

# Genetica, Ambiente E Interazioni Microbiche

**Antonella Amicucci**

Dipartimento di Scienze biomolecolari  
Università di Urbino



1506  
UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI URBINO  
CARLO BO

DISB  
DIPARTIMENTO DI  
SCIENZE BIOMOLECOLARI



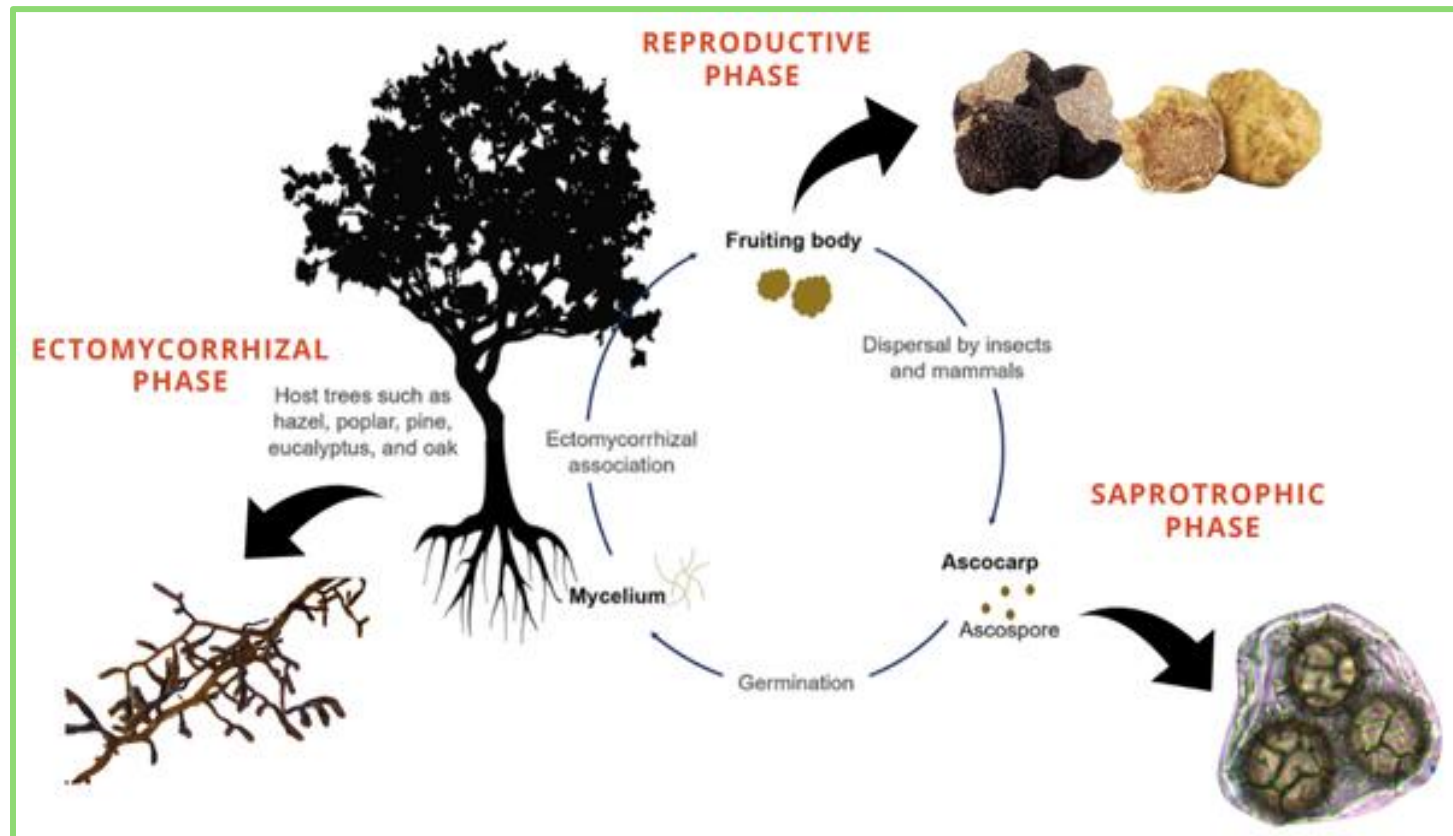
# Ciclo Vitale del Tartufo

## FATTORI BIOTICI

(pianta ospite, essudati radicali, microrganismi, micofagi)

## FATTORI ABIOTICI

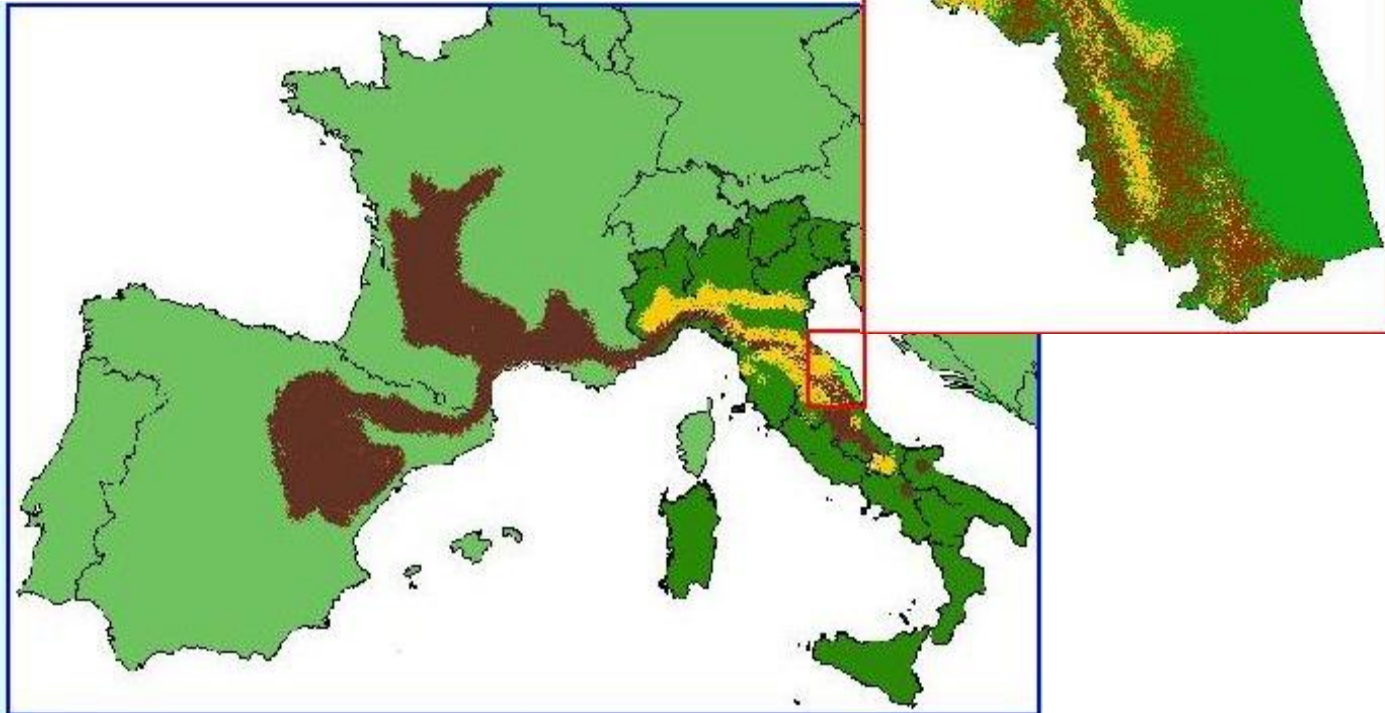
(luce, gravità, temperatura, ossigeno, tipo di terreno, nutrienti)



# Distribuzione

## ITALIA

Le principali zone di produzione sono l'Appennino Centrale e la zona del Piemonte



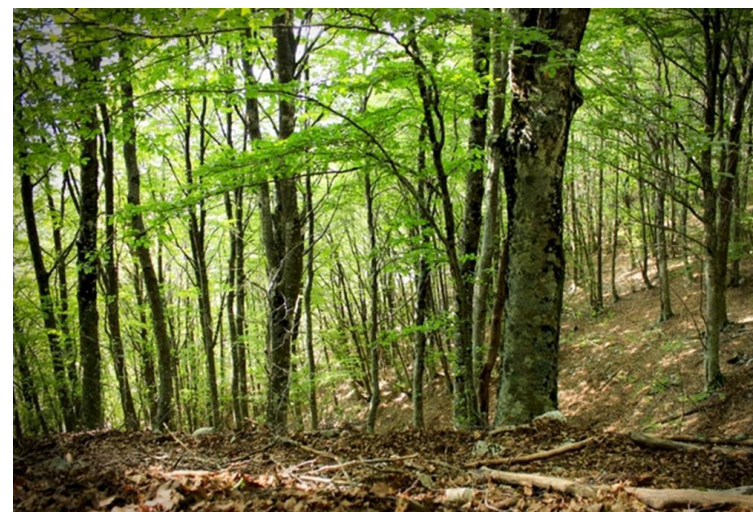
**REGIONE MARCHE** 

La Regione Marche occupa una posizione di leadership per l'elevata quantità di tartufo bianco che viene raccolto ogni anno



# Le Molteplici Sfaccettature del Valore del Tartufo

1. **Impatto economico**
2. **Turismo gastronomico**
3. **Valore culinario, culturale e ricreativo**
4. **Ruolo ecosistemico, conservazione e ripristino delle foreste**
5. **Proprietà nutraceutiche**



# Principali Criticità

## 1. Identificazione delle specie e rischio di frode commerciale

- La commercializzazione di corpi fruttiferi, piante micorrizzate e prodotti a base di tartufo
- L'affidabilità della ricerca e della sperimentazione

## 2. Calo della produzione di tartufoie naturali e tartufoie controllate

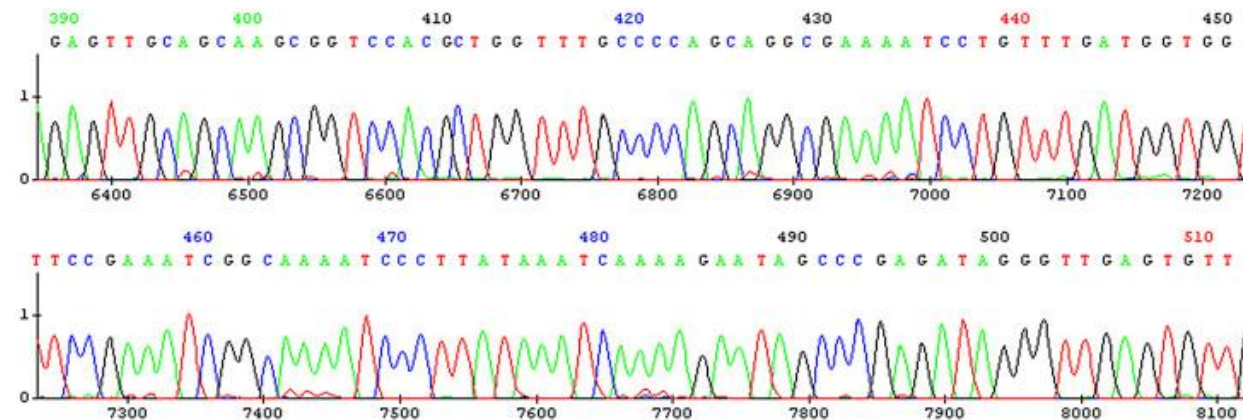
- Deforestazione e degrado dell'habitat
- Raccolta scarsamente regolamentata
- Cambiamenti climatici e crescente pressione antropica

## 3. Valutazione della qualità del tartufo

- Valore di mercato
- Attributi sensoriali e integrità strutturale
- Idoneità alla distribuzione e agli standard di consumo



# Tutela dei Tartufi: Come Può Aiutare La Ricerca?

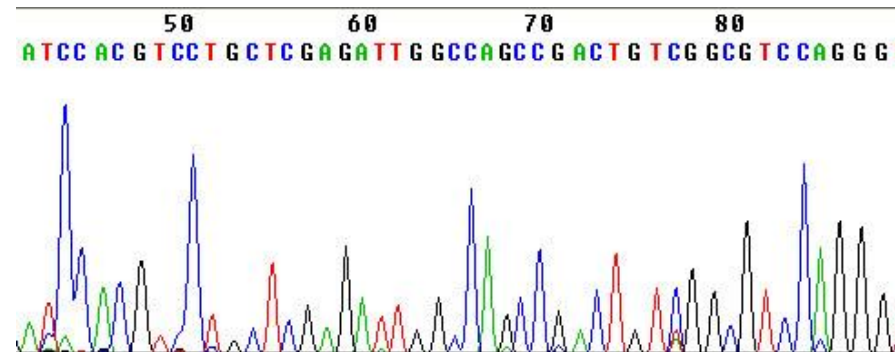
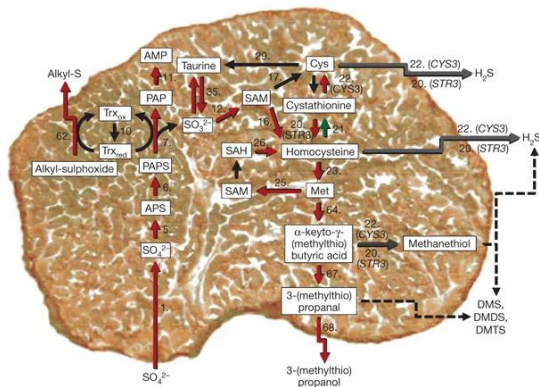


# Sequenziamento del Genoma di *Tuber melanosporum*

nature

## Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis

Francis Martin<sup>1</sup>, Annegret Kohler<sup>1</sup>, Claude Murat<sup>1</sup>, Raffaella Balestrini<sup>2</sup>, Pedro M. Coutinho<sup>3</sup>, Olivier Jaillon<sup>4-6</sup>, Barbara Montanini<sup>7</sup>, Emmanuelle Morin<sup>1</sup>, Benjamin Noel<sup>4-6</sup>, Riccardo Percudani<sup>7</sup>, Bettina Porcel<sup>4-6</sup>, Andrea Rubini<sup>8</sup>, Antonella Amicucci<sup>9</sup>, Joelle Amselem<sup>10</sup>, Véronique Anthouard<sup>4-6</sup>, Sergio Arcioni<sup>8</sup>, François Artiguenave<sup>4-6</sup>, Jean-Marc Aury<sup>4-6</sup>, Paola Ballario<sup>11</sup>, Angelo Bolchi<sup>7</sup>, Andrea Brenna<sup>11</sup>, Annick Brun<sup>1</sup>, Marc Buée<sup>1</sup>, Brandi Cantarel<sup>3</sup>, Gérard Chevalier<sup>12</sup>, Arnaud Couloux<sup>4-6</sup>, Corinne Da Silva<sup>4-6</sup>, France Denoeud<sup>4-6</sup>, Sébastien Duplessis<sup>1</sup>, Stefano Ghignone<sup>2</sup>, Benoît Hilselberger<sup>1,10</sup>, Mirco Iotti<sup>13</sup>, Benoît Marçais<sup>1</sup>, Antonietta Mello<sup>2</sup>, Michele Miranda<sup>14</sup>, Giovanni Pacioni<sup>15</sup>, Hadi Quesneville<sup>10</sup>, Claudia Riccioni<sup>8</sup>, Roberta Ruotolo<sup>7</sup>, Richard Splivallo<sup>16</sup>, Vilberto Stocchi<sup>9</sup>, Emilie Tisserant<sup>1</sup>, Arturo Roberto Viscomi<sup>7</sup>, Alessandra Zambonelli<sup>13</sup>, Elisa Zampieri<sup>2</sup>, Bernard Henrissat<sup>3</sup>, Marc-Henri Lebrun<sup>17</sup>, Francesco Paolocci<sup>2</sup>, Paola Bonfante<sup>2</sup>, Simone Ottonello<sup>7</sup> & Patrick Wincker<sup>4-6</sup>



Genoscope  
European Consortium

Consorzio  
ITALO-FRANCESE



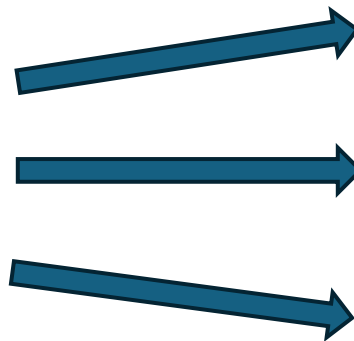
Foto: Anna-Lena Anderberg

**Importanza della identità di specie per validare i metodi di micorrizzazione (realizzazione di piantine micorrizzate), monitorare l'andamento di un impianto sperimentale o naturale ecc**



**Marcatore molecolari**

**Fattori biotici e abiotici che influenzano il ciclo biologico**



**Fattori abiotici: temperatura**

**Fattori biotici: gli animali micofagi**

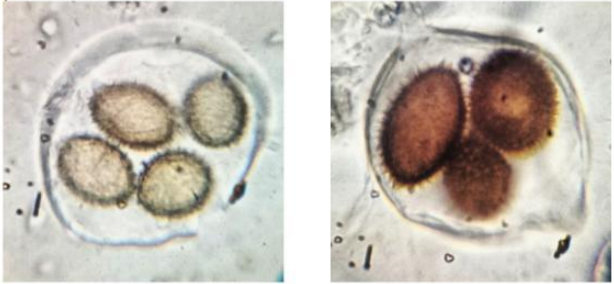
**Fattori biotici: i batteri**

# Metodi di Identificazione Molecolare

## METODI MORFOLOGICI

Recognition of mycorrhizae or spores

Mycorrhizal Systems Ltd.  
*Tuber indicum* spores (left) vs *Tuber melanosporum* spores (right)



Spore colour and spore number are variable in both species. Both species have spores ornamented with spines and are of similar size. DNA is the only reliable way to differentiate species.

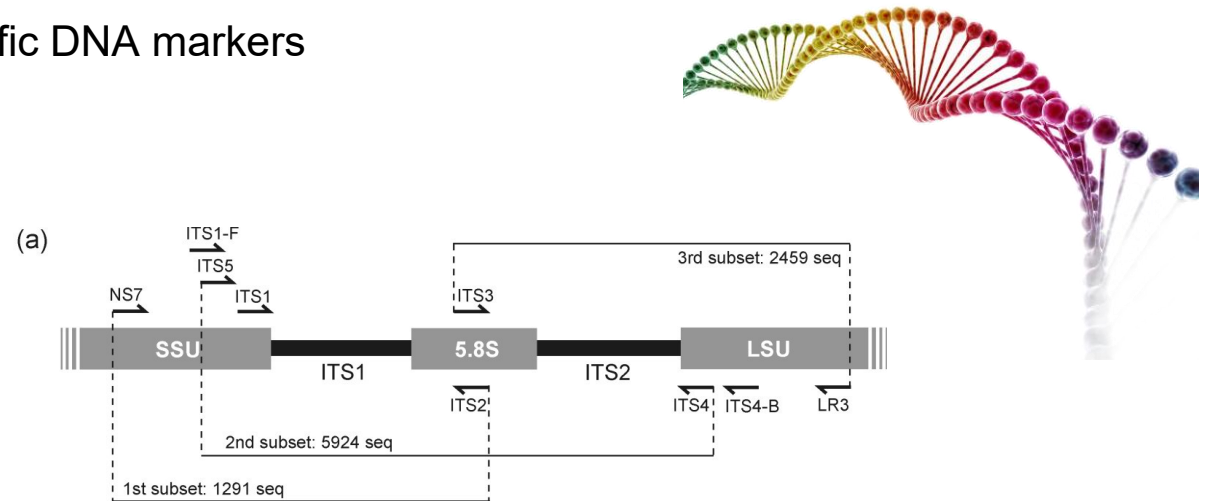
www.PlantationSystems.com ©Mycorrhizal Systems Ltd 2013



*T. magnatum* vs *Choiromyces meandriformis*

## METODI MOLECOLARI

Specific DNA markers



## *T. melanosporum* vs *T. indicum*



# Metodi di Identificazione Molecolare

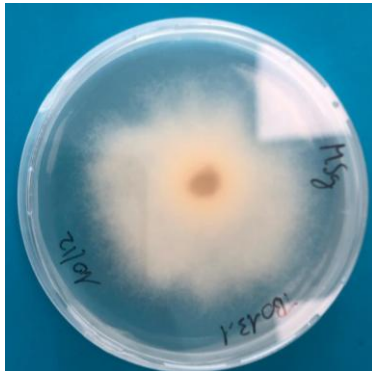
1. Analisi dei carpofori commercializzati



2. Identificazione delle piantine micorrizate



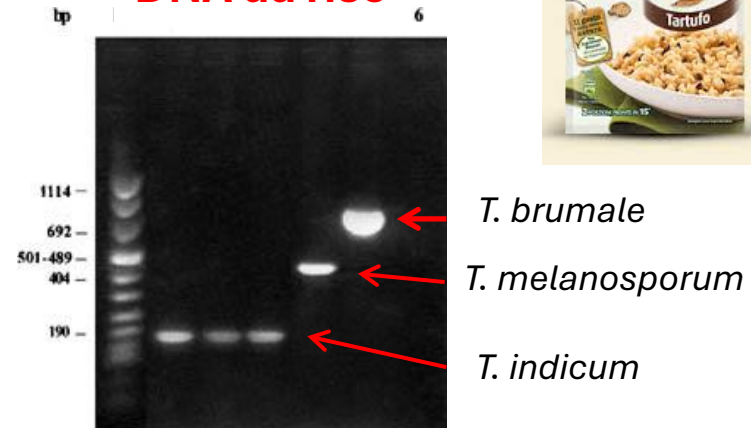
3. Monitoraggio di modelli *in vitro* e tartufaie sperimentali



4. Analisi dei prodotti alimentari a base di tartufo



DNA da riso



## Overview of molecular methods for quick identification of *Tuber* species

Antonella Amicucci<sup>1</sup>, Bianca Ranocchi<sup>1</sup>



# Metodi di Identificazione Molecolare

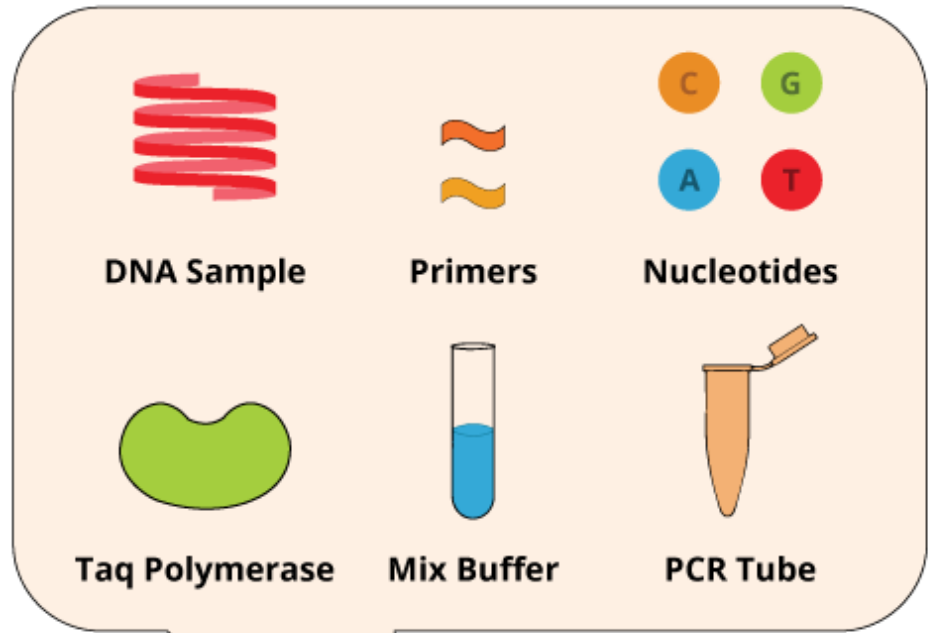
**Analisi della regione ITS**

*Restriction Length Fragment Polymorphism Analyses (RFLP),  
ITS specific primers*

**RAPD e marcatori SCAR**



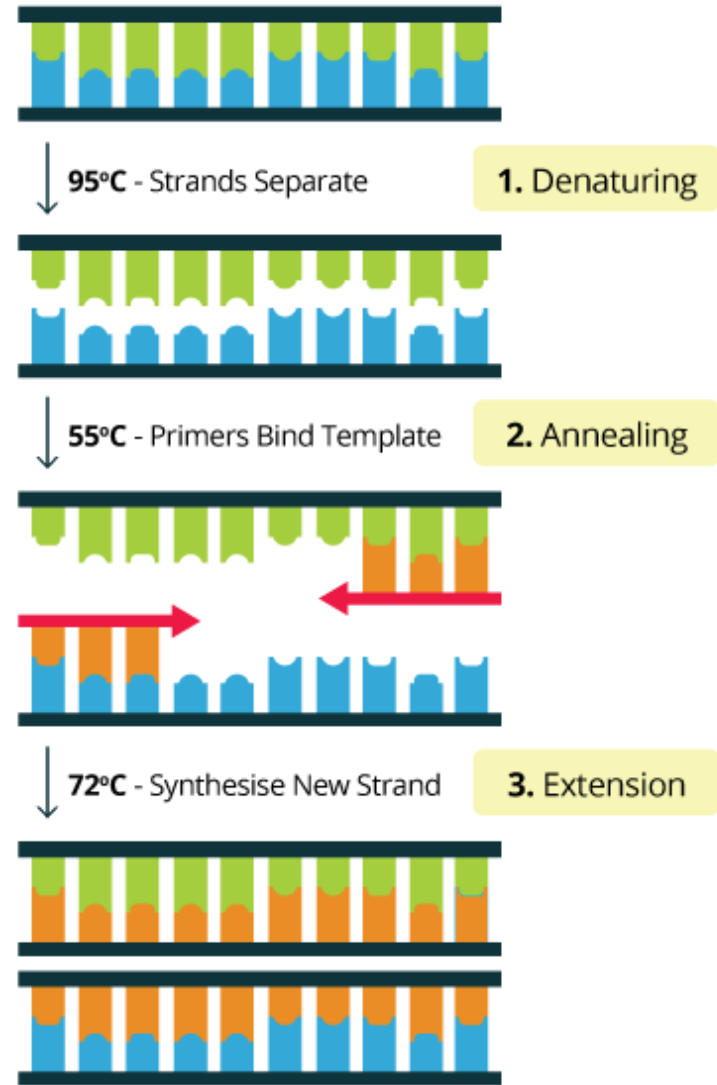
## PCR Components

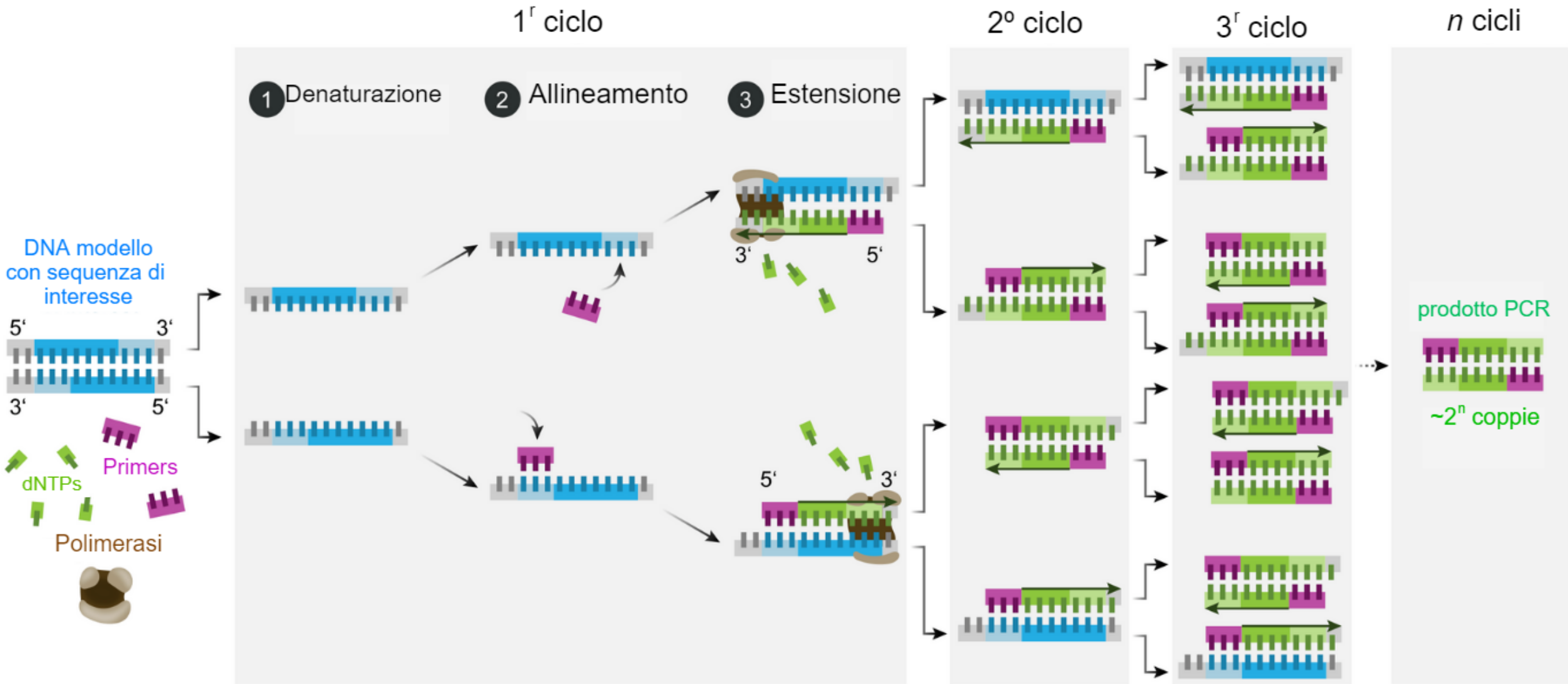


Thermal Cycler

PCR Cycle

## PCR Process (One Cycle)

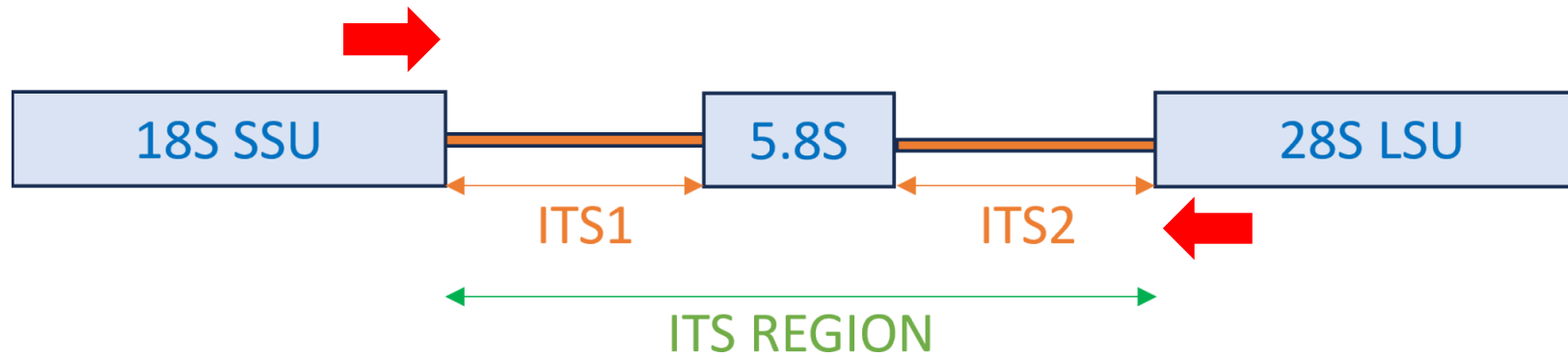




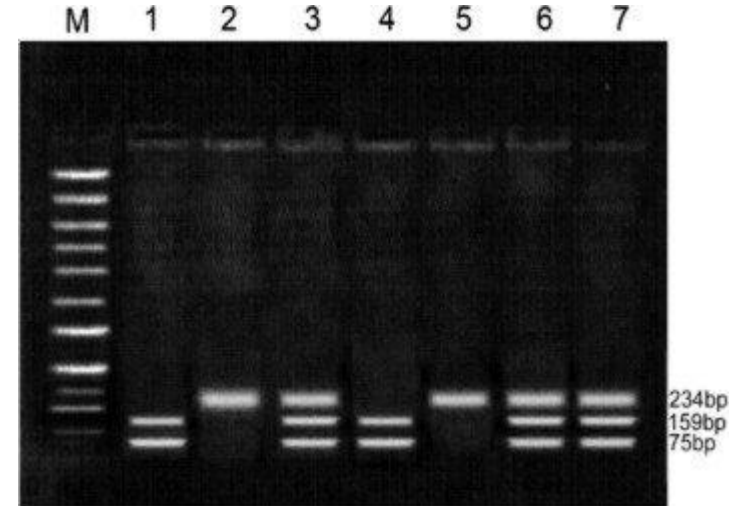
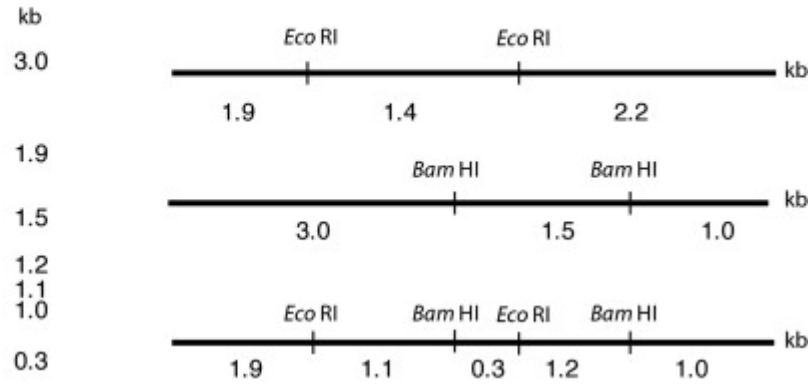
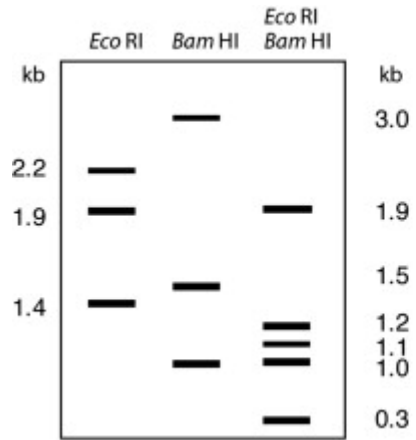
## Analisi della regione ITS

*Restriction Length Fragment Polymorphism Analyses (RFLP)*

*ITS specific primers*



# Restriction Length Fragment Polymorphism Analyses (RFLP)



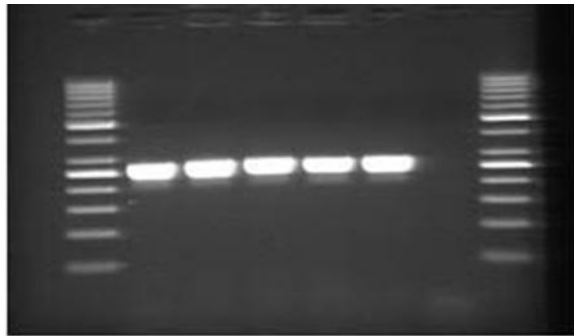
- Sequenziamento del DNA
- Analisi bioinformatica della sequenza



```
TAAACATGGCAAGTCGGGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTT
GAGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT
AGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAAC
GTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTAT
```

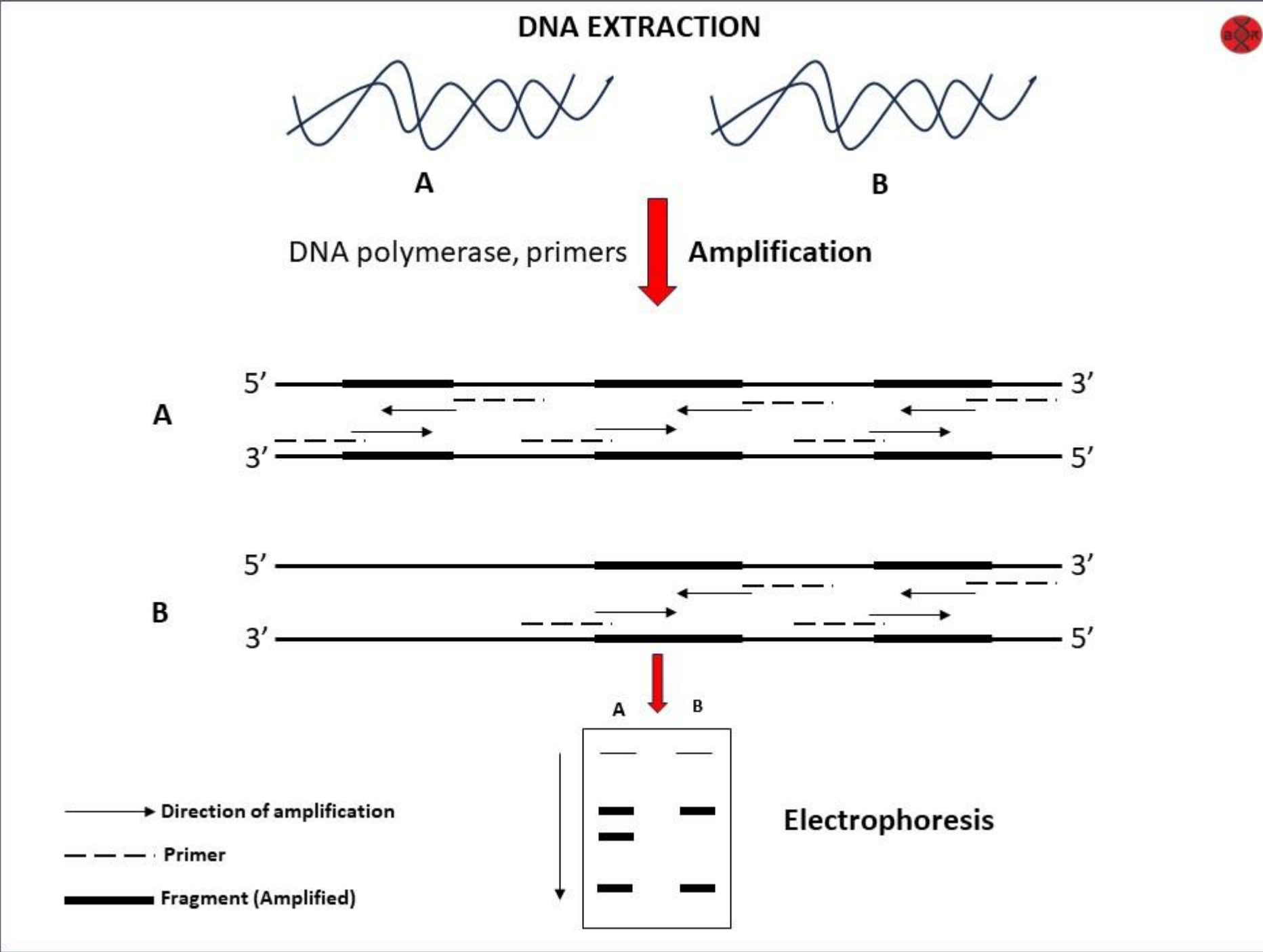


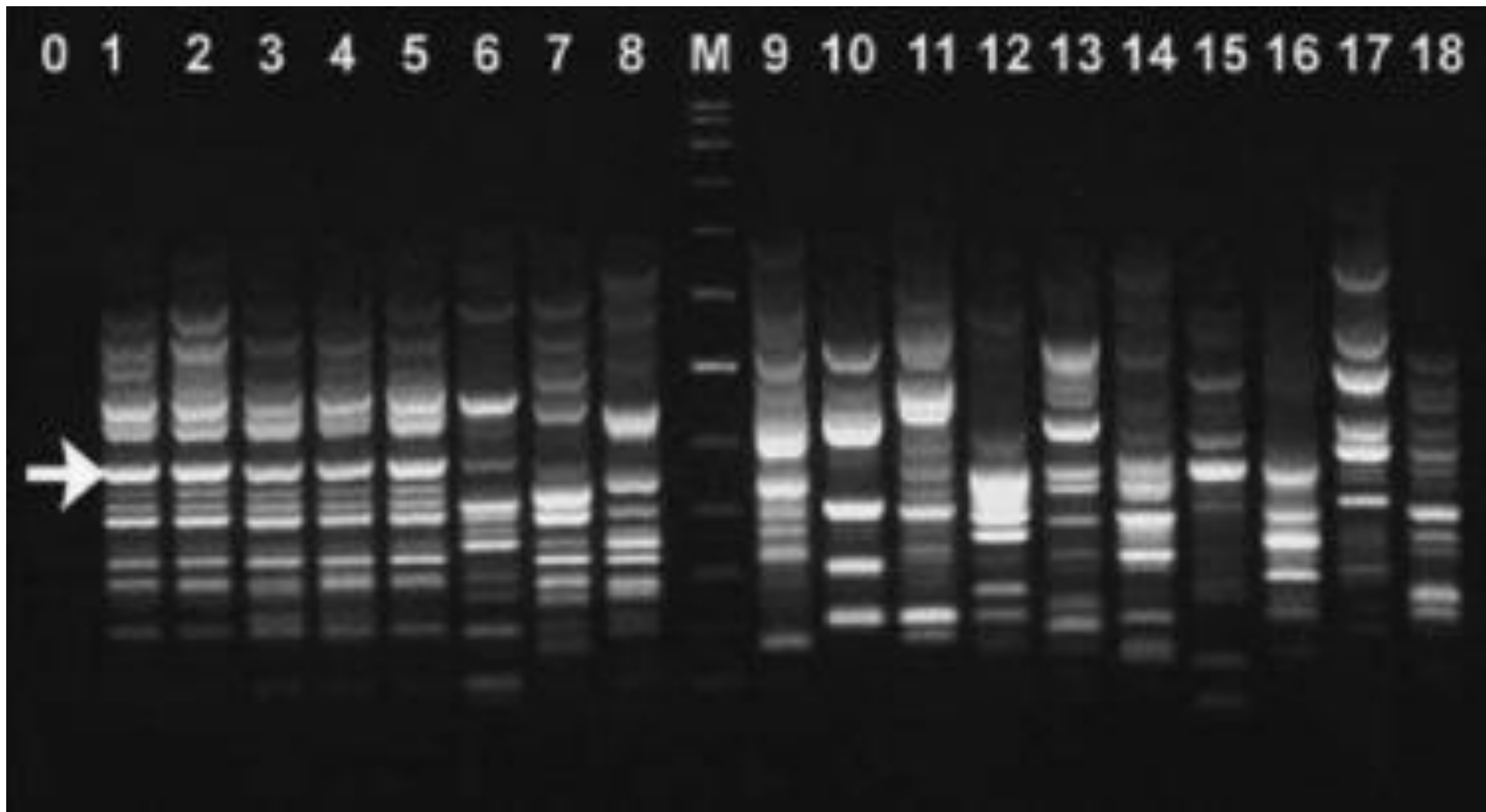
Allineamento con analoghe sequenze di altre specie

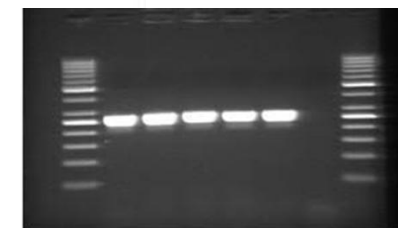
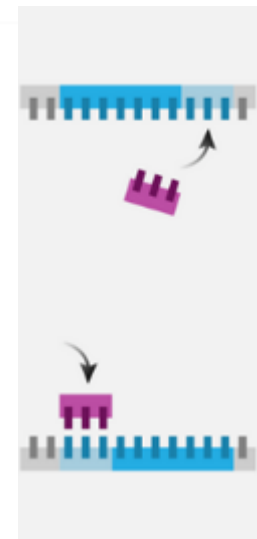
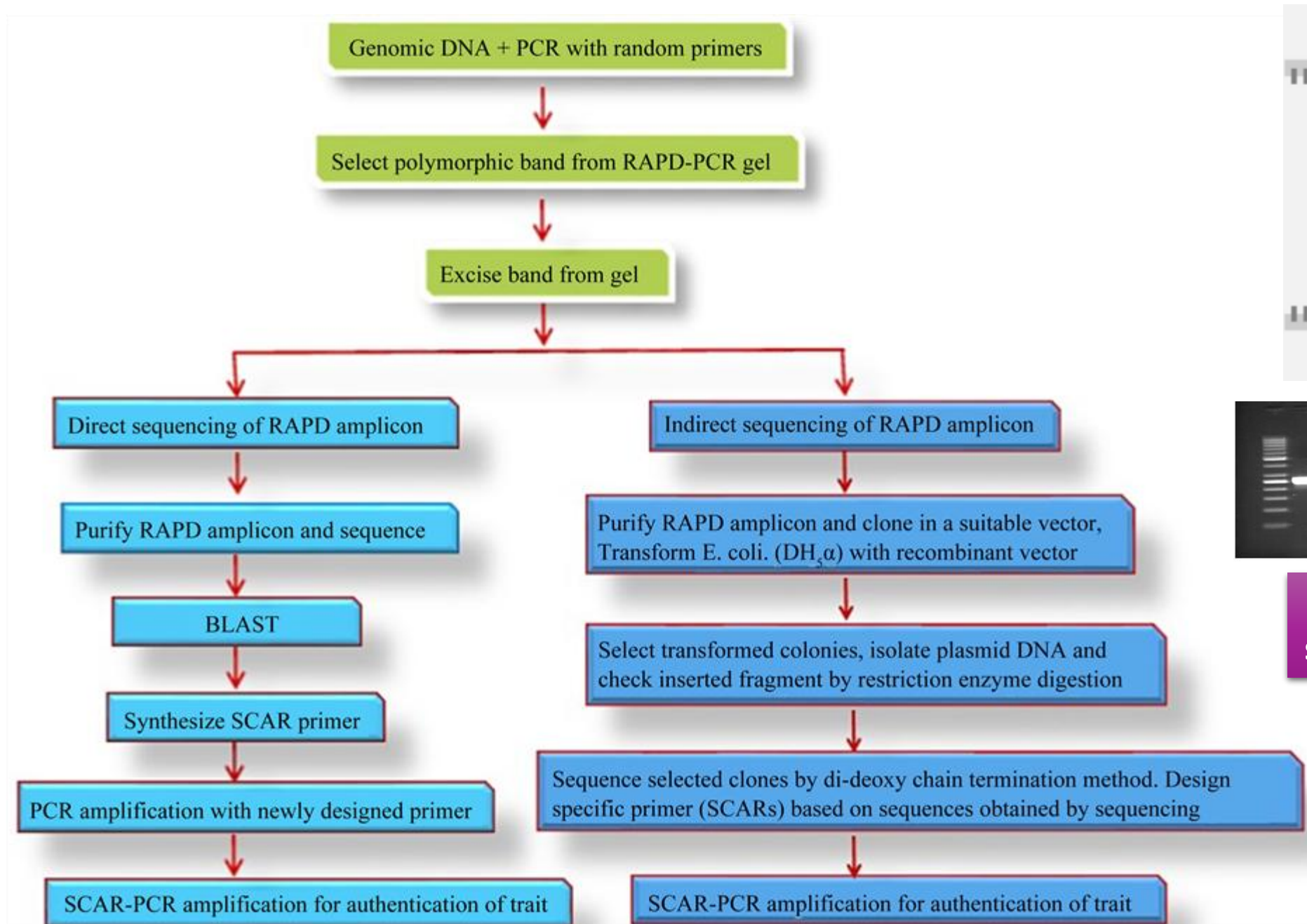


PCR specifica

**RAPD e  
marcatori SCAR**







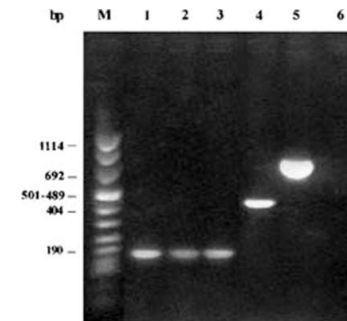
**PCR  
specifica**

## Specie identificate con metodi molecolari

*T. magnatum*  
*T. borchii*  
*T. puberulum*  
*T. maculatum*  
*T. dryophilum*  
*T. rufum*  
*T. melanosporum*  
*T. indicum*  
*T. brumale*  
*T. aestivum*  
*T. uncinatum*

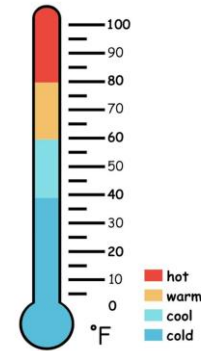


- PCR specifica
- PCR multiplex
- PCR quantitativa



# Fattori Biotici e Abiotici che Influenzano il Ciclo Biologico del Tartufo

**Fattori abiotici: temperatura**



**Fattori biotici: gli animali micofagi**



**Fattori biotici: i batteri**





# Innalzamento della Temperatura

## Cause dell'aumento della temperatura globale

- **Aumento dei gas serra** ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ) dovuto a combustibili fossili, agricoltura e deforestazione.
- **Uso intensivo di energia** e crescita industriale → maggiore emissione di  $\text{CO}_2$ .
- **Deforestazione** → riduzione della capacità di assorbire anidride carbonica.
- **Allevamenti intensivi** → rilascio di metano.
- **Modifiche dell'uso del suolo** e urbanizzazione → effetto "isola di calore".

# Effetti dell'Innalzamento della Temperatura sui Tartufi

**Modifica della fenologia:** anticipa o riduce il periodo di maturazione dei corpi fruttiferi.

**Riduzione della produttività:** temperature più alte e siccità prolungate riducono la formazione di micorrize e tartufi.

**Stress idrico:** i tartufi richiedono suoli umidi; la carenza d'acqua limita lo sviluppo del micelio e dei carpofori.

**Spostamento geografico:** le specie termofile (es. *Tuber aestivum*) tendono ad espandersi verso nord o a quote maggiori, mentre quelle mesofile (es. *Tuber melanosporum*, *T. magnatum*) si riducono.

**Alterazioni del microbioma del suolo:** il riscaldamento può modificare le comunità microbiche simbiotiche, influenzando la crescita e la qualità del tartufo.

**Effetti sulla qualità aromatica:** variazioni termiche possono alterare il profilo volatile e quindi l'aroma del tartufo.

**Importanza del monitoraggio climatico:** lo studio delle correlazioni clima-fruttificazione è essenziale per la gestione sostenibile delle tartufige naturali e coltivate.

# Strategie di Ricerca per Contrastare gli Effetti del Riscaldamento Globale sui Tartufi

## Ottimizzazione delle tecniche di coltivazione in tartufaia

→ Pratiche di irrigazione mirata, ombreggiamento, gestione del suolo per mantenere l'umidità.

## Studio del microbioma associato alla micorrizosfera

→ Ruolo di batteri "helper" (MHB) nel migliorare la crescita e la resistenza del micelio.

## Inoculazione sperimentale con consorzi microbici benefici

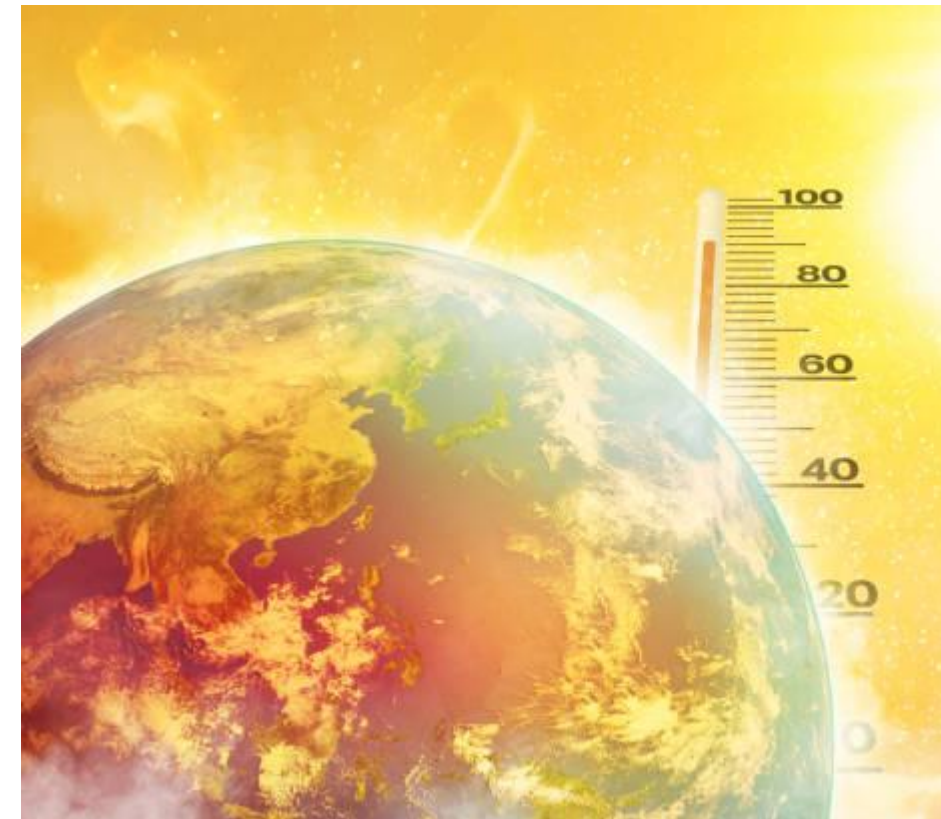
→ Uso specifici ceppi batterici per sostenere il metabolismo del fungo.

## Monitoraggio ecologico e genomico delle popolazioni naturali

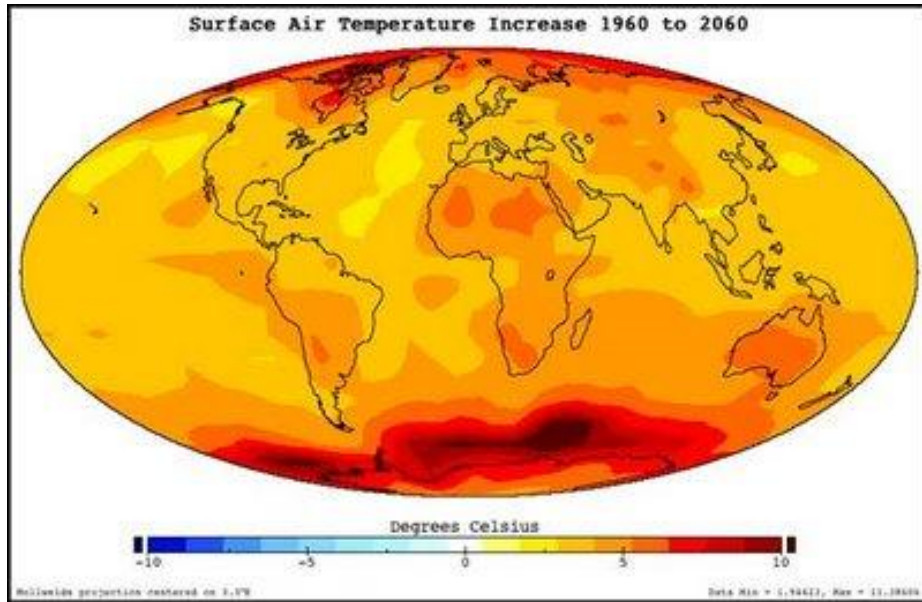
→ Analisi di adattamento genetico, biodiversità e risposta ai cambiamenti climatici.

## Selezione e caratterizzazione di ceppi più resistenti alla siccità e al calore

→ Identificazione di isolati di *Tuber* con maggiore tolleranza termica e idrica.



# Impatto dell'aumento di Temperatura su Ceppi di Tartufo



Valutazione degli effetti delle alte temperature sullo sviluppo in vitro di diversi isolati di *T. borchii* di diversa provenienza e la loro capacità di micorrizzare



Contents lists available at ScienceDirect

Fungal Ecology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/funeco](http://www.elsevier.com/locate/funeco)



Morphological and functional changes in mycelium and mycorrhizas of *Tuber borchii* due to heat stress



Pamela Leonardi <sup>a</sup>, Mirco Iotti <sup>b,\*</sup>, Sabrina Donati Zeppa <sup>c</sup>, Enrico Lancellotti <sup>d</sup>, Antonella Amicucci <sup>c</sup>, Alessandra Zambonelli <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Agricultural Sciences, University of Bologna, viale Fanin 46, 40127 Bologna, Italy

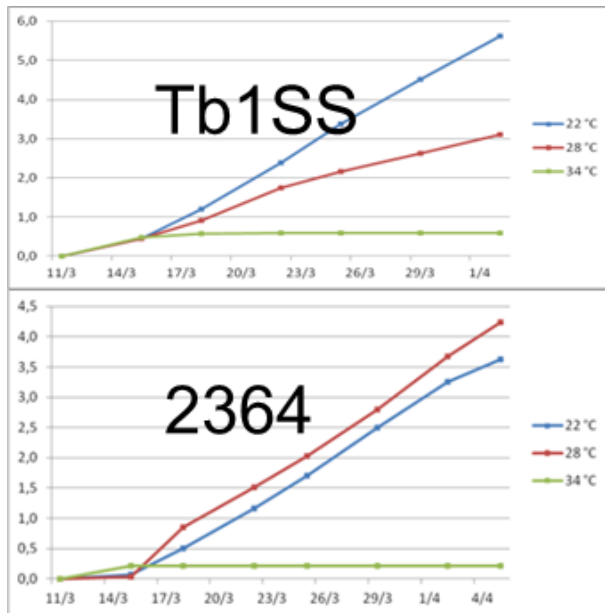
<sup>b</sup> Department of Life, Health and Environmental Sciences, University of L'Aquila, via Vetoia, Coppito 1, 67100 L'Aquila, Italy

<sup>c</sup> Department of Biomolecular Sciences, University of Urbino Carlo Bo, via Saffi 2, 61029 Urbino, Italy

<sup>d</sup> Department of Agriculture, University of Sassari, via Enrico de Nicola 1, 07100 Sassari, Italy

**SELEZIONARE I CEPPI PIÙ  
RESISTENTI DA USARE PER  
INOCULI**

# Impatto dell'aumento di Temperatura su Ceppi di Tartufo



Accrescimento  
diametrico medio

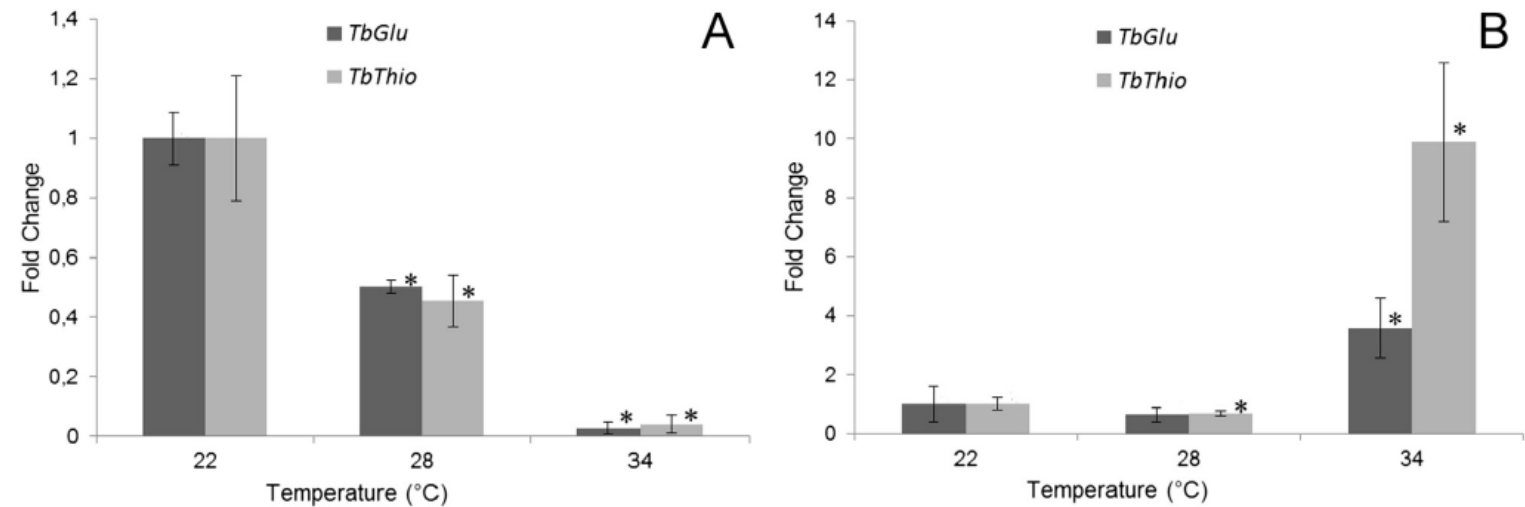


Fig. 2. Expression of *TbThio* and *TbGlu* genes in *T. borchii* strains Tb1SS (A) and 2364 (B) after 4 d of growth at 3 different temperatures: 22 °C (control), 28 °C and 34 °C. Data are mean  $\pm$  standard error of at least three independent experiments each performed in triplicate. The expression data were expressed as fold expression versus 22 °C. Asterisks indicate significant differences with the control at 22 °C ( $p \leq 0.05$ ).

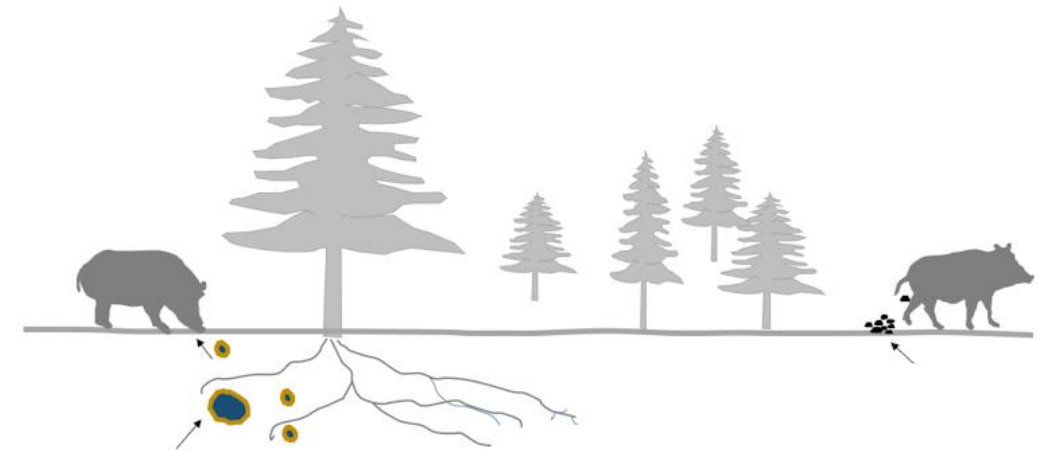
# Fattori Biotici: gli Animali Micofagi

1. Numerosi animali micofagi contribuiscono attivamente al ciclo biologico dei tartufi, fungendo da principali **agenti di dispersione delle spore**.

2. I mammiferi e gli insetti micofagi ingeriscono i corpi fruttiferi dei tartufi e ne disseminano le spore attraverso le feci, favorendone la **germinazione** in nuovi siti adatti alla micorrizzazione.

4. L'interazione tra tartufi e animali micofagi costituisce un esempio di **mutualismo**: il fungo fornisce un alimento ricco di nutrienti, mentre gli animali ne garantiscono la **propagazione**.

3. La micofagia rappresenta una **strategia ecologica** fondamentale per i tartufi, i cui ascomiceti ipogei dipendono interamente dagli animali per la diffusione delle spore.

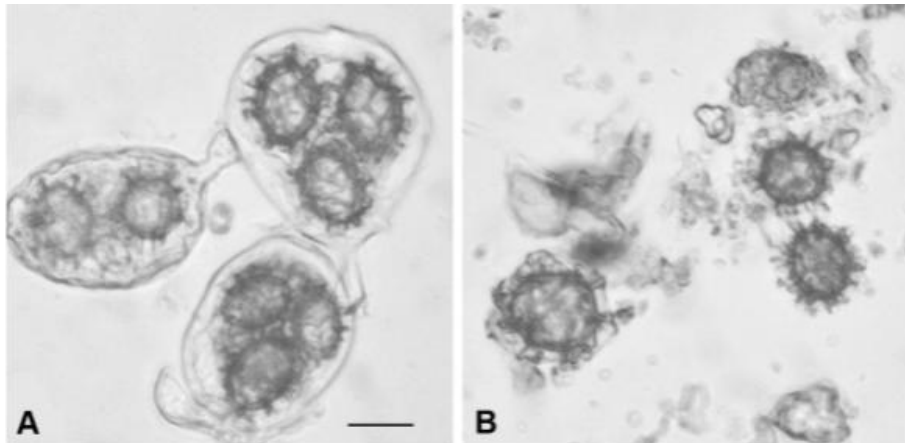


5. Le spore, dopo il passaggio nel tratto digerente degli animali, risultano spesso più pronte alla germinazione, probabilmente per l'azione di **digestione** parziale del peridio o per la **stimolazione meccanica**.

# Influenza di Animali Micofagi



IL PASSAGGIO DELLE SPORE  
NELL'INTESTINO DEL MAIALE/CINGHIALE  
FACILITA LA GERMINAZIONE DELLE SPORE



– *T. aestivum*: un eaten spores in the asci (A), free spores in the pig faeces (B). Bar = 20  $\mu\text{m}$ .

FUNGAL ECOLOGY 9 (2014) 59–60



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/funeco](http://www.elsevier.com/locate/funeco)



## Viability and morphology of *Tuber aestivum* spores after passage through the gut of *Sus scrofa*



Federica PIATTONI<sup>a</sup>, Antonella AMICUCCI<sup>b</sup>, Mirco IOTTI<sup>a</sup>, Francesca ORI<sup>a</sup>,  
Vilberto STOCCHI<sup>b</sup>, Alessandra ZAMBONELLI<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie, University of Bologna, V.le Fanin 46, 40127 Bologna, Italy

<sup>b</sup>Dipartimento di Scienze Biomolecolari, University of Urbino "Carlo Bo", Via Saffi 2, 61029 Urbino, Italy

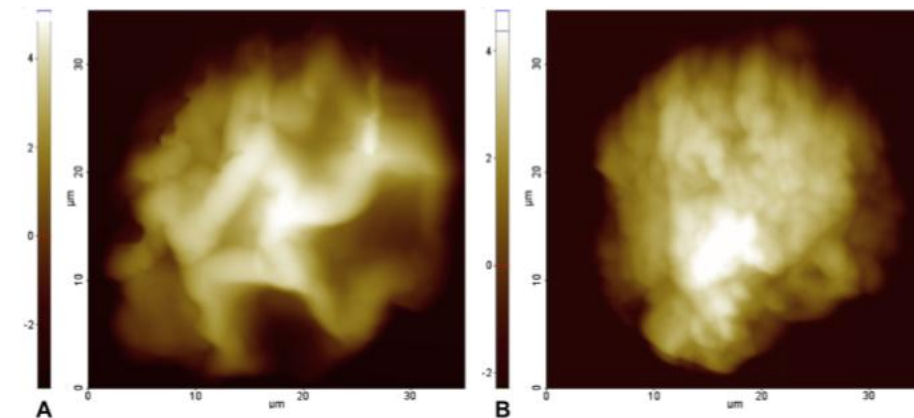


Fig 2 – AFM FMM topographic images of *T. aestivum* un eaten spores (A) and of pig-digested spores (B). Scan size 35  $\times$  35  $\mu\text{m}$  @ 0.2 Hz. The visible morphology changes have been quantitatively described by Rsk descriptor that was found to be  $-0.15$  (mean value) for undigested spores, and  $0.18$  (mean value) for the digested ones. In pig-digested spores most ornamentations disappeared and numerous small peaks/valleys appeared.

# Influenza di Animali Micofagi



LE SPORE INGERITE DALLE LUMACHE FAVORISCONO LA MICORRIZZAZIONE

bms  
British Mycological Society promoting fungal science

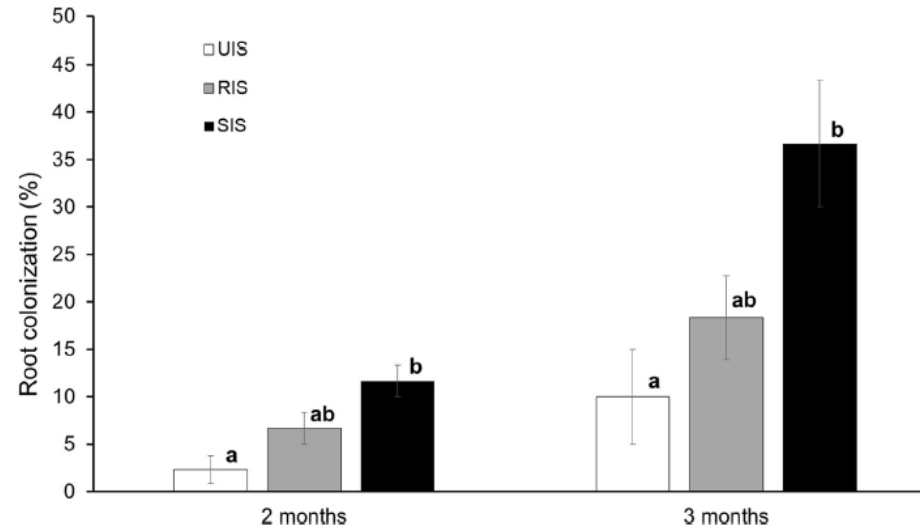
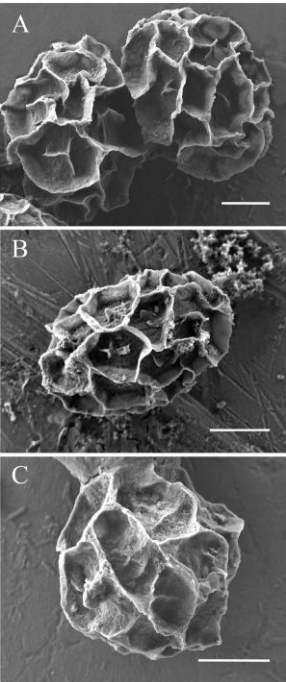
Contents lists available at ScienceDirect

Fungal Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fu](http://www.elsevier.com/locate/fu)

Effect of slug mycophagy on *Tuber aestivum* spores

Francesca Ori <sup>a</sup>, Michele Menotta <sup>b</sup>, Marco Leonardi <sup>a,\*</sup>, Antonella Amicucci <sup>b</sup>,  
Alessandra Zambonelli <sup>c</sup>, Hervé Covès <sup>d,e</sup>, Marc-André Selosse <sup>d,f</sup>,  
Laure Schneider-Maunoury <sup>d</sup>, Giovanni Pacioni <sup>a</sup>, Mirco Iotti <sup>a</sup>



Analisi del grado di micorrizzazione


Microscopia a forza atomica (AFM)

# Applicazioni ecologiche e biotecnologiche degli animali micofagi




1  PRETRATTAMENTI  
"BIOMIMETICI" DELLE SPORE


**INOCULO E GERMINAZIONE**  
→ SIMULAZIONE DEL PASSAGGIO  
INTESTINALE (PH, ENZIMI) PER  
MIGLIORARE LA GERMINAZIONE  
DELLE SPORE E L'EFFICIENZA DI  
INOCULO.

2  USO DELLA FAUNA  
MICOFAGA COME BIOINDICATORE

**BIOINDICATORI E DISPERSIONE  
NATURALE**  
→ SPECIE MICOFAGHE COME  
INDICATORI DI HABITAT  
FAVOREVOLI O VETTORI NATURALI  
DI DIFFUSIONE DELLE SPORE.

3  STUDIO DEL MICROBIOMA  
FECALE PER INOCULI PIÙ EFFICACI

**MICROBIOMA FECALE E BATTERI  
PROMOTORI**  
→ ANALISI DELLE FECI PER  
INDIVIDUARE CONSORZI  
MICROBICI UTILI ALLA  
GERMINAZIONE E ALLA  
MICORRIZZAZIONE.

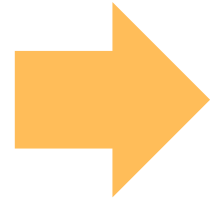
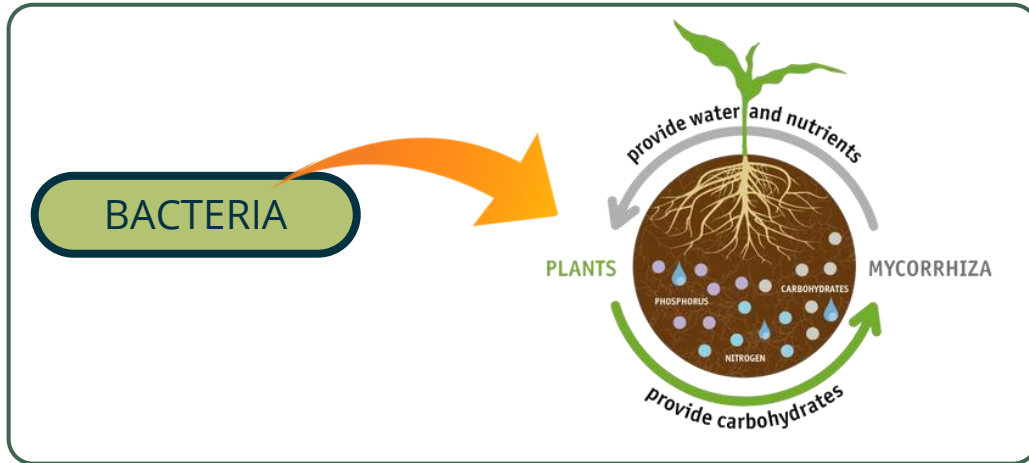
4  SUPPORTO AL RIPRISTINO  
ECOLOGICO DI TARTUFAIE

**RIPRISTINO ECOLOGICO**  
→ USO DELLA FAUNA MICOFAGA  
PER FAVORIRE LA  
RICOLONIZZAZIONE DI TARTUFAIE  
DEGRADATE.

# Interazione Tartufo-Pianta-Batteri



MICORRIZOSFERA  
ASSOCIATO AL TARTUFO



"Holobiont"  
organism



COMUNITÀ  
BATTERICHE PIÙ  
PRESENTI

- Proteobacteria
- Bacteroidetes
- Firmicutes
- Actinobacteria

# Interazione Tartufo-Pianta-Batteri



MICORRIZOSFERA  
ASSOCIATO AL TARTUFO

Mycorrhiza (2012) 22:429–436  
DOI 10.1007/s00572-011-0420-0

ORIGINAL PAPER

**The combined effects of *Pseudomonas fluorescens* and *Tuber melanosporum* on the quality of *Pinus halepensis* seedlings**

J. A. Domínguez · A. Martín · A. Anríquez · A. Albanesi

 forests

MDPI

Article

**Use of Inoculator Bacteria to Promote *Tuber melanosporum* Root Colonization and Growth on *Quercus faginea* Saplings**

Yasmine Piñuela <sup>1,2,\*</sup>, Josu G. Alday <sup>1,3</sup>, Daniel Oliach <sup>2</sup>, Francesc Boloña <sup>2</sup>, Carlos Colinas <sup>1,2</sup> and José Antonio Bonet <sup>1,3</sup>

 ELSEVIER

Fungal Biology

Volume 114, Issues 11–12, November–December 2010, Pages 936–942

**New evidence for nitrogen fixation within the Italian white truffle *Tuber magnatum***

Elena Barbieri <sup>\*</sup>, Paola Ceccaroli <sup>\*</sup>, Roberta Saltarelli <sup>\*</sup>, Chiara Guidi <sup>\*</sup>, Lucia Potenza <sup>\*</sup>, Marina Basaglia <sup>\*</sup>, Federico Fontana <sup>\*</sup>, Enrico Baldan <sup>\*</sup>, Sergio Casella <sup>\*</sup>, Ouafae Ryahi <sup>\*</sup>, Alessandra Zambonelli <sup>\*</sup>, Vilberto Stocchi <sup>\*</sup>

 sfam

Research article | Open Access

**Bacteria associated with truffle-fruited bodies contribute to truffle aroma**

Richard Spilivallo <sup>\*</sup>, Aurélie Deveau, Nayuf Valdez, Nina Kirchhoff, Pascale Frey-Klett, Petr Karlovsky

First published: 05 June 2014 | <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12521> | Citations: 93

**Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation**

Elena Barbieri <sup>\*</sup>, Chiara Guidi, Joanne Bertaux, Pascale Frey-Klett, Jean Garbaye, Paola Ceccaroli, Roberta Saltarelli, Alessandra Zambonelli, Vilberto Stocchi <sup>\*</sup>

First published: 29 May 2007 | <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01338.x> |

Comparative Study | FEMS Microbiol Lett. 2005 Jun 1;247(1):23–35.

doi: 10.1016/j.femsle.2005.04.027.

**New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad**

Elena Barbieri <sup>\*</sup>, Luana Bertini, Ismaela Rossi, Paola Ceccaroli, Roberta Saltarelli, Chiara Guidi, Alessandra Zambonelli, Vilberto Stocchi

- ✓ Influenzano l'aroma
- ✓ Promuovono la crescita della pianta
- ✓ Modulano la crescita ifale
- ✓ Promuovono la micorrizazione
- ✓ Proteggono dai patogeni
- ✓ Fissano l'azoto
- ✓ Modulano la germinazione delle spore



# Rilevamento di un *Bradyrhizobium* fissatore di azoto nell'ascoma di *Tuber magnatum*

FUNGAL BIOLOGY 114 (2010) 936–942



ELSEVIER



British Mycological  
Society promoting fungal science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/funbio](http://www.elsevier.com/locate/funbio)



## New evidence for nitrogen fixation within the Italian white truffle *Tuber magnatum*

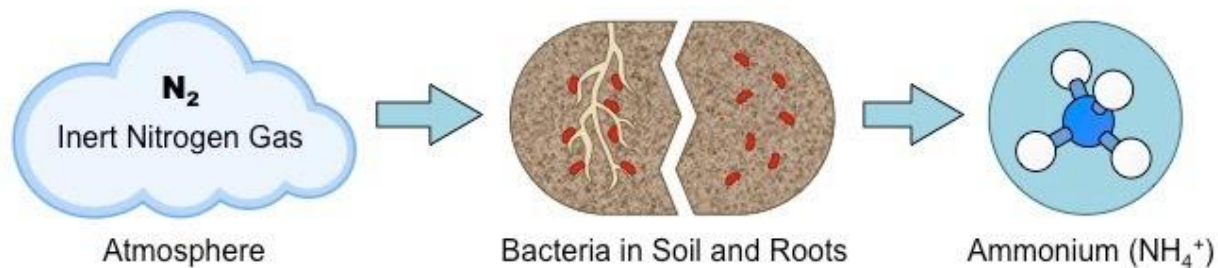
Elena BARBIERI<sup>a,\*</sup>, Paola CECCAROLI<sup>a</sup>, Roberta SALTARELLI<sup>a</sup>, Chiara GUIDI<sup>a</sup>,  
Lucia POTENZA<sup>a</sup>, Marina BASAGLIA<sup>b</sup>, Federico FONTANA<sup>b</sup>, Enrico BALDAN<sup>b</sup>,  
Sergio CASELLA<sup>b</sup>, Ouafae RYAH<sup>c</sup>, Alessandra ZAMBONELLI<sup>c</sup>, Vilberto STOCCHI<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Scienze Biomolecolari, University of Urbino "Carlo Bo", Urbino, Italy

<sup>b</sup>Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, University of Padova, Agripolis, Legnaro, Italy

<sup>c</sup>Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, University of Bologna, Bologna, Italy

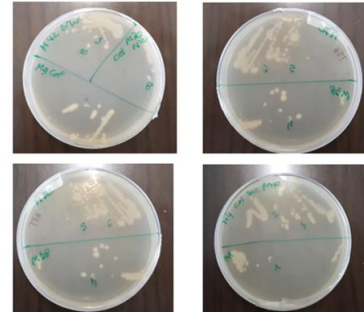
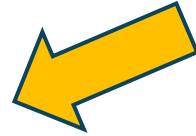
### Nitrogen Fixation



La maggior parte dell'**azoto** presente nel suolo **non è biodisponibile** per il fungo e la pianta ( $\text{N}_2$ ). I **batteri**, in particolare i batteri *Bradyrhizobium*, sono in grado di **fissare l'azoto in  $\text{NH}_3$** , rendendolo **utilizzabile dalla pianta e dal fungo**

# Uso di Ceppi Batterici come Biostimolanti

Piantine in serra

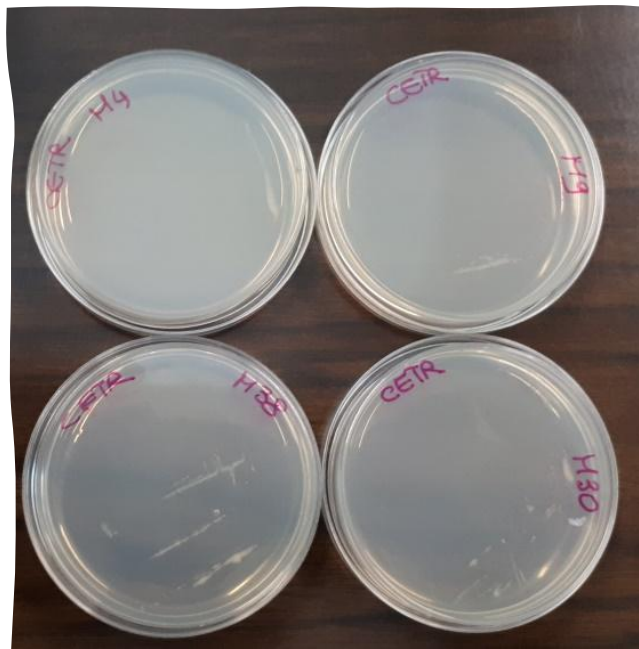


Tartufaie coltivate di tartufo nero



Tartufaie naturali di tartufo bianco










- 
- **Inoculazioni batteriche in piantine di *Quercus pubescens* micorrizate con *Tuber melanosporum* Vittad.: Premesse per la sperimentazione di nuovi biostimolanti**

# Effetto dell'Inoculazione di Batteri in Piantine Micorrizate

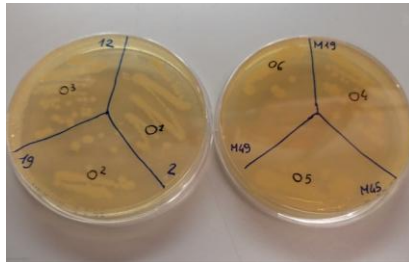
Article

## Effect of Bacteria Inoculation on Colonization of Roots by *Tuber melanosporum* and Growth of *Quercus ilex* Seedlings

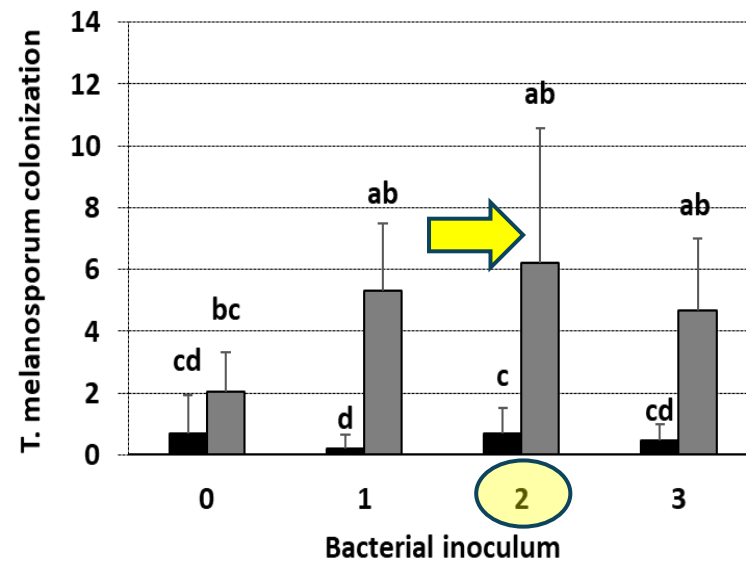
Veronica Giorgi <sup>1</sup>, Antonella Amicucci <sup>2,\*</sup>, Lucia Landi <sup>1</sup>, Ivan Castelli <sup>1</sup>, Gianfranco Romanazzi <sup>1</sup>, Cristiano Peroni <sup>3</sup>, Bianca Ranocchi <sup>2</sup>, Alessandra Zambonelli <sup>4</sup> and Davide Neri <sup>1</sup>



Piantine in serra



ALCUNE SPECIE BATTERICHE STIMOLANO LO SVILUPPO DELLA SIMBIOSI MICORRIZICA

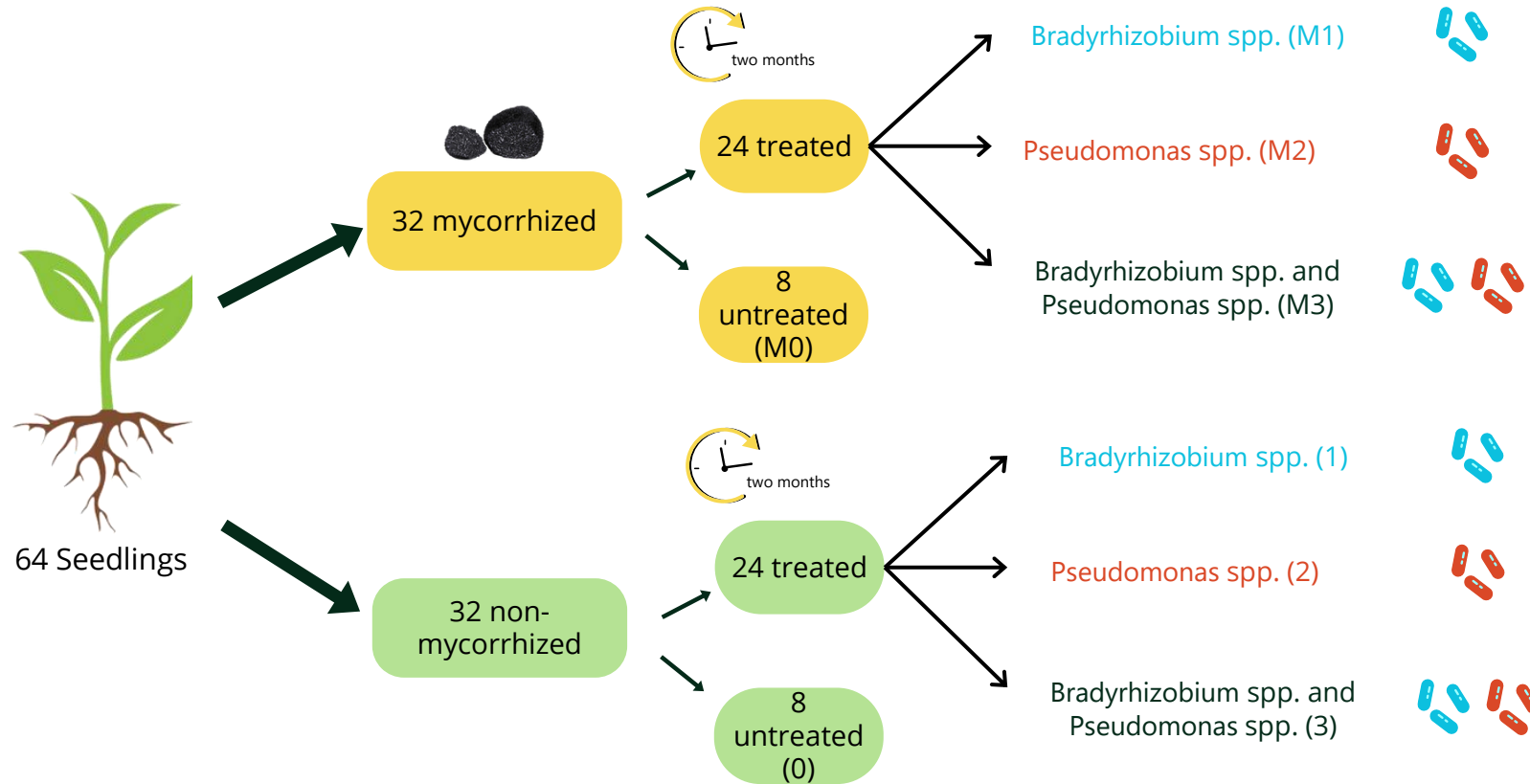


Ceppi di *Pseudomonas* stimolano lo sviluppo della simbiosi micorrizica

# In the Nursery

EFFECT OF BACTERIA INOCULATION ON COLONIZATION OF ROOTS BY *Tuber melanosporum* AND GROWTH OF *Quercus ilex* SEEDLINGS

## Experimental Setup



The eight treatments were replicated eight times, leading to a total of 64 seedlings

# Results

## EFFECT OF BACTERIA INOCULATION ON COLONIZATION OF ROOTS BY *Tuber melanosporum* AND GROWTH OF *Quercus ilex* SEEDLINGS

### Mycorrhization degree

Five root fragments (5–10 cm long, with all the branching roots) were randomly selected from the proximal and the distal parts of the root system of each plant.

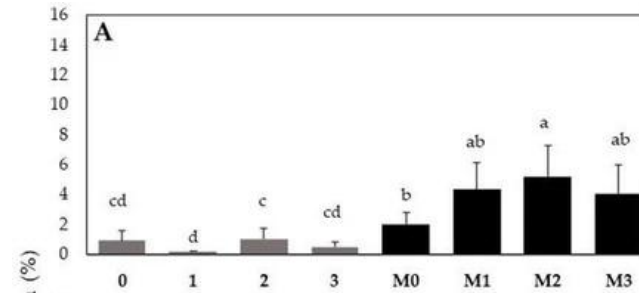


The percentage of ECM colonization was calculated as the ratio of the number of mycorrhizal root tips to the total number of root tips for each plant.



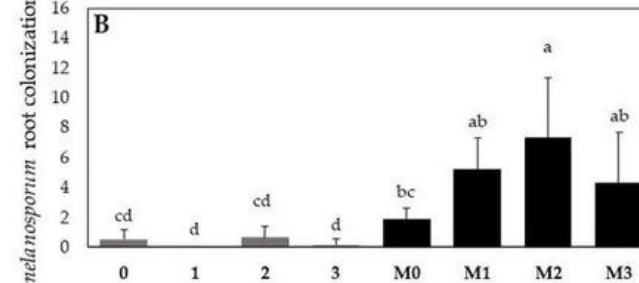
About 700 root tips were examined for each plant: 300 from the proximal section and 400 from the distal section.

Overall plant



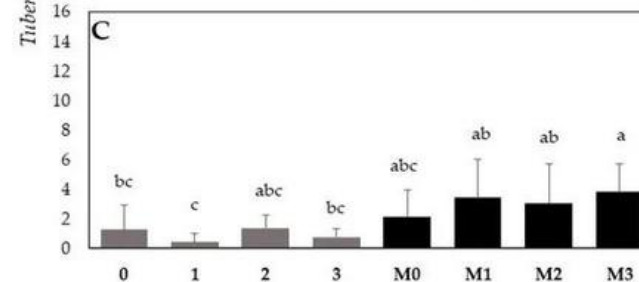
Bacteria stimulated in all seedlings the mycorrhization of *T. melanosporum* respect untreated plants

Proximal collar



*T. melanosporum* displayed the highest colonization on proximal roots, mainly for the M2 treatment

Distal collar



**INCREASED MYCORRHIZATION DEGREE WITH MIXTURE M2 (*Pseudomonas* spp.)**

Bars indicate standard deviation; different letters indicate statistical difference for the Tukey HSD test ( $p > 0.05$ )

The percentages of *T. melanosporum* mycorrhization were normalized using the arcsine square-root transformation before proceeding to statistical analysis

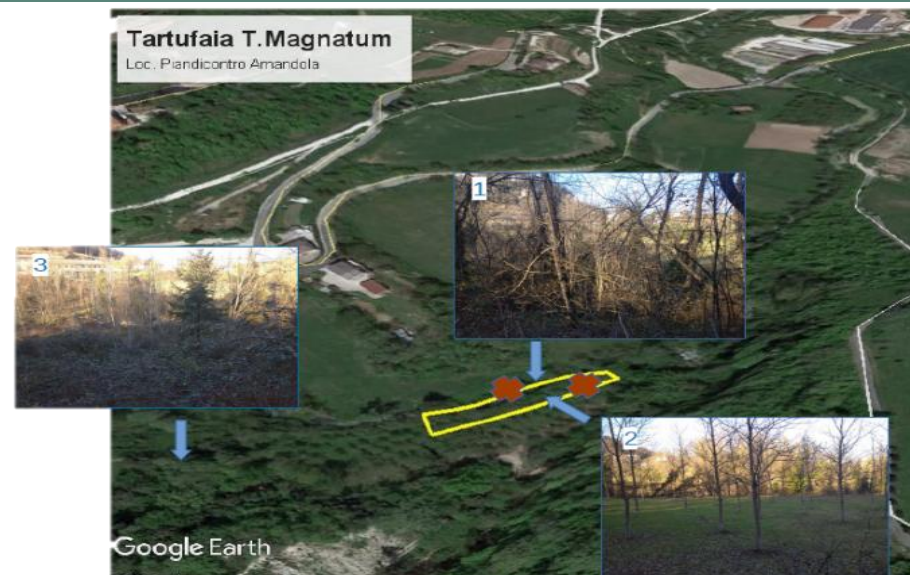
# Applicazione di Batteri in Tartufaie



## NATURALE PRODUTTIVA

Analizzare l'effetto dell'inoculo di ceppi batterici sulla produzione di *T. magnatum*

Implementare la produttività



## NATURALE NON PRODUTTIVA

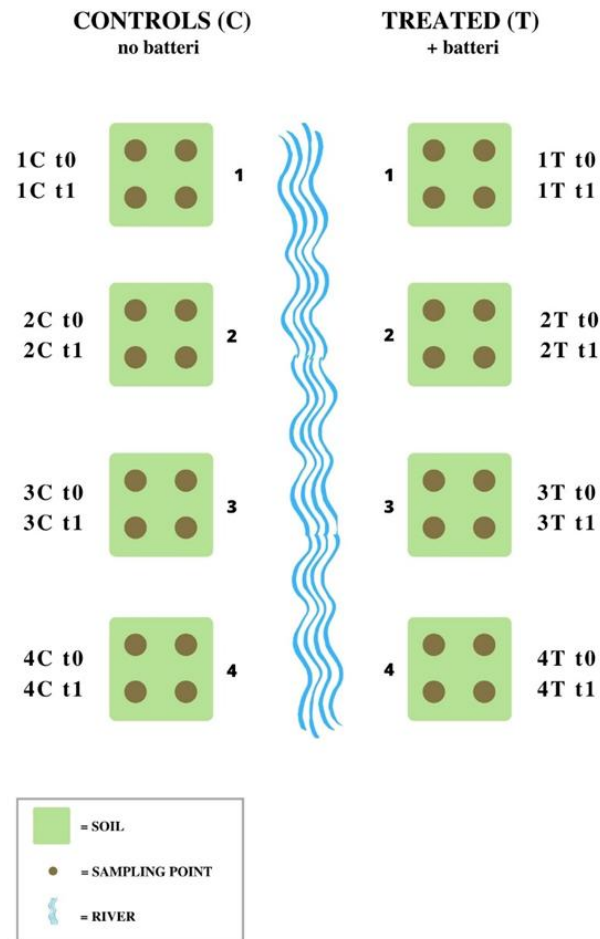
Valutare la presenza del materiale genetico di *T. magnatum* nel suolo

Risalire alle cause della mancata produttività



# Applicazione di Batteri in Tartufaie

*Bradyrhizobium japonicum* in una tartufaia naturale produttiva di *Tuber magnatum*



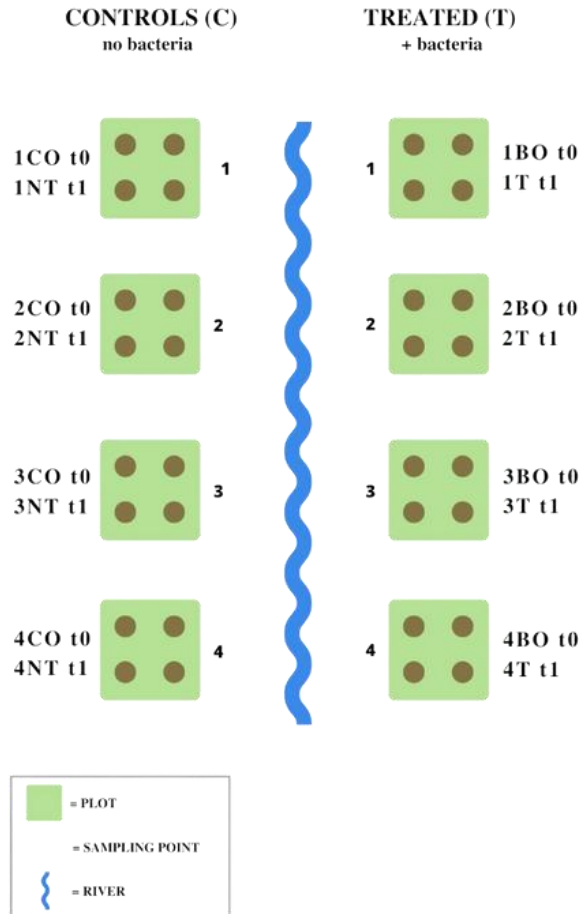
AUMENTO DELLA QUANTITÀ DI MICELIO DI *TUBER* NEL TERRENO IN ESAME UN ANNO DOPO L'INOCULO DEI CEPPI BATTERICI

Questo risultato suggerisce che il trattamento con *Bradyrhizobium* ha avuto un effetto positivo sulla crescita del micelio, favorendo la propagazione del tartufo bianco nel terreno.

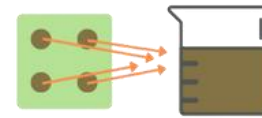
# In the Field

STUDY OF NEW SUSTAINABLE STRATEGIES FOR IMPLEMENTING AND PRESERVING NATURAL *Tuber magnatum* TRUFFLE GROUND:  
EMPLOY OF *Bradyrhizobium* BACTERIA

## Experimental Design



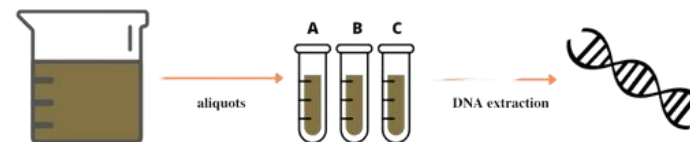
samples from the same area are combined in a container and mixed



Freeze drying, grinding and sieving for each sample



3 aliquots of each sample and DNA extraction



<b>CONTROLS time 0 (2019)</b> 1 CO A, B, C 2 CO A, B, C 3 CO A, B, C 4 CO A, B, C	<b>TREATED time 0 (2019)</b> 1 BO A, B, C 2 BO A, B, C 3 BO A, B, C 4 BO A, B, C
<b>CONTROLS time 1 (2020)</b> 1 NT A, B, C 2 NT A, B, C 3 NT A, B, C 4 NT A, B, C	<b>TREATED time 1 (2020)</b> 1 T A, B, C 2 T A, B, C 3 T A, B, C 4 T A, B, C

# PCR Quantitativa

## Real-time PCR mediante sonda Taqman

1 La sonda TaqMan ha un **fluoroforo** e un **quencher**

2 Finché la sonda è intera → **nessuna luce**

3 Durante l'amplificazione, la **Taq polimerasi** rompe la sonda → il fluoroforo si libera ✨

4 La **fluorescenza aumenta** a ogni ciclo → misura **in tempo reale** la quantità di DNA

 Più DNA iniziale → segnale prima

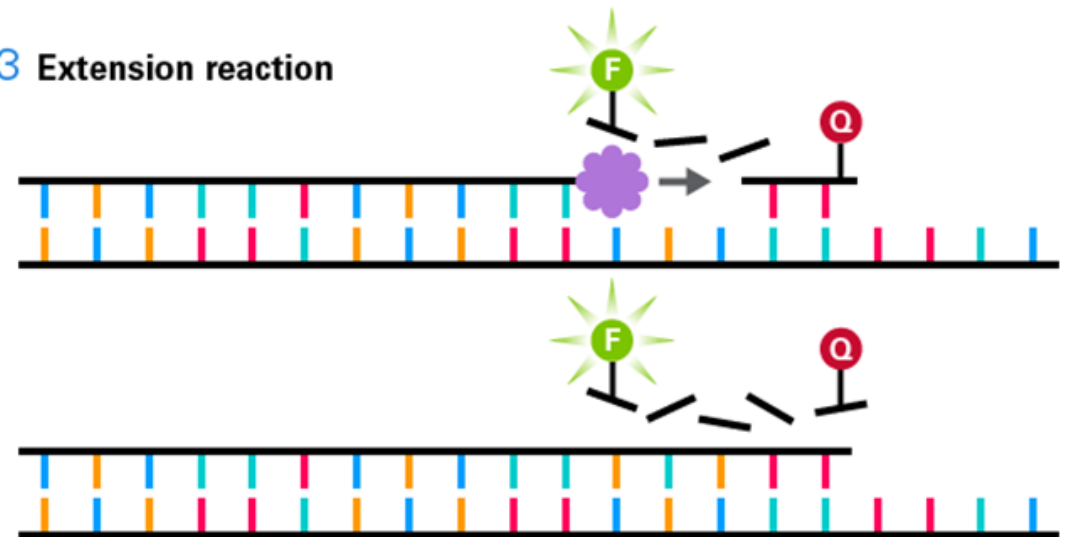
1 Heat denaturation



2 Primer annealing/probe hybridization



3 Extension reaction



# Rilevamento di un *Bradyrhizobium* Fissatore di Azoto nell'Ascoma di *Tuber magnatum*

FUNGAL BIOLOGY 114 (2010) 936–942



ELSEVIER



British Mycological  
Society promoting fungal science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/funbio](http://www.elsevier.com/locate/funbio)



## New evidence for nitrogen fixation within the Italian white truffle *Tuber magnatum*

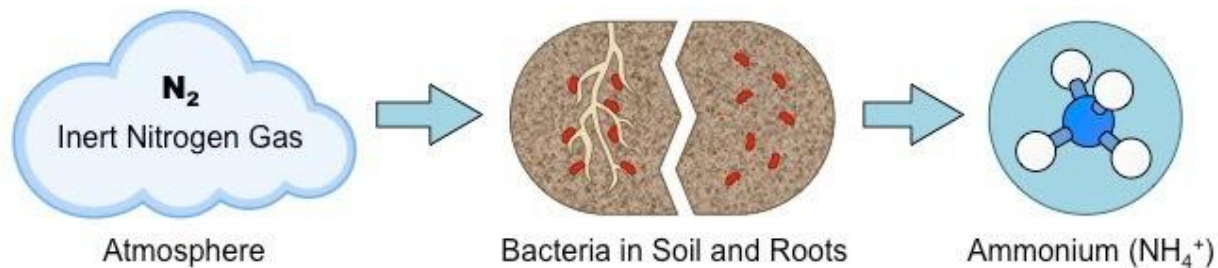
Elena BARBIERI<sup>a,\*</sup>, Paola CECCAROLI<sup>a</sup>, Roberta SALTARELLI<sup>a</sup>, Chiara GUIDI<sup>a</sup>,  
Lucia POTENZA<sup>a</sup>, Marina BASAGLIA<sup>b</sup>, Federico FONTANA<sup>b</sup>, Enrico BALDAN<sup>b</sup>,  
Sergio CASELLA<sup>b</sup>, Ouafae RYAHY<sup>c</sup>, Alessandra ZAMBONELLI<sup>c</sup>, Vilberto STOCCHI<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Scienze Biomolecolari, University of Urbino "Carlo Bo", Urbino, Italy

<sup>b</sup>Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, University of Padova, Agripolis, Legnaro, Italy

<sup>c</sup>Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, University of Bologna, Bologna, Italy

### Nitrogen Fixation



La maggior parte dell'azoto presente nel suolo **non è biodisponibile** per il fungo e la pianta ( $\text{N}_2$ ). I **batteri**, in particolare i batteri *Bradyrhizobium*, sono in grado di **fissare l'azoto in  $\text{NH}_3$** , rendendolo utilizzabile dalla **pianta e dal fungo**

# Bradyrhizobium spp. in Colture Miceliari di *Tuber magnatum*

## RESEARCH ARTICLE

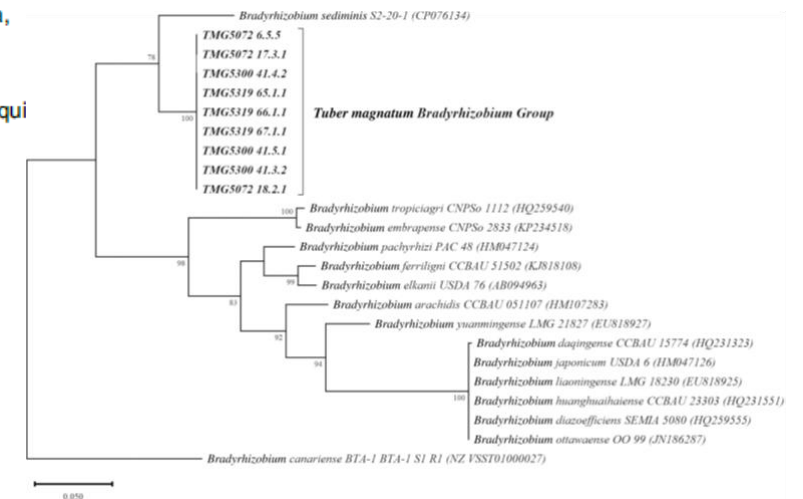
### In vitro interactions between *Bradyrhizobium* spp. and *Tuber magnatum* mycelium

Simone Graziosi<sup>1</sup> | Federico Puliga<sup>1</sup> | Mirco Iotti<sup>2</sup> | Antonella Amicucci<sup>3</sup> |  
Alessandra Zambonelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy

<sup>2</sup>Department of Life, Health and Environmental Science, University of L'Aquila, L'Aquila, Italy

<sup>3</sup>Department of Biomolecular Sciences, University of Urbino, Urbino, Italy



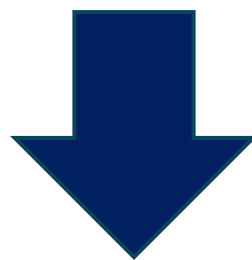
Esempio di coltura di micelio di *Tuber magnatum* su substrato di coltura modificato (mWPM) al primo stadio di crescita (A). Biofilm batterico attorno alle ife (B). Morfologia del micelio di *T. magnatum* (C–E); barra = 15 µm. Distribuzione batterica lungo le ife (C), vescicole (D), spirali ifali e aggregati (E). Ife e batteri sono stati colorati con lattofenolo blu.

# CONCLUSIONI

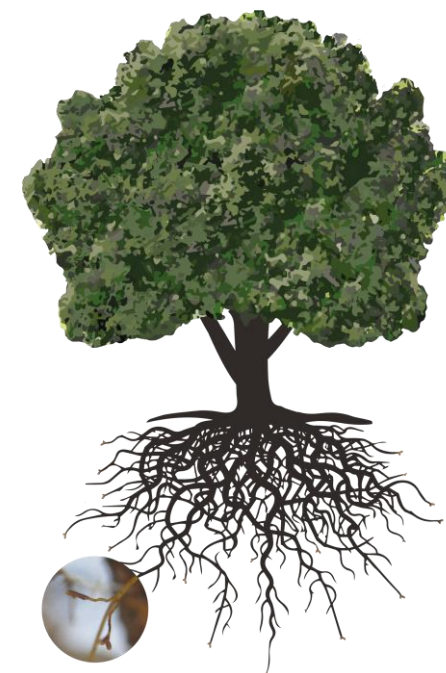
## RICERCA



- **CONOSCENZA**
- **RISPOSTE A SPECIFICHE CRITICITÀ**
- **STRATEGIE INNOVATIVE PER LA CONSERVAZIONE E LA PRODUZIONE**



**TUTELA E VALORIZZAZIONE  
DELLE RISORSE  
TARTUFIGENE DEL  
TERRITORIO**



# ***Università degli Studi Carlo Bo di Urbino*** ***antonella.amicucci@uniurb.it***



