

Il tartufo: una simbiosi multipla

1. Il tartufo come sistema biologico; 2. Gli elementi dell'associazione simbiotica: 2.1 Il fungo, 2.2 La pianta, 2.3 Il sistema suolo-acqua, 2.4 I microorganismi associati; 3. La comunità fungina della tartufaia; 4. Le prospettive; 5. Bibliografia

1. Il tartufo come sistema biologico

Le specie del genere *Tuber* sono funghi Ascomiceti ectomicorrizici che producono ascocarpi, noti con il nome di tartufi, come risultato della simbiosi del fungo con piante arbustive ed arboree. Gli ascocarpi contengono quantità rilevanti di batteri a tasso di biodiversità relativamente basso. Alcune specie di *Tuber* sono particolarmente apprezzate nell'alta gastronomia per l'intenso aroma che emana dal corpo fruttifero, ciò che le rende molto ricercate sul mercato, sia come prodotto fresco che conservato. Ad esempio nel 2003, un'annata nella quale la raccolta è stata scarsa, il tartufo bianco italiano (*Tuber magnatum*) è stato venduto sul mercato americano del fresco a US\$ 2,200–4,600/kg, mentre il tartufo nero (*Tuber melanosporum*) del Périgord ha spuntato US\$ 900–2,000/kg e il bianchetto (*Tuber borchii*), di qualità e prezzo più modesti, ha spuntato US\$ 300/kg sempre sullo stesso mercato (Giomaro *et al.*, 2005). In Europa molte specie di *Tuber*, tra le quali le più pregiate, sono endemiche, altrove sono state introdotte e “coltivate” anche per soddisfare l'aumento della domanda e contrastare il contemporaneo declino della produzione naturale (Hall *et al.*, 2003). La “coltivazione” del tartufo ha compiuto un deciso passo in avanti nell'ultimo decennio del secolo scorso con la messa a punto (dovuta anche al successo della coltivazione *ex planta* di varie specie *Tuber*, di cui si parlerà più avanti) degli inoculi di funghi micorrizici a base di radici pre-micorrizzate con micelio in cultura pura o, con minor successo, con spore. Quest'ultimo metodo infatti può essere applicato ad alcune specie di *Tuber* (*T. melanosporum*, *Tuber aestivum* e *T. borchii*) ma non a *T. magnatum* per le difficoltà con la germinazione delle spore. L'inoculo sporale inoltre potrebbe essere contaminato con microfunghi e batteri associati, che in alcuni casi hanno effetti inibitori dello sviluppo del micelio ectomicorrizico *in vitro* come vedremo più avanti. Lo stesso dicasi per gli inoculi formati esclusivamente da tessuto glebale. Sul tartufo, un poderoso contributo all'avanzamento delle conoscenze in sede internazionale è stato fornito dall'Italia con il Progetto Strategico CNR-Regioni “*Tuber*: Biotecnologia della micorrizzazione” tra il 1995 e il 2003. Il Progetto ha consentito di mettere a punto protocolli per l'identificazione non ambigua di varie specie di *Tuber*, incluso *T. magnatum* Pico, *T. borchii* Vitt., *Tuber maculatum* Vitt., *Tuber puberulum* Berk e Br., *Tuber dryophilum* Tul., *T. melanosporum* Vitt., *Tuber brumale* Vitt., *Tuber indicum* Cooke e Masee, *T. indicum* var. *himalayensis*. Questi protocolli, basati su metodi molecolari, sono risultati di notevole utilità sia per la preparazione di inoculi monoxenici sia, a livello diagnostico, per evitare frodi alimentari per incorretta identificazione o importazioni fraudolente di specie non ammesse in Italia. Quest'ultimo caso si è verificato, ad esempio, nel 1998 con l'importazione di cinquanta tonnellate di *T. indicum himalayensis*, acquistati a poche decine di

^{*}Università di Pisa, ^{**}Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria – CNR

migliaia di lire al chilogrammo e rivenduti come *T. melanosporum* a prezzi anche di venti volte superiori. Nell'ambito del Progetto Strategico CNR-Regioni è stato inoltre realizzato "TuberKey", un sistema computerizzato per l'identificazione guidata da computer che, attraverso l'utilizzo di appositi programmi software, consente anche ad operatori non esperti d'identificare i tartufi mediante chiavi interattive (Zambonelli *et al.*, 2000). Il Progetto ha altresì consentito l'acquisizione di importanti conoscenze di base sulla biologia e la genetica del tartufo e sulle interazioni biotiche con i batteri associati ai carpofori e ad altre strutture micorriziche. Alcuni degli aspetti più avanzati o controversi sono stati poi oggetto di un incontro internazionale a Pisa nel 2005 tra ricercatori italiani e tartuficoltori francesi, ponendo a confronto la tartuficoltura della regione dell'Aude e del Périgord con quella delle Marche, Toscana ed Emilia-Romagna.

2. Gli elementi dell'associazione simbiotica

La pianta ospite e il fungo micorrizico, elementi fondamentali della simbiosi, si relazionano principalmente attraverso gli scambi nutrizionali, con la cessione di carbonio organico dalla pianta al fungo e di acqua e elementi nutritivi quali N, P, Mg, Zn e Cu, in forma organica ed inorganica, dal fungo alla pianta. Il micelio extraradicale che si estende dalle radici colonizzate nel suolo svolge un ruolo chiave nell'assorbimento dell'acqua e dei nutrienti, 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). Nella comunità vegetale, le ectomicorrize sono inoltre in grado di collegare tra di loro gli apparati radicali di piante, anche appartenenti a specie diverse, attraverso la connessione delle diverse reti miceliari mediante anastomosi, all'interno delle quali è possibile il trasferimento di nutrienti e fotosintati da una pianta all'altra (Martins, 1993; Simard, 1997; Sbrana *et al.* 2007). Dal punto di vista ecologico i funghi micorrizici sono in grado di regolare la diversità vegetale e favorire la sopravvivenza di piante nelle fasi critiche del loro ciclo vitale (Domínguez Nùñez *et al.*, 2006). Inoltre, a livello di ecosistema, le relazioni simbiotiche instaurate tra funghi e piante si riflettono sulla disponibilità di nutrienti, sulla proliferazione delle popolazioni microbiche rizosferiche, sulla struttura del suolo e sui rapporti di competizione e successione tra i vegetali (Courty *et al.*, 2010). Negli ultimi venti anni infine è apparso chiaro che la simbiosi pianta-fungo, considerata a lungo bipartitica, in realtà include un terzo elemento che è stato trovato costantemente presente: i batteri associati sia allo sporocarpo che alle strutture miceliari. I batteri ricevono nutrienti ed acqua dal sistema fungo-pianta e producono a loro volta sostanze biostimolanti (fito-ormoni quali auxine, gibberelline e citochinine, specifici aminoacidi), contribuiscono alla produzione di sostanze che compongono l'aroma dell'ascocarpo (composti solforati) o sono capaci di modulare la germinazione delle spore, la crescita ifale e la morfogenesi dell'ospite fungino. I batteri associati possono infine essere in grado di contrastare la crescita di altri microrganismi patogeni ed agire come agenti di controllo biologico. Sebbene la ricerca in questo settore sia ancora in una fase iniziale, appare già chiaro che il contributo della componente batterica ad entrambi i partners eucarioti è rilevante ed articolato. Ad esempio, la recente descrizione di funzionalità del complesso nitrogenasico (a livelli pari a quelli di noduli precoci nelle leguminose) in *T. magnatum* getta nuova luce sulla possibilità di approvvigionamento di fonti di azoto addizionali per il corpo fruttifero.

2.1 Il fungo

Il ciclo biologico delle specie fungine appartenenti al genere *Tuber* inizia con il rilascio di aschi e ascospore dagli ascocarpi maturi che, rimasti nel suolo, vanno incontro a degradazione naturale ad opera dei microrganismi presenti. La germinazione della spora, regolata dalla percezione di segnali chimici provenienti dalle piante ospiti, sviluppa un micelio primario aploide (monocariotico) in grado di colonizzare le radici. La simbiosi con le radici della pianta ospite è caratterizzata da numerosi avvolgimenti di ife fungine intorno agli apici radicali così da formare un manicotto esterno - la micoclena - e da una rete ifale intercellulare che si sviluppa nel tessuto corticale - il reticolo di Hartig. Le radici micorrizzate modificano il loro aspetto morfologico assumendo una forma clavata e spesso ramificata e da esse si sviluppa la fitta rete ifale extraradicale che esplora il suolo circostante e assorbe nutrienti. Quando la pianta micorrizzata diventa produttiva, dalle radici micorrizzate si sviluppano i cordoni miceliari in grado di differenziare i primordi degli ascomi: nella fase iniziale il primordio dipende dalla pianta madre dal punto di vista nutrizionale, mentre sembra che a maturità, quando la differenziazione dei tessuti sterili e fertili al suo interno è avanzata, passi ad una crescita autonoma, di tipo "saprofitico". All'interno del carpoforo lo sviluppo della gleba, il tessuto fertile, viene completato in seguito alla fertilizzazione tra miceli compatibili finalizzata alla differenziazione di aschi e ascospore per la disseminazione fungina. La morfologia delle radici micorrizzate è caratteristica delle diverse interazioni pianta-fungo, e gli esperti sono spesso in grado di identificare la specie di *Tuber* in simbiosi con un determinato ospite in base ad essa. E' però importante, al fine di individuare con precisione la specie fungina in simbiosi in tutte le fasi diverse del ciclo, quali radici micorrizzate, carpofori, micelio, la disponibilità di metodi rapidi e facilmente utilizzabili anche da persone non particolarmente esperte. La ricerca condotta su *Tuber* ha permesso di individuare metodi efficienti e riproducibili per evidenziare marcatori genetici caratteristici delle diverse specie. Mediante l'uso di sequenze arbitrarie, ribosomali o microsattelliti sono stati ottimizzati i metodi per le diverse specie, ed oggi è possibile determinare in un campione la presenza/assenza di una singola specie (PCR con una singola coppia di *primers*) o di più specie diverse contemporaneamente (PCR *multiplex*). E' quindi possibile sia determinare la presenza di contaminazioni nella produzione di piante micorrizzate in vivaio, sia discriminare carpofori di specie pregiate da altri simili ma con minor valore, come ad esempio *T. borchii* e *T. indicum* commercializzati in luogo di *T. magnatum* e *T. melanosporum*, smascherando così frodi commerciali economicamente importanti. Il recente sequenziamento del genoma delle due specie di funghi ectomicorrizici *Laccaria bicolor* e *T. melanosporum* ha fornito nuovo materiale genetico per lo studio della biologia di questi organismi, che sembrano molto diversi, anche dal punto di vista dei meccanismi di interazione con l'ospite. Il genoma del tartufo nero, sebbene sia composto da un limitato numero di geni, risulta il più esteso tra i genomi fungini conosciuti, ed è caratterizzato da una forte presenza di sequenze relative a elementi genetici mobili (trasposoni) e dall'assenza di vie biosintetiche per la produzione di micotossine. Le indagini volte allo studio del genoma di *Tuber* sono state affiancate da altre finalizzate all'analisi dell'espressione genica: la caratterizzazione delle proteine sintetizzate nelle diverse fasi del ciclo vitale ha suggerito che alcune di queste siano esclusivamente prodotte nel micelio in attiva crescita, per la sintesi della parete cellulare, mentre altre sembrano caratteristiche del carpoforo in sviluppo (Lacourt *et al.*, 2002).

Per alcune specie, economicamente rilevanti, di *Tuber* è stato possibile ottenere colture monoxeniche *ex planta* (Zambonelli *et al.*, 2002; Giomaro *et al.*, 2005). Tra queste, il bianchetto o marzuolo (*T. borchii*) e il tartufo nero (*T. melanosporum*), ma anche specie meno pregiate possono

essere coltivate *ex planta* : *T.aestivum*, *T. brumale*, *T. mesentericum*, *T. rufum* e *T. uncinatum*. Al momento, la difficoltà di far germinare le spore di *T. magnatum* non ha consentito di ottenere colture monoxeniche *ex planta* del tartufo pregiato bianco.

Una branca dello studio della biologia di *Tuber* utile ai fini della caratterizzazione dei prodotti è quella delle analisi dei componenti volatili (VOCs), molecole organiche caratterizzate da una bassa tensione di vapore e perciò dalla elevata capacità di diffusione ambientale: i VOCs sono molto importanti come segnali nella comunicazione tra organismi, ma rappresentano anche un potente mezzo per identificare le caratteristiche aromatiche di un alimento. Nel caso degli ascocarpi di *T. magnatum*, i risultati delle analisi dei VOCs mostrano una capacità di discriminazione ottima e univoca per prodotti provenienti dalle tre maggiori regioni produttrici, Marche, Toscana e Piemonte, ma anche tartufi originari dell'Emilia Romagna sono ben caratterizzati (Gioacchini *et al.*, 2008).

2.2 La pianta

Le piante che stabiliscono simbiosi con il tartufo bianco pregiato, *T. magnatum*, sono *Salix alba* (salice bianco), *Populus alba* (pioppo bianco), *Populus nigra* (pioppo nero), *Tilia* spp. (tiglio), *Ostrya carpinifolia* (carpino nero), *Quercus robur* (farnia), *Quercus petraea* (rovere), *Quercus pubescens* (roverella), *Populus deltoides* cv. *carolinensis* (pioppo carolina), *Populus tremula* (pioppo tremulo), *Salix caprea* (salicone) e *Corylus avellana* (nocciolo). La vegetazione tipica delle aree di produzione è caratterizzata da specie indicatrici di ambienti freschi ed ombreggiati. Le piante ospiti del tartufo nero pregiato, *T. melanosporum*, sono generalmente *Quercus pubescens* (roverella), *Quercus ilex* (leccio), *Quercus cerris* (cerro), *Tilia platyphyllos* (tiglio), *Corylus avellana* (nocciolo), *Ostrya carpinifolia* (carpino nero), e *Cistus* spp. (cisto). Nelle regioni centrali la sua associazione più frequente è con il bosco di roverella, dove è spesso distribuito nella fascia esterna del bosco, detta anche "mantello". In vivaio è possibile ottenere piante micorrizzate con *Tuber* appartenenti a quasi tutti i possibili ospiti (roverella, cerro, farnia, leccio, nocciolo, carpino nero, cisto, tiglio, pioppo, salice e pino).

Oltre alle piante ospiti di *Tuber*, nella maggioranza delle tartufaie produttive è presente una componente arbustiva tipica degli ecosistemi di bosco misto formata da specie vegetali che non formano ectomicorrize. Le specie più frequentemente rilevate sono *Cornus mas*, *Cornus sanguinea*, *Crataegus monogyna*, *Rosa canina*, *Rubus caesius*, *Sambucus nigra*. Queste specie, note come piante indicatrici o "comari", vivono negli stessi ambienti richiesti per lo sviluppo delle piante tartufigene e hanno probabilmente un ruolo nel mantenimento delle condizioni del suolo adatte all'instaurarsi della simbiosi, in particolare la conservazione dell'umidità superficiale e il controllo degli sbalzi termici. Al contrario, lo sviluppo di piante erbacee viene in alcuni casi attivamente controllato da *Tuber*, che "difende" la pianta ospite dai possibili competitori per le risorse nutritive arrivando a formare il "pianello", area intorno alla pianta ospite quasi completamente priva di copertura erbacea.

L'eccessiva densità del bosco è molto dannosa per lo sviluppo di *T. melanosporum*, ma anche nel caso di *T. magnatum* è stato osservato che il diradamento del bosco influisce sulla produzione dei carpofori, infatti nella stagione seguente il taglio la produzione di tartufi è stimolata.

T. brumale, *T. aestivum* e *T. albidum* sono in grado di adattarsi a molti degli ospiti vegetali sopra citati, e inoltre a faggio, cedro e pino (quest'ultimo frequentemente in simbiosi con *T. albidum*). Da parte loro, le piante possono essere in grado di ospitare tutte le specie di tartufo di interesse commerciale, come ad esempio, il nocciolo o selezionare solamente alcuni simbionti, come accade per il salice bianco che sembra formare micorrize soltanto con i tartufi bianchi (*T. magnatum* e *T. borchii*). La pianta ospite appare inoltre in grado di determinare la maggiore o minore diversità fungina della tartufaia, alcuni studi hanno infatti suggerito che le foreste monospecifiche a *Fagus sylvatica* rappresentino non solo aree fortemente produttive ma anche quelle dove la diversità a livello di specie di *Tuber* è più elevata (Violante *et al.*, 1997).

Mentre *T. magnatum* e *T. melanosporum* sono più legati a specifiche nicchie ecologiche, altre specie quali *T. albidum*, *T. brumale* e *T. aestivum* vengono considerate ubiquitarie, con diffusioni ecologiche molto ampie, che comprendono molti ambienti di bosco a bassa densità in diverse regioni d'Europa. Ad esempio è caratteristica la fruttificazione di *T. albidum* nelle pinete, dove corpi fruttiferi di piccole dimensioni si sviluppano vicino alla superficie, a volte nella lettiera di aghi, mentre se il terreno viene lavorato i carpofori mostrano dimensioni superiori. Anche *T. brumale* è frequente nei campi coltivati ed è un tipico tartufo contaminante le tartufaie dove vengono eseguite troppo spesso lavorazioni del terreno (Zambonelli *et al.*, 2002; Gardin, 2005; Hall *et al.*, 2007).

Come modello sperimentale dell'interazione pianta-fungo sono stati utilizzati micelio di *T. borchii* in coltura pura e piante di *Tilia platyphyllos* e *Tilia americana*. Il taglio può formare ectomicorrize anche in natura con molte specie di *Tuber*, e le caratteristiche morfologiche dei componenti distintivi (micoclena e cistidi) della micorrizza sviluppata in vitro sono analoghe a quelle descritte *in vivo*. Il sistema modello ha permesso lo studio dei meccanismi che regolano la micorrizzazione, a livello di espressione genica e di diversità nelle proteine sintetizzate nelle diverse fasi dello sviluppo della simbiosi (Sisti *et al.*, 2005).

2.3 Il sistema suolo-acqua

Eccetto *T. borchii*, che preferisce terreni leggermente acidi, gli altri tartufi pregiati prediligono i terreni marnoso-calcarei situati ad altitudine media, con pH compreso tra 6.8 e 8.5, con scarsa sostanza organica e ben areati. Queste condizioni sono adatte alla crescita e alla fruttificazione di *T. magnatum*, mentre *T. melanosporum* è meglio adattato a boschetti radi di ambienti collinari con scarsa o nulla vegetazione di sottobosco, in terreno permeabile (calcareo-breccioso con argilla non superiore al 40%) ma sufficientemente compatto da favorire lo sviluppo delle radici delle piante in superficie. Spesso, all'impianto di una tartufaia ai limiti degli areali vocati, la correzione con calcare è una delle operazioni agronomiche più necessarie. Tra l'altro essa offre il vantaggio di evidenziare il successo della micorrizzazione in quanto le plantule nelle quali la micorrizzazione non ha avuto successo non crescono o crescono molto stentate rispetto a quelle ben micorrizzate. Con gli anni queste differenze tendono a diminuire, ma inizialmente possono pregiudicare anche l'inizio della raccolta dei corpi fruttiferi. Così dicasi per l'importanza della disponibilità di acqua, che ha suggerito in tartufaie sia di nuovo impianto che datate (in Piemonte e nelle Marche) di installare impianti d'irrigazione a goccia, con benefici diretti sulle produzioni unitarie anche in annate avverse. I fattori pedo-climatici e idro-geologici, oltre a quelli legati alla pianta, comportano che ci

siano anche importanti differenze nella distribuzione geografica dei tartufi. Mentre *T.borchii* e *T.maculatum* infatti vengono rinvenuti in tutta Europa, il nero pregiato *T. melanosporum* è rinvenuto solo nell'Europa meridionale-occidentale (Francia, Italia, Spagna) e il bianco pregiato *T. magnatum* viene raccolto soltanto in Italia e alcuni paesi dell'Europa dell'est (Croazia, Slovenia ed Ungheria), ciò che contribuisce alla sua scarsa disponibilità sul mercato (Mello *et al.*, 2006).

2.4 I microrganismi associati

L'interno del corpo fruttifero del tartufo non è sterile e sono ormai numerose le evidenze sperimentali che quantificano e qualificano le popolazioni batteriche interne allo sporcarpo di Tuber oppure ad altre strutture micorriziche, quali i *tips* ifali. Queste evidenze sperimentali sono state ottenute a partire dall'inizio degli anni '90 utilizzando sia metodi basati sulla coltivazione delle popolazioni batteriche vitali coltivabili, cioè capaci di dar luogo a colonie di batteri in attiva moltiplicazione su piastra (che consentono quindi di isolare e studiare gli isolati sia *in vitro* che *in vivo*), sia metodi DNA-dipendenti (che consentono di svelare la presenza di cellule vitali non coltivabili e cellule morte, presenti anche a bassa densità). Utilizzando in maniera integrata entrambi i risultati, ne emerge un quadro complesso, che vede la dominanza di certi gruppi di batteri e la presenza di altri: un mondo affascinante di possibili ruoli e inter-relazioni che solo in minima parte è stato possibile finora svelare. Gli sporocarpi prodotti dai funghi ectomicorrizici ospitano popolazioni vitali coltivabili di batteri chemo-organotrofi riferibili a pseudomonadali e bacilli sporigeni. La loro densità in *T. borchii*, *T. maculatum* e *T. magnatum* è stimata a 10^5 - 10^8 cfu/g p.s. (Citterio *et al.* 1995; Bedini *et al.*, 1999). In questo secondo studio, 600 ceppi batterici sono stati isolati dagli sporocarpi di *T. borchii*, dei quali 300 ceppi erano riferibili a specie di *Pseudomonas*, in particolare *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas corrugata* e *Pseudomonas tolaasi*. Utilizzando un anticorpo monoclonale per l'acido indol-3-acetico, è stato possibile evidenziare che tutti gli isolati riferibili a Pseudomonadali erano capaci di produrre questa auxina. Altre sostanze erano prodotte da alcuni isolati (Tab. 1). Popolazioni batteriche sono state rilevate in sporocarpi immaturi a densità di tre logaritmi superiori rispetto alla densità del suolo circostante (Gazzanelli *et al.* 1999). I batteri coltivabili predominanti erano *P. fluorescens* (30% della popolazione totale coltivabile) e i gram+ sporigeni (15% dei totali coltivabili). Questi isolati sono stati trovati positivi al test di degradazione della cellulosa e della chitina, componenti maggioritari delle pareti ifali. L'esame ultrastrutturale degli sporocarpi hanno rivelato la presenza dei batteri negli spazi interinali, una parte dei quali era incluso nella parete dell'asco. Gli Autori suggerivano che la presenza di *P. fluorescens* e *Bacillaceae* potrebbe essere in relazione con queste attività enzimatiche che a loro volta sarebbero coinvolte nell'apertura dell'asco e, forse nella germinazione delle spore. Barbieri *et al.* (2001) hanno caratterizzato i batteri associate agli sporocarpi di *T.borchii* con metodi DNA-dipendenti evidenziando che oltre a *Pseudomonas* spp. vi sono batteri del gruppo del *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *Paenibacillus* spp. Inoltre, tra i vitali non-coltivabili, è stato rinvenuto un batterio del complesso *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* con sei-dieci cellule per ogni compartimento ifale, associato al micelio in coltura pura di *T. borchii* (Barbieri *et al.* 2002). Questo batterio è stato trovato anche in *T. aestivum* Vittad. (Mello *et al.* 2002). Alcuni di questi isolati sono capaci di modulare la germinazione delle spore, la crescita ifale e la morfogenesi dell'ospite fungino. Oppure i batteri possono contribuire alla produzione di composti organici solforosi volatili,

quindi contribuire alla formazione dell'aroma (Buzzini *et al.*, 2005), incluso *Staphylococcus* rinvenuto in varie specie di tartufo (Citterio *et al.*, 1995; Barbieri *et al.*, 2005), sebbene Splivallo *et al.* (2009) ritengano che *Tuber* possieda gran parte degli enzimi necessari alla biosintesi dei composti dell'aroma. Altri Autori (Barbieri *et al.* 2005, 2007; Bonfante e Anca, 2009) hanno confermato, con metodi DNA-dipendenti, la presenza di batteri in *Tuber borchii*: γ -Proteobatteri, soprattutto Pseudomonadali, batteri del gruppo *Bacteroidetes* e gram+, soprattutto Bacillus, e α -Proteobatteri riferibili a Rhizobiaceae (Tab.1). Tra i γ -Proteobatteri, Barbieri *et al.* (2007) hanno confermato la presenza del gruppo degli *Pseudomonas* fluorescenti in *T. magnatum*, con numerose sequenze geniche (16S rRNA) quasi identiche a quelle di isolati da *T. borchii*. Di particolare interesse lo studio di Barbieri *et al.* (2010) che ha dimostrato l'espressione di *nif* H e la presenza di *Bradyrhizobium* spp. nel tartufo bianco. La positività del test di riduzione dell'acetilene in *T. magnatum* ha confermato la funzionalità del complesso nitrogenasico (a livelli pari a quelli di noduli precoci nelle leguminose), gettando nuova luce sulla possibilità di approvvigionamento di fonti di azoto addizionali per l'intero asco-simbiosoma o "ascosoma", termine che qui si propone di utilizzare per definire il complesso ifale del tartufo e insieme dei microorganismi associati. I risultati sopra riportati peraltro confermano quanto in precedenza descritto per *T. borchii* da Barbieri *et al.* (2005, 2007). Lo studio delle popolazioni batteriche associate a micorrize e suolo di tartufoie di *T. aestivum* ha evidenziato la presenza di un numero significativo di sequenze correlate con la presenza di *T. aestivum* relative a *Pseudonocardineae*, mentre tra le sequenze negativamente correlate con il fungo simbiote sono risultate, inaspettatamente, proprio quelle relative a *Bradyrhizobium* (Gryndler *et al.*, 2012).

Le popolazioni batteriche associate agli ascocarpi di *Tuber* potrebbero avere un interesse per il loro potenziale uso biotecnologico durante il processo di micorrizzazione. Gli studi su *T. borchii* Vittad. (Sbrana *et al.*, 2000), hanno dimostrato che il 98% delle popolazioni batteriche coltivabili associate a sporocarpi immaturi (266 ceppi) poteva essere assegnata a *Pseudomonas*. Questi dati, in accordo con la letteratura, suggeriscono che popolazioni batteriche possono essere selezionate durante la differenziazione dello sporocarpo. Il fingerprinting metabolico e la caratterizzazione in cultura pura dei ceppi di *Ps. fluorescens* isolati dall'interno degli sporocarpi di *Tuber* suggeriscono che questi batteri potrebbero svolgere ruoli diversi (Sbrana *et al.*, 2002): (a) l'alta frequenza di ceppi capaci di assimilare composti caratteristici della essudazione ifale o della lisi suggerisce un ruolo di "spazzini" per questi batteri; (b) la presenza di ceppi batterici che rilasciano metaboliti capaci di influenzare la crescita miceliare suggerisce il loro coinvolgimento nelle fasi precoci della differenziazione ifale che porta allo sviluppo degli sporocarpi; (c) la capacità antagonistica della maggior parte degli isolati pseudomonadali capaci di sintetizzare una varietà di molecole rilevanti come stimoli o segnali di difesa e di controllare la crescita di funghi fitopatogeni o saprofiti, suggerisce che i batteri associati potrebbero proteggere gli sporocarpi contro i contaminanti fungini. Inoltre, ceppi ascocarpici di *Ps. fluorescens* hanno mostrato una adesione preferenziale a *T. borchii* rispetto sia a diversi miceli fungini e ad isolati rizosferici co-specifici. Gli studi riguardanti i funghi associati agli ascocarpi di *Tuber* hanno evidenziato la presenza di lieviti e funghi filamentosi all'interno dei carpofori formati da diverse specie di *Tuber*. In particolare, sono stati identificati in *T. melanosporum* e *T. magnatum* lieviti appartenenti alle specie *Candida saitoana*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon moniliforme* e al genere *Cryptococcus*, risultati produttori di alcune molecole volatili caratteristiche dell'aroma dei tartufi (Buzzini *et al.*, 2005), e

in ascocarpi di *T. aestivum* lieviti appartenenti alle specie *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus humicolus*, dotati di attività cellulolitica e pectinolitica (Zacchi *et al.*, 2003).

Batteri	Densità (metodi coltura-dipendenti)	Presenza (metodi DNA-dipendenti)	Associati a Tuber	Tratti fisiologici rilevanti per la simbiosi	Riferimento bibliografico
<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., <i>Moraxella</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp.	-	-	<i>T. borchii</i> , <i>T. maculatum</i> , <i>T. magnatum</i>	-	Citterio <i>et al.</i> (1995)
<i>Pseudomonas</i> spp. <i>P. fluorescens</i> <i>P. corrugata</i> <i>P. tolaasi</i>	10 ⁵ - 10 ⁸ cfu g ⁻¹ p.s.	-	<i>T. borchii</i>	Produzione di IAA, 2,4-DPG, HCN, proteasi, siderofori fluorescenti, attività CMCasica e collagenasica, BCA	Bedini <i>et al.</i> (1999)
<i>P. fluorescens</i> Bacillaceae	10 ⁶ cfu g ⁻¹ p.s.	-	<i>T. borchii</i>	Attività cellulastica e chitinasica	Gazzanelli <i>et al.</i> (1999)
<i>Pseudomonas</i> spp.	-	-	<i>T. borchii</i>	Adesione a miceli , BCA, produzione di HCN, attività stimolatorie	Sbrana <i>et al.</i> (2000)
Batteri eterotrofi <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Actinobacteria</i> Bacilli sporigeni	10 ⁵ -10 ⁶ cfu g ⁻¹ p.s.	-	<i>T. borchii</i>	BCA, attività stimolatorie	Sbrana <i>et al.</i> (2002)
Batterio del gruppo <i>Cytophaga</i> - <i>Flexibacter</i> - <i>Bacteroides</i>	-	Rilevamento <i>in situ</i>	<i>T. aestivum</i>	-	Mello <i>et al.</i> (2002)
<i>Pseudomonas</i> spp., Bacillaceae	10 ⁵ - 10 ⁶ cfu g ⁻¹ p.s.	16S rDNA	<i>T. borchii</i>	-	Barbieri <i>et al.</i> (2005)
Lieviti	-	-	<i>T. magnatum</i> , <i>T. melanosporum</i>	Produzione di VOCs	Buzzini <i>et al.</i> (2005)
α - , β - e γ - <i>Proteobacteria</i> ; gruppo <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Firmicutes</i>	10 ⁶ -10 ⁷ cfu g ⁻¹	16S rDNA	<i>T. magnatum</i>	-	Barbieri <i>et al.</i> (2007)
α - <i>Proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Bradyrhizobium</i> spp.	-	Semi-nested PCR	<i>T. magnatum</i>	Azotofissazione (produzione di etilene da acetilene)	Barbieri <i>et al.</i> (2010)

Tabella 1 - Batteri associati al tartufo e relativi tratti fisiologici. IAA = acido indol-3-acetico; 2,4-DPG = 2,4-diclorofluoroglucinololo; HCN = acido cianidrico; CMC = carbossimetil-cellulosa; BCA = attività di biocontrollo nei confronti di microfunghi fitopatogeni; PCR = reazione a catena della polimerasi; VOCs = prodotti volatili organici.

In seguito al primo isolamento di un fungo filamentoso, *Sporothryx tuberum* (adesso *Nodulisporium tuberum*), da ascocarpi di *T. melanosporum*, *T. magnatum* e *Tuber asa* (Fontana e Fasolo-Bonfante,

1971), molte specie ed alcuni isolati, le cui sequenze non corrispondono a specie disponibili in database, sono stati individuati negli ascocarpi di diverse specie di *Tuber*: in particolare, le specie *Talaromyces wortmannii* e *Trichopezizella nidulus*, produttori di metaboliti con attività antibiotica e antifungina, e *Nectria ramulariae* e *Tetracladium maxilliforme*, conosciuti come endofiti di vegetali (Pacioni *et al.*, 2007).

In aggiunta alla componente batterica, anche quella fungina potrebbe rappresentare una importante risorsa per l'ascocarpo in maturazione, in grado di proteggerlo da contaminanti batterici e fungini e di favorire lo sviluppo delle componenti aromatiche.

3. La comunità fungina della tartufoia

All'interno delle comunità vegetali le diverse specie fungine in grado di sviluppare ectomicorrize possono coesistere nell'apparato radicale della stessa pianta e nella stessa radice, in competizione tra loro per i nutrienti e per i siti radicali non ancora colonizzati. L'equilibrio tra le diverse specie è modulato dalle caratteristiche ambientali naturali e dagli interventi sul suolo, che influiscono fortemente anche sulla stabilità e interconnessione delle reti extraradicali. Poiché le reti non solo permettono l'assorbimento dei nutrienti dal suolo, ma possono trasferire nutrimento e informazioni collegando piante diverse, il mantenimento della loro integrità avvantaggia le piante ospiti e la stessa produzione di corpi fruttiferi. Al fine di comprendere le relazioni tra i funghi appartenenti a *Tuber*, altri simbionti e specie saprofiti, e valutare la possibilità di interventi sui fattori rilevanti dal punto di vista produttivo, è stata studiata da diversi autori la distribuzione delle specie fungine all'interno delle comunità di tartufoie naturali e coltivate.

I risultati hanno evidenziato che, mentre la densità di radici micorrizzate da *T. melanosporum* e *T. borchii* è maggiore nei relativi siti produttivi rispetto a quelli non produttivi, nelle tartufoie di *T. magnatum* le aree di sviluppo dei carpofori sono correlate con una bassa frequenza delle relative micorrize (Murat *et al.*, 2005; Napoli *et al.*, 2010). La diversità della comunità fungina non è risultata ridotta nei siti produttivi di *T. borchii* mentre sembra essere significativamente alterata dalla presenza di *T. melanosporum*. Un numero elevato di specie diverse di funghi micorrizici è stato rilevato in tartufoie produttive di diverse regioni, con una diversità media variabile tra 22 specie (Emilia Romagna) e 60 specie (Abruzzo) e con presenza di 45 specie diverse in Toscana. Le famiglie fungine più abbondanti nei diversi siti sono risultate sempre *Thelephoraceae*, più abbondanti nei siti produttivi, e *Sebacinaceae*, più rappresentate, insieme a *Russulaceae* e *Inocybaceae*, nei siti non produttivi.

Studi filogenetici condotti nelle tartufoie, su campioni provenienti sia da carpofori che da micorrize, hanno mostrato che le popolazioni di *Tuber* presenti in Italia sembrano possedere una struttura genetica intraspecifica, che consente la loro discriminazione in gruppi diversi al cui interno la variabilità è ridotta, probabilmente per mancanza di flussi genici dovuta a fenomeni di incompatibilità. Isolati distinti di *T. magnatum*, *T. borchii* e *T. melanosporum* sono stati individuati nei diversi siti geografici all'interno dell'areale di distribuzione, suggerendo la possibilità di tracciare l'origine geografica dei prodotti (Rubini *et al.*, 2004, 2005; Riccioni *et al.*, 2008).

Nella maggioranza delle tartufoie di *T. magnatum* studiate sono stati individuati isolati di specie di *Tuber* diverse, con frequenti rilevamenti di *T. rufum* e *T. borchii*, e presenza più sporadica di *T. maculatum*, *T. brumale*, *T. melanosporum* e *T. dryophilum*, in alcuni casi (*T. rufum*) proprio nei siti di sviluppo dei carpofori di tartufo bianco pregiato.

Dal punto di vista biologico ed ecologico non è ancora stato compreso il ruolo che le specie fungine ectomicorriziche diverse da *Tuber* e le specie di *Tuber* non fruttificanti rivestono nell'economia della tartufaia, se siano semplicemente degli eventuali competitori o se svolgano attività che rappresentano un supporto alla fruttificazione della specie principale.

4. Le prospettive

L'aumento delle conoscenze negli ultimi decenni ha portato alla possibilità di ampliare l'areale di "coltivazione" di varie specie di *Tuber* (attraverso la coltivazione delle piante ospiti, opportunamente micorrizzate in vivaio). Si stima che al momento attuale più dell'80% della produzione francese del tartufo nero provenga da tartufaie "artificiali". Ciò ha peraltro dei limiti, in quanto l'impianto di una nuova tartufaia non è un'operazione possibile in qualunque situazione pedo-climatica, ma può avvenire solo nell'ambito di una ristretta combinazione di fattori idro-geologici e pedo-climatici. Un secondo errore comune è quello di identificare l'impianto delle plantule micorrizzate come l'unico momento impegnativo per l'attecchimento e per la vita di una tartufaia. Niente di più errato. Bisogna mettere in conto invece che, quando viene impiantata una tartufaia (nuova o estensione di una precedente), non si potrà realizzare il binomio "bel bosco" ed "elevata produzione di tartuffi", dovendo spesso ricorrere a potature, sia in chioma che delle radici, che poco hanno a che vedere con una normale gestione forestale. Anche le concimazioni e le correzioni del pH del terreno o l'irrigazione, non sono pratiche normali nei boschi naturali, ma sono pratiche alle quali invece ricorrono i tartuficoltori più esperti.

L'uso dei batteri per stimolare la micorrizzazione è agli albori, anche se risultati incoraggianti sono stati ripetutamente osservati da vari tartuficoltori, sia in Italia che in Francia. Recentemente in Spagna Dominguez *et al.* (2012), utilizzando *P. fluorescens* CECT 844 e *T. melanosporum* per l'inoculo di plantule di *Pinus halepensis* hanno trovato che in generale l'inoculo ha migliorato l'assimilazione dei nutrienti e la crescita delle plantule, e che in particolare veniva raddoppiata la velocità di micorrizzazione da parte di *T. melanosporum*.

La possibilità non solo di identificare ma anche di tracciare l'origine dei tartufi prodotti in aree vocate è adesso reale (Rizzello *et al.*, 2012), e valorizza i risultati di anni di studi di tipo biochimico, microbiologico e genetico-molecolare svolti sulle specie di tartufo di maggior interesse commerciale. Questa prospettiva offre alle aree mediterranee vocate per la produzione dei tartufi più pregiati al mondo un supporto tecnico-scientifico particolarmente utile per evitare la concorrenza sleale con prodotti di qualità inferiore e le contraffazioni. Ed anche quando la *Food & Drug Administration* statunitense invia i propri ispettori in Italia per valutare qualità e sicurezza del tartufo come prodotto conservato, la tracciabilità e la rintracciabilità rappresentano due punti di forza per le nostre esportazioni in quel Paese. In un futuro ormai prossimo, è prevedibile che l'uso di kit molecolari di identificazione, accompagnato dalla caratterizzazione dei *VOCs*, rappresenti un "codice a barre" che possa caratterizzare i prodotti locali di particolare pregio gastronomico.

4. BIBLIOGRAFIA

- BARBIERI E., POTENZA L., STOCCHI V. (2001): *Molecular characterization of cellulolytic-chitinolytic bacteria associated with fruit bodies of the ectomycorrhizal fungus Tuber borchii Vittad.*, «Symbiosis», 30, pp.123–139.
- BARBIERI E., RICCIONI G., PISANO A., SISTI D., ZEPPA S., AGOSTINI D., STOCCHI V. (2002): *Competitive PCR for quantitation of a Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides phylum bacterium associated with the Tuber borchii Vittad. mycelium*, «Applied Environmental Microbiology», 68, pp. 6421–6424.
- BARBIERI E., BERTINI L., ROSSI I., CECCAROLI P., SALTARELLI R., GUIDI C. (2005): *New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus Tuber borchii Vittad.*, «FEMS Microbiology Letters», 247, pp. 23–35.
- BARBIERI E., GUIDI C., BERTAUX J., FREY-KLETT P., GARBAYE J., CECCAROLI P., SALTARELLI R., ZAMBONELLI A., STOCCHI V. (2007): *Occurrence and diversity of bacterial communities in Tuber magnatum during truffle maturation* «Environmental Microbiology», 9, pp. 2234–2246.
- BARBIERI E., CECCAROLI P., SALTARELLI R., GUIDI C., POTENZA L., BASAGLIA M., FONTANA F., BALDAN E., CASELLA S., RYAHY O., ZAMBONELLI A., STOCCHI V. (2010): *New evidence for nitrogen fixation within the Italian white truffle Tuber magnatum*, «Fungal Biology», 114, pp. 936-942.
- BEDINI, S., BAGNOLI G., SBRANA C., LEPORINI C., TOLA E., DUNNE C. (1999): *Pseudomonads isolated from within fruit bodies of T. borchii are capable of producing biological control or phytoestimulatory compounds in pure culture*, «Symbiosis», 26, pp. 223–236.
- BIANCIOOTTO V., BANDI C., MINERDI D., SIRONI M., TICHY H.V., BONFANTE P. (1996): *An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria*. «Applied and Environmental Microbiology», 62, pp. 3005–3010.
- BIANCIOOTTO V., LUMINI E., BONFANTE P., VANDAMME P. (2003): '*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*' gen. nov., sp nov., *an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi*. «International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology», 53, pp.121–124.
- BONFANTE P., ANCA I.-A. (2009): *Plants, Mycorrhizal Fungi and Bacteria: a Network of Interactions*. «Annual Review of Microbiology», 63, pp. 363-383.
- BUZZINI P., GASPARETTI C., TURCHETTI B., CRAMAROSSA M.R., VAUGHAN-MARTINI A., MARTINI A., PAGNONI U.M., FORTI L. (2005): *Production of volatile organic compounds (VOCs) by yeasts isolated from the ascocarps of black (Tuber melanosporum Vitt.) and white (Tuber magnatum Pico) truffles*, «Archives of Microbiology», 184, pp.187–193.
- CITTERIO B., PIEROTTI C., CARDONI P., POTENZA L., AMICUCCI A., STOCCHI V., GOLA G., TRILLINI B., NUTI M.P. (1995): *Isolation of bacteria from sporocarps of Tuber magnatum Pico, T. borchii Vitt., and T. maculatum Vitt.: identification and biochemical characterization*, in *Biotechnology of Ectomycorrhizae: Molecular approaches*, a cura di Stocchi V., Bonfante-Fasolo P., Nuti M.P., Plenum Press, pp. 241-248.
- CITTERIO B., MALATESTA M., BATTISTELLI S., MARCHEGGIANI F., BAFFONE W., SALTARELLI R., STOCCHI V., GAZZANELLI G. (2001): *Possible involvement of Pseudomonas*

- fluorescens and Bacillaceae in structural modifications of *Tuber borchii* fruit bodies, «Canadian Journal of Microbiology», 47, pp. 264-268.
- COURTY P-E., BUÉE M., GAMBY DIEDHIU A., FREY-KLETT P, LE TACON, F., RINEAU F., TURPAULT M-P., UROZ S., GARBAYE J. (2010): *The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts*, «Soil Biology & Biochemistry», 42, pp. 679-698.
- DOMÌNGUEZ NÙÑEZ J. A., SELVA SERRANO J., RODRÌGUEZ BARREAL J. A., SAIZ DE OMEÑACA GONZÀLEZ J. A. (2006): *The influence of mycorrhization with Tuber melanosporum in the afforestation of a Mediterranean site with Quercus ilex and Quercus faginea*, «Forest Ecology and Management», 231, pp. 226–233.
- DOMINGUEZ J. A., MARTIN A., ANRIQUEZ A., ALBANESI A. (2012): *The combined effects of Pseudomonas fluorescens and Tuber melanosporum on the quality of Pinus halepensis seedlings*, «Mycorrhiza», 22, pp. 429–436.
- GARDIN L. (2005): *I tartufi minori in Toscana. Gli ambienti di crescita dei tartufi marzuolo e scorzone*, Quaderno ARSIA.
- GAZZANELLI G., MALATESTA M., PIANETTI A., BAFFONE W., STOCCHI V., CITTERIO B. (1999): *Bacteria associated to fruit bodies of the ecto-mycorrhizal fungus Tuber borchii Vittad.*, «Symbiosis», 26, pp. 211–219.
- GIOACCHINI A.M., MENOTTA M., GUESCINI M., SALTARELLI R., CECCAROLI P., AMICUCCI A., BARBIERI E., GIOMARO G., STOCCHI V. (2008): *Geographical traceability of Italian white truffle (Tuber magnatum Pico) by the analysis of volatile organic compounds*, «Rapid Communications in Mass Spectrometry», 22, pp. 3147-3153.
- GIOMARO G.M., SISTI D., ZAMBONELLI A. (2005): *Cultivation of Edible Ectomycorrhizal Fungi by in Vitro Mycorrhizal Synthesis*, in *Soil Biology, Volume 4, In Vitro Culture of Mycorrhizas*, a cura di Declerck S., Strullu D.-G., Fortin A., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 253- 267.
- HALL I.R., YUN W., AMICUCCI A. (2003): *Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms*, «Trends in Biotechnology», 21, 433–438.
- HALL I.R., BROWN G., ZAMBONELLI A. (2007): *Taming the Truffle. The History, Lore, and Science of the Ultimate Mushroom*. Timber Press, Portland.
- MARTINS M.A. (1993): *The role of the external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in the carbon transfer process between plants*, «Mycological Research», 97, pp. 807-810.
- MELLO A., CANTISANI A., VIZZINI A., BONFANTE P. (2002): *Genetic variation of Tuber uncinatum and its relatedness to other black truffles*, «Environmental Microbiology», 4, pp. 584–594.
- MELLO A., MURAT C., BONFANTE P. (2006): *Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy*, «FEMS Microbiology Letters», 260, pp. 1-8.
- MURAT C, VIZZINI A, BONFANTE P, MELLO A. (2005): *Morphological and molecular typing of the below-ground fungal community in a natural Tuber magnatum truffleground*, «FEMS Microbiology Letters», 245, pp. 307–313.

- NAPOLI C, MELLO A, BORRA A, VIZZINI A, SOURZAT P, BONFANTE P. (2010): *Tuber melanosporum, when dominant, affect fungal dynamics in truffle grounds*, «New Phytologist», 185, pp. 237–247.
- 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, pp. 1195-1205.
- RICCIONI C., BELFIORI B., RUBINI A., PASSERI V., ARCIONI S., PAOLOCCI F. (2008): *Tuber melanosporum outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario*, «New Phytologist», 180, pp. 466–478.
- RIZZELLO R., ZAMPIERI E., VIZZINI A., AUTINO A., CRESTI M., BONFANTE P., MELLO A. (2012): *Authentication of prized white and black truffles in processed products using quantitative real-time PCR*, «Food Research International», 48, pp. 792–797.
- RUBINI A., TOPINI F., RICCIONI C., PAOLOCCI F., ARCIONI S., (2004), *Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in white truffle (Tuber magnatum)*, «Molecular Ecology Notes», 4, pp.116–118.
- RUBINI, A., F. PAOLOCCI, C. RICCIONI, G. G. VENDRAMIN, ARCIONI S. (2005): *Genetic and phylogeographic structure in the symbiotic fungus Tuber magnatum*, «Applied and Environmental Microbiology», 71, pp.6584–6589.
- SIMARD S.W., MOLINA R., SMITH J.E., PERRY D.A., JONES M.D. (1997): *Shared compatibility of ectomycorrhizae on Pseudotsuga menziesii and Betula papyrifera seedlings grown in mixture in soils from southern British Columbia*, «Canadian Journal of Forest Research», 27, pp. 331-342.
- SISTI D., GIOMARO G., CECCHINI M., FACCIO A., NOVERO M., BONFANTE P. (2003): *Two genetically related strains of Tuber borchii produce Tilia mycorrhizas with different morphological traits*, «Mycorrhiza», 13, pp.107–115.
- SBRANA C., BAGNOLI G., BEDINI S., FILIPPI C., GIOVANNETTI M., NUTI M.P. (2000): *Adhesion to hyphal matrix and antifungal activity of Pseudomonas strains isolated from Tuber borchii ascocarps*. «Canadian Journal of Microbiology», 46, pp. 259–268.
- SBRANA C., AGNOLUCCI M., BEDINI S., LEPERA A., TOFFANIN A., GIOVANNETTI M., NUTI M.P. (2002): *Diversity of culturable bacterial populations associated to Tuber borchii ectomycorrhizas and their activity on T. borchii mycelial growth*, «FEMS Microbiology Letters», 211, pp.195–201.
- SBRANA C., NUTI M.P., GIOVANNETTI M. (2007): *Self-anastomosing ability and vegetative incompatibility of Tuber borchii isolates*, «Mycorrhiza», 17, pp. 667–675.
- SPLIVALLO R., OTTONELLO S., MELLO A., KARLOVSKY P. (2011): *Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis*, «New Phytologist», 189, pp. 688–699.
- VIOLANTE U. (1998): *Alla scoperta della tartuficoltura campana. Le condizioni ci sono*. «Campania Agricoltura», 6, pp. 23-26.

ZAMBONELLI A., IOTTI M., GIOMARO G., HALL I., STOCCHI V. (2002): *T. borchii cultivation: an interesting perspective*. In: *Edible Mycorrhizal Mushrooms*. Proceedings of 2nd International Workshop on Edible Ectomycorrhizal Mushrooms, New Zealand, 3–6 July 2001, a cura di Hall I., Wang Y., Danell E., Zambonelli, A.

ZAMBONELLI A., RIVETTI C., PERCURDANI R., OTTONELLO S. (2000): *TuberKey: a DELTA-based tool for the description and interactive identification of truffles*. «Mycotaxon»,74, pp. 57–76.