetto al tradizionale modo di sviluppo dei funghi filamentosi *in vitro*, incluso quello delle altre specie di tartufo che è tipicamente di tipo radiale. L'accrescimento ifale delle masserelle miceliari trapiantate in substrati freschi si arrestava dopo uno sviluppo diametrico di circa 1-2 mm raggiunto in circa 4 settimane, mentre la "lag" fase era paragonabile a quella delle altre specie di *Tuber* (7-10 giorni). Questo tipo di sviluppo era difficile da apprezzare (e misurare) ad occhio nudo senza l'ausilio dello stereomicroscopio. La moltiplicazione ed il mantenimento in coltura delle colonie era effettuato mediante taglio delle masserelle miceliari con bisturi. I frammenti ottenuti dovevano essere completamente immersi nel nuovo substrato agarizzato per evitare l'arresto della crescita miceliare e l'imbrunimento (morte) delle nuove colonie, situazione che si verificava nel caso in cui essi fossero appoggiati sulla superficie o solo parzialmente

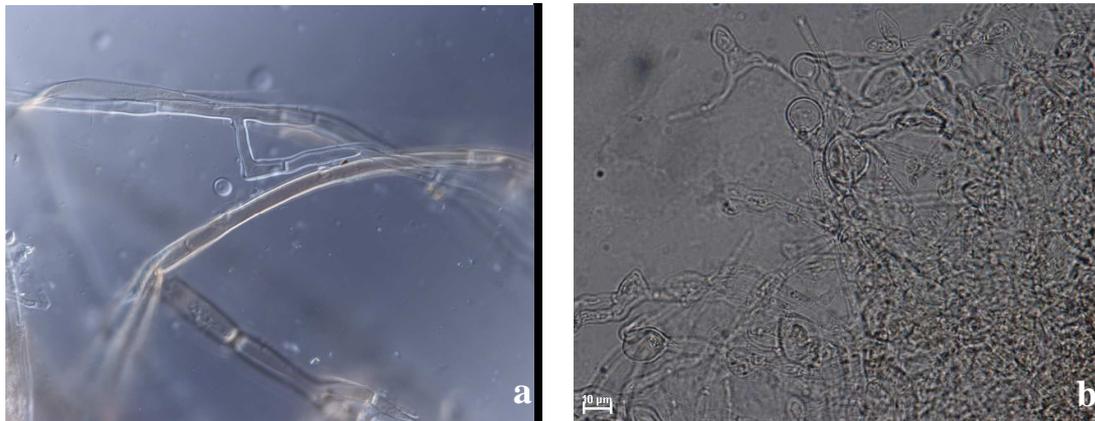
immersi in esso. Questa caratteristica dimostra che il micelio di *T. magnatum* è molto più sensibile alla disidratazione di quello delle altre specie di tartufo per le quali è solo necessario sigillare le piastre petri con Parafilm per evitarne l'arresto di sviluppo dovuto a disseccamento. Le caratteristiche morfologiche dei ceppi di *T. magnatum* sono riportati in tabella 3. In particolare, è stato misurato un indice di accrescimento ifale medio di 23,07  $\mu\text{m}$ , un diametro ifale medio di 3,24  $\mu\text{m}$  ed infine una distanza fra setti media di 12.82  $\mu\text{m}$ .

**Tabella 3-** Caratteristiche biometriche del micelio di *T. magnatum*

<b>Ceppo</b>	<b>Indice di sviluppo ifale (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Diametro ifale (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Distanza tra setti (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>Tmg5</b>	24,41	3,54	13,72
<b>Tmg2</b>	21,72	2,94	11,92

Il confronto di questi valori con quelli di altre specie di tartufo, pubblicati da Iotti *et al.* (2002) ed ottenuti sul medesimo substrato, ha dimostrato che i valori dell'indice di accrescimento ifale e della distanza fra setti di *T. magnatum* sono inferiori a quelli di *T. maculatum*, *T. melanosporum*, *T. aestivum*, *T. macrosporum*, *T. rufum* e *T. brumale*. Al contrario, il diametro ifale era superiore rispetto quello di *T. rufum* e *T. melanosporum* ma inferiore a quello delle altre specie. Inoltre, similmente alle altre specie di tartufi, entrambi i miceli dei due ceppi di *T. magnatum* isolati producevano vescicole intercari lungo le ife e formavano frequenti anastomosi (Fig. 7), come già riportato da alcuni autori che avevano descritto le ife emanate dalle micorrize di tale specie (Mello *et al.*, 2001; Rubini *et al.*, 2001). Le vescicole sono delle strutture caratteristiche dei miceli dei tartufi allevati *in vitro* e, per la loro morfologia, è stato ipotizzato possano essere delle strutture di resistenza tipo le clamidospore (Iotti *et al.*, 2002). Inoltre, un incremento del numero di tali strutture è stato rilevato nel micelio di *T. borchii* sviluppatosi in presenza di *Pseudomonas* spp, batteri isolati

da ascocarpo di *T. borchii* che hanno un attività antifungina e possono pertanto svolgere un ruolo nel mantenimento della salute della ascocarpo (Sbrana *et al.*, 2000).



**Fig. 7** - Anastomosi (a) e vescicole (b) del micelio di *T. magnatum*

### **3.4. Conclusioni**

Quest'esperienza ha dimostrato che è possibile isolare il micelio di *T. magnatum* e mantenerlo vitale in coltura pura attraverso successivi trapianti, come già realizzato per tutte le altre specie di tartufi pregiati. Comunque, nelle condizioni di crescita adottate in questa prova non è stato possibile produrre significative quantità di biomassa miceliare tali da poterne prevedere un utilizzo sperimentale. A tal riguardo, lo sviluppo dei miceli dei due ceppi di *T. magnatum* è stato estremamente ridotto e sicuramente molto inferiore a quello dei miceli delle altre specie di *Tuber*. In particolare sembra che tali ceppi mantengano ancora il “ricordo”, e di conseguenza un quadro d'espressione genica, legato allo sviluppo del corpo fruttifero.

La produzione di biomassa miceliare ha rappresentato spesso un fattore limitante per sperimentazione nell'ambito del genere *Tuber* e, di conseguenza, per l'approfondimento delle conoscenze sulla biologia e fisiologia di questi funghi. Tuttavia per *T. borchii* è stato possibile creare un modello per studiare le interazioni molecolari pianta ospite / fungo simbiote durante le prime fasi del processo di micorrizzazione (Sisti *et al.*, 1998). Seppur *T. melanosporum* manifesti un sviluppo più limitato, è stato possibile sequenziarne l'intero

genoma e studiarne l'espressione genica del micelio (Martin *et al.*, 2010) oppure studiarne l'incompatibilità vegetativa effettuando co-colture fra ceppi diversi di questa specie (Iotti *et al.*, 2012).

Proprio per questi motivi è cruciale trovare condizioni di sviluppo adeguate per migliorare la crescita *in vitro* anche di *T. magnatum*, in modo da poterlo impiegare in sperimentazioni che prevedono la sintesi delle sue micorrize in condizioni controllate, lo studio delle variazioni di espressione genica e morfologica dei miceli sottoposti a stress ambientali, ecc.



# Capitolo 4

## 4. Miglioramento dello sviluppo del micelio di *T. magnatum*

### 4.1. Introduzione

Il requisito principale che deve possedere una specie fungina per essere impiegata sperimentalmente in laboratorio, riguarda la sua capacità di produrre biomassa su substrati sintetici o semisintetici, in condizione perfettamente definite e facilmente riproducibili. Il suo sviluppo vegetativo dovrebbe essere abbondante e rapido per soddisfare tutte le esigenze operative. Infatti, un micelio che cresce lentamente e con ridotta densità ifale, non permette d'ottenere una quantità di biomassa sufficiente per produrre degli inoculi in grado di infettare piante. Proprio quest'ultimo fenomeno è una delle causa principali d'insuccesso della micorrizzazione delle piante con le specie del genere *Tuber*. Una limitata quantità di micelio non permette inoltre sia di estrarre sufficiente quantità di DNA o RNA necessari per applicare tutta una serie di studi molecolari e fisiologici.

Le scarse conoscenze sul metabolismo di *Tuber* spp, rappresentano il limite principale all'utilizzo sperimentale della maggior parte delle specie appartenenti a questo genere. Infatti, sono pochi i lavori che hanno esplorato le preferenze nutrizionali di queste specie, sia per la mancanza di disponibilità del micelio, sia per le difficoltà di mantenerlo stabilmente in coltura. I funghi micorrizici ricevono la maggior parte dei carboidrati dalla pianta come glucosio e fruttosio (Nehls, 2008) e di conseguenza questi zuccheri sono spesso comunemente utilizzati per il loro sviluppo *in vitro*. Altri studi hanno dimostrato che anche altri zuccheri, come saccarosio e mannosio, sono in grado di far sviluppare il micelio di molti funghi ectomicorrizici come *T. melanosporum* (Palmer e HacsKaylo, 1970).

Le notevoli difficoltà nell'isolare i miceli di *T. magnatum* hanno ulteriormente ostacolato la ricerca sul metabolismo di tale specie. Scopo di questo lavoro è stato quello di testare per la

prima volta la capacità di sviluppo del micelio di *T. magnatum* in differenti condizioni di substrato.

## **4.2. Materiali e metodi**

### **4.2.1. Ceppo fungino**

Il ceppo di *T. magnatum* impiegato in questa prova sperimentale è stato il Tmg5, isolato con successo nella precedente fase sperimentale.

### **4.2.2. Condizioni di coltura**

Gli inoculi utilizzati nelle prove di accrescimento sono stati ottenuti da colture mantenute e moltiplicate su WPM modificato già descritto in precedenza. Tali colture sono state moltiplicate per circa 1 anno tramite successive frammentazioni delle piccole masserelle miceliari per poter avere sufficienti quantità di inoculi (ciascuno di diametro pari a circa 0.5-1 mm). Per verificare le migliori condizioni di sviluppo miceliare, Tmg5 è stato fatto sviluppare su WPM modificato la cui variabile era rappresentata dalla componente zuccherina utilizzata. In particolare sono stati testati alcuni degli zuccheri che hanno fornito “performance” migliori fra quelli già impiegati nelle prove di sviluppo miceliare di altre specie di tartufo (Iotti *et al.*, 2002), come mannosio, mannitolo, glucosio, fruttosio oltre a ribosio, cellobiosio e saccarosio quest’ultimo considerato come testimone perchè impiegato nel mantenimento dei ceppi di *T. magnatum*.

Inoltre, sono state saggiati anche diversi aminoacidi (L-fenilalanina e L-serina) e 1-Triacontanol (TRIA), composto utilizzato da Selegean (2009), avente ha un effetto stimolante sulla crescita ifale di *T. brumale*. Queste sostanze sono state aggiunte al mezzo nutritivo testimone in quantità di 0.1 g/L. Tutti i valori di pH (6.3) sono stati corretti prima della sterilizzazione in autoclave effettuata per 20 minuti a 120 °C. Ciascuna tesi sperimentale era composta da 5 ripetizioni in altrettante piastre petri di 6 cm di diametro (12 ml di substrato ciascuna) ed ogni prova è stata ripetuta due volte per confermarne i risultati. Poiché le tesi sperimentali erano numerose in rapporto alla disponibilità dell’inoculo, le

prove sono state condotte in fasi successive e le masserelle miceliari sviluppatasi in ciascuna serie di prove è stata riciclata per quella successiva. Le scatole Petri sono state sigillate con PARAFILM® e mantenute in termostato, all'oscurità, ad una temperatura di 22 °C. Ogni settimana venivano osservate sia ad occhio nudo sia allo stereomicroscopio per verificare lo sviluppo miceliare.

### **4.3. Risultati e discussione**

Nessuno degli zuccheri o delle altre sostanze aggiunte al mezzo nutritivo ha prodotto apprezzabili accrescimenti rispetto alla tipologia di sviluppo delle colonie descritta nel precedente capitolo. In tutte le tesi sperimentali, infatti, le colonie hanno mantenuto un tipico aspetto globulare e lo sviluppo diametrico non ha mai superato i 2 mm. Solamente in alcune ripetizioni contenenti mannosio, Tmg5 ha assunto un accrescimento radiale più marcato con ife sviluppatasi anche sulla superficie del mezzo nutritivo agarizzato. Comunque, questo comportamento non è stato confermato nella prova successiva e gli inoculi miceliari ottenuti nelle zone periferiche di queste colonie non sono stati in grado di svilupparne delle nuove. Tuttavia, questo dato conferma che il mannosio è una delle fonti di carbonio organico più efficaci nello stimolare lo sviluppo dei miceli delle specie di tartufi (Iotti *et al.*, 2002, Mamoun e Olivier, 1991) anche se non è stato risolutivo per migliorare l'accrescimento di *T. magnatum*. Anche la morfologia miceliare delle colonie sviluppatasi nelle diverse tesi sperimentali non mostrava sostanziali modifiche, sia per l'entità della ramificazione e del diametro ifale sia per la formazione di anastomosi e vescicole.

Lo sviluppo del micelio di *T. magnatum*, seppur limitato, è migliore in presenza degli stessi zuccheri utilizzati da altre specie di tartufi per la crescita dei loro miceli (Iotti *et al.*, 2002). In particolare, dall'analisi degli accrescimenti si può dedurre che *T. magnatum* dovrebbe possedere un invertasi attiva come *T. melanosporum* (Ceccaroli *et al.*, 2011) ed altri *Tuber* spp. ad eccezione di *T. borchii* (Ceccaroli *et al.* 2011). Questo enzima non è molto frequente

fra i funghi ectomicorrizici (Hacskeylo, 1973) ma particolarmente diffuso fra le specie di tartufo.

#### **4.4. Conclusioni**

Fino a oggi, non erano mai state verificate le esigenze nutrizionali di *T. magnatum*. Quelli eseguiti in questa prova sono stati i primi tentativi di mettere a punto un mezzo idoneo per lo sviluppo in coltura pura del micelio di questa importante specie di tartufo. Anche se non sono stati ottenuti risultati incoraggianti questo lavoro può rappresentare una base di partenza per applicare approcci differenti e raggiungere questo obiettivo. Il micelio di questa specie è molto diffuso nel suolo naturale più di quanto si possa presumere dalla frequenza dei punti di raccolta dei suoi corpi fruttiferi o dall'abbondanza delle sue micorrize (Iotti *et al.*, 2012, Leonardi *et al.*, 2013). La capacità di vivere come saprotrofo nel suolo è stata ipotizzata (Barbieri *et al.*, 2010) ma contrasta con le difficoltà di farlo crescere *in vitro* su mezzi sintetici o semisintetici. Murat e colleghi (2005) hanno suggerito che il rapporto simbiotico fra *T. magnatum* e la pianta ospite in condizioni naturali possa anche non richiedere la formazione di ectomicorrize ben differenziate nonostante esso sia capace di formarle (Mello *et al.*, 2001; Rubini *et al.*, 2001). Altre ipotesi suggeriscono che possa vivere in simbiosi tripartite con altri funghi o microorganismi oltre alla pianta ospite (Leonardi *et al.*, 2013), comportarsi come un endofita seguendo l'esempio delle specie di *Terfezia*, i cosiddetti "tartufi del deserto" (Morte *et al.*, 2000), oppure formare altre tipi di simbiosi come mostrato per altre specie di tartufi o per le Sebacinaceae (Selosse *et al.*, 2002). In ogni caso, per stimolarne lo sviluppo del micelio sono necessarie una o una serie di composti chimici presenti nel suolo o prodotti da una pianta ospite od un altro microrganismo simbiote. Non necessariamente potrebbe trattarsi di una fonte di carbonio particolare per alimentare il suo metabolismo ma di molecole segnale che fungano da interruttore per lo sviluppo miceliare e l'utilizzazione degli zuccheri che ha a disposizione.



# Capitolo 5

## 5. Effetto degli estratti radicali e degli essudati miceliari sullo sviluppo dei miceli di *T. magnatum* e *T. borchii*

### 5.1. Introduzione

I funghi, come tutti gli esseri viventi, necessitano di carboidrati in quanto queste sostanze vengono impiegate come metaboliti per la sintesi dei componenti cellulari e come fonte energetica per alimentare i processi metabolici. I principali idrati di carbonio a disposizione del fungo a livello radicale sono quelli presenti negli essudati radicali delle piante ospite. Questi hanno una struttura chimica diversa a seconda della specie che li produce e sono fondamentali per la formazione delle simbiosi micorriziche. Molti studi hanno confermato il ruolo importante di queste sostanze secrete dalle radici delle piante ospiti per la stimolazione della crescita e della ramificazione ifale (Nagahashi e Douds, 2000; Buee *et al.*, 2000). Sun *et al.* (2012) hanno dimostrato che gli essudati radicali hanno un ruolo determinante già nella fase di riconoscimento tra la pianta ospite e i funghi micorrizici arbuscolari ed agiscono come segnali molecolari stimolando la crescita ifale. Oltre alle molecole rilasciate dalla pianta anche quelle secrete da alcune specie fungine durante la loro fase vegetativa possono avere un effetto positivo sullo sviluppo del micelio di altri funghi o microrganismi. Fraccia *et al.* (2004) hanno dimostrato che gli essudati miceliari di *Aspergillus niger* e *Penicillium restrictum* hanno un effetto stimolante sulla germinazione delle spore e la crescita ifale di *Glomus mosseae* e *Gigaspora rosea* e sulla colonizzazione delle radici da parte di queste specie. Studi eseguiti da Toljander *et al.* (2007) hanno confermato l'effetto positivo degli essudati prodotti del micelio dei funghi micorrizici arbuscolari (AM) sulla crescita e lo sviluppo *in vitro* di batteri. In passato si supponeva che *T. magnatum* subisse una forte competizione da parte delle altre specie di tartufo (in particolare i tartufi bianchi) per occupare gli "spazi" liberi sulle radici delle piante o colonizzare il suolo con i rispettivi

miceli. I più recenti studi condotti nelle tartufaie naturali con metodi molecolari hanno invece dimostrato che nei punti dove si raccolgono gli ascomi di *T. magnatum* spesso sono presenti anche altri tartufi come *T. maculatum*, *T. rufum* e *T. borchii*, sia come micorriza sia come micelio libero nel suolo (Zampieri *et al.*, 2010; Leonardi *et al.*, 2013; Iotti e Zambonelli, 2006). Anche le micorrize di *Sebacina* spp. spesso vengono trovate in corrispondenza dei punti produttivi del tartufo bianco pregiato (Murat *et al.*, 2005). Questo comportamento potrebbe far supporre che *T. magnatum* possa trarre beneficio per il suo sviluppo o la sua riproduzione dalla presenza di altre specie di tartufi o altre specie fungine.

Lo scopo di questa parte della tesi è stato quello di verificare l'effetto degli estratti radicali ottenuti da piantine di nocciolo sullo sviluppo del micelio di *T. borchii*. Quest'ultima specie è stata utilizzata come specie di confronto per la sua facilità di sviluppare *in vitro*. Inoltre, per controllare l'effetto che il micelio di altre specie di tartufi possono avere su quello di *T. magnatum* sono stati utilizzati essudati miceliari di *T. borchii*, *T. brumale* e *T. rufum*.

## **5.2. Materiali e metodi**

### **5.2.1. Ceppi fungini e materiale vegetale**

Per questa sperimentazione sono stati impiegati il ceppo Tmg5 (*T. magnatum*) e 17bo (*T. borchii*). Il micelio di *T. borchii* è stato mantenuto in coltura pura in piastre Petri contenenti 20g/l di Potato Dextrose Agar (PDA, Difco), fatte crescere al buio alla temperatura di 22°C. Le colture di questo ceppo sono state rinnovate ogni 60 giorni, prelevando dischetti di micelio dalle porzioni più esterne delle colonie in crescita e trasferendoli in nuove piastre contenenti PDA. Il micelio di *T. magnatum* è stato mantenuto come descritto nel capitolo 3.2.1. Gli estratti radicali sono stati ottenuti da piantine di nocciolo (*Corylus avellana* L.) micropropagate *in vitro*, prodotte dalla ditta Vitroplant (Cesena) che ha collaborato nella sperimentazione.

### **5.2.2. Preparazione dell'estratto radicale di nocciolo**

Per la preparazione dell'estratto radicale, 0,66 g di radici sono state lavate con acqua distillata, essiccate in stufa (60 °C per 2 ore) e polverizzate con azoto liquido ed un pestello. Tredici ml di etanolo 80% sono stati aggiunti alla polvere e la miscela è stata lasciata in agitazione per un'ora. Dopo una centrifugazione a 14.000 rpm per 10 minuti, il surnatante è stato recuperato. La procedura di estrazione è stata ripetuta per altre due volte risospendendo il pellet in 5 ml di etanolo 80% e lasciandolo in agitazione per 30 minuti. I surnatanti recuperati sono stati riuniti e portati a secco utilizzando una Savant Vacuum Concentrator (Savant Instruments). Infine l'estratto radicale è stato risolubilizzato in 1 ml di etanolo assoluto e conservato a 4 °C fino al momento del suo impiego.

### **5.2.3. Preparazione degli essudati miceliari di *Tuber* spp.**

Per la preparazione dell'estratto miceliare sono stati impiegati colture pure delle seguenti specie di *Tuber*: *T. brumale* (ceppo Tbr1), *T. borchii* (ceppo 17bo) e *T. rufum* (ceppo Tru1), in collezione presso il Centro di Micologia di Bologna (CMI-Unibo). I ceppi Tbr1 e Tru1 sono stati mantenuti in coltura su WPM modificato e rinnovati ogni 60 giorni.

Le colture liquide sono state preparate in boccetti contenenti 40 ml di WPM liquido addizionato di 10 g/L di glucosio inoculati con due dischetti (0.7 cm di diametro) d'agar infungato. Le colture sono state mantenute in termostato, all'oscurità, a 22 °C. Dopo 10 giorni (per 17bo) e 15 giorni (per Tbr1 e Tru1) di sviluppo sono state rimosse le colonie fungine ed il liquido di coltura è stato filtrato utilizzando Sterivex™ GP 0.22 µm Filter Unit (Millipore) e successivamente impiegato come mezzo nutritivo per *T. magnatum*. Sono state preparate 8 provette contenenti 10 ml di substrato liquido filtrato ottenuto da ciascuna delle tre specie di *Tuber* utilizzate oltre a 8 provette contenenti 10 ml di WPM liquido fresco.

Le provette sono state mantenute in termostato, all'oscurità, a 22 °C e controllate sia ad

occhio nudo sia allo stereomicroscopio (50 X) ogni 3-4 giorni. I nuovi accrescimenti sono stati valutati dopo un mese di coltura prelevando le masserelle di micelio dalla coltura liquida, disponendole su di un vetrino e misurando la loro nuova espansione radiale (dall'aspetto e colore del micelio si diversificano i nuovi accrescimenti dai vecchi) con un oculare graduato ad uno stereomicroscopio (50X). HGU e diametro ifale sono stati invece valutati al microscopio ottico come già riportato in precedenza.

#### **5.2.4. Prove di crescita del micelio di *T. borchii* e *T. magnatum* in substrato arricchito dell'estratto radicale di nocciolo**

Per valutare l'effetto dell'estratto radicale di nocciolo sullo sviluppo del micelio di *T. borchii*, sono state allestite delle prove di crescita in terreno PDA in tre condizioni di crescita differenti: i) TRATTATO CON GLI ESTRATTI (TE) (10 piastre), micelio cresciuto in presenza di 50 µl di estratto radicale di nocciolo eluito con etanolo; ii) testimone TRATTATO CON SOLVENTE (TS) (10 piastre), micelio cresciuto in presenza di 50 µl di etanolo assoluto; iii) TESTIMONE (T) (10 piastre), micelio cresciuto in assenza di estratto radicale e solvente. Le piastre sono state incubate a 22 °C al buio. L'HGU sono stati misurati dopo 10 giorni di sviluppo mentre il diametro delle colonie è stato valutato dopo 1 mese. Per ciascuna condizione testata 5 piastre sono state destinate all'analisi morfologica e le restanti sono state utilizzate per l'analisi molecolare. In queste ultime il micelio è stato fatto crescere separato dal terreno da un disco di *cellophane*.

#### **5.2.5. Analisi morfologica dei miceli di *T. borchii* cresciuti con l'estratto radicale di nocciolo**

L'analisi morfologica del micelio trattato con l'estratto radicale (TE) ed i rispettivi testimoni (TS, T) è stata effettuata 15 giorni dopo l'inoculo misurando il diametro delle colonie e l'indice di ramificazione ifale. Quest'ultimo è stato determinato scegliendo in ogni piastra tre ife periferiche nella zona più esterna della colonia. Le osservazioni sono state effettuate con

un microscopio ottico come descritto nel capitolo 3.2.2. La determinazione dei valori di accrescimento della colonie in ciascuna piastra é stata effettuata mediante la misurazione del diametro verticale (oa) e longitudinale (ob) una e due settimane dall'inoculazione.

#### **5.2.6. Analisi degli estratti radicali di nocciolo e raccolta delle frazioni mediante HPLC-DAD**

Gli estratti radicali di nocciolo sono stati analizzati mediante *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) nel laboratorio dell'Università di Urbino. Questa tecnologia è estremamente efficace e molto utilizzata per separare le diverse componenti chimiche di una soluzione e permetterne il riconoscimento qualitativo e quantitativo. L'HPLC si basa sulla distribuzione differenziale dei vari componenti fra due fasi, una chiamata *fase fissa* o *fase stazionaria* e l'altra chiamata *fase mobile* o *eluente*, che fluisce in continuo attraverso la fase fissa.



Per le analisi è stato utilizzato un sistema Beckman Coulter costituito da un modulo di pompe per i solventi (System Gold 126), un rivelatore ad assorbanza (System Gold 168 Diode Array) con un range di lunghezza d'onda compreso tra 190 e 600 nm (UV-visibile), con una valvola di iniezione BeckmanCoulter (modello Autex A210). La matrice cromatografica utilizzata è una colonna Supelco C18 con particelle di 3µm (lunghezza 150 mm, diametro 4.6 mm) equipaggiata con una guard column Supelco (Supelguard, lunghezza 2cm). Per l'analisi sono stati usati, come solventi, acqua bidistillata (solvente A) e acetonitrile (solvente B) e l'eluizione è stata eseguita ad un flusso di 1 ml/min secondo un gradiente così strutturato:

- 0% di solvente B per 10 min
- da 0% a 40% di solvente B in 30 min
- dal 40% al 80% di solvente B in 5 min
- 80% di solvente B per 5 min
- dal 80% al 0% di solvente B in 1 min

Terminata l'eluizione la colonna è stata riequilibrata in acqua prima della successiva analisi.

Gli estratti sono stati risospesi in acqua bidistillata e, prima dell'iniezione in colonna, sono stati filtrati con filtri da siringa con pori di diametro 0,2  $\mu\text{m}$ . Il volume dei campioni analizzati era di 450  $\mu\text{l}$ .

I dati cromatografici sono stati salvati e analizzati utilizzando il *software* 32 Karat (Beckman Coulter). Sulla base dell'elettroferogramma ottenuto sono state raccolte sei frazioni impiegate successivamente per le prove di crescita sui miceli di *T. borchii*, come descritto nel paragrafo successivo.

### **5.2.7. Prova di crescita di *T. borchii* con le frazioni dell'estratto radicale raccolte mediante HPLC**

Le singole frazioni dell'estratto radicale di nocciolo raccolte mediante HPLC sono state portate a secco nella Savant Vacuum e risospese in 350  $\mu\text{l}$  di etanolo assoluto. In tal modo la concentrazione dei composti presenti in ogni frazione è identica a quella nell'estratto iniziale. Per ogni frazione sono state allestite 7 piastre di PDA con il micelio di *T. borchii* cresciuto in presenza di 50  $\mu\text{l}$  di frazione risospesa. Per il testimone con solvente ed il testimone sono state preparate rispettivamente 7 piastre con micelio cresciuto in presenza di 50  $\mu\text{l}$  di etanolo assoluto, e 7 piastre con il micelio cresciuto in assenza di frazioni risospese e solvente. Le piastre sono state incubate a 22°C al buio per 10 giorni. Per ciascuna condizione testata 3 piastre sono state destinate all'analisi morfologica e le restanti sono state utilizzate per l'analisi molecolare. In queste ultime il micelio è stato fatto crescere separato dal terreno da un disco di *cellophane*.

### **5.2.8. Analisi morfologiche dei miceli di *T. borchii* con le frazioni dell'estratto radicale raccolte mediante HPLC**

L'analisi morfologica dei miceli con le frazioni dell'estratto radicale è stata eseguita analizzando i parametri indicatori della crescita ifale precedentemente descritti: accrescimento diametrico della colonia e HGU. In aggiunta è stato calcolato il diametro delle ife e la distanza fra i setti. Il diametro delle ife è stato determinato al microscopio ottico Laborlux 12 Leitz (320X). Tale misurazione è stata effettuata su tre piastre, per ciascuna delle quali sono stati misurati i diametri di 30 ife, facendo attenzione di scegliere quelle più esterne e di misurare il diametro dopo la prima ramificazione. La distanza fra i setti è stata misurata tra quattro setti contigui di 10 ife, scelte nella stessa zona dove sono stati misurati i diametri ifali.

### **5.2.9. Elaborazione statistica dei risultati dell'analisi morfologica**

I dati ottenuti dall'analisi morfologica sono stati analizzati statisticamente mediante ANOVA e le medie sono state confrontate mediante il Tukey test ( $p \leq 0,05$ ) utilizzando il programma XL STAT.

### **5.2.10. Analisi molecolari dei miceli di *T. borchii* trattati con gli estratti radicali di nocciolo e con le singole frazioni dell'estratto**

Per eseguire le analisi molecolari sono stati utilizzati i miceli cresciuti nelle piastre Petri separati dal terreno PDA da un filtro di *cellophane*.

#### **5.2.10.1. Prelievo dei miceli ed estrazione dell'RNA totale**

Terminato il periodo di incubazione per ciascuna colonia è stata prelevata la porzione più esterna, immersa in 400  $\mu$ L di soluzione RLC (RNeasyPlant Mini Kit, Qiagen) e conservata a -80 °C. Al momento dell'utilizzo i campioni sono stati scongelati, omogenati in ghiaccio

secco e l'RNA è stato estratto utilizzando il kit RNeasyPlant Mini Kit (Qiagen) seguendo il protocollo della ditta produttrice.

#### **5.2.10.2. Sintesi del cDNA**

Gli estratti di RNA sono stati trattati con Dnase I (Ambion), e dosati al Nanodrop. Per ciascun campione ad un volume corrispondente a 1 µg di mRNA è stata aggiunta la miscela di primer oligo-dT 1µM (PROMEGA) ed è stato portato a 15 µL con acqua RNase-free. Dopo un'incubazione di 2 minuti a 65 °C sono stati aggiunti 5 µL di mix contenente: Buffer RT 1X, dNTPs 0,5 mM e 4 unità di trascrittasi inversa Omniscript. La reazione di retrotrascrizione è stata condotta alla temperatura di 37 °C per 60 minuti, seguita da una fase di inattivazione a 72 °C per 10 minuti. Infine i campioni di cDNA ottenuti sono stati diluiti aggiungendo 20 µL di acqua DEPC e successivamente conservati a – 20 °C.

#### **5.2.10.3. Real time PCR**

Nelle analisi di real time PCR, l'rRNA 18S di *T. borchii* è stato utilizzato come standard interno e coppie di primer specifici per i target *CDC42* e *Rho-GDI* sono stati impiegati per studiare la variazione di espressione genica di tali geni (tabella.4). La PCR è stata eseguita in un termociclatore StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystem) alle seguenti condizioni di amplificazione: 95 °C per 20 s seguiti da 40 cicli composti da un primo step a 95 °C per 3 s ed un secondo step a 60 °C per 30 s. Ogni reazione di 20 µL è stata assemblata con le seguenti concentrazioni finali dei reagenti: Fast SYBR ®Green Master Mix (Applied Biosystem) 1X, primer forward e reverse 500 nM, 1 µL di cDNA. La specificità dei prodotti di amplificazione ottenuti è stata confermata attraverso l'analisi delle curve di Melting e successiva analisi elettroforetica in gel d'agarosio al 3%. La quantità di trascritto target è stata messa in relazione con quella del gene di riferimento attraverso il metodo del  $\Delta C_t$  ( $C_t$

gene riferimento – Ct 18S) secondo il quale all'aumentare del valore diminuisce il livello di espressione del gene.

**Tabella. 4-** I primer utilizzati per studiare l'espressione dei geni *CDC42* E *RhoGDI* in real time PCR

TARGET	PRIMER	SEQUENZA	LUNGHEZZA AMPLIFICATO (bp)
<i>rRNA 18S</i>	TB18F TB18R	5' - ACTGGTCCGGTCGGATCTT - 3' 5' - TTCAAAGTAAAAGTCCTGGTTCCC - 3'	80
<i>CDC42</i>	RT_cdf2 RT_cdr1	5' – CAGCCGTCAAGTATGTCGAA - 3' 5' – TGTAGTGTAGGGGCTCCAG - 3'	65
<i>RhoGDI</i>	RT_gdif2 RT_gdir2	5' – ATCCACCACCGAAGGATACA - 3' 5' – TCTCCAAGAGAGCCACCAGT - 3'	141

### 5.3. Risultati e Discussione

#### 5.3.1. Analisi morfologiche dei miceli di *T. magnatum* incubato nell'estratto miceliare

L'impiego degli essudati miceliari ha fornito risultati interessanti soprattutto con quelli ottenuti dalle colture di *T. brumale*. Nuovi significativi accrescimenti oltre l'inoculo iniziale sono stati ottenuti nei primi 10 giorni dalle colonie di Tmg5 inoculate nel mezzo liquido in cui precedentemente si era sviluppato *T. brumale*. Durante questo lasso di tempo nei substrati ottenuti da *T. borchii* e *T. rufum* sono stati rilevati accrescimenti miceliari non differenti da quelli delle tesi testimone. Comunque, dopo 1 mese di sviluppo, dalle colonie delle varie tesi sperimentali analizzate al microscopio ottico, non sono state rilevate differenze statisticamente significative per lo sviluppo, la ramificazione ed il diametro ifale (Tab. 5) anche se il testimone presentava colonie mediamente meno sviluppate radialmente. Un effetto positivo sullo sviluppo del micelio di *T. magnatum* da parte di altri miceli di *Tuber* sembra esserci, seppur poco evidente e per ora difficilmente interpretabile. In particolare questo effetto sembra maggiormente indotto da *T. brumale* che normalmente, nel suolo in pieno campo, non occupa le stesse nicchie di sviluppo di *T. magnatum* (Leonardi *et al.*, 2013). Questo potrebbe essere anche dovuto ad un effetto di competizione fra queste due

specie che funzionerebbe da stimolo per il micelio di *T. magnatum* ad occupare lo spazio disponibile. Comunque gli essudati miceliari delle altre specie di tartufo non hanno alcun effetto inibente nei confronti del micelio del tartufo bianco pregiato.

Diversi studi hanno dimostrato l'esistenza di un rapporto diretto fra i funghi e la fruttificazione del genere *Tuber* (Zacchi *et al.*, 2003). Inoltre la co-presenza di altre specie di *Tuber* nelle tartufaie di tartufo bianco, spesso nei punti di ritrovamento dei suoi corpi fruttiferi (Leonardi *et al.*, 2013), potrebbe avere un significato ancora sconosciuto ma molto importante nella biologia di *T. magnatum*. Da questo studio in campo si nota che alcune specie fungine ectomicorriziche che accompagnano *T. magnatum* potrebbero influire positivamente sulla sua diffusione nelle tartufaie naturali ed addirittura favorirne la fruttificazione.

**Tabella. 5-** Dati biometrici del micelio e di sviluppo radiale delle colonie di *T. magnatum* sviluppatesi in colture liquide precedentemente inoculate con tre specie di *Tuber* e in WPM liquido fresco

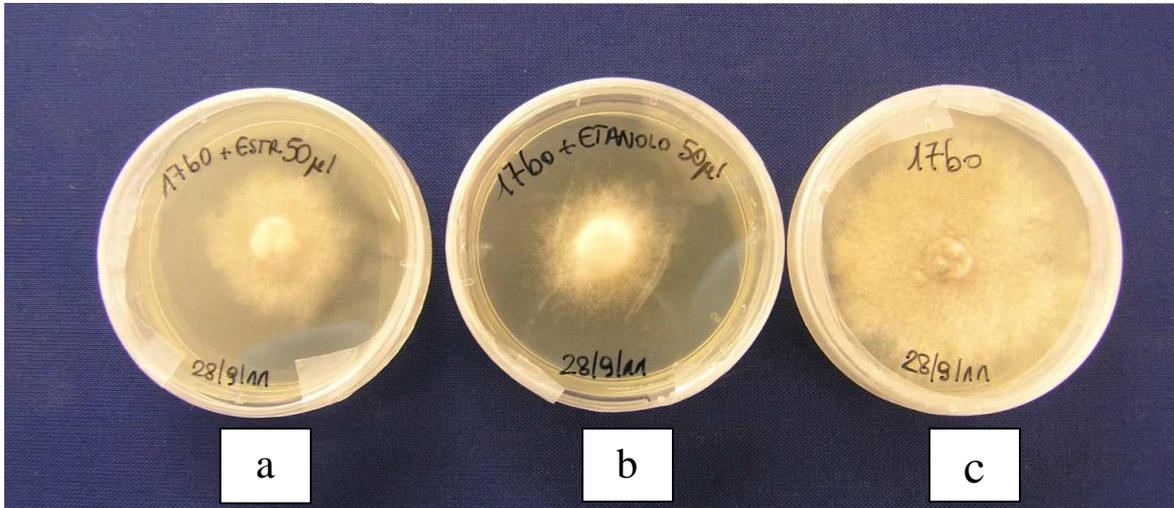
Colture liquide	Sviluppo radiale ( $\mu\text{m}$ ) <sup>†</sup>	HGU ( $\mu\text{m}$ )	Diametro ifale ( $\mu\text{m}$ )
<i>T. brumale</i>	610	28.61	3.57
<i>T. rufum</i>	580	20.2	3.31
<i>T. borchii</i>	560	25.5	3.74
WPM liquido fresco	550	24.41	3.54

<sup>†</sup>distanza misurate come nuovi accrescimenti delle masserelle miceliari estratte dalle colture liquide

### 5.3.2. Analisi morfologiche dei miceli di *T. borchii* trattati con l'estratti radicali di nocciolo

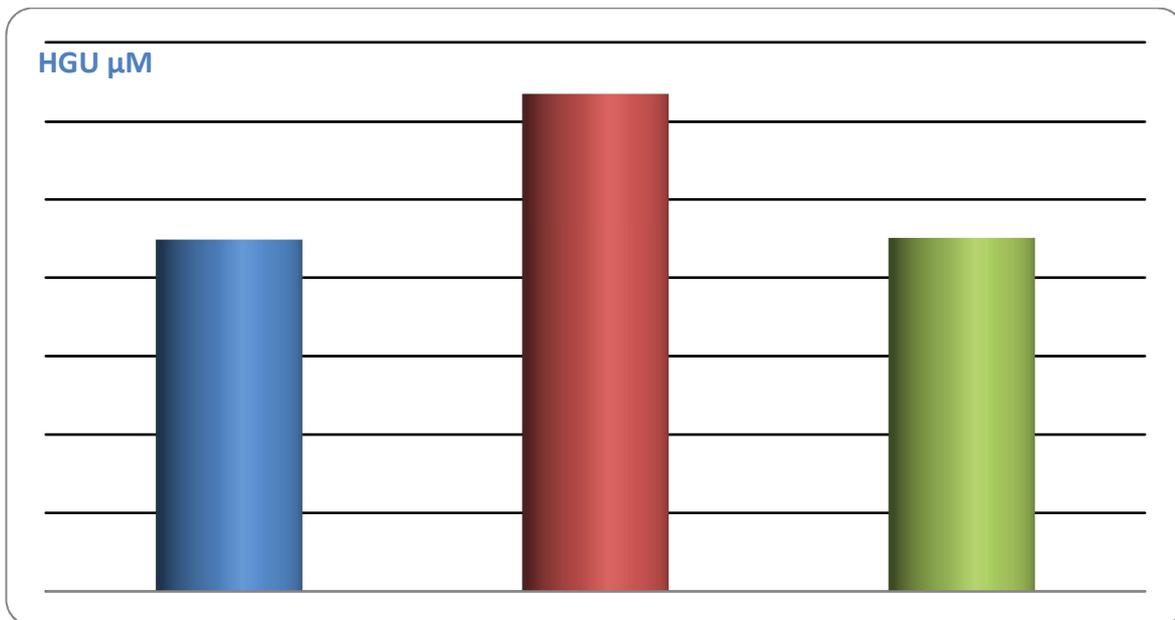
Dalle osservazioni ad occhio nudo, i miceli di *T. borchii* cresciuti nelle piastre TE (estratto) mostravano un accrescimento maggiore di quelli cresciuti nelle piastre TS (solo solvente) (fig. 8). Solamente le colonie testimoni (T) hanno mostrato uno sviluppo miceliare superiore alle altre tesi, indice che il solvente utilizzato (etanolo) ha un forte potere inibente. Tutte le

differenze di sviluppo sono risultate statisticamente significative ed in media, il diametro delle colonie del testimone T era di 4.7 cm, mentre per testimone TS di 2.5 cm e per il trattato TE di 3.1cm.



**Fig. 8-** Miceli di *T. borchii* cresciuti in presenza di estratto radicale di nocciolo dopo un mese di sviluppo. a) micelio con estratto radicale, b) controllo con il solvente, c) Testimone.

Questi risultati sono stati confermati dalle analisi biometriche al microscopio ottico. Infatti l'indice HGU dei miceli cresciuti nel substrato TE risultava significativamente inferiore (in media 448) rispetto a quello del testimone TS (635) ma simile a quello del testimone T (450). Tale risultato coincide con l'osservazione iniziale poiché, più l'indice di accrescimento ifale è basso, più il micelio è ramificato e quindi più denso (fig.9). Questo valore è stato dimostrato essere un utile indicatore dell'accrescimento miceliare di *T. borchii* direttamente correlato anche con l'espressione dei geni coinvolti nello sviluppo ifale, nella detossificazione e del metabolismo generale (Amicucci *et al.*, 2010).



**Fig. 9-** Valori medi dell'indice di accrescimento ifale del micelio di *T. borchii* trattato con estratto radicale e con solvente

### 5.3.3. Analisi morfologiche dei miceli di *T. borchii* trattati con le frazioni dell'estratto radicale raccolte mediante HPLC

Le indagini morfologiche condotte sui miceli di *T. borchii* cresciuti in un terreno arricchito con le frazioni dell'estratto radicale raccolte mediante HPLC, hanno evidenziato un loro effetto stimolante sullo sviluppo ifale del fungo (Tabella 6). In particolare, nelle tesi trattate, è stato evidenziato un HGU medio dei 6 diversi tipi di estratti (356) significativamente inferiore al valore medio di quello dei miceli del testimone TS (570) e del testimone T (506). Tutte le frazioni ottenute dagli estratti radicali impiegati in questa prova hanno un effetto positivo sulla ramificazione miceliare di *T. borchii* senza alcuna differenza statisticamente significativa fra di loro. Per quanto riguarda il diametro ifale, invece, sono state trovate differenze statisticamente significative più controverse. Solo nella piastre addizionate della frazione 3 è stato osservato uno sviluppo significativamente superiore rispetto i valori medi dei miceli del testimone trattato con solvente e quelli cresciuti in substrati addizionati con le frazioni 2, 4, 5 e 6. Infine per quanto riguarda la distanza tra i setti non sono state evidenziate differenze statisticamente significative. Durante la prima settimana è stato identificato un

maggiore sviluppo del diametro delle colonie solo nella piastre addizionate della frazione 2, rispetto al testimone con solvente. Per tale frazione l'effetto sullo sviluppo diametrale si esauriva già nella seconda settimana. Comunque alla seconda settimana, tutti le colonie sviluppate su tutte le frazioni, presentano un diametro superiore rispetto al testimone TS ma inferiore a quello senza solvente (T) (Tabella 6).

**Tabella 6.** Valori medi di indice di ramificazione ifale, diametro delle ife, distanza tra i setti e diametro colonia dei miceli di *T. borchii* arricchite con le frazioni dell'estratto radicale (TE) e dei rispettivi controlli (TS e T). Valori seguiti da lettere diverse differiscono statisticamente tra loro ( $p \leq 0,05$ ).

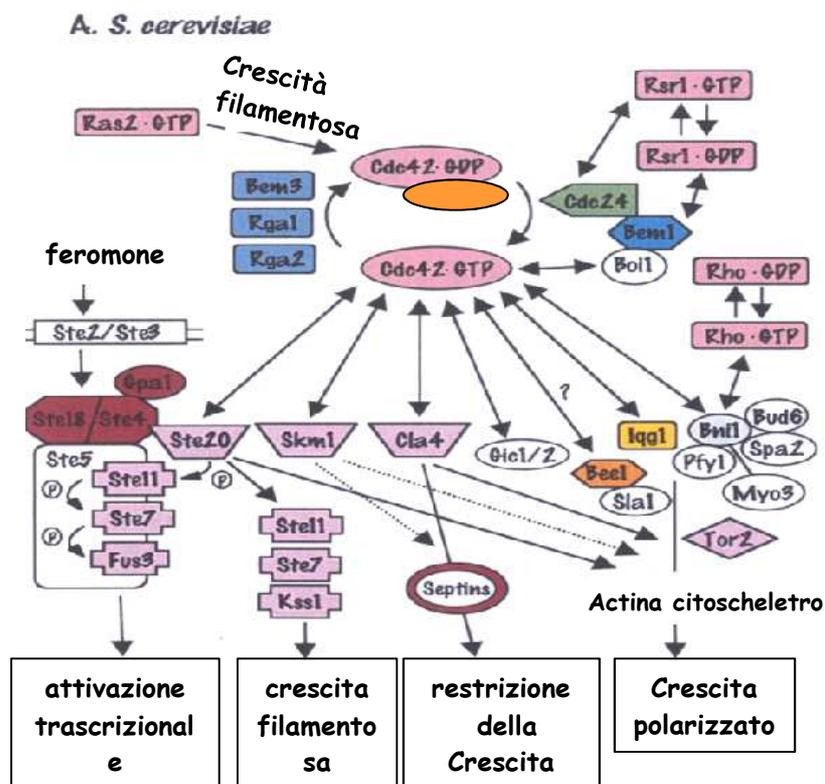
	HGU*	Diametro ifale ( $\mu\text{m}$ )	Distanza tra i setti ( $\mu\text{m}$ )	Diametro colonia (cm)	
				1 Settimana	2 Settimana
<b>Frazione 1</b>	367,887 c	5,978 ab	60,744 a	1,100 ab	2,367 b
<b>Frazione 2</b>	344,046 c	5,770 b	72,776 a	1,200 a	2,167 bc
<b>Frazione 3</b>	359,605 c	6,465 a	67,160 a	1,167 ab	1,833 bc
<b>Frazione 4</b>	367,582 c	5,885 b	63,318 a	1,167 ab	2,067 bc
<b>Frazione 5</b>	351,830 c	5,766 b	58,832 a	1,133 ab	2,267 b
<b>Frazione 6</b>	347,298 c	5,816 b	77,103 a	1,067 ab	2,000 bc
<b>Testimone 7</b>	506,508 b	5,978 ab	66,816 a	1,000 ab	3,133 a
<b>Testimone+etanolo8</b>	570,616 a	5,758 b	75,938 a	0,933 b	1,567 c

Da questo studio preliminare è possibile evidenziare che negli estratti radicali di nocciolo sono presenti sostanze che influiscono fortemente sulla morfologia del micelio. Molti studi effettuati su funghi endomicorrizici, hanno dimostrato la presenza di molecole segnale rilasciate dalla pianta ospite e che possono avere un effetto positivo di attrazione delle ife verso le radici e sulla loro ramificazione (Bécard *et al.*, 1995; Buee *et al.*, 2000). La stimolazione della crescita e la ramificazione ifale di funghi AM in simbiosi con la pianta sono stati descritti come uno dei primi eventi di riconoscimento durante la fase pre-simbiotica. Diversi autori hanno suggerito che i composti specifici contenuti negli essudati radicali hanno la capacità di stimolare la crescita ifale di funghi VAM (Bécard et Piché, 1990). Vi sono indicazioni che il fungo micorrizico possa riconoscere, come fanno i batteri

del gen. *Rhizobium*, delle sostanze liberate dalla radice con gli essudati radicali. Ipotesi quest'ultima che scaturisce dalla constatazione che alcune sostanze di origine vegetale, in particolare alcuni flavonoidi, favoriscono l'accrescimento dei funghi arbuscolari in coltura axenica (Tsai e Phillips, 1991). Ad esempio i flavonoidi possono essere coinvolti nella colonizzazione delle radice da parte dei funghi AM e svolgono un ruolo importante nella fase presimbiotica (germinazione delle spore, ramificazione ifale, ecc.) e durante la fase simbiotica (formazione dei punti di ingresso e la colonizzazione delle radice) (Morandi, 1996; Vierheilig *et al.*, 1998). Buée *et al.*, (2000) hanno dimostrato che la frazione semi purificata degli essudati radicali di *Daucus carota* L. ha un effetto notevole sulla germinazione delle spore di *Gigaspora gigantea*, *G. rosea*, e *G. margarita*. Altri studi hanno dimostrato che alcuni flavonoli agliconi possono stimolare notevolmente la crescita ifale di *G. margarita* (Bécard *et al.*, 1992; Chabot *et al.*, 1992). Alcuni studi effettuati utilizzando funghi ectomicorrizici (Sisti *et al.*, 2007) hanno evidenziato che la presenza di sostanze, probabilmente lipofile, nelle estratti radicale di *Tilia americana* L. influenzano notevolmente la morfologia del micelio di *T. borchii*. Altri studi hanno dimostrato che l'interazione *in vitro* fra *T. borchii* e *T. americana* senza che avvenisse un contatto fisico fra i due simbionti, si verificava uno scambio di molecole segnale responsabili della crescita apicale del fungo e dell'infezione dell'ospite (Menotta *et al.*, 2004). Le frazioni isolate dalle radici di nocciolo in questo caso hanno prodotto una maggior ramificazione dei miceli anche in assenza della pianta ospite, fenomeno tipico delle fasi pre-simbiontiche. Nonostante l'effetto inibente del solvente questo fenomeno è possibile verificarlo non solo nella morfologia miceliare ma anche nello sviluppo diametrico delle colonie, probabilmente indice di un aumento del metabolismo fungino quando viene simulata la presenza della pianta ospite.

### 5.3.4. Analisi molecolari dei miceli di *T. borchii* trattati con gli estratti radicali di nocciolo e con le singole frazioni dell'estratto

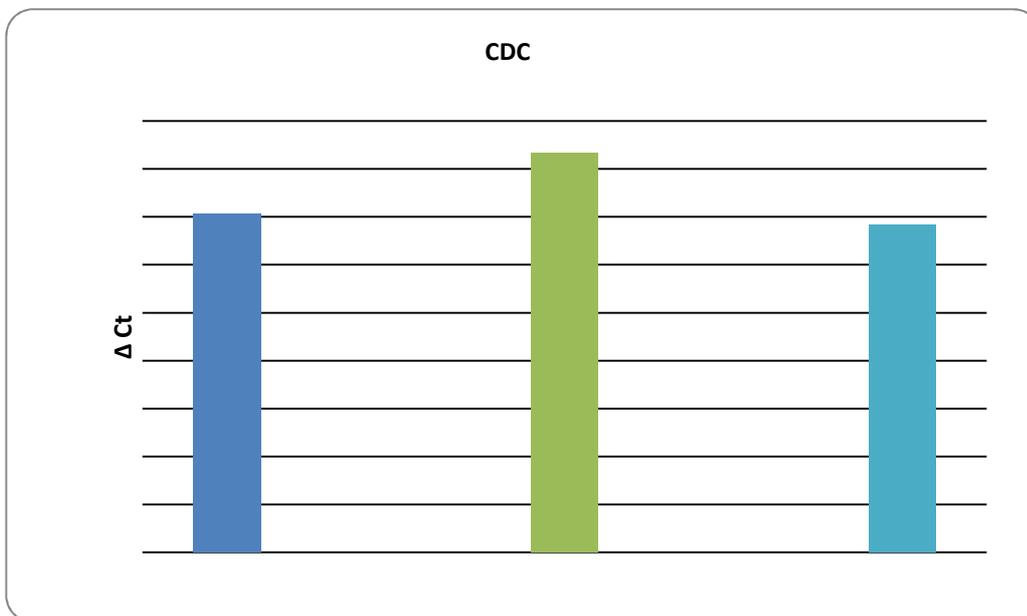
È noto dalla letteratura che la small GTPase-CDC42 è implicata nella crescita apicale polarizzata nei funghi filamentosi (Hazan *et al.*, 2002): nella sua forma attiva si lega alla membrana plasmatica con la coda isoprenica e la sua attivazione o disattivazione è regolata dalla proteina Rho-GDI. Quest'ultima può legarsi alla coda isoprenica di CDC42 sia quando questa è legata al GTP (forma attiva) sia quando è legata al GDP (forma inattiva) (Fig. 10).



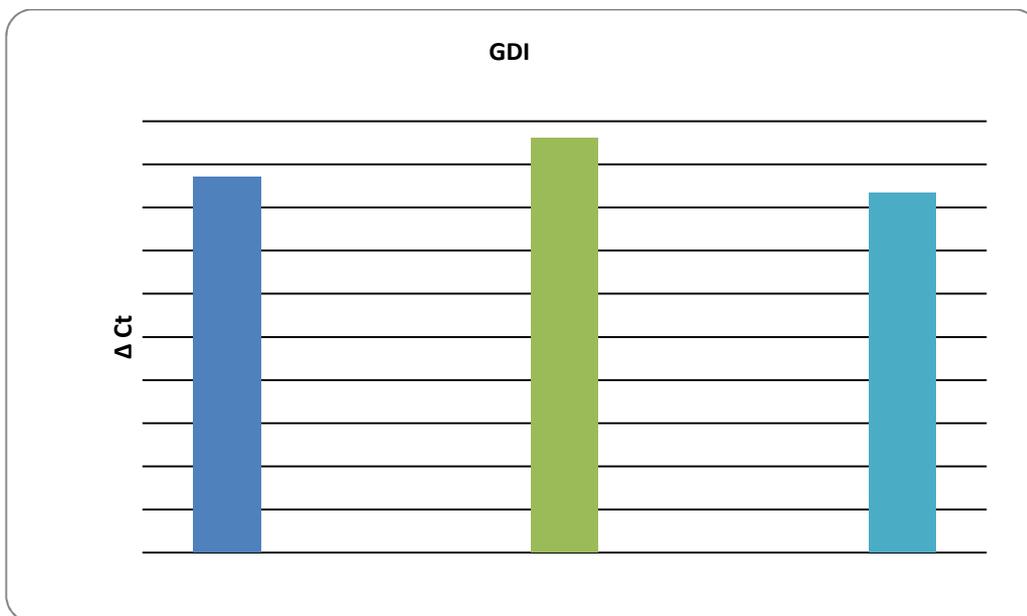
**Fig. 10-** TbCdc42 e TbRhoGdi in *Saccaromyces cerevisiae*

Lavori precedenti hanno evidenziato che in miceli di *T. borchii* l'espressione di questi due geni è sovra regolata in presenza della pianta ospite, degli essudati radicali e del glucosio (Menotta *et al.*, 2008; Menotta *et al.*, 2007; Amicucci *et al.*, 2010). In questa tesi indagini preliminari sono state condotte tramite real time PCR al fine di valutare possibili effetti di

estratti radicali di nocciolo sulla crescita ifale. Dai risultati ottenuti si può osservare che si assiste ad una maggiore espressione dei geni codificanti sia CDC42 sia RhoGDI rispetto ai testimoni con etanolo (Fig. 11 e 12).

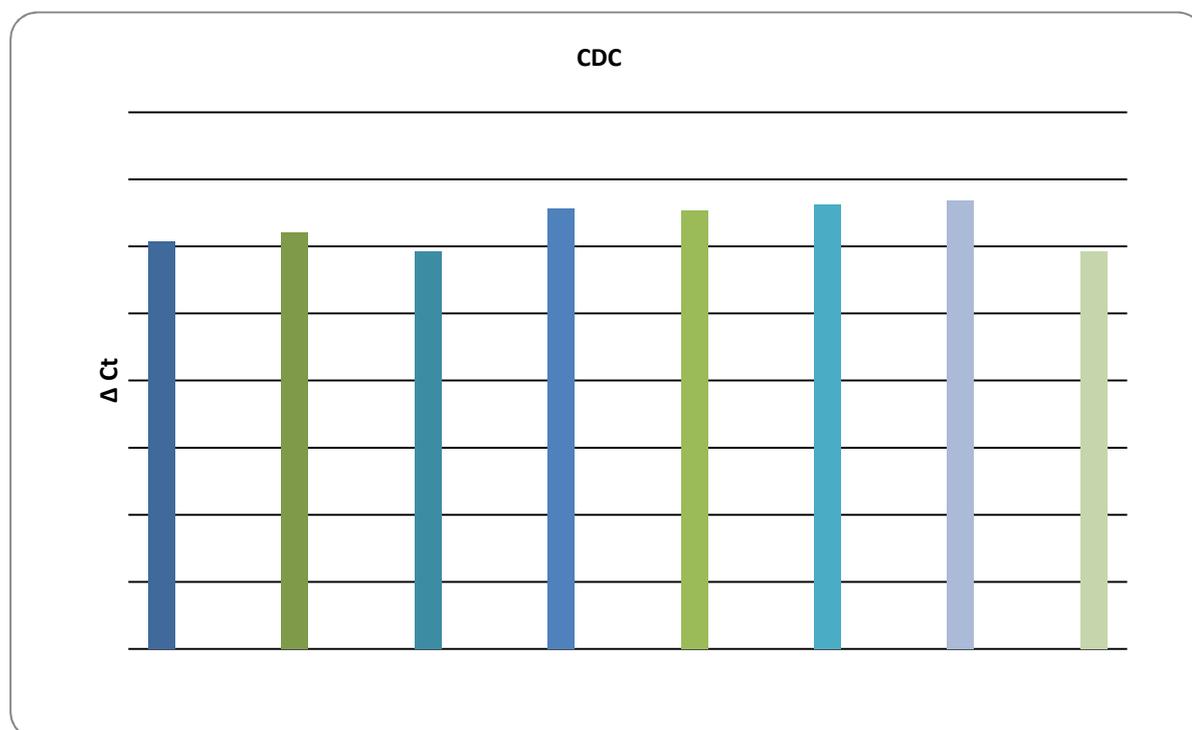


**Fig. 11** - Espressione del gene *CDC42* nel micelio di *T. borchii* cresciuti in presenza di estratto radicali di nocciolo ESTR (TE) e nei testimoni TS (ETOH) e T (TEST).

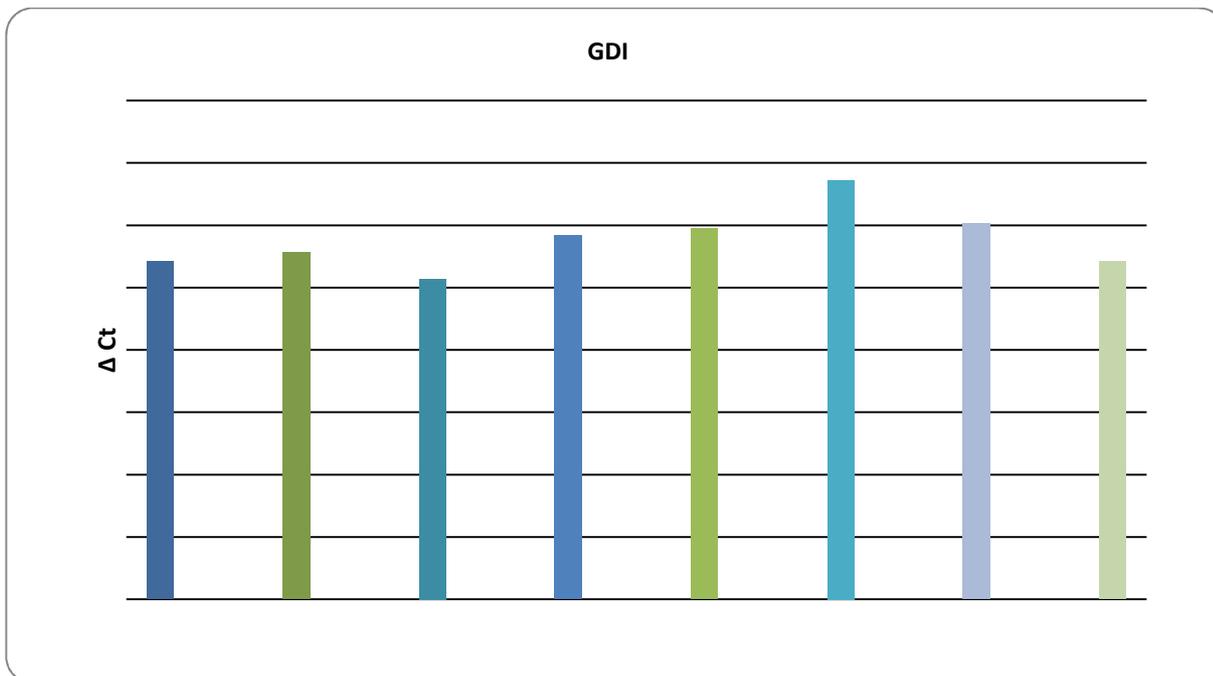


**Fig. 12** - Espressione del gene *Rho-GDI* nel micelio di *T. borchii* cresciuti in presenza di estratto radicali di nocciolo ESTR (TE) e nei testimoni TS (ETOH) e T (TEST).

Analogamente l'analisi dell'espressione dei geni *CDC42* e *Rho-GDI* è stata eseguita sui miceli cresciuti in presenza delle singole frazioni dell'estratto radicale, raccolte mediante HPLC. Come riportato nel (fig. 13 e 14) l'andamento dell'espressione è abbastanza variabile tra le diverse frazioni sia per gene *CDC42* sia per *Rho-GDI*. Per entrambi i geni, i valori di espressione misurate con i miceli cresciuti nelle frazioni 4, 5 e 6 non hanno manifestato differenze significative con il testimone TS. Contrario è stato per l'andamento per le frazioni 1, 2 e 3 dell'estratto radicale. In particolare la frazione 3, che le misure morfologiche attribuivano un diametro ifale significativamente superiore a quello delle altre tesi, mostra valori di espressione superiori a quelli ottenuti per le altre frazioni per entrambi i geni analizzati. Come evidenziato in parte anche dalle indagini morfologiche le singole frazioni degli estratti radicali analizzate in questo lavoro hanno effetti differenti sullo sviluppo miceliare di *T. borchii*.



**Fig. 13** - Espressione del gene *CDC42* del micelio di *T. borchii* trattato con le frazioni dell'estratto radicale raccolte mediante HPLC e nei testimoni TS (ETOTHER) e T (CONTR).



**Fig. 14-** Espressione del gene *Rho-GDI* nel micelio di *T. borchii* trattato con le frazioni dell'estratto radicale raccolte mediante HPLC, e nei testimoni TS (ETOHER) e T (CONTR).

## 5.4. Conclusioni

Ad oggi sono ancora sconosciuti i meccanismi responsabili del riconoscimento fra i funghi del genere *Tuber* e le sue piante ospiti. I dati preliminari ottenuti in questa tesi hanno evidenziato che la crescita dei miceli di *Tuber* è influenzata dalle sostanze presenti nelle radici poichè gli estratti radicali modificano la ramificazione e la morfologia ifale e la capacità di sviluppo di *Tuber*. I risultati ottenuti da questa prova rappresentano una base di partenza per ulteriori ricerche sull'espressione dei geni coinvolti nelle fasi di sviluppo miceliare pre-simbiontico e potranno ampliare il quadro di conoscenze riguardo i meccanismi di reazione del fungo in risposta a segnali emessi dalla pianta. Probabilmente il riconoscimento tra il fungo e l'ospite non è mediato da una singola molecola, ma piuttosto dall'azione sinergica di diversi composti, prodotti e rilasciati dalle radici della pianta, con effetto chemiotropico e stimolante sulle ife di *Tuber*. Tutto ciò potrebbe fornire utili indicazioni di notevole impatto applicativo per sviluppare le tecnologie di micorrizzazione che per certe specie di tartufi (*T. magnatum*) rappresentano il limite principale alla sua coltivazione.



## Capitolo 6

### 6. Produzione di piantine micorrizzate con *T. magnatum* ed altre specie di tartufo e studio della dinamica della colonizzazione radicale

#### 6.1. Introduzione

Il requisito fondamentale per la coltivazione di un fungo micorrizico edule è la messa a dimora in pieno campo di piantine il cui apparato radicale deve essere ben colonizzato con la specie fungina d'interesse. Ad eccezione di *T. magnatum*, per tutti gli altri tartufi di pregio (*T. melanosporum*, *T. aestivum*, *T. borchii*, *T. mesentericum*, ecc.) è possibile ottenere piantine micorrizzate su larga scala in vivaio, impiegando la tecnica d'inoculazione sporale. Questa possibilità ha notevolmente favorito la loro coltivazione, tanto da diffonderla oltre i confini dei paesi di origine (Francia, Italia e Spagna), sia nell'emisfero boreale sia in quello australe (Hall e Haslam, 2013; Lefevre, 2013; Wang, 2013). Oltre alle difficoltà d'isolarne e moltiplicarne i miceli, le spore di *T. magnatum* germinano con enorme difficoltà (Gregori, 2002; Karwa *et al.*, 2011) e ciò ha notevolmente ostacolato la possibilità di ottenere piantine adeguatamente micorrizzate con questa specie di tartufo, lasciandone sostanzialmente inalterato l'areale produttivo naturale. La difficoltà di ottenere micorrize di *T. magnatum* in condizioni controllate ha rappresentato anche un grosso ostacolo per la ricerca scientifica che inevitabilmente ne ha ostacolato i progressi cognitivi sulla sua biologia, fisiologia ed ecologia.

Lo scopo di questa parte sperimentale è stato quello di ottenere piantine micorrizzate con *T. magnatum* in condizioni controllate impiegando un inoculo sporale, sia per caratterizzarne morfologicamente le micorrize sia per verificarne il mantenimento e la dinamica di propagazione in vaso. Parallelamente, a scopo di confronto, sono state condotte prove di micorrizzazione utilizzando anche l'inoculo sporale di *T. oligospermum* ed inoculi miceliari di *T. borchii*. Entrambe queste specie possono rappresentare pericolose fonti d'inquinamento

quando si vogliono ottenere piantine micorrizzate di *T. magnatum* con il metodo sporale. Infatti, durante la preparazione dell'inoculo, che spesso si ottiene impiegando corpi fruttiferi immaturi o di scarsa qualità, ascomi di *T. oligospermum*, *T. borchii* o anche di altre specie di tartufi bianchi possono essere scambiati con quelli di *T. magnatum* e finire nella massa in preparazione. Queste specie di minor valore sono anche più aggressive ed occupano gli apparati radicali “vergini” dei semenzali prodotti in vivaio a discapito di *T. magnatum*. Altro scopo di questa prova è stato quello di valutare l'effetto dell'età del micelio sulla capacità di infettare le radici delle piante ospite. Questo è stato realizzato impiegando diverse colture pure di *T. borchii* isolate nel corso di più di 20 anni nel nostro laboratorio e mantenute in coltura continuata su substrato agarizzato.

## **6.2. Materiali e metodi**

### **6.2.1. Ceppi fungini e specie arboree**

Le prove di micorrizzazione sono state condotte impiegando l'inoculo sporale per *T. magnatum* e *T. oligospermum* e l'inoculo miceliare per *T. borchii*, mentre la specie ospite selezionata è stata *Quercus pubescens*. Gli ascomi di *T. magnatum* sono stati raccolti in Novembre 2010 a Valpiana (Pianoro) (peso totale 40 g), mentre quelli di *T. oligospermum* sono stati raccolti in Marocco nella foresta della Mormora (Rabat) nel 2010 (peso totale 52g). In laboratorio sono stati immediatamente lavati, sterilizzati in superficie tramite passaggio veloce alla fiamma e successivamente conservati in frigorifero a 4 °C, in sabbia sterile e umida all'interno di vasi di vetro richiusi con garza sterile, per un periodo di circa 2 mesi prima della preparazione dell'inoculo. I dati relativi ai 10 ceppi miceliari di *T. borchii* impiegati nella prova sono riportati in tabella 7. I miceli sono stati mantenuti tramite successive subculture rinnovate ogni 2 mesi circa su PDA, dal momento dell'isolamento fino a quello della prova.

**Tabella. 7-** Data d'isolamento, provenienza dell'ascoma ed età (anni) dei 10 ceppi miceliari di *T. borchii*

<b>Ceppo</b>	<b>Data di isolamento</b>	<b>Provenienza ascoma</b>	<b>Età (anni)</b>
<b>1Bo</b>	03/1997	Ravenna	15
<b>17Bo</b>	02/1987	Ravenna	25
<b>43Bo</b>	02/1997	Ravenna	15
<b>Tbo1/94</b>	03/1998	Ravenna	14
<b>Tbo2364</b>	03/2004	Riva (RO)	7
<b>Tbo2392</b>	03/2004	Pavia (PA)	7
<b>Tbo3035</b>	02/2006	Pomposa (FE)	6
<b>Tbo3067</b>	02/2006	Mesola ( FE)	6
<b>Tbo3840</b>	04/2010	Pianoro (BO)	1
<b>Tbo4284</b>	03/2010	Ferrara	1

I semi di *Q. pubescens* sono stati raccolti da un'unica pianta nell'ottobre 2010. Successivamente sono stati sterilizzati in una soluzione d'ipoclorito di sodio all'1%, risciacquati in acqua corrente e mantenuti a 4 °C stratificati fino al momento dell'utilizzo in sabbia umida e sterile. I semenzali sono stati preparati circa un mese prima del momento dell'inoculazione, utilizzando un substrato a base di torba e sabbia (1:9). Prima del trapianto il loro apparato radicale è stato potato e lavato.

#### **6.2.2. Preparazione degli inoculi sporali e miceliari, allevamento e controllo delle piante micorrizzate**

Gli ascomi sono stati spappolati tramite l'utilizzo di un mortaio e pestello con aggiunta di sabbia per facilitarne la disgregazione. La poltiglia creata è stata risospesa in acqua e vermiculite sterili in modo da facilitare la distribuzione dell'inoculo in prossimità degli

apparati radicali dei singoli semenzali. Ad ogni piantina è stato fornito un quantitativo di ascoma di circa 2.6 g corrispondenti a circa  $10^5$ - $10^6$  spore. Gli inoculi miceliari di *T. borchii* sono stati preparati tramite una prima fase di sviluppo in coltura liquida ed una seconda fase su substrato solido secondo una metodologia simile a quella descritta da Molina *et al.*, (1992). Dischetti d'agar infungati di 0.7 cm di diametro prelevati alla periferia di colonie di 50 giorni sono stati inseriti in vasetti di vetro contenenti 50 ml di WPM liquido (10 g/l glucosio) e fatti sviluppare per 50 giorni a 22 °C all'oscurità. Successivamente le colonie miceliari sono state frammentate meccanicamente tramite un omogenizzatore in 30 ml di WPM fresco e le sospensioni miceliari così create sono state versate in contenitori di vetro contenenti 200 ml di torba vermiculite (1:9) imbibiti con 70 ml di WPM ed autoclavati per 20 min a 120 °C. Dopo circa 2 mesi di sviluppo a 22 °C all'oscurità i contenitori sono stati svuotati, il substrato infungato da ciascun ceppo riunito assieme in una garza sterile e sottoposto a 5 cicli di lavaggio e "squeezing" sotto acqua corrente per rimuovere i cataboliti prodotti dal fungo durante il suo sviluppo. Ad ogni piantina è stato fornito un quantitativo d'inoculo di circa 70 ml depositato in prossimità dell'apparato radicale. Nel marzo 2011 sono state inoculate 20 piantine con ciascuna delle specie *T. magnatum* e *T. oligospermum* e 10 piantine per ciascuno dei ceppi di *T. borchii*. Le piante inoculate sono state allevate in vasi (250 ml) riempiti con terreno prelevato dalle tartufaia naturale in cui sono stati raccolti gli ascomi di *T. magnatum* impiegati nelle prove di micorrizzazione. Il terreno è stato sterilizzato in autoclave tramite due cicli di riscaldamento a 120°C per 1 ora. I vasi sono stati mantenuti in serra a 22-25 °C ed innaffiati settimanalmente con 100 ml d'acqua. I controlli del grado d'infezione degli apparati radicali sono stati effettuati dopo 1, 3, 6 e 9 mesi dall'inoculo. Le piantine sono state svasate, lavati i loro apparati radicali, isolate 4 radichette di circa 3 cm ed analizzate con l'ausilio di uno stereomicroscopio (20 X). La percentuale di micorrizzazione è stata espressa come numero di micorrize osservate sul totale degli apici radicali contati. Le piante inoculate con *T. magnatum* che hanno mostrato il livello di colonizzazione radicale più elevato sono state

impiegate quali piante madri per studiare le modalità di propagazione di questa specie di tartufo fra semenzali cresciuti nello stesso vaso, sfruttando la metodologia di micorrizzazione per approssimazione radicale. Ogni pianta madre selezionata è stata trapiantata al centro di un vaso di diametro 24.5 cm ed altezza 17 cm, circondata da 6 semenzali ottenuti come descritto nel paragrafo 6.2.1 e distanti circa 12.25 cm. Lo stesso terreno impiegato per la prima fase di micorrizzazione è stato usato anche in questa fase sperimentale. Il controllo del livello di colonizzazione radicale delle piante madri e dei semenzali è stato effettuato 6 mesi dopo il trapianto.

### **6.2.3. Identificazione molecolare e descrizione delle micorrize**

L'identificazione delle micorrize delle tre specie inoculate è stata eseguita seguendo la tecnica della PCR multiplex descritta da Amicucci *et al.* (2000). In particolare sono stati usati il primer ITS4 (White *et al.*, 1990) come unico innesco "reverse", il primer forward TMGI specifico per *T. magnatum*, rTboII specifico per *T. borchii* mentre per *T. oligospermum* è stato appositamente disegnato un primer forward specifico non essendo già stato sviluppato precedentemente per tale specie. TOLf (5'-CTCCTGAGCTGAGGTGTC-3') è stato disegnato in base all'allineamento delle sequenze ITS di *T. oligospermum* e quelle di altre specie di *Tuber*. Le sequenze utilizzate per l'allineamento sono state ottenute sia dai corpi fruttiferi di *T. oligospermum* impiegati in questo lavoro come inoculi sia dal database genetico pubblico GenBank (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). La regione ITS1-5.8S-ITS2 di ciascun corpo fruttifero di *T. oligospermum* è stata amplificata e sequenziata tramite la metodologia di PCR diretta messa a punto da Bonuso *et al.* (2010) usando la coppia di primer universali ITS1f-ITS4 (Gardes e Bruns, 1993). Dall'allineamento delle sequenze, effettuato tramite il programma Multalign (Corpet, 1988), è stato possibile identificare una porzione nucleotidica in prossimità del terminale 3' della regione ITS1 che presentava bassa variabilità intraspecifica ma nel contempo garantiva un sufficiente grado di specificità del primer nei confronti delle altre specie di tartufo e determinava la produzione di un amplicone di taglia tale da poterlo

facilmente distinguere da quelli prodotti dalle coppie di primer TMGI-ITS4 e rTboII-ITS4. Il primer TOLf è stato poi disegnato con il software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) usando parametri intermedi fra quelli che caratterizzavano gli altri primer co-impiegati nelle reazioni di PCR multiplex. Strutture secondarie e formazione di dimeri sono stati verificati utilizzando il software Oligo Analyzer 1.0.3 (Freeware, Teemu Kuulasmaa, Finlandia) e la specificità del primer TOLf è stata valutata in primo luogo *in silico* utilizzando l'algoritmo BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) poi tramite amplificazione PCR di estratti di DNA di diverse specie di *Tuber* (*T. oligospermum*, *T. magnatum*, *T. borchii*, *T. maculatum*, *T. dryophilum*, *T. aestivum*, *T. rufum*, *T. macrosporum*, *T. brumale*, *T. melanosporum*). Le reazioni PCR sono state effettuate in volumi di 30 µl contenenti i seguenti reagenti : 1x buffer (Fermentas), 1 mM dNTPs, 0.5 mM per ciascun primer, 4 mM di MgCl<sub>2</sub> e 1 unità della Taq DNA polimerasi (Fermentas). Le condizioni d'amplificazione sono state: 30 cicli di 94 °C per 20 secondi, 62 °C per 20 secondi, 72 °C per 1 minuto, con una denaturazione iniziale a 95 °C per 3 minuti ed un'estensione finale a 72 °C per 10 minuti.

La descrizione morfologica delle micorrize delle diverse specie analizzate è stata eseguita riportandone la forma, il colore, il tipo di ramificazione, la presenza di ife o cistidi. La struttura anatomica ed i caratteri biometrici delle micorrize sono stati descritti e misurati con un microscopio ottico come riportato al capitolo 3.2.2. Le caratteristiche misurate sono state: l'area, il perimetro, l'asse maggiore e minore delle cellule del mantello fungino, le dimensioni delle ife e cistidi. Per ciascuno dei parametri biometrici è stata calcolata la media relativa a 50 misurazioni ottenute da 3 micorrize diverse per ciascuna specie.

#### **6.2.4. Verifica e quantificazione del micelio di *T. magnatum***

##### **6.2.4.1. Prelievo dei campioni di suolo**

A sei mesi dall'inoculazione per approssimazione radicale sono stati controllati gli apparati radicali sia delle piante madri sia dei semenzali trapiantati nello stesso vaso, per verificarne lo stato di micorizzazione e sono stati prelevati campioni di suolo per rilevare lo sviluppo

miceliare tramite un approccio di PCR quantitativa. Per ciascun vaso sono stati prelevati due campioni di suolo di circa 100 g, il primo in corrispondenza dell'apparato radicale della pianta madre (al centro del vaso) ed il secondo nella zona periferica esterna in prossimità delle radici dei semenzali (periferia del vaso). Successivamente i campioni di suolo sono stati liofilizzati per tre giorni in un liofilizzatore Virtis Benchtop 2K (SP Industries). Dopo la liofilizzazione, i campioni sono stati finemente polverizzati in un mortaio, mescolati accuratamente e conservati a -20 ° C fino al momento dell'analisi. Da ciascun campione sono state preparate tre repliche di 5 g ciascuna in altrettanti tubi da 15 ml ed il DNA totale è stato estratto tramite il protocollo sviluppato da Iotti *et al.*, (2012). Ogni replica è stata risospesa in 6 ml del tampone di lisi (2% CTAB, 2% Polyvinylpyrrolidon, 2 M di NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8). Gli estratti grezzi di DNA sono stati purificati con il kit NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel) secondo il protocollo della ditta produttrice. Infine il DNA totale di ciascuna reazione è stato eluito in 65 µl di tampone (5 mM Tris / HCl, pH 8,5). La quantità di DNA in ciascun estratto è stata quantificata usando uno spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). La qualità del DNA totale è stata valutata con i rapporti OD 260/280 nm e 260/230 nm.

#### **6.2.4.2. Real time PCR**

Il DNA purificato è stato conservato a -80 °C fino al momento dell'analisi. Le reazioni di “real-time” PCR (chimica TaqMan) sono state effettuate secondo la metodologia proposta da Iotti *et al.* (2012) in piastre da 96 pozzetti ottici (bioplastica) con un termociclatore Stratagene Mx3000P QPCR system (Stratagene). L'amplificazione è stata effettuata in reazioni di 25µl contenenti 12,5 µl di Maxima Probe qPCR Master Mix (Fermentas), 30 nM di ROX e 200 ng di DNA totale. La concentrazione della sonda e dei primer sono stati 0,5 µM e 0,2 µM rispettivamente. La sonda TaqMan è stata marcata all'estremità 5' con il reporter fluorescente FAM (6-carbossi-fluorescein) mentre l'estremità 3' è stata modificata con il quencher TAMRA (6-carbossi-tetramethylrhodamine) (MWG Biotech). Due repliche per ciascun campione di suolo estratto e del controllo sono stati preparati per ogni piastra e le “real-time” PCR sono state

ripetute due volte per confermare i risultati. Le condizioni d'amplificazione sono state: 10 minuti di incubazione a 95 °C seguiti da 45 cicli di 95 °C per 15 s, 60 °C per 30 s, 72 °C per 30 s. Il livello di soglia di fluorescenza è stata determinata con l'algoritmo di default del software MXpro (versione 4.10) (Agilent Technologies) ed i risultati dei valori di Ct sono stati automaticamente convertiti in quantitativi di DNA di *T. magnatum* utilizzando il metodo della curva standard. Una curva standard è stata generata per ciascuna corsa con una serie di otto diluizioni seriali di DNA genomico di *T. magnatum* (50, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0005, 0.0001 ng DNA totale di *T. magnatum*) replicate in doppio. Tutte i prodotti PCR real time sono stati visualizzati su gel dopo elettroforesi per escludere l'amplificazione di sequenze non bersaglio.

#### **6.2.4.3. PCR qualitative sulle radici delle piante madri**

Sono stati prelevati delle piante madri campioni di radici per verificare la presenza di *T. magnatum* tramite un approccio di PCR qualitativa condotta sul DNA totale estratto. A tal scopo, per ciascuna pianta, sono stati prelevati 3 campioni di radici micorrizzate e non micorrizzate di circa 0.3 g. Le radici sono state sterilizzate esternamente per 30 s in una soluzione di etanolo (72%) e successivamente in una soluzione d'ipoclorito di sodio (10%) per 10 min in agitazione, quindi sono state lavate per 4 volte in acqua sterile distillata. Dopo la sterilizzazione, i campioni sono stati finemente polverizzati in un mortaio con l'azoto liquido, il DNA totale è stato estratto tramite il Kit NucleoSpin® Plant II secondo il protocollo della ditta produttrice.

Il DNA estratto è stato amplificato secondo la metodologia proposta da Amicucci *et al.* (1998) utilizzando i primer specie specifici TMGI e TMGII.

### **6.3. Risultati e discussione**

#### **6.3.1. Colonizzazione radicale con *T. magnatum*, *T. borchii* e *T. oligospermum***

Dopo un mese dall'inoculazione dei semenzali, solamente alcuni ceppi di *T. borchii* (Tbo2364, Tbo3035, Tbo3067, Tbo3840, Tbo4284) mostravano rari apici radicali già formati e dotati di cistidi, mentre nella maggior parte delle radichette infettate il mantello era in fase di formazione

ancora allo stato ifale e senza la tipica struttura di tipo pseudoparenchimatica, caratteristica della specie. In questa fase nessuna micorrizza è stata rilevata nelle radici dei semenzali inoculati con *T. magnatum* e *T. oligospermum*. In tabella 8 sono riportate le percentuali di micorrizzazione delle tre specie analizzate e la loro evoluzione nel tempo. Come si può notare dalla tabella, l'evoluzione del processo di micorrizzazione è stato più rapido per *T. borchii* rispetto alle altre specie. Questo aspetto è probabilmente dovuto al tipo d'inoculo impiegato. Il micelio offre garanzie di un'immediata e più rapida colonizzazione radicale rispetto alle spore che, come organi di resistenza, richiedono anche un certo intervallo di tempo per la germinazione e la formazione del micelio primario. Comunque, la durata del mantenimento in coltura dei miceli influisce enormemente sulla loro infettività. Fra i 10 ceppi di *T. borchii* impiegati nelle prove, solo quelli isolati più recentemente sono stati in grado di colonizzare gli apparati radicali dei semenzali anche se in alcune ripetizioni non sono state rilevate micorrize. Questo è probabilmente dovuto alle caratteristiche di ciascun ceppo (vitalità ed infettività del micelio) ma anche alla tecnologia impiegata per produrre gli inoculi miceliari che, per le specie del genere *Tuber*, è ancora nelle fasi iniziali di sviluppo (Xiao *et al.*, 2004). Anche se questo periodo può variare in modo significativo fra gli isolati di una stessa specie, indicativamente, almeno per *T. borchii*, dopo 10 anni di mantenimento in coltura di un ceppo è probabile che questo non sia più in grado di infettare gli apparati radicali.

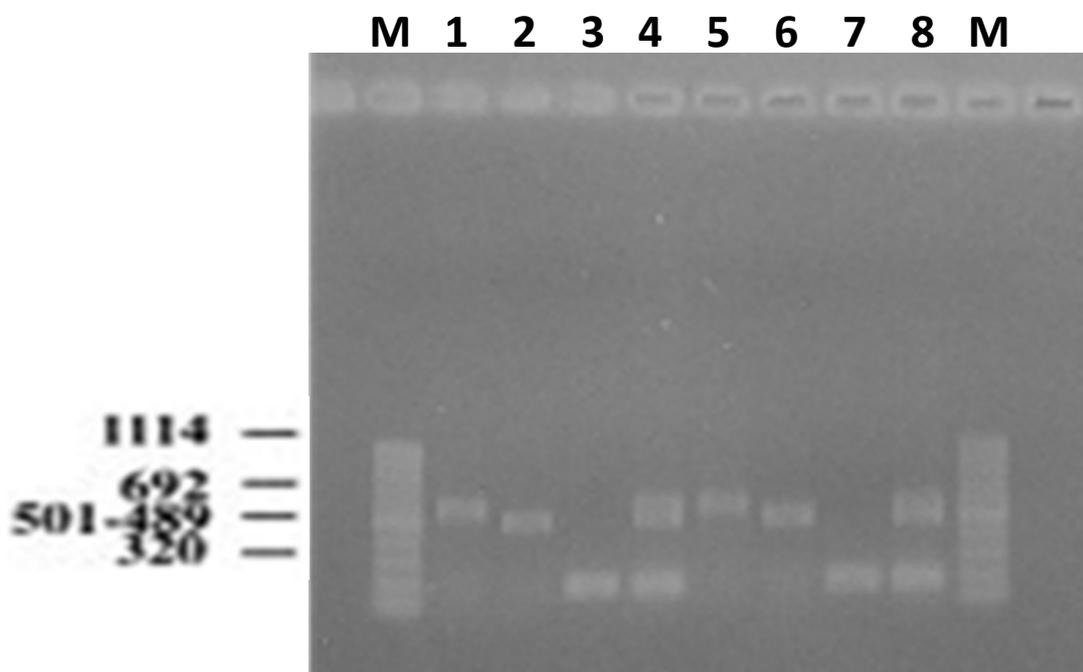
Nonostante il gap temporale iniziale probabilmente dovuto al diverso tipo di inoculo impiegato, *T. oligospermum* ha manifestato un livello di infettività simile o superiore a quello ottenuto per *T. borchii*. Questo tartufo è considerato una specie "aliena" per il territorio italiano e quindi la sua introduzione nelle tartufaie coltivate, sottoforma di piantine micorrizzate erroneamente prodotte in vivaio, potrebbe rappresentare un serio rischio ecologico oltre ad un pericolo per la tartuficoltura tradizionale. Infatti, questa specie è originaria del Marocco, non è endemica in Europa ad eccezione del sud della Spagna (Alvarado *et al.*, 2012), produce corpi fruttiferi di scarso valore commerciale che vengono usati nelle frodi alimentari (Zambonelli *et*

al., 2000) e, come dimostrato in queste prove sperimentali, colonizza i semenzali molto facilmente. Non è possibile ancora sapere se introdotto negli ambienti boschivi italiani possa insediarsi facilmente ed essere un forte competitore verso le altre specie di tartufi, sostituendosi a loro sulle radici delle piante almeno in certe combinazioni pedoclimatiche. Comunque, la possibilità che tartufi alieni siano introdotti in Italia è già stata dimostrata con *Tuber indicum*, tartufo di origine cinese, la cui presenza in tartufaie coltivate è stata già verificata da Murat *et al.*, (2008).

L'impossibilità di ottenere idonei inoculi miceliari per *T. magnatum* ci ha obbligato ad utilizzare il classico inoculo sporale per produrre micorrize con questa specie. In passato questa tecnica si è rilevata molto spesso inadeguata per produrre piantine micorrizzate sia per scopi scientifici sia per scopi commerciali, ma successi sono stati ottenuti in alcuni casi (Mello *et al.*, 2001; Rubini *et al.*, 2001). Anche nel corso di questa sperimentazione siamo riusciti ad ottenere micorrize di questa specie di tartufo anche se il livello d'infezione variava notevolmente da pianta a pianta. Solamente due piante mostravano una percentuale di micorizzazione superiore al 70% mentre per 5 semenzali sono state rilevate percentuali di colonizzazione delle radichette comprese fra il 10 e 20%. Anche in condizioni di suolo ottimali per lo sviluppo di *T. magnatum* la capacità d'infezione di questa specie è risultata essere più bassa rispetto a quella delle altre due testate. Una spiegazione potrebbe essere attribuita alle diverse esigenze ecologiche del tartufo bianco pregiato rispetto a *T. borchii* e *T. oligospermum*. In passato è stato dimostrato che *T. borchii* è classificato come "early stage fungus" ossia una specie fungina che si sviluppa su apparati radicali di piante giovani od alla periferia di quelli di piante mature e, quando in pieno campo la copertura arborea diventa prossima al 100%, le sue micorrize tendono a scomparire ed essere rimpiazzate da altre specie (Zambonelli *et al.*, 2000). Quindi è lecito supporre che su giovani semenzali, *T. borchii*, come pure *T. oligospermum*, possono manifestare una maggiore aggressività. Al contrario, *T. magnatum* potrebbe essere un "late stage fungus" e svilupparsi preferibilmente su piante mature ed in condizioni di copertura

arborea elevata, come spesso confermato dai siti di raccolta dei suoi corpi fruttiferi (Pacioni, 2012). Un'altra spiegazione potrebbe essere dovuta alla morte, in seguito alla sterilizzazione del suolo di allevamento delle piantine, di microrganismi che ne favoriscono lo sviluppo e la diffusione negli ambienti naturali. Questa ipotesi potrebbe essere di supporto alla teoria della simbiosi tripartita enunciata nel capitolo 4.4.

L'effettiva appartenenza delle micorrize ottenute con l'inoculo sporale a *T. magnatum* e *T. oligospermum* è stata confermata dall'amplificazione tramite PCR multiplex dei rispettivi morfotipi ectomicorrizici. Cinque-dieci apici infungati per ciascun morfotipo sono stati amplificati in reazioni di PCR diretta contenenti i tre primer forward TMGI-TOLf-rTboII ed il primer reverse ITS4 impiegando frammenti del mantello immessi direttamente nel tubo di reazione. I frammenti specifici generati da TOLf-ITS4 sono di 513 bp, facilmente distinguibili su gel da quelli generati da TmagI-ITS4 (595 bp) per *T. magnatum* e da rTboII-ITS4 per *T. borchii* (Fig. 15)



**Fig. 15-** Prodotti di amplificazione (PCR multiplex) ottenuti con i primers specifici. Dalla corsia 1 alla 4 sono stati impiegati i corpi fruttiferi delle rispettive specie, dalla corsia 5 alla 8

le micorrize ottenute in serra. Corsia 1 e 5: *T. magnatum*; corsie 2 e 6: *T. oligospermum*; corsie 3 e 7: *T. borchii*; corsie 4 e 8: tutte le specie.

**Tabella. 8** - Percentuale di micorrizzazione dopo 3, 6 e 9 mesi dall'inoculo dei semenzali di *Q. pubescens*

Specie	Ceppo	Inoculo	micorrizzazione		micorrizzazione		micorrizzazione	
			3 mesi (%)		6 mesi (%)		9 mesi (%)	
			micorr. PI (%)	PNI (n°)	micorr. PI (%)	PNI (n°)	micorr. PI (%)	PNI (n°)
Testimone	-	-	0	10	0	10	0	10
<i>T. borchii</i>	1Bo	micelio	0	10	0	10	0	10
<i>T. borchii</i>	17Bo	micelio	0	10	0	10	0	10
<i>T. borchii</i>	43Bo	micelio	0	10	0	10	0	10
<i>T. borchii</i>	Tbo1/94	micelio	0	10	0	10	0	10
<i>T. borchii</i>	Tbo2364	micelio	15.9	2	47.5	2	61.2	2
<i>T. borchii</i>	Tbo2392	micelio	0	10	0	10	0	10
<i>T. borchii</i>	Tbo3035	micelio	23.4	0	49.7	0	65.8	0
<i>T. borchii</i>	Tbo3067	micelio	17.4	4	44.2	4	70.2	4
<i>T. borchii</i>	Tbo3840	micelio	28.0	3	55.2	3	72.1	3
<i>T. borchii</i>	Tbo4284	micelio	18.1	1	41.3	1	67.8	1
<i>T. magnatum</i>		spore	0	20	< 10	15	48.2	5
<i>T. oligospermum</i>		spore	0	20	37.8	18	76.8	18

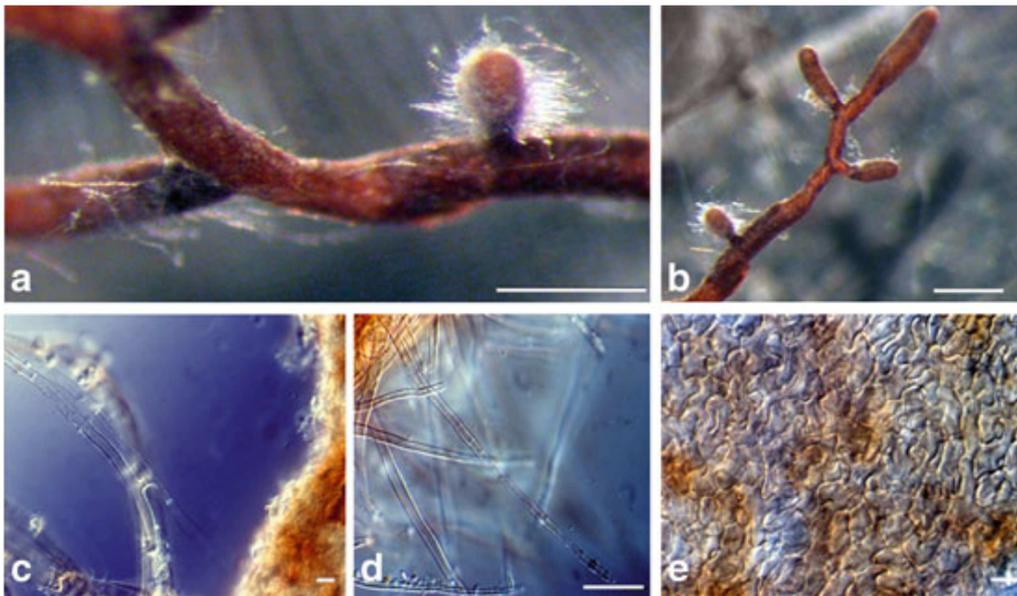
PI = Piante Infettate; PNI = Piante non Infettate

### 6.3.2. Caratterizzazione morfologica delle micorrize delle tre specie studiate

*T. magnatum* (Fig. 16) - Le micorrize sono semplici o con ramificazione monopodiali pinnata.

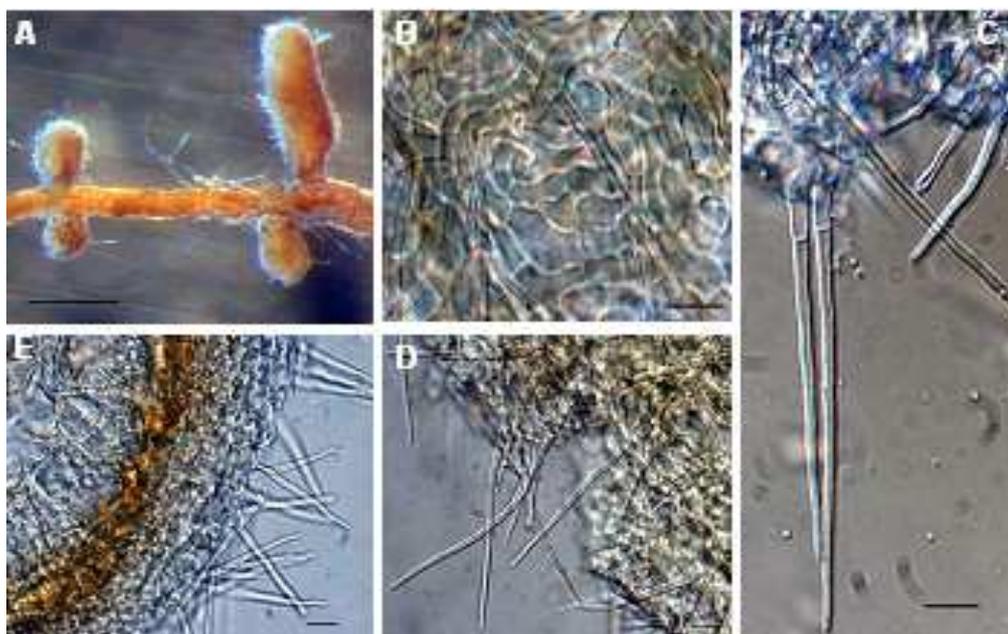
I terminali non ramificati sono dritti, di aspetto lanoso e raramente lisci, di colore marrone con

apice più chiaro, generalmente ricoperti di cistidi ialini allungati. Il mantello è di tipo pseudoparenchimatico con cellule epidermoidi con accentuata lobatura. Le ife sono ialine senza unioni a fibbia. Le caratteristiche morfologiche sono in linea con quelli ottenuti da Mello *et al.* (2001).



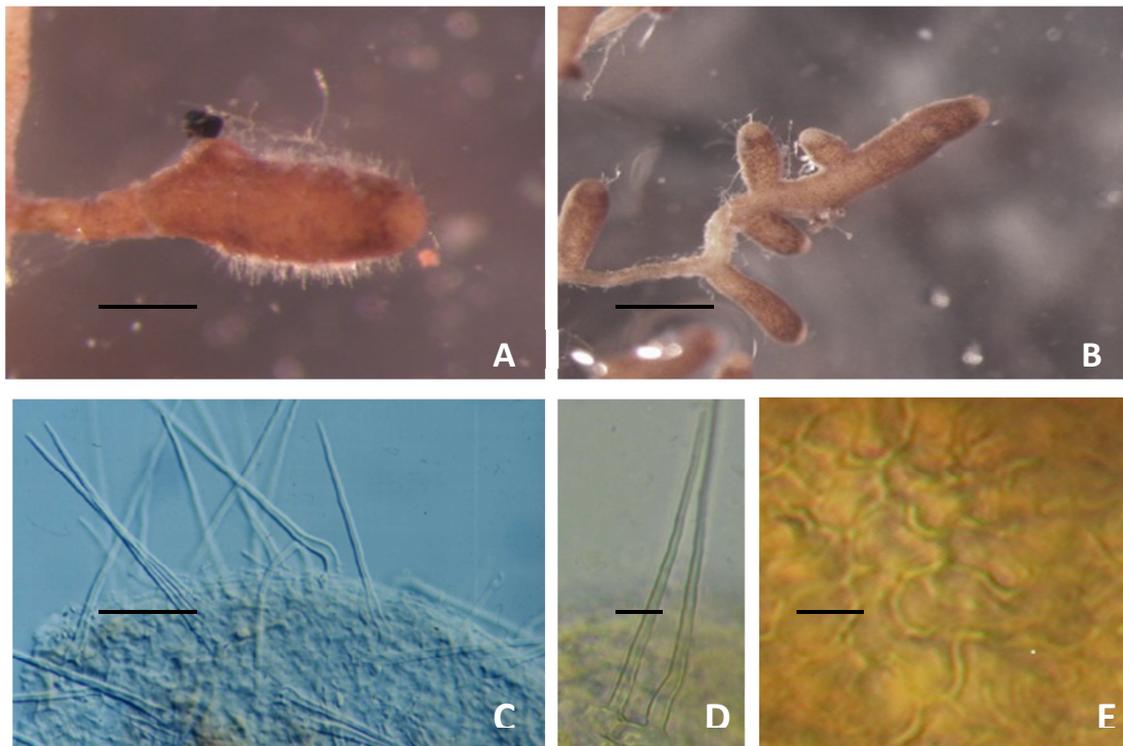
**Fig. 16-** Micorrize di *T. magnatum*: a e b) apici radicali micorrizzati (barra = 1 mm); b) anastomosi ifale (barra = 10  $\mu\text{m}$ ); d) cistidi (barra = 10  $\mu\text{m}$ ); e) anatomia del mantello (barra = 10  $\mu\text{m}$ )

*T. oligospermum* (Fig. 17) - Le micorrize sono semplici o con ramificazione monopodiali pinnate. I terminali non ramificati sono clavati, hanno un colore ocra con apice più chiaro, lisci o ricoperti di cistidi spinuliformi con base allargata ed apice arrotondato. Il mantello è di tipo pseudoparenchimatico con cellule epidermoidi intercalate ad alcuni elementi ifali. Le ife sono ialine prive di unioni a fibbia. La morfologia e l'anatomia delle micorrize di *T. oligospermum* descritte in questo studio sono simili a quelle rilevate da Bencivenga *et al.* (1997).



**Fig. 17-** Micorrize di *T. oligospermum*: A) radice micorrizata (barra = 300  $\mu\text{m}$ ); B) aspetto della superficie esterna della micoclona (barra = 10  $\mu\text{m}$ ); C) cistidi con rigonfiamento basale e setto ben visibile (barra = 10  $\mu\text{m}$ ); D) cistidi (barra = 10  $\mu\text{m}$ ); E) sezione trasversale della micorrizza (barra = 10  $\mu\text{m}$ )

*T. borchii* (Fig. 18) - Le micorrize sono semplici o con ramificazione monopodiali pinnate. I terminali non ramificati sono cilindrici o leggermente clavati con apice largo e arrotondato hanno un colore ocra nocciola con apice più chiaro, ricoperti di cistidi spinuliformi ialini con a volte la base allargata e apice arrotondato. Il mantello è di tipo pseudoparenchimatico con cellule epidermoidi o arrotondate.



**Fig. 18** - Micorrize di *T.borchii*: A e B) micorrize semplici o ramificate (barra = 1mm); C e D) cistidi (barra = 10 μm); E) immagine della superficie esterna della micoclona con cellule a contorno poco lobato (barra = 10 μm)

Le caratteristiche biometriche delle tre specie di *Tuber* sono riportate in tabella 9.

X	<i>T. magnatum</i>	<i>T. borchii</i>	<i>T. oligospermum</i>
	(μm)	(μm)	(μm)

**Tabella. 9** -Caratteristiche biometriche delle cellule del mantello e cistide di micorrize delle tre specie studiate

<b>Area cellule</b>	69.46 ± 30.39	79.54 ± 36.46	70.72 ± 28.46	*
<b>Perimetro cellule</b>	38.33 ± 11.05	40.79 ± 10.17	39.07 ± 9.72	Non
<b>Asse maggiore</b>	13.86 ± 4.20	14.75 ± 3.68	14.35 ± 3.15	è
<b>Asse minore</b>	8.22 ± 2.37	8.52 ± 2.38	8.36 ± 2.15	stato
<b>Lunghezza dei cistidi</b>	109.59 ± 41.42	65.01 ± 14.85	44.49 ± 12.21	rilev
<b>Diametro dei cistidi</b>	2.12 ± 0.36	3.44 ± 0.82	1.93 ± 0.52	ato
<b>Diametro ifale</b>	2.47 ± 0.44	4.87 ± 1.17	—*	in
				quan

to non si sono mai osservate ife peritrofiche

### 6.3.3. Verifica e quantificazione del micelio di *T. magnatum*

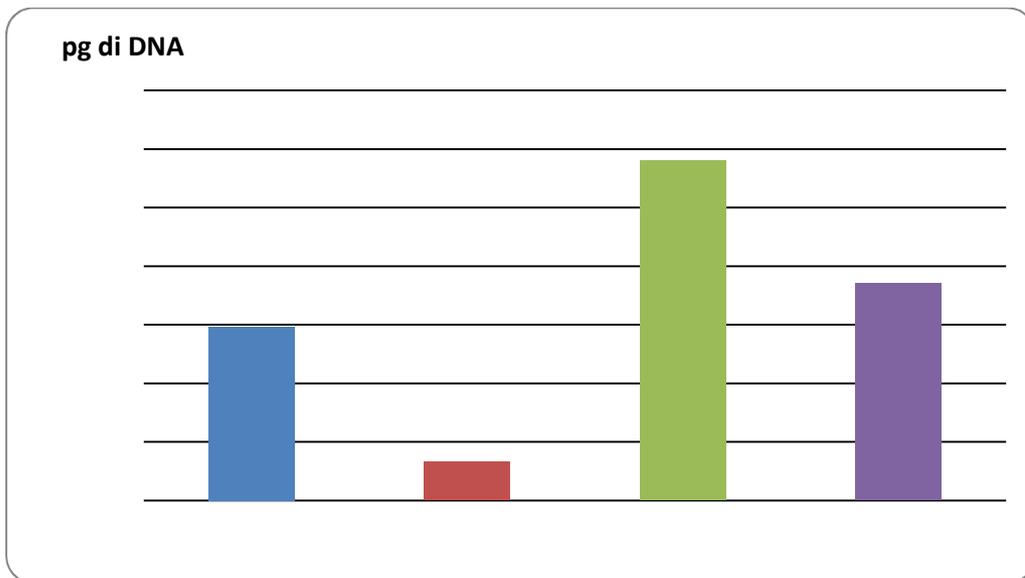
Le due piante aventi una percentuale di micorrizzazione con *T. magnatum* che superava il 70% sono state selezionate come piante madri per indurre la colonizzazione in nuovi semenzali tramite la tecnica per approssimazione radicale. A sei mesi dal trapianto una delle due piante madri non presentava più alcun tipo di micorrizza mentre l'apparato radicale dell'altra pianta mostrava un 50% di apici colonizzati da *Sphaerospora brunnea*, un comune contaminante delle piantine micorrizzate in vivaio (Amicucci *et al.*, 2000) ed un 10% di micorrize attribuibili a *T. magnatum*. Nessuna delle nuove piantine associate alle piante madri presentava micorrize di *T. magnatum*.

Le reazioni di “real-time” PCR sui campioni di suolo prelevati nei vasi hanno evidenziato che la quantità maggiore di micelio di *T. magnatum* era presente vicino agli apparati radicali delle piante madri e diminuiva di circa un ordine di magnitudo nei campioni raccolti alla periferia dei vasi (Fig. 19). Inoltre nel vaso in cui era presente la pianta madre ancora micorrizzata, la concentrazione del micelio di *T. magnatum* nel substrato era 25 volte superiore a quella del vaso della pianta madre che aveva perso le micorrize. Dai risultati ottenuti scaturisce che le ectomicorrize di *T. magnatum* supportano una quantità di micelio superiore rispetto a radici

senza ectomicorrize ma la loro scomparsa a livello radicale non è indice di assenza di questa specie sugli apparati radicali. Il micelio tende a concentrarsi maggiormente in prossimità dell'inoculo iniziale (pianta madre) ma si era anche sviluppato in tutto il volume di suolo contenuto nel vaso pur senza formare nuove ectomicorrize. La velocità di diffusione nel suolo è certamente superiore a quella delle colture pure. Infatti dopo 6 mesi dal trapianto il micelio di *T. magnatum* nel suolo dei vasi di allevamento delle piantine si era propagato per una distanza superiore ai 5 cm, distanza che in piastra necessiterebbe di alcuni anni e successive subculture per essere coperta.

Questa capacità di diffusione del micelio del tartufo bianco pregiato nel suolo è stata riscontrata anche in due ricerche effettuate su campioni di suolo naturali che hanno evidenziato come esso si possa trovare anche molto distante dal punto di ritrovamento dei carpofori (Zampieri *et al.*, 2010; Iotti *et al.*, 2012) mentre le sue micorrize in natura sono rarissime (Leonardi *et al.*, 2013).

Questi risultati sostengono l'ipotesi che *T. magnatum* rimane presente nelle radici delle piante sottoforma di endofita o di un'altra tipologia di simbiosi micorrizica come anticipato nelle conclusioni del capitolo 2. Le PCR qualitative condotte sul DNA totale estratto dalle porzioni di radici non micorrizzate e dalle ectomicorrize di *S. brunnea* e di *T. magnatum* (queste ultime usate come controllo positivo) prelevate dalle piante madri hanno infatti determinato l'amplificazione di prodotti PCR specie-specifici in tutti i campioni estratti. Comunque sarà necessario applicare altri approcci molecolari, come la PCR *in situ*, per confermare l'effettiva presenza del micelio di *T. magnatum* all'interno dei tessuti corticali.



**Fig. 19-** Quantità medie di DNA del micelio di *T. magnatum* nel suolo. i valori in ordinata sono stati logaritmizzati.

#### 6.4. Conclusioni

I risultati ottenuti rappresentano un buon punto di partenza per impostare future sperimentazioni su questa specie di tartufo pregiata e risolvere i numerosi misteri che riguardano la sua biologia. In primo luogo bisognerà confermare una delle ipotesi legate alla strategia ecologica e biologica che impiega questo tartufo per mantenersi e diffondersi in pieno campo. La possibilità di ottenere micorrize in condizioni controllate e verificarne l'effettiva appartenenza a questa specie con metodi molecolari rende un po' più concreta la possibilità d'impostare specifici piani di produzione di piantine micorrizzate. In passato fra i principali fallimenti nel coltivare questo tartufo sono da annoverare l'utilizzo di piantine micorrizzate con altri tartufi che si sostituivano a *T. magnatum* sugli apparati radicali. Come abbiamo dimostrato anche in questa prova le micorrize di *T. oligosperum*, *T. magnatum* e *T. borchii* sono morfologicamente ed anatomicamente simili. A livello morfologico solamente i cistidi possono differenziare queste tre specie fra loro ma non sempre questi elementi anatomici sono presenti sulle micorrize. Lo sviluppo del primer specifico TOLf da impiegare in PCR multiplex con gli altri primer disegnati e testati in passato permette una rapida e sicura

identificazione delle micorrize di *T. oligosperum* evitando possibili frodi alimentari o l'introduzione nelle tartufaie italiane di questo potenziale fungo "alieno" che si aggiunge alle altre specie di tartufi "minori" già presenti nel nostro territorio. Sicuramente l'impiego dei miceli nei processi di micorrizzazione rappresenta l'obiettivo principale per il futuro per risolvere diversi problemi legati alla produzione di piantine micorrizzate. Anche se la produzione di inoculi miceliari su vasta scala è ancora in fase sperimentali, le prove effettuate con *T. borchii* hanno evidenziato che questa metodologia produce piante ben micorrizzate in tempi più brevi rispetto all'utilizzo dell'inoculo sporale. Inoltre i miceli possono essere sottoposti a selezione genetica per migliorare la produttività, l'adattamento ad uno specifico ambiente di coltura ed il processo di micorrizzazione e offrono la possibilità di una migliore gestione dei mating type. Questo tipo di inoculi si potrebbero prestarsi anche ad un facile impiego direttamente in campo bypassando la fase vivaistica. Comunque il principale problema legato all'utilizzo dei miceli è la perdita delle capacità infettive se mantenuti in coltura per lungo tempo.

## **Capitolo 7**

### **7. Messa a punto di protocolli di conservazione per colture di *Tuber* spp. e la creazione di una banca di germoplasma di tartufi**

#### **7.1. Introduzione**

L'Italia è il paese dove si registra la crescita spontanea delle due specie di tartufo di maggior pregio: il *T. melanosporum* (tartufo nero pregiato) e il *T. magnatum* (tartufo bianco pregiato) insieme ad altre specie di minore ma pur sempre consistente interesse commerciale, come il

tartufo estivo (*T. aestivum / uncinatum*) ed il tartufo bianchetto (*T. borchii*). La raccolta e la commercializzazione di queste specie rappresenta un' importante fonte di reddito soprattutto per le popolazioni collinari e montane. Purtroppo, nell'ultimo secolo, la produzione di tartufi in Italia e nel resto d'Europa è in notevole calo a causa del disboscamento, del degrado del territorio montano, della raccolta eccessiva e dei cambiamenti climatici (Hall *et al.*, 2007). Inoltre queste importanti specie autoctone rischiano di essere soppiantate da specie alloctone più competitive (quali i tartufi cinesi *T. indicum*, *T. himalayense* e *T. sinense*) con evidenti rischi per la biodiversità fungina. Il tartufo non europeo, come il cinese *T. indicum*, è stato esportato dalla Cina in Europa, Nord America e Australia (Garcia-Montero *et al.*, 2010). Tale tartufo è difficile da distinguere da *T. melanosporum* poiché hanno caratteristiche organolettiche e morfologiche molto simili. Un grosso problema è rappresentato dal fatto che *T. indicum* è spesso venduto come *T. melanosporum* e perciò potrebbe essere (volontariamente o meno) utilizzato in vivaio come inoculo per la micorrizzazione di piantine, come peraltro precedentemente accaduto (Murat *et al.*, 2008). Proteggere la biodiversità, nonché la diversità genetica all'interno delle specie è nell'interesse di ogni Paese e, in questo contesto, la creazione di una banca di germoplasma è di fondamentale importanza. Per far ciò è necessario mettere a punto tecniche di conservazione adattate al materiale biologico da conservare.

### **Le diverse tecniche di conservazione di materiale fungino: excursus storico**

Le tecniche di conservazione di ceppi fungini devono garantire la loro purezza, vitalità e nel contempo mantenere invariate nel tempo le loro caratteristiche morfologiche, fisiologiche e genetiche.

Per la conservazione di materiale fungino, in passato, sono stati sviluppati molti metodi (Nakasone *et al.*, 2004), ma solo pochi di essi sono adatti ai funghi ectomicorrizici in generale, ed alle specie di *Tuber* in particolare (dati non pubblicati).

La scelta del metodo di conservazione dipende dalla specie coinvolta e dagli obiettivi che si intendono raggiungere.

La conservazione a breve termine tramite rinnovi colturali ripetuti frequentemente è semplice, economica ed idonea alla maggior parte dei funghi ectomicorrizici ma il rischio di contaminazione nonché l'essiccamento del terreno di crescita sono sempre presenti. Inoltre, la ripetizione continuativa dei trapianti può portare alla perdita dell'infettività per l'insorgenza di mutazioni o a modifiche dell'espressione genica (Coughlan e Pichè, 2005). Nel precedente capitolo è stato dimostrato che i ceppi di *T. borchii* più vecchi presenti nella nostra collezione avevano perso la loro capacità di formare ectomicorrize in condizioni controllate. In alcuni casi tale problema può essere risolto semplicemente modificando la composizione del terreno nutritivo che può portare al ringiovanimento di vecchie culture e alla riduzione della perdita di vitalità del fungo (Nakasone *et al.*, 2004; Repac, 2011).

La conservazione a lungo termine in tubo sotto strato d'olio presenta il vantaggio dell'economicità. Essa consiste nel sommergere completamente con uno strato d'olio di vaselina, precedentemente sterilizzato, la colonia fungina sviluppatasi sul terreno nutritivo. I tubi devono essere sigillati e il livello d'olio deve essere controllato periodicamente e, se necessario, rimboccato. Analogamente, le colonie fungine possono essere conservate anche in provette contenenti acqua distillata sterile: se conservate a 4 °C tali colture mantengono la massima vitalità (Richter, 2008). E' tuttavia fondamentale sottolineare che questi due semplici metodi di conservazione a lungo termine di materiale fungino sono validi solo per alcune specie di funghi ectomicorrizici. Ad esempio, alle suddette condizioni la vitalità a lungo termine dei miceli di *Tuber* non è garantita (osservazione personale).

L'ultracongelamento a - 80 C° è una tecnica di conservazione a lungo termine che garantisce elevati tassi di sopravvivenza (Kitamoto *et al.*, 2002). Essa prevede la conservazione di plug di micelio entro criotubi contenenti l'idoneo terreno nutritivo liquido con l'aggiunta di un crioprotettore. I criotubi così preparati vengono poi posti direttamente

nell'ultracongelatore. Questa tecnica presenta il vantaggio di essere poco costosa, in quanto la maggior parte dei laboratori possiede un ultracongelatore, ma ha lo svantaggio di non essere applicabile a tutti i funghi ectomicorrizici, come dimostrato da Obase *et al.*, (2011).

Un'altra innovativa tecnica di conservazione a lungo termine è la crioconservazione o conservazione criogenica. Con tale termine ci si riferisce allo stoccaggio di materiale biologico alla temperatura ultra-bassa dell'azoto in fase liquida (-196 °C). A tale temperatura le cellule entrano in uno stato di "quiescenza assoluta", in quanto tutte le reazioni fisiche e biochimiche sono praticamente ferme a causa della mancanza di acqua allo stato liquido, rendendo minima l'eventuale alterazione del loro potenziale vitale e della loro capacità rigenerativa. In questa particolare condizione, i tempi di conservazione divengono praticamente illimitati.

L'esposizione al freddo intenso (-196 °C) comporta alterazioni dovute al congelamento dell'acqua che si trova nei tessuti e nelle cellule. Infatti, l'esposizione a temperature sotto lo zero porta alla formazione di cristalli aghiformi, che si accompagna ad un aumento di volume del 9%, con conseguenti variazioni del metabolismo cellulare ed danni fisici irreversibili. La cristallizzazione dell'acqua, in ambiente sia extracellulare che intracellulare, senza passare attraverso una fase di disidratazione cellulare, provoca una perforazione delle membrane e delle pareti dovuta all'azione meccanica di crescita dei cristalli ed è la causa principale della morte delle cellule (Dereuddre e Gazeau, 1992).

L'esposizione al freddo intenso comporta anche alterazioni delle membrane. Tutte le membrane cellulari e principalmente la membrana plasmatica, sono sensibili al freddo ed alla disidratazione (Uemura e Steponkus, 1999). La sopravvivenza della cellula dipende dall'integrità della membrana plasmatica, che gioca un ruolo fondamentale nel metabolismo cellulare con la diffusione attiva o passiva delle molecole necessarie al funzionamento cellulare (Robert e Roland, 1989). Un rapido abbassamento della temperatura può causare una forte disidratazione delle cellule, l'esclusione delle proteine di membrana e steroli e la

separazione laterale e irreversibile dei fosfolipidi che, a sua volta, può provocare la dislocazione del plasmalemma e, di conseguenza, la morte cellulare (Mazliak, 1999; Wolfe e Bryant, 1999).

Per queste problematiche, in tale tecnica, l'uso di crioprotettori è indispensabile per proteggere le cellule. In base al sito d'azione si distinguono due categorie di crioprotettori: quelli che agiscono all'interno della cellula (crioprotettori intracellulari, come ad es. il DMSO(dimetilsolfossido) e il glicerolo) e quelli che agiscono all'esterno della cellula (crioprotettori extracellulari, come zuccheri quali sorbitolo, saccarosio, lattosio, trealosio ed altri).

Entrando più nello specifico, con questa tecnica le ife fungine subiscono dapprima un graduale ciclo di raffreddamento, che dura anche molte ore, al termine del quale vengono poi trasferite in una bombola contenente azoto liquido, bloccando così le eventuali modificazioni genetiche.

La crioconservazione, sperimentata per la prima volta nel 1953 su globuli rossi (Lovelock, 1953), si è poi largamente affermata in campo veterinario e botanico. Infatti, Hwang (1960) dimostrò che la conservazione in azoto liquido è la tecnica migliore e più ampiamente applicabile per la conservazione di funghi filamentosi (Smith, 1998). E' utilizzata di routine in America e l'American Type Culture Collection (ATCC) ne è l'esempio.

Il protocollo descritto da Smith (1998) è stato applicato nei primi anni del 2000 con successo a spore di funghi micorrizici arbuscolari, ma sui miceli è di difficile applicazione (Homolka *et al.*, 2001). Se da un lato tale tecnica presenta il vantaggio di essere l'unica in grado di assicurare una reale e affidabile conservazione a lungo termine, dall'altro presenta lo svantaggio di essere costosa per l'elevato costo delle apparecchiature necessarie a realizzarla.

Basandoci sui risultati ottenuti in passato su materiale fungino ectomicorrizico, in questo lavoro abbiamo cercato di mettere a punto due metodi per la conservare a lungo termine i

miceli di *Tuber* e precisamente: quello dell'ultracongelamento a -80°C, come descritta da Kitamoto *et al.* (2002), scelto per la facilità d'applicazione, il basso costo e la disponibilità nella nostra struttura di un ultracongelatore e quello della crioconservazione in azoto liquido modificando il protocollo di Danell e Flygh (2002).

## 7.2. Materiali e metodi

### 7.2.1. Ceppi fungini utilizzati

Le prove sono state condotte utilizzando miceli in coltura pura di *T. borchii*, *T. aestivum* e *T. macrosporum* in collezione presso la micoteca del Centro di Micologia di Bologna (CMI-Unibo) (Tabella 10). I miceli sono stati fatti crescere al buio a 22°C, in piastre Petri contenenti PDA per *T. borchii* e WPM per *T. aestivum* e *T. macrosporum*. Il micelio è stato propagato bimestralmente prelevando dei plug (Ø 7 mm) dal margine più esterno della colonia.

**Tabella. 10-** Ceppi di micelio utilizzati

Ceppo	Data di raccolta	N. erbario
<i>T.borchii</i> (2364)	12-03-2004	2364
<i>T. aestivum</i> (Tae2)	16-12-1999	1463
<i>T. macrosporum</i> (Tmc1)	01-12-1999	1461-2

### 7.2.2. Ultracongelamento a – 80 °C

In questo lavoro è stato applicato il metodo di ultracongelamento a -80°C descritto da Kitamoto *et al.* (2002). Dal margine di una colonia di 50 giorni di *T. borchii*, *T. aestivum* e *T. macrosporum* è stato prelevato 1 disco di micelio (3 mm) e trasferito in tubi contenenti il

mezzo di crescita (PDA o WPM), solidificato a becco di clarino, con l'aggiunta del 10% di glicerolo come crioprotettore. I miceli sono stati fatti crescere in termostato a  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  per 3-4 settimane dopodiché i tubi sono stati trasferiti direttamente nell'ultracongelatore a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 60 giorni. Trascorso tale periodo i miceli sono stati scongelati a temperatura ambiente per 3 ore dopodiché per ciascuna specie sono state allestite 4 piastre Petri contenenti substrato agarizzato (PDA o WPM) e incubati al buio alla temperatura di  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 30 giorni. Parallelamente, è stato allestito un eguale numero di piastre con i corrispondenti miceli freschi. Settimanalmente è stato misurato il diametro di tutte le colonie.

### **7.2.3. Crioconservazione a $-196^{\circ}\text{C}$**

Previe opportune modifiche, ci si è basati sul protocollo di Danell e Flygh (2002). Le modifiche si sono rese necessarie in quanto tale protocollo è stato sviluppato per la crioconservazione di *Cantarellus cibarius*, fungo epigeo, mentre noi ci siamo trovati ad operare con *Tuber* spp. che presenta maggiori difficoltà di crescita in coltura pura (Iotti *et al.*, 2002). La modifica ha riguardato l'aggiunta di saccarosio per ridurre la tossicità del crioprotettore dimetilsolfossido (DMSO) previsto dal protocollo. E' infatti noto che il saccarosio è un buon crioprotettore di tipo extracellulare.

#### **7.2.3.1 Fase di congelamento del micelio**

Dal margine di colture fungine di 30 gg di età di *T. borchii*, *T. aestivum* e *T. macrosporum* sono stati campionati 10 plug (1 mm) di micelio. Questi sono stati posti in criotubi contenenti 1,5 ml di mezzo di coltura liquido sterile (PDBroth, Difco e WPM a secondo della specie di *Tuber* coinvolto ) cui è stato aggiunto sorbitolo (105  $\mu\text{l}$ ) e dimetilsolfossido (DMSO) (117  $\mu\text{l}$ ) ogni 3 minuti per 10 volte. Le colture sono state quindi incubate per 24 ore al buio a  $22-23\text{ }^{\circ}\text{C}$  su di un agitatore rotante. I criotubi contenenti le colture miceliari sono stati inseriti in un apposito strumento (Kryo 10 series II, PlanerProducts) programmato col seguente ciclo di raffreddamento: abbassamento della temperatura a  $-1\text{ }^{\circ}\text{C} / 10'$ ; successiva

diminuzione della temperatura di 0,3 °C / min fino al raggiungimento di -16 °C, mantenuti per 15'; successiva diminuzione della temperatura di 0,3 °C / min fino ad arrivare a -35,5 °C ed ulteriore abbassamento di 15 °C / min fino al raggiungimento di -50 °C. A questo punto i criotubi sono stati immersi in azoto liquido (-196 °C) per 48 ore.

#### **7.2.3.2. Fase di scongelamento del micelio**

Subito dopo esser stati estratti dall'azoto liquido, i criotubi sono stati immersi in acqua a 35 °C al fine di provocarne il parziale scongelamento dopodiché sono stati lavati trasferendoli entro tubi contenenti 15 ml del corrispondente mezzo nutritivo liquido. Tale operazione si rende necessaria per eliminare il maggior quantitativo possibile di DMSO che diventa tossico a temperatura ambiente. I campioni sono stati quindi trasferiti su piastre Petri contenenti substrato agarizzato (PDA, Difco e WPM) e incubati al buio alla temperatura di 22° C. Settimanalmente è stato misurato lo sviluppo diametrico delle colonie per paragonarlo a quello del corrispondente micelio fresco trapiantato al momento.

#### **7.2.4. Prove di verifica dell'infettività del micelio**

##### **Micorrizzazione di piantine con micelio crioconservato e fresco**

Con questa prova si è inteso verificare se la crioconservazione modifichi l'infettività dei miceli crioconservati rispetto a quelli freschi come risulta in alcuni casi riportati in letteratura (Chetverikova, 2009). A tal fine, il micelio di *T. borchii*, *T. aestivum* e *T. macrosporum* (Tabella 10) sviluppatosi in piastra dopo la crioconservazione è stato trasferito entro provette di vetro (200 ml) contenenti 70 ml di vermiculite imbibita di WPM liquido. Sono stati preparati 6 provette/ceppo crioconservato, per un totale di 18 provette ed un uguale numero con micelio fresco dei medesimi ceppi. Il micelio è stato mantenuto in tali condizioni per due mesi, al fine di permettere la colonizzazione del substrato. Parallelamente, nel gennaio del 2011, un centinaio di ghiande di *Quercus cerris*, previa

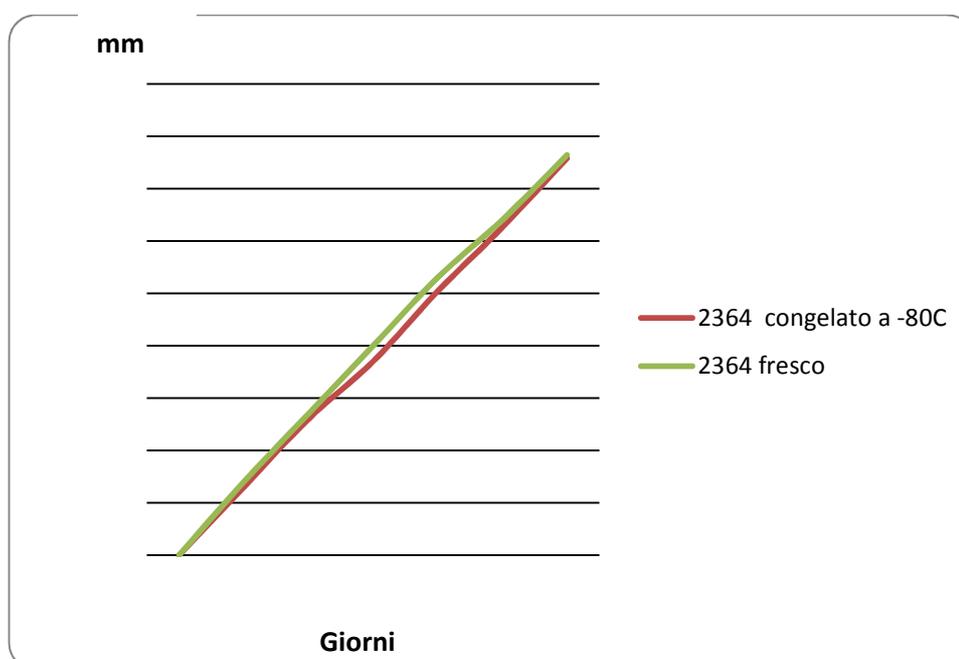
sterilizzazione superficiale in soluzione acquosa di NaClO (1%) per 15', sono state seminate in un substrato sterile di vermiculite e torba in parti eguali (Bencivenga, 1982). A 2 mesi dalla semina, sono state scelte casualmente 42 piantine inoculate con le provette di micelio precedentemente preparato (6 piantine per tesi) e trapiantate in vasetti di plastica (250 ml) riempiti con vermiculite/sabbia/terriccio vulcanico (30:30:40) sterili. Parallelamente sono stati allestiti 6 vasetti testimone con piantine non inoculate. Le piante sono state allevate in serra per 6 mesi (da marzo ad agosto 2011) ed irrigate settimanalmente.

Nei mesi di settembre - ottobre e novembre, cioè a sei - sette mesi dall'inoculo, le piantine sono state svasate e gli apparati radicali sono stati lavati delicatamente sotto acqua corrente. Il grado di micorrizzazione è stato valutato al microscopio stereoscopico (20x).

### **7.3. Risultati e discussione**

#### **7.3.1. Ultracongelamento a -80°C**

L'ultracongelamento a -80 °C ha fornito risultati positivi col micelio di *T. borchii* giorni mentre per *T. aestivum* e *T. macrosporum* non si è ottenuto alcuno sviluppo miceliare. Nel caso di *T. borchii* la lag-phase è durata 8 giorni: superata tale fase, l'accrescimento radiale della colonie fungina è stato di circa 5-6 mm/settimana (fig. 20), assumendo un andamento esponenziale del tutto simile a quello osservate per il micelio fresco. Questi risultati rispecchiano le difficoltà di mantenimento in coltura pura per *T. aestivum* e *T. macrosporum* in assenza della pianta simbionte. Il mancato sviluppo, dopo l'ultracongelamento, osservato per *T. aestivum* e per *T. macrosporum* può anche esser spiegato col fatto che queste due specie sono molto più sensibili al congelamento, caratteristica che si aggiunge alle maggiori difficoltà di coltivarle in vitro rispetto a *T. borchii*.



**Fig. 20-** Grafico dei valori medi d'accrescimento del micelio di *T. borchii* ultracongelato e fresco, una volta superata la lag-phase.

### 7.3.2. Crioconservazione in azoto liquido (-196°C)

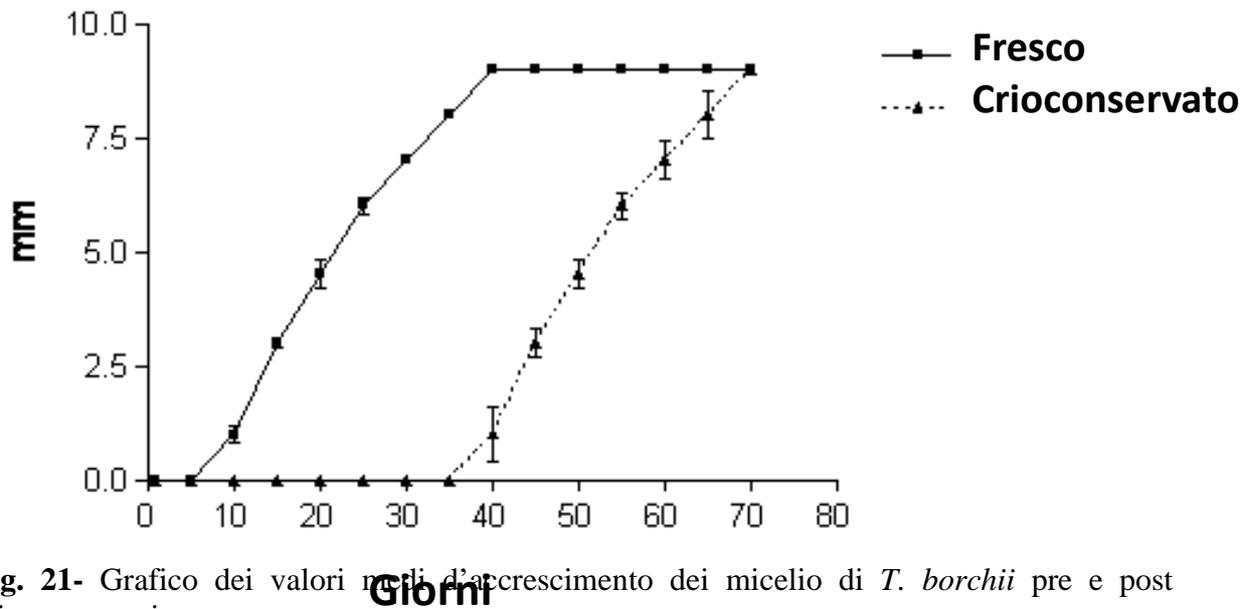
In Tabella 11 vengono presentati i risultati relativi ai valori di accrescimento ifale dei miceli crioconservati paragonati a quelli dei corrispondenti miceli freschi. I risultati dimostrano che non sussistono differenze nell'accrescimento, indipendentemente dalla specie di *Tuber* coinvolta. Inoltre, tale assenza di differenze si manifesta fin dalla prima data di controllo dopo la lag fase e si protrae per tutta la durata della prova.

**Tabella 11-** Valori medi di accrescimento del micelio crioconservato e fresco di *T. borchii*, *T. aestivum* e *T. macrosporum* (valori medi di 5 ripetizioni).

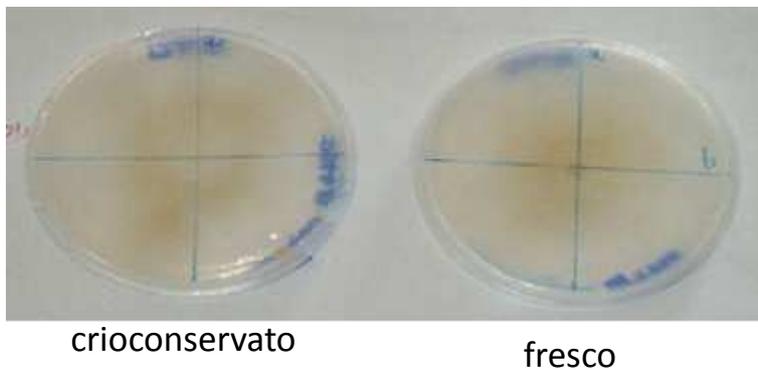
	2364		Tmc1		Tae2	
	crioconservato	fresco	crioconservato	fresco	crioconservato	fresco
<b>Lag-phase (gg)</b>	35	6	70	10	70	10
<b>Controlli (gg)</b>						
<b>1</b>	0	0	0	0	0	0
<b>4</b>	10,5	9,88	2,75	3,5	1,88	2,3
<b>7</b>	19,38	19,3	8,13	9,3	9	9
<b>11</b>	26,3	26,63	14,3	15,12	12,8	12,38
<b>14</b>	33,8	33,95	17,8	18,62	17,3	16
<b>18</b>	40,5	40,88	23,6	23,75	20,33	19,63
<b>21</b>	49,8	49,3	28	28,23	31,3	29,63

<b>25</b>	59,13	60,08	32,3	32,75	36,8	36,88
<b>28</b>	66,88	66,93	36,63	37,37	44	44,3
<b>32</b>	76	76,88	42,5	42,5	48,13	49,53
<b>35</b>	82,3	82,63	47,88	48,5	54,13	55
<b>39</b>	85	85	54,3	55,12	61,38	62,3

Tuttavia, occorre sottolineare che marcate differenze, tra micelio crioconservato e fresco, sono state rilevate in termini di lag fase, per tutte e tre le specie di *Tuber*: il micelio crioconservato di *T. borchii* ha sviluppato dopo 35 giorni (fig. 21), mentre quello crioconservato di *T. aestivum* e *T. macrosporum* ha iniziato a svilupparsi dopo 70 giorni. Questo risultato porterebbe a concludere che l'azione del freddo interferisce notevolmente sulla lag fase del micelio conseguente ad un periodo di "risveglio" delle vie metaboliche cellulari. Tuttavia, una volta superata tale fase, la crescita del micelio crioconservato e fresco è uguale (Fig. 21 e 22). Occorre anche dire che differenze, in termini di lunghezza della lag fase tra queste tre specie di tartufo si possono notare, anche se in scala ridotta, nel trapianto dei miceli in condizioni standard. Infatti, durante i trapianti di routine per mantenimento delle colture madri, il micelio di *T. borchii* impiega dai 5 ai 7 giorni prima di sviluppare nuove ife mentre per *T. aestivum* e *T. macrosporum* questo lasso di tempo dura circa 10 giorni. Anche Nagai *et al.* (2000) arrivarono, infatti, alla conclusione che il successo della crioconservazione di colture pure varia da specie a specie e da ceppo a ceppo.



**Fig. 21-** Grafico dei valori medi d'accrescimento dei micelio di *T. borchii* pre e post crioconservazione



**Fig. 22 -** Confronto dopo 52 giorni di incubazione di micelio di *T.borchii* crioconservato e fresco

In passato la crioconservazione aveva dato risultati positivi con spore di funghi micorrizici arbuscolari, ma quando si cercò di applicarla alla conservazione di campioni di micelio, la sua applicazione presentò notevoli difficoltà in quanto le strutture ifali risultarono essere più sensibili al congelamento (Homolka *et al.*, 2001). Infatti, i cristalli di ghiaccio si formano preferenzialmente nel punto in cui la parete ifale è stata danneggiata, danni che possono verificarsi durante la preparazione del campione (Tan e van Ingen, 2004) e che possono portare a scarsa sopravvivenza o a uno scarso recupero dopo il congelamento (Corbery e Le Tacon, 1997; Smith, 1998; Danell e Flygh, 2002). Nel nostro caso, pare che tali danni non si

siano verificati, in quanto l'accrescimento e la macro e micromorfologia delle colonie fungine crioconservate in azoto liquido sono risultate uguali a quelle delle colonie testimone non congelate e mantenute attivamente in coltura su substrato agarizzato (Tabella 11 e Figura 22). I risultati ottenuti modificando il metodo di Danell e Flygh (2002) tramite l'aggiunta di saccarosio, dimostrano che è possibile crioconservare i miceli di *Tuber* spp., nonostante le notevoli difficoltà nel mantenere in coltura pura questi funghi, superiori a quelle che si incontrano per altre specie fungina ectomicorrizica (Iotti *et al.*, 2002; Iotti *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda i risultati inerenti le prove di micorrizzazione con micelio fresco e crioconservato, 6 mesi dall'inoculazione solo le piante inoculate con *T. borchii* sono risultate micorrizzate (percentuali di micorrizzazione del 46.5% e 33.5%, rispettivamente per l'inoculo col micelio fresco e crioconservato). Al contrario, per le piante inoculate col micelio di *T. aestivum* e *T. macrosporum* non sono state ottenute micorrize, né con l'inoculo fresco né con quello crioconservato. Quest'ultimo dato confermerebbe i risultati ottenuti nella precedente prova di ultracongelamento: trattandosi di ceppi isolati 12 anni prima del loro impiego ed essendo stati sottoposti a molteplici rinnovi, questi hanno perso la capacità di infettare le radici delle piante ospiti. Osservazioni simili sono state riportate anche da Marx e Daniel (1976), da Thomson *et al.*, (1993) e da Giltrap, (1981) i quali hanno dimostrato una diminuzione della capacità, da parte di diverse specie fungine, di formare associazioni ECM dopo molti anni di trapianto delle stesse, difficoltà associata anche a una riduzione della loro capacità di miglioramento della crescita delle piante. I risultati positivi ottenuti con le piantine inoculate col micelio crioconservato di *T. borchii* confermano la validità della tecnica di crioconservazione da noi messa a punto.

#### **7.4. Conclusioni**

In base ai nostri risultati, possiamo affermare che la crioconservazione in azoto liquido è una tecnica di successo anche quando si tratta di micelio di funghi ectomicorrizici particolarmente difficili da coltivare, quali quelli del genere *Tuber*, aprendo la possibilità alla creazione di una prima banca di germoplasma di tartufo per poterne conservare la biodiversità e per possibili sviluppi biotecnologici.

Al contrario la tecnica dell'ultracongelamento adottata in questa sperimentazione non si è dimostrata idonea per conservare i miceli indipendentemente dalla specie in oggetto, anche se questa è interessante poichè la lag fase risulta essere notevolmente ridotta. Probabilmente ulteriori sviluppi di tale tecnica potrà consentire di essere applicata a qualsiasi specie di tartufo.

## **Conclusioni generali**

Il lavoro svolto durante questa tesi di dottorato pone le basi per lo sviluppo di nuove biotecnologie della micorrizzazione di piante forestali con tartufi pregiati ed in particolare con *T. magnatum*.

Le tecniche di inoculazione miceliare che si stanno mettendo a punto presso i laboratori del Centro di Micologia dell'Università di Bologna rappresentano un approccio innovativo per la produzione di piante micorrizzate tradizionalmente ottenute con metodo di inoculazione sporale (Hall *et al.*, 2007). Oltre a contenere i costi relativi alla produzione delle piante micorrizzate, poiché si evita l'acquisto di tartufi, si evitano inquinamenti, spesso dovuti ad altre specie di *Tuber* che possono incidentalmente finire nell'inoculo e soprattutto si apre la strada di effettuare una selezione genetica.

Durante questa tesi abbiamo descritto ottenuto e descritto le micorrize di *T. magnatum* e quelle di altri tartufi "bianchi" (*T. oligospermum*, *T. borchii*) con caratteristiche morfologiche simili che spesso vengono mescolati o addirittura commercializzati al posto di quelli del tartufo bianco pregiato (Zambonelli e Iotti, 2005). Abbiamo disegnato primer specie specifici in grado di identificare *T. oligospermum* e abbiamo verificato la possibilità di utilizzare questi primers in PCR multiplex con quelli di *T. magnatum* e di *T. borchii* al fine di "scovare" sia frodi nella commercializzazione degli ascomi sia eventuali contaminazioni nelle piante micorrizzate. Quest'ultimo aspetto è particolarmente importante in quanto piante micorrizzate con *T. oligospermum*, specie esotica comune nel nord Africa, potrebbero diffondersi nei nostri ambienti tartufigeni con conseguente rischio di contaminazione ecologica.

Per la prima volta durante lo svolgimento di questa tesi di dottorato siamo riusciti ad isolare e mantenere in coltura pura il micelio di *T. magnatum* e la sua identità è stata confermata mediante utilizzo di primer specie specifici. Fino ad ora i tentativi di isolamento effettuati erano falliti, in quanto le colture ottenute si perdevano al primo trapianto, oppure le colture ottenute appartenevano ad altre specie di *Tuber* come scoperto in seguito attraverso

identificazione molecolare (Mello *et al.*, 2001; Gregori, 2002). Tuttavia i miceli *T. magnatum* da noi isolati crescevano troppo lentamente per permetterne l'utilizzo in tecniche di inoculazione miceliare. Abbiamo pertanto cercato alternative per migliorare il mezzo nutritivo per la crescita del micelio utilizzando: 1) fonti di carbonio diverse, 2) estratti radicali di nocciolo (una delle piante ospiti preferite dal tartufo), 3) diverse frazioni degli estratti radicali di nocciolo, 4) essudati di altri funghi del genere *Tuber*. Per queste prove abbiamo utilizzato sia un ceppo *T. magnatum* da noi isolato e un ceppo di *T. borchii*, specie modello per lo studio del tartufo *in vitro*. Da questi studi è emerso come gli estratti miceliari ma soprattutto gli estratti radicali siano in grado di stimolare la crescita miceliare del tartufo modello *T. borchii*. Non abbiamo tuttavia potuto apprezzare differenze significative fra le singole frazioni dell'estratto radicale. Questo incremento nella crescita del micelio di *T. borchii* in substrato arricchito con estratto radicale di nocciolo corrisponde ad un aumento dell'espressione di geni *CDC42* e *Rho-GDI* due geni legati alla crescita apicale polarizzata delle ife dei funghi filamentosi.

Nell'ambito di questa tesi abbiamo evidenziato come il mantenimento in coltura per numerosi anni di ceppi della specie modello *T. borchii* influenzi negativamente la loro infettività nei confronti della pianta ospite (Coughlan e Piché, 2005). In questa tesi abbiamo pertanto perfezionato tecniche di crioconservazione di ceppi di *Tuber* spp. che, come è noto dalla letteratura (dati non pubblicati), permettono di mantenere stabili nel tempo le caratteristiche genetiche degli organismi animali e vegetali e che recentemente sono state applicate anche ai funghi (Smith, 1998; Danell e Flygh, 2002).

I risultati positivi da noi ottenuti con la crioconservazione pongono le basi per la creazione di una banca di germoplasma di specie del genere *Tuber* che, oltre a rappresentare una riserva di materiale genetico da cui selezionare i ceppi più idonei per l'inoculazione miceliare a seconda delle diverse combinazioni pianta ospite-ambiente, costituisce l'unico mezzo

efficace per la salvaguardia della biodiversità dei tartufi. Il patrimonio tartuficolo italiano ed europeo infatti si sta impoverendo a causa della raccolta indiscriminata. Inoltre anche se per molte specie di tartufo la coltivazione è possibile (eccetto, per ora, *T. magnatum*) essa non tiene conto delle caratteristiche genetiche del materiale fungino di base, con un rischio di impoverimento della sua diversità (Hall e Zambonelli, 2012).

## **Bibliografia**

**Ahmed M., Abdel-Azeem. 2010.** The history, fungal biodiversity, conservation, and future perspectives for mycology in Egypt. *IMA Fungus*. 2: 123–142.

**Alexopoulos C J., Mims C W., Blackwell M. 1996.** *Introductory Mycology* (4th Ed.). John Wiley and Sons, New York, USA. 868p.

**Alvarado P., Moreno G., anjón J M. 2012.** Comparison between *Tuber gennadii* and *T. oligospermum* lineages reveals the existence of the new species *T. cistophilum* (Tuberaceae, Pezizales). *Mycologia*, 10: 11-254.

**Alvin K L. 1960.** Further conifers of the pinaceae from the Wealden formation of Belgium. In institut Royal des sciences naturelles de Belgique, *Memoirs*. 146: 1-39.

**Amicucci A., Guidi C., Zambonelli A., Potenza L., Stocchi V. 2000.** Multiplex PCR for the identification of white Tuber species. *FEMS Microbiology letters*, 189: 265-269.

**Amicucci A., Zambonelli A., Giomaro G., Potenza L., Stocchi V. 1998 .** Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *Tuber* by species-specific ITS primers. *Molecular Ecology*, 7: 273–277.

**Amicucci A., Zambonelli A., Guidi C., Stocchi V. 2001.** Morphological and molecular characterization of *Pulvinula constellatio* ecyomycorrhizae. *FEMS Microbiology letters*, 194: 121-125.

**Amicucci A., Zambonelli A., Iotti M., Polidori E., Menotta M., Saltarelli R., Potenza L., Stocchi V. 2010.** Morphological and Molecular Modifications Induced by Different Carbohydrate Sources in *Tuber borchii*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 18: 120-128

**Andrade S A L., Mazzaferai P., Schiavinato M A., Silveira A P D. 2009.** Arbuscular mycorrhizal association in coffee. *Journal of Agricultural Science*, 147: 105–115.

**Azcón R., Gomez M., Tobar R. 1996.** Physiological and nutritional responses by *Lactuca sativa* L. to nitrogen sources and mycorrhizal fungi under drought conditions. *Biol. Fert. Soils*, 22: 156–161.

**Azcon-Aguilar C., Barea J M. 1996 .** Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne fungi: an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457-464.

**Barbieri E., Ceccaroli P., Saltarelli R., Guidi C., Potenza L., Basaglia M., Fontana F., Baldan E., Casella S., Ryahi O., Zambonelli A., Stocchi V. 2010.** New evidence for nitrogen fixation within the Italian white truffle *Tuber magnatum*. *Fungal Biol* 114:936–942.

**Bécard G., Douds, D D., Pfeffer P E. 1992.** Extensive In vitro growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO<sub>2</sub> and flavonols. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:821-825.

**Bécard G., Piché Y., 1990.** Physiological factors determining vesicular-arbuscular mycorrhizal formation in host and nonhost Ri T-DNA transformed roots. *Can. J. Bot.* 68:1260-1264.

**Beard G., Taylor L.P., Douds D D Jr., Pfeffer P E., Doner L W. 1995.** Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 8: 252-258.

**Bedini S., Pellegrino E., Argese E., Giovannetti M. 2004** . Miglioramento del suolo e biostabilizzazione di metalli pesanti mediati da glomalina. 14th Meeting of the Italian Society of Ecology, 4-6 October 2004, Siena.

**Bencivenga M., Di Massimo G., Donnini D., Baciarelli F L. 2009.** The cultivation of Truffles in Italy. *Acta Botanica Yunnanica*. Suppl. XVI - 021- 08.

**Bencivenga M., Tanfulli M., Donni D. 1997.** Micorrizzazione di *Quercus Cerris* L. con *Tuber oligospermum* (Tul. et Tul.) Trappe. *Mic. Ital*, 3: 89 – 93.

**Berbee M L., Taylor J W. 1993.** Dating the evolutionary radiation of the true fungi. In *Canadian Journal of Botany*. 71:1114-1127.

**Bonfante P. 2001.** At the interface between mycorrhizal fungi and plants: The structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. In the *Mycota IX Fungal Associations*. Ed. B Hock, Springer Verlag, Berlin. Germany. 45-61.

**Bonuso E., Iotti M., Macri A., Zambonelli A. 2006.** Approccio innovativo per l'identificazione molecolare di funghi filamentosi. *Micologia Italiana*, n. 3.

**Bonuso E., Zambonelli A., Bergemann S., Iotti M., Garbelotto M. 2010.** Multilocus phylogenetic and coalescent analyses identify two cryptic species in the Italian bianchetto truffle, *Tuber borchii* Vittad. *Conserv Genet* ,11:1453–1466.

**Buee M., Martin F. 2009.** Method for obtaining *Tuber magnatum* mycelium and mycelium obtained by means of the method. Pub. No.: WO/2009/136049 International Application No: PCT/FR2009/050582 [<http://www.wipo.int/patentscope/search/en/WO2009136049>].

**Buee M., Rossignol M., Jauneau A., Ranjeva R., Becard G. 2000** . The presymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molec Plant Microbe Interact* 13:693–698.

**Buscot F., Munch J C., Charcosset J Y., Gardes M., Nehls U., Hampp R. 2000.** Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiol*. 24: 601-614

**Cassidy J R., Moore D., Lu B C., Pukkila P J. 1984.** Unusual organization and lack of recombination in the ribosomal RNA genes of *Coprinus cinereus*. *Current Genetics*, 8: 607-613.

**Ceccaroli P., Buffalini M., Saltarelli R., Barbieri E., Polidori E., Ottonello S., Kohler A., Tisserant E., Martin F., Stocchi V. 2011.** Genomic profiling of carbohydrate metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *New Phytologist*. 189: 751-764.

**Chabot S., Bel-Rhliid R., Chénevert R., Piché Y. 1992.** Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO<sub>2</sub> enriched conditions. *New Phytol*. 122:461-467.

**Chatin G A., 1892.** La truffe: botanique de la truffe et des plantes truffiaeres-sol-climat-pays producteurs-conserves-prêparations culinaires. Baillièrre, Paris.

**Chetverikova E P. 2009.** The Problem of Stability of Organisms after Cryopreservation (Fungi as Example) Biophysics. 54: 626–630

**Chevalier G., GRENTE J., Poollaksek A. 1973.** Obtention de mycorhizes de différents *Tuber* par synthèse à partir de spores en conditions gnotoxéniques et à partir de cultures pures du mycélium an conditions axéniques et gnotoxéniques. Ann Phytopatho, 15: 107-108.

**Chevalier G. 1973 .** Synthèse axénique des mycorhizes de *Tuber brumale*Vitt. a partir de cultures pures du champignon. Ann Phytopathol5: 163-182.

**Ciccarelli A. 1564.** Opusculum de Tuberibus.

**Coleman M D., Bledsoe C., Smit B A. 1990.** Root hydraulic conductivity and xylem saplevel of zeating riboside and abscisic acid in ectomicorrhiza Douglas fir seedling. New Phytol. 115 : 275 – 284.

**Corbery Y., Le Tacon F. 1997.** Storage of ectomycorrhizal fungi by freezing. Annales de Sciences forestières 54 : 211-217.

**Corpet F. 1988.** “Multiple sequence alignment with hierarchical clustering” Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890.

**Coughlan AP., Piche Y. 2005.** Cistus incanus root organ cultures: a valuable tool for studying mycorrhizal associations. In: Declerck S, Strullu DG, Fortin JA (eds) In vitro culture of mycorrhizas. Soil biology series. Springer, Berlin, 235–252.

**Dalpé Y. 2005.** Les mycorhizes : un outil de protection des plantes mais non une panacée. Phytoprotection, 86: 53-59.

**Damm U., Woudenberg J H C., Cannon P F., Crous P W. 2009.** Colletotrichum species with curved conidia from herbaceous hosts. Fungal Diversity 39: 45–87.

**Danell E., Flygh G. 2002.** Cryopreservation of the ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*, Mycological Research 106: 1340–1342.

**De Borsch. 1780.** Lettres sur les truffes du piémont, Milan. 51p.

**Dechamplain N., Gosselin L. 2002.** Les champignons mycorhiziens (PISTES) (CRBF) /Université Laval.

**Dehne H W. 1982.** Interaction between vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. Phytopathology 72:1115–1119.

**Dereuddre J., Gazeau C. 1992.** Les végétaux et les très basses températures, Les végétaux et le Froid, Ed Herman. 107-175

- Dixon R K., Buschena C A. 1988.** Response of ectomycorrhizal *Pinus banksiana* and *Picea glauca* to heavy metals in soil. *Plant Soil*, 105: 265-271
- Douet J P., Castroviejo M., Mabru D., Chevalier G., Dupre C., Bergognoux F., Ricard J M., Medina B. 2004.** Rapid molecular typing of *Tuber melanosporum*, *T. brumale* and *T. indicum* from tree seedlings and canned truffles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379: 668-673.
- Fontana A. 1971.** Il micelio di *Tuber melanosporum* Vittad. In coltura pura. *Allionia* 17: 19 – 23.
- Fracchia S., Sampedro I., Scervino J M., Garcia-Romera I., Ocampo J A., Godeas A. 2004.** Influence of saprobe funghi and their exudates on arbuscular mycorrhizal symbioses. *Symbiosis*, 36: 169-182
- Francolini F. 1931.** Tartufi coltura e rimboschimenti. Federazione italiana dei consorzi agrari, Piacenza.
- Frank A B. 1885.** Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft* 3: 128–145.
- Frey-Klett P., Chavatte M., Clause M L., Courier S., Le Roux C., Raaijmakers J., Martinotti M G., Pierrat J C., Garbaye J. 2005.** Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizospherefluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165: 317–328.
- Frey-Klett P., Pierrot J G., Garbaye J. 1997.** Location and survival of mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* during establishment of ectomycorrhizal symbiosis between *Laccaria bicolor* and *Douglas Fir*. *Applied and environmental Microbiology*, 63: 139-144.
- Garcia-Montero L G., Dfaz P., Di Massimo G., Garcia-Abril A. 2010.** A review of research on Chinese Tuber species, *Mycological Progress* 9: 315-335.
- Gardes M., Bruns T D. 1993.** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113–118
- Gibelli G. 1879.** “La malattia del Castagno”. *Bollettino Comizio Agrario Modena*.
- Gibelli G. 1883.** “Nuovi studi sulla malattia del castagno detta dell’inchostro”. *Memorie Acc. Sc. Bologna*, 4: 287-314.
- Giltrap N J. 1981.** Formation of primordia and immature fruiting bodies by edomycorrhizal fungi in culture. *Transactions of the British Mycological Society* 77:204-205.
- Giomaro G., Zambonelli A., Sisti D., Cecchini M., Evangelista V., Stocchi V. 2000.** Anatomical and morphological characterization of mycorrhizas of five different strains of *Tuber borchii*Vittad. *Mycorrhiza* 10: 107 – 114.
- Graham J H. 1986.** Citrus mycorrhizae: potential benefits and interactions with pathogens. *HortScience* 21: 1302-1306.

**Gregori G L. 2002.** Problems and expectations with the cultivation of *Tuber magnatum*. In: Hall, I.R., Wang, Y., Danell, E., Zambonelli, A., eds. *Edible Mycorrhizal Mushrooms and Their Cultivation: Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*. Christchurch, New Zealand, 3–5 July 2001, CD-ROM. Christchurch, New Zealand, Institute for Crop and Food Research Limited.

**Grove T S., Le Tacon. 1993.** Mycorrhiza in plantation forestry. In *Advances Plant Pathology*. 9 :191-227.

**Guehl J M., Garbaye J., Wartinger A M. 1992 .** The effects of ectomycorrhizal status on plant-water relations and sensitivity of leaf gas exchange to soil drought in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedling. In: Read, D J., Lewis D H., Fitter A H., Alexander I J. (Eds), *Mycorrhizas in Ecosystems*. CAB International, UK, PP. 323-332.

**HacsKaylo E. 1973.** Carbohydrate physiology of ectomycorrhizae. In: *Ectomycorrhizae: their Ecology and physiology* (ed. G. C. Marks and T. T. Kozlowski), Academic Press, New York and London: 207 - 230.

**Hall I R., Brown G T., Zambonelli A. 2007.** *Taming the Truffle: The History, Lore and Science of the Ultimate Mushroom*. Timber Press, Portland.

**Hall I R., Zambonelli A. 2012.** The cultivation of mycorrhizal mushrooms - still the next frontier! In: J. Zhang, H Wang & M Chen (Eds). *Mushroom Science XVIII*. Beijing, China Agricultural Press. Pp 16-27.

**Hall IR., Haslam W. 2013.** Truffle cultivation in the southern hemisphere. In: *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms*, Zambonelli A. and Bonito G.M. (eds.), *Soil Biology* 34. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI10.1007/978-3-642-33823-6-11.

**Hall J L. 2002 .** Cellular mechanism for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental botany* 53: 111.

**Hansen K., Pfister D H. 2006.** Systematics of the Pezizomycetes – the operculate discomycetes. *Micologia*, 98: 1029 – 1040.

**Hawksworth D L. 1991.** The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* 95:641-655.

**Hawksworth D L. 1993.** The tropical fungal biota: Census, pertinence, prophylaxis, and prognosis. Pages 265-293 in: *Aspects of Tropical Mycology*. S. Isaac, J. S. Frankland, R. Watling, and A. J. S. Whalley, eds. Cambridge University Press, Cambridge.

**Hawksworth D L., Rossman A Y. 1997.** Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology* 87:888-891.

**Hazan I, Liu H. 2002.** Hyphal tip-associated localization of Cdc42 is F-actin dependent in *Candida albicans*. *Euk Cell*, 1:856-864

**Heywood V H. 1995.** *Global Biodiversity Assessment*. Cambridge University Press, Cambridge.

**Hibbett D S., Binder M., Bischoff J F., Blackwell M., Cannon P F, Eriksson O E., Huhndorf S., James T., Kirk P M., Luecking R., et al. 2007.** A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*.111:509–547.

**Hiltner L. 1904.** Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unterbesonderes Berücksichtigung der Grundlagen und Brauche. *ARDtschLasdwrtGesBerl* 98: 59-78.

**Hodge A. 2000.** Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza, *FEMS Microbiology Ecology* 32.

**Hodge A., Robinson D., Fitter A H. 2000.** An arbuscular mycorrhizal inoculum enhances root proliferation in, but not nitrogen capture from, nutrient-rich patches in the soil. *New Phytologist* 145: 575–584.

**Homolka L., Lisà L., Eichlerová I., Nerud F. 2001.** Cryopreservation of basidiomycete strains using perlite. *Journal of Microbiological Methods* 47: 307-313.

**Hwang S W. 1960.** Effects of ultra-low temperatures on the viability of selected fungus strains. *Mycologia* 52: 527–529.

**Hyde K D., Bahkali A H., Moslem M A. 2010.** Fungi – an unusual source of cosmetics. *Fungal Diversity* 43: 1–9.

**Iotti M. 2002.** Rapporti fra funghi ectomicorrizici, pianta ospite ed ambiente. Tesi di dottorato in Patologia Vegetale – XIV°. Università degli studi di Bologna.

**Iotti M., Amicucci A., Stocchi V., Zambonelli A. 2002.** Morphological and molecular characterization of mycelia of some Tuber species in pure culture. *New Phytologist* 155: 499-505.

**Iotti M., Zambonelli A . 2006.** A quick and precise technique for identifying ectomycorrhizas by PCR. *Mycol Res* 110: 60–65.

**Iotti M., Leopardi M., Oddis M., Salerni E., Baraldi E., Zambonelli A. 2012.** Development and validation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Tuber magnatum* in soil. *BMC Microbiology*, 12:93

**Jennings D.H., Lysek G. 1996.** Fungal biology: understanding the fungal lifestyle. (Bios Scientific publishers eds).

**Karwa A., Varma A., Rai M. 2011.** Edible ectomycorrhizal fungi: cultivation, conservation and challenges. In: Ray M, Varma A (eds), *Soil biology 25: Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 429-453.

**Kitamoto Y., Suzuki A., Shimada S., Yamanaka K. 2002.** A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience*, 43: 143–149.

**Lamhamedi M S., Bernier PY., Fortin J A. 1992.** Growth, nutrition and response to water

- stress of *Pinus pinaster* inoculated with ten dikaryotic strains of *Pisolithus* sp. *Tree Physiol.* 10: 153-167.
- Lefevre C. 2013.** Native and cultivated truffles of north America. In: *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms*, Zambonelli A. and Bonito G.M. (eds.), *Soil Biology* 34. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI10.1007/978-3-642-33823-6-12.
- Leonardi M., Iotti M., Oddis M., Lalli G., Pacioni G., Leonardi P., Maccherini S., Perini C., Salerni E., Zambonelli A. 2013.** Assessment of ectomycorrhizal fungal communities in the natural habitats of *Tuber magnatum* (Ascomycota, Pezizales). *Mycorrhiza*, 0474:7.
- Leyval C., Turnau K., Haselwandter K. 1997.** Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7: 139-153.
- Linser A., Cazzara L., Barbieri G. 2006.** Rizobatteri promotori di crescita, una nuova opportunità per l'agricoltura sostenibile. *Fertilitas Agrorum* 1: 65-75.
- Lovelock L. 1953.** The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing, *Biochim Biophys Acta.* vol 11: 28-36
- Mamoun M., Olivier J M. 1991.** Effect of carbon and nitrogen sources on in vitro growth of *Tuber melanosporum* Vittad. Application to mycelia biomass production. *Aronomie* 11:521-527.
- Mannozi Torini L. 1976.** Manuale di tartufi coltura: tartufi e tartufi coltura in Italia. Edagricole, Bologna, 1976.
- Martin F., Kohler A., Murat C., Balestrini R., Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, Porcel B, Rubini A, Amicucci A, Amselem J, Anthouard V, Arcioni S, Artiguenave F, Aury JM, Ballario P, Bolchi A, Brenna A, Brun A, Buée M, Cantarel B, Chevalier G, Couloux A, Da Silva C, Denoeud F, Duplessis S, Ghignone S, Hilselberger B, Iotti M, Marçais B, Mello A, Miranda M, Pacioni G, Quesneville H, Riccioni C, Ruotolo R, Splivallo R, Stocchi V, Tisserant E, Viscomi AR, Zambonelli A, Zampieri E, Henrissat B, Lebrun MH, Paolocci F, Bonfante P, Ottonello S, Wincker P. 2010.** Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464 (7291):1033-8.
- Martin F., Tagu D. 1999.** Developmental biology of a Plant-Fungus Symbiosis: the Ectomycorrhiza. In *Mycorrhiza. Structure, function, molecular biology and biotechnology*. Varma, A., and Hock, B. (eds.) Heidelebrg: Springer-Verlag, pp. 51-73.
- Marx D H., Daniel W J. 1976.** Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage. *Canadian Journal of Microbiology* 22:338-341.
- Mattirolo o. 1928.** La tartufi coltura e il rimboschimento. Tipo-lito L. Checchini.
- Mazliak P. 1999.** Les effets du froid sur les biomembranes, dans les végétaux et le froid, Ed herman., p 3-26

- Melin E., Nilsson H. 1952.** Transport of labelled nitrogen from an ammonium source to pine seedlings through mycorrhizal mycelium. *Svensk Botanisk Tidskrift* 46, 281-285.
- Melin E., Nilsson H. 1953.** Transfer of labelled nitrogen from glutamic acid to pine seedlings through the mycelium of *Boletus variegatus* (S.W.) Fr. *Nature* 171, 434.
- Melin E., Nilsson H. 1958.** Translocation of nutrient elements through mycorrhizal mycelium to pine seedlings. *Botaniska Notiser* 111, 251-256.
- Mello A., Fontana A., Meotto F., Comandini O., Bonfante P. 2001.** Molecular and morphological characterization of *Tuber magnatum* mycorrhizas in a long-term survey. *Microbiol Res*, 155:279–284.
- Mello A., Vizzini A., Longato S., Rollo F., Bonfante P et Trappe J M. 2000.** *Tuber borchii* versus *Tuber maculatum*: neotype studies and Dna analyses. *Mycologia* 92: 326-331.
- Menotta M., Amicucci A., Basili G., Polidori E., Stocchi V., Rivero F. 2008.** Molecular and functional characterization of a Rho GDP dissociation inhibitor in the filamentous fungus *Tuber borchii* *BMC Microbiology*, 8:5
- Menotta M., Amicucci A., Sisti D., Giocchini A.M., Stocchi V. 2004.** Differential gene expression during pre-symbiotic interaction between *Tuber borchii* Vittad. and *Tilia americana* L. *Curr Genet*, 46: 158–165.
- Menotta M., Amicucci A., Basili G., Rivero F., Polidori E., Sisti D., Stocchi V. 2007 .** Molecular characterisation of the small GTPase CDC42 in the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. *Protoplasma*, 231:227-237.
- Meyer F H. 1973.** Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In: Marks, G.C. and Kozlowski, T.T., (Eds.) *Ectomycorrhizae*.
- Mischiati P., Fontana A. 1993,** *In vitro* culture of *Tuber magnatum* mycelium isolated from mycorrhizas. *Mycological Research*, 97: 40-44.
- Moigno M. 1856.** Analyses publiées dans le cosmos et reproduite dans les annales Forestières (n° 11 novembre 1856
- Molina R. 1994.** The Role of Mycorrhizal Symbioses in the Health of Giant Redwoods and Other Forest Ecosystems. USDA Forest Service Gen. Tech. Rep. PSW-151.
- Molina R., Massicotte H., Trappe J M. 1992.** specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis community-ecological consequences and practical implications. In *Mycorrhizal Functioning*, ed. M.F. Allen. Chapman and hall, London, UK. 357-423.
- Morte A., Lovisolo C., Schubert A. 2000.** Effect of drought stress on growth and water relations of the mycorrhizal association *Helianthemum almeriense*-*Terfezia claveryi*. *Mycorrhiza* 10 : 115–119

- Morandi D. 1996.** Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. *Plant and Soil*. 185, 241-251.
- Murat C., Vizzini A., Bonfante P., Mello A. 2005 .** Morphological and molecular typing of the below-ground fungal community in a natural *Tuber magnatum* truffle-ground. *FEMS Microbiol Lett* 245: 307-313.
- Murat C., Zampieri E., Vizzini A., Bonfante P. 2008.** Is the Perigord black truffle threatened by an invasive species? We dreaded it and it has happened!. *New Phytologist* 178: 699-702.
- Nagahashi G., Douds DD Jr. 2000.** Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycol Res* 104:1453-1464.
- Nagai T., Ideno A., Tsuge M., Oyanagi C., Oniki M., Kita K., Horita M., Aoki T., Kobayashi T., Tsuchiya K. 2000.** Preservation of fungi in an atmosphere over liquid nitrogen after uncontrolled freezing. *Microbiol. Cult. Coll.*, 16: 13–22.
- Nakasone K K., Peterson S W., Jong S C. 2004.** Preservation and distribution fungal cultures. In: Mueller GM, Bills GF & Foster MS (eds.). *Biodiversity of Fungi*, pp. 37-47. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Nehls U. 2008.** Mastering ectomycorrhizal symbiosis the impact of carbohydrates. *J Exp Bot*. 59:1097-1108.
- Obase K., Lee S Y., Chun K W., Lee J K. 2011.** Regeneration of ectomycorrhizal fungal isolates following deep freezer storage. *Mycobiology* 39: 133-136.
- Pacioni G. 2012.** Effeto del diradamento selettivo della copertura vegetale. In progetto *magnatum: Montoraggio delle Attività di Gestione delle tartufaie Naturali di Tuber magnatum* .
- Pacioni, G. 1986.** *La culture des truffes*. Vecchi Ed, PARIS, 125 p.
- Palmer J G., Hasckaylo E. 1970.** Ectomycorrhizal fungi in pure culture, I. Growth on single carbon sources. *Physiol Plantarum*. 23:1187-1197.
- Parguey Leduc A., Montant C., Kulifaj M. 1984.** “Structure et evolution de l’Ascocarpe du *Tuber melanosporum* (Vitt.) “. *C.R.Ac. Sc. Paris Tome* 299: 315-320.
- Pegler D N., Spooner B M., Young T W K. 1993.** *British truffles. A revision of British hypogeous fungi*. Royal Botanic Gardens, Kew press.
- Percudani R., Trevisi A., Zambonelli A., Ottonello S. 1999.** Molecular phylogeny of truffles ( *Pezizales: Terfeziaceae, Tuberaceae*) derived from nuclear rDNA sequence analysis. *Mol. Phylogenet. Evol*, 1: 169 – 180.
- Perrin R. 1985.** L’aptitude des mycorhizes à proteger les plantes contre les maladies: panacéeou chimère?.*Ann. Sc. For.*, 42(4): 453-470.
- Pico V. 1788.** "Melethemata inauguralia" (Torino).

**Piculell B., Hoeksema J., Thompson J. 2008.** Interactions of biotic and abiotic environmental factors in an ectomycorrhizal symbiosis, and the potential for selection mosaics, *BMC Biology*, 6:23.

**Pinochet J., Calvet C., Campruby A., Fernandez C. 1996 .** Interactions between migratory endoparasitic nematodes and arbuscular mycorrhizal fungi in perennial crops: a review. *Plant Soil* 185 : 183–190.

**Plassard C., Bonafos B., Touraine B. 2000.** Differential effects of mineral and organic N sources, and of ectomycorrhizal infection by *Hebeloma cylindrosporum*, on growth and N utilization in *Pinus pinaster*, *Plant Cell and Environment* 23:1195-1205.

**Podila G K., Zheng J., Balasubramanian S., Sundaram S., Hiremath S., Brand JH., Hymes MJ. 2002 .** Fungal gene expression in early symbiotic interaction between *Laccaria bicolor* and red pine. *Plant Soil*, 244:117-128.

**Pozo M J., Azcón-Aguilar C. 2007.** Un raveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 393–398.

**Read D J. 1999.** Mycorrhiza-the state of the art. In: *Mycorrhiza*, Varma A, Hock B, Springer Verlag, Eds, Berlin, Germany, p. 3-34.

**Redecker D. 2002.** New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil. *Research in Microbiology*. 153: 125-130.

**Repa'c' I. 2011.** Ectomycorrhizal inoculum and inoculation techniques. In: Rai R, Varma A (eds) *Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae*. Soil biology series. Springer, Berlin, pp 43-63.

**Richter D L. 2008.** Revival of saprotrophic and mycorrhizal basidiomycete cultures after 20 years in cold storage in sterile water. *Can J Microbiol* 54: 595-599.

**RiOUSset G., RiOUSset L., Chevalier G., Bardet M C. 2001.** *Truffe d'Europe et de la chine*. INRA Paris.

**Robert D., Roland J C. 1989.** *Biologie Végétale – caractéristiques et stratégie évolutive des plantes*, 1989

**Romanazzi 1 G., Musetti R., Marzachi C., Casati P. 2009.** Induction of resistance in the control of phytoplasma diseases. *Petria* 19 :113-129.

**Grove T S., Le Tacon. 1993.** Mycorrhiza in plantation forestry. In *Advances Plant Pathology*.9 :191-227.

**Rubini A., Paolocci F., Granetti B., Arcioni S. 2001.** Morphological characterization of molecular-typed *Tuber magnatum* ectomycorrhizae. *Mycorrhiza*, 11:179–185.

**Sbrana C., Bagnoli G., Bedini S., Filippi M., Giovanetti M., Nuti M P. 2000.** Adhesion to hyphal matrix and antifungal activity of pseudomonas strains isolated from *Tuber borchii* asocarps. *Canadian journal of microbiology*, 46: 259 - 268.

- Selegan M. 2009.** Study of different growth parameters in *T. brumale*. Ser. Biology, XII. 31-34.
- Selosse M A. 2000.** La Symbiose : structure et fonctions, rôle écologique et évolutif . Vuibert, Paris.
- Selosse M A., Bauer R., Moyersoen B. 2002.** Basal hymenomycetes belonging to the Sebacinaceae are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees. *New Phytologist* 155: 183–195.
- Selosse M A., Le Tacon F. 1998 .** The land flora: A phototroph – fungus partnership? *Trends in ecology and evolution* 13: 15-20.
- Singer R., Harris B. 1987.** *Mushrooms and Truffles: Botany, Cultivation and Utilization.* Koeltz, Koenigstein, Germany.
- Sisti D., Giomaro G., Zambonelli A., Rossi I., Ceccaroli P., Citterio B., Stocchi V., Benedetti PA. 1998.** In vitro mycorrhizal synthesis of micropropagated *Tilia platyphyllos* Scop. plantlets with *Tuber borchii* Vittad. mycelium in pure culture. *Acta Horticulturae* 457: 379–387.
- Sisti D., Mattucci M., Giovanna G. 2007.** Effet of some substances produced in the pre-symbiotic phase on the morphology of *Tuber borchii* Vittad. Mycelium. *Caryologia*, 60: 196-198.
- Smith D. 1998.** The use of cryopreservation in the *ex-situ* conservation of fungi. *CryoLetters* 19: 79-90.
- Smith S E., Read D J. 1997.** *Mycorrhizal Symbiosis* (second edition). Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Sun S., Wang J., Zhu L., Liao D., Gu M., Ren L., Kapulnik Y., Xu G. 2012.** An Active Factor from Tomato Root Exudates Plays an Important Role in Efficient Establishment of Mycorrhizal Symbiosis. *Mycorrhizal Symbiosis*. 7(8): 43385.
- Tan C S., van Ingen C W. 2004.** Preservation of Fungi and Yeasts. In: Fuller B, Lane N and Benson E. (eds), *Life in the Frozen state*. CRC Press, Boca Raton, pp. 277-297.
- Thomson B D., Malajczuk N., Grove T S., Hardy G E St J. 1993.** Improving the colonization capacity and effectiveness of ectomycorrhizal fungal cultures by association with a host plant and re-isolation. *Mycological research* 97: 839-844.
- Tibiletti E., Zambonelli A. 2000.** I Tartufi della provincia di Forlì-Cesena, Patron, Bologna.
- Toljander J F, Paul L, Lindahl B D, Elfstrand M, Finlay R D. 2007.** Influence of AM fungal exudates on bacterial community structure. *FEMS Microbiology Ecology* 61: 295-304.
- Trappe J M., Molina R., Luoma D L., Cázares C., Pilz D., Smith J E., Castellano M A., Miller M L., Trappe M. 2009.** Diversity, ecology and conservation of truffle fungi in

forests of the Pacific Northwest. USDA Forest Service, Pacific Northwest Research Station General Technical Report-GTR-772, Portland, OR. 195 pp.

**Trappe J M. 1979.** The orders, families and genera of hypogeous Ascomycotina (truffles and their relatives). *Mycotaxon* 9: 297- 340.

**Trinci A P J. 1973.** a study of the Kinetics of Hyphal Extension and Branch Initiation of Fungal Mycelia. *Journal of General Microbiology* 81: 225-236

**Tsai S M., Phillips D A. 1991.** Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1485-1488.

**Turnau K., Kottke I., Dexheimer J. 1996.** Toxic element filtering in *Rhizopogon roseolus* /*Pinus Sylvestri* mycorrhizas collected from calamine dumps. *Mycol Res* 100: 16-22.

**Uemura M., Steponkus P L. 1999.** Cold acclimation in plants : relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane, *J.Plant Res.* 112: 245-254

**Vierheilig H., Bago B., Albrecht C., Poulin M J., Piche Y. 1998.** Flavonoids and arbuscular mycorrhizal fungi. *Flavonoids in the Living System.* 439, 9-33.

**Vittadini C. 1800-1865.** *Monogr. Tuber.* [8J, 1-88. pl. 1-5. 1831.-*Monographia Tuberacearum.*

**Vittadini C. 1831.** *Monographia Tuberacearum.* Ed. Felicis Rusconi; Milano: 88 pag.

**Vogt K A., Publicover D A., Vogt D J. 1991.** A critique of the role of ectomycorrhizas in forest ecology. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 35: 171 - 190

**Vogt K A., Edmonds R L., Grier C C. 1981.** Biomass and nutrient concentrations of sporocarps produced by mycorrhizal and decomposer fungi in *Abies amabilis* stands, *Oecologia* 50: 170-175.

**Wang X. 2013.** Truffle cultivation in China. In: *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms*, Zambonelli A. and Bonito G.M. (eds.), *Soil Biology* 34. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI10.1007/978-3-642-33823-6-13.

**Whipps J M. 2004.** Prospect and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*, 82: 1198-1227.

**White T J., Bruns T D., Lee S B., Taylor J W. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.D. (Eds), *PCR protocols: a guide to methods and Applications.* Academic press, London, 315-322.

**Wilcox H E. 1991.** Mycorrhizae. In *Plant roots: the hidden half.* Waisel Y, E.A., Kafkafi U, Marcel Dekker (ed.) New York, 731-765.

**Wolfe J., Bryant G. 1999.** Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems, *Cryobiology.* 39: 103-129

**Xiao J H., Chen D X., Liu J W., Liu Z L., Wan W H., Fang N., Xiao Y., Qi Y., Liang Z Q. 2004.** Optimization of submerged culture requirements for the production of mycelial growth and exopolysaccharide by *Cordyceps jiangxiensis* JXPJ 0109.

**Zacchi L., Vaughan-Martini A., Angelici P. 2003.** Yeast distribution in a truffle-field ecosystem. *Ann Microbiol* 53: 275–282.

**Zambonelli A., Iotti M. 2005.** Appennino modenese. Terre Da Tartufo. Giorgio Mondadori, Milano.

**Zambonelli A., Iotti M., Amicucci A., Pisi A. 1999.** Caratterizzazione anato-morfologica delle micorrize di *Tuber maculatum* Vittad. su *Ostrya carpinifolia* Scop. *Micologia Italiana* 3: 29-35.

**Zambonelli A., Iotti M., Rossi I., Hall I. 2000.** Interactions between *Tuber borchii* and other ectomycorrhizal fungi in a field plantation. *Mycol. Res.* 104: 698-702.

**Zambonelli A., Iotti M. 2006.** The pure culture of *Tuber* mycelia and their use in the cultivation of the truffles. In KABAR, L. (Ed.) Actes du premier Symposium sur les Champignons hypogés du Bassin Méditerranéen, 6-8 aprile 2004. Rabat, Maroc, pp. 244-255.

**Zambonelli A., Pisi A., Tibiletti A. 1997.** Caratterizzazione anatomo-morfologica delle micorrize di *Tuber indicum* Cooke & Masee su *Pinus pinea* L. e *Quercus cerris* L. *Micologia Italiana*, 1: 29-36.

**Zambonelli A., Salomoni S., Pisi A. 1993.** Caratterizzazione anatomomorfologica delle micorrize di *Tuber* spp, su *Quercus pubescens* Wild. *Micol, Ital*, 22: 73-90.

**Zampieri E., Murat C., Cagnasso M., Bonfante P., Mello A. 2010.** Soil analysis reveals the presence of an extended mycelial network in a *Tuber magnatum* truffle ground. *FEMS Microbiol Ecol*, 71:43-49.