

Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare

Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"

C.N.R.-I.G.V. - Perugia

Università degli Studi di Bologna

INCONTRO SCIENTIFICO

Progetto di Ricerca

TUBER: STUDIO DEL RUOLO E FUNZIONE DEL TARTUFO COME NUOVO MODELLO PER LA SALVAGUARDIA DELL'AMBIENTE E DELLA BIODIVERSITÀ



13 Dicembre 2010 ore - 09,30
Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"
Aula Presidenza – Facoltà di Scienze Motorie
Via M. Oddi, 14 – Urbino

Progetto finanziato dal

**Ministero dell'Ambiente e della
Tutela del Territorio e del Mare**

Coordinatore del Progetto:

Prof. Vilberto Stocchi
Università degli Studi di Urbino “*Carlo Bo*”
Dipartimento di Scienze Biomolecolari

Unità di Ricerca coinvolte:

CNR-IGV: Istituto di Genetica Vegetale
articolazione territoriale di Perugia
via Madonna Alta, 130
06128 Perugia

Università degli Studi di Bologna
Dipartimento di Protezione e
Valorizzazione Agroalimentare
via Fanin, 46
40127 Bologna

Università degli Studi di Urbino “*Carlo Bo*”
Dipartimento di Scienze Biomolecolari
via Saffi, 2
61029 Urbino (PU)

RELAZIONI

Nuove conoscenze sull'ecologia di *Tuber borchii* dallo studio delle comunità fungine ectomicorriziche

Mirco Iotti, Federica Piattoni, Alessandra Zambonelli

Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, Università degli Studi di Bologna, via Fanin 46, 40127 Bologna.

Tuber borchii è un ascomicete ectomicorrizico di notevole interesse scientifico che produce corpi fruttiferi ipogei di particolare pregio gastronomico. Nonostante il valore commerciale dei suoi ascomi sia inferiore a quello di *Tuber magnatum* e *T. melanosporum*, questa specie è particolarmente apprezzata in alcuni mercati locali sia come prodotto fresco che trasformato (Zambonelli et al., 2002). Nell'ultimo decennio l'interesse per questo tartufo ha valicato i confini nazionali e la sua coltivazione si sta diffondendo anche in paesi extraeuropei quali come la Nuova Zelanda, dove viene commercializzato con prezzi simili a quelli di *T. melanosporum* (Hall, 2008).

T. borchii è diffuso naturalmente in quasi tutte le regioni italiane e ritrovamenti di ascomi di questo tartufo sono stati segnalati anche in molti altri paesi europei quali la Filandia, l'Irlanda, la Polonia, l'Ungheria, ecc. (Hall et al., 2007).

Rispetto alle altre specie di tartufi più pregiate *T. borchii* è dotato di un'elevata adattabilità ecologica che lo rende capace di stabilire simbiosi con una vasta gamma di piante ospiti e di svilupparsi in ambienti pedo-climatici molto differenti fra loro (Zambonelli et al., 2002; Gardin, 2005; Hall et al., 2007). Pur preferendo i suoli sabbiosi e calcarei delle pinete litoranee lo possiamo trovare anche nei terreni acidi delle sugherete in Sardegna ma anche in diversi tipi di boschi collinari quali castagneti, querceti ecc. Queste caratteristiche biologiche ne rendono possibile la coltivazione anche in ambienti nei quali non sono in grado di svilupparsi le altre specie di tartufi più pregiate. Inoltre, la facilità d'isolamento e la capacità di sviluppo *in vitro* del micelio hanno consentito a *T. borchii* di diventare la specie modello per la ricerca nell'ambito del genere *Tuber*. L'interesse scientifico per questo tartufo è infatti dimostrato dall'elevato numero di pubblicazioni che in questi ultimi 20 anni lo hanno avuto come oggetto di studio.

Nonostante l'importanza scientifica e le potenzialità agronomiche di *T. borchii* sono estremamente scarse le conoscenze sulle comunità microbiche che dominano gli ambienti naturali dove si sviluppa questa specie di tartufo. I dati riportati in questa relazione sono stati ricavati da un lavoro pubblicato nell'ambito di questo progetto (Iotti et al., 2010). La ricerca è stata finalizzata alla caratterizzazione della comunità fungina ectomicorrizica presente in tartufaie naturali di *T. borchii* situate nel litorale ferrarese, una delle aree più produttive in Italia. In particolare sono stati valutati gli effetti della specie ospite e del punto di fruttificazione sulla composizione della comunità stessa.

L'area oggetto di studio è localizzata nel Parco del Delta del Po dove sono diffusi boschi di piccole e medie dimensioni, ecologicamente simili, residui dell'antico bosco eliceo. Le specie ospiti dominanti sono *Pinus pinaster* e *Pinus pinea* di origine antropica ma questi ambienti si stanno rinaturalizzando con *Quercus ilex* (Corticelli et al., 2004). Le analisi sono state effettuate su 30 campioni di suolo, metà prelevati nel punto di ritrovamento degli ascomi di *T. borchii* (Tbo0) e metà ad un metro di distanza dal precedente (TboI). Sette ascomi sono stati raccolti nella pineta di Volano ed 8 nel bosco della Mesola. Le radici rimosse dal suolo sono state attribuite a pino o quercia in base alle loro caratteristiche morfologiche mentre gli apici micorrizzati sono stati conteggiati e suddivisi in morfotipi in accordo con Agerer (2006). L'identificazione molecolare di ciascun morfotipo è stata realizzata tramite la metodologia descritta da Iotti e Zambonelli (2006) mentre la classificazione tassonomica di ciascun OTU (Operational Taxonomic Unit) è stata effettuata seguendo i criteri proposti da Landeweert et al. (2003). Le comunità fungina ectomicorriziche sono state caratterizzate tramite 3 misure di diversità: la ricchezza, l'indice di Pielou e l'indice di Shannon–Wiener mentre il confronto fra le comunità (Tbo0 vs TboI, *Pinus* sp. vs *Q. ilex*) è stato eseguito tramite il coefficiente di similarità di Bray-Curtis.

In totale sono stati esaminati 13134 apici micorrizzati, suddivisi in 70 morfotipi, 56 dei quali sono stati attribuiti ad altrettanti OTU in base alle analisi delle sequenze delle loro regioni ITS. L'intera comunità ectomicorrizica era caratterizzata da un'elevata biodiversità, ma solo *T. borchii* ed alcune specie appartenenti alle famiglie delle Thelephoraceae e delle Sebacinaceae mostravano valori di abbondanza superiori al 3%. La presenza di poche specie dominanti accompagnate da un numero elevato di specie rare è una caratteristica comune delle comunità fungine ectomicorriziche (Taylor, 2002). Fra i basidiomiceti la famiglia con i valori di abbondanza maggiori era rappresentata dalle

Thelephoraceae (42,4%, 20 OTU), seguita dalle Sebacinaceae (9,7%, 6 OTU) e dalle Inocybaceae (6,3%, 8 OTU) mentre fra gli ascomiceti solo il genere *Tuber* colonizzava copiosamente le radici (21,7%, 2 OTU: *T. borchii* e *T. dryophilum*). Differenze con le altre comunità ectomicorriziche descritte in bibliografia sono invece da attribuire alla scarsità di Russulaceae ed all'assenza di micorrize di *Cenococcum* spp. accreditate fra le specie fungine più diffuse negli ecosistemi forestali (Lobuglio et al., 1996; Horton e Bruns, 2001).

Il confronto fra i campioni raccolti nei punti produttivi (Tbo0) ed in quelli non produttivi (TboI) ha evidenziato che la biodiversità è inferiore sulle radici localizzate in prossimità dei corpi fruttiferi di *T. borchii* anche se solo l'indice di Pielou (che valuta l'uniformità di distribuzione degli individui fra le specie) ha fatto registrare differenze statisticamente significative. Differenze significative sono state trovate anche nella composizione di OTU fra le comunità presenti nei campioni Tbo0 (maggior abbondanza per le Thelephoraceae) e TboI (maggior abbondanza di Inocybaceae, Sebacinaceae e Russulaceae). Le micorrize di *T. borchii* erano presenti in entrambe le comunità ma erano significativamente più abbondanti nei campioni Tbo0. Questo dimostra che *T. borchii* si comporta in modo simile a *T. melanosporum* (Napoli et al., 2010) ma in modo diametralmente opposto a *T. magnatum* o altre specie pregiate come *B. edulis* per le quali solo poche micorrize supportano lo sviluppo dei rispettivi corpi fruttiferi nei punti produttivi (Murat et al., 2005; Peintner et al., 2007). Al contrario di *T. melanosporum* (Napoli et al., 2010), *T. borchii* però non ha un effetto inibitore sulla biodiversità poiché determina solo la riduzione del numero di micorrize delle altre specie fungine ma non influenza la ricchezza in specie.

Le analisi statistiche condotte sulle comunità ectomicorriziche che si sviluppano sulle radici delle due specie ospiti (*Q. ilex* vs *Pinus* spp.) non hanno prodotto differenze significative solo riguardo la loro composizione ma non la loro biodiversità intrinseca. Solo il 26% dei taxa identificati, fra cui *T. borchii* e *T. dryophilum*, formava micorrize con entrambi gli ospiti, mentre le altre specie si sviluppavano solo sui pini (es. *Inocybe rufuloides*) o solo sul leccio (*Tomentella lilacinogrisea*). Nel sito di studio la distribuzione di Sebacinaceae e Inocybaceae è fortemente influenzata dalla pianta ospite.

Ulteriori indagini effettuate sull'intera area oggetto dell'indagine hanno permesso di scoprire che nel Parco del Delta del Po si sviluppano entrambe le specie criptiche attribuibili a *T. borchii* recentemente caratterizzate da Bonuso et al. (2010). Questo studio, basato sull'analisi combinata di 4 diversi loci nucleari, ha dimostrato che i ceppi di *T.*

borchii di origine italiana si suddividono in due distinti gruppi filogenetici caratterizzati da una bassa variabilità al loro interno e dall'assenza di un reciproco flusso genetico. Inoltre la mancanza di caratteri biometrici e morfologici discriminanti i rispettivi ascomi ha indotto gli autori ad concludere che queste due linee geneticamente isolate possono rappresentare due specie criptiche non ancora sottoposte a differenziazione morfologica.

Per approfondire le conoscenze sulla distribuzione geografica di queste due forme criptiche di *T. borchii* è stata effettuata una ricerca *in silico* di sequenze ITS simili a quelle di riferimento, recuperandone poi i dati bibliografici riferiti agli ascomi od alle micorrize da cui sono state ottenute. Inoltre sono stati geneticamente caratterizzati parte degli ascomi classificati come *T. borchii* depositati presso l'erbario del "Centro di Micologia" dell'Università di Bologna. Tale caratterizzazione è stata condotta con l'impiego di primer specifici appositamente selezionati dalle sequenze delle regioni ITS in grado di discriminare le due forme criptiche.

In totale l'indagine ha considerato 129 individui, 113 di origine italiana e 16 da altri paesi europei

Dalle indagini effettuate si è potuto stabilire che: 1) entrambe le specie sono diffuse in tutto il territorio italiano e formano simbiosi sia con conifere sia con latifoglie; 2) la specie riferibile al genotipo 1 è quella più frequente ed abbondante in Italia; 3) solo raramente condividono gli stessi ambienti e quando ciò si verifica, come nell'area di campionamento, solo in alcuni boschi si sviluppano entrambe le specie; 4) la specie riferibile al gruppo 2 è diffusa anche negli altri paesi europei (in Spagna, Portogallo, est-nord Europa) mentre il genotipo 1 non sembra essere diffuso oltre il territorio alpino, anche se il numero di campioni considerato allo stato attuale è alquanto limitato.

Dai risultati ottenuti è possibile concludere che le due specie criptiche sembrano preferire microhabitat differenti poiché difficilmente si sviluppano contemporaneamente nello stesso ambiente. La specie riferibile al genotipo 2 sembra essere quella dotata di una maggiore adattabilità ambientale sviluppandosi sia in ambienti pedoclimatici dell'area nord europea sia in quelli tipici del mediterraneo.

Bibliografia

- Agerer R (2006) Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycol Prog* 5: 67–107.
- Corticelli S, Garberi ML, Gavagni A & Guandalini B (2004) Carte della vegetazione e della naturalità dei parchi regionali e di altre zone. Servizio Sistemi informativi geografici, Regione Emilia Romagna.
- Gardin L (2005) I tartufi minori in Toscana. Gli ambienti di crescita dei tartufi marzuolo e scorzone. Quaderno ARSIA, January 2005.
- Hall IR (2008) *The Bianchetto Truffle, Tuber borchii*, revised edn. Truffles & Mushrooms Consulting Ltd, Dunedin, New Zealand. <http://www.trufflesandmushrooms.co.nz/Tuber%20borchii%20web.pdf>
- Hall I, Brown G & Zambonelli A (2007) *Taming the Truffle. The History, Lore, and Science of the Ultimate Mushroom*. Timber Press, Portland, OR.
- Horton TR & Bruns TD (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Mol Ecol* 10: 1855–1871.
- Iotti M, Lancellotti E, Hall I & Zambonelli A. (2010) *The ectomycorrhizal community in natural Tuber borchii grounds*. *FEMS Microbiol Ecol.*, 72: 250–260.
- Iotti M & Zambonelli A (2006) A quick and precise technique for identifying ectomycorrhizas by PCR. *Mycol Res* 110: 60–65.
- Landeweert R, Leeflang P, Kuyper TW, Hoffland E, Rosling A, Wernars K & Smit E (2003) Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Appl Environ Microbiol* 69: 327–333.
- Lobuglio KF, Berbee ML & Taylor JW (1996) Phylogenetic origins of the asexual mycorrhizal symbiont *Cenococcum geophilum* Fr. and other mycorrhizal fungi among the Ascomycetes. *Mol Phylogenet Evol* 2: 287–294.
- Murat C, Vizzini A, Bonfante P & Mello A (2005) Morphological and molecular typing of the below-ground fungal community in a natural *Tuber magnatum* truffle-ground. *FEMS Microbiol Lett* 245: 307–313.
- Napoli C, Mello A, Borra A, Vizzini A, Sourzat P & Bonfante P (2010) *Tuber melanosporum*, when dominant, affects fungal dynamics in truffle grounds. *New Phytol* 185: 237–247.
- Peintner U, Iotti M, Klotz P, Bonuso E & Zambonelli A (2007) Soil fungal communities in a *Castanea sativa* (chestnut) forest producing large quantities of *Boletus edulis* sensu lato (porcini): where is the mycelium of porcini? *Environ Microbiol* 9: 880–889.
- Zambonelli A, Iotti M, Giomaro G, Hall I & Stocchi V (2002) *T. borchii* cultivation: an interesting perspective. *Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, CD ROM, 3–6 July 2001, Christchurch, New Zealand (Hall I, Yun W, Danell E & Zambonelli A, eds), New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited, Christchurch, New Zealand.

La crioconservazione dei miceli di *Tuber* spp. per la creazione di una banca di germoplasma di tartufi

Federica Piattoni, Siham Baoutahir , Mirco Iotti, Alessandra Zambonelli

Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, Università degli Studi di Bologna, via Fanin 46, 40127 Bologna

L'Italia è l'unico paese dove si registra la crescita spontanea delle due specie di tartufi di maggior pregio: *T. melanosporum* (tartufo nero pregiato) e *T. magnatum* (tartufo bianco pregiato) insieme ad altre specie di minore ma sempre consistente interesse commerciale, come il tartufo estivo (*T. aestivum/uncinatum*) ed il tartufo bianchetto (*Tuber borchii*). La raccolta e commercializzazione di queste specie fungine rappresenta un importante fonte di reddito soprattutto per la popolazioni collinari e montane. Purtroppo la produzione di tartufi in Italia e nel resto d'Europa è notevolmente calata nell'ultimo secolo a causa del disboscamento, del degrado del territorio montano, della raccolta eccessiva e dei cambiamenti climatici (Hall *et al.*, 2007). Inoltre queste importanti specie autoctone rischiano di essere soppiantate da specie alloctone più competitive (quali i cinesi *T. indicum*, *T. himalayense* e *T. sinense*) con evidenti rischi per la biodiversità fungina.

In questo lavoro si sono studiate tecniche per la crioconservazione del micelio di tartufo al fine di porre i presupposti per la creazione di una prima banca germoplasma di questi preziosi funghi al fine di conservarne la biodiversità. La crioconservazione, tecnica già affermata in campo medico, veterinario e botanico rappresenta il principale strumento per la conservazione a lungo termine di materiale biologico. Essa si basa sulla riduzione ed il successivo arresto delle funzioni metaboliche del materiale biologico, conservandone la piena vitalità.

Le prove sono state condotte utilizzando i ceppi 2364 e 10RA di *T. borchii* e Tae2 di *T. aestivum*.

Il lavoro svolto è stato suddiviso in due parti: la congelazione del micelio in azoto liquido e lo scongelamento del micelio. Per la congelazione sono state impiegati piccoli pezzetti

(1mm) di micelio di *Tuber borchii* e *Tuber aestivum*, sviluppatasi su substrato agarizzato (PDA, Difco e WPM rispettivamente). Questi sono stati posti in criotubi contenenti 1,5 ml di mezzo di coltura liquido (PD, Difco per *T. borchii* e WPM per *T. aestivum*) ed è stato aggiunto sorbitolo (105 µl) e dimetilsolfossido (DMSO) come crioprotettore (117 µl) ogni 3 minuti per 10 volte. Le colture sono state quindi incubate per 24 ore al buio a 22-23°C su di un agitatore rotante.

I criotubi contenenti le colture miceliari sono stati quindi congelati con azoto liquido utilizzando il ciclo di raffreddamento di Danell e Flygh (2002). I campioni sono stati conservati immersi in azoto liquido, dopo 24 ore una parte dei campioni sono stati in congelatore -80°C. Per lo scongelamento i miceli crioconservati sono stati scongelati parzialmente in acqua tiepida (35°C) e dopo sono stati lavati con substrato liquido PD/WPM (8ml) per eliminare il DMSO tossico per il micelio. I campioni sono stati quindi trasferiti in piastre Petri contenenti substrato agarizzato e incubati per rilevare la crescita miceli e la morfologia delle colonie.

La tecnica ha fornito ottimi risultati con *Tuber borchii* che ha sviluppato dopo 34 giorni mentre per *Tuber aestivum* abbiamo ottenuto una prima crescita ifale dopo 70 giorni. La lag fase per i miceli conservati a -80 °C è stata molto più breve, ma come risulta dalla bibliografia una conservazione ad una temperatura superiore a -135° C potrebbe danneggiare i miceli (<http://www.cabri.org/guidelines/micro-organisms/M300Ap507.html>).

L'accrescimento e la morfologia delle colonie fungine crioconservate sia in azoto liquido sia a -80°C sono risulti uguali a quello delle colonie testimone non congelate e mantenute attivamente in coltura su substrato agarizzato a 22-23°C. Sono in corso prove di micorrizzazione in serra per verificare se la crioconservazione ha modificato l'infettività dei miceli crioconservati come risulta da alcuni casi riportati in letteratura (Chetverikova, 2009). Parallelamente si sta mettendo a punto un mezzo di crioconservazione senza DMSO, al fine di ridurre la lag fase come pure si stanno conducendo esperimenti di trasferimento del micelio in mezzo nutritivo liquido anziché agarizzato.

I risultati ottenuti dimostrano che è possibile crioconservare i miceli di *Tuber* spp., nonostante le notevoli difficoltà nel mantenere in coltura questi funghi, superiori a quelle che si incontrano per qualsiasi altra specie fungina ectomicorrizica (Iotti *et al.*, 2002).

Questi risultati aprono la possibilità di creare una prima banca di germoplasma di tartufo per poterne conservare la biodiversità e per possibili sviluppi biotecnologici.

Bibliografia

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

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

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

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

Biodiversità delle specie pregiate di *Tuber* e studi preliminari sull'ecologia dei tartufi

Claudia Riccioni, Andrea Rubini, Beatrice Belfiori, Francesco Paolocci.

*CNR-IGV: Istituto di Genetica Vegetale, articolazione territoriale di Perugia, via
Madonna Alta, 130, 06128 Perugia*

Introduzione e obiettivi

E' ampiamente riconosciuto il ruolo che i funghi micorrizici rivestono negli ecosistemi forestali, legato principalmente al ciclo dei nutrienti. Al contempo, le specie ectomicorriziche del genere *Tuber* rappresentano una importante risorsa economica per il nostro paese, l'unico a poter beneficiare della crescita spontanea di entrambe le specie di tartufo di maggior pregio, *Tuber magnatum* e *T. melanosporum*.

La richiesta mondiale supera ampiamente l'offerta di questi prodotti "di lusso", ciò anche in considerazione del forte declino della produzione spontanea di tartufi che si è verificato negli ultimi cento anni (Hall et al., 2003). Al calo produttivo si sta di recente sovrapponendo il rischio di perdita della biodiversità delle specie autoctone per effetto dell'importazione di ingenti quantitativi di specie alloctone provenienti da altri paesi. Il caso più eclatante è quello dei tartufi di origine asiatica quali *T. indicum*, *T. himalayense* e *T. sinense*. Tali specie sono caratterizzate da un'estrema affinità morfologica e filogenetica con *T. melanosporum* (Paolocci et al., 1997, 1999, 2000; Rubini et al., 1998). Queste specie esotiche sembrano essere più competitive e adattabili a diverse condizioni ambientali rispetto al *T. melanosporum*, motivo per cui la loro introduzione in Italia potrebbe avere effetti devastanti sul piano ambientale. Ciò soprattutto se tali specie venissero utilizzate più o meno consapevolmente per la produzione di piante micorrizzate da impiantare in zone vocate alla produzione di tartufi di maggior pregio.

E' stato inoltre dimostrato di recente che *T. melanosporum* è una specie eterotallica (Martin et al., 2010; Rubini et al., 2010a) per cui non è da escludere che ceppi autoctoni di tartufo nero pregiato possano addirittura incrociarsi con ceppi di specie asiatiche

strettamente affini. Ciò comporterebbe un ulteriore depauperamento del tartufo pregiato fino ad un possibile rischio di estinzione della specie.

In considerazione di questi fattori di rischio ambientale, emerge la necessità di progettare strategie mirate alla valorizzazione e alla difesa delle produzioni naturali autoctone con le loro eventuali tipicità legate all'habitat di provenienza.

Recenti ricerche hanno infatti messo in luce la presenza di ceppi fungini geneticamente differenziati nell'areale di distribuzione sia di *T. magnatum* (Rubini et al., 2004, 2005) che di *T. melanosporum* (Riccioni et al., 2008). In particolare per il tartufo bianco pregiato, l'utilizzo di marcatori molecolari SSR (Simple Sequence Repeats) ha consentito di svelare l'esistenza di una struttura genetica e filogeografica delle popolazioni con una chiara distinzione di quelle situate alle estremità nord-ovest (Piemonte) e sud (Campania, Basilicata) dell'areale, rispetto a tutte le altre. Anche in *T. melanosporum* è stata dimostrata una struttura genetica delle popolazioni tramite analisi con marcatori SSR e SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Obiettivo principale di questa ricerca è stato pertanto quello di approfondire le indagini sulla variabilità genetica di queste specie pregiate di *Tuber*, e di identificare una relazione con la provenienza geografica dei corpi fruttiferi analizzati. Ciò per poter giungere ad una tipizzazione con marcatori genetici del maggior numero di popolazioni possibile di entrambe le specie.

Parallelamente è stato svolto uno studio per la caratterizzazione morfologica e molecolare e l'inquadramento tassonomico di una specie fungina ectomicorrizica nota come morfotipo AD, comunemente presente nelle tartufaie sia naturali che coltivate di *T. melanosporum* e ritenuta una specie competitiva che potrebbe rappresentare un rischio per la diffusione e la permanenza delle micorrize di *T. melanosporum* sulle piante ospiti.

Attività e risultati

Riguardo a *T. magnatum*, sono stati campionati 79 ascocarpi in differenti località della Val d'Agri in Basilicata e successivamente genotipizzati utilizzando 7 marcatori polimorfici SSR e una sequenza SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), chiamata MA13, già nota per una delezione di 120 bp presente solo in alcune popolazioni meridionali di tartufo bianco (Rubini et al., 2005). Questi dati sono stati confrontati con un precedente dataset ottenuto da uno screening con gli stessi marcatori di oltre 300 campioni di *T. magnatum* raccolti in tutto l'areale della specie e raggruppati in 26 popolazioni (Rubini et al., 2005).

Le analisi hanno mostrato per 5 dei 7 loci SSR la presenza di alleli con frequenze particolarmente elevate nelle popolazioni meridionali di *T. magnatum*. Al contrario, questi alleli risultano assenti o presenti con frequenza molto bassa in tutte le altre popolazioni. Inoltre quasi tutti i campioni della Val d'Agri possiedono sulla SCAR la delezione di 120 bp tipica delle popolazioni del sud. Si ipotizza che questo possa essere il risultato di un fenomeno noto come "effetto fondatore" per cui la colonizzazione di nuove aree a partire da pochi e distinti individui porta all'origine di popolazioni in cui i tratti determinanti degli individui fondatori vengono ad essere fissati. Nello specifico, i nostri dati suggeriscono che ceppi fungini con la delezione di 120 bp al locus MA13 abbiano colonizzato questa zona della Basilicata e che, per effetto dell'isolamento geografico da altre popolazioni, l'allele portante la delezione si sia fissato in pressoché tutti gli individui.

Analisi statistiche effettuate sull'intero dataset con il software STRUCTURE hanno confermato una netta differenziazione delle popolazioni della Val d'Agri rispetto a tutte le altre.

Il recente sequenziamento dell'intero genoma di *T. melanosporum* (Martin et al., 2010) ha consentito di selezionare un alto numero di loci SSR per lo sviluppo di nuovi marcatori polimorfici per questa specie (Murat et al., 2010). Nello specifico sono stati selezionati 71 loci SSR singola copia, dei quali 6 mononucleotidici e 65 dinucleotidici, scelti tra i motivi più lunghi presenti nel genoma. Per ciascun locus sono state disegnate delle coppie di primer per PCR sulle regioni fiancheggianti ed è stato effettuato un pre-screening della variabilità di ogni motivo SSR su un campione di 20 tartufi di diversa provenienza. Dei 71 loci, 25 sono risultati polimorfici e quindi utilizzati per uno screening più completo su 200 ascocarpi di *T. melanosporum* raggruppati in 22 popolazioni italiane, francesi e spagnole.

L'analisi della distribuzione delle frequenze alleliche e la successiva elaborazione statistica con il software STRUCTURE ha messo in evidenza una struttura genetica delle popolazioni più chiara rispetto alle precedenti ricerche. Appare infatti molto evidente una forte differenziazione delle popolazioni del Piemonte non solo da tutte le altre ma anche tra di esse. Anche le popolazioni dell'Italia centrale risultano geneticamente riconoscibili, mentre meno chiara è la distinzione delle popolazioni francesi e spagnole.

L'ultima parte di questo lavoro ha riguardato la caratterizzazione morfologica e lo studio della tassonomia molecolare del morfotipo ectomicorrizico chiamato "Tipo-AD" originariamente descritto da Giraud (1988) e riconoscibile per le caratteristiche ife con ramificazioni ad angolo retto ("angles droits" in francese, da cui il nome) e per l'aspetto a cellule poligonali della superficie del mantello. In precedenti analisi basate sulla regione ITS dell'rDNA, micorrize morfologicamente riferibili al "Tipo-AD" erano state attribuite alle famiglie Sarcosomataceae e Pyronemataceae (Baciarelli Falini et al., 2006; Agueda et al., 2008). Per un più esatto inquadramento tassonomico della specie fungina responsabile della formazione delle micorrize del "Tipo-AD" in questo lavoro è stata effettuata un'analisi di sequenza sia del gene 28S che dell'ITS di 16 campioni micorrizici reperiti in tartufo naturali e coltivate e da piantine micorrizzate con *T. melanosporum*.

E' stato così dimostrato che le ectomicorrize del tipo AD appartengono alla specie *Trichophaea woolhopeia* della famiglia delle Pyronemataceae. L'analisi delle sequenze ha inoltre evidenziato un certo polimorfismo corroborando l'ipotesi che questo *taxon* sia in realtà un complesso di più specie (Rubini et al., 2010b).

Conclusioni

I risultati ottenuti dimostrano in maniera incontrovertibile la presenza di popolazioni geneticamente distinte entro l'areale di distribuzione di *T. magnatum* e *T. melanosporum*. Sembra quindi possibile, purché in presenza di un numero alto di marcatori molecolari ed un esteso e capillare campionamento di ascocarpi, genotipizzare le varie popolazioni di queste due specie pregiate di tartufo in funzione della zona geografica di provenienza. Tutto ciò costituisce uno strumento molto utile per promuovere e mettere in atto strategie volte a difendere e valorizzare la biodiversità fungina presente nel nostro paese. Infine, l'attribuzione di uno specifico rango tassonomico a una delle specie fungine maggiormente competitive nei confronti di *T. melanosporum* costituisce un altro importante risultato

verso la comprensione delle dinamiche fungine e dei fattori ecologici che possono giocare un ruolo determinante nella produzione in tartufoie naturali e coltivate.

Bibliografia

Agueda B, Agerer R, De Miguel AM, Parlade J (2008) *Querciriza quadratum*: a revision of the characters and identity of AD-type ectomycorrhiza. In Abstracts of Third International Spoleto Congress on Truffles. Spoleto 25–28 Nov 2008, p 39

Baciarelli Falini L, Rubini A, Riccioni C, Paolocci F (2006) Morphological and molecular analyses of ectomycorrhizal diversity in a man-made *T. melanosporum* plantation: description of novel truffle-like morphotypes. *Mycorrhiza* 16:475–484

Giraud M (1988) Prélèvement et analyse de mycorhizes. *Bull. FNTP*, 10, 49–63. In: *La Truffe*. CTIFL, Paris

Hall, I. R., Yun, W., Amicucci, A. 2003. Cultivation of edible mushrooms. *Trends in biotechnology* 21: 433–438.

Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, Porcel B, Rubini A, Amicucci A, Amselem J, Anthouard V, Arcioni S, Artiguenave F, Aury JM, Ballario P, Bolchi A, Brenna A, Brun A, Buée M, Cantarel B, Chevalier G, Couloux A, Da Silva C, Denoeud F, Duplessis S, Ghignone S, Hilselberger B, Iotti M, Marçais B, Mello A, Miranda M, Pacioni G, Quesneville H, Riccioni C, Ruotolo R, Splivallo R, Stocchi V, Tisserant E, Viscomi AR, Zambonelli A, Zampieri E, Henrissat B, Lebrun MH, Paolocci F, Bonfante P, Ottonello S, Wincker P. (2010) Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464 (7291):1033-8.

Murat C, Riccioni C, Belfiori B, Cichocki N, Labbé J, Morin E, Tisserant E, Paolocci F, Rubini A, Martin F. (2010) Distribution and localization of microsatellites in the Périgord black truffle genome and identification of new molecular markers. *Fungal Genetics and Biology*, [doi:10.1016/j.fgb.2010.10.007](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.10.007).

Paolocci F, Rubini A, Granetti B, Arcioni S (1997) Typing *Tuber melanosporum* and Chinese black truffle species by molecular markers. *FEMS Microbiology Letters* 153: 255-260.

Paolocci F, Rubini A, Granetti B, Arcioni S (1999) Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber* spp. Ectomycorrhizae. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 23-30.

Paolocci F, Rubini A, Riccioni C, Granetti B, Arcioni S (2000) Cloning and characterization of two repeated sequences in the symbiotic fungus *Tuber melanosporum* Vitt. *FEMS Microbiology Ecology* 34: 139-146.

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: 466-478.

Rubini A, Paolocci F, Granetti B, Arcioni S (1998) Single step molecular characterization of morphologically similar black truffle species. *FEMS Microbiology Letters* 264: 7-12.

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, 116–118

Rubini A, Paolocci F, Riccioni C, Vendramin GG, Arcioni S. 2005. Genetic and phylogeographic structures of the symbiotic fungus *Tuber magnatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 6584-6589.

Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Tisserant E, Arcioni S, Martin F, Paolocci F, 2010a. Isolation and characterization of *MAT* genes in the symbiotic ascomicete *Tuber melanosporum*. *New Phytologist*, doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03492.x

Rubini A, Belfiori B, Passeri V, Baciarelli Falini L, Arcioni S, Riccioni C, Paolocci F. 2010b. The AD-type ectomycorrhizas, one of the most common morphotypes present in truffle fields, result from fungi belonging to the *Trichophaea woolhopeia* species complex. *Mycorrhiza*, doi: 10.1007/s00572-010-0308-4.

Verso la comprensione del sistema riproduttivo e del ciclo biologico in *Tuber magnatum*

Beatrice Belfiori, Francesco Paolocci, Claudia Riccioni, Andrea Rubini

CNR-IGV: Istituto di Genetica Vegetale, articolazione territoriale di Perugia, via
Madonna Alta, 130, 06128 Perugia

Introduzione ed obiettivi

La crescente domanda mondiale per il tartufo e la possibilità di inoculare piante ospiti con diverse specie di *Tuber* hanno promosso nel corso degli ultimi decenni numerosi tentativi di coltivazione di questi funghi. Tali tentativi, tuttavia, non sempre sono risultati fruttuosi. In particolare, la coltivazione del tartufo bianco pregiato a differenza di quella di altre specie di *Tuber*, non ha ancora dato esiti positivi nonostante nel tempo siano state realizzate numerose tartufaie con questa specie. Il successo della coltivazione, così come la produzione spontanea di tartufi dipendono infatti da numerosi fattori, sia biotici che abiotici, con molti aspetti concernenti il ciclo biologico, il sistema riproduttivo e le esigenze ecologiche di questi funghi che solo recentemente sono stati oggetto di approfonditi studi. Inoltre, le difficoltà di coltivare *in vitro* i miceli di tartufo, l'impossibilità di incrociarli in condizioni controllate ed il basso livello di conservazione dei geni che regolano le modalità riproduttive (geni del mating type) negli ascomiceti, hanno sino ad ora precluso l'ottenimento di qualsiasi evidenza diretta sul sistema riproduttivo che governa la fruttificazione di questa ed altre specie di *Tuber* (Rubini et al., 2007).

Il successo delle tartufaie coltivate è legato anche alla qualità delle piante micorrizzate impiegate. La micorrizzazione con il *T. magnatum*, a differenza delle altre specie di tartufo eduli, si è rivelata un processo estremamente delicato e di difficile riproducibilità (Rubini et al., 2001). Inoltre, il controllo e certificazione delle piante micorrizzate viene attualmente effettuato principalmente con metodi morfologici che non sempre consentono l'identificazione certa delle micorrize delle varie specie di *Tuber*.

Risulta pertanto chiaro come l'acquisizione di conoscenze sul ciclo biologico di questi funghi e lo studio dei parametri che favoriscono la micorrizzazione delle piante ospiti con il *T. magnatum* siano questioni pregiudiziali per l'allestimento di tartufaie di tartufo bianco produttive.

Precedenti ricerche basate sull'utilizzo di marcatori molecolari hanno mostrato bassa variabilità genetica nei tartufi pregiati *T. magnatum* e *T. melanosporum* (Frizzi et al., 2001; Gandeboeuf et al., 1997; Bertault et al., 1998 and 2001). In *T. melanosporum*, Bertault e colleghi (1998, 2001), utilizzando marcatori codominanti, hanno evidenziato una modesta variabilità genetica e la totale assenza di eterozigosi negli ascocarpi, strutture supposte essere formate da ife dicariofitiche. Ciò è stato interpretato come il risultato di un probabile bottleneck genetico verificatosi a seguito dell'ultima glaciazione, e di una riproduzione prevalentemente di tipo selfing. Invero, un ciclo biologico con una netta prevalenza della fase dicariofitica su quella aploide è peculiarità dei basidiomiceti e non degli ascomiceti, classe a cui appartengono i tartufi. Alla luce di questa considerazione e di uno studio basato sull'impiego di numerosi marcatori molecolari codominanti simple sequence repeats (SSR) (Rubini et al., 2004) abbinato ad uno screening capillare di campioni di *T. magnatum* provenienti da diverse zone dell'areale di diffusione della specie, queste conclusioni sono state recentemente confutate dal nostro gruppo di lavoro (Rubini et al., 2005). Queste analisi hanno evidenziato in *T. magnatum* l'assenza di linkage disequilibrium tra i marcatori SSR utilizzati e provato l'esistenza di un elevato flusso genico non solo entro le singole popolazioni ma anche tra popolazioni limitrofe. Ciò ci ha indotto ad ipotizzare che in questa specie l'autofecondazione non sia il modello riproduttivo prevalente.

Questa ipotesi è stata ulteriormente confermata da uno studio successivo nel quale specifiche procedure sono state utilizzate per separare le ascospore dalle ife sterili (gleba) di singoli ascocarpi al fine di isolare ed amplificare separatamente tramite marcatori SSR il DNA da queste strutture (Paolocci et al., 2006). Nello stesso studio inoltre, singole micorrize ottenute da piante inoculate con ascocarpi preventivamente analizzati con marcatori SSR sono state genotipizzate sempre mediante l'uso di SSR. In sintesi, questi approcci hanno consentito di analizzare mediante marcatori codominanti i DNA isolati dalle differenti strutture che le specie di *Tuber* producono durante il loro ciclo vitale quali il corpo fruttifero (contente la gleba e le ascospore) e le micorrize. Queste analisi hanno evidenziato sempre la presenza di un singolo allele SSR per locus in tutti i campioni di

gleba e micorrize analizzati. Tuttavia, l'analisi dei pool sporali ha mostrato, in numerosi carpofori, la presenza di alleli SSR aggiuntivi a quelli della gleba, a conferma che eventi di fecondazione incrociata (outcrossing) sono possibili in *T. magnatum*.

Tali risultati hanno inoltre dimostrato che le micorrize sono aploidi e che la gleba è costituita quasi esclusivamente da tessuto aploide che si origina da uno solo dei partners sessuali. Questo modello spiega inoltre l'assenza dell'eterozigosi descritta da diversi autori: il risultato dell'outcrossing è infatti evidenziabile solo quando le spore vengono analizzate separatamente dalla gleba circostante.

Pur avendo dimostrato l'esistenza di fenomeni di incrocio, tali studi non hanno consentito di stabilire con certezza se questa specie sia caratterizzata da incrocio obbligato (eterotallismo) o al contrario sia omotallica, con la possibilità di attuare sia la fecondazione incrociata che la autofecondazione.

Pertanto, muovendo dalle acquisizioni sopra descritte le attività svolte hanno perseguito l'obiettivo di comprender in maggior dettaglio le modalità riproduttive in *T. magnatum*, nel tentativo di identificare i meccanismi molecolari che sottendono al riconoscimento sessuale e alla fecondazione, e di migliorare le tecniche di micorrizzazione al fine di incrementare la qualità delle piante micorrizzate.

Attività e risultati

Per il perseguimento del primo obiettivo sono stati utilizzati diversi approcci. In primo luogo, allo scopo di studiare la distribuzione degli alleli identificati nei pool sporali, si è deciso di isolare ed analizzare individualmente con marcatori SSR singole ascospore prelevate da carpofori di *T. magnatum*.

Le ascospore sono state isolate dagli aschi e la loro parete cellulare è stata digerita attraverso particolari procedure meccaniche ed enzimatiche. Una procedura di amplificazione dell'intero genoma (GenomiPhi Amplification Kit, GE-Healthcare, Milano, Italia) è stata poi condotta al fine di ottenere il maggior numero di copie possibile di DNA target per poter poi procedere ad un'amplificazione per PCR. Il DNA è stato amplificato con successo da aschi contenenti 2, 3 e 4 spore provenienti da due corpi fruttiferi (MA453 e MA490). Per l'analisi delle singole spore sono stati utilizzati i microsatelliti MA12 e MA19 (Rubini et al., 2004) per i quali è stata preventivamente mostrata la presenza di

doppi alleli nei pool sporali dei carpofori esaminati. Indipendentemente dal numero di spore per asco, ogni singola spora ha mostrato un singolo allele SSR ed il profilo genetico delle ascospore dello stesso asco è risultato essere diverso. Tali analisi hanno dimostrato per la prima volta la segregazione di marcatori SSR nelle singole ascospore di *T. magnatum* confermando, in maniera inequivocabile, l'esistenza di eventi di alloincrocio in questa specie.

Parallelamente si è proceduto con approcci diretti all'identificazione dei geni del mating type (*MAT*) responsabili della compatibilità sessuale. A questo proposito ci si è avvalsi dell'enorme mole di informazioni desunte dal recente sequenziamento del genoma di *T. melanosporum* (Martin et al., 2010). L'analisi di questo genoma ha infatti consentito di identificare per la prima volta in *Tuber* i geni del mating type (*MAT1-2-1* e *MAT1-1-1*) che presiedono alla riproduzione sessuale. È stato dimostrato che questi due geni si trovano in individui separati, una situazione che caratterizza gli ascomiceti eterotallici (Rubini et al., 2010).

Sfruttando la conoscenza delle sequenze dei geni *MAT* del *T. melanosporum* si è quindi cercato di identificare i geni omologhi in *T. magnatum* tramite amplificazione PCR. Gli esperimenti di amplificazione hanno consentito di isolare in *T. magnatum* dei frammenti corrispondenti alle regioni più conservate in seno ai geni *MAT* (regioni HMG-box e α -box). La costruzione di primer specifici sia per l' HMG-box che per l' α -box in di *T. magnatum* ha quindi consentito di screenare tramite PCR una serie di ascocarpi di questa specie e di dimostrare che, analogamente al *T. melanosporum*, i due geni *MAT* sono presenti in differenti ascocarpi. È stato pertanto dedotto che anche il *T. magnatum* è caratterizzato da un sistema di riproduzione di tipo eterotallico.

La fase successiva della ricerca è stata quella di isolare l'intera regione del locus *MAT* (regione chiamata idiomorfo) di *T. magnatum*. A tale scopo sono stati intrapresi 2 approcci tra loro complementari: i) genome walking a partire dalle regioni HMG-box e α -box già sequenziate ii) disegno di primers sulle regioni fiancheggianti il locus oggetto di studio basandosi sulle sequenze nucleotidiche del *T. melanosporum* e sull'ipotesi che tali regioni risultano in genere conservate in specie filogeneticamente affini. L'uso combinato di queste 2 strategie ha consentito al momento di isolare una parte dell'idiomorfo *MAT1-2*.

Parallelamente sono stati condotti degli esperimenti volti al miglioramento delle tecniche di micorrizzazione di piante forestali con il *T. magnatum*. Gli esperimenti di micorrizzazione

sono stati effettuati in una serra del CNR-IGV di Perugia dove è stato possibile regolare in modo efficiente le condizioni climatiche nelle varie stagioni di permanenza del materiale vivaistico. Al fine di ridurre al minimo il rischio di diffusione di funghi micorrizici “inquinanti” ed ottenere un’ adeguata e riproducibile micorrizzazione da parte della specie oggetto di studio sono stati controllati alcuni parametri ambientali come l’ illuminazione, il riscaldamento, il condizionamento e l’ irrigazione. Le piantine delle varie specie (es. quercia, pioppo, salice, carpino) utilizzate per l’ inoculazione, praticata mediante l’ uso di sospensioni sporali, sono state ottenute da seme o da talea, previo opportuno trattamento di sterilizzazione.

In tutte le piante inoculate le analisi morfologiche e molecolari hanno accertato la formazione di ectomicorrize di *T. magnatum* dopo un periodo di 6-8 mesi dall’ inoculazione. Tali piante potranno essere utilizzate per la realizzazione di impianti sperimentali e per valutare la presenza, permanenza e distribuzione di ceppi con diverso mating type sia in vivaio che dopo la messa a dimora in pieno campo.

Conclusioni

Nuove ed importanti evidenze sperimentali sono state ottenute sul ciclo biologico di *T. magnatum*. In particolare è stato dimostrato che, in analogia con il *T. melanosporum*, anche in questa specie la riproduzione avviene mediante eventi di alloincrocio. Alla luce di questi risultati di base e dell’ottimizzazione di metodiche per produrre piantine micorrizzate con *T. magnatum*, sarà ora possibile inoculare piante ospiti con ceppi fungini caratterizzati per il loro mating type e monitorare nel tempo la distribuzione degli stessi sull’ apparato radicale ospite una volta che le piantine sono state messe a dimora. In virtù di queste nuove conoscenze la possibilità di impiantare tartufaie di bianco pregiato potenzialmente produttive sembra pertanto poter dipendere in larga misura da un’ equa distribuzione dei sessi nei siti.

Bibliografia

- Rubini, A., Riccioni, C., Paolocci, F., Arcioni, S. 2007. Troubles with truffles: unveiling more of their biology. *New Phytologist* 174: 256–259.
- Rubini, A., F. Paolocci, Granetti, B., Arcioni, S. 2001. Morphological characterization of molecular-typed *Tuber magnatum* ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 11:179–185.

- Frizzi, G., G. Lalli, Miranda, M., G. Pacioni. 2001. Intraspecific isozyme variability in Italian populations of the white truffle *Tuber magnatum*. *Mycol. Res.* 105:365–369.
- Gandeboeuf, D., Dupré, C., Roeckel-Drévet, P., Nicolas, P., G. Chevalier. 1997. Grouping and identification of *Tuber* species using RAPD markers. *Can. J. Bot.* 75:36–45.
- Bertault, G., Raymond, M., Berthomieu, A., Callot, G., D. Fernandez. 1998. Trifling variation in truffles. *Nature* 394:734.
- 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* 86:451–458.
- Rubini, A., Topini, F., Riccioni, C., Paolocci, F., Arcioni, S. 2004. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in white truffle (*Tuber magnatum*). *Mol. Ecol. Notes* 4:116–118.
- Rubini, A., Paolocci, F., Riccioni, C., Vendramin, G. G., Arcioni, S. 2005. Genetic and phylogeographic structure in the symbiotic fungus *Tuber magnatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6584–6589.
- Paolocci, F., Rubini, A., Riccioni, C., Arcioni, S. 2006. Reevaluation of the life cycle of *Tuber magnatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2390–2393.
- Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Balestrini, R., Coutinho, P.M., Jaillon, O., Montanini, B., Morin, E., Noel, B., Percudani, R. et al. 2010. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464: 1033–1038.
- Rubini, A., Belfiori, B., Riccioni, C., Tisserant, E., Arcioni, S., Martin, F., Paolocci, F. 2010. Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete *Tuber melanosporum*. *New Phytologist*, doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03492.x.

Analisi morfologiche e molecolari di miceli di *Tuber* cresciuti in presenza di metalli pesanti

Sabrina Zeppa, Alessandra Zambonelli[^], Giovanna Giomaro*, Mirco Iotti[^], Davide Sisti, Ugo Donatelli, Antonella Amicucci, Vilberto Stocchi

Dipartimento di Scienze Biomolecolari Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo", Via Saffi 2, Urbino

[^]*Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, Università degli Studi di Bologna, via Fanin 46, Bologna*

**Dipartimento di Scienze della Terra della Vita e dell'Ambiente, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo", via Bramante 28, Urbino*

La contaminazione delle falde acquifere e del suolo con metalli pesanti rappresenta oggi uno dei maggiori problemi di inquinamento inorganico degli ambienti naturali. L'acidificazione dei suoli forestali in aree altamente industrializzate, accompagnata da elevate concentrazioni di metalli pesanti nel terreno determinano un impoverimento della comunità fungina ed una forte riduzione della biodiversità di diversi ecosistemi (Fellner and Pesková, 1995). I funghi micorrizici hanno evidenziato caratteristiche uniche di assorbimento e tolleranza ai metalli pesanti e sono in grado di colonizzare aree industriali degradate che presentano altissime concentrazioni di ioni metallici quali Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} .

La diffusione del rame nell'ambiente è strettamente correlata al massiccio impiego in agricoltura di anticrittogamici che lo contengono mentre quella del piombo è dovuta principalmente allo smaltimento dei metalli, l'utilizzo di vernici a base di piombo e l'uso di pesticidi e fertilizzanti.

Per verificare un possibile ruolo positivo della simbiosi pianta-fungo nell'ambito della tolleranza al piombo e al rame della pianta simbionte, abbiamo affrontato uno studio approfondito sulla risposta del fungo ectomicorrizico *Tuber borchii* Vittad all'inquinamento da ioni Cu^{2+} e Pb^{2+} . *T. borchii* (tartufo bianchetto) è una specie molto

competitiva nei confronti degli altri funghi ectomicorrizici, capace di stabilire simbiosi micorrizica con il tiglio (*Tilia* spp.) sia *in vitro* che *in vivo*.

Nel nostro esperimento abbiamo utilizzato come pianta simbionte *Tilia americana* L., una specie capace di crescere in terreni fortemente antropizzati e che ben si presta alla coltura *in vitro*. L'utilizzo della coltura *in vitro* ci ha consentito di ottenere un protocollo stabile e riproducibile, minimizzando la complessità del sistema e riducendo il numero delle variabili da considerare.

Abbiamo preso in considerazione 4 cloni di *T. borchii* (10RA, 17B0, ATCC e Z43) per verificare l'esistenza di eventuali differenze intraspecifiche nella tolleranza al Cu^{2+} e Pb^{2+} .

Questi ceppi sono stati fatti crescere in terreno solido a 14 concentrazioni crescenti di Cu^{2+} , da 0,005 mM a 44,272 mM e concentrazioni crescenti di piombo da 0,04 a 20,48 mM.

In presenza dei metalli pesanti in tutti gli isolati analizzati è evidente un aumento della crescita radiale rispetto al controllo, tranne nel clone ATCC in presenza del rame. Un comportamento di questo tipo può essere interpretato non come un aumento di stato di salute del fungo alle alte concentrazioni di inquinante nel terreno, ma piuttosto come una strategia adottata da *T. borchii* per cercare di colonizzare porzioni non inquinate.

Le analisi di espressione di geni coinvolti nella crescita apicale (*RhoGDI* e *CDC42*) sui ceppi ATCC e 10RA cresciuti su terreno contaminato con Cu^{2+} e Pb^{2+} hanno evidenziato una maggiore espressione nel ceppo 10RA, che alle alte concentrazioni dei metalli mostrava una maggiore crescita diametrale, rispetto al clone ATCC. Nessuno dei due ceppi cresciuti in terreni contaminati da rame ha evidenziato attivazione dei meccanismi di protezione da stress ossidativo indotto da metalli, come dimostrato dai livelli invariati di espressione di glutaredoxina e tioredoxina rispetto al controllo. Al contrario nel ceppo ATCC in terreno contaminato da piombo si attivano i meccanismi di detossificazione cellulari come è dimostrato dall'aumentata espressione della glutaredoxina e tioredoxina, mentre gli stessi geni non vengono sovra espressi in presenza di Pb^{2+} nel ceppo 10RA.

Per spiegare quali potrebbero essere i meccanismi adottati dal fungo per resistere anche ad alte concentrazioni di inquinante, abbiamo effettuato l'analisi al microscopio ottico del contenuto intracellulare di piombo utilizzando come colorante specifico il sodio rodizonato (Tung and Temple, 1996).

Dalle immagini ottenute si osserva che fino alla concentrazione di 2.56 mM, il Pb^{2+} assorbito viene sequestrato a livello dei vacuoli della cellula fungina mentre a concentrazioni superiori precipita in forma cristallina al di fuori dell'ifa. In questo modo il fungo eviterebbe l'accumulo intracellulare di quantità di Pb^{2+} potenzialmente letali.

Un analogo meccanismo si è osservato nei confronti del rame in cui vi è una stretta correlazione positiva fra un aumento di produzione di acido ossalico, composto ritenuto responsabile della tolleranza al rame di diversi organismi, e l'aumento di concentrazione di questo metallo nel terreno di coltura.

Sono state inoltre condotte prove in serra per verificare la tolleranza al rame di piantine micorrizate con *Tuber melanosporum* Vittad.. Le prove hanno dimostrato che un quantitativo di rame nel suolo pari a 145 ppm, superiore a quello presente nei suoli di molte regioni italiane non danneggia le micorrize di questo tartufo (APAT, 2003). I sintomi fogliari e l'accumulo di rame nelle foglie risultano meno evidenti nelle piante micorrizate rispetto a quelle non micorrizate, evidenziando quindi un effetto di bioprotezione nei confronti della pianta da parte del tartufo.

Le nostre ricerche hanno dimostrato che grazie al meccanismo di immobilizzazione che il micelio del tartufo effettua nei confronti dei metalli pesanti, l'utilizzo di piante micorrizate con tartufo oltre a portare notevoli vantaggi economici potrebbe avere un effetto di biorisanamento dei suoli inquinati da metalli pesanti ed in particolare dei nostri suoli agrari.

Bibliografia

Fellner R and Pesková V. 1995. Effects of industrial pollutants on ectomycorrhizal relationships in temperate forests. *Canadian Journal of Botany* 73: S1310-S1315.

Tung G and Temple PJ. 1996. Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays*) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy. *The Science of Total Environment* 188: 71-85.

Valutazione del pattern aromatico in diverse specie di *Tuber*: dall'identificazione alla tracciabilità geografica.

Anna Maria Gioacchini, Sabrina Zeppa, Roberta Saltarelli, Paola Ceccaroli, Michele Menotta, Elena Barbieri, Alessandra Zambonelli, Antonella Amicucci, Vilberto Stocchi

Dipartimento di Scienze Biomolecolari Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo", Via Saffi 2, Urbino

I tartufi sono corpi fruttiferi di funghi ipogei che vivono e si sviluppano sottoterra in simbiosi mutualistica con l'apparato radicale di alcune piante arboree.

Il tartufo ha nelle Marche radici storiche antichissime tanto da essere parte integrante della nostra cultura e tradizione, inoltre le Marche rappresentano una delle poche regioni italiane ad avere nel proprio territorio una buona produzione di tutte le specie di tartufi commerciabili. Le aree a vocazione tartufigena presenti nel territorio marchigiano forniscono quantità significative di tartufi da immettere sia nel mercato nazionale che internazionale. I tartufi sono noti soprattutto per le loro ottime qualità organolettiche, tra le quali la più importante è sicuramente l'aroma, diverso per intensità e fragranza nelle varie specie. Le caratteristiche del corpo fruttifero variano a seconda della specie, del tipo di pianta simbiote e dell'ambiente nel quale il tartufo matura e si accresce.

Nel suolo micorrizico il tartufo interagisce con particolari batteri che si sviluppano all'interno della "micorrizosfera" (l'ambiente di suolo e aria attorno alle micorrize). Questi microorganismi stimolano il processo di micorrizzazione, producendo composti volatili che possono aumentare la ricettività della radice della pianta ospite nei confronti del simbiote fungino.

I composti organici volatili (Volatile Organic Compounds VOCs) sono un'ampia categoria di molecole organiche caratterizzate da una tensione di vapore tale da renderle evaporabili alle condizioni di temperatura e pressione ambientali. In virtù delle loro caratteristiche fisico-chimiche queste sostanze svolgono un ruolo molto importante all'interno della biosfera: l'elevata capacità di diffondere nell'ambiente (a breve, media e lunga distanza, in un mezzo acquoso o nel terreno) le rende un ottimo sistema di interazione tra organismi di uno stesso ecosistema.

Tali sostanze chimiche sono responsabili delle sensazioni olfattive percepite.

La composizione degli aromi può variare quali-quantitativamente ovvero sia come tipologia sia come quantità dei singoli componenti ed i principali fattori che la influenzano sono:

- Fattori intrinseci: specie, cultivar, clone, ecotipo.
- Fattori ecologici: origine geografica (latitudine e altitudine), condizioni climatiche (ora solare, fotoperiodo, temperatura, ecc.) e podologiche (struttura del terreno e pH), fattori biotici (attacchi da insetti o altri patogeni)
- Fattori tecnologici: tecniche di coltivazione, tipologia dei processi di raccolta, condizioni di conservazione della materia prima, tecnologie di trasformazione.

L'analisi chimica delle componenti volatili rappresenta uno strumento estremamente efficace e raffinato non solo perché consente di individuare le componenti "nobili" che conferiscono alla pianta o all'alimento l'aroma tipico, ma soprattutto perché offre la possibilità di seguirne la tracciabilità, rilevando specifici marcatori che descrivono il prodotto stesso e tutto il percorso della filiera produttiva, dalla raccolta fino all'utilizzatore finale.

A causa delle basse concentrazioni degli aromi negli alimenti, la prima operazione che deve essere eseguita per l'analisi è la preconcentrazione mediante, in genere, la tecnica della [HS-SPME](#) (Head Space – Solid Phase MicroExtraction), utile per determinare i composti organici volatili.

La microestrazione in fase solida (SPME) è una tecnica recente basata sull'utilizzo di una sottile fibra di silice fusa rivestita da un opportuno materiale in grado di adsorbire diversi composti presenti sia in matrici liquide che solide. Il campionamento delle sostanze può avvenire per esposizione della fibra sia nello spazio di testa sovrastante la matrice (tecnica idonea per analiti volatili).

Alla luce delle evidenze scientifiche sopra riportate, abbiamo voluto contribuire alla caratterizzazione e alla tutela di un prodotto tipico e di elevato valore commerciale quale è il tartufo bianco pregiato (*T. Magnatum* Pico) che viene raccolto spontaneamente nel territorio marchigiano. L'attività di ricerca svolta ha permesso l'individuazione di marcatori chimici in grado di discriminare l'area di raccolta di *Tuber Magnatum* Pico.

Inoltre, in un precedente lavoro, abbiamo sviluppato un metodo che consente, attraverso l'analisi dei VOCs, di caratterizzare e, di conseguenza, differenziare le varie specie di tartufo onde evitare frodi alimentari.

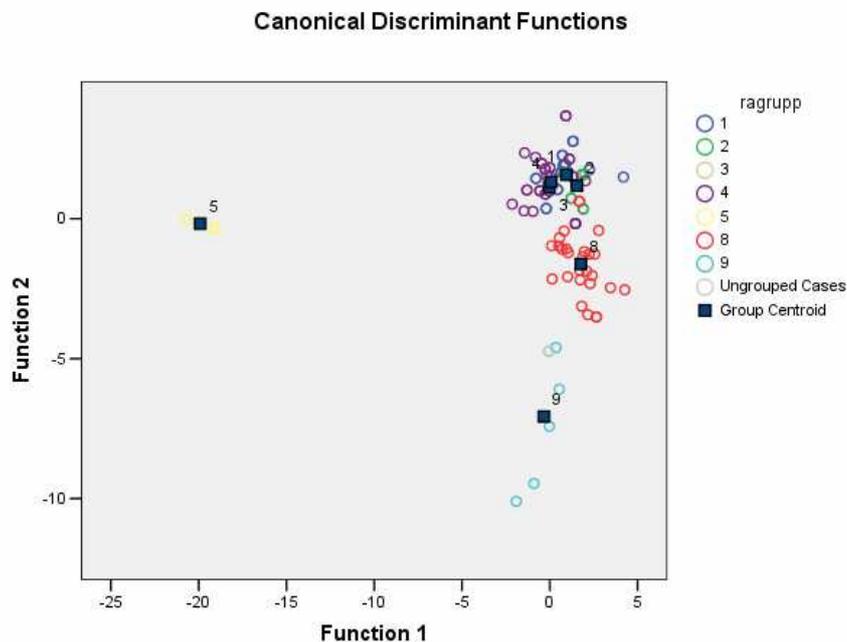
Per quanto riguarda gli studi di variabilità intraspecifica della specie di tartufo bianco pregiato le indagini sono state compiute con l'utilizzo della gas cromatografia/spettrometria di massa (GC/MS). Tramite questa tecnica è possibile caratterizzare i composti presenti nel campione utilizzando una piccola quantità dello stesso.

Sono stati analizzati 67 campioni di *T. magnatum* raccolti in tartufige naturali del centro, del nord e del sud Italia.

Per ogni campione è stato ottenuto un cromatogramma che riporta la corrente ionica totale, ciascun picco corrisponde ad una molecola volatile il cui spettro caratteristico permette la sua individuazione. Gli spettri ottenuti dai cromatogrammi di tutti i campioni studiati sono stati elaborati in maniera tale da eseguire un'analisi dei componenti discriminanti principali (PCA). Per ciascun PCA discriminante, è stato eseguito un test "incrociato di validazione" per corpi fruttiferi di *T. magnatum* considerando l'areale di raccolta come se fosse sconosciuto e verificando successivamente la validità del metodo discriminante SPME-GC/MS.

Dai risultati ottenuti dall'analisi discriminante (Fig. 1) si evince un'ottima separazione tra le regioni Piemonte, Toscana e Molise, mentre una buona separazione si ha tra le regioni Emilia, Romagna, Marche e Umbria. Per una migliore interpretazione dei dati, i carpofori provenienti dalle zone dell'Emilia sono stati analizzati separatamente da quelli provenienti della Romagna, vista la vicinanza geografica con le Marche

Fig. 1 Analisi discriminante. 1 Emilia; 2 Romagna; 3 Umbria; 4 Marche; 5 Molise; 8 Piemonte; 9 Toscana.



Come prova di validazione del metodo applicato, sono stati inseriti dati di tartufi analizzati precedentemente: la loro provenienza è stata classificata correttamente in base al metodo di analisi messo a punto, confermando l'accuratezza e la precisione dello stesso.

Analizzando tutti i cromatogrammi e relativi spettri, sono state evidenziate delle differenze che caratterizzano la provenienza dei campioni. Al fine di ottimizzare l'attendibilità e l'accuratezza del metodo sono stati presi in considerazione anche i composti contenenti zolfo ed i terpeni che sono molto significativi per discriminare la provenienza geografica dei campioni.

Inoltre, è stata identificata una serie omologa di alcoli con un range di peso molecolare da 46 a 88 Dalton ed una seconda serie omologa in un range di peso molecolare da 74 a 144 Dalton formata da esteri.

Utilizzando solo gli ioni provenienti dai composti contenenti zolfo la percentuale di classificazione dei carpofori di *T. magnatum* provenienti dall'Emilia e dalle Marche migliora di circa l'8%.

La spettrometria di massa combinata alla gas cromatografia ed alla tecnica HS-SPME insieme con l'analisi discriminante offre un metodo molto efficace per la caratterizzazione di tartufi attraverso l'analisi della loro frazione volatile. In particolare, il *Tuber Magnatum* Pico proveniente da Marche, Toscana e Piemonte, le più importanti regioni italiane in cui questi funghi sono raccolti e venduti, è ben classificato e distinto. Anche i tartufi raccolti nelle regioni confinanti Marche ed Emilia Romagna, regioni con caratteristiche pedoclimatiche molto simili, sono discriminati.

Bibliografia

Gioacchini A.M., Menotta M., Bertini L., Rossi I., Zeppa S., Zambonelli A., Piccoli G., Stocchi V. Solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry: a new method for species identification of truffles. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005; **19**: 2365-2370.

Gioacchini A.M., Menotta M., Guescini M., Saltarelli R., Ceccaroli P., Amicucci A., Barbieri E., Giomaro G., Stocchi V. Geographical traceability of Italian white truffle (*Tuber Magnatum* Pico) by the analysis of volatile organic compounds. *Rapid Communications Mass Spectrom.* 2008; **22**: 3147-3153.

Pelusio F, Nilsson T, Montanarella L, Tilio R, Larsen B, Facchetti S, Madsen J. *J Agric. Food Chem.* 1995; **43**: 2138.

Talou T, Del mas M, Gaset A. *Flavour Fragrance J.* 1989; **4**: 109.

Bellesia F, Pinetti A, Bianchi A, Tirillini B. *Flavour Fragrance J.* 1996; **11**: 239.

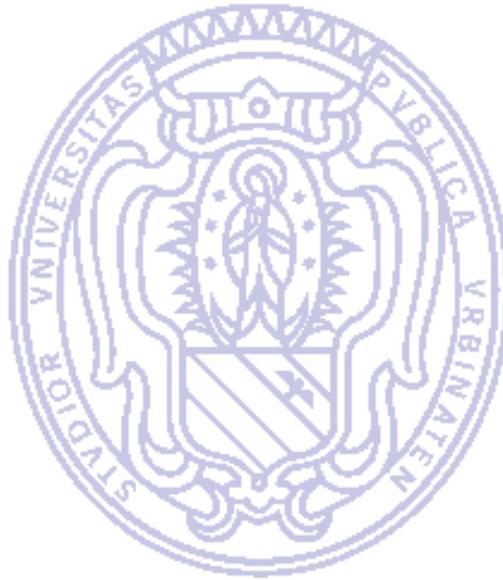
Bellesia F, Pinetti A, Tirillini B, Bianchi A. *Flavour Fragrance J.* 2001; **16**: 1.

Diaz P, Senoràs FJ, Reglero G, Ibanez E. *J Agric. Food Chem.* 2002; **50**: 6468.

Lord H, Pawliszyn J. *J. Chromatogr Sci.* 2000; **38**: 270.

March RE. *J. Mass Spectrom.* 1997; **32**: 351.

Goff Stephen A. and Klee Harry J. "Plant Volatile Compounds: Sensory Cues for Health and Nutritional Value?" *Science* 2006; **311**: 815-819.



1506
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI URBINO
CARLO BO



Dipartimento di Scienze Biomolecolari
Via Saffi, 2 – 61029 Urbino PU
Tel. +39 0722 305261 Fax +39 0722 305324
e-mail: dipsienzebiomol@uniurb.it – www.uniurb.it