

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E AMBIENTE

CORSO DI LAUREA IN  
SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

**Influenza dei batteri del suolo sulla micorrizzazione e loro  
impatto sulla produzione tartuficola del *Tuber melanosporum***

*Impact of soil bacteria on mycorrhization and their influence on truffle  
production of Tuber Melanosporum*

Docente di riferimento  
Prof. *Luca Sella*

Laureando  
*Maria Paola Brescello*  
Matricola n.  
*2032615*

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

---



# INDICE

|                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUZIONE</b>                                                | <b>7</b>  |
| 1.1 Valenza gastronomica ed economica del tartufo                  | 7         |
| 1.2 La tartuficoltura                                              | 7         |
| <b>CAPITOLO 1</b>                                                  | <b>10</b> |
| 1.1 Le micorrize                                                   | 10        |
| 1.2 Lo scambio nutrizionale e vantaggi annessi alla micorizzazione | 12        |
| 1.3 Specie fungine appartenenti al genere <i>Tuber</i>             | 13        |
| <b>CAPITOLO 2</b>                                                  | <b>17</b> |
| 2.1 Tecniche di micorizzazione                                     | 17        |
| 2.2 Coltivazione del tartufo                                       | 18        |
| 2.2.1 Requisiti geo-pedo-climatici                                 | 18        |
| 2.2.2 Gestione agronomica                                          | 21        |
| <b>CAPITOLO 3</b>                                                  | <b>24</b> |
| 3.1 Batteri associati alle micorrize di <i>Tuber melanosporum</i>  | 24        |
| 3.2 Applicazione dei batteri per migliorare la tartuficoltura      | 25        |
| 3.2.1 <i>Tuber melanosporum</i> e <i>Quercus ilex</i>              | 25        |
| 3.2.2 <i>Tuber melanosporum</i> e <i>Quercus faginea</i>           | 27        |
| <b>CONCLUSIONI</b>                                                 | <b>30</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>                                                | <b>31</b> |
| 1.1 Bibliografia                                                   | 31        |
| 1.2 Sitografia                                                     | 31        |

## RIASSUNTO

*Tuber melanosporum* è un fungo ascomicete ipogeo che forma simbiosi ectomicorriziche (ECM) con diverse piante ospiti, dando luogo alla formazione di corpi fruttiferi commestibili di alto valore economico. Affinché la coltivazione del tartufo abbia successo, è fondamentale la qualità delle piante nella fase iniziale. Questa tesi prende considerazione alcune specie batteriche che collaborano al processo di simbiosi radicale promuovendo da un lato il grado di micorrizzazione, dall'altro lo sviluppo delle radici delle piante, motivo per cui risulta conveniente il loro utilizzo come trattamento per le piante inoculate con spore e propaguli miceliari del fungo.

## ABSTRACT

*Tuber melanosporum* is an underground fungus that belongs to the ascomycete group. It forms symbiotic relationships with the roots of various host plants, leading to the development of valuable edible fruiting bodies. The quality of the plants during the initial stage is crucial for successful truffle cultivation. This thesis explores certain bacterial species that contribute to the root symbiosis process. These bacteria enhance both the degree of mycorrhizal formation and the growth of plant roots. Consequently, their application as a treatment for plants inoculated with fungal spores and mycelial propagules proves beneficial.



# INTRODUZIONE

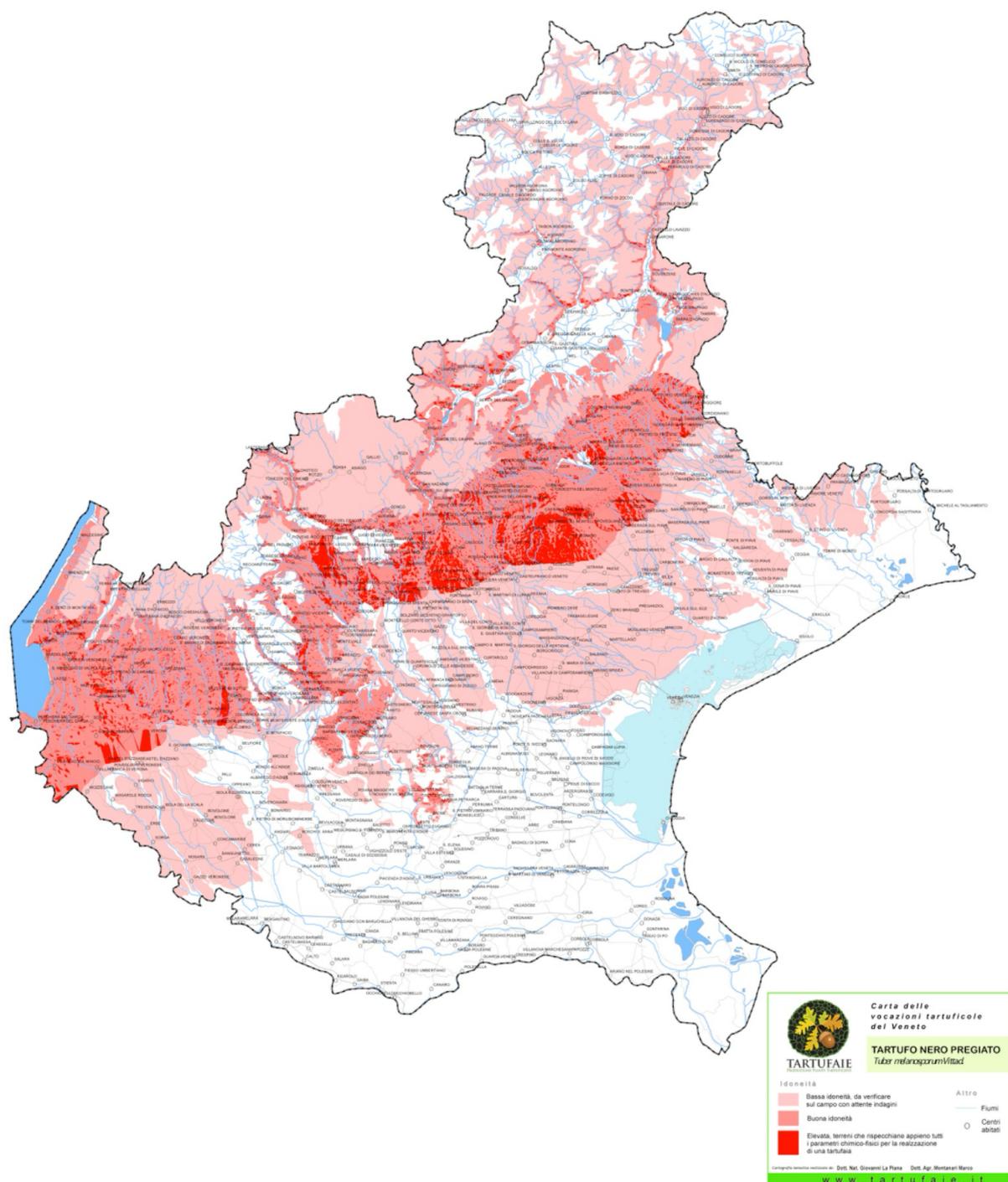
## 1.1 Valenza gastronomica ed economica del tartufo

I tartufi, funghi ipogei pregiati noti per il loro aroma intenso e il sapore inconfondibile, rappresentano un vero e proprio gioiello della gastronomia italiana e mondiale. La loro rarità, il complesso processo di raccolta e le loro caratteristiche organolettiche li rendono ingredienti esclusivi, ricercati e apprezzati sia come prodotto fresco che conservato per questo motivo la conoscenza del tartufo come prodotto di nicchia assume un forte ruolo strategico per lo sviluppo del turismo enogastronomico.

Oltre al loro pregio gastronomico, i tartufi ricoprono un ruolo significativo nell'economia di alcune regioni italiane (Piemonte, Umbria, Marche, Toscana e in misura minore Veneto) tant'è che rappresenta una fonte di reddito importante per comunità locali, soprattutto per quelle situate in zone rurali. Il prezzo elevato di questo prodotto è determinato da diversi fattori, tra cui la rarità, le difficoltà di raccolta, le caratteristiche organolettiche e la stagionalità. Il mercato dei tartufi è caratterizzato da prezzi medio elevati, che possono variare notevolmente in base alla specie, alla qualità e alle dimensioni del corpo fruttifero. Per esempio la pezzatura media, corrispondente a 8-20 g, viene venduta ai prezzi di 1.815,00 € e 933,00 € rispettivamente per il tartufo bianco pregiato o *Tuber magnatum*, più raro e pregiato, e per il tartufo nero pregiato o *Tuber melanosporum* (tartufo.com).

## 1.2 La tartuficoltura

È interessante osservare come nella regione Veneto le zone potenzialmente vocate per la coltivazione del tartufo siano numerose (fig. 1.1).



**Fig. 1.1** – *Carta delle vocazioni tartufigole del Veneto* (fonte: [www.tartufoie.it](http://www.tartufoie.it))

Accanto alla raccolta del tartufo “spontaneo”, attività regolamentata e soggetta a licenza come decretato dalla Legge Regionale 28.06.1988, n. 30: "Disciplina della raccolta, coltivazione e commercializzazione dei tartufi", si è sviluppata la tartufigicoltura. Una corretta coltivazione dei tartufi deve essere supportata dalla validità delle conoscenze tecnico-scientifiche e dalla razionalità e

produttività degli investimenti economici (E. Roca); essa può attuarsi se si dispone di alcuni prerequisiti:

- opportuna scelta del sito di impianto, dell'essenza forestale e della specie di tartufo simbiote;
- disponibilità di piante tartufigene ben micorrizzate con la specie di tartufo desiderata e possibilmente autoctone;
- conoscenza approfondita delle caratteristiche pedoclimatiche ed ecologiche della specie di tartufo da coltivare;
- competenza tecnica nell'impianto della tartufaia e nella gestione colturale;
- capacità di sviluppo del circuito commerciale e avvio di eventuali attività di trasformazione, al fine di conseguire maggiori benefici per l'intera comunità locale.

# CAPITOLO 1

## 1.1 Le micorrize

Il termine micorrizza deriva dal greco ed è composto da “mycos”, cioè fungo e “rhiza”, radice, e indica un’associazione mutualistica che si instaura tra il micelio di un fungo del terreno e l’apparato radicale della pianta ospite o “simbionte”. Questo stretto legame si manifesta con una fitta rete di ife associate alle radici e consente l’aumento dell’efficienza in termini di assorbimento di acqua e nutrienti, stimolando così la crescita della pianta. Ad oggi la percentuale di piante studiate per questo fenomeno è ridotta, solo il 5% delle monocotiledoni e il 23% delle dicotiledoni, ma è ragionevole affermare che gran parte delle piante terrestri possa essere interessate da questo tipo di simbiosi. I funghi sono organismi eterotrofi perciò devono ricavare la sostanza organica necessaria per soddisfare le loro funzioni vitali da altri microrganismi, ciò si realizza anche attraverso le micorrize dove il fungo preleva i composti di cui necessita grazie all’attività fotosintetica della pianta ospite e le mette a disposizione acqua, sali minerali ed altre sostanze utili che solo le ife fungine, in virtù delle loro ridotte dimensioni, possono raggiungere. La simbiosi, anche detta micorrizzazione, coinvolge in genere gli apici radicali delle radici secondarie perché sono quelle più ricche di capillizio e specializzate nell’assorbimento di nutrienti dal terreno. Talvolta questa simbiosi può sfociare in fenomeni di antagonismo, questo accade se il fungo sfrutta in modo eccessivo la pianta, soggetta quindi a infertilità, viceversa se è la pianta a prevalere il fungo può essere digerito secondo un comportamento mico-eterotrofo.

In base al grado di simbiosi e alla posizione del fungo rispetto alle cellule radicali, si differenziano tre tipologie di micorrize:

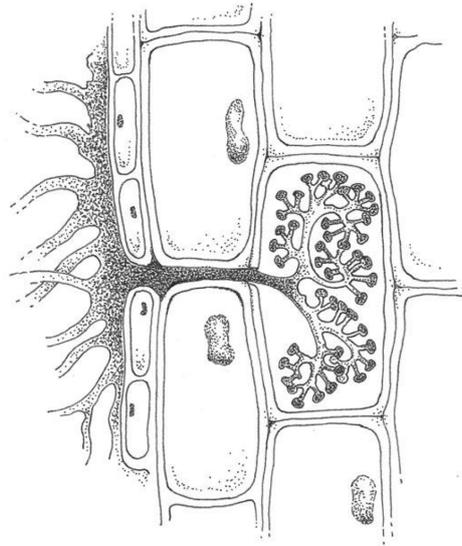
- Nelle ectomicorrize (ECM), il fungo, attirato chimicamente dagli essudati radicali della pianta, colonizza la superficie esterna avvolgendo l’apice radicale fino a costituire un rivestimento radicale, spesso diversi millimetri, detto mantello o micoclona e dalle cellule esterne di quest’ultima possono espandersi nel terreno circostante diverse strutture fungine quali cistidi e rizomorfe. In seguito i filamenti ifali penetrano le cellule epidermiche e corticali senza addentrarsi ulteriormente, formando il cosiddetto reticolo di Hartig che assolve alla funzione di passaggio e scambio di composti minerali ed organici fra i due simbionti. L’interazione tra la cellula fungina e quella radicale avviene mediante i setti trasversali, dotati di corpi di Woronin negli ascomiceti e di tipo doliporo nei basidiomiceti. Il fungo simbionte, per completare il processo di colonizzazione, impiega dai 4 ai 5 mesi ed interessa l’intera radice eccetto per la zona apicale dove sono localizzati i meristemi adibiti all’allungamento dell’apice radicale. La maggior parte delle piante arboree forestali presentano micorrize di

questo tipo e in caso di simbiosi con specie appartenenti al genere *Tuber* il corpo fruttifero che ne deriva è il tartufo.



**Fig. 1.1** – *Particolare di ectomicorriza: gli apici radicali micorrizzati sono spesso visibili ad occhio nudo, caratterizzati da una forma clavata*

- Le endomicorrize o micorrize vescicolo arbuscolari (VAM), a differenza delle precedenti, sono formate da ife esterne che non formano il mantello e si propagano all'interno della radice penetrando le cellule, per questo motivo non sono visibili ad occhio nudo ma solo al microscopio, se non per la presenza di un micelio esterno che si estende per qualche centimetro attorno alla radice. Nello specifico le ife del fungo simbionte entrano in contatto con la superficie della radice su cui formano degli appressori quindi penetrano nella corteccia dove, esternamente, formano avvolgimenti di cellule detti gomitoli mentre ancora più in profondità danno luogo a vescicole, strutture ovoidali con funzione di riserva, e arbuscoli, strutture intracellulari ramificate molto sottili, specializzate negli scambi tra i due organismi coinvolti nella simbiosi. Le micorrize vescicolo arbuscolari, rappresentano il tipo di micorriza più comune, si riscontrano infatti nell'80% delle piante terrestri appartenenti a molteplici specie vegetali, per la maggior parte erbacee, siano esse coltivate o spontanee, e sono prodotte da numerose specie di funghi.



**Fig. 1.2** – *Particolare di endomicorriza*

- Caratteri intermedi tra le due prime tipologie si riscontrano nelle ectoendomicorrize, distinte sia dal mantello esterno miceliare che dalla penetrazione intracellulare del micelio simbiote. La funzione di questo tipo di micorriza potrebbe essere quella di accumulo e riserva di sostanze nutritive che verranno restituite dal fungo alla pianta nel momento opportuno.

## **1.2 Lo scambio nutrizionale e vantaggi annessi alla micorizzazione**

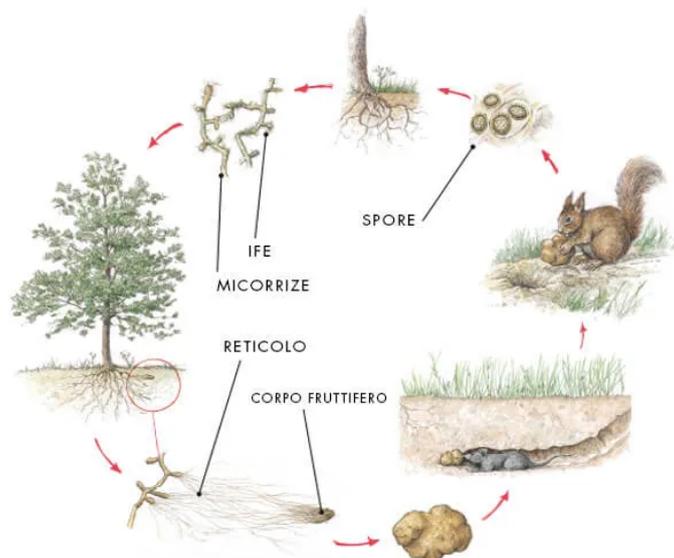
I due elementi protagonisti della simbiosi micorrizica, la pianta ospite e il fungo, si relazionano grazie a scambi nutrizionali a vantaggio di entrambi i simbionti. La prima conseguenza dell'infezione della radice con un fungo micorrizico è la formazione di un micelio extra radicale che si estende a partire dalle radici colonizzate creando un "apparato radicale ausiliario" dotato di maggiore superficie assorbente (fino a 1000 metri di micelio per ogni metro di radice) e capace di esplorare un maggior volume di suolo (Plassard *et al.*, 2000). Il fungo, in quanto organismo eterotrofo, localizza la sua parte vitale nel sottosuolo in modo da ricavare in corrispondenza delle radici delle piante superiori, oltre all'acqua, sostanze nutrienti già sintetizzate dalla pianta ospite e quindi pronte all'uso, in primis il carbonio prodotto mediante la fotosintesi. La simbiosi micorrizica svolge un ruolo chiave nell'assorbimento del fosforo, elemento quasi sempre presente nel terreno ma di difficile assorbimento da parte della pianta, viene prima assorbito dalle ife del micelio extra radicale e poi trasportato rapidamente attraverso le stesse fino a livello dell'arbuscolo dove, grazie ai trasportatori fosfato della pianta, raggiunge la cellula vegetale e l'efficienza del processo è tale che il fosforo assorbito da una radice micorrizata è maggiore dalle tre alle nove volte rispetto ad una non micorrizata. I composti azotati vengono anch'essi recuperati dal fungo micorrizico che ne aumenta

la biodisponibilità trasformandoli in molecole facilmente utilizzabili dalla pianta, va considerato che se l'azoto è abbondante la pianta riesce ad assumerlo in modo autonomo perciò la simbiosi stenta ad instaurarsi, ne consegue che dal punto di vista selettivo le piante micorrizzate godono di un vantaggio perchè sono in grado di adattarsi in terreni scarsi di elementi nutritivi. Altri macro e micro elementi il cui assorbimento è favorito sono potassio, calcio, magnesio, rame, zinco e ferro. Le micorrize sono avvantaggiate anche per altri motivi, a partire dalla capacità di tollerare stress di tipo biotico e abiotico. Nel primo caso la tolleranza è dovuta a fenomeni di competizione per lo spazio nei siti di infezione e per la disponibilità di nutrienti ma anche all'induzione di sistemi di difesa grazie all'attivazione di geni di resistenza a livello delle cellule in cui sono contenuti gli arbuscoli, tanto che si è stimata una riduzione tra il 55% e il 70% delle patologie fungine, ad opera delle micorrize (Dehne, 1982). In riferimento agli stress abiotici la micorizzazione garantisce una resistenza, entro certi limiti, alla salinità grazie alla limitazione dell'assorbimento di sodio e potassio presenti nel terreno, alla regolazione dell'apertura e chiusura stomatica e delle condizioni osmotiche della pianta. Anche lo stress idrico viene contenuto in virtù del notevole assorbimento di acqua garantito dalle ife che si estendono ben oltre le radici.

Gli aspetti sopra descritti, sommati tra loro, si traducono in una migliore crescita delle piante micorrizzate rispetto a quelle non micorrizzate.

### 1.3 Specie fungine appartenenti al genere *Tuber*

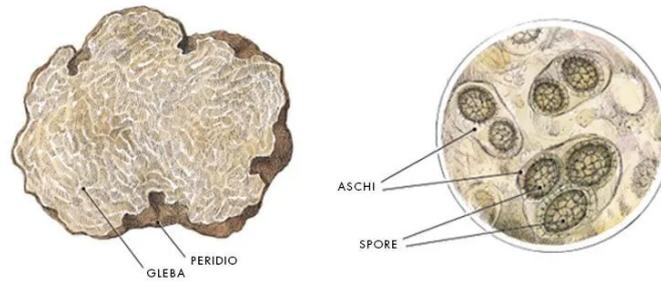
Secondo la classificazione micologica, il genere *Tuber* si colloca nella divisione degli *Ascomycota* in quanto avviene la produzione di ascospore e, poiché i carpofori sono sempre ipogei, il genere viene incluso nell'ordine *tuberales*.



**Fig. 1.3** – Schematizzazione del ciclo biologico di un tartufo (fonte: [www.tuber.it](http://www.tuber.it))

Il ciclo biologico si può considerare iniziato quando il carpoforo, decomposto a causa di fenomeni naturali o perché attaccato da microrganismi e animali, libera gli aschi e quindi le ascospore contenute al suo interno nel terreno che germineranno una volta manifestate le condizioni ideali, di norma in primavera perché la germinazione delle spore viene stimolata da un aumento di riscaldamento e umidità del suolo, dalla ripresa vegetativa delle piante simbiotiche e dalla differente produzione di essudati radicali. Le spore germinano emettendo un tubetto germinativo che durante la sua crescita origina il micelio primario, costituito da filamenti miceliali mononucleati. Questo micelio poi si ramifica creando una rete di ife sotterranee attraverso le particelle del suolo e grazie a fenomeni di anastomosi ifale i miceli primari derivanti da ascospore diverse danno luogo a miceli secondari, formati da filamenti miceliari contenenti due o più nuclei diversi tra loro. Quando il micelio secondario, durante il suo accrescimento, incontra le radici di una potenziale pianta simbiotica vi si associa formando le micorrize delle tre tipologie viste in precedenza. In risposta a stimoli di tipo metabolico legati alle condizioni ambientali in cui si trovano, le ife cessano di crescere e passano così dallo stato vegetativo a quello riproduttivo con la produzione dei carpofori.

Negli stadi iniziali il corpo fruttifero è costituito da un intreccio pressoché globoso di ife ma già alle dimensioni di 1 mm di diametro presenta la sua struttura caratteristica ovvero una gleba formata da un'alternanza di ife fertili e sterili e il peridio esterno, nel frattempo il carpoforo aumenta di dimensione e cambia il suo aspetto in base alla specie considerata. Nel caso del *Tuber melanosporum* le scaglie del peridio assumono dapprima una forma poligonale e bruna per poi diventare piramidali e nere, inoltre, ciascuna scaglia si divide a sua volta permettendo al periodo di accrescersi integro seguendo lo sviluppo della gleba al suo interno. La gleba anch'essa subisce dei cambiamenti, all'inizio è bianca ma presto compaiono delle venature di color marrone molto chiaro, si tratta delle ife sterili tra le quali in modo graduale compariranno ife fertili, di colore più scuro perché differenziano aschi e ascospore. Con la maturazione dell'ascocarpo le ife sterili vengono sempre più compresse dalla presenza degli aschi e di norma si interrompono in corrispondenza del peridio a meno che riescano a raggiungere l'esterno grazie a dei minuscoli fori presenti nel solco tra due scaglie adiacenti. Infine, una volta che le spore sono del tutto mature, il carpoforo si decompone liberandole nel terreno e così il ciclo biologico può ricominciare. La durata delle fasi appena descritte è variabile, per esempio, i carpofori di *Tuber melanosporum* si formano tra giugno e luglio e maturano non prima di novembre mentre il *Tuber magnatum Pico* compie un ciclo molto breve che si conclude in poche settimane.



**Fig. 1.3** – *Tartufo in sezione* (fonte: [ww.tuber.it](http://ww.tuber.it))

Nel mondo le specie di tartufi del genere *Tuber* sono 63, in Italia ne sono presenti 23 ma quelle di riferimento in quanto commestibili e quindi commerciabili in Italia sono 9:

- *Tuber magnatum* Pico (tartufo bianco d'Alba o bianco pregiato)
- *Tuber melanosporum* Vitt. (Tartufo nero di Norcia o nero pregiato)
- *Tuber magnatum* Pico (Tartufo Bianco d'Alba o bianco pregiato)
- *Tuber mesentericum* Vitt. (Tartufo nero di Bagnoli Irpino o mesenterico)
- *Tuber aestivum* Vitt. (Tartufo nero estivo o Scorzone)
- *Tuber aestivum* Vitt. fo. *uncinatum* Cha. (Tartufo uncinato)
- *Tuber borchii* Vitt. o *Tuber albidum* Pico (Bianchetto o Marzuolo)
- *Tuber brumale* Vitt. (Tartufo nero invernale)
- *Tuber brumale* Vitt. Fo. *moschatum* De Ferry (Tartufo moscato)
- *Tuber macrosporum* Vitt. (Tartufo nero liscio)

Altre specie facilmente reperibili nel nostro territorio ma non commestibili sono:

- *Tuber excavatum* Vitt.
- *Tuber rufum* Pico
- *Tuber regianum*

#### **1.4 Specie arboree e arbustive che sviluppano la simbiosi micorrizica con i tartufi**

La maggior parte delle piante si avvale della simbiosi micorrizica e le specie in grado di farlo appartengono a numerosi generi e famiglie. I tartufi sono un noto esempio tra i numerosi generi di funghi micorrizici e si associano in simbiosi con molteplici piante ospiti, in questo capitolo si riportano quelle di interesse ovvero le specie arboree ed arbustive che instaurano simbiosi con *Tuber melanosporum*. Questa specie di tartufo si distingue poiché la presenza di piante erbacee viene contenuta da parte di *Tuber melanosporum* grazie alla concorrenza per acqua e sostanze nutritive e all'azione fitotossica e antibiotica operata dal micelio che secreta marasmina, una sostanza che

inibisce la germinazione dei semi e lo sviluppo di erbe e arbusti con cui viene a contatto, dando luogo al cosiddetto “pianello” o “bruciata” ovvero un’area localizzata attorno alla pianta quasi priva di vegetazione erbacea. La produzione di marasmina non è costante durante lo sviluppo del tartufo, si concentra nella fase di attiva crescita del tallo e in quella di fruttificazione cioè da maggio ad agosto, motivo per cui alcune piante erbacee con ciclo vegetativo sfasato rispetto a questo periodo possono presentarsi sul pianello, tra queste sono tipiche: *Silene vulgaris* (strigolo), *Sanguisorba minor* (sanguisorba), *Anagallis foemina* (anagallide) e *Galeopsis angustifolia* (canapa selvatica). La pianta ospite con maggiore frequenza (80%) del tartufo nero pregiato è *Quercus pubescens* (roverella) seguita, in relazione alla zona geografica, da *Quercus ilex* (leccio), *Quercus cerris* (cerro), *Quercus robur* (rovere), *Quercus pedunculata* (farnia), *Tilia platyphyllos* (tiglio), *Corylus avellana* (nocciolo) e *Ostrya carpinifolia* (carpino nero). Spesso nelle tartufaie produttive si riscontra la presenza di vegetazione arbustiva che funge da indicatore della presenza di micorrize tartufigene, le specie rilevate con maggior frequenza sono: *Cornus mas* (corniolo), *Cornus sanguinea* (sanguinella), *Crataegus monogyna* (biancospino), *Rosa canina*, *Rubus caesius* (rovo), *Sambucus nigra* (sambuco), *Juniperus communis* (ginepro) e *Spartium junceum* (ginestra). Le specie appena elencate sono coinvolte nel mantenimento delle condizioni del suolo idonee alla simbiosi quali la conservazione dell’umidità superficiale e il controllo degli sbalzi termici.

## CAPITOLO 2

### 2.1 Tecniche di micorrizzazione

L'ottenimento di piante ben micorrizzate sta alla base del successo della coltivazione del tartufo e nel tempo le metodologie utilizzate per conseguire questo risultato si sono evolute. Ad oggi ci si avvale di tre strategie: l'inoculo di spore, l'inoculo miceliare (o vegetativo) e la colonizzazione radicale. Nel primo caso, quello dell'inoculo di spore, bisogna valutare la predisposizione della specie fungina all'inoculazione, condizione che dipende dalla reperibilità dei corpi fruttiferi, dalla produzione massiccia di spore e dalla colonizzazione rapida dell'apparato radicale della pianta ospite. Soddisfatti questi tre requisiti, l'inoculo di spore può essere utilizzato con successo nei vivai commerciali di diverse specie di *Tuber*, pratica ormai comune da 30 anni per produrre piante micorrizzate con *Tuber melanosporum*, *Tuber aestivum* e *Tuber borchii*. I vantaggi dati da questa tecnica stanno nella semplicità di esecuzione, nell'economicità del materiale e nei tempi richiesti ridotti. Le spore si ottengono sminuzzando il carpoforo manualmente con un mortaio oppure servendosi di un frullatore, il processo può essere facilitato aggiungendo acqua e particelle abrasive come la sabbia e la soluzione finale viene versata nella buca di impianto della giovane pianta oppure, per un risultato migliore, si fa assorbire la soluzione da vermiculite sterile, un substrato minerale che consente di posizionare l'inoculo attorno alle radici della pianta. La quantità di spore da fornire per pianta è variabile in relazione alla specie e alle condizioni ambientali, in genere si consigliano almeno un centinaio di spore per pianta (Weden 2004). Il carpoforo utilizzato può essere sia fresco che conservato e nel caso dei tartufi la conservazione è sempre richiesta sia perché non sempre la disponibilità del corpo fruttifero coincide con il momento dell'inoculo, sia perché risulta utile per ridurre i costi di produzione, tipicamente soggetti ad un andamento altalenante, e consiste nel mantenimento del carpoforo in sabbia sterile e umida a 4°C, condizione che mantiene inalterato il potenziale infettivo delle spore. L'aspetto negativo dell'inoculo di spore è la possibile presenza di ectomicorrize estranee che si stabiliscono sulle radici sostituendo in parte o del tutto la specie che si è interessati a coltivare, ciò accade spesso se si utilizzano quantità notevoli di corpi fruttiferi per la preparazione dell'inoculo e quando si utilizzano carpofori immaturi, responsabili di una negativa contaminazione dell'inoculo. Per questi motivi in molti paesi viene richiesta la verifica del materiale per l'inoculo che consiste nella sua analisi morfologica e molecolare.

Passando all'inoculo miceliare, questo si distingue per alcuni aspetti rispetto al precedente, in primis garantisce minori rischi di contaminazione inoltre non è soggetto a problemi di disponibilità e variazioni di prezzi, gode di un potenziale di infezione superiore e permette la tracciabilità genetica. Il materiale per la micorrizzazione si può ricavare a partire da spore, ectomicorrize o carpofori la cui

qualità, in termini di purezza e freschezza, influisce direttamente sul risultato del processo. Tra queste l'opzione più sfruttata è l'ultima poiché garantisce il minore rischio di contaminazione e la procedura è piuttosto semplice, consiste infatti nell'isolamento di frammenti molto piccoli (inferiori a 1 mm) di tessuto fungino, asportati dalle venature sterili della gleba e posti su piastre agarizzate, dalle quali si ricavano colture pure. Un aspetto di cui tener conto è che si lavora con ascomiceti eterotallici perciò bisogna unire due miceli diversi ma geneticamente compatibili per ottenere corpi fruttiferi fertili mediante riproduzione sessuata. Si prosegue quindi con la coltivazione del micelio, processo che richiede l'incubazione degli isolati al buio e alla temperatura di 20-22°C, dopo di che il micelio in attiva crescita, ricavato ai bordi della piastra agarizzata dove ci sono le ife più giovani, viene utilizzato per inoculare delle miscele di torba sterile e vermiculite umidificata e dopo 30-50 giorni sempre alle condizioni di buio e 20-22°C, l'inoculo vegetativo può essere trasferito attorno all'apparato radicale della pianta da micorrizzare che subirà una rapida ed uniforme colonizzazione.

La terza tecnica consiste nella cosiddetta colonizzazione o approssimazione radicale, utile soprattutto per le specie appartenenti al genere *Tuber* perché non si ricorre alla germinazione delle spore, passaggio che spesso comporta delle difficoltà. L'inoculo è costituito da piante, già micorrizzate con uno dei due metodi sopra descritti, che vengono coltivate circondate da giovani piante sterili cosicché gli apparati radicali siano in stretto contatto tra loro oppure si ricavano dei frammenti radicali dalla pianta micorrizzata, chiamata anche pianta madre, da inserire in vasi contenenti le piante non ancora infette. Le piante madri nel lungo termine sono soggette a fenomeni di contaminazione e per risolvere questo aspetto problematico da una parte vanno controllate spesso e in modo accurato per evitare la presenza di altri funghi micorrizici, dall'altra negli ultimi anni è stata sviluppata la possibilità di ottenere l'inoculo radicale in vitro. Questo procedimento offre numerosi vantaggi, tra cui la produzione di piante 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.

## **2.2 Coltivazione del tartufo**

### **2.2.1 Requisiti geo-pedo-climatici**

Coltivare il tartufo richiede un'attenta gestione dei molteplici fattori coinvolti quali il suolo, l'irrigazione, le erbe infestanti, il sito di impianto, il tipo e la qualità della pianta ospite ed eventuali avversità parassitarie. Ora si descriveranno le condizioni più idonee per il *Tuber melanosporum* che rispecchiano l'habitat naturale che ospita questa specie di tartufo.

La posizione geografica ove si intende installare una tartufaia è determinante ma dev'essere valutata in modo congiunto alle condizioni climatiche della zona, due parametri influenti sono

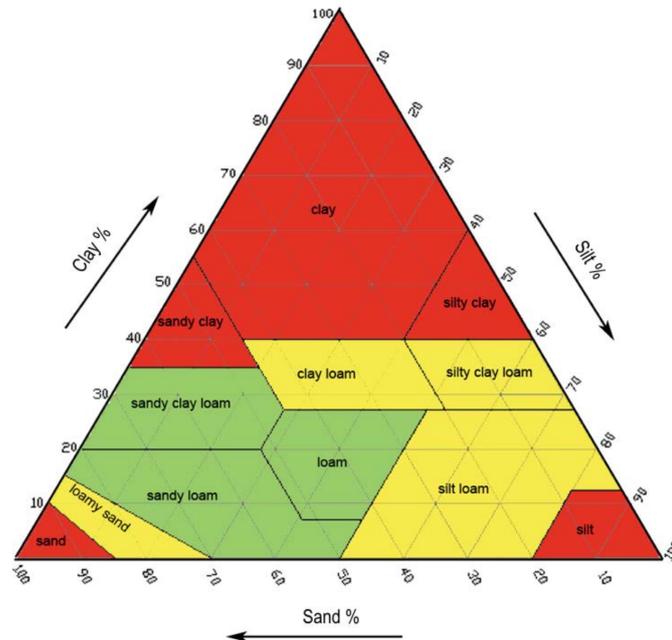
l'altitudine che può assumere valori molto variabili dai 600 agli 1800 metri s. l. m. e una minima pendenza del suolo, inferiore ai 15°, che garantisce il drenaggio del suolo. Il clima più adatto si distingue per marcati cambiamenti stagionali e da un breve periodo di aridità estiva, interrotto da fenomeni temporaleschi ma il tartufo nero pregiato tollera anche condizioni climatiche estreme, se occasionali. Sono quindi da evitare zone geografiche caratterizzate da climi con differenze stagionali minime, estati molto calde e inverni rigidi. Un aspetto di primaria importanza per una tartufaia coltivata produttiva è la disponibilità di acqua soprattutto durante la primavera e fino all'inizio dell'estate, quando le precipitazioni influiscono in modo decisivo sulla crescita del corpo fruttifero. Dai siti di tartufi naturali, l'intervallo di precipitazioni annuali osservato varia tra 485 e 1.500 mm/anno, con un minimo di 72 mm di pioggia durante i mesi estivi (Reyna 2000; Ricard 2003). I siti con precipitazioni più basse possono essere adatti per la coltivazione di tartufi neri se altri parametri del sito sono accettabili e un sistema di irrigazione affidabile può soddisfare le esigenze idriche durante i periodi secchi.

Passando alle temperature ideali, variano in relazione allo stadio di maturazione considerato: durante l'inverso, temperature inferiori ai -10°C per più di 5 giorni non sono accettabili, d'estate invece *Tuber melanosporum* può adattarsi a un clima con temperature medie massime mensili superiori a 24,8°C per un periodo di 4 mesi dell'anno. Se si considerano le giovani piante, studi svolti in vaso su piantine di *Quercus ilex* inoculate con *T. melanosporum* coltivate in 4 diversi potenziali idrici (Olivera et al. 2006) hanno dimostrato che con condizioni molto calde del suolo (35-40°C) si è osservato uno sviluppo micorrizico diminuito nelle piantine rispetto a quelle coltivate in condizioni più fresche o normali del suolo estivo (T° di 30-33°C); e nessuna quantità di irrigazione ha compensato la perdita micorrizica in condizioni estremamente elevate del suolo. Tuttavia, a temperature del suolo normali o più fresche, uno stress idrico moderato è stato favorevole poiché ha portato a uno sviluppo micorrizico maggiore. L'obiettivo è aiutare a moderare la temperatura del suolo in momenti di stress idrico. Una soluzione per questo problema è data dalla pacciamatura del suolo, utile a moderare la temperatura del suolo, fino alla profondità di 10-15 cm, durante tutto il periodo di coltivazione.

Per quanto riguarda i requisiti pedologici, il genere *Tuber* prospera in suoli calcarei e la pietrosità del suolo garantisce il buon drenaggio e l'aerazione del sito di coltivazione inoltre funge da regolatore della temperatura del suolo, diminuisce l'evaporazione estiva e protegge il terreno da fenomeni di compattazione ed erosione. Tuttavia un eccesso di pietre è sfavorevole soprattutto se il terreno è caratterizzato da una frazione argillosa bassa perché comporta un terreno asciutto troppo a lungo. Anche il pH assume un ruolo determinante nella coltivazione del tartufo, l'intervallo di riferimento per il *Tuber melanosporum* è alcalino, compreso tra i valori 7,5 e 8,5, e dato da un'abbondanza di

calcio scambiabile. Il carbonato di calcio è indispensabile per la crescita di questo tartufo perché rappresenta una fonte di riserva di cationi di scambio che contribuiscono alla regolazione del pH ed al mantenimento di una struttura equilibrata tra particelle fini e grossolane.

Le caratteristiche appena descritte suggeriscono quindi che il terreno ideale debba avere una tessitura di tipo argilloso, franco-sabbioso oppure franco-sabbioso-argilloso.



**Fig. 4.4** – Triangolo della tessitura del suolo con indicazioni per l’idoneità alla coltivazione del *Tuber melanosporum*, le aree verdi indicano la tessitura ottimale per la coltivazione, quelle gialle la tessitura adeguata, quelle rosse la tessitura non adatta (fonte: Fischer et al. 2017)

La quantità di sostanza organica presente nel sito di coltivazione scelto è un altro fattore da considerare in quanto contribuisce al miglioramento della struttura, collabora alla formazione di aggregati, aumenta la porosità e la capacità di scambio cationico, regola il pH e stimola l’attività biologica. Per questo parametro i valori raccomandati per la coltivazione del tartufo sono quelli compresi tra l’1,5% e l’8%. A proposito dell’attività biologica del suolo, un indice di interesse è il rapporto carbonio/azoto il cui valore dovrebbe risultare tra 8 e 15 per una coltivazione di successo.

Se consideriamo la richiesta di macronutrienti, di norma i suoli sono già dotati di quantità di nutrienti sufficienti per sostenere sia la crescita del fungo che della pianta ospite, i problemi sorgono quando le concentrazioni di nutrienti sono troppo elevate, spesso a causa dell’utilizzo di fertilizzanti che determinano un indesiderato calo del tasso di micorrizzazione poiché la pianta assorbe i nutrienti senza servirsi della simbiosi micorrizica che invece sfrutta quando la ricerca dei nutrienti è più difficoltosa, per questo motivo il contenuto di azoto organico e fosforo da mantenere è compreso tra

0,1 e 0,3% mentre per il potassio tra 0,01 e 0,03%. Infine la struttura del suolo più adatta è quella granulare o friabile, con aggregati stabili all'acqua inferiori a 4 mm.

### 2.2.2 Gestione agronomica

La coltivazione del tartufo richiede innanzitutto la preparazione del terreno, realizzata con operazioni di erpicatura volte a dissodare eventuali strati compatti per poi procedere con lavorazioni superficiali eseguite con ripuntatori e livellatori per una completa omogeneizzazione del terreno. Ciò va eseguito nei mesi estivi e autunnali che precedono la messa a dimora delle giovani piante e con terreno asciutto. In questa prima fase di coltivazione è necessario rimuovere tutte le radici della coltura precedente per evitare la proliferazione di funghi patogeni delle radici come *Armillaria sp.* che altrimenti potrebbero nuocere alla simbiosi micorrizica. Nel caso di coltivazione in suoli acidi, la preparazione del terreno richiede anche la correzione del pH, da calcolare in base alle caratteristiche pedologiche del sito scelto.

La messa a dimora è preceduta dalla scelta della specie della pianta ospite tra quelle citate nel capitolo 1.4 che deve avere un apparato radicale ben sviluppato e colonizzato con micorrize di *T. melanosporum*, non dovrebbe esserci alcuna traccia di micorrize diverse da quella d'interesse. Un altro fattore da valutare è la densità d'impianto che ancora una volta dipende dalla specie ospite e dalle caratteristiche del terreno, in genere la densità va mantenuta più bassa nelle aree con stagioni di crescita lunghe dove ci si aspetta una crescita annuale più elevata degli alberi. Inoltre, se si prevede di lavorare spesso il terreno, ad esempio per il controllo delle infestanti, è bene distanziare le piante di conseguenza, ad oggi i sestri d'impianto più frequenti sono 6x5, 6x6 o 7x5 che stabiliscono una densità di 200-330 piante/ha. A seconda del clima di ciascuna regione, la piantagione dovrebbe essere effettuata dall'inizio della stagione piovosa autunnale fino alla fine delle gelate primaverili per fare in modo che le giovani piante godano delle piogge naturali, prima dell'inizio dei mesi più secchi e caldi. La messa a dimora vera e propria viene eseguita manualmente: prima si forma un buco tanto grande da potere posizionare la pianta verticalmente con le radici ben disposte, da riempire poi fin sopra al colletto. In questa fase bisogna avere una particolare cura delle piantine, da proteggere con ripari per evitare che eventuali animali le danneggiano inoltre va scelta una finestra temporale esente da rischi di forti venti e gelate.

La gestione post-impianto della tartufaia va affrontata con altrettanta cura ed un primo segnale della crescita fungina è la comparsa della "bruciata" che può comparire tra il quarto e il settimo anno sebbene questa caratteristica non garantisce la produzione di tartufi. Fino a 6-10 anni dalla piantagione per seguire lo sviluppo del fungo si può valutare la crescita di micorrize a livello radicale altrimenti bisogna ricorrere all'analisi molecolare poiché non ci sono altri segnali a cui far riferimento

direttamente. Durante i primi 2-4 anni è bene mantenere l'area circostante le piante libera da infestanti per preservare la sopravvivenza delle piante stesse evitando fenomeni di competizione per acqua e nutrienti e al tempo stesso favorendo la crescita del micelio del *Tuber melanosporum*. Nelle fasi post-impianto le lavorazioni meccaniche del terreno vanno limitate ma da preferire rispetto a trattamenti erbicidi che potrebbero introdurre nel suolo sostanze chimiche tossiche per il micelio fungino, una valida alternativa è rappresentata dalla pacciamatura realizzata sia con materiali naturali come paglia che con teli in propilene bianchi o neri che ostacolano la germinazione e la capacità fotosintetica delle infestanti.

L'irrigazione è una pratica di primaria importanza nella coltivazione del tartufo e la sua gestione è delicata soprattutto durante i primi anni, considerato che un'irrigazione eccessiva può contribuire a una diminuzione dello stato di colonizzazione micorrizica e può favorire la colonizzazione indesiderata del sistema radicale da parte di altri funghi micorrizici. Il metodo più accurato per stimare i fabbisogni idrici nella fase di impianto e di pre-produzione è quello di misurare direttamente il potenziale idrico del frutteto che risulta ottimale quando rimane inferiore a  $-0,4$  MPa. Torna nuovamente utile la pacciamatura se le piante non possono essere irrigate per favorire la crescita del micelio trattenendo l'umidità del suolo. Durante la fase produttiva della tartufaia coltivata si raccomandano irrigatori a pioggia rispetto a quelli a pioggia, la massima produttività si ottiene irrigando fino alla capacità di campo e lasciando asciugare il suolo, ma evitando che il potenziale idrico scenda al di sotto di  $-1$  MPa per più di 2 settimane e mai al di sotto di  $-2$  MPa per più di 1 settimana, prima di annaffiare per tutta la stagione di crescita (Oliach et al. 2016).

Dato che la maggior parte dei suoli è già dotato di quantità sufficienti di nutrienti per lo sviluppo dei tartufi, il ricorso alla fertilizzazione si consiglia solo in caso di terreni particolarmente poveri, sulla base di analisi del suolo regolari per monitorare lo stato dei nutrienti del suolo per evitare di influenzare l'equilibrio della simbiosi micorrizica. Talvolta le piante possono manifestare sintomi di clorosi dovute a carenza di ferro, elemento disponibile a pH molto elevati, questo problema si può risolvere con l'applicazione fogliare di prodotti chelanti del ferro.

Per quanto riguarda la potatura, essa è funzionale alla formazione e al mantenimento di alberi di forma conica oppure ovale che consentono la ricezione di ottimali quantità di luce a livello basale, l'installazione di sistemi di irrigazione e un'efficiente raccolta dei tartufi. In prossimità degli anni di produzione, si dovrebbe limitare la crescita dell'albero evitando la chiusura della chioma e la sua espansione radicale, intensificando le operazioni di potatura ogni 2-3 anni.

Mantenere una tartufaia di *Tuber melanosporum* sana è un progetto a lungo termine che richiede una pianificazione ponderata e vigilanza per diversi decenni poiché ci sono molti fattori che possono contribuire a problemi di salute per l'albero ospite o per il tartufo in via di sviluppo nel sottosuolo. La

messa a dimora di giovani piante che non sono autoctone o provengono da popolazioni fuori sede di una particolare specie, esiste il rischio che gli alberi possano subire danni da muffa, gelate, insetti e siccità a causa di un cattivo adattamento alle condizioni climatiche, ai regimi di irrigazione e alle frequenti potature. Un altro fattore è la piantagione di monoculture su ampie aree di terreno. L'ecologia dei funghi ipogei coinvolge la dispersione delle spore da parte di insetti e mammiferi, esistono infatti molti organismi micofagi che consumano e disperdono le spore di tartufo, come i cinghiali, la mosca del tartufo (*Helomyza tuberivora*) e i coleotteri del tartufo (*Leiodes cinnamomea*), ma le loro popolazioni, come molti altri predatori naturali, possono proliferare in modo intenso quando c'è un'abbondanza di tartufi. Questi organismi sono responsabili della riduzione della produzione e della qualità dei tartufi, e altri possono minacciare la salute e la sopravvivenza degli alberi. Di particolare preoccupazione sono le infezioni da funghi del genere *Phytophthora* che possono infliggere gravi danni ai frutteti di tartufo e sono state recentemente rilevate in tutta Europa (Pérez-Sierra et al. 2013; Jung et al. 2016). Nella gestione della coltivazione del tartufo, non sono raccomandati attacchi aggressivi contro gli organismi offensivi poiché ogni trattamento applicato può influire sull'ecosistema del tartufo. Tuttavia, una corretta identificazione, il monitoraggio e gli interventi tempestivi possono promuovere la salute delle piantine, la qualità dei tartufi e la longevità del frutteto.

## CAPITOLO 3

### 3.1 Batteri associati alle micorrize di *Tuber melanosporum*

Gli elementi biotici dell'ambiente sono tanto importanti quanto quelli abiotici visti finora. Nell'ottica di una migliore coltivazione del tartufo, è richiesta un'adeguata consapevolezza sia delle condizioni ambientali e del suolo, sia degli elementi biotici che possono favorire l'insediamento della micorrizzazione e lo sviluppo del tartufo. In questo contesto, le comunità batteriche del suolo, un terzo partner nella simbiosi tra il fungo e la radice della pianta, sembrano svolgere un ruolo chiave nei complessi processi biologici di scambio che coinvolgono nutrienti e segnali dal suolo, dalle ife, dalle micorrize e dagli ascomi. I batteri hanno un impatto positivo sul funzionamento della simbiosi micorrizica, promuovono l'insediamento della simbiosi stimolando l'estensione miceliare, aumentando i contatti e la colonizzazione radice-fungo, facilitando la produzione di corpi fruttiferi e il loro processo di maturazione e riducendo l'impatto delle condizioni ambientali avverse sul micelio dei funghi micorrizici (Frey-Klett et al., 2007). Per i motivi appena elencati, questi batteri sono noti come batteri "helper" della micorrizzazione o MHB e alcuni possono avere ulteriori impatti benefici, come la stimolazione diretta della crescita delle piante e la protezione dai patogeni del suolo (Deveau e Labbè 2016). Quindi, il complesso ecosistema microbico del tartufo comprende tutti gli organismi (piante e funghi) e i microrganismi che vivono in una particolare nicchia in cui interagiscono in modi diversi a beneficio reciproco, stabilendo relazioni sinergiche e scambiando metaboliti.

È stato dimostrato che le specie di *Tuber* interagiscono con una popolazione microbica diversa in ogni fase del loro ciclo vitale ovvero nella fase vegetativa ma anche nella fase simbiotica e di fruttificazione. I ceppi di MHB identificati fino ad oggi appartengono a numerosi gruppi e generi batterici, come i Proteobatteri gram-negativi (*Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Rhizobium*), i Firmicutes gram-positivi (*Bacillus*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus*) e gli Actinomycetes gram-positivi (*Rhodococcus*, *Streptomyces* e *Arthrobacter*). Come si è potuto riscontrare in altre specie di tartufo, le parti interne ed esterne degli ascocarpi di *Tuber melanosporum* sono profondamente colonizzate da complesse comunità batteriche le cui composizioni sono variabili in relazione allo stadio di maturazione. Dagli studi svolti è emerso che diversi MHB, in particolare *Bacillus sp.* e *Pseudomonas sp.*, sono stati trovati dalle prime fasi della formazione micorrizica fino alla completa maturazione degli ascocarpi del tartufo nero pregiato.

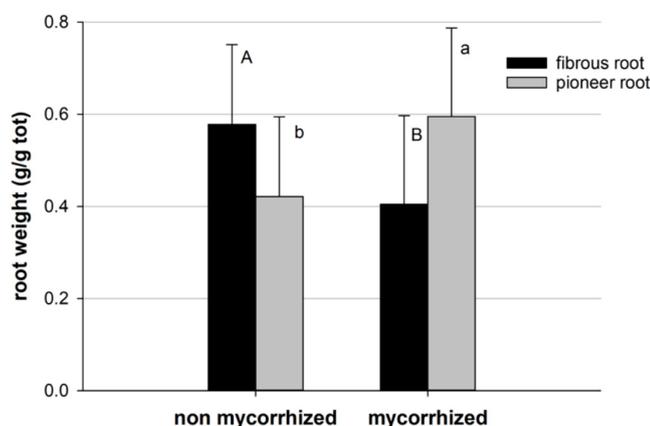
### 3.2 Applicazione dei batteri per migliorare la tartuficoltura

Le popolazioni batteriche associate ai corpi fruttiferi di *Tuber* possono assumere un interesse per il loro utilizzo biotecnologico durante il processo di micorrizzazione. A dimostrazione di ciò, vengono qui riportati gli aspetti più significativi di due casi sperimentali.

#### 3.2.1 *Tuber melanosporum* e *Quercus ilex*

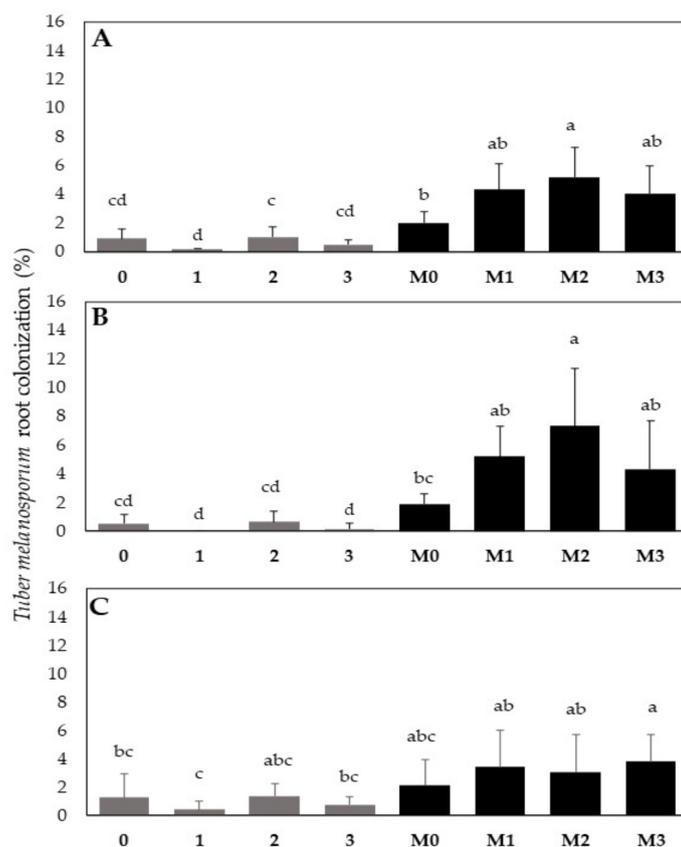
Gli studi svolti presso le università di Bologna, Urbino e delle Marche hanno analizzato l'effetto dell'inoculazione batterica sulla colonizzazione delle radici da parte di *Tuber melanosporum* e sulla crescita delle piantine di *Quercus ilex* valutando i seguenti aspetti: l'identità dei ceppi batterici inoculati, l'analisi delle micorrize, l'architettura radicale delle piante e il grado di micorrizzazione.

In primo luogo, l'identità dei batteri coltivati in mezzi liquidi o solidi è stata confermata mediante analisi RFLP della regione 16S. La permanenza dei batteri inoculati è stata verificata in campioni di radice utilizzando la PCR con primer specifici. La presenza delle micorrize ha avuto effetti diversi sui campioni di piante e la loro caratterizzazione è stata eseguita attraverso osservazioni al microscopio ottico e analisi molecolari. La biomassa radicale viene considerata distinta in radici pioniere e fibrose: le prime sono più lunghe, spesse, chiare e svolgono un ruolo di primaria importanza nella valutazione del sistema radicale in quanto responsabili dell'esplorazione di nuove aree da parte del fungo mentre le seconde sono corte, sottili, numerose ed è su queste che si sviluppa il micelio fungino. Il rapporto tra queste due tipologie di radice è indice dell'architettura radicale e, in generale, la presenza delle micorrize può influenzare in modo significativo queste caratteristiche. Infatti le misure della biomassa di radici pioniere e fibrose sono risultate statisticamente diverse tra piante micorrizzate e non micorrizzate, evidenziando una maggiore biomassa di radici fibrose nelle piante non micorrizzate (Fig. 3.1).



**Fig. 3.1** – Confronto tra la biomassa radicale delle radici pioniere e fibrose in piante micorrizzate e non micorrizzate (fonte: *Plants* 2024, 13(2), 224)

Per quanto riguarda il grado di colonizzazione di *Tuber melanosporum*, in tutti i trattamenti, a quattro mesi dal trattamento batterico, la percentuale media di colonizzazione è aumentata da 2,1 a 2,5 volte rispetto al trattamento senza inoculo batterico (fig. 3.2.A). Ciò indica un miglioramento generale della micorrizzazione delle radici di quercia a seguito del trattamento con formulazioni batteriche. Nel dettaglio, un miglioramento significativo è stato rilevato utilizzando una formulazione basata su *Pseudomonas spp.* (fig. 3.2.A), anche noti come batteri "helper" poiché in grado di stimolare la crescita miceliare, influenzare la relazione simbiotica tra la pianta ospite e i funghi e ridurre gli effetti dello stress ambientale sul micelio. E' stata indagata inoltre la capacità combinata di *Tuber melanosporum* e dei batteri inoculati di influenzare lo sviluppo delle piantine. Nelle fasi di sperimentazione è stato riscontrato un rapporto simile tra biomassa di germogli e radici, indicando una proporzione simile di ripartizione delle risorse tra parti aeree e sotterranee; nonostante ciò, le piantine co-inoculate con *Pseudomonas sp.* e *T. melanosporum* (M2) hanno prodotto le piante più piccole ma con la maggiore presenza di radici fibrose. Si osserva inoltre che la distribuzione del grado di micorrizzazione non è omogeneo sulla radice ma aumenta a livello delle punte delle radici prossimali (fig. 3.2.B) alla giunzione del germoglio mentre cala se si considerano le radici distali (fig. 3.2.C). In aggiunta *Tuber melanosporum* può influenzare la morfologia delle radici, stimolando la formazione di radici laterali e aumentando la ramificazione attraverso la produzione di metaboliti (Splivallo et al. 2019). Considerato che le radici fibrose e la simbiosi micorrizica richiedono entrambe carbonio dalla pianta per il loro sviluppo, ne consegue che, sotto il trattamento M2, il sistema radicale altamente micorrizzato compensa la riduzione della biomassa totale, a dimostrazione che i batteri possono avere un grande impatto sia sulla crescita delle piante che sull'associazione micorrizica.



**Fig. 3.2** – Effetto delle diverse formulazioni batteriche sulla colonizzazione delle radici da parte di *Tuber melanosporum*. Il tasso di colonizzazione rilevato su: (A) le punte totali delle radici dell'apparato radicale; (B) la punta della radice prossimale al colletto radicale; (C) le punte distali delle radici. Nota: le piante inoculate solo con batteri includono quanto segue. 0: vuoto, 1: *Bradyrhizobium* sp., 2: *Pseudomonas* sp., 3: *Bradyrhizobium* sp. + *Pseudomonas* sp. Le piante inoculate con entrambi *T. melanosporum* e miscele batteriche includono M0, M1 M2 e M3 (fonte: *Plants* 2024, 13(2), 224)

### 3.2.2 *Tuber melanosporum* e *Quercus faginea*

L'utilizzo di alcuni MHB per promuovere la colonizzazione radicale delle radici da parte di *Tuber melanosporum* e la crescita di piante di *Quercus faginea* è stato studiato in modo sperimentale presso i dipartimenti di scienze forestali in Spagna (*Forests* 2020, 11(8), 792), nazione che rappresenta un importante centro per la produzione tartufigola.

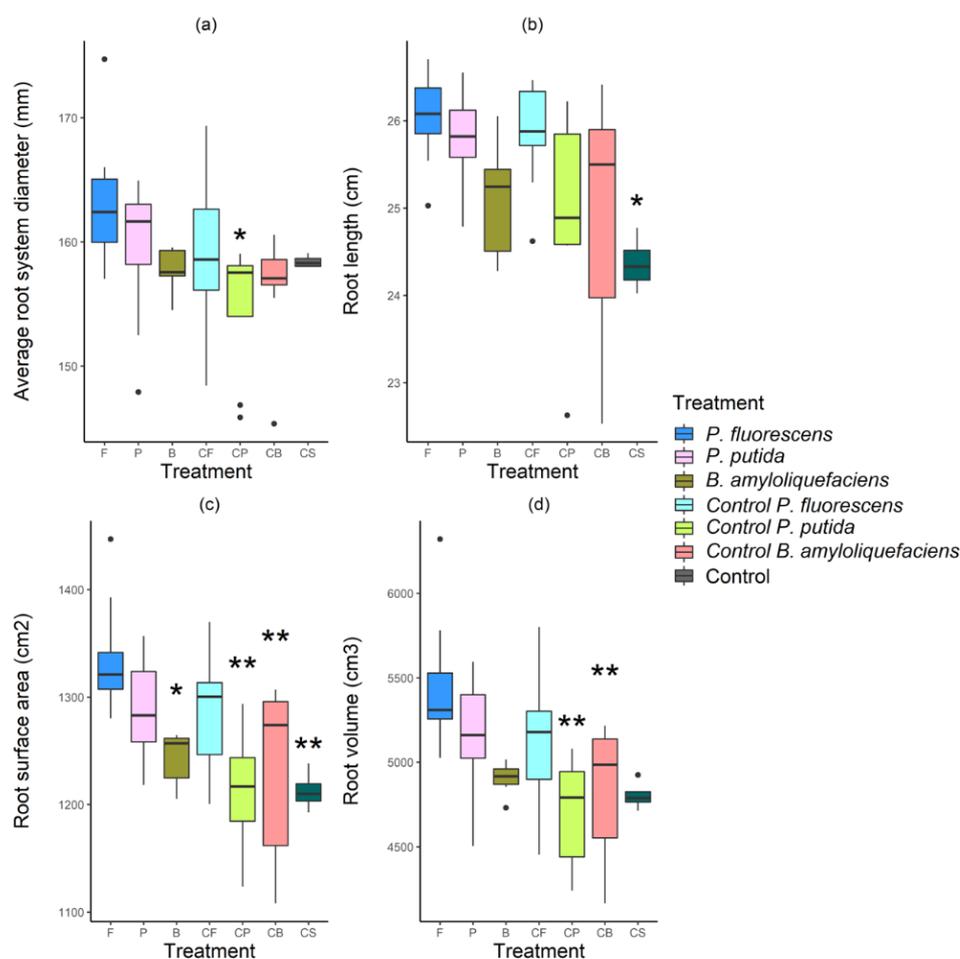
Gli obiettivi del lavoro di Piñuela et al. sono analoghi al precedente; infatti è stata valutata l'influenza di tre diversi MHB sul tasso di colonizzazione di piante di *Q. faginea* e sulla crescita radicale delle stesse. I batteri selezionati sono stati *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* e *Bacillus amyloliquefaciens*, quest'ultimo preso in considerazione perché naturalmente presente in abbondanza nella rizosfera dove si sviluppa la micorrizza (Deveau et al. 2016). Le inoculazioni sono state ripetute un mese e nove mesi post inoculazione con *T. melanosporum* per verificare e valutare l'influenza della co-inoculazione sulla formazione micorrizica anche dopo la formazione di

un'associazione simbiotica. In primis l'identificazione dell'avvenuta micorrizzazione è stata verificata grazie all'atlante delle micorrize di Agerer. In seguito, l'analisi dell'effetto dei singoli batteri ha mostrato che i tassi di colonizzazione variano da un minimo del  $25,4\% \pm 2,7\%$  delle radici colonizzate da *Tuber melanosporum*, registrato per le piantine di controllo (CS), a un massimo del  $35,1\% \pm 1,6\%$ , registrato invece per le piantine inoculate con *P. fluorescens* (F) (Tabella 3.1). In genere, tutte le piantine inoculate con i batteri tendono quindi ad avere una maggiore proporzione di radici micorrizzate rispetto alle piantine inoculate solo con i rispettivi mezzi di crescita eccetto per *P. putida*, nel cui caso le piantine co-inoculate con il mezzo di crescita *P. putida* (CP) o *P. putida* (P) avevano una proporzione di radici colonizzate da *T. melanosporum*, simile a quello osservato inoculando *P. putida* (P) (tabella 3.1).

| Bacterial Inoculation Treatment | Bacteria/Growth Media                          | <i>T. melanosporum</i> Mycorrhization Rates (%) | Average Mycorrhization Rates (%)/Inoculation Treatment Type |
|---------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Bacteria in growth media        | <i>Pseudomonas fluorescens</i> (F)             | 35.1 ± 1.6 a                                    | 33.4 ± 1.4 a                                                |
|                                 | <i>Pseudomonas putida</i> (P)                  | 32.9 ± 2.5 ab                                   |                                                             |
|                                 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (B)          | 32.2 ± 3.1 ab                                   |                                                             |
| Growth media without bacteria   | <i>P. fluorescens</i> growth medium (CF)       | 26.8 ± 1.8 b                                    | 29.6 ± 1.2 a                                                |
|                                 | <i>P. putida</i> growth medium (CP)            | 33.0 ± 2.0 ab                                   |                                                             |
|                                 | <i>B. amyloliquefaciens</i> growth medium (CB) | 29.1 ± 2.5 ab                                   |                                                             |
| No inoculation                  | Control seedlings (CS)                         | 25.4 ± 2.7 b                                    |                                                             |

**Tab. 3.1** – Incidenza dell'inoculazione batterica sul tasso di micorrizzazione (Forests 2020, 11, 792)

È stato inoltre valutato l'effetto dell'inoculo con batteri su un insieme di caratteristiche delle radici delle giovani piante: il diametro medio del sistema radicale, la lunghezza, la superficie e il volume delle radici. Questi caratteri non sono stati influenzati in modo significativo eccetto nel caso delle piante inoculate con *P. fluorescens*, i cui valori hanno subito un aumento significativo in virtù del trattamento batterico. I risultati (tabella 3.2) hanno infatti rivelato che tra i tre ceppi batterici valutati, *P. fluorescens* ha promosso efficacemente sia lo sviluppo micorrizico di *T. melanosporum* che quello delle radici delle piantine di *Q. faginea*. Nel complesso, in tutte le piantine co-inoculate con i batteri sono stati osservati tassi di micorrizzazione migliori rispetto a quelle inoculate solo con *T. melanosporum* (controllo, CS), ma solo le piantine co-inoculate con *P. fluorescens* hanno mostrato tassi di colonizzazione significativamente maggiori rispetto al controllo. *P. fluorescens* ha anche mostrato un leggero effetto promotore della crescita delle radici, determinando valori medi significativamente più alti per la lunghezza totale del sistema radicale e la superficie delle radici rispetto alle piantine CS.



**Tab. 3.2** – (a) Diametro medio del sistema radicale (mm), (b) lunghezza delle radici (cm), (c) superficie (cm<sup>2</sup>), (d) volume delle radici (cm<sup>3</sup>) valutati nei diversi trattamenti: *Pseudomonas fluorescens* in mezzo di crescita (F), *Pseudomonas putida* in mezzo di crescita (P), *Bacillus amyloliquefaciens* in mezzo di crescita (B), controllo del mezzo di crescita *P. fluorescens* (CF), controllo del mezzo di crescita *P. putida* (CP), controllo del mezzo di crescita *B. amyloliquefaciens* (CB) e piantine di controllo (CS) che non sono state inoculate con batteri o un mezzo di crescita batterico. I valori *p* (\*\* *p* < 0,01 e \* *p* < 0,05) sono indicati sopra i box per indicare trattamenti specifici che hanno portato a valori delle caratteristiche delle radici significativamente inferiori rispetto a quelli delle piantine co-inoculate con *P. fluorescens* (F) (Forests 2020, 11, 792)

## CONCLUSIONI

La presente tesi si è focalizzata sull'utilizzo di inoculo batterico per potenziare la coltivazione del *Tuber melanosporum*, pratica agricola che al giorno d'oggi sta ampliando i propri confini.

I microrganismi associati ai corpi fruttiferi svolgono un ruolo di primaria importanza durante il ciclo vitale del tartufo, influenzando sia l'affinità delle radici delle piante con i funghi ectomicorrizici, sia la morfologia e la crescita delle radici, garantendo una maggiore superficie di scambio di nutrienti essenziali. I batteri, in particolare *Pseudomonas spp.*, possono essere quindi sfruttati per migliorare la qualità della micorrizzazione nei vivai promuovendo così una produzione di tartufi più efficace. Inoltre, si tratta di un modo biologico, non inquinante ed economico per migliorare i tassi di micorrizzazione e la qualità delle piante nelle prime fasi di sviluppo.

Nonostante ciò, ulteriori studi potrebbero essere utili per:

- valutare altre associazioni batterico-fungine, essenziali per osservare gli effetti dei MHB sulle specie di *Tuber*;
- considerare altri ceppi batterici o co-inoculazioni con più di un batterio contemporaneamente;
- indagare come le applicazioni ripetute di inoculazioni batteriche e diverse dosi di inoculazione batterica potrebbero promuovere la micorrizzazione fungina.

Per concludere, considerato che la nostra regione offre numerose aree vocate alla coltivazione del tartufo, ciò può rappresentare una notevole risorsa economica, creando opportunità occupazionali e promuovendo un'identità culturale ancora poco nota.

## BIBLIOGRAFIA

### 1.1 Bibliografia

Deveau, A.; Antony-Babu, S.; Le Tacon, F.; Robin, C.; Frey-Klett, P.; Uroz, S. Temporal changes of bacterial communities in the *Tuber melanosporum* ectomycorrhizosphere during ascocarp development. *Mycorrhiza* 2016, 26, 389–399.

Deveau, A., Labbé, J. (2016). Mycorrhiza helper bacteria. In *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*, F. Martin (Ed.).

Fischer, C.; Oliach, D.; Bonet, J.A.; Colinas, C. (2017). Best Practices for Cultivation of Truffles; Forest Sciences Centre of Catalonia (CTFC): Solsona, Spain; Yaşama Dair Vakıf: Antalaya, Turkey.

Frey-Klett, P., Garbaye, J. and Tarkka, M. (2007), The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, 176: 22-36.

Giorgi, V.; Amicucci, A.; Landi, L.; Castelli, I.; Romanazzi, G.; Peroni, C.; Ranocchi, B.; Zambonelli, A.; Neri, D. Effect of Bacteria Inoculation on Colonization of Roots by *Tuber melanosporum* and Growth of *Quercus ilex* Seedlings. *Plants* 2024, 13, 224.

Herrero de Aza, C.; Armenteros, S.; McDermott, J.; Mauceri, S.; Olaizola, J.; Hernández-Rodríguez, M.; Mediavilla, O. Fungal and Bacterial Communities in *Tuber melanosporum* Plantations from Northern Spain. *Forests* 2022, 13, 385.

Iotti, M., Piattoni, F., & Zambonelli, A. (2012). Techniques for host plant inoculation with truffles and other edible ectomycorrhizal mushrooms. In Zambonelli, A., & Bonito, G. (Eds.), *Edible ectomycorrhizal mushrooms. Soil biology* (Vol. 34). Springer.

Iotti M.; Zambonelli A. (2006) A quick and precise technique for identifying ectomycorrhizas by PCR, *Mycological Research*, Volume 110, Issue 1, Pages 60-65.

Jung, T., Orlikowski, L., Henricot, B., Abad-Campos, P., Aday, A. G., Agúin Casal, O., Pérez-Sierra, A. (2016). Widespread Phytophthora infestations in European nurseries put forest, seminatural and horticultural ecosystems at high risk of Phytophthora diseases. *Forest Pathology*.

Oliach, D., Fischer, C. R., Colinas, C. (2016). Soil water potential and truffle productivity. In: IWEMM8. Cahors, France.

Olivera A., Martínez de Aragón J., Fischer C., Oliach, D., Bonet, JA., Colinas, C. (2006). Are black truffle systems under risk of recession due to a warning climate? 5th International Conference on Mycorrhizae (ICOM 5). Granada.

Pérez-Sierra, A., López-García, C., León, M., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P., Jung, T. (2013). Previously unrecorded low-temperature Phytophthora species associated with Quercus decline in a Mediterranean forest in eastern Spain. *Forest Pathology*, 43(4), 331– 339.

Piñuela, Y.; G. Alday, J.; Oliach, D.; Bolaño, F.; Colinas, C.; Bonet, J.A. Use of Inoculator Bacteria to Promote *Tuber melanosporum* Root Colonization and Growth on *Quercus faginea* Saplings. *Forests* 2020, 11, 792.

Plassard, C., Bonafos, B. and 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 & Environment*, 23: 1195-1205.

Prisa, D. (2019). Le micorrize: fisiologia e applicazioni.

Reyna, S. (2000). La trufa, truicultura y selvicultura trufera. Mundi-Prensa. Madrid.

Ricard, J.M. (2003). La truffe. Guide technique de trufficulture. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes. Paris.

Splivallo, R.; Vahdatzadeh, M.; MacIá-Vicente, J.G.; Molinier, V.; Peter, M.; Egli, S.; Uroz, S.; Paolucci, F.; Deveau, A. Orchard conditions and fruiting body characteristics drive the microbiome of the black truffle *Tuber aestivum*. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 439462.

Wedén, C. (2004). Black Truffles of Sweden: Systematics, Population Studies, Ecology and Cultivation of *Tuber aestivum* syn. *T. uncinatum* (PhD dissertation, Acta Universitatis Upsaliensis).

## **1.2 Sitografia**

<https://www.tuber.it/>

<https://www.tartufo.com/it/>

<https://www.georgofili.it/>

<https://www.tartufaie.it/>