



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE FORESTALI E AMBIENTALI

**Studio sulla popolazione microbica di una tartufaia:
indagine preliminare nella regione Marche**

Study on the microbial population of a truffle ground: preliminary
investigation in the Marche region

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
ANNA CRETONE

Relatore:
PROF.SSA LUCIA LANDI

Correlatore:
PROF. SERGIO MUROLO
DOTT. CRISTIANO PERONI

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

SOMMARIO

SOMMARIO	3
ELENCO DELLE FIGURE	5
ABSTRACT	8
RIASSUNTO.....	8
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE	11
1.1 Generalità sui funghi	11
1.2 La simbiosi micorrizica	12
1.3 Vantaggi della micorizzazione.....	15
1.4 Il genere <i>Tuber</i>	15
1.5 Piante tartufigene	19
1.6 Il pianello.....	19
1.7 Importanza economica del tartufo.....	25
1.8 Il tartufo e i batteri del suolo.....	27
1.9 Metagenomica.....	31
CAPITOLO 2 MATERIALI E METODI	36
2.1 Prelievo dei campioni	36
2.2 Liofilizzazione dei campioni.....	38
2.3 Estrazione del DNA	40
2.4 Sequenziamento Shallow whole-metagenome shotgun.....	40
CAPITOLO 3 RISULTATI	44
3.1 Risultati del sequenziamento	44
3.2 Distribuzione dei Phyla Batterici e Eucariotici	45
3.3 Distribuzione e clustering di generi e specie batteriche	47
3.4 Abbondanza relativa delle principali 25 specie batteriche.....	50
3.5 Analisi delle componenti principali (PCoA) delle specie batteriche.....	51
3.6 Distribuzione e clustering di generi e specie fungine.....	52
3.7 Abbondanza relativa delle principali 25 specie fungine	55

3.8 Analisi delle componenti principali (PCoA) delle specie fungine	56
3.9 Batteri: analisi dell'abbondanza differenziale delle specie.....	57
3.10 Annotazione funzionali dei geni: analisi comparativa dei matagenomi	61
CONCLUSIONI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BIBLIOGRAFIA	68
RINGRAZIAMENTI	68

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1: Organizzazione tassonomica dei funghi secondo Spatafora et al., (2016)	12
Figura 1-2: <i>Tuber melanosporum</i> Vittad	18
Figura 1-3: Radici di Leccio (<i>Quercus ilex</i> L., 1753) micorrizzate con <i>Tuber melanosporum</i> . (a e b) La presenza del fungo è evidenziata dalla forma clavata delle radici.	18
Figura 1-4: Pianta di <i>Q. pubescens</i> Willd micorrizzata dove è evidente la formazione del pianello ai nel suolo che circonda il tronco	24
Figura 2-1: Tartufaia dell'azienda agricola "Angellozzi tartuficoltura" di Angellozzi Emidio Esempio schema sperimentale dei campionamenti effettuati all'interno della tartufaia.	37
Figura 2-2: <i>Quercus pubescens</i> produttiva (P1).	38
Figura 2-3: Campioni di suolo posizionati nelle vaschette pronti per la liofilizzazione ...	39
Figura 2-4: Campioni di suolo posti in tubi sterili da 50 ml adatti per la conservazione a -80°C prima dell'estrazione del DNA.	40
Figura 2-5: schema del flusso di lavoro effettuato per l'analisi metagenomica.....	42
Figura 3-1: Schema di una 'reads' ottenuta da sequenziamento Illumina	44
Figura 3-2: Composizione della comunità microbica nei suoli di tartufaia: distribuzione dei phyla batterici.....	46
Figura 3-3: Composizione della comunità microbica nei suoli di tartufaia: distribuzione dei phyla eucariotici.....	47
Figura 3-4: Heatmap degli 80 generi batterici più numerosi individuate mediante il software Kraken2 e ottenuta usando il metodo di raggruppamento completo basato su una matrice di distanza euclidea. La gradazione dei colori dal verde al blu, indicando rispettivamente una minore o maggiore abbondanza generi. Il gradiente di colore da quindi informazioni sulla distribuzione delle abbondanze batteriche tra i diversi campioni analizzati. P = campioni suolo all'interno del pianello delle piante produttive), F= campioni suolo fuori pianello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.....	48

Figura 3-5: Heatmap delle prime 50 specie batteriche più numerose individuate mediante il software Kraken2 e ottenuta usando il metodo di raggruppamento completo basato su una matrice di distanza euclidea. La gradazione dei colori dal verde al blu, indicando rispettivamente una minore o maggiore abbondanza generi. Il gradiente di colore da quindi informazioni sulla distribuzione delle abbondanze batteriche tra i diversi campioni analizzati. P = campioni suolo all'interno del pianello delle piante produttive), F= campioni suolo fuori pianello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.....49

Figura 3-6: Il grafico rappresenta le 25 specie batteriche principalmente individuate mediante il software Kraken2. P = campioni suolo all'interno del pianello delle piante produttive), F= campioni suolo fuori pianello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.51

Figura 3-7: Analisi PCoA a livello di specie batteriche basata sulla dissomiglianza di Bray-Curtis. NOTA: gli assi X e Y mostrano la componente principale 1 (Coordinata 1) e la componente principale 2 (Coordinata 1) relative all'abbondanze e alla somiglianza delle popolazioni microbiche. La percentuale di variazione spiegata dalle coordinate principali tracciate è indicata sugli assi. Ogni punto rappresenta un singolo campione e i colori rappresentano diversi gruppi di campioni. P = campioni suolo all'interno del pianello delle piante produttive), F= campioni suolo fuori pianello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.52

Figura 3-8: Heatmap degli 80 generi fungini più abbondanti, individuati mediante il software Kraken2, e ottenuta usando il metodo di raggruppamento completo basato su una matrice di distanza euclidea. La gradazione dei colori dal blu al rosso, indicando rispettivamente una minore o maggiore abbondanza generi. La classificazione trofica viene descritta con l'ausilio del database FUNGuild che classifica i funghi in base alla loro modalità ecologica in Patogeno (P), Saprofita (S) e Simbionte (S). P = campioni suolo all'interno del pianello delle piante produttive), F= campioni suolo fuori pianello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.....53

Figura 3-9: Heatmap delle 50 specie fungine più abbondanti, individuati mediante il software Kraken2, e ottenuta usando il metodo di raggruppamento completo basato su una matrice di distanza euclidea. La gradazione dei colori dal blu al rosso, indicando rispettivamente una minore o maggiore abbondanza generi. La classificazione trofica viene descritta con l'ausilio del database FUNGuild che classifica i funghi in base alla loro modalità ecologica in Patogeno (P), Saprofita (S) e Simbionte (S). P = campioni suolo

all'interno del pianello delle piante produttive), F= campioni suolo fuori pianello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.....54

Figura 3-10: Il grafico rappresenta le 25 specie fungine principalmente individuate mediante il software Kraken2. P = campioni suolo all'interno del pianello delle piante produttive), F= campioni suolo fuori pianello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.56

Figura 3-11 Analisi PCoA a livello di specie fungine basata sulla dissomiglianza di Bray-Curtis. NOTA: gli assi X e Y mostrano la componente principale 1 (Coordinata 1) e la componente principale 2 (Coordinata 1) relative all'abbondanze e alla somiglianza delle popolazioni microbiche. La percentuale di variazione spiegata dalle coordinate principali tracciate è indicata sugli assi. Ogni punto rappresenta un singolo campione e i colori rappresentano diversi gruppi di campioni. P = campioni suolo all'interno del pianello delle piante produttive), F= campioni suolo fuori pianello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.57

Figura 3-12: Analisi dell'abbondanza differenziale dei taxa individuati nella tesi P rispetto alla tesi F, effettuata mediante edgeR con test statistico GLM. P = campioni suolo all'interno del pianello delle piante produttive), F= campioni suolo fuori pianello delle piante produttive.59

Figura 3-13: Analisi dell'abbondanza differenziale dei taxa individuati nella tesi P rispetto alla tesi N, effettuata mediante edgeR con test statistico GLM. P = campioni suolo all'interno del pianello delle piante produttive), N = campioni suolo di piante non produttive.60

Figura 3-14: Distribuzione e confronto delle categorie funzionali COG nei campioni P, F e N. Il grafico rappresenta le abbondanze relative dei 22 diversi COG, categorie funzionali secondo tre ampi gruppi funzionali ('Metabolism', 'Cellular Processing and Signaling' e 'Storage and processing'. P = campioni suolo all'interno del pianello delle piante produttive), F= campioni suolo fuori pianello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.62

ABSTRACT

In recent years, truffle cultivation need to deal with many problems, including climatic changes as well as the need to improve the productivity of mycorrhized plants. Bacterial communities play a central role in promoting mycorrhization, truffle development and maturation. However, information regarding the composition and abundance of the microbial community existing in the soil of a truffle ground in relation to productive and unproductive mycorrhized plants is still limited. In this work, a metagenomic study was carried out using the innovative Shallow-Whole-Metagenome Shotgun sequencing (S-WMS) technique investigating a productive area located in the south of the Marche region, near Roccafluvione (AP), planted with Downy Oak (*Quercus pubescens* Willd., 1805) plants, inoculated with *Tuber melanosporum* Vittad. The preliminary study involved soil sampling in November 2023 from 4 mycorrhizal plants that never entered production (N) and 4 productive plants, differentiating in the latter the soil inside (P) and outside the plateau (F). Based on the identified taxa and their abundance, significant differences emerged associated with the analyzed theses. In P soil , *T. melanosporum* dominates, while in the N soil samples the most abundant species belong to the genera *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria* and *Penicillium*, ubiquitous microorganisms with saprophytic or parasitic character, suggesting a competition between the species. In the F samples, these microorganisms are associated with endomycorrhiza of the genus *Rhizophagus*, which form symbiosis with the roots of the erbaceous present outside the plateau. Among bacteria, the genera *Bradyrhizobium* and *Microvirga*, suggested as ‘mycorrhizal helper’ are the most abundant in all soils but prevalent in F soil. Species of the genus *Blastococcus* and *Archangium*, prevail in P soil . This study provides preliminary information on the microbial composition populating the soils and suggests the microbial species mainly involved in the productive areas of a truffle ground.

RIASSUNTO

La tartuficoltura negli ultimi anni sta affrontando difficoltà crescenti associate ai cambiamenti meteorologici e alla necessità di migliorare la produttività delle piante micorrizzate. Le comunità batteriche svolgono un ruolo centrale nel promuovere la micorrizzazione, lo sviluppo e maturazione del tartufo. Tuttavia, le informazioni riguardanti la composizione e abbondanza della comunità microbica presente nel suolo di una tartufaia in relazione a piante micorrizzate produttive e improduttive sono ancora limitate. In questo lavoro è stato realizzato uno studio metagenomico mediante la tecnica innovativa 'Shallow-Whole-Metagenome Shotgun sequencing' (S-WMS) indagando un'area produttiva sita a sud della regione Marche, presso Roccafluvione (AP), impiantata con piante di Roverella (*Quercus pubescens* Willd., 1805), inoculate con *Tuber melanosporum* Vittad. Lo studio preliminare ha previsto il campionamento di suolo nel novembre 2023 da 4 piante micorrizzate che non sono mai entrate in produzione (N) e 4 piante produttive, differenziando in quest'ultime il suolo all'interno (P) e fuori pianello (F). In base ai taxa identificati e alla loro abbondanza sono emerse differenze significative associate alle tesi analizzate. Nel suolo P domina *T. melanosporum*, mentre nei campioni di suolo N le specie più abbondanti appartengono ai generi *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria* e *Penicillium*, microrganismi ubiquitari con carattere saprofitario o parassitario, suggerendo una competizione tra le specie. A questi microrganismi, nei campioni F si associano endomicorrize del genere *Rhizophagus*, che formano simbiosi con le radici della prateria presente fuori dal pianello. Tra i batteri i generi *Bradyrhizobium* e *Microvirga* suggeriti come 'mycorrhizal helper' sono i più abbondanti in tutti i suoli ma prevalenti in F. Specie del genere *Blastococcus* e *Archangium*, prevalgono in nel suolo P. Questo studio fornisce informazioni

preliminari sulla composizione microbica che popola i suoli e suggerisce le specie microbiche principalmente coinvolte nelle aree produttive di una tartufaia.

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 Generalità sui funghi

I funghi, anche detti Eumiceti, sono organismi complessi, eterotrofi, eucarioti che necessitano di ossigeno per sopravvivere. Essendo privi di clorofilla si alimentano di materia organica prodotta da altri organismi. Il regno dei funghi è stato classificato per prima volta nel 1817, dal botanico-entomologo-fisico tedesco Christian Gottfried Daniel Nees von Esenbeck (Nees) che propose per la prima volta, di inquadrare questi organismi viventi in un nuovo Regno a sé stante ma, prima di allora si riteneva che fossero piante primitive, oppure originatesi in seguito a processi degradativi e per tali ragioni furono classificati da Carlo Linneo, nel 1753 all'interno della classe delle piante. Fu soltanto nel 1968 che i funghi vennero ufficialmente elevati a rango di Regno, ad opera del biologo statunitense Robert Whittaker.

Oggi si ritiene che l'unico aspetto che i funghi condividono con le piante, a parte i caratteri comuni a tutti gli eucarioti, è la loro natura sessile e il tipo di crescita pluricellulare. Si conoscono più di 1.000.000 specie di funghi, e circa 1.200 nuove specie vengono descritte ogni anno. Più di un terzo di tutte le specie fungine appartengono al sottoregno Dikarya e la maggior parte di esse sono Ascomiceti. I Basidiomiceti sono un altro importante gruppo di funghi superiori nel sottoregno Dikarya, ma sono meno numerosi rispetto agli Ascomiceti. Entrambi i gruppi sono caratterizzati dalla presenza di strutture riproduttive specializzate chiamate ascocarpi negli Ascomiceti e basidiocarpi nei Basidiomiceti. (Spatafora et al., 2016).

La divisione Ascomycota costituisce il più grande gruppo finora conosciuto, questa divisione comprende oltre 32.000 specie, corrispondenti a circa il 40% di

quelle fino ad ora descritte (Spatafora et al.,2016) fra cui molti funghi ben noti ed economicamente importanti. La maggior parte delle muffe verdi, rosse e brune che causano danni alle derrate alimentari sono ascomiceti. Gli ascomiceti sono anche causa di varie e gravi malattie delle piante, tra cui l'oidio, che attacca principalmente le foglie; il cancro della corteccia del castagno causata dal fungo *Cryphonectria parasitica*, accidentalmente introdotto nel Nord America dal Giappone; e la grafiosi dell'olmo, causata da *Ophistoma ulmi* e dal più aggressivo *Ophistoma novo-ulmi*, causò la scomparsa di intere popolazioni di maestosi olmi in Nord America e in Europa.

Molti lieviti sono ascomiceti, come pure le spugnone e i tartufi.

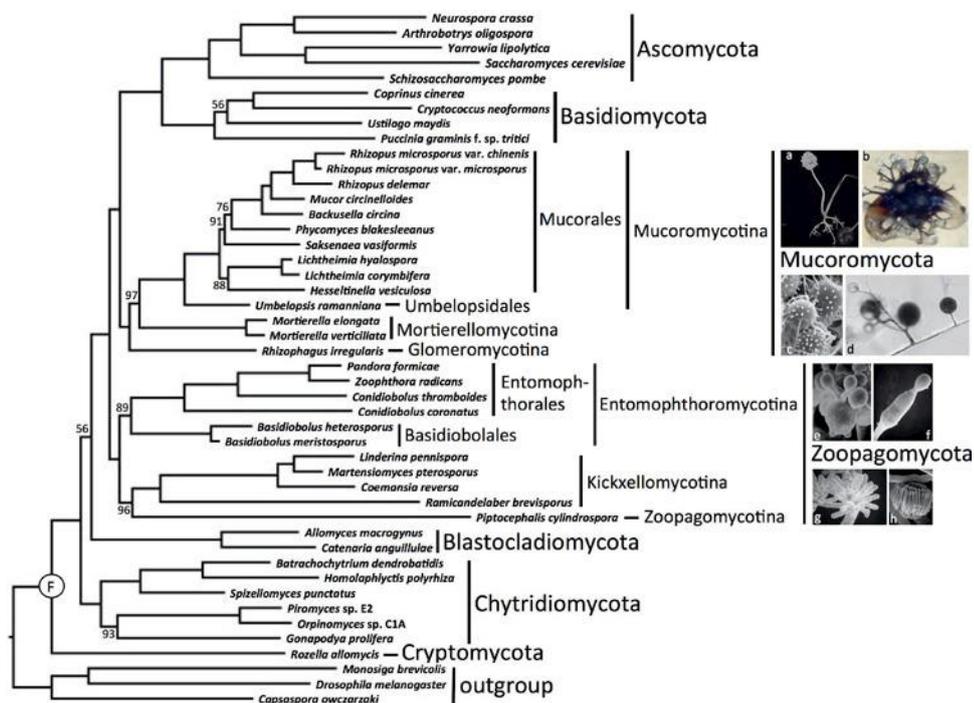


Figura 1-1: Organizzazione tassonomica dei funghi proposta da Spatafora et al. (2016).

La maggior parte dei funghi sono costituiti da un aggregato di filamenti strettamente associati. I filamenti fungini sono dette ife e la massa di ife è detta micelio. Tra le varie funzioni del micelio abbiamo la produzione di proteine, essenziali per l'allungamento delle ife le quali si accrescono dall'apice e con un'elevata velocità, tanto che un singolo organismo fungino può produrre più di un chilometro di nuove ife in 24 ore.

In virtù della loro rapida crescita e della forma filamentosa, i funghi hanno con l'ambiente circostante relazioni profondamente diverse rispetto a quelle di qualsiasi altro gruppo di organismi. Il rapporto superficie/volume nei funghi è molto alto, e questo significa che essi, come i batteri, si trovano in stretto contatto con l'ambiente. (Pérez-Pazos et al., 2024).

I funghi sono organismi chiave nel funzionamento degli ecosistemi e mentre noi possiamo ammirare il loro gran numero, la conoscenza della loro "diversità funzionale" è fondamentale per comprendere la loro importanza per la salute dell'ecosistema.

Nell'ambito dei bioriduttori o decompositori si ritrovano una miriade di organismi viventi che hanno il compito di degradare la materia organica proveniente dai livelli trofici precedenti. Tutti questi organismi non devono essere considerati come singoli elementi scollegati, ma come componenti di un sistema vitale complesso, dove gli organismi presenti intrecciano rapporti e relazioni sociali di vario genere ed interagiscono tra loro e con l'ambiente che li circonda, determinandone caratteristiche ed equilibri che contribuiscono a mantenerne la loro biodiversità. In questo contesto i funghi rivestono un ruolo fondamentale nei cicli naturali per le loro peculiari modalità di nutrimento che coinvolge la produzione di molti enzimi. Questa loro peculiarità li rende fondamentali per la degradazione e la mobilitazione dei recalcitranti composti organici del legno morto. I funghi non solo contribuiscono al riciclo dei nutrienti attraverso la loro decomposizione, ma anche riescono a trattenere i nutrienti all'interno della loro biomassa vivente nel suolo, riducendo così la perdita di nutrienti attraverso la lisciviazione. Il micelio nel suolo è una presenza molto importante, la biomassa fungina è infatti una fonte primaria di cibo per molti altri organismi (Holt et. al., 2024). Gruppi di funghi molto importanti hanno la capacità di effettuare una simbiosi con le radici delle piante superiori acquisendo da esse nutrimento e nel contempo fornendo alle piante nutrimenti essenziali.

1.2 La simbiosi micorrizia

La simbiosi è una stretta e duratura associazione tra organismi appartenenti a specie diverse. Sebbene alcuni funghi siano parassiti, molti di essi sono coinvolti in relazioni simbiotiche dette mutualistiche. Due di queste simbiosi mutualistiche, i licheni e le micorrize, sono state di straordinaria importanza nell'adattamento degli organismi fotosintetici agli ambienti terrestri. I licheni sono associazioni simbiotiche tra un fungo e una popolazione di alghe (filamentose o unicellulari) o ciano-batteri mentre la micorrizia è un'interazione simbiotica mutualistica tra funghi micorrizici e piante superiori e costituisce la forma di simbiosi più diffusa su scala globale; infatti, le più diffuse e importanti simbiosi mutualistiche del regno vegetale sono le micorrize (Smith e Read 1997).

La simbiosi micorrizica è stata osservata per la prima volta dall'italiano Gibelli (1879, 1883), che la considerò come uno stato patologico, successivamente solo il tedesco Frank (1885) dimostrò la natura simbiotica di queste strutture, a cui diede il nome di micorrize. Il termine micorriza deriva dal greco '*mykes*' = fungo e '*rhiza*' = radice. Queste strette associazioni simbiotiche mutualmente benefiche che si realizzano tra funghi e radici sono presenti nella maggior parte delle piante vascolari, sia selvatiche che coltivate. La maggior parte delle radici delle piante sono colonizzate da funghi micorrizici, in particolare è stimato che più del 90 % di tutte le specie di piante possono formare simbiosi con specie fungine appartenenti alle suddivisioni Glomeromycotina, Ascomycotina e Basidiomycotina (Bonfante and Anca, 2009; Bonfante and Genre, 2010; Bonfante and Venice, 2020).

In base al grado di simbiosi e alla posizione del fungo rispetto alle cellule radicali si possono distinguere due tipologie di relazioni tra pianta e fungo:

- Le ectomicorrize, in cui il fungo appartenente principalmente alle divisioni di Ascomycotina e Basidiomycotina, non penetra all'interno delle cellule vegetali, ma avvolge completamente l'apice radicale fino a formare un mantello, e lo scambio di sostanze nutritive tra fungo e pianta avviene in una struttura fungina che si insinua tra le cellule epidermiche e corticali, mantenendosi sempre all'esterno delle pareti cellulari, formando il reticolo di '*Hartig*'.

- Le endomicorrize, suddivisione Glomeromycotina, è caratterizzato da funghi il cui micelio penetra all'interno delle cellule corticali delle radici formando delle strutture note come arbuscoli dove avvengono gli scambi nutrizionali tra i due simbionti. La presenza di questo tipo di micorrize non è rilevabile a occhio nudo, ma sezionando la radice solo al microscopio e con l'ausilio di coloranti specifici.

Le endomicorrize sono le più comuni, trovandosi in circa l'80% delle piante vascolari; le ectomicorrize invece, sono tipiche delle piante forestali distribuite prevalentemente nelle regioni temperate. Tra queste vi sono le *Fagaceae*, le *Salicaceae* e le *Pinaceae* (Malloch, D. W., et al. 1980).

1.3 Vantaggi della micorizzazione

I benefici delle micorrize per le piante derivano principalmente dal miglioramento delle capacità di assorbimento delle radici, che diventano più efficienti grazie alla simbiosi con i funghi. La relazione tra fungo e radice si sviluppa in quella porzione di suolo denominato "rizosfera". Il termine "rizosfera" è stato coniato nel 1904 da Lorenz Hiltner (Linser et al., 2006) e si riferisce a una porzione di suolo circonda la radice e che viene di conseguenza direttamente influenzata dalle radici delle piante e dai microrganismi associati. Questa piccola area è considerata una zona ecologica ricca di nutrienti, microflora e microfauna. Tra i microrganismi che influenzano la rizosfera, i funghi micorrizici svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo delle piante. La penetrazione del fungo incrementa la dimensione della radice permettendo ad essa un'esplorazione più ampia del suolo.

I funghi micorrizici svolgono un ruolo fondamentale nell'ecosistema vegetale in quanto contribuiscono a migliorare lo stato nutrizionale della pianta ospite fornendo minerali essenziali specialmente fosforo, azoto, zinco, manganese e rame, aumentano l'assorbimento di acqua dal suolo e conferiscono resistenza allo stress e malattie (Bonfante and Genre, 2010; Mello and Balestrini, 2018; Lanfranco and Bonfante, 2022). In cambio di tutti questi vantaggi il fungo riceve dalla pianta ospite carbonio, lipidi e vitamine essenziali per la sua crescita. Questo scambio di nutrienti influenza i

processi chiave del suolo, il ciclo del carbonio e la salute delle piante influenzando fortemente gli ecosistemi vegetali e microbici (Shi, Jincan and Xiaolin, Wang and Wang, Ertao, 2023). Inoltre, la presenza del fungo fornisce una protezione efficace contro stress abiotici e parassiti, grazie a meccanismi fisici e biochimici (Bonfante e Venice, 2020; Weng et al., 2022).

Le micorrize possono essere considerate un'estensione del sistema radicale, contribuendo così a migliorare la resistenza allo stress idrico anche in condizioni di estrema aridità. Questo effetto è dovuto a vari fattori, tra cui l'aumento della conduttività idrica nella pianta, la riduzione della resistenza al flusso dell'acqua e, in particolare, il maggiore assorbimento dell'acqua da parte delle ife extraradicali che si estendono oltre la zona raggiunta dalle radici. È stato dimostrato che la conducibilità idrica del sistema suolo-pianta risulta migliore nelle piante micorrizzate (Bitterlich et al., 2018).

I funghi micorrizici, possono proteggere la pianta ospite tramite vari meccanismi, come la competizione con i patogeni per i siti di infezione e i nutrienti, la formazione di una barriera fisica intorno alle radici e l'induzione di meccanismi di difesa (Benjamin e Sikes, 2010; Miozzi et al., 2019). Il fungo può attivare geni che aiutano la resistenza a patogeni. In particolare, l'applicazione di funghi micorrizici è in grado di attivare nelle piante una resistenza nota come resistenza sistemica acquisita (SAR) o indotta (ISR), (Cameron et al., 2013; Duncan et al., 2013; Pozo et al., 2020). Alcuni enzimi idrolitici prodotti a seguito dell'infezione micorrizica, come chitinasi e β -glucanasi, svolgono un ruolo protettivo grazie alla loro attività antifungina efficace nei tessuti della pianta, non solo contro i patogeni radicali, ma anche contro quelli che attaccano la parte aerea e organismi sistemici come i fitoplasmi (Romanazzi et al., 2009).

I funghi micorrizici possono ridurre la gravità di alcune malattie biotiche causate da nematodi (Veresoglou e Rillig, 2012) e soprattutto da patogeni del suolo (*Sclerotium cepivorum*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Pythium* spp., ecc.) (Whipps, 2004), alterando la fisiologia dell'ospite e rendendo le radici più resistenti ai patogeni stessi. Si stima che le micorrize possano ridurre le malattie fungine tra il 55% e il 70% (Berdeni et al., 2018). In alcune associazioni tra fungo e pianta si osserva inoltre un aumento del

livello di lignificazione delle pareti cellulari dell'endoderma, dei tessuti vascolari e un accumulo di callosio, che crea una barriera contro la penetrazione dei patogeni (Moritz et al., 2018).

La simbiosi micorrizica permette al fungo di completare il proprio ciclo vitale e, nel caso delle ectomicorrize, di formare corpi fruttiferi. Dalle ectomicorrize, si sviluppano nuove ife che colonizzano il terreno circostante e le nuove radici della pianta o di altre piante vicine. Il ciclo biologico delle micorrize segue quello della pianta: in primavera, con la ripresa della crescita vegetativa, le micorrize riprendono a crescere, continuando per tutta l'estate, se le condizioni del suolo rimangono favorevoli. Durante l'inverno, le micorrize riducono la loro attività metabolica per sopravvivere alla stagione fredda, per poi riprendere a svilupparsi in primavera (Lima, 2009).

1.4 Il genere *Tuber*

Il genere *Tuber* comprende funghi Ascomiceti ectomicorrizici noti comunemente come tartufi, in grado di produrre ascocarpi (ascomi) che sono il frutto di una simbiosi tra il fungo e piante arbustive e arboree.

Uno degli esemplari più pregiati di questo genere è il *Tuber melanosporum* Vittad., conosciuto anche come tartufo nero pregiato o tartufo italiano. Questa specie può produrre un ascoma con un diametro variabile tra 2 e 12 cm. La forma è generalmente rotondeggiante, ma può diventare irregolare in relazione al suolo nel quale si sviluppa. Gli ascomi di maggiori dimensioni, possono raggiungere un peso compreso tra i 200 e i 300 grammi.

Il tartufo è costituito da una massa carnosa detta “gleba”, rivestita dal “peridio” una sorta di corteccia. Il peridio del *T.melanosporum* è di colore nero con zonature rugginose, mentre la gleba, compatta e soda, è attraversata da numerose venature biancastre ben definite. Nei tartufi immaturi, la gleba è biancastra, ma con la maturazione assume una colorazione nero-bruna, a volte tendente al violaceo o al

rossiccio. L'odore del tartufo nero pregiato è aromatico e intenso, con un sapore delicato e molto apprezzato.



Figura 1-2: Ascoma di *Tuber melanosporum*.

Il ciclo biologico delle specie del genere *Tuber* inizia con il rilascio di aschi e ascospore dagli ascocarpi maturi nel suolo. La germinazione delle spore è regolata da segnali chimici emessi dalle piante ospiti, che inducono lo sviluppo di un micelio primario aploide in grado di colonizzare le radici delle piante. La simbiosi che si instaura è caratterizzata da un avvolgimento delle ife fungine intorno agli apici radicali delle piante, formando un manicotto esterno e una rete ifale intercellulare, nota come reticolo di Hartig, nel tessuto corticale delle radici. Le radici micorrizzate assumono una forma clavata e spesso ramificata, (Figura 1-3).



Figura 1-3: Radici di Leccio (*Quercus ilex* L., 1753) micorrizzate con *Tuber melanosporum*. (a e b) La presenza del fungo è evidenziata dalla forma clavata delle radici dovuta alla formazione del 'mantello' di ife fungine (freccia rossa).

Quando la pianta ospite diventa produttiva, dai cordoni miceliari si differenziano i primordi degli ascomi. In questa fase iniziale, il primordio dipende dalla pianta ospite per il nutrimento, ma, con l'avanzare della maturazione, sembra acquisire un'autonomia nutrizionale, sviluppando una crescita di tipo saprofitico.

All'interno del carpoforo, lo sviluppo della gleba, che rappresenta il tessuto fertile, si completa grazie alla fertilizzazione tra miceli compatibili, portando alla differenziazione di aschi e ascospore per la disseminazione fungina. Il ciclo biologico dei tartufi è estremamente complesso e presenta ancora alcune fasi non del tutto chiarite. Basandosi sugli studi condotti principalmente sul *T. melanosporum*, è possibile identificare tre fasi principali: vegetativa, riproduttiva e simbiotica. Dopo un periodo di quiescenza, le spore disseminate nel terreno iniziano a germinare in condizioni pedoclimatiche favorevoli. Inizialmente, emettono un micelio mononucleato (micelio primario), che si accresce verso le radici giovani delle piante, formando le micorrize. Una volta che la pianta ospite raggiunge la maturità fisiologica, la micorriza cessa di crescere e si sviluppa il primordio del corpo fruttifero a seguito della gamia tra due miceli di 'mating type' diverso. Infine, il corpo fruttifero diventa indipendente dalla pianta e continua il suo sviluppo autonomamente, assorbendo nutrienti dal terreno fino alla completa maturazione. Quando l'ascocarpo raggiunge un diametro di 1 mm e un peso di circa 3 mg, esso presenta già un peridio formato e una gleba costituita da vene fertili e sterili.

1.5 Piante tartufigene

Le piante che stabiliscono simbiosi con il tartufo nero pregiato, *T. melanosporum*, sono generalmente *Quercus pubescens* Willd. (roverella), *Quercus ilex* L. (leccio), *Quercus cerris* L. (cerro), *Tilia platyphyllos* Scop. (tiglio), *Corylus avellana* L. (nociolo), *Ostrya carpinifolia* Scop. (carpino nero) e *Cistus* L. (cisto) (Giorgi et al. 2024).

Nelle regioni centrali la sua associazione più frequente è con il bosco di *Q. pubescens*, dove è spesso distribuito nella fascia esterna del bosco, detta anche mantello. In vivaio è possibile ottenere piante micorrizzate con *Tuber* spp.

appartenenti a quasi tutti i possibili ospiti (roverella, cerro, farnia, leccio, nocciolo, carpino nero, cisto, tiglio, pioppo, salice e pino).

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

Le piante che favoriscono la crescita dei tartufi sono alberi che vengono coltivati in vivaia specializzati. Queste piante formano una simbiosi con le specie pregiate di tartufo, ed è grazie alla loro presenza che gli impianti tartufigeni hanno successo. Negli ultimi anni, si è raggiunta una qualità elevata della micorrizzazione, il che può aver contribuito a una produzione più rapida dei tartufi. Nei primi impianti, in cui le piante non erano perfettamente micorrizzate, ci volevano almeno dieci anni o più per ottenere una produzione di tartufi. Tuttavia, negli impianti più recenti, si sono già segnalate produzioni a partire dal quarto inverno. (Bagnacavalli et al., 2012).

La coltivazione di piante micorrizzate rappresenta un eccellente esempio di come i risultati della ricerca scientifica vengano trasferiti sia all'ambito imprenditoriale pubblico che privato. I vivaisti hanno adattato le metodologie sperimentate nei laboratori per poterle applicare su larga scala. Attualmente, ogni vivaio dispone di tecniche specifiche, sebbene il protocollo di produzione sia abbastanza uniforme.

I principali punti della metodologia produttiva sono i seguenti:

- Mettere in contatto le radici giovani delle piante con le spore del tartufo che si desidera far crescere in simbiosi.

- Utilizzare tecniche di allevamento che favoriscano la formazione delle micorrize di tartufo e che impediscono o limitano la formazione di micorrize di altre specie di funghi.

Nell'apparato radicale, che è sempre ben sviluppato, si trovano numerosi apici radicali, di cui una buona percentuale è unita simbioticamente al tartufo che si intende coltivare. La presenza di numerosi apici micorrizzati permette di introdurre nel terreno un'elevata quantità di micelio di tartufo. Più micelio di tartufo viene introdotto nel terreno, maggiori sono le possibilità che altri apici sviluppino la simbiosi con il tartufo, favorendo la produzione. Inoltre, la pianta di tartufo di qualità è priva di micorrize prodotte da funghi estranei che potrebbero diventare concorrenti per il tartufo in coltivazione. La scelta di una pianta di tartufo di qualità da coltivare in un determinato terreno è fondamentale per ottenere risultati positivi nella coltivazione della tartufaia.

Le plantule nelle quali la micorizzazione non ha avuto successo non crescono o crescono molto stintamente rispetto a quelle ben micorrizzate. Con gli anni queste differenze tendono a diminuire, ma inizialmente possono pregiudicare anche l'inizio della raccolta dei corpi fruttiferi.

In generale, *T. melanosporum* è meglio adattato a boschetti radi di ambienti collinari con scarsa o nulla vegetazione di sottobosco, in terreno permeabili (calcareo- breccioso con argilla non superiore al 40%) ma sufficientemente compattato da favorire lo sviluppo delle radici delle piante in superficie. Spesso, all'impianto di una tartufaia la correzione con calcare è una delle operazioni agronomiche più necessarie, così dicasi per l'importanza della disponibilità di acqua, che ha suggerito in tartufaie sia di nuovo impianto che datate (in Piemonte e nelle Marche) di installare impianti d'irrigazione a goccia, con benefici diretti sulle produzioni unitarie anche in annate avverse. I fattori pedo-climatici e idro-geografici, oltre a quelli legati alla pianta, comportano che ci siano anche importanti differenze nella distribuzione geografica dei tartufi; infatti, il tartufo nero pregiato è rivenuto sono nell'Eurpoa meridionale-occidentale (Francia, Itali, Spagna). (Mello et al., 2006).

1.6 Il pianello

Alcune specie appartenenti al genere *Tuber* producono intorno alla pianta ospite una zona completamente priva di vegetazione o scarsamente inerbita che prende il nome di pianello (o brûlé in francese o burn in inglese). Quest'area, di norma di forma circolare, può essere pluriennale o no. È generalmente di dimensioni molto variabili, si accresce con le dimensioni dei capillari radicali della pianta ospite che portano le micorrize, con una tendenza ad espandersi verso l'esterno di 10-15 cm ogni anno. Lo sviluppo maggiore delle micorrize si può osservare alla periferia dell'area bruciata o all'esterno della stessa dove è presente la vegetazione erbacea. La formazione del pianello è influenzata da fattori quali il clima, principalmente la piovosità, e il periodo dell'anno. All'interno è presente una scarsa vegetazione tipica di ambienti aperti, secchi e soleggiati. I cambiamenti della composizione erbacea nel pianello sembrano associati alla produzione di sostanze fitotossiche, metaboliti prodotti da alcune specie di *Tuber*, in particolar modo *T. melanosporum*, *T. aestivum* e *T. indicum*, che influenzano la copertura erbacea e le radici della pianta ospite (Lanza et al., 2004; Pacioni, 1991). Pacioni (1991) ha dimostrato l'influenza negativa di tre aldeidi (2-metilpropanale, 2-metilbutanale e 3-metilbutanale) e due alcoli (2-metilbutanolo e 3-metilbutanolo) estratti da tartufi maturi, sulla germinazione dei semi di alcune piante coltivate e sullo sviluppo di alcuni funghi e batteri della rizosfera. Sono fitotossici anche alcuni aminoacidi e, in generale, alcune sostanze, sia volatili che solubili.

La presenza del pianello è un segno che le specie di tartufo, presenti nel sottosuolo, sono attive, anche se non è indice della sicura presenza di ascocarpi. L'area occupata dal pianello si accresce all'estendersi delle dimensioni della pianta ospite e dell'estensione del micelio. La stessa produzione di corpi fruttiferi aumenta all'aumentare dell'area del pianello. I meccanismi della formazione del pianello non sono ancora completamente conosciuti, ma questo fenomeno inizia quando le radici micorrizzate della pianta ospite si avvicinano alla superficie (in generale 10-15 cm sotto il livello della superficie). Le alterazioni, all'interno del pianello, create dal tartufo sono (Menta et al., 2014):

1. Innalzamento del pH a valori compresi tra il 7.5 e 8.2 (García-Montero et al., 2014);
2. Diminuzione del carbonio organico (García-Montero et al., 2014);
3. Diminuzione della sostanza organica;
4. Riduzione dell'umidità.

Queste ultime tre conseguenze possono essere dovute principalmente alla scarsa copertura vegetale che riduce l'apporto di materiale da degradare al suolo, con conseguente diminuzione di sostanza organica e carbonio organico, e con la mancanza di copertura durante l'insolazione estiva che facilita lo stress idrico. García-Montero et al. (2009) hanno inoltre evidenziato come le dimensioni dell'area del pianello sembrerebbero essere correlate alla percentuale di carbonato attivo presente negli orizzonti superficiali (viene considerato carbonato attivo quella frazione di carbonato di calcio con dimensioni inferiori ai 50 μm , suscettibile di rapida mobilizzazione e chimicamente molto attiva). Il micelio fungino è in grado di acidificare la porzione di suolo intorno alla zona di micorrizzazione della pianta ospite, emettendo ioni H^+ per acquisire dal terreno ioni K^+ . Questa acidificazione provoca lo scioglimento di carbonato di calcio e un conseguente aumento di carbonato attivo. L'aumento nel suolo di questo ultimo provoca a sua volta un aumento del pH, che comporta un aumento degli ioni HCO_3^- e Ca^{2+} , questo, a cascata, porta all'insolubilizzazione di elementi come Al, Co, Cu, Fe, Zn, e Mn. Questa maggiore concentrazione di carbonato attivo nel suolo induce, nelle piante presenti nel pianello, uno stato di clorosi (denutrizione). La clorosi si manifesta mediante l'effetto inibente la crescita e la germinazione di altre piante all'interno del pianello. Inoltre, tale stato sulla pianta ospite produce un aumento del bisogno di risorse trofiche, che vengono assorbite attraverso micorrize; questo stimolerà la crescita del micelio fungino, che di conseguenza tornerà ad incrementare la concentrazione di carbonato attivo nel suolo. In questo modo il micelio innesca un meccanismo di feedback vantaggioso per l'aumento della produzione di corpi fruttiferi (García-Montero et al., 2009). Anche Castrignanò et al. (2000), partendo dall'ipotesi che il pianello potesse presentare modificazioni di tipo fisico-chimico, con uno studio confermarono che la presenza di copertura erbacea nell'area esterna al pianello stabilizza la struttura del suolo, favorendo la presenza di aggregati di

dimensioni maggiori rispetto all'area interna, che di 26 conseguenza risulta più sensibile agli effetti disgreganti degli agenti atmosferici, più incoerente, poroso e areato.



Figura 1-4: Pianta di *Q. pubescens* micorizzata dove è evidente la formazione del pianello nel suolo che circonda il tronco

1.7 Importanza economica del tartufo

L'importanza economica internazionale dei tartufi, testimoniata anche dal recente interessamento e dagli ingenti investimenti in ambito tartuficolo di paesi quali l'Australia, gli Stati Uniti e la Nuova Zelanda, è in costante crescita (<https://www.atlasbig.com/en-us/countries-mushroom-truffle-production>). L'Italia rappresenta, assieme alla Francia, e più recentemente anche alla Spagna, una delle aree geografiche più importanti, riconosciuta a livello mondiale, per la produzione e la commercializzazione dei tartufi. Nel nostro paese vengono commercializzati ufficialmente ogni anno circa 200 quintali di tartufi che vengono per la maggior parte esportati negli Stati Uniti, in Giappone, Germania, e Svizzera (Pampanini et al., 2012). Mentre la Francia è il principale produttore ed esportatore del tartufo nero pregiato (*T. melanosporum*), in Italia viene maggiormente raccolto e commercializzato il tartufo bianco pregiato (*T. magnatum*), che ha un elevatissimo valore commerciale (Iotti et al., 2014; Pieroni, 2016).

L'Italia è il Paese europeo che vanta la presenza del maggior numero di specie di tartufi spontanei eduli. Le specie che possono essere raccolte e commercializzate in Italia, secondo la Legge quadro nazionale n. 752/85 e sue successive modificazioni (n. 162/91), sono:

- 1) *Tuber magnatum* Pico, detto volgarmente tartufo bianco;
- 2) *Tuber melanosporum* Vittad., detto volgarmente tartufo nero pregiato;
- 3) *Tuber brumale* var. *moschatum* De Ferry, detto volgarmente tartufo moscato;
- 4) *Tuber aestivum* Vittad., detto volgarmente tartufo d'estate o scorzone;
- 5) *Tuber uncinatum* Chatin, detto volgarmente tartufo uncinato [1];
- 6) *Tuber brumale* Vittad., detto volgarmente tartufo nero d'inverno o trifola nera;
- 7) *Tuber Borchii* Vittad. o *Tuber albidum* Pico, detto volgarmente tartufo bianchetto o marzuolo;
- 8) *Tuber macrosporum* Vittad., detto volgarmente tartufo nero liscio;
- 9) *Tuber mesentericum* Vittad., detto volgarmente tartufo nero ordinario.

Nel panorama italiano, l'Umbria e l'Abruzzo sono le Regioni produttrici più importanti, rappresentando complessivamente circa il 57% della produzione italiana in termini quantitativi. Per quanto concerne, invece, il totale nazionale, le aree appenniniche del centro (Marche, Lazio, Umbria, Toscana) rappresentano il 53%, seguite dal Sud con il 39% e dal Nord con l'8% (ISTAT, 2023). Da alcune stime

empiriche si ritiene tuttavia che la produzione reale di tartufo in Italia sia molto superiore, come evidenziato nell'ambito del progetto di ricerca Fitava finanziato dalla Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione nel Settore Agricolo-Forestale della Regione Toscana e dall'Agenzia per i Servizi di Sviluppo Agricolo - Regione Abruzzo.

Negli anni 70 viene descritta l'Italia come la realtà più importante a livello mondiale per la produzione, trasformazione e commercializzazione del tartufo insieme alla Francia, la cui storia economico-commerciale vanta radici lontane. Lungo le filiere di commercializzazione dei tartufi, il fresco rappresenta la parte più consistente del mercato.

Nelle Marche, la coltivazione dei tartufi non solo rappresenta un forte impulso all'economia delle aree interne, fornendo redditi significativi, ma contribuisce anche ad uno sviluppo sostenibile, attuata senza l'impiego di fertilizzanti chimici o, peggio, di diserbanti nocivi per l'ambiente. Pochi sanno che la moderna tartuficoltura nasce proprio nelle Marche, sia perché nel 1932 vi è stata impiantata la prima tartufaia "coltivata", ma soprattutto perché negli anni 50- 60 sono state realizzate ad opera del dr. Mannozi - Torini (Ispettore Regionale del Corpo Forestale dello Stato) numerose tartufaie coltivate, soprattutto tartufo nero pregiato, di cui alcune tuttora in produzione, a dimostrazione di una indubbia vocazione del territorio marchigiano alla coltivazione, oltre che alla produzione spontanea per le favorevoli condizioni climatiche e pedologiche.

Negli ultimi anni si è assistito, grazie agli aiuti comunitari del PSR-Regione Marche 2000-2006, ad un recupero di molti terreni abbandonati nel comprensorio ascolano. Ciò ha determinato tanto un aumento del valore fondiario quanto un maggior interesse verso la produzione e promozione del tartufo da parte di agricoltori ed Enti locali. Il recupero dei terreni incolti o sottoutilizzati, altrimenti lasciati al naturale rimboschimento, ha innescato un fenomeno indiretto quale la modificazione e l'aumento della bellezza del paesaggio montano. Paesaggio che pur fortemente caratterizzato nel suo aspetto fisico, è rappresentativo dell'adattamento dell'uomo alle condizioni imposte dalla natura, fino al punto di costituire un'unità inscindibile con l'agricoltura e le attività agricole. I territori montani, fortemente caratterizzati da potenzialità inespresse, dovranno fare della tartuficoltura uno dei settori portanti

dello sviluppo di un'economia fino ad oggi considerata apparentemente povera. La coltivazione del tartufo nero pregiato del Piceno, pertanto, rappresenta e rappresenterà una realtà innovativa ed un motore trainante per lo sviluppo dell'economia locale. I tartufi e la tartuficoltura generano attività dirette (vivai, laboratori di analisi, punti vendita, ricerca e sperimentazione ecc...), ma anche indirette (ristorazione, mercati e feste locali che hanno un effetto d'invito a scoprire i prodotti provinciali e favoriscono un turismo di fuori stagione). Queste attività hanno un'importanza rilevante per dinamizzare le aree montane interne della provincia tradizionalmente produttrici di tartufi, presentano un sicuro interesse per lo sviluppo dei territori nella loro pianificazione, ma anche nella loro promozione e nella loro economia.

A livello della regione Marche, il territorio del comune di Roccafluvione si trova a 299 m.s.l. Le caratteristiche orografiche e climatiche, permettono lo sviluppo di tutte le specie di tartufi. Da diverso tempo ricopre notevole interesse ed importanza la tartuficoltura con la coltivazione principale del Tartufo Nero Pregiato che ha permesso di recuperare aree agricole marginali o abbandonate, permettendo così una nuova cura del territorio.

1.8 Il tartufo e i batteri del suolo

Il suolo è l'habitat d'elezione dei funghi, le comunità microbiche in esso presenti potrebbero avere un impatto nella colonizzazione delle radici delle piante da parte dei funghi micorrizici e alterare gli effetti che i funghi hanno sulla crescita della pianta stessa (Piculell, 2008). Alcuni batteri presenti nella rizosfera sono in grado di favorire l'instaurarsi della micorrizzazione e di stimolare la capacità di infezione fra fungo e pianta (Frey-klett et al., 2005). Una ricerca condotta da Hodge et al. (2000), che riguarda le micorrize arbuscolari, dimostra che la comunità microbica del suolo è in grado di influenzare la crescita del fungo e l'instaurazione del rapporto simbiotico con la pianta ospite in maniera positiva, negativa o neutra.

Alcune specie batteriche sono benefiche per i funghi, promuovendo l'insediamento di micorrize e lo sviluppo del corpo fruttifero (Aspray et al., 2006, Frey-Klett et al., 2011; Giorgi et al., 2024), altre sono specie patogene e possono controllare la sporulazione (Partida-Martinez e Hertweck, 2005; Benucci e Bonito, 2017) o avere un effetto dannoso sullo sviluppo del micelio (Barbieri et al., 2005). In particolare, gli effetti positivi indotti dalla componente microbica si esplicano in una maggior crescita del micelio fungino e in un aumento della capacità iniziale del fungo di colonizzare le radici della pianta, contribuendo quindi a migliorare lo sviluppo e il funzionamento della simbiosi micorrizica. Gli effetti negativi sul fungo si traducono con la riduzione del numero di spore germinanti, della lunghezza delle ife, del grado di colonizzazione della radice della pianta ospite.

Queste interazioni riguardano anche le specie *Tuber*, che sono a stretto contatto con i microrganismi durante tutto il loro ciclo di vita. In effetti, i tartufi ospitano e interagiscono con complesse comunità microbiche di batteri, lieviti e funghi filamentosi, nonché virus (Splivallo et al., 2015, 2019; Vahdatzadeh et al., 2019; Benucci e Bonito, 2017).

I batteri possono colonizzare pesantemente gli ascocarpi del tartufo, sia i tessuti interni (gleba) che la superficie (peridio), raggiungendo una densità da milioni a miliardi di cellule per grammo (peso secco; Splivallo et al., 2015, 2019; Vahdatzadeh et al., 2019). Peridio e gleba sembrano attrarre specifici generi batterici (Barbieri et al., 2016), che sembrano essere selezionati dalle comunità del suolo durante la fase iniziale di formazione del tartufo. Infatti, si ritiene che i batteri del suolo colonizzino i primordi di *Tuber* prima che avvenga la differenziazione dei tessuti ascocarpici, quando il primordo è direttamente a contatto con il suolo. Successivamente, dopo la differenziazione del peridio, i batteri rimarrebbero intrappolati nella gleba, in parte protetti dagli scambi con il suolo dal peridio che, al contrario, rimane a contatto con il terreno durante tutto lo sviluppo dell'ascocarpo (Antony-Babu et al., 2014; Monaco et al., 2020).

Molteplici fattori possono influenzare la composizione delle comunità microbiche associate al tartufo. Diversi studi hanno evidenziato variazioni nella struttura del microbiota correlate alle diverse specie di *Tuber*, in relazione agli stadi del ciclo vitale del fungo (ad esempio, micorrize vs. corpi fruttiferi; gleba vs. peridio), al

periodo di conservazione, al sito di raccolta, alla stagione di raccolta e alle condizioni ambientali (Vahdatzadeh et al., 2015; Monaco et al., 2020; Niimi et al., 2021; Sillo et al., 2022). Pertanto, le specie di *Tuber* forniscono diversi microhabitat che ospitano comunità microbiche complesse e mutevoli, coinvolte in numerose funzioni. In particolare, i batteri sembrano svolgere un ruolo centrale nei complessi processi biologici di segnalazione e scambi di nutrienti che coinvolgono ife, ectomicorrize e ascocarpi (Barbieri et al., 2016). In cambio di acqua e nutrienti, producono biostimolanti (ad esempio, fitormoni e specifici amminoacidi), promuovono la crescita del micelio e la formazione di ectomicorrize (Frey-Klett et al., 2007) e partecipano allo sviluppo e alla maturazione dei corpi fruttiferi del tartufo (Antony-Babu et al., 2014; Amicucci et al., 2018). I batteri possono migliorare la nutrizione fungina (sia del primordio che dell'ascocarpo sviluppato) aumentando la disponibilità di alcuni elementi (N, P, micronutrienti) attraverso la loro attività di fissazione dell'azoto, trasformazione chimica, solubilizzazione del fosfato e produzione di composti chelanti (Pavić et al., 2011, 2013). Inoltre, alcuni taxa batterici potrebbero essere coinvolti nella germinazione delle spore e nell'apertura degli aschi e nel rilascio delle ascospore grazie alle loro attività cellulolitiche e chitinolitiche (Pavić et al., 2011); altri inibiscono/contrastano la crescita di patogeni e funghi contaminanti producendo sostanze antimicrobiche. I microrganismi sono anche in parte responsabili dell'aroma del tartufo poiché sintetizzano composti volatili solforati che, oltre a determinare le proprietà organolettiche dei corpi fruttiferi, attraggono i mammiferi. In questo modo i batteri prendono parte indirettamente alla disseminazione delle spore del tartufo, confermando il loro ruolo chiave nel ciclo vitale del fungo (Splivallo et al., 2015; Splivallo e Ebeler, 2015).

Il ruolo svolto dal microbiota del tartufo nella maturazione del corpo fruttifero, nella formazione dell'aroma e nella potenziale fissazione dell'azoto è stato segnalato per *Tuber melanosporum* Vittad., *T. magnatum* T. *borchii* e *T. aestivum* (Frey-Klett et al., 2007; Pavić et al., 2013; Vahdatzadeh et al., 2015; Mello e Zampieri, 2017). È stato ipotizzato che la colonizzazione del tessuto della gleba da parte del microbiota del suolo possa verificarsi prima della differenziazione del peridio, quando il primordio (un pellet miceliare giallastro) è a stretto contatto con il suolo (Antony-Babu et al., 2014). Dopo questo processo iniziale, specie microbiche selezionate sono

state intrappolate nell'ascocarpo durante lo sviluppo del primordio e quindi protette dallo scambio del suolo circostante dal peridio (Antony-Babu et al., 2014). È stata osservata una diminuzione della diversità batterica nei corpi fruttiferi rispetto al suolo circostante, suggerendo così che il microbiota può essere selezionato ed escluso dalla colonizzazione degli ascovati. Tra tutti i *phyla* batterici identificati nei corpi fruttiferi del tartufo, batteri appartenenti al gruppo dei Proteobacteria sembra essere il più rilevante, seguito da Actinobacteria e Firmicutes (Antony-Babu et al., 2014; Benucci e Bonito, 2017; Niimi et al., 2021). In *Tuber spp.*, *Bradyrhizobium* è stato trovato come il genere più abbondante, ed è stato ipotizzato che potrebbe probabilmente essere collegato alla capacità di fissare l'azoto tipica dell'ordine *Rhizobiales* (Gryndler et al., 2013). Mello et al. (2017) hanno studiato la composizione microbica del suolo in aree in cui si trovano corpi fruttiferi di *T. melanosporum* per definire quali specie potrebbero essere state sottoposte a pressione selettiva nelle interazioni con il fungo. I dati di metagenomica hanno mostrato che i generi più abbondanti erano *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus* e *Flavobacterium*. La presenza di *Actinobacteria* è confermata anche da altri studi (Pavić et al., 2013), e *Actinobacteria* è stato collegato a un presunto coinvolgimento nell'assimilazione dell'azoto. L'analisi della diversità microbica nel corpo fruttifero di *T. melanosporum* ha mostrato che gleba e peridio erano colonizzati da batteri diversi (Antony-Babu et al., 2014). Nel peridio, i *phyla* più abbondanti erano *Actinobacteria*, *Acidobacteria* e *Planctomycetes*, che erano assenti nella gleba. Durante il processo di maturazione, all'interno dell'ascocarpo, gleba e peridio hanno mostrato un andamento diverso in termini di presenza di comunità batteriche: i *bacteroidetes* sono aumentati nel peridio e diminuiti nella gleba, mentre i *Firmicutes* sono rimasti stabili nel peridio e sono aumentati nella gleba. *Bradyrhizobium* è risultato essere il genere dominante nella gleba (Antony-Babu et al., 2014). L'analisi dell'ibridazione fluorescente in situ (FISH) (Antony-Babu et al., 2014) ha dimostrato che la colonizzazione batterica si è verificata specificamente nelle ife della gleba ma non negli aschi.

1.9 Metagenomica

La metagenomica, chiamata anche genomica ambientale, analizza pool di DNA o di RNA in un campione ambientale contenente organismi che non sono mai stati isolati e identificati. Proprio come il contenuto genetico di un organismo è il suo genoma, il contenuto totale degli organismi che vivono in un ambiente è il suo metagenoma. Oltre alle analisi metagenomiche basate sul sequenziamento nel DNA, per esplorare i profili di espressione genetica delle comunità microbiche naturali possono essere usate le analisi basate sull'RNA o sulle proteine. Con la tecnologia disponibile oggi, questi studi possono essere eseguiti su singole cellule. (Madigan M. et al. 2016). Le tecniche molecolari utilizzate per studiare la biodiversità del microbioma includono metodi di sequenziamento ad alta efficienza e comprendono: 1) *'DNA metabarcoding'*; 2) metagenomica *'shotgun'*; 3) metagenomica funzionale.

Il *'DNA metabarcoding'* permette di valutare la composizione tassonomica globale di gruppi specifici (come batteri o funghi) in un qualsiasi campione, basandosi sull'amplificazione selettiva di regioni ipervariabili comuni, chiamate *'DNA barcode'* (ad esempio, regioni variabili dell'rRNA 16S per i batteri, o regioni ITS del DNA ribosomale per i funghi). Il *'Whole-Metagenome Shotgun Sequencing'* (WMS), che implica il sequenziamento completo e l'annotazione delle sequenze di acidi nucleici ottenute, consente di rilevare la diversità tassonomica e funzionale di un campione o ambiente specifico. La metagenomica funzionale, infine, permette di esplorare il potenziale funzionale e metabolico dei genomi microbici attraverso screening funzionali su vasta scala.

Negli ultimi anni, il sequenziamento WMS è diventato sempre più popolare come metodo per l'analisi genomica, poiché consente di esaminare l'intera comunità microbica presente in un campione, fornendo una visione globale che va dalla diversità filogenetica alla totalità dei geni e alle vie metaboliche all'interno della comunità. (Chen e Pachter, 2005).

Il DNA estratto viene utilizzato per creare librerie contenenti frammenti del genoma provenienti da un mix variegato di specie, ceppi e sottopopolazioni (Tringe e Rubin, 2005). Dopo l'estrazione, il DNA viene frammentato e sequenziato attraverso

tecnologie di sequenziamento ad alta velocità, come la tecnologia Illumina. I dati ottenuti dal sequenziamento vengono successivamente assemblati con metodi computazionali e confrontati con database di riferimento per identificare i geni funzionali e le sequenze di DNA presenti nel campione (Wooley et al., 2010).

La formazione e il successivo riassetto dei frammenti genomici offrono una copertura del genoma che è quasi uniforme. Tuttavia, la presenza di errori di sequenziamento, che possono introdurre sequenze non genomiche o ripetitive, complica il lavoro dei bioinformatici e può portare a errori nel riassetto (Quince et al., 2017).

L'analisi metagenomica è in grado di fornire dettagli approfonditi sulla diversità e sulle funzioni dei microrganismi presenti in un determinato ambiente. La ricerca sul microbioma in vari habitat sta diventando sempre più rilevante, con un crescente numero di studi anche nel settore agrario (Abdelfattah et al., 2016; Patriarca, 2019). Tuttavia, l'identificazione dei microrganismi chiave e delle loro funzioni richiede spesso ampi studi, a causa dell'elevato numero di specie e geni coinvolti, e delle notevoli variazioni sia intra-individuali che inter-individuali.

L'analisi metagenomica nota come 'Shallow Whole-Metagenome Shotgun Sequencing' (S-WMS) rappresenta un'alternativa valida al WMS, che, per via dei suoi alti costi, viene attualmente impiegato solo per un numero limitato di campioni. Studi recenti hanno dimostrato che la tecnica S-WMS produce minori variazioni tecniche rispetto al sequenziamento 'barcoding' 16S per gli studi sul microbioma, offrendo al contempo una maggiore riproducibilità e una copertura più ampia nei database di riferimento (Xu et al., 2021; La Reau et al., 2023).

Di conseguenza, la tecnologia S-WMS colma il divario tra il WMS e il sequenziamento dell'amplicone 16S/18S/ITS. Questo metodo fornisce informazioni tassonomiche sul DNA genomico totale di tutti gli organismi presenti in un campione, evitando la necessità di isolare e coltivare i microrganismi. Questo è un aspetto cruciale, poiché quasi il 99% dei microrganismi non può essere coltivato in laboratorio. Sebbene il WMS rimanga il punto di riferimento per l'analisi del microbioma ad alta risoluzione, l'S-WMS si presenta come un'alternativa efficace al sequenziamento dell'amplicone. Utilizzando la tecnologia NGS, l'S-WMS fornisce una tassonomia a livello di specie attraverso vari taxa, riducendo al minimo o

eliminando la distorsione causata dalla PCR e non essendo limitato dalla regione di amplificazione. Uno dei principali vantaggi dell'S-WMS è la capacità di sequenziare più microrganismi in un'unica corsa senza doverli isolare e coltivare. Inoltre, rispetto all'analisi metagenomica basata su ampliconi PCR, l'S-WMS presenta un bias limitato poiché non richiede l'amplificazione di regioni target specifiche per procarioti o eucarioti. I risultati del sequenziamento, quindi, offrono una visione completa della diversità e della composizione microbica.

SCOPO DELLA TESI

Le Marche sono una delle regioni italiane che vanta antiche tradizioni nella raccolta e consumo dei tartufi, tanto da farne un prodotto simbolo del territorio delle aree montane dell'entroterra. Tuttavia la produzione di tartufo nero pregiato (*Tuber melanosporum* Vittad.) oggi avviene principalmente all'interno di impianti arborei coltivati, e non più unicamente in tartufaie spontanee. Negli ultimi anni la produzione di tartufo in ambienti naturali è calata considerevolmente, a causa principalmente dei mutamenti climatici che ne minacciano la produzione. Quindi il calo produttivo rischia di essere sempre più condizionato da fattori esterni difficilmente controllabili. Alla luce di tutto ciò è quindi corretto affermare che il futuro del tartufo è nella tartuficoltura. In particolare la crescente domanda di mercato del tartufo nero pregiato, insieme al calo della sua produzione naturale, ha portato a un crescente interesse per le tecniche di coltivazione e ha incoraggiato i tartufai e i ricercatori ad indagare più a fondo i fattori che potrebbero influenzare e migliorare la produttività. In questo contesto, le comunità microbiche svolgono un ruolo centrale. Negli ultimi anni, infatti, sta suscitando sempre più attenzione l'ipotesi di un possibile legame tra la composizione delle comunità microbiche e la produttività delle tartufaie. E' noto che i corpi fruttiferi sono abitati da una vasta comunità batterica la cui funzione non è del tutto nota. La piena comprensione dei fattori che influenzano il ciclo vitale del tartufo e favoriscono lo sviluppo dei corpi fruttiferi è di fondamentale importanza. Tra questi fattori, le comunità batteriche sembrano svolgere un ruolo fondamentale. In questo lavoro di tesi abbiamo analizzato le comunità microbiche che abitano il suolo di una tartufaia collocata in provincia di Ascoli Piceno in un'area vocata alla coltivazione del tartufo nero pregiato con lo scopo di comprendere se esiste una correlazione tra taxa microbici e produttività delle tartufaie. In dettaglio è stato affrontato uno studio metagenomico

confrontando le comunità fungine e batteriche presenti nei suoli di piante di roverella micorizzate con *T. melanosporum* produttive e improduttive. Si tratta di una indagine preliminare che fornirà preziose informazioni utili per migliorare la produttività delle piante tarufigene.

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

2.1 Descrizione della tartufaia

In questa tesi è stato condotto uno studio di metagenomica utilizzando la tecnologia S-WMS (*'Shotgun Metagenomics Sequencing'*) per analizzare la variabilità della comunità microbica presente nel suolo di una tartufaia.

Si tratta di un impianto per la produzione di tartufo nero pregiato, *Tuber melanosporum* Vittad., situata presso Roccafluvione (AP), un comune incluso in area della regione Marche vocata alla coltivazione del tartufo. La tartufaia di proprietà dell'azienda agricola "Angellozzi tartuficoltura" di Angellozzi Emidio, si estende su un'area di 50 ettari ed è impiantata con la specie *Quercus pubescens*, comunemente nota come Roverella utilizzata come pianta ospite.

L'impianto risale a nove anni fa, e il suolo su cui si ritrova è caratterizzato da una composizione di marna arenacea. Nel complesso la tartufaia è caratterizzata da tre principali tipologie di suolo, che variano in base all'altitudine: nella parte alta della tartufaia prevale un suolo argilloso, a metà collina il suolo presenta una composizione mista di argilla e sabbia, mentre nella parte bassa si riscontra un suolo prevalentemente sabbioso.

Lo studio oggetto di questa tesi si è sviluppato prendendo in considerazione piante collocate nella zona centrale della tartufaia.

2.2 Prelievo dei campioni

Il prelievo di suolo è stato effettuato il 27 novembre 2023 prima dell'inizio della stagione di raccolta del tartufo nero pregiato prevista per il 1° dicembre 2023. Il prelievo ha riguardato 8 piante, 4 produttive secondo le indicazioni degli anni precedenti e 4 che non avevano mai prodotto tartufi. Dalle 4 piante produttive è stato prelevato suolo, a 10-15 cm di profondità sia all'interno pianello (campioni denominati P1 P2 P3 P4) che all'esterno del pianello dove era presente la vegetazione erbacea (campioni denominati F1 F2 F3 F4).

Il pianello rappresenta una zona che circonda il tronco (1-2 m diametro) con assenza di vegetazione erbacea dovuta a sostanze tossigene prodotte dal fungo ipogeo ed è presa come indicatrice della produzione del tartufo. Dalle 4 piante non produttive è stato prelevato suolo alla stessa profondità a circa 1 metro dal tronco (campioni denominati N1 N2 N3 N4). Per ogni campione è stato prelevato 1 Kg di suolo che è stato portato presso i laboratori di Patologia Vegetale (UNIVPM) per le analisi successive.



Figura 2-1: Tartufaia dell'azienda agricola "Angellozzi tartuficoltura" di Angellozzi Emidio Esempio schema sperimentale dei campionamenti effettuati all'interno della tartufaia.



Figura 2-2: *Quercus pubescens* produttiva (P1).

2.3 Liofilizzazione dei campioni

Una volta giunti in laboratorio, i campioni di suolo sono stati sottoposti a liofilizzazione.

La liofilizzazione è un processo di essiccamento nel quale un liquido, generalmente acqua, viene allontanato da un prodotto tramite sublimazione. Alla base del processo vi è quindi il passaggio dell'acqua dallo stato solido allo stato vapore, senza passare per lo stato liquido. Questo è reso possibile dal connubio di due condizioni operative: la pressione e la temperatura. Questa tecnica è particolarmente preziosa per conservare i microbi, gli enzimi e i composti volatili organici presenti nel campione utile per la conservazione a lungo termine di campioni destinati ad analisi successive. Inoltre, l'allontanamento dell'acqua ha consentito di ottimizzare la concentrazione dei microrganismi presenti nel suolo.

Prima della liofilizzazione i campioni di suolo sono stati disposti in contenitori di plastica adatti alla dimensione del liofilizzatore, ad uno strato di 1 cm per accelerare il processo di essiccamento (Figura 2-3).

La liofilizzazione è stata effettuata utilizzando lo strumento "*PROXIMA*", che ha completato il processo in circa 24 ore. Durante la fase di '*auto drying*', i campioni sono stati mantenuti a una temperatura di 20°C sugli scaffali, mentre la macchina operava a 25°C, con un vuoto di 0,38 mbar e una pressione di sicurezza di 0,5 mbar. Successivamente, nella fase di '*secondary drying*', la temperatura è stata gradualmente abbassata a -40°C e poi a -15°C, con un vuoto mantenuto a 0,25 mbar, per garantire una completa rimozione dell'umidità residua e un'essiccazione efficace.



Figura 2-4: Campioni di suolo posizionati nelle vaschette pronti per la liofilizzazione

Successivamente i campioni sono stati setacciati per ridurre la matrice grossolana in particelle più piccole per favorire l'estrazione del DNA dai microrganismi. I campioni sono stati conservati fino al momento dell'estrazione a -80°C (Figura 2-5).



Figura 2-6: Campioni di suolo posti in tubi sterili da 50 ml adatti per la conservazione a -80°C prima dell'estrazione del DNA.

2.4 Estrazione del DNA

Per effettuare l'estrazione del DNA dai campioni di suolo è stato utilizzato il '*Kit NDaesy PowerSoil Pro*' (QIAGEN- Germany). Questo kit viene suggerito per l'estrazione del DNA microbico da diversi tipi di terreno, inclusi compost, argilla e terreno superficiale. Il kit è dotato di reagenti ottimizzati per poter effettuare una lisi efficace di batteri e funghi presenti nel terreno. Il kit contiene inoltre una tecnologia semplificata di rimozione degli inibitori comunemente presenti nei campioni di terreno. Le fasi di estrazione del kit comprendono la lisi del campione effettuata aggiungendo a 250 mg di terreno nel tubo '*PowerBead*' (2 ml) contenete delle microboliche necessarie alla frantumazione del suolo insieme a 800 μl di soluzione CD1. Di seguito i tubi sono stati posti in '*TissueLyser III*' per la frantumazione

simultanea dei campioni biologici attraverso l'agitazione ad alta velocità (30 min a 30 Hz).

Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 15.000×g per 1 minuto. Il supernatante ottenuto (circa 500–600 µl) è stato trasferito con attenzione in un nuovo tubo da 2 ml fornito nel kit, evitando di trasferire particelle di terreno.

La fase successiva riguarda la purificazione del DNA. Al supernatante sono stati aggiunti 200 µl di soluzione CD2. Dopo aver mescolato i campioni per 5 secondi usando il 'vortex', i campioni sono stati sottoposti a centrifugazione ad una velocità di 15.000×g per 1 minuto. Il sopranatante ottenuto, 700 µl, è stato trasferito in un nuovo tubo da 2 ml. Successivamente, alla soluzione sono stati aggiunti 600 µl di soluzione CD3. I campioni sono stati mescolati per 5 secondi con il 'vortex'.

Una volta purificato il campione, l'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando delle resine poste in una colonnina denominata MB. La resina ha la funzione di trattenere gli acidi nucleici. Nel dettaglio 650 µl del lisato di ciascun campione è stato caricato nella colonna MB. Il passaggio del liquido nella resina è stato garantito sottoponendo la colonnina ad una centrifugazione a 15.000×g per 1 minuto.

A questo punto, per pulire il DNA incluso nella resina da eventuali sali, le colonnine MB sono state sottoposte ad un primo lavaggio aggiungendo 500 µl di soluzione EA. Dopo centrifugazione a 15.000×g per 1 minuto, è stato effettuato un secondo aggiungendo la soluzione C5 seguita da centrifugazione a 15.000×g per 1 minuto.

Una volta pulito il campione, nell'ultima fase dell'estrazione è stata effettuata l'eluzione del DNA, che serve a staccare gli acidi nucleici dalla resina. Con questa finalità sono stati aggiunti 50 µl della soluzione C6 direttamente al centro della colonnina, seguiti da una centrifugazione a 15.000 x g per 1 minuto. Infine, il DNA ottenuto è stato conservato a -20°C preservando così l'integrità del DNA nel tempo.

2.5 Sequenziamento ‘*Shallow whole-metagenome shotgun*’

I campioni di DNA estratto sono stati inviati alla ‘*Novogene*’ di *Cambridge* (UK) per il sequenziamento Illumina e la preparazione delle librerie necessarie per lo studio metagenomico utilizzando la tecnologia S-WMS. Questo metodo di sequenziamento metagenomico "superficiale" fornisce informazioni tassonomiche sul DNA genomico totale di tutti i microrganismi presenti in un campione, senza la necessità di isolarli ed allevarli *in vitro*.

Una volta ottenute le librerie da parte della ‘*Novogene*’ è stata effettuata una indagine per verificare la tipologia, l’abbondanza e prevedere la funzione dei microrganismi identificati. Con tale finalità è stata utilizzata la funzione ‘*metagenomics*’ messa a disposizione dalla piattaforma ‘*OmicsBox*’ BioBam Bioinformatics S.L. (Avenida Peris y Valero 78-23 46006 Valencia – ES-Spain). In dettaglio è stata eseguita una pipeline come di seguito illustrata (Figura 2-7).

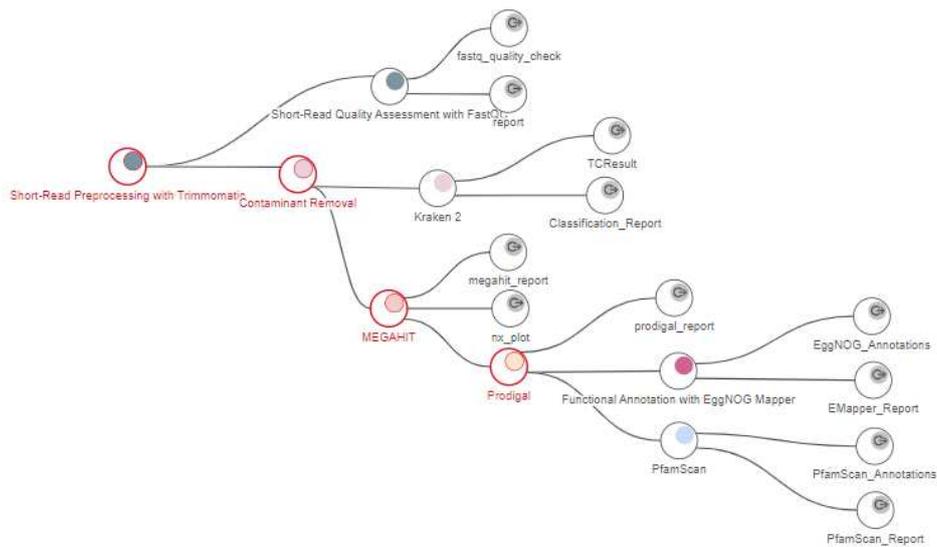


Figura 2-8: Schema del flusso di lavoro effettuato per l’analisi metagenomica.

In un primo step i file FASTQ relativi alle librerie di ciascun campione sono stati ripuliti mediante il software di pre-elaborazione ‘*Trimmomatic*’ per rimuovere gli adattatori e le sequenze di contaminazione, filtrando le ‘*reads*’ di bassa qualità. Le sequenze ripulite sono state sottoposte alla classificazione tassonomica mediante il software ‘*Kraken 2*’ (Wood et al., 2019).

Per comprendere il ruolo funzionale della comunità microbica è stata fatta un'indagine atta ad individuare i geni presenti nelle sequenze metagenomiche e la loro funzione. Con tale finalità le sequenze sono state sottoposte ad un assemblaggio mediante il software *'MEGAHIT'* (Li et al., 2016), che utilizza un metodo noto come *'Bruijn method'*. Questo primo step è necessario per ricostruire le sequenze in strutture note come *'contig'* per consentire nella fase successiva la possibilità di individuare i geni della popolazione microbica. A questo scopo i *'contig'* sono stati sottoposti al software *'Prodigal'* (Hyatt et al., 2010) che ne ha consentito la predizione genica. La funzione dei geni identificati è stata effettuata mediante il software *'EggNOG-mapper'* (Cantalapiedra C. et al., 2021) che è uno strumento per l'annotazione funzionale di nuove sequenze (geni o proteine) mediante ortologia e che le classifica in base al database di *'Clusters of Orthologous Groups of proteins'* (COG) Ogni COG include proteine che si suppone siano ortologhe. Tutti i software sono stati utilizzati mediante i parametri di default consigliati dal programma.

Capitolo 3

RISULTATI

3.1 Risultati del sequenziamento

Il sequenziamento NGS ha consentito di ottenere una quantità di 'reads', (per 'reads' si intende una corta sequenza di DNA di sintesi che viene prodotta durante la reazione di sequenziamento NGS), relativo alle sequenze dei microrganismi presente nei diversi campioni di suolo in un numero compreso tra 1.057.516 per il campione F1 e 1.538.594 ottenute per il campione F2. Di queste, la percentuale delle 'reads' classificate dal software 'Kraken2' è compresa tra il 99,4% per il campione P1 e 99,46% per il campione P4.

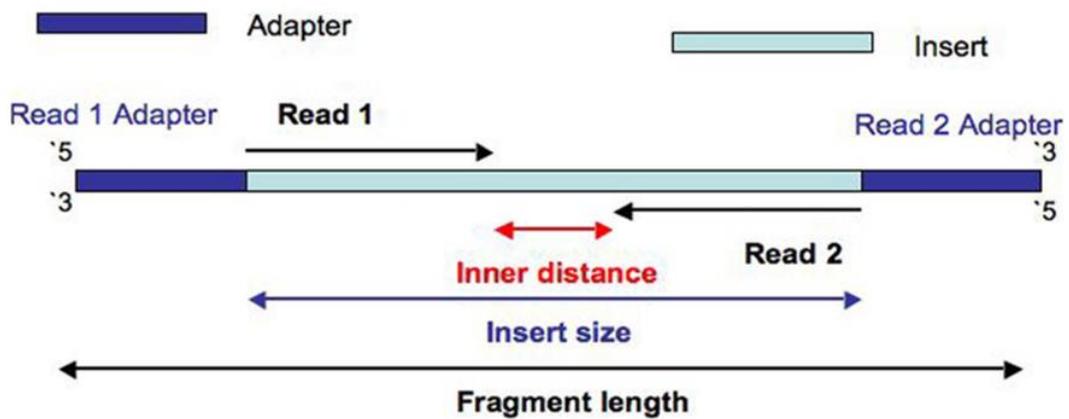


Figura 3-1: Schema di una 'reads' ottenuta da sequenziamento Illumina.

3.2 Distribuzione dei Phyla Batterici e Eucariotici

I grafici presentati (Figura 3-2, 3-3) mostrano l'abbondanza relativa dei principali phyla di batteri ed eucarioti riscontrati in campioni di suolo analizzati. La categorizzazione è basata su due gruppi principali: Bacteria ed Eukaryota.

I batteri predominanti appartengono ai phyla Pseudomonadota e Actinomycetota. In particolare, riguardo il phylum Pseudomonadota i campioni F (fuori pianello) hanno mostrato una percentuale compresa tra 69,6%, in F3 e 74,5%, in F4; per quanto riguarda il suolo da piante non produttive (N), la percentuale era compresa tra 71,4% in N2, e 74,6% nel suolo prelevato da N1; per quanto riguarda il suolo da pianello (P), il phylum Pseudomonadota variava da 68,4% in P1 e 69,9% in P4 (Figura 3-2). Per quanto concerne il phylum Actinomycetota nei campioni F la quantità variava da 22,2% in F4 a 27,4% in F3; per i campioni N l'abbondanza era compresa tra 22,5% in N1 e 25,7% per il campione N2; per quanto riguarda i campioni P, la quantità era compresa tra 27,3% in P4 e 28,2% in P1 (Figura 3-2). Percentuali di abbondanza inferiori, < ad 1,2%, sono state rilevate per altri phyla come indicato nella Figura 3-2.

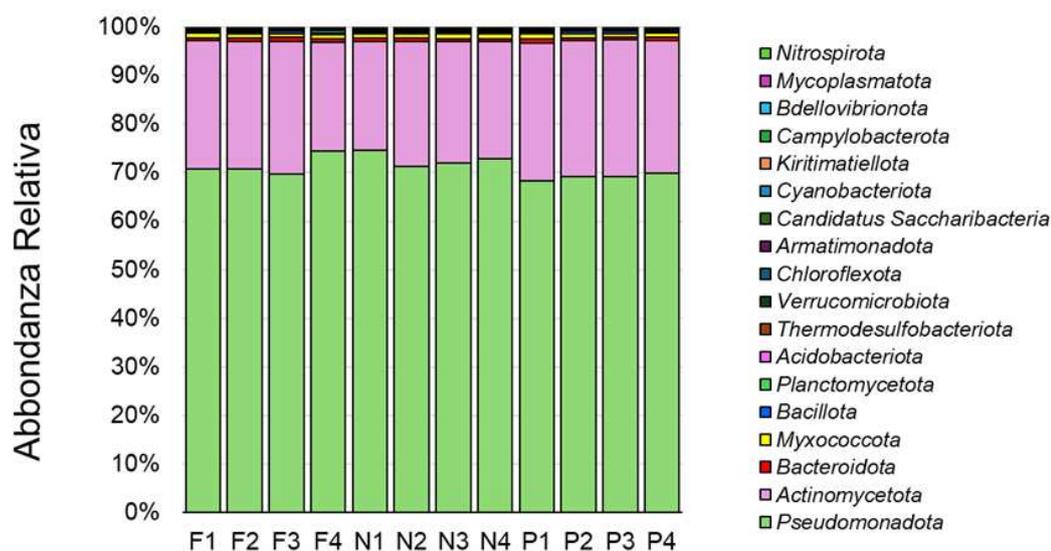


Figura 3-2: Composizione della comunità microbica nei suoli di tartufaia: distribuzione dei phyla batterici.

In merito agli eucarioti, il software ha individuato principalmente dei funghi e una percentuale $< 0,1\%$ di Archea che non discutiamo in questa tesi. Tra i funghi il phylum principale era quello degli Ascomycota la cui abbondanza nei campioni F variava da $83,3\%$ in F2 al 90% in F4; nei campioni N variava tra $86,7\%$ in N3 al 91% in N2; nei campioni P, variava da $91,4\%$ in P1 a $93,4\%$ in P4 (Figura 3-3). Per quanto riguarda il phylum dei Basidiomycota nei campioni F la percentuale era compresa tra $7,2\%$ nel campione F1 a $4,6\%$ nel campione F4; nei campioni N i Basidiomycota sono presenti in percentuale variabile tra $7,8\%$ in N1 a $5,8\%$ in N2; nei campioni P, la percentuale variava da $5,2\%$ in P2 a 3% in P1. Interessante il phylum dei Mucoromycota che è stato principalmente individuato nei campioni F con percentuali variabili da $7,7\%$ per il campione F2 a $2,5\%$ per il campione F4. Altri phyla in percentuale $< 0,1\%$ sono stati individuati e mostrati nella figura 3-3.

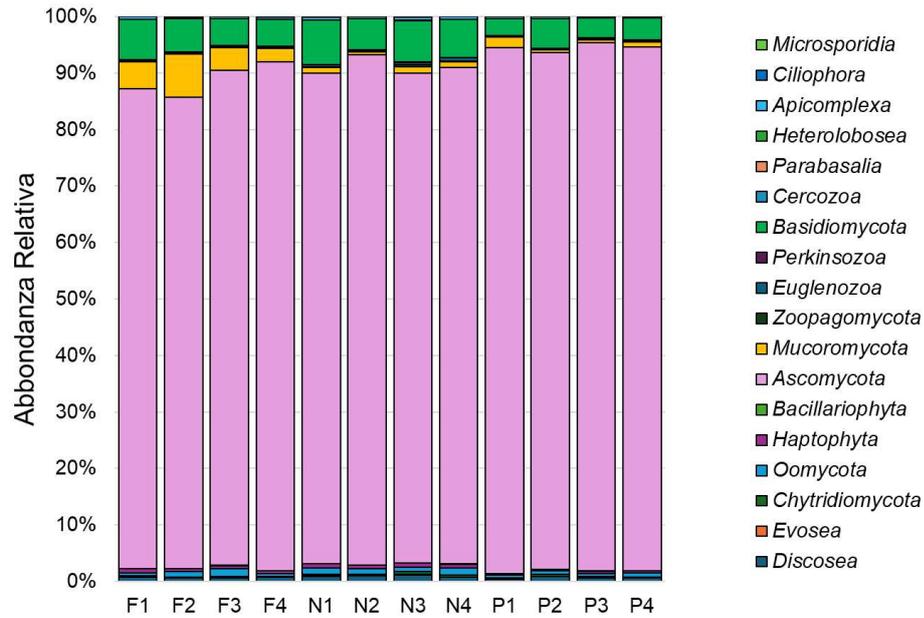


Figura 3-3: Composizione della comunità microbica nei suoli di tartufo: distribuzione dei phyla eucariotici.

3.3 Distribuzione e ‘clustering’ di generi e specie batteriche

Sono state identificate 8595 specie batteriche distribuite in 1997 generi (Figura 3-4, Figura 3-5). Le ‘heatmaps’ sono state ottenute utilizzando il metodo di raggruppamento completo basato su una matrice di distanza euclidea. Questo metodo di clustering permette di visualizzare le relazioni tra i diversi gruppi. Nelle figure sono mostrate gli 80 generi e le 50 specie più numerose (Figura 3-4, Figura 3-5). In entrambi i casi le analisi mostrano che in relazione all’abbondanza e alle tipologie di generi o specie identificate, il gruppo N è risultato più simile a F, mentre il gruppo P si unisce al cluster per ultimo (Figura 3-4, Figura 3-5).

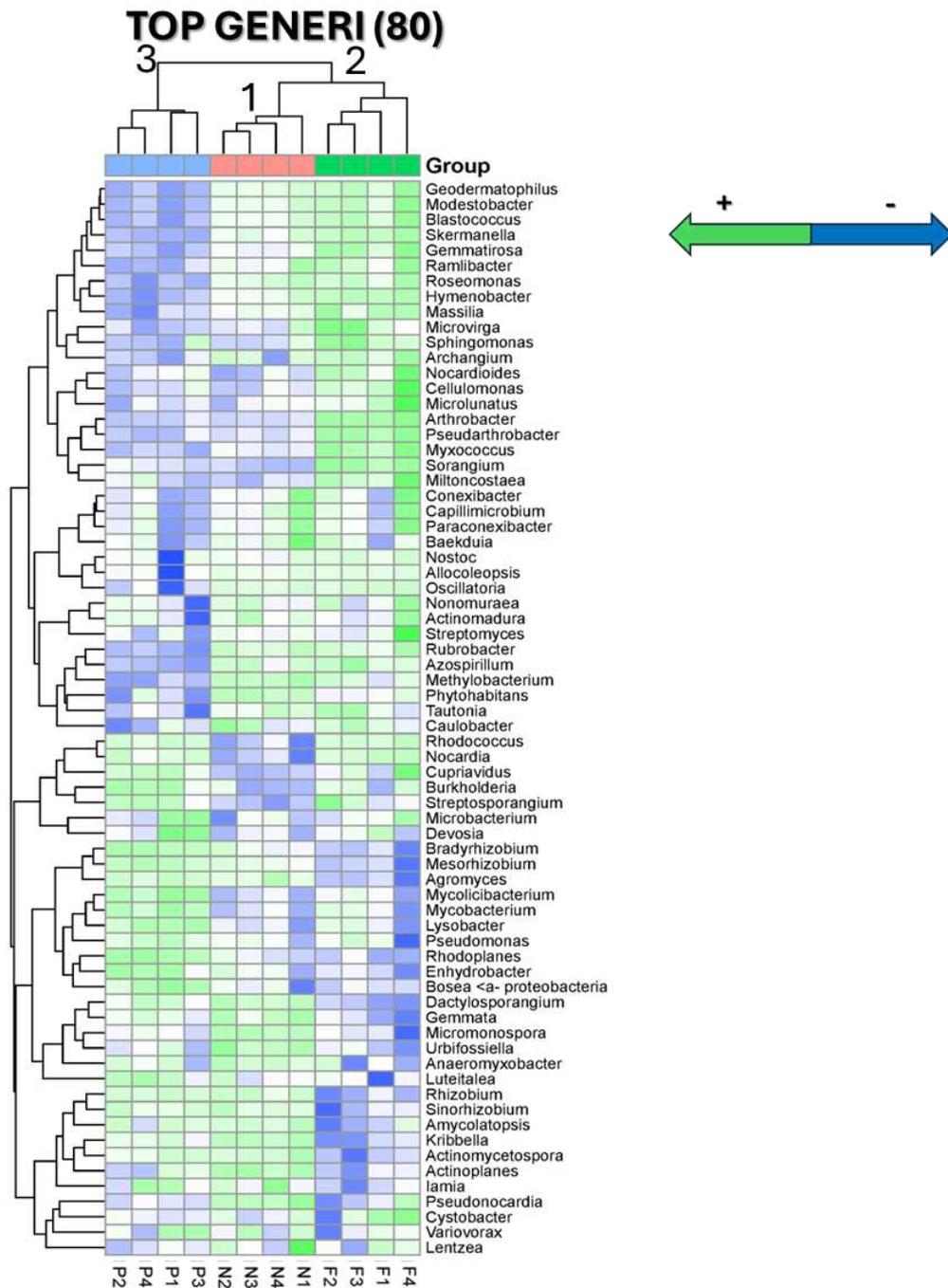


Figura 3-4: ‘Heatmap’ degli 80 generi batterici più numerosi individuate mediante il software ‘Kraken2’ e ottenuta usando il metodo di raggruppamento completo basato su una matrice di distanza euclidea. La gradazione dei colori dal verde al blu, indicando rispettivamente una minore o maggiore abbondanza generi. Il gradiente di colore da quindi informazioni sulla distribuzione delle abbondanze batteriche tra i diversi campioni analizzati. P = campioni suolo all’interno del pannello delle piante produttive), F= campioni suolo fuori pannello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.

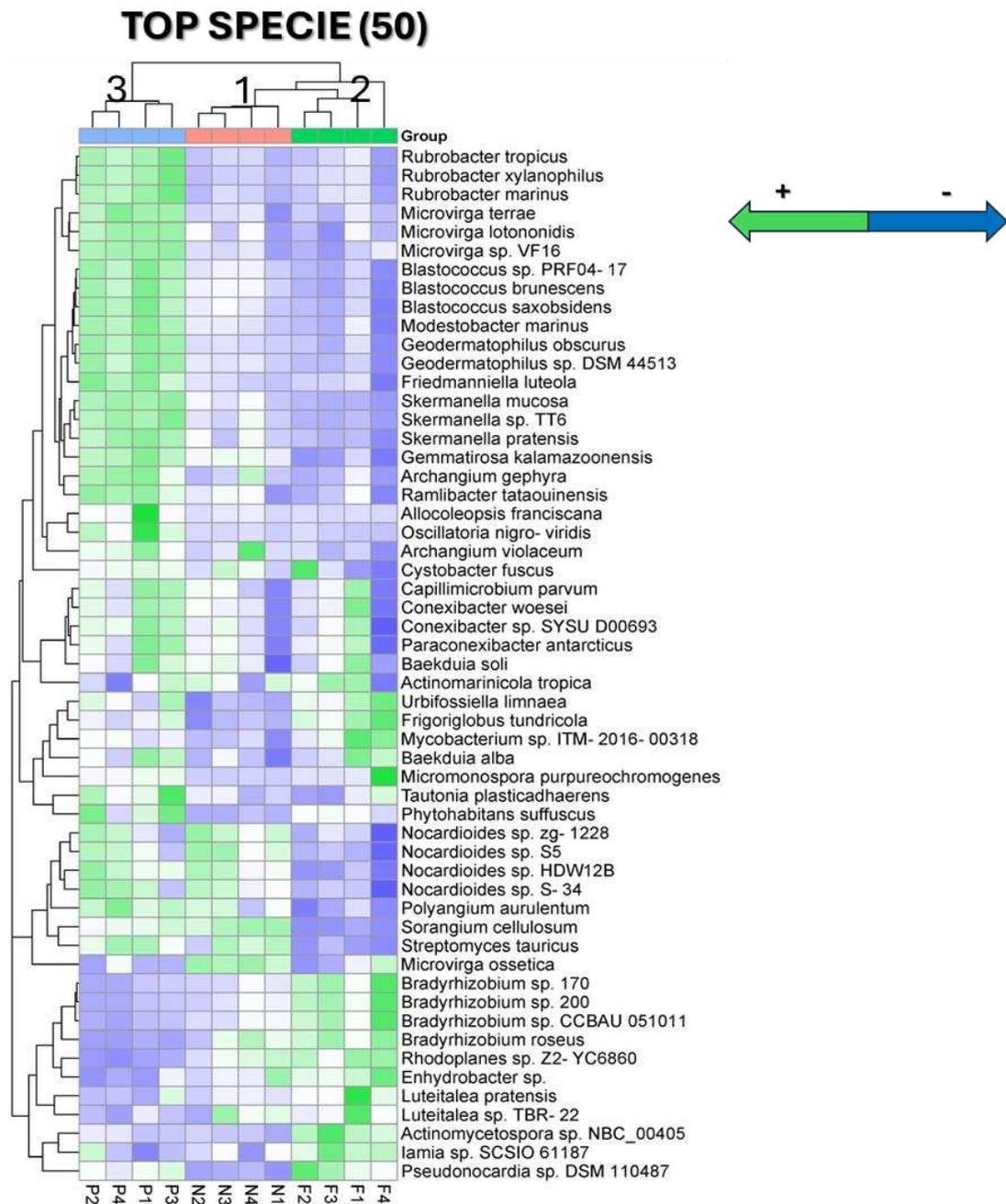


Figura 3-5: ‘Heatmap’ delle prime 50 specie batteriche più numerose individuate mediante il software ‘Kraken2’ e ottenuta usando il metodo di raggruppamento completo basato su una matrice di distanza euclidea. La gradazione dei colori dal verde al blu, indicando rispettivamente una minore o maggiore abbondanza generi. Il gradiente di colore da quindi informazioni sulla distribuzione delle abbondanze batteriche tra i diversi campioni analizzati. P = campioni suolo all’interno del pianello delle piante produttive), F= campioni suolo fuori pianello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.

3.4 Abbondanza relativa delle principali 25 specie batteriche

Il grafico presentato è un diagramma a barre impilate che offre una visualizzazione della composizione relativa delle 25 specie batteriche numericamente più abbondanti. (Figura 3-6). In sostanza, ci mostra quali batteri sono presenti e in quale proporzione in ciascun campione. Il grafico evidenzia una notevole diversità batterica tra i campioni. Alcune specie batteriche predominano in tutti campioni ma con differenze in relazione alle tesi analizzate. È il caso delle specie appartenenti al genere *Bradyrhizobium* che complessivamente nei campioni F variavano da 1,67% in F1, a 3,31% in F4; nella tesi N la percentuale variava da 1,34% in N2 a 1,77% in N4; e nella tesi P variavano da 1,05% in P4 a 1,19% in P3. Tra le specie più abbondanti sono risultate essere quelle incluse nel genere *Microvirga* con percentuali simili tra tutti i campioni variabili da 1,36% in P4 e 1,39% in N4. Interessante le specie appartenenti al genere *Blastococcus* predominano nei campioni P. Altre differenze sono osservabili direttamente dalla figura 3-6.

Specie Batteri : TOP 25

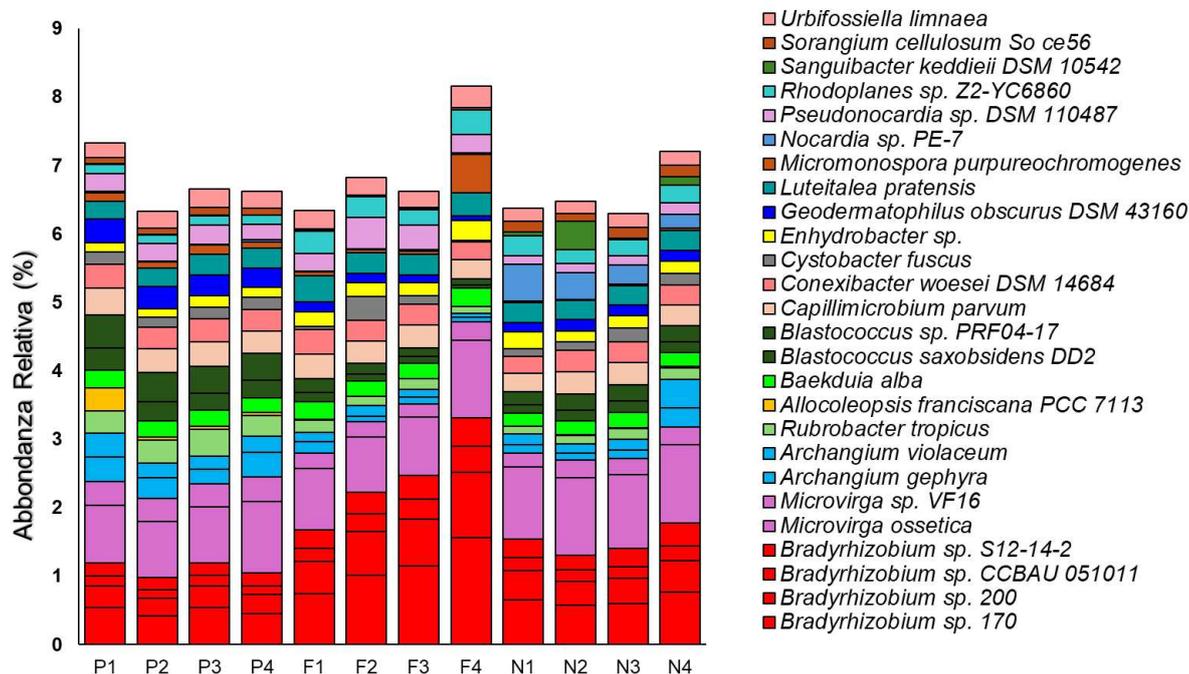


Figura 3-6: Il grafico rappresenta le 25 specie batteriche principalmente individuate mediante il *software* 'Kraken2'. P = campioni suolo all'interno del pianello delle piante produttive), F= campioni suolo fuori pianello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.

3.5 Analisi delle componenti principali (PCoA) delle specie batteriche

L'analisi PCoA, o delle coordinate principali mostra che la variabilità relativa all'abbondanza e tipologie di specie batteriche individuate è descritta per il 35% dalla coordinata 1 e per il 26% dalla coordinata 2 (Figura 3-7). L'analisi mostra che i campioni si raggruppano in relazione alle tipologie, P, N e F, prese in considerazione in questa tesi. In particolare, una maggiore vicinanza è stata osservata per i campioni P a destra del grafico, descritti principalmente dalla coordinata 1, per i campioni N nella parte centrale anche esse descritti dalla coordinata 1 ed in fine per i campioni F che sono descritti da entrambe le coordinate.

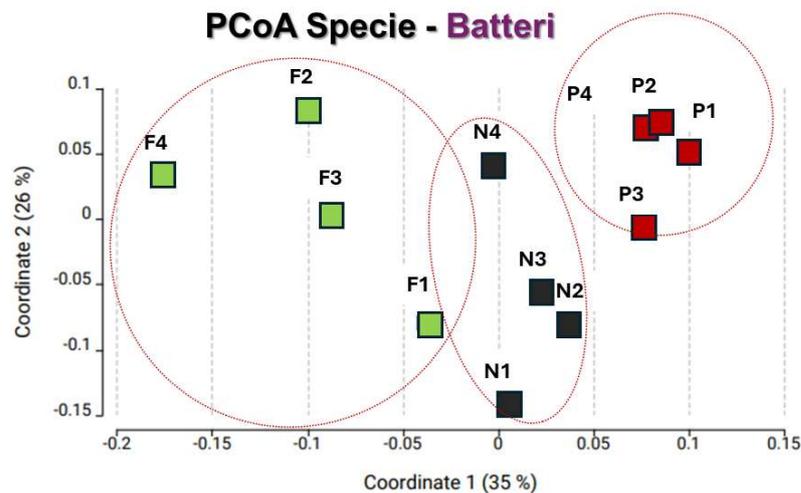


Figura 3-7: Analisi PCoA a livello di specie batteriche basata sulla dissomiglianza di ‘Bray-Curtis’. NOTA: gli assi X e Y mostrano la componente principale 1 (Coordinata 1) e la componente principale 2 (Coordinata 1) relative all’abbondanze e alla somiglianza delle popolazioni microbiche. La percentuale di variazione spiegata dalle coordinate principali tracciate è indicata sugli assi. Ogni punto rappresenta un singolo campione e i colori rappresentano diversi gruppi di campioni. P = campioni suolo all’interno del pianello delle piante produttive), F = campioni suolo fuori pianello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.

3.6 Distribuzione e clustering di generi e specie fungine

Per quanto riguarda i funghi sono state identificate 610 specie incluse in 289 generi. Le ‘heatmaps’ sono state ottenute utilizzando il metodo di raggruppamento completo basato su una matrice di distanza euclidea. Nelle figure sono mostrate gli 80 generi e le 50 specie più numerose (Figura 3-8, Figura 3-9). In entrambi i casi le analisi mostrano che in relazione all’abbondanza e alle tipologie di generi o specie identificate, il gruppo N è più simile a F, mentre P si unisce al ‘cluster’ per ultimo.

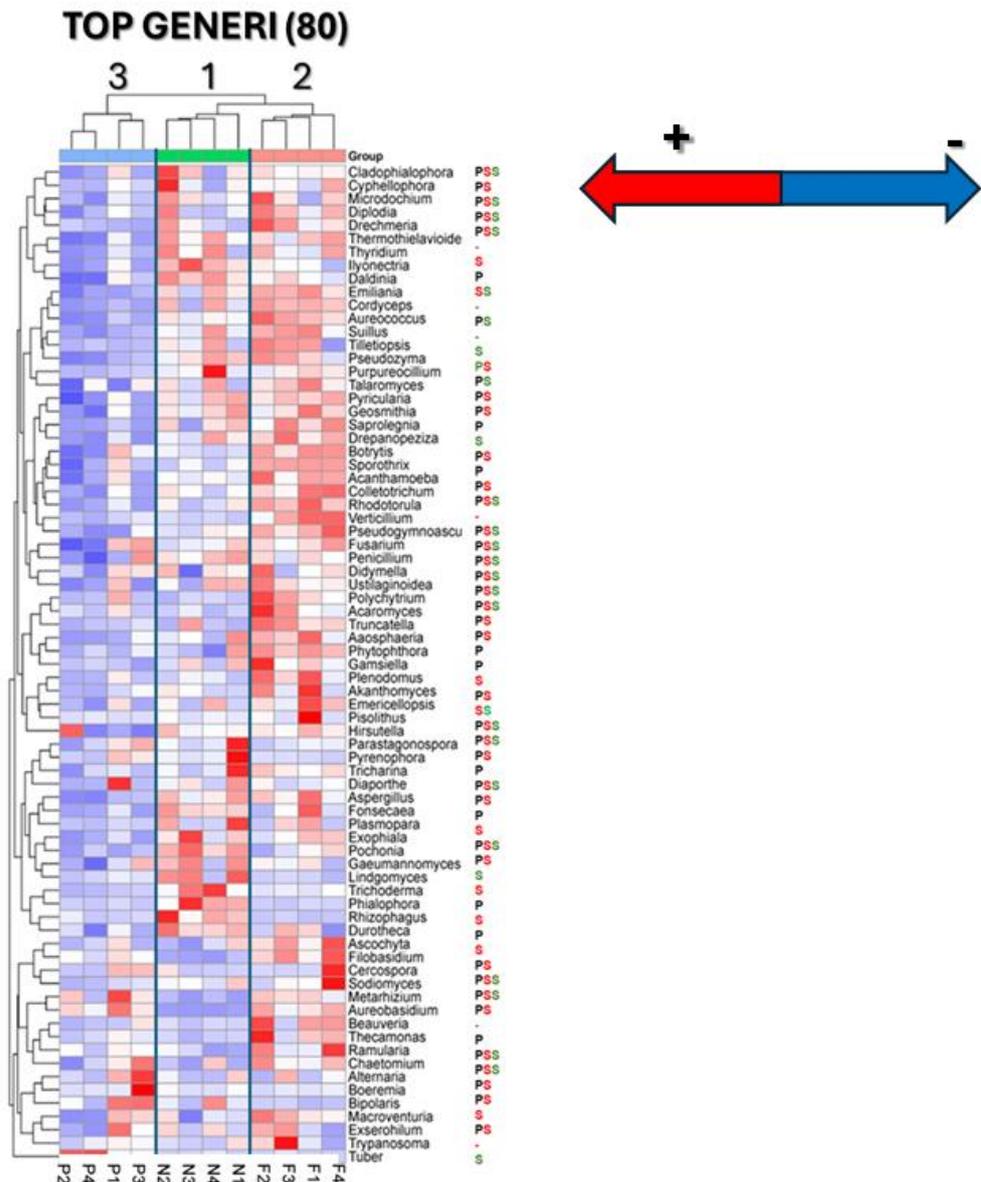


Figura 3-8: 'Heatmap' degli 80 generi fungini più abbondanti, individuati mediante il software 'Kraken2', e ottenuta usando il metodo di raggruppamento completo basato su una matrice di distanza euclidea. La gradazione dei colori dal blu al rosso, indicando rispettivamente una minore o maggiore abbondanza generi. La classificazione trofica viene descritta con l'ausilio del database 'FUNGuild' che classifica i funghi in base alla loro modalità ecologica in Patogeno (P), Saprophyta (S) e Simbionte (SS). P = campioni suolo all'interno del pannello delle piante produttive), F = campioni suolo fuori pannello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.

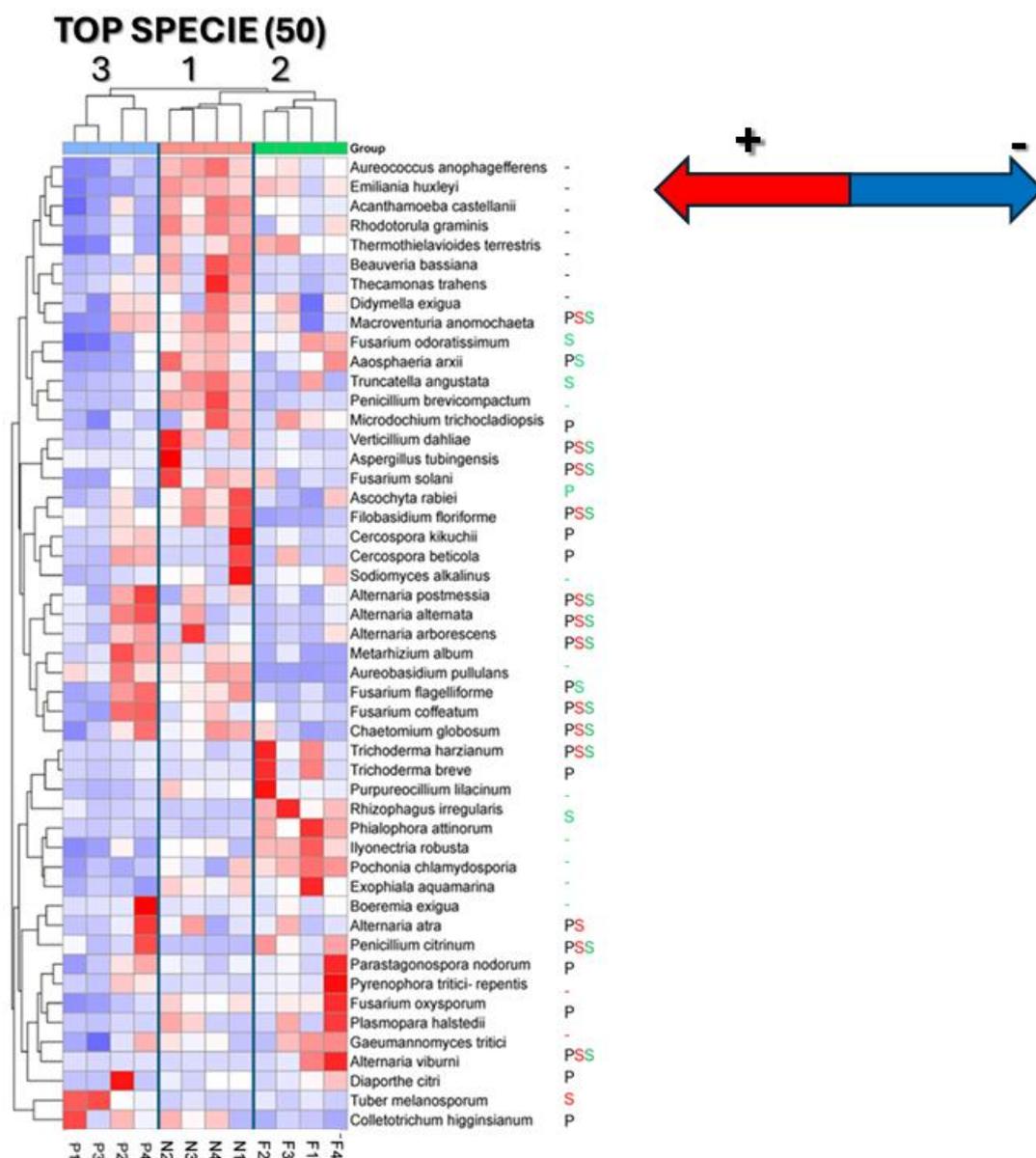


Figura 3-9: ‘Heatmap’ delle 50 specie fungine più abbondanti, individuati mediante il software ‘Kraken2’, e ottenuta usando il metodo di raggruppamento completo basato su una matrice di distanza euclidea. La gradazione dei colori dal blu al rosso, indicando rispettivamente una minore o maggiore abbondanza generi. La classificazione trofica viene descritta con l’ausilio del database ‘FUNGuild’ che classifica i funghi in base alla loro modalità ecologica in Patogeno (P), Saprofita (S) e Simbionte (S). P = campioni suolo all’interno del pannello delle piante produttive), F = campioni suolo fuori pannello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.

3.7 Abbondanza relativa delle principali 25 specie fungine

Il grafico presentato è un diagramma a barre impilate che offre una visualizzazione della composizione relativa di 25 specie fungine più numerose, (Figura 3-10). In sostanza, ci mostra quali funghi sono presenti e in quale proporzione in ciascun campione. Il grafico evidenzia una notevole diversità fungina tra i campioni. Alcune specie fungine sembrano predominare in specifici campioni. Ad esempio, nei campioni P1 e P3, *T. melanosporum* predomina, ed è particolarmente importante notare che P1 e P3 sono le uniche due piante che hanno prodotto tartufi. Quantità apprezzabili di *T. melanosporum* sono evidenti anche in F1, F4 e N4. Le altre specie fungine emerse tra le più abbondanti appartengono in particolare al genere *Fusarium* e *Alternaria*. Interessante tra le specie fungine predominanti la specie *Rhizophagus irregularis*, una nota endomicorriza di tipo arbuscolare è stata individuata nei suoli F dove è presente una maggiore vegetazione erbacea (Figura 3-10).

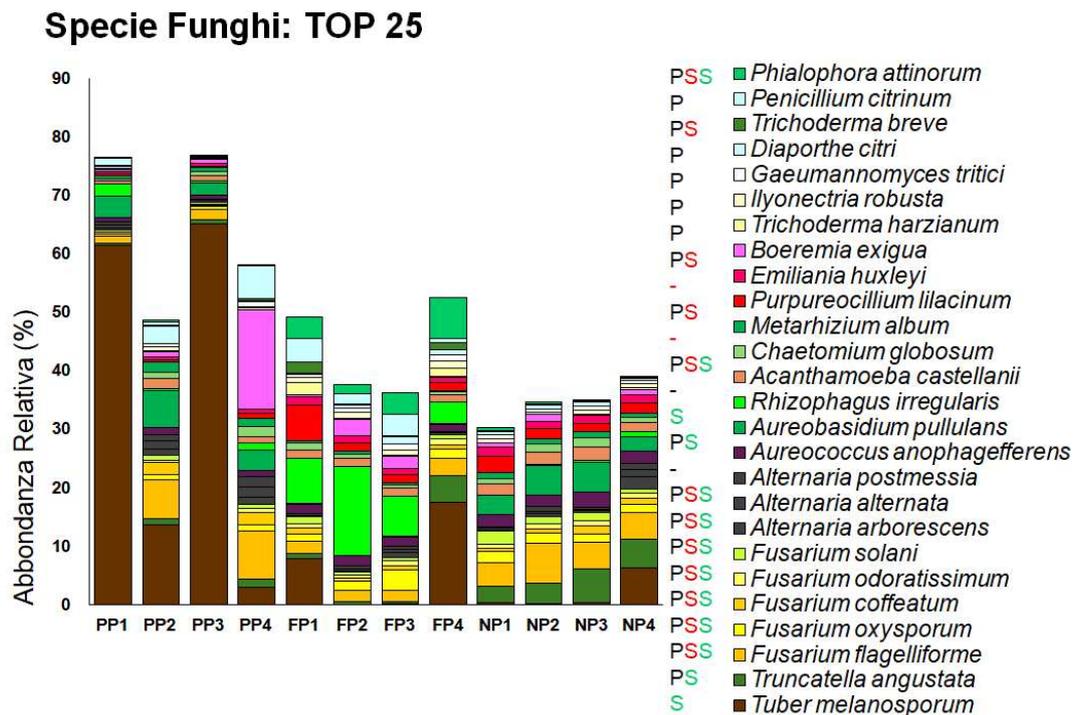


Figura 3-10: Il grafico rappresenta le 25 specie fungine principalmente individuate mediante il *software 'Kraken2'*. P = campioni suolo all'interno del pianello delle piante produttive), F = campioni suolo fuori pianello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.

3.8 Analisi delle componenti principali (PCoA) delle specie fungine

L'analisi PCoA, o delle coordinate principali mostra che la variabilità relativa all'abbondanza e tipologie di specie batteriche individuate è descritta per il 37% dalla coordinata 1 e per il 16% dalla coordinata 2 (Figura 3-11). L'analisi mostra che parzialmente i campioni si raggruppano in relazione alle tipologie prese in considerazione in questa tesi. In particolare, i campioni P non si raggruppano tutti insieme. Se P1 e P3 (in rosso) sono raggruppati insieme sul lato sinistro del grafico, indicando una somiglianza significativa nella composizione microbica tra di loro, P2 e P4 sono risultati più simili ai campioni F (Figura 3-11). I campioni N (in nero) si

raggruppano sul lato destro e sono anch'essi vicini tra loro, indicando che le piante non produttive condividono una composizione fungina simile (Figura 3-11).

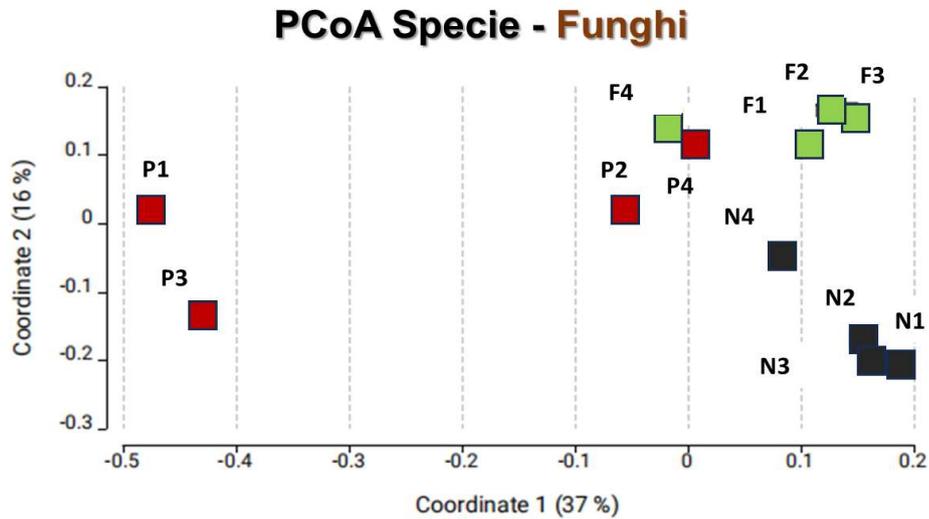


Figura 3-11: Analisi PCoA a livello di specie fungine basata sulla dissomiglianza di 'Bray-Curtis'. NOTA: gli assi X e Y mostrano la componente principale 1 (Coordinata 1) e la componente principale 2 (Coordinata 2) relative all'abbondanze e alla somiglianza delle popolazioni microbiche. La percentuale di variazione spiegata dalle coordinate principali tracciate è indicata sugli assi. Ogni punto rappresenta un singolo campione e i colori rappresentano diversi gruppi di campioni. P = campioni suolo all'interno del pianello delle piante produttive), F = campioni suolo fuori pianello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive.

3.9 Batteri: analisi dell'abbondanza differenziale delle specie

L'analisi identifica le specie batteriche sovrarappresentate e sottorappresentate utilizzando un logaritmo del fattore di cambiamento ($\log_{2}FC$) per quantificare la differenza di abbondanza, considerando una soglia di $\log_{2}FC > 2$ per le specie sovrarappresentate e $\log_{2}FC < -2$ per quelle sottorappresentate. Viene anche specificato che le differenze sono statisticamente significative con un valore 'False discovery rate' (FDR) $< 0,05$. Il confronto delle popolazioni batteriche tra P vs F ha individuato 161 specie batteriche maggiormente rappresentate e 73 sottorappresentate (Figura 3-12). Mentre il confronto delle popolazioni batteriche tra P vs N ha individuato 64 specie

batteriche maggiormente rappresentate e 73 sottorappresentate (Figura 3-13). Dal confronto dei campioni P vs F è emerso che i taxa maggiormente sovrarappresentati in P troviamo *Streptomyces spp.*, *Pseudarthrobacter spp.*, *Hymenobacter spp.*, e *Arthrobacter spp.* Tra quelli sottorappresentati, notiamo taxa come *Mesorhizobium spp.* e *Bradyrhizobium spp.* (Figura 3-12).

P versus F

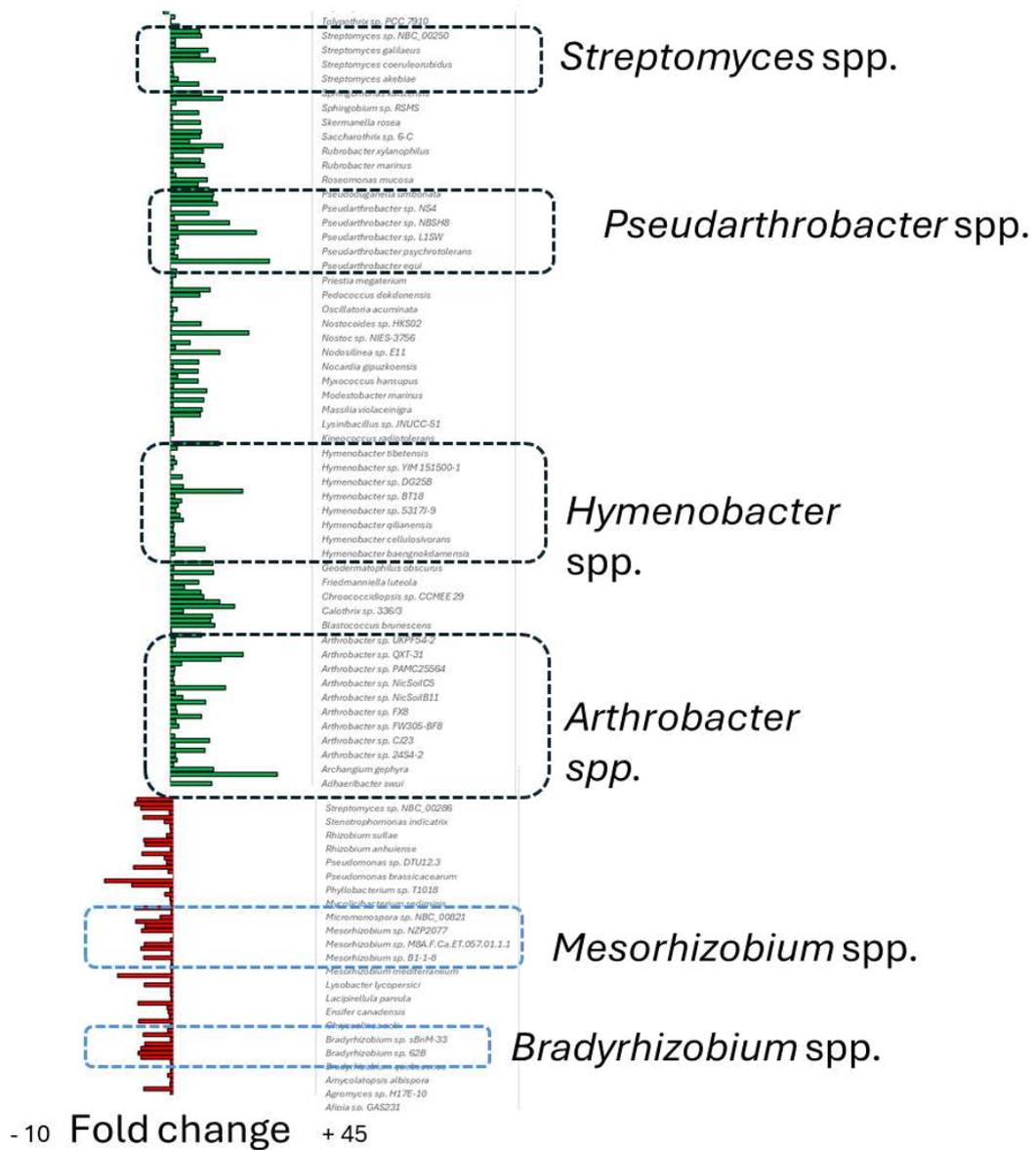


Figura 3-12: Analisi dell'abbondanza differenziale dei taxa individuati nella tesi P rispetto alla tesi F, effettuata mediante edgeR con test statistico GLM. P = campioni suolo all'interno del pianello delle piante produttive), F= campioni suolo fuori pianello delle piante produttive. $\logFC > 2(-2)$.

Dal confronto dei campioni P vs N in taxa *Streptomyces spp.*, *Rubrobacter spp.*, *Hymenobacter spp.*, e *Mycolicibacterium spp* sono sovrarappresentati; mentre *Streptomyces drozdowiczii* e *Mycolicibacterium*, sono sottorappresentate rispetto ai campioni N (Figura 3-13).

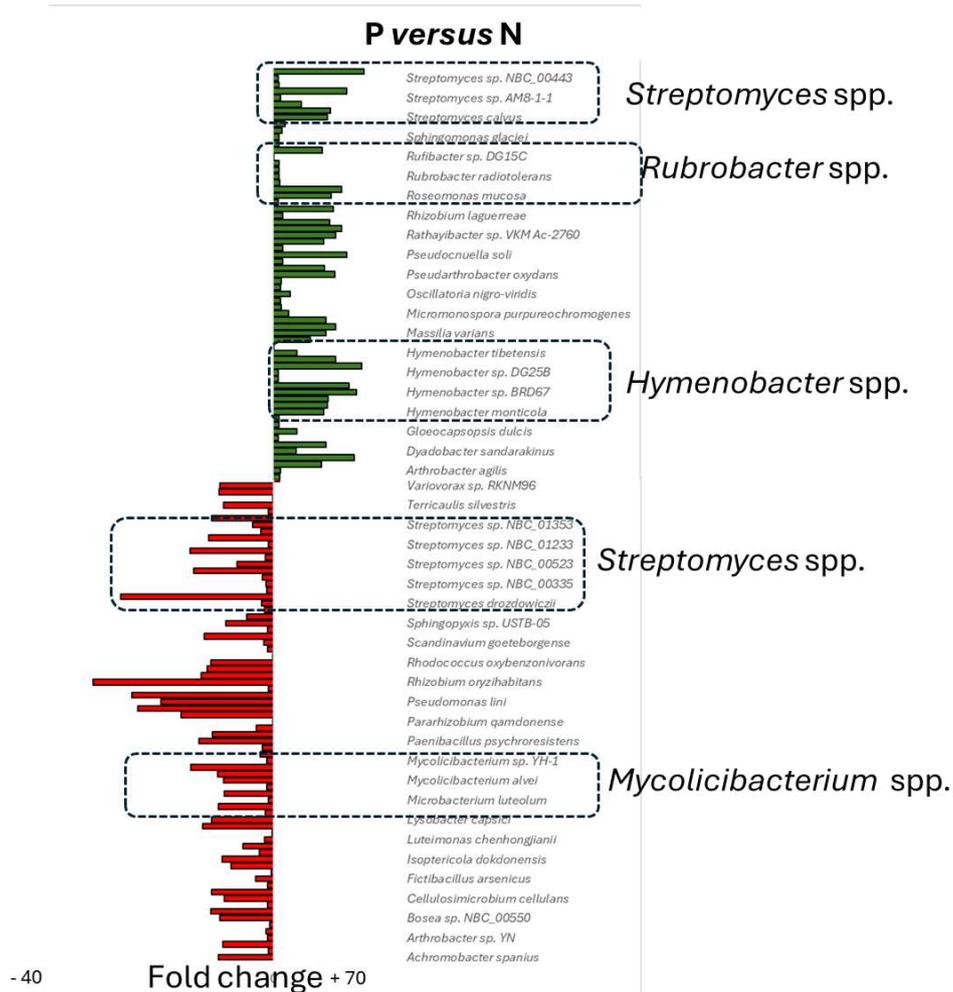


Figura 3-13: Analisi dell'abbondanza differenziale dei taxa individuati nella tesi P rispetto alla tesi N, effettuata mediante edgeR con test statistico GLM. P = campioni suolo all'interno del pianello delle piante produttive), N = campioni suolo di piante non produttive. $\log_{FC} > 2(-2)$.

3.10 Annotazione funzionali dei geni: analisi comparativa dei matagenomi

Analisi dei geni ortologhi mediante l'annotazione dei '*Cluster of Orthologous Group*' (COG) hanno evidenziato che i geni individuati sono stati assegnati a otto categorie funzionali incluse nel gruppo '*Metabolism*', dieci categorie funzionali incluse nel gruppo '*Cellular Processes and Signaling*' e cinque categorie funzionali incluse nel gruppo '*Storage and Processing*', le cui differenze tra le tesi analizzate sono mostrate nella figura 3-14. In particolare, all'interno della categoria funzionale '*Replication, recombination and repair (L)*' sono stati annotati il maggior numero di geni nei campioni P (17,9%) mentre nei campioni N e F la percentuale è risultata inferiore al 16%. Interessante i campioni P mostrano un numero di geni annotati elevato nella categoria '*Carbohydrate transport and metabolism (G)*', con una quantità di geni annotati del 6,1% rispetto al 4,5 % annotato nelle categorie N e F (Figura 3-14). Un'altra differenza interessante è stata osservata per la categoria funzionale '*Defense mechanisms (V)*', dove nei campioni F il numero di geni annotati è del 3,8% mentre nei campioni N e P rappresenta circa 1,5% dei geni annotati.

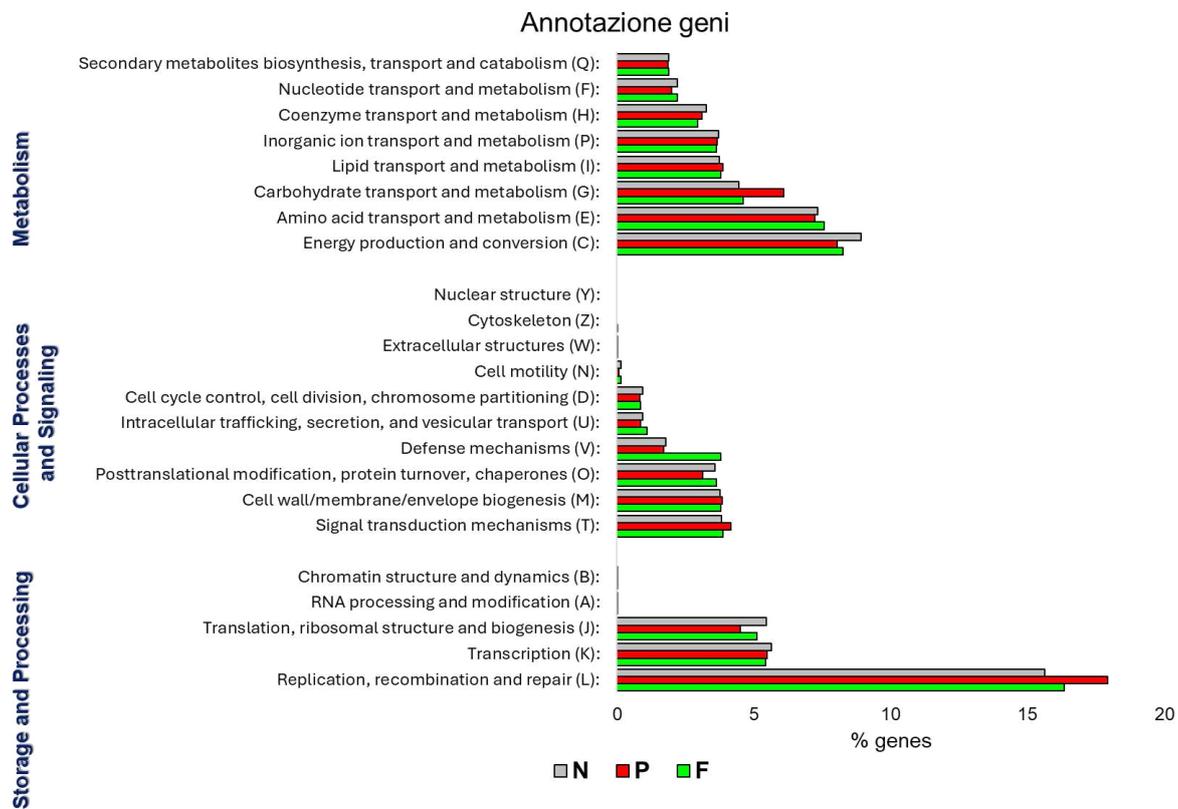


Figura 3-14: Distribuzione e confronto delle categorie funzionali COG nei campioni P, F e N. Il grafico rappresenta le abbondanze relative dei 22 diversi COG, categorie funzionali secondo tre ampi gruppi funzionali (*‘Metabolism’*, *‘Cellular Processing and Signaling’* e *‘Storage and processing’*). P = campioni suolo all’interno del pianello delle piante produttive, F = campioni suolo fuori pianello delle piante produttive; N = campioni suolo di piante non produttive).

DISCUSSIONE

I prodotti forestali, sia spontanei che coltivati, e le loro filiere costituiscono una importante risorsa economica per il Paese. In modo particolare, la coltivazione di tartufi rappresenta un'eccellenza da valorizzare e preservare, soprattutto in aree montane, dove il tartufo costituisce una significativa fonte di reddito. I cambiamenti climatici e le produzioni in altri Paesi europei stanno mettendo i tartuficoltori nella condizione di trovare tecniche di allevamento più innovative, che consentano di incrementare la produzione e ridurre l'influenza delle variazioni stagionali (Čejka et al., 2020). È noto che le comunità batteriche svolgono un ruolo centrale nel promuovere sia la micorrizzazione che lo sviluppo e la maturazione del tartufo (Amicucci et al., 2018; Monaco et al., 2020; Sillo et al., 2022; Giorgi et al. 2024).

In questo lavoro di tesi sono state analizzate le comunità microbiche presenti nel suolo di una tartufaia collocata nel sud delle Marche, zona vocata alla produzione del tartufo nero pregiato, per verificare esistono differenze in abbondanza e tipologie di taxa tra le piante produttive e quelle improduttive. Si tratta di una prima indagine effettuata nella regione Marche riguardante l'habitat del tartufo nero pregiato. Altri studi precedenti hanno indagato la comunità microbica associata ad altre tipologie di tartufo, analizzando diverse tipologie del genere *Tuber* (Benucci et al., 2016), *T. aestivum* (Monaco et al 2020), *T. indicum* (Liu et al., 2021), *T. magnatum* (Monaco et al 2022) concentrandosi principalmente sulla popolazione presente all'interno del corpo fruttifero. Un primo approccio analitico associato allo studio del suolo all'interno di una tartufaia è stato realizzato anche per *T. melanosporum* da Mello et al., (2017).

Questo lavoro di tesi ha affrontato, per la prima volta, un'analisi comparativa della comunità microbica complessiva presente nel suolo di piante produttive ed improduttive. Per quanto riguarda le piante produttive, oltre al suolo prelevato dal pianello, quell'area della tartufaia nota anche come bruciata che rappresenta il primo

segnale dell'attività della tartufaia, anche suolo al di fuori del pianello, dove è presente la vegetazione erbacea. L'inclusione di questa area nello studio è importante perché fornisce indicazioni su come la comunità microbica venga modificata a ridosso di una medesima pianta quando l'attività della micorrizica si organizza a formare il corpo fruttifero.

Il nostro studio, a nostra conoscenza, utilizza per la prima volta un approccio meta genomico, che ha consentito l'analisi complessiva delle popolazioni eucariotiche rappresentate dai funghi e dagli archeobatteri, e delle popolazioni procariotiche associate ai batteri. I lavori precedentemente citati hanno utilizzato un approccio 'metabarcoding' andando ad analizzare la sola popolazione batterica. Il nostro approccio è innovativo e ci ha fornito una visione olistica di tutta la comunità presente nel suolo. In questo lavoro di tesi ci siamo concentrati sulla analisi delle popolazioni fungine e batteriche.

L'analisi complessiva delle popolazioni microbiche evidenzia una somiglianza tra i diversi siti in relazione alle tesi analizzate, suggerendo che il campionamento realizzato è stato effettuato correttamente. Il metodo utilizzato ci ha consentito di individuare più di 8.000 specie batteriche e più di 600 specie fungine. È noto che il numero delle specie batteriche del suolo è superiore a quello fungino (Chen Y. et al 2022). Tuttavia, non possiamo escludere che i database utilizzati nello studio possano essere carenti per quanto riguarda l'identificazione delle specie fungine. L'aggiornamento dei database avviene periodicamente, quindi non è escluso che in un'indagine successiva possa essere individuato un numero maggiore di specie fungine. Tuttavia, il nostro studio ha prodotto un numero molto limitato di sequenze non definite.

Complessivamente, il nostro studio ha mostrato una maggiore somiglianza tra le comunità batteriche e fungine presenti nell'area fuori pianello delle piante produttive e le comunità microbiche riscontrate nel suolo associato alle piante non produttive. Questa osservazione può essere dovuta alla presenza di una vegetazione erbacea in queste due aree, che le differenzia dalla zona del pianello, sottolineando la forte relazione tra le radici delle piante erbacee e i microrganismi del suolo.

Per quanto riguarda la comunità fungina è interessante notare che la presenza di *T. melanosporum* è predominante nel suolo di due delle quattro piante produttive

mentre quasi assente nelle altre due. Questo risultato è in linea con la produttività delle piante osservata nella stagione 2024, che ha evidenziato la produzione di tartufo solo nelle due piante con predominanza di *T. melanosprum*. Ciò suggerisce che il tipo di indagine può essere predittiva della produttività del tartufo.

Relativamente ai funghi, il phylum predominante in tutte le aree è quello degli Ascomyceti, a seguire ritroviamo in tutte le tesi i Basidiomiceti. È interessante la presenza più numerosa del phylum Mucoromycota relativo al gruppo delle endomicorrize, che sono associate alle radici delle piante erbacee (Smith e Read, 1997). Analizzando le specie fungine più presenti, risulta che il suolo fuori pianello e delle piante improduttive mostra una maggiore quantità di funghi potenzialmente patogeni come i generi *Fusarium*, *Alternaria* e *Penicillium*. Questo non sorprende, poiché è noto che i funghi micorrizici competono per le nicchie ecologiche con i funghi patogeni (Bebber D.P. et al., 2022).

È interessante osservare una presenza importante di una specie micorrizica associata alle radici delle piante erbacee, tra le più presenti nei suoli coltivati, relativa a *Rhizophagus irregularis*, nell'area fuori pianello, mentre non è dominante nelle piante improduttive nonostante la presenza delle piante erbacee. Questo aspetto dovrebbe essere approfondito per chiarire se esiste una correlazione tra l'improduttività delle piante inoculate con *T. melanosporum* e l'assenza di funghi benefici micorrizici. Inoltre, tra i funghi maggiormente presenti solo nel suolo delle piante non produttive troviamo *Truncatella angustata*, riconosciuta per avere un ruolo sia endofitico che patogeno (Błaszczuk L. et al., 2021).

Per quanto riguarda il regno dei batteri predominano due phyla, il primo è quello dei Pseudomonadota, relativo a batteri gram-negativi che include un'ampia varietà di generi patogeni anche per l'uomo, come *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Legionella* (Garrity et al., 2021), e il secondo è quello degli Actinomycetota, costituito da batteri gram-positivi, spesso benefici per l'ambiente, che hanno un'importanza cruciale per le foreste e l'agricoltura in quanto aiutano a decomporre la materia organica (Ghai et al., 2011). È interessante osservare che gli Actinomycetota sono maggiormente presenti nel suolo all'interno del pianello, anche se le differenze con le altre tipologie di suolo non sono significative. Interessante tra le specie maggiormente presenti, abbiamo individuato quelle incluse nel genere

Bradyrhizobium. Questo genere predomina in tutti i suoli ma in modo particolare nell'area fuori pianello, mentre è meno presente nell'area del pianello. Il genere *Bradyrhizobium* è stato indicato come predominante all'interno dei corpi fruttiferi prodotti dal genere *Tuber* (Benucci et al., 2016; Liu et al., 2021; Monaco et al 2022) ed è utilizzato in diversi sistemi di allevamento delle piante tartufigene come coadiuvante la micorrizzazione (Amicucci et al., 2018; Giorgi et al., 2024). Le nostre indagini supportano i precedenti studi. Tuttavia, la minore presenza del genere *Bradyrhizobium* nel suolo del pianello non deve sorprendere, in quanto si tratta di un genere a cui appartengono specie azotofissatrici e 'mycorrhizal helper', quindi maggiormente associati alle radici delle piante (Zahran et. al., 1999) . Con lo stesso ruolo abbiamo individuato la presenza importante delle specie associate al genere *Microvirga* (Herrero de Aza et al, 2022). Interessante con una maggiore uniformità quantitativa tra le differenti tesi. Ciò suggerisce che la comunità microbica all'interno del pianello potrebbe selezionare la tipologia e quantità di microrganismi presenti. L'analisi di quali batteri e in che quantità sono presenti nei corpi fruttiferi potrebbe chiarire questa ipotesi. Attualmente possiamo evidenziare che altri generi sono maggiormente presenti nel suolo all'interno del pianello come specie del genere *Archangium* indicatori significativi di produttività *Boletus edulis* (Mediavilla et al., 2019), o specie del genere *Blastococcus* associato a *T. aestivum* Monaco et al 2020). Interessante lo studio differenziale che mostra nel confronto tra le comunità batteriche presenti all'interno del pianello rispetto al suolo delle piante non produttive specie appartenenti al genere *Hymenobacter* e *Rubrobacter*. Quest'ultimo è stato segnalato tra i gruppi predominanti nell'area del pianello in *T. melanosporum* (Mello et al., 2013). Altri generi come *Arthrobacter* *Pseudarthrobacter* e *Hymenobacter* sono predominanti nel pianello rispetto al suolo fuori pianello. Facendo emergere il genere *Hymenobacter* come quello significativamente presente nel suolodel pianello sia a confronto con l'area fuori pianello che quella delle piante improduttive. Queste sono informazioni nuove che necessitano di un ulteriore approfondimento. Molto interessante ed innovativo è lo studio funzionale dei geni identificati nella comunità microbica complessiva. In particolare abbiamo evidenziato una maggior presenza di geni associati al metabolismo dei carboidrati nell'area all'interno del pianello. Questo risultato potrebbe essere associato

all'attività micorrizica svolta dal *T. melanosporum*. E' noto che con la simbiosi micorrizica il fungo acquisisce zuccheri dalla pianta. Interessante notare che più elevata è la presenza di geni associati ai processi di ricombinazione e replicazione nei microrganismi associati al pianello suggerendo un elevata attività metabolica.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdelfattah, A., Malacrino, A., Wisniewski, M., Cacciola, S.O., Schena, L. (2016)). Metabarcoding: A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies. *Biological Control*, 120: 1-10. doi:org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.009
2. Amicucci, A., Barbieri, E., Sparvoli V., Gioacchini A.M., Calcabrini C., Palma F., Stocchi V., Zambonelli A. (2018). Microbial and pigment profile of the reddish patch occurring within *Tuber magnatum* ascomata. *Fungal Biology*122:1134-1141.
3. Antony-Babu, S., Deveau, A., Van Nostrand, J.D., Zhou, J., Le Tacon, F., Robin, C., Frey-Klett, P., Uroz, S. Black truffle-associated bacterial communities during the development and maturation of *Tuber melanosporum* ascocarps and putative functional roles. *Environ Microbiol.* (2014) Sep;16(9):2831-47. doi: 10.1111/1462-2920.12294. Epub 2013 Nov 1. PMID: 24118660.
4. Aspray, T.J, Frey-Klett, P., Jones, J.E., Whipps, J.M., Garbaye, J., Bending, G.D. Mycorrhization helper bacteria: a case of specificity for altering ectomycorrhiza architecture but not ectomycorrhiza formation. *Mycorrhiza.* (2006);16(8):533-541. doi: 10.1007/s00572-006-0068-3. Epub 2006 Sep 16. PMID: 16983568
5. Bagnacavalli, P., Capecchi, M., Zambonelli, A. (2012). Al via la certificazione delle piante tartufigene. *Agricoltura* 4:12-13. file:///C:/Users/Alessandra/Downloads/al-via-la-certificazione-delle-piante-tartufigene%20(3).pdf

6. Barbieri, E., Bertini, L., Rossi, I., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Guidi, C., Zambonelli, A., Stocchi V., (2005) Nuove evidenze per la diversità batterica nell'ascoma del fungo ectomicorrizico *Tuber borchii* Vittad., *FEMS Microbiology Letters*, Volume 247, Issue 1, <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.027>
7. Bebber, D.P., Chaloner, T.M. (2022) Specialists, generalists and the shape of the ecological niche in fungi. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.18005.
8. Benjamin, A.S. (2010). When do arbuscular mycorrhizal fungi protect plant roots from pathogens?, *Plant Signaling e Behavior*, 5:763-765.
9. Benucci, G.M., Bonito, G., Marozzi, G., Sánchez, S., Falini, L.B., Albertini, E., Donnini, D. (2017) Mycorrhization of pecan (*Carya illinoensis*) with black truffles: *Tuber melanosporum* and *Tuber brumale*. *Mycorrhiza*. 2017 (3):303-309. doi: 10.1007/s00572-016-0743-y. Epub 2016 Nov 12. PMID: 27838857.
10. Berdeni, D., Cotton, T.E.A., Daniell, T.J., Bidartondo, M.I., Cameron, D.D. Evans, K.L. (2018). The Effects of Arbuscular mycorrhizal fungal colonisation on nutrient status, growth, productivity, and canker resistance of apple (*Malus pumila*). *Frontiers in Microbiology*. 9: 1461. doi: 10.3389/fmicb.2018.01461.
11. Bitterlich, M., Franken, P., Graefe, J. (2018). Arbuscular mycorrhiza improves substrate hydraulic conductivity in the plant available moisture range under root growth exclusion. *Frontiers in Plant Science*. 9: 301. doi: 10.3389/fpls.2018.00301.
12. Błaszczuk, L., Salamon, S., Mikołajczak, K. (2021) Fungi Inhabiting the Wheat Endosphere. *Pathogens*. doi: 10.3390/pathogens10101288.
13. Bonfante, P., and Anca, I. A. (2009). Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 363–383. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073504.

14. Bonfante, P., Genre, A. (2010) Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat Commun* 1, 48 (2010). <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>.
15. Bonfante, P., Venice, F. (2020). Mucoromycota: going to the roots of plant-interacting fungi. *Fungal Biol Rev* 34:100–113. doi: 10.1016/j.fbr.2019.12.003.
16. Cameron, D.D., Neal, A.L., Van Wees, S.C., Ton, J. (2013) Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends Plant Sci.* Oct;18(10):539-45. doi: 10.1016/j.tplants.2013.06.004. Epub 2013 Jul 18. PMID: 23871659; PMCID: PMC4194313.
17. Cantalapiedra, C., Hernández-Plaza, A., Ivica Letunic, I., Bork, P., Huerta-Cepas, J. (2021) eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 38, Issue 12, Pages 5825–5829, <https://doi.org/10.1093/molbev/msab293>.
18. Castrignanò, A., Goovaerts, P., Lulli, L., Bragato, G., (2000) A geostatistical approach to estimate probability of occurrence of *Tuber melanosporum* in relation to some soil properties. *Geoderma*, 98, 95-113.
19. Chen K., Pachter L. (2005). Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. *PLoS computational biology*, 1:e24. doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010024.
20. Chen, Y., Xi, J., Xiao, M., Wang, S., Chen, W., Liu, F., Shao, Y., Yuan, Z. (2022) Soil fungal communities show more specificity than bacteria for plant species composition in a temperate forest in China. *BMC Microbiol.* doi: 10.1186/s12866-022-02591-1.
21. Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., Sarniguet, A. (2011) Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol Mol Biol Rev.*;75(4):583-609. doi: 10.1128/MMBR.00020-11. PMID: 22126995; PMCID: PMC3232736.

22. Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clause, M.L., Courier, S., Le Roux, C., Raaijmakers, J., Martinotti, M.G., Pierrat, J.C., Garbaye, J. (2005). Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165: 317–328.
23. Frey-Klett, P., Uroz S, Calvaruso, C., Turpault, M.P., Pierrat, J.C., Mustin, C., (2007). Effect of the Mycorrhizosphere on the Genotypic and Metabolic Diversity of the Bacterial Communities Involved in Mineral Weathering in a Forest Soil. *Appl Environ Microbiol* 73: <https://doi.org/10.1128/AEM.00121-07>.
24. García-Montero, L.G., Kuyper, T., Moreno, D., Monleon, V., Myrold, D., Trappe, J., Baham, J., Valverde, I., Parladé, X., Álvarez, A., Benito, L.F., Quintana, J.R., Parke, J., Quintana, A., (2014). Could ectomycorrhizae perform “ecosystem engineering” on the host plant’s rhizosphere? In: J.A Bonet, 80 C. Colinas, X. Parladé (Eds.) *Proceedings of the Encuentro en Cataluña del proyecto Micosylva*. Centre Tecnològic Forestal de Catalunya, Lleida. Submitted.
25. García-Montero, L.G., Quintana, A., Valverde-Asenjo, I., Díaz, P., (2009). Calcareous amendments in truffle culture: a soil nutrition hypothesis. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 1227-1232
26. Garrity et al., (2022). *Pseudomonadota* t <https://doi.org/10.15468/c3kkgh> .
27. Giorgi, V., Amicucci, A., Landi, L., Castelli, I., Romanazzi, G., Peroni, C., Ranocchi, B., Zambonelli, A., Neri, D. (2024) Effect of bacteria inoculation on colonization of roots by *Tuber melanosporum* and growth of *Quercus ilex* seedlings. *Plants*, 13: 224. doi:10.3390/plants13020224.
28. Gryndler, M., Soukupová, L., Hřelová, H., Gryndlerová, H., Borovička, J., Streiblová E., et al. (2013). A quest for indigenous truffle-helper prokaryotes. *Environ. Microbiol. Rep.* 5 346–352.
29. Hodge, A., Robinson, D., Fitter, A.H. (2000). An arbuscular mycorrhizal inoculum enhances root proliferation in, but not nitrogen capture from, nutrient-rich patches in the soil. *New Phytologist* 145: 5–584.

30. Holt, R.R., Munafo, J.P. Jr., Salmen, J., Keen, C.L., Mistry, B.S., Whiteley, J.M., Schmitz, H.H. (2024) Mycelium: A Nutrient-Dense Food To Help Address World Hunger, Promote Health, and Support a Regenerative Food System. *J Agric Food Chem.* 7;72(5):2697-2707. doi: 10.1021/acs.jafc.3c03307.
31. Hyatt, D., Chen, GL., LoCascio, P.F. et al. (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11, 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>.
32. Iotti, M., Leonardi, M., Lancellotti, E., Salerni, E., Oddis, M., Leonardi, P., Perini, P., Pacioni, G., Zambonelli, A. (2014). Spatio-temporal dynamic of *Tuber magnatum* mycelium in natural truffle grounds. *PLoS ONE*. 9:e115921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115921>
33. La Reau, A.J., Strom, N.B., Filvaroff, E. Mavrommatis K, Ward T.L., Knights D. (2023) Shallow shotgun sequencing reduces technical variation in microbiome analysis. *Scientific Reports* 13: 7668. doi:org/10.1038/s41598-023-33489-1.
34. Lanfranco, L., Bonfante, P., Chialva, M., (2022) The plant microbiota: composition, functions, and engineering. *Curr Opin Biotechnol.* Feb;73:135-142. doi: 10.1016/j.copbio.2021.07.003. Epub 2021 Aug 12. PMID: 34392234.
35. Lanza, B., Oweczarek, M., De Marco, A., Raglione, M., (2004). Evaluation of phytotoxicity and genotoxicity of substances produced by *Tuber aestivum* and distributed in the soil using *Vicia faba* root micronucleus test. *Fresenius Environmental Bulletin*, 13, 1410-1414.
36. Li, D., Luo, R., Liu, C.M., Leung, C.M., Ting, H.F., Sadakane, K., Yamashita, H. and Lam, T.W., (2016). MEGAHIT v1.0: A Fast and Scalable Metagenome Assembler driven by Advanced Methodologies and Community Practices. *Methods*.

37. Linser, A., Cazzara, L., Barbieri, G. (2006). Rizobatteri promotori di crescita, una nuova opportunità per l'agricoltura sostenibile. *Fertilitas Agrorum*. 1:65-75
38. Malloch, D. W., et al. "Ecological and Evolutionary Significance of Mycorrhizal Symbioses in Vascular Plants (A Review)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 77, no. 4, 1980, pp. 2113–18. JSTOR, <http://www.jstor.org/stable/8610>
39. Mello A, Ding GC, Piceno YM, Napoli C, Tom LM, DeSantis TZ, Andersen GL, Smalla K, Bonfante P. Truffle brûlés have an impact on the diversity of soil bacterial communities. *PLoS One*. 2013 Apr 30;8(4):e61945. doi: 10.1371/journal.pone.0061945. PMID: 23667413; PMCID: PMC3640031.
40. Mello, A., Balestrini, R., (2018) Recent Insights on Biological and Ecological Aspects of Ectomycorrhizal Fungi and Their Interactions. *Front Microbiol*. 15;9:216. doi: 10.3389/fmicb.2018.00216. PMID: 29497408; PMCID: PMC5818412.
41. Mello, A., e Zampieri, E. (2017). Chi c'è là fuori? Cosa stanno facendo? Applicazione della metagenomica e della metaproteomica per rivelare il funzionamento del suolo. *Italian Journal of Mycology*, 46, 1–7. <https://doi.org/10.6092/issn.2531-7342/6647>.
42. Mello, A., Murat, C., Bonfante, P. (2006): truffe: much more than a prized and local fungal delicacy, «*FEMS Microbiology Letters* », 260, pp 1-8.
43. Mello, A., Zampieri, E., Zambonelli, A. (2017). Truffle Ecology: Genetic Diversity, Soil Interactions and Functioning. In: Varma, A., Prasad, R., Tuteja, N. (eds) *Mycorrhiza - Function, Diversity, State of the Art*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53064-2_11.
44. Menta, C., Garcia-Montero, L.G., Pinto, S., Conti, F.D., Baroni, G., Maresi, M. (2014). Does the natural "microcosm" created by *Tuber aestivum* affect soil microarthropods? A new hypothesis based on Collembola in truffle culture. *Applied Soil Ecology*, 84, 31-37.

45. Monaco, P., Toumi, M., Sferra, G., Tóth, E., Naclerio, G., Bucci, A. (2020) The bacterial communities of *Tuber aestivum*: preliminary investigations in Molise region, Southern Italy. *Annals of Microbiology*, 70:37. doi: 10.1186/s13213-020-01586-5.
46. Moritz, K., Schmidt, A., Moritz, F., Rosenkranz, M., Witting, M., Kasper, K., Janz, D., Kopplin, P.S.; Schnitzler, J.A., Polle, A. (2018). Mycorrhiza-triggered transcriptomic and metabolomic networks impinge on herbivore fitness. *Plant Physiology*. 176:2639-2656.
47. Niimi, j., Deveau, A., Splivallo, R., (2021) Aroma and bacterial communities dramatically change with storage of fresh white truffle *Tuber magnatum*, Volume 151, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112125>.
48. Pacioni G., (1991). Effects of *Tuber* metabolites on the rhizospheric environment. *Mycological Research*, 95 (12), 1355-1358
49. Paolocci, F., Rubini, A., Riccioni, C., Arcioni, S. (2006). Reevaluation of the life cycle of *Tuber magnatum*. *Appl Environ Microbiol*. doi: 10.1128/AEM.72.4.2390-2393.2006.
50. Partida-Martinez, L.P., Hertweck, C. (2005). Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. *Nature*. 6;437(7060):884-8. doi: 10.1038/nature03997. PMID: 16208371.
51. Patriarca A. (2019). Fungi and mycotoxin problems in the apple industry. *Current Opinion in Food Science*, 29:42–47. doi:org/10.1016/j.cofs.2019.08.002.
52. Pavić, A., Stanković, S., Marjanović, Ž. (2011). Biochemical characterization of a sphingomonad isolate from the ascocarp of white truffle (*Tuber magnatum* Pico). *Arch. Biol. Sci.* 63, 697–704. doi: 10.2298/ABS1103697P.
53. Pavić, A., Stanković, S., Saljnikov, E., Krüger, D., Buscot, F., Tarkka, M., et al. (2013). Actinobacteria may influence white truffle (*Tuber magnatum* Pico) nutrition, ascocarp degradation and interactions with other soil fungi. *Fungal Ecol.* 6, 527–538. doi: 10.1016/j.funeco.2013.05.006

54. Pérez-Pazos, E., Beidler, K.V., Narayanan, A., Beatty, B.H., Maillard, F., Bancos, A., Heckman, K.A., Kennedy, P.G. (2024) Fungi rather than bacteria drive early mass loss from fungal necromass regardless of particle size. *Environ Microbiol Rep.*;16(3):e13280. doi: 10.1111/1758-2229.13280.
55. Piculell, B., Hoeksema, J., Thompson, J. (2008). Interactions of biotic and abiotic environmental factors in an ectomycorrhizal symbiosis, and the potential for selection mosaics, *BMC Biology*, 6:23.
56. Pieroni, A. (2016). The changing ethno ecological cobweb of white truffle (*Tuber mangnatum* Pico) gatherers in South Piedmont, NW Italy. *Journal of Ethnobiology Ethnomedicine*. 12:18. doi:10.1186/s13002-016-0088-9
57. Pozo, M.J., Albrechtsen, B.R., Bejarano, E.R., de la Peña, E., Herrero, S., Martinez-Medina, A., Pastor, V., Ravnskov, S., Williams, M., Biere, A. (2020). Three-way interactions between plants, microbes, and arthropods (PMA): Impacts, mechanisms, and prospects for sustainable plant protection. *Teaching tools in plant biology: Lecture Notes. The Plant Cell* 32, 1–11.
58. Quince, C., Walker, A. W., Simposon, J. T., Ioman, N. J., Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature biotechnology*. 35: 833-844. doi: 10.1038/nbt.3935.
59. Raven, P. H., Evert, R. F., e Eichhorn, S. E. (2016). *Biology of plants*. 14th ed. New York, N.Y., Worth Publishers.
60. Romanazzi, G., Musetti, R., Marzachi, C., Casati, P. (2009). Induction of resistance in the control of phytoplasma diseases. *Petria*. 19 :113-129.
61. Shi, J., Wang, X., Wang, E., (2023) *Mycorrhizal Symbiosis in Plant Growth and Stress Adaptation: From Genes to Ecosystems*. *Annu Rev Plant Biol*. May 22;74:569-607. doi: 10.1146/annurev-arplant-061722-090342.
62. Smith, S.E. and Read, D.J. (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. 2nd Edition, Academic Press, New York.

63. Spatafora, J.W. Chang, Y. Benny, G.L. Lazarus, K. Smith, M.E. Berbee, M.L. Bonito, G. Corradi, N. Grigoriev, I. Gryganskyi, A. James, T.Y. O'Donnell, K. Roberson, R.W. Taylor, T.N. Uehling, J. Vilgalys, R. White, M.M. Stajich J.E. (2016) A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108, 1028-1046,
64. Splivallo R, Ebeler SE. Sulfur volatiles of microbial origin are key contributors to human-sensed truffle aroma. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015 Mar;99(6):2583-92. doi: 10.1007/s00253-014-6360-9. Epub 2015 Jan 10. PMID: 25573471.
65. Tringe, S.G., Rubin, E.M. (2005). Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nature reviews genetics*, 6(11), 805-814.
66. Vahdatzadeh, M., Deveau, A., Splivallo, R. (2019) The Role of the Microbiome of Truffles in Aroma Formation: a Meta-Analysis Approach. *Appl Environ Microbiol*. Oct;81(20):6946-52. doi: 10.1128/AEM.01098-15. Epub 2015 Jul 17. PMID: 26187969; PMCID: PMC4579448.
67. Veresoglou, Stavros e Chen, Baodong e Rillig, Matthias. (2012). Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. *Soil Biology and Biochemistry*. 46. 53-62. 10.1016/j.soilbio.2011.11.018.
68. Wahab, A., Muhammad, M., Munir, A., Abdi, G., Zaman, W., Ayaz, A., Khizar, C., Reddy, S.P.P. (2023) Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Regulating Growth, Enhancing Productivity, and Potentially Influencing Ecosystems under Abiotic and Biotic Stresses. *Plants (Basel)*. doi: 10.3390/plants12173102.
69. Weng, W., Yan, J., Zhou, M., Yao, X., Gao, A., Ma, C., Cheng, J., Ruan, J. (2022) Roles of Arbuscular mycorrhizal Fungi as a Biocontrol Agent in the Control of Plant Diseases. *Microorganisms*. 10(7):1266. doi: 10.3390/microorganisms10071266. PMID: 35888985; PMCID: PMC9317293.
70. Whipps, J.M. (2004). Prospect and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*. 82:1198-1227.

71. Wood, D.E., Lu, J. e Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol* 20, 257 <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>.
72. Wooley J.C., Godzik A., Friedberg I. (2010). A Primer on Metagenomics. *PLoS Comput Biol* 6: e1000667. [doi:org/10.1371/journal.pcbi.1000667](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000667).
73. Xu W., Chen T., Pei Y., Guo H., Li Z., Yang Y., Zhang F., Yu J., Li X., Yang Y., Zhao B., Wu C. (2021). Characterization of Shallow Whole-Metagenome Shotgun Sequencing as a High-Accuracy and Low-Cost Method by Complicated Mock Microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, 12: 678319. [doi:10.3389/fmicb.2021.678319](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.678319)
74. Zahran HH. (1999) Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev.* [doi: 10.1128/MMBR.63.4.968-989](https://doi.org/10.1128/MMBR.63.4.968-989)

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questa prima fase del mio cammino universitario, desidero esprimere la mia più sincera gratitudine a tutte le persone che hanno contribuito a rendere possibile questo importante traguardo.

Un ringraziamento particolare va alla professoressa Lucia Landi, relatrice di questa tesi, per la sua preziosa guida, per l'impegno e la passione con cui ha accompagnato il mio lavoro, e per i consigli che hanno arricchito questa esperienza.

Un sentito grazie al professor Sergio Murolo e al dottor Cristiano Peroni per la loro disponibilità, professionalità e gentilezza, sempre pronti a offrire supporto.

Il mio pensiero va anche alla mia famiglia, a mia mamma e a mio papà, che con il loro amore, la loro pazienza e il loro sostegno incondizionato hanno reso tutto questo possibile. Ringrazio mio fratello Daniele, sempre presente, il suo affetto e la sua vicinanza che non mi ha mai fatto sentire sola in questo percorso.

Infine, desidero ringraziare tutti i miei amici, compagni di studio e colleghi, che hanno condiviso con me fatiche e soddisfazioni, e che con la loro amicizia mi hanno sostenuto nei momenti più difficili. A tutti voi, grazie di cuore per aver reso questa tappa del mio percorso così significativa e indimenticabile.