

MANUELA GIOVANNETTI^{*}, CRISTIANA SBRANA^{**}

^{*}*Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali, Università di Pisa,* ^{**}*Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, CNR*

Appuntamento al buio

1. INTRODUZIONE

Lo studio della struttura delle comunità biotiche è sempre difficoltoso, per la grande diversità di organismi che le compongono e l'incredibile rete di interazioni che lega gli uni agli altri. Migliaia di specie che coesistono e si relazionano sono coinvolte nel funzionamento dell'ecosistema, spesso giocando un ruolo fondamentale nella disponibilità di acqua e nutrienti per la comunità del suolo. Lo studio degli organismi, e in particolare dei microrganismi che popolano il suolo, deve tenere in considerazione non solo il singolo individuo con le sue caratteristiche biologiche, ma analizzarlo in funzione del suo ruolo come membro della comunità, cercando di comprendere anche i meccanismi di comunicazione attivi all'interno della popolazione.

Lo studio della biologia e della genetica dei funghi ectomicorrizici, organismi simbiotici che hanno un ruolo fondamentale nella nutrizione di molte piante forestali, permette di ottenere una migliore conoscenza delle relazioni tra piante e funghi in questi ecosistemi, popolati da molti simbiotici benefici che formano micorrize e supportano la crescita e la diversità vegetale e la produzione di carpofori, compresi quelli di *Tuber*.

Gli studi sono importanti anche per la conoscenza dei dettagli molecolari della comunicazione, ancora largamente sconosciuti, tra fungo simbiote e pianta e tra i simbiotici fungini stessi, appartenenti a specie diverse o a ceppi della stessa specie. Non è ancora chiaro se tutti i funghi simbiotici hanno in comune alcuni tratti genetici relativi alla comunicazione con la pianta ospite durante le fasi iniziali della formazione della simbiosi o se ogni sistema simbiotico ha evoluto un diverso "linguaggio" nel corso dell'evoluzione. Analogamente, i diversi modelli fungini studiati hanno mostrato meccanismi biochimici e molecolari di comunicazione tra le ife variabili in funzione delle specie, sebbene sembrano tratti comunemente rilevati il rilascio di feromoni, la crescita direzionale e i fenomeni di incompatibilità vegetativa e/o sessuale. Infatti le ife fungine sono in grado di discriminare ife compatibili, con le quali innescano meccanismi di riconoscimento che si concludono con la fusione vegetativa/sessuale, da quelle incompatibili. In questo ultimo caso il fungo attiva, prima della fusione o in seguito al contatto tra i protoplasmi,

dei sistemi di morte cellulare programmata che, isolando il materiale cellulare delle ife incompatibili, impediscono il trasferimento degli elementi genetici tra i due individui.

L'esito del riconoscimento è legato alla diversità genetica, poiché generalmente le interazioni tra specie diverse e tra isolati geneticamente distanti mostrano incompatibilità, al punto che all'interno di molte specie fungine si utilizzano i test di compatibilità vegetativa per definire gruppi di anastomosi, che comprendono isolati tra loro compatibili e spesso con caratteristiche fisiologiche e genetiche comuni.

Tra gli ascomiceti ectomicorrizici, molti studi sono stati effettuati su specie fungine all'interno del genere *Tuber* al fine di approfondire le conoscenze della fisiologia e genetica di questo genere, economicamente ed ecologicamente importante.

2. DIVERSITÀ GENETICA E FISIOLOGICA IN *TUBER* SPP.

Le caratteristiche fisiologiche e genetiche dei miceli fungini variano in funzione degli stadi del ciclo vitale: la presenza di micelio vegetativo e riproduttivo, strutture di assorbimento, di resistenza, di disseminazione e, nel caso di *Tuber*, delle strutture simbiotiche, fa sì che la conoscenza del ciclo vitale sia stata fondamentale per lo studio fisiologico e molecolare di questo genere. La germinazione delle spore di *Tuber*, regolata dalla percezione di segnali chimici provenienti dalle piante ospiti, sviluppa un micelio primario aploide (monocariotico) che forma la simbiosi con le radici della pianta ospite. Nella simbiosi ectomicorrizica, le ife fungine circondano le radici assorbenti a formare un mantello (micoclena) e penetrano intercellularmente a formare una rete (reticolo di Hartig), dove i nutrienti assorbiti dal fungo (soprattutto azoto, fosforo e zolfo) vengono ceduti alla pianta in cambio di carbonio organico. Dalle micorrize si sviluppano in seguito i cordoni miceliari per la produzione del carpoforo: lo sviluppo del tessuto fertile avviene mediante la fertilizzazione tra miceli compatibili per dare il micelio dicariotico in grado di differenziare aschi e ascospore.

Le ricerche condotte su *Tuber* hanno prodotto metodiche molecolari riproducibili per individuare marcatori genetici caratteristici di specie e isolati. Studi basati sull'analisi di sequenze anonime (RAPD), di regioni ribosomali (ITS e IGS) e di sequenze ripetute (microsatelliti) hanno individuato primers specifici per la determinazione di una o più specie mediante PCR e sequenze bersaglio per identificare i campioni tramite ibridazione. L'utilizzo di marcatori molecolari ha inoltre dimostrato che nelle specie *T. magnatum* e *T. melanosporum* è presente una bassa variabilità genetica (Frizzi *et al.*, 2001; Gandeboeuf *et al.*, 1997; Bertault *et al.*, 2001). In campioni originati da ascocarpi di *T. melanosporum* era stata inizialmente osservata assenza di eterozigosi, interpretata come conseguenza dell'isolamento dovuto

all'ultima glaciazione e di una riproduzione prevalentemente di tipo "selfing" (Bertault *et al.*, 1998, 2001): da ciò seguiva che lo sviluppo del corpo fruttifero poteva avvenire senza un partner sessuale compatibile, e lo sviluppo di fruttificazioni negli impianti sarebbe dipeso solamente da condizioni ambientali favorevoli. Studi successivi condotti su *T. magnatum* e *T. melanosporum* non hanno confermato tale modello (Rubini *et al.*, 2004, 2005; Paolocci *et al.*, 2006; Riccioni *et al.*, 2008). Le analisi, condotte con numerosi marcatori molecolari selezionati in zone di DNA ripetuto (simple sequence repeats, SSR), hanno evidenziato in *T. magnatum* l'esistenza di un elevato flusso genico non solamente all'interno delle popolazioni, ma anche tra popolazioni limitrofe, suggerendo eventi di ricombinazione.

Analisi condotte separatamente su micorrize di *T. magnatum* ottenute da inoculo precedentemente genotipizzato e su ascospore e ife sterili della gleba di *T. magnatum* e *T. melanosporum* hanno evidenziato la presenza di marcatori SSR e polimorfismi a singoli nucleotidi nella regione dello spaziatore interno trascritto (ITS/SNP) aggiuntivi a quelli della gleba nelle ascospore, mentre singoli e identici alleli erano sempre presenti nei campioni di gleba e micorrize analizzati, risultati aploidi. Nel caso di *T. melanosporum*, le recenti analisi del genoma hanno dimostrato trattarsi di una specie eterotallica, dotata dei componenti genetici necessari per la riproduzione sessuata conosciuti per altri ascomiceti, quali i geni che regolano il "mating type", la produzione e recezione di feromoni, la meiosi e lo sviluppo del corpo fruttifero (Martin *et al.*, 2010; Rubini *et al.*, 2010).

I risultati suggeriscono quindi la presenza di un processo di fertilizzazione, evidenziabile solamente dalle analisi delle ascospore, tra i miceli aploidi delle micorrize che iniziano la produzione del carpoforo, precedentemente alla differenziazione della gleba, di origine esclusivamente materna e formata indifferentemente da miceli MAT⁺ o MAT⁻. E' però chiaro che le nuove piantagioni dovrebbero essere stabilite con piante micorrizzate da miceli di entrambi i "mating types" per favorire il processo riproduttivo.

Gli studi riguardanti la variabilità genetica all'interno del genere *Tuber* hanno mostrato una più o meno ampia diversità intraspecifica in funzione delle specie, ma hanno comunque permesso di individuare marcatori specifici finalizzati allo sviluppo di metodi molecolari per l'identificazione delle specie e per l'analisi della diversificazione geografica all'interno del genere e delle specie (Lanfranco *et al.*, 1993; Henrion *et al.* 1994; Amicucci *et al.*, 1998; Paolocci *et al.* 1997; Mabru *et al.*, 2001; Mello *et al.*, 2001, 2002, 2005; Murat *et al.* 2004; Rubini *et al.*, 2005). Analisi molecolari di diverse regioni del DNA hanno mostrato la capacità di discriminare geneticamente sia campioni provenienti da ascocarpi che da micorrize, e lo spaziatore ITS, proposto come "codice a barre" per l'identificazione di *Tuber* a livello di specie,

rappresenta un buon bersaglio per il monitoraggio delle specie a livello di vivaio come di tartufaia (El Karkouri *et al.*, 2007). Il sequenziamento dei genomi dei funghi ectomicorrizici *Laccaria bicolor* e *T. melanosporum* suggerisce una elevata diversità tra i due simbionti, particolarmente per ciò che riguarda i meccanismi di interazione con l'ospite e per la presenza elevata, nell'esteso genoma del tartufo nero, di elementi genetici mobili (trasposoni). Inoltre, dalle sequenze di *T. melanosporum* sono assenti quelle relative alle vie biosintetiche per la produzione di micotossine (Martin *et al.*, 2010).

A livello intraspecifico, è stato osservato che isolati diversi appartenenti alla specie *T. borchii* hanno la capacità di formare micorrize dotate di micoclona con caratteristiche morfologiche diverse, in quanto le dimensioni, il grado di vacuolizzazione e la densità di mitocondri nelle ife appaiono caratteri isolato-specifici e, in alcuni casi, correlati con la capacità di colonizzazione dell'isolato (Giomaro *et al.* 2000; Sisti *et al.*, 2003). Inoltre, la velocità di crescita, le attività enzimatiche relative alla via glicolitica e i profili elettroforetici di polipeptidi e mRNA hanno evidenziato variabilità tra isolati diversi di *T. borchii*, mostrando una peculiare diversità genetica per l'isolato 1BO, dotato di crescita più rapida rispetto agli altri (Saltarelli *et al.*, 1999).

Dal punto di vista genetico, la caratterizzazione di isolati diversi appartenenti alle specie *T. borchii*, *T. maculatum*, *T. albidum*, *T. magnatum* e *T. melanosporum* ha mostrato diversità di profili RAPD e di sequenze delle regioni ITS e IGS (Henrion *et al.*, 1994; Potenza *et al.*, 1994; Rossi *et al.*, 1999; Ciarmela *et al.*, 2002; Iotti *et al.*, 2002). Nella specie *T. melanosporum* è stata osservata una ampia diversità genetica e in particolare una elevata variabilità nei marcatori SSR localizzati in geni regolatori coinvolti nello sviluppo di corpi fruttiferi e micorrize (Murat *et al.*, 2011). La caratterizzazione a livello di isolato potrebbe essere implementata dallo studio non solo della variabilità molecolare ma anche da quello della diversità nella produzione di componenti volatili (VOCs), che ha evidenziato la possibilità di discriminare ascocarpi di diversa origine territoriale (Gioacchini *et al.*, 2008), e che potrebbe rappresentare un mezzo per aumentare le conoscenze relative alla capacità dei diversi miceli di produrre questi segnali, importanti nella comunicazione tra organismi.

3. COMPATIBILITÀ E INCOMPATIBILITÀ VEGETATIVA IN *TUBER* SPP.

Nei funghi filamentosi, la fusione vegetativa tra le ife (anastomosi) è un fenomeno molto diffuso e può essere considerato uno degli eventi morfogenetici principali del ciclo vitale fungino. Per mezzo delle anastomosi vengono riparate le ife danneggiate e il micelio diviene interconnesso formando le reti, che permettono la comunicazione e la traslocazione di nutrienti

all'interno di individui fungini (Gregory, 1984; Rayner, 1996). E' interessante notare che in alcune specie fungine la capacità di formare fusioni ifali è stata anche messa in relazione alla maggiore capacità di sopravvivenza, come ad esempio in alcuni isolati di *Rhizoctonia solani* (Hyakumachi e Ui, 1987; Hyakumachi *et al.*, 1987).

Nei funghi micorrizici le anastomosi rappresentano un evento citologico fondamentale nella formazione di reti extraradicali interconnesse, che si sviluppano dalle radici colonizzate e assorbono e traslocano nutrienti minerali alle piante ospiti. Le reti hanno anche l'importante funzione di connettere tra loro ospiti vegetali diversi, anche appartenenti a specie e famiglie distanti (Brownlee *et al.*, 1991; Martins, 1993; Simard, 1997; Giovannetti *et al.*, 2001; Giovannetti *et al.*, 2004).

Il fenomeno delle fusioni ifali è inoltre stato utilizzato negli studi di biodiversità, per saggiare la diversità genetica di miceli appartenenti ad isolati co-specifici: questo metodo citomorfologico si è rivelato molto sensibile, tanto da individuare, all'interno di molte specie fungine, diversi gruppi di anastomosi o compatibilità vegetativa, caratterizzati da profili genetici diversi (Sen, 1990; Worrall, 1997; Chillali *et al.*, 1998; Stenlid e Vasiliauskas, 1998; Mes *et al.*, 1999; Saupé, 2000). Nelle fusioni tra isolati compatibili, la continuità protoplasmatica che si crea tra le ife anastomizzate permette la distribuzione delle risorse, secondo i gradienti che si creano nel micelio, e il flusso genetico, con la combinazione di nuclei e mitocondri dei due isolati. La reazione di incompatibilità che si origina dopo la fusione di isolati non compatibili coinvolge fenomeni di vacuolizzazione, attivazione di fenolossidasi e proteasi e infine la morte cellulare del compartimento interessato dalla fusione: in questo modo viene mantenuta l'identità genetica e impedita l'eventuale immissione di materiale genetico pericoloso (ad es. micovirus). In molti casi i miceli non compatibili non vanno incontro a fusione, sia per assenza di processi di riconoscimento tra le ife sia mediante meccanismi che arrestano il riconoscimento in stadi precoci (Giovannetti *et al.*, 2003).

Le osservazioni del micelio delle diverse specie di *Tuber* hanno evidenziato la presenza di anastomosi, sebbene questo carattere non sia stato quantificato in relazione alle diversità genetiche o fisiologiche individuate. La compatibilità/incompatibilità vegetativa tra diversi isolati di *T. borchii* in coltura (1BO/ATCC 96540, 10RA, 17BO, Z43 e B2) è stata studiata utilizzando sistemi di coltura in piastra e in microcamera (Sbrana *et al.*, 2007). In tre degli isolati studiati, le interazioni tra ife appartenenti allo stesso isolato hanno mostrato fusioni perfette, cioè con continuità protoplasmatica tra le ife anastomizzate e presenza di nuclei nei ponti ifali, con frequenze comprese tra il 55.7% e l'88.0% dei contatti. In uno degli isolati capaci di formare anastomosi, *T. borchii* 10RA, è stata monitorata la fusione ifale, con durata variabile tra 115 e

200 min, mediante microscopia time-lapse: un fenomeno di attrazione (homing) tra le ife vicine, evidenziato dal riorientamento della crescita degli apici ifali l'uno verso l'altro in modo da favorire il contatto, era seguito da una maggiore vacuolizzazione all'interno dell'ifa contattata, precedente la lisi delle pareti, dopo la quale il flusso protoplasmatico tra le ife connesse era evidente. Spesso in seguito alla fusione si osservava la formazione di un setto nell'ifa contattata, a distanza di 8–10 μm dal sito di fusione. Gli isolati capaci di anastomosi mostravano crescita concorrente, indicativa di compatibilità, quando due colonie venivano coltivate nella stessa piastra, mentre negli altri casi si osservavano formazione di barrage, di micelio aereo o crescita senza interazioni.

Entrambi i sistemi di coltura utilizzati, piastra e microcamera, hanno evidenziato assenza di fusioni perfette e diversi gradi di incompatibilità vegetativa tra miceli appartenenti ad isolati diversi, con alta frequenza di contatti senza interazioni ifali e una ridotta frequenza, nell'interazione tra 10RA, 17BO e Z43, di incompatibilità post-fusione. I risultati appaiono coerenti con i dati relativi alla diversità degli isolati studiati, ottenuti con metodologie molecolari, e confermano la validità dell'uso dei test di compatibilità vegetativa per la discriminazione di genotipi fungini.

Inoltre, i risultati indicavano una relazione tra la capacità degli isolati di anastomizzare al loro interno e la velocità di crescita e competitività in vitro: gli isolati capaci di formare fusioni si mostravano più competitivi nelle colture in piastra. La capacità di competere o di innescare fenomeni di incompatibilità vegetativa potrebbe essere alla base dell'esclusione di genotipi diversi di miceli aploidi di *T. melanosporum* osservata *in planta* (Rubini *et al.*, 2011), dove a 6 mesi dall'inoculo misto di ascospore erano osservabili micorrize formate da più "mating types", mentre un solo "mating type" era rilevabile nella pianta dopo un anno. I risultati di questo studio mostravano inoltre che micorrize vicine (tra 3 e 30 m) erano formate dallo stesso mating type caratterizzato dagli stessi marcatori molecolari, fenomeno probabilmente dovuto alla capacità di un solo isolato di diffondersi e dominare in una data nicchia ecologica originando un "genet". La compatibilità ifale può quindi giocare un ruolo importante nella biologia del micelio di tartufo, permettendo la connessione tra le ife e i loro protoplasmi all'interno dello stesso genet ed escludendo genet meno competitivi dalla colonizzazione degli ospiti.

4. BIBLIOGRAFIA

- AMICUCCI, A., ZAMBONELLI A., GIOMARO G., POTENZA L., STOCCHI V. (1998): *Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus Tuber by species-specific ITS primers*, «Molecular Ecology», 7, pp. 273-277.
- BERTAULT, G., RAYMOND, M., BERTHOMIEU, A., CALLOT, G., FERNANDEZ, D. (1998): *Trifling variation in truffles*, «Nature», 394, p. 734.
- BERTAULT, G., ROUSSET, F., FERNANDEZ, D., BERTHOMIEU, A., HOCHBERG, M.E., CALLOT, G., RAYMOND, M. (2001): *Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field*, «Heredity», 86, pp. 451-458.
- BROWNLEE C., DUDDRIDGE J.A., MALIBARI A., READ D.J. (1991): *The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing pathways for assimilate and water transport*, «Plant and Soil», 71, 433-443.
- CHILLALI M., IDEER-IGHILI H., GUILLAUMIN J.J., MOHAMMED C., LUNG ESCARMANT B., BOTTON B. (1998): *Variation in the ITS and IGS regions of ribosomal DNA among the biological species of European Armillaria*, «Mycological Research», 102, pp. 533-540.
- CIARMELA P., POTENZA L., CUCCHIARINI L., ZEPPA S., STOCCHI V. (2002): *PCR amplification and polymorphism analysis of the intergenic spacer region of ribosomal DNA in Tuber borchii*, «Microbiological Research», 157, pp. 69-74.
- EL KARKOURI K., MURAT C., ZAMPIERI E., BONFANTE P. (2007): *Identification of internal transcribed spacer sequence motifs in truffles: a first step toward their DNA bar coding*, «Applied and Environmental Microbiology», 73, pp. 5320-5330.
- FRIZZI, G., LALLI G., MIRANDA M., PACIONI G. (2001): *Intraspecific isozyme variability in Italian populations of the white truffle Tuber magnatum*, «Mycological Research», 105, pp. 365-369.
- GANDEBOEUF D., DUPRE C., ROECKEL DREVET P., NICOLAS P., CHEVALIER G. (1997): *Typing Tuber ectomycorrhizae by polymerase chain amplification of the internal transcribed spacer of rDNA and the sequence characterized amplified region markers*, «Canadian Journal of Microbiology», 43, pp. 723-728.
- GIOACCHINI AM, 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., ZAMBONELLI A., SISTI D., CECCHINI M., EVANGELISTA V., STOCCHI V. (2000): *Anatomical and morphological characterization of mycorrhizas of five strains of Tuber borchii Vittad.* «Mycorrhiza», 10, pp. 107-114.
- GIOVANNETTI M., FORTUNA P., CITERNESI A.S., MORINI S., NUTI M.P. (2001): *The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks.* «New Phytologist», 151, pp. 717-724.
- GIOVANNETTI M., SBRANA C., STRANI P., AGNOLUCCI M., RINAUDO V., AVIO L. (2003): *Genetic diversity of geographically different isolates of Glomus mosseae detected by vegetative compatibility and biochemical and molecular analysis.* «Applied and Environmental Microbiology», 69, pp. 616-624.
- GIOVANNETTI M., SBRANA C., AVIO L., STRANI P. (2004) *Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks.* «New Phytologist», 164, pp. 175–181.
- GREGORY P.H. (1984): *The fungal mycelium: an historical perspective.* «Transactions of the British Mycological Society», 82, pp. 1-11.
- HENRION B., CHEVALIER G., MARTIN F. (1994): *Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers.* «Mycological Research», 98, pp. 37-43.
- HYAKUMACHI M., UI T. (1987): *Non-self-anastomosing isolates of Rhizoctonia solani obtained from fields of sugarbeet monoculture.* «Transactions of the British Mycological Society», 89, pp. 155-159.
- HYAKUMACHI M., YOKOYAMA K., UI T. (1987): *Role of melanin in the susceptibility and resistance of Rhizoctonia solani to microbial lysis.* «Transactions of the British Mycological Society», 89, pp. 27-33.
- IOTTI M., AMICUCCI A., STOCCHI V., ZAMBONELLI A. (2002): *Morphological and molecular characterization of mycelia of some Tuber species in pure culture.* «New Phytologist», 155, 499-505.
- LANFRANCO L., WYSS P., MARZACHI C., BONFANTE P. (1993): *DNA probes for identification of the ectomycorrhizal fungus Tuber magnatum Pico.* «FEMS Microbiology Letters», 114, pp. 245–225.
- MABRU D., DUPRE C., DOUET J.P., LEROY P., RAVEL C., RICARD J.M., MEDINA B., CASTROVIEJO M. ET AL. (2001): *Rapid molecular typing method for the reliable detection of Asiatic black truffle (Tuber indicum) in commercialized products: fruiting bodies and mycorrhizal seedlings.* «Mycorrhiza», 11, pp. 89-94.

- MARTIN F., KOHLER A., MURAT C., BALESTRINI R., COUTINHO P.M., JAILLON O., MONTANINI B., MORIN E., NOEL B. ET AL. (2010) *Perigord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis*, «Nature», 464, pp. 1033-1038.
- 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., FONTANA A., MEOTTO F., COMANDINI O., BONFANTE P. (2001): *Molecular and morphological characterization of Tuber magnatum mycorrhizas in a long-term survey*, «Microbiological Research», 155, pp. 279-284.
- MELLO A., CANTISANI A., VIZZINI A., BONFANTE P. (2002): *Genetic variability of Tuber uncinatum and its relatedness to other black truffles*, «Environmental Microbiology», 4, pp. 584-594.
- MELLO A., MURAT C., VIZZINI A., GAVAZZA V., BONFANTE P. (2005): *Tuber magnatum, a species of limited geographical distribution: its genetic diversity inside and outside a truffle ground*, «Environmental Microbiology», 7, pp. 55–65.
- MES J.J., WESTSTEIJN E.A., HERLAAR F., LAMBALK J.J.M., WIJBRANDI J., HARING M.A., CORNELISSEN B.J.C. (1999): *Biological and molecular characterization of Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici divides race 1 isolates into separate virulence groups*, «Phytopathology», 89, pp. 156-160.
- MURAT C., DIEZ J., LUIS P., DELARUELLE C., DUPRÉ C., CHEVALIER G., BONFANTE P., MARTIN F. (2004): *Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle Tuber melanosporum*, «New Phytologist», 164, pp. 401–411.
- MURAT C., RICCIONI C., BELFIORI B., CICHOCKI N., LABBÉ J., MORIN E., TISSERANT E., PAOLOCCI F., RUBINI A., MARTIN F. (2011) *Distribution and localization of microsatellites in the Perigord black truffle genome and identification of new molecular markers*, «Fungal Genetics and Biology», 48, pp. 592-601.
- PAOLOCCI F., RUBINI A., GRANETTI B., ARCIONI S. (1997): *Typing Tuber melanosporum and Chinese black truffle species by molecular markers*, «FEMS Microbiology Letters», 153, pp. 255–260.
- PAOLOCCI F., RUBINI A., RICCIONI C., ARCIONI S. (2006): *Reevaluation of the Life Cycle of Tuber magnatum*, «Applied and Environmental Microbiology», 72, pp. 2390–2393.
- POTENZA L., AMICUCCI A., ROSSI I., PALMA F., DE BELLIS R., CARDONI P., STOCCHI V. (1994): *Identification of Tuber magnatum Pico DNA markers by RAPD analysis*, «Biotechnology Techniques», 8, pp. 93–98.

- RAYNER A.D.M. (1996): *Interconnectedness and individualism in fungal mycelia*. In: Sutton B.C. (ed), *A century of mycology*, Cambridge University Press, pp. 193-232.
- ROSSI I., ZEPPA S., POTENZA L., SISTI D., ZAMBONELLI A., STOCCHI V. (1999): *Intraspecific polymorphisms among Tuber borchii Vittad. mycelial strains*, «Symbiosis», 26, pp. 313-325.
- 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.
- RUBINI A., PAOLOCCI F., RICCIONI C., VENDRAMIN G.G., ARCIONI S. (2005): *Genetic and phylogeographic structure in the symbiotic fungus Tuber magnatum*, «Applied and Environmental Microbiology», 71, pp. 6584–6589.
- 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., BELFIORI B., RICCIONI C., TISSERANT E., ARCIONI S., MARTIN F., PAOLOCCI F. (2011): *Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete Tuber melanosporum*, «New Phytologist», 189, pp. 710–722.
- RUBINI A., BELFIORI B., RICCIONI C., ARCIONI S., MARTIN F., PAOLOCCI F. (2011): *Tuber melanosporum: mating typedistribution in a natural plantation and dynamics of strains of different mating types on the roots of nursery-inoculated host plants*, «New Phytologist», 189, pp. 723-735.
- SALTARELLI R., CECCAROLI P., CESARI P., ZEPPA S., POTENZA L., STOCCHI V. (1999): *Strain differences in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus Tuber borchii*, «Mycological Research», 103, pp. 1524-1528.
- SAUPÉ S.J. (2000): *Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes*, «Microbiology and Molecular Biology Reviews», 64, pp. 489–502.
- SBRANA C., NUTI M.P., GIOVANNETTI M. (2007): *Self-anastomosing ability and vegetative incompatibility of Tuber borchii isolates*, «Mycorrhiza», 17, pp. 667–675.
- SEN R. (1990): *Intraspecific variation in two species of Suillus from Scots pine (Pinus sylvestris L.) forests based on somatic incompatibility and isozyme analyses*, «New Phytologist», 114, pp. 607-616.
- 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.

STENLID J., VASILIAUSKAS R. (1998): *Genetic diversity within and among vegetative compatibility groups of Stereum sanguinolentum determined by arbitrary primed PCR*, «Molecular Ecology», 7, pp. 1265-1274.

WORRALL J.J. (1997): *Somatic incompatibility in basidiomycetes*, «Mycologia», 89, pp. 24-36.