



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

TECNICHE DI RECUPERO DI UNA TARTUFAIA A FINE CICLO PRODUTTIVO

RECOVERY TECHNIQUES OF A TRUFFLE ORCHARD
AT THE END OF THE PRODUCTION CYCLE

TIPO TESI: (sperimentale)

Studente:
IVAN CASTELLI

Relatore:
PROF. DAVIDE NERI

Correlatore:
DOTT.SSA GIORGI VERONICA

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

*A te che in ogni caso
avresti avuto qualcosa da ridire*

RIASSUNTO

La durata della produttività di una tartufaia è da sempre oggetto di importati attenzioni per i risvolti economici che ne derivano. Il crollo della produzione di corpi fruttiferi avviene ad una distanza di anni dalla messa a dimora delle piante che, seppur in funzione del sesto d'impianto scelto, risulta comunque inevitabile. Gli studi che hanno indagato questo fenomeno si sono concentrati su singoli aspetti (regime idrico, competizione con altre specie fungine e aumento dell'età della pianta ospite), trascurando invece le dinamiche del sistema in cui la pianta e il fungo sono inseriti. In questo scenario, la durata della produttività di un impianto può essere considerata in funzione della presenza di radici assorbenti - sedi del micelio fungino - che decresce nel tempo per l'esaurirsi di porzioni di suolo favorevoli da sfruttare da parte delle radici. Pertanto, lo scopo di questa indagine è stato quello di valutare il miglioramento della struttura di suolo di una tartufaia considerata a fine ciclo produttivo per stimolare una nuova formazione di radici assorbenti, attraverso l'apporto di sostanza organica matura arricchita con spore di *T. melanosporum*. Analizzando 166 campioni di suolo prelevati in due anni, sono state valutate le lunghezze della densità delle radici (RLD), sia assorbenti che pioniere, in relazione ai trattamenti ed ai controlli. I risultati mostrano una risposta graduale, in quanto si sono riscontrate maggiori radici pioniere nel primo anno e maggiori radici fini nell'anno successivo, dunque indicando un ritorno all'attività di assorbimento di nutrienti a scapito dell'esplorazione solo dopo il secondo trattamento. Pertanto, le ragioni del calo di produzione di radici fini nel tempo in un impianto di *Tuber melanosporum* sembrano protendere verso il sovrasfruttamento delle risorse nel suolo.

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno permesso di raggiungere questo ennesimo traguardo.

In primis la mia famiglia, che è sempre al mio fianco.

Il Prof. Davide Neri per l'opportunità che mi ha concesso.

La Dott.ssa Veronica Giorgi e tutti i ragazzi del laboratorio per i consigli e la disponibilità dimostratami.

SOMMARIO

SOMMARIO	3
ELENCO DELLE TABELLE.....	7
ELENCO DELLE FIGURE	8
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE:	10
1.1 LA TARTUFICOLTURA.....	10
1.2 TUBER MELANOSPORUM Vittad. (1831)	11
1.3 QUERCUS PUBESCENS Willd. (1805).....	13
1.4 LA BRUCIATA.....	14
1.5 ASPETTI NUTRIZIONALI	15
1.5.1 Studi di base e concimazioni.....	15
1.5.2 Sostanza organica	16
1.5.3 Pascolo.....	17
1.6 AMBIENTE NATURALE vs AMBIENTE COLTIVATO: DURATA E RESE.....	18
1.7 NICCHIA ECOLOGICA IN UNA TARTUFAIA	20
1.8 FUNZIONI E CLASSIFICAZIONE DELLE RADICI	23
1.9 ACCRESCIMENTO RADICALE.....	24
CAPITOLO 2 OBIETTIVI.....	25
CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI.....	26
3.1 AREA DI STUDIO.....	26
3.2 PROVA SPERIMENTALE	26
3.3 ANALISI DELLA BRUCIATA	29
CAPITOLO 4 RISULTATI	30
CAPITOLO 5 DISCUSSIONE	37
5.1 Accrescimento radicale.....	37
5.2 Valutazione della bruciata.....	39
CAPITOLO 6 CONCLUSIONI	40

APPENDICE I CICLO BIOLOGICO	41
APPENDICE II INOCULO SPORALE	42
BIBLIOGRAFIA	44

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1. Fattori ambientali di crescita di <i>T. melanosporum</i> con valori limite.	12
Tabella 2. Fattori ambientali e fisiologici caratterizzanti <i>Q. pubescens</i>	13
Tabella 3. Riepilogo delle caratteristiche della nicchia ecologica radicale e suo sfruttamento. Confronto tra fattori in tre differenti situazioni ambientali.	22
Tabella 4. Nomenclatura dei campionamenti.....	27

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1 Radice micorrizata di <i>Q. pubescens</i> . Viene evidenziata l'estensione ifale del fungo simbiote	2120
Figura 2. Rappresentazione grafica dello schema di applicazione della sostanza organica nei due anni di prova.....	27
Figura 3. Schema del prelievo dei campioni di suolo per pianta nei due anni di prova.....	287
Figura 4. Immagine dello strumento realizzato per la valutazione della bruciata.....	298
Figura 5. Confronto della densità di lunghezza delle radici (RLD) tra trattamenti. A = radici assorbenti, P = radici pioniere. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale (Tukey HSD test).	309
Figura 6. Rapporto radici assorbenti su radici pioniere tra i trattamenti. Controllo esterno = fuori dal blocco sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale (Tukey HSD test)	3130
Figura 7 Densità della lunghezza delle radici tra i trattamenti nelle due profondità. Controllo esterno = fuori dal blocco sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale (Tukey HSD test).....	321
Figura 8. Rapporto radici assorbenti / radici pioniere nello strato compreso tra 5 e 15 cm di profondità. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale. In giallo le aree trattate nell'anno (Tukey HSD test).....	31
Figura 9. Rapporto radici assorbenti / radici pioniere nello strato compreso tra 5 e 15 cm di profondità. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale. In giallo le aree trattate nell'anno (Tukey HSD test).....	32
Figura 10. Rapporto radici assorbenti / radici pioniere nelle tre distanze dal tronco nei i trattamenti. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale (Tukey HSD test).....	32

Figura 11. Rapporto radici assorbenti / radici pioniere a 100 cm dal tronco. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale. In giallo le aree trattate	nell'anno	(Tukey	HSD	
test).....				33
Figura 12. Rapporto radici assorbenti / radici pioniere a 150 cm dal tronco. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale. In giallo le aree trattate	nell'anno	(Tukey	HSD	
test).....				33
Figura 13. Rapporto radici assorbenti / radici pioniere a 2000 cm dal tronco. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale. In giallo le aree trattate	nell'anno	(Tukey	HSD	
test).....				34
Figura 14. Confronto tra trattamenti e controllo in relazione alla presenza di vegetazione nella bruciata (Tukey HSD test).....				35
Figura 15. Sviluppo annuale del carpoforo delle principali specie del genere Tuber. In rosso viene evidenziato il periodo di stress idrico estivo.....				40

Capitolo 1

INTRODUZIONE:

1.1 LA TARTUFICOLTURA

Fin dai secoli passati il tartufo ha suscitato interesse per le sue peculiarità: un prodotto della foresta che si sviluppa nel sottosuolo, edibile e capace di emanare intensi aromi. Oggetto di numerose attenzioni da parte degli studiosi delle varie epoche, oggi sembra non aver perso l'attrattiva di un tempo, al contrario, la sua diffusione commerciale oltre i confini europei ha aumentato la sua considerazione. Se fino al XVIII° secolo il tartufo più trovato e venduto è stato *Tuber aestivum*, dal XIX° secolo, *Tuber melanosporum*, o tartufo nero pregiato, ha fatto registrare un sorpasso nella raccolta, grazie alla promulgazione in Francia di leggi che hanno favorito l'insediamento di numerose tartufaie artificiali mediante la semina di ghiande o piantagioni di giovani alberi, ma anche alle osservazioni giudiziose dei primi pionieri con le loro iniziative di successo nella sua addomesticazione (Le Tacon, 2017; Sourzat 2017).

In Italia, nel 2012, si riteneva che dalle tartufaie coltivate arrivasse il 90-95% della produzione di tartufo nero pregiato, con un quantitativo medio annuo stimato intorno alle 80-100 tonnellate; mentre solo il restante 5-10% della produzione provenisse da tartufaie naturali (Gregori 2012). Quindi, appare evidente il ruolo che gli impianti artificiali rivestono nel sostegno del settore.

A tal fine, la regione Marche, a partire dalla metà degli anni '90, si è dotata di strumenti legislativi che hanno avuto lo scopo di favorire la creazione di nuovi impianti per la coltivazione del tartufo. Il primo strumento, in ordine di tempo, è stato il Regolamento CE 2080/92 (deliberato dal Consiglio regionale il 22/02/1994), che ha promosso l'imboschimento dei terreni agricoli con premi annui per la manutenzione e il mancato reddito. Il secondo strumento è stata la Misura H che era parte del PSR Marche 2000-2006. Il suo obiettivo era l'imboschimento e la diversificazione produttiva delle superfici agricole ai fini di una riduzione delle eccedenze alimentari, attraverso la conversione dei seminativi in superfici a bosco produttivo. Il terzo strumento, la Misura 2.2.1 (primo imboschimento di terreni agricoli) era contenuta nel PSR Marche 2007-2013. Essa si poneva come obiettivi la tutela, la salvaguardia e la valorizzazione del territorio, tutelando la qualità della risorsa idrica. In totale, la superficie di tartufaie destinate

alla coltivazione di tartufi finanziata con le tre misure è stata di circa 260 ettari (fonte Agenzia per l’Innovazione nel Settore Agroalimentare e della Pesca "Marche Agricoltura Pesca" - AMAP).

1.2 TUBER MELANOSPORUM Vittad. (1831)

Il tartufo nero pregiato di Norcia, o anche tartufo nero del Perigord, è un fungo appartenente all’ordine Pezizales, famiglia Tuberaceae. Forma una ectomicorriza, cioè un organismo che vive in un rapporto di simbiosi mutualistica con l’apparato radicale della pianta ospite (Martin et al. 2016). In Europa è naturalmente presente in un areale geografico compreso tra i 40° e 48° di latitudine nord (Le Tacon 2016), ma come ormai noto, la sua coltivazione si è estesa anche a territori extra europei come: Australia, Sud Africa, Stati Uniti, Cile (Hall et al. 2007). Predilige un clima mediterraneo, ma tollera un clima oceanico o continentale purché moderato. I fattori limitanti per la sua distribuzione sono due: clima e suolo. È molto sensibile alle basse temperature, infatti non lo si trova sopra i 1,100m di altitudine in clima mediterraneo; pur essendo il più xerofilo tra le specie del genere *Tuber* soffre la siccità estiva se marcata. Sembra probabile che il contrasto di temperatura tra le stagioni sia importante per l’inizio della fruttificazione (Le Tacon 2016). Predilige suoli con pH superiore a 7, anche se nelle zone dei Pirenei ci sono ritrovamenti in condizioni di pH fino a 5,5. Invece, risulta essenziale un complesso adsorbente saturo o parzialmente saturo di calcio o magnesio (Jaillard et al. 2014). In tabella 1 sono riportati i principali fattori ambientali di crescita di *T. melanosporum* con i relativi valori ripresi dalla letteratura.

Il tartufo nero sembra essere associato a tutte le specie arboree in grado di formare ectomicorrize, anche se le specie maggiormente utilizzate per la sua coltivazione sono poche, ed in particolare nei climi mediterranei sono principalmente due: la roverella (*Q. pubescens* L.) e il leccio (*Q. ilex* L.). Il nocciolo (*Corylus avellana* L.) risulta invece più adatto nelle zone settentrionali dell’areale di distribuzione. Non sembrano esserci differenze di produzione tra le varie specie, pertanto la scelta dell’albero si basa su valutazioni che tengono conto dell’idoneità del sito di riferimento (Le Tacon 2017).

Tabella 1. Fattori ambientali di crescita di *T. melanosporum* con valori limite.

AUTORI	Profondità del suolo (cm)	Scheletro %	Dimensione aggregati del suolo (mm)	pH	Carbonati %	Calcare attivo %	Sostanza organica %	C / N	Azoto totale %	Fosforo
Jaillard 2016	30 – 50									
Bencivenga 1990 Delmas 1981 Reyna 2000		8 – 90 0 – 75 0 – 90								
Lulli 1999 Ricard 2003			1 – 2 0,25 – 2							
Raglione e Owczarek 2005 Bencivenga 1990 Bencivenga 2012				7,5 – 8,4 7,05 – 8,25 7,5 – 8,2						
Bencivenga 1990 Palazon 2008 Bencivenga 2012					0 – 84 29 0 – 69					
Palazon 2008 Chiucchiarelli 2008						2 – 15 2 – 14				
Bencivenga 1990 Poitou 1990							1 – 17 1 – 8			
Bencivenga 1990 Poitou 1990								10 – 26 8 – 11		
Bencivenga 1990 Poitou 1990 Chiucchiarelli 2008									0,08 – 0,5 0,1 – 0,3 0,14 – 1,57	
Saez 1991 Bencivenga 1990 Poitou 1990 Chiucchiarelli 2008										< 18 (mg Kg ⁻¹) 24 – 102 (Kg ha) 1 – 3 ‰ 4 – 72 (ppm)

1.3 QUERCUS PUBESCENS Willd. (1805)

Q. pubescens, o roverella, è tra i più comuni ospiti che si associano alle diverse specie di tartufo in natura. Attualmente è tra le principali specie scelte nella realizzazione di tartufaie artificiali. Cresce naturalmente dal livello del mare fino a 1.300m, ma è molto comune lungo i pendii collinari tra i 200 e 800m formando i tipici boschi di latifoglie del sud Europa (Pasta et al., 2016). Da un punto di vista economico viene sfruttata principalmente come legname da ardere; pertanto, l'attenzione che ha ricevuto dalla comunità scientifica si è concentrata primariamente sulla genetica di popolazione (Bruschi et al., 2000; Salvini et al., 2009) e sulle risposte a stress ambientali (siccità e incendi) (Haldimann et al 2008; Di Iorio 2011; Gričar 2020). Tuttavia, benché sia impiegata in tartuficoltura sin dalla creazione dei primi impianti artificiali, il suo comportamento in ambito agronomico non ha avuto altrettanta attenzione.

Tabella 2. Fattori ambientali e fisiologici caratterizzanti *Q. pubescens*.

*Pasta et al. 2016; **Timbal e Aussenac 1996.

Dimensioni*	15 – 20 m
Altitudine*	0 – 1,200 m
Fioritura*	Marzo - maggio
Maturazione frutto*	Settembre - novembre
Temperatura ottimale media**	13° C
Resistenza al freddo max**	-30° C
Precipitazioni medie annue**	600 – 900 mm
Resistenza alla siccità**	Buona
Suolo*	Ricchi di calcare e ben drenati (nord dell'areale) Acidi (sud dell'areale)
Comportamento*	Eliofilo e termofilo
Suscettibilità a stress*	Alta (tagli, incendi, pasco)
Attitudine al germogliamento*	Scarsa

1.4 LA BRUCIATA

Le bruciate sono aree con limitata vegetazione erbacea o anche arbustiva attorno al tronco di alberi o arbusti (querce, nocciole, faggi, cisti, ecc.) in cui le radici sono colonizzate da tartufi e formano micorrize. Queste aree sono molto spesso indicatrici di produzione di tartufi, sebbene non sia sempre vero. *Tuber melanosporum* è la specie che induce le bruciate più evidenti. *Tuber indicum*, *T. aestivum* e *T. brumale* causano bruciate più discrete, mentre *Tuber magnatum* non sembra produrre bruciate. Nelle tartufaie spontanee di *Tuber melanosporum* le bruciate sono poco presenti, sia perché c'è poca vegetazione spontanea di accompagnamento, sia perché la proporzione di micorrize nei tartufi è bassa; tuttavia, in ambiente spontaneo, quando prevalgono le micorrize del tartufo, le bruciate sono molto visibili e possono anche apparire in prati aperti a diversi metri o decine di metri dal tronco dell'albero le cui radici portatrici di micorrize hanno raggiunto porzioni di prato. Nelle tartufaie artificiali il più delle volte compaiono da tre a cinque anni dopo la piantagione e si estendono in cerchio attorno all'albero o all'ospite, diffondendosi di anno in anno più o meno irregolarmente circa una decina di centimetri all'anno. Questa estensione segue esattamente lo sviluppo della radice con micorrize di *T. melanosporum*. A volte le bruciate si staccano dal cerchio se le radici con micorrize sono fuoriuscite dall'area centrale. Tuttavia, se le radici sono colonizzate da altre specie fungine le bruciate non compaiono o sono poco evidenti (Le Tacon 2017). Alcuni autori hanno dimostrato che solo poche specie vegetali resisterebbero alla bruciata e che alcune specie sarebbero buoni indicatori di produzione di tartufo come *Sedum altissimum*, *Festuca ovina* o *Hieracium pilosella*. Sembra molto probabile che il micelio del tartufo nel suolo e gli ascocarpi producano composti volatili che influenzano la germinazione dei semi delle piante infestanti, con effetti fitotossici sulle piantine germinate e causando necrosi delle radici (Splivallo et al., 2007).

1.5 ASPETTI NUTRIZIONALI

1.5.1 *Studi di base e concimazioni*

Su questo argomento in letteratura si possono confrontare posizioni discordanti. Ad atteggiamenti conservativi (Olivera et al. 2011; Le Tacon 2017) si contrappongono proposte più interventistiche (Suz et al. 2010; Oliver et al., 2018). Di conseguenza, per tentare di fare un punto, è bene partire da quelli che sono gli elementi base del sistema pianta-micorriza-suolo. Le ectomicorrize del genere *Tuber* si collocano in ambiente forestale, il quale è caratterizzato dalla presenza di suoli con fertilità minerale bassa. Infatti, nei terreni dove è naturalmente presente *T. melanosporum*, la concentrazione di fosforo è generalmente inferiore a 18 mg kg^{-1} (Saez e De Miguel 1995). Sono noti i ruoli delle ectomicorrize nello svolgere importanti funzioni nell'assimilazione del fosforo per la pianta ospite; queste avvengono attraverso: (i) la mobilizzazione di forme poco solubili di fosforo (attraverso escrezione di fosfatasi defosforilanti, escrezione di protoni, o escrezione di radicali organici acidi); (ii) l'aumento del volume di suolo esplorato dalle ife miceliali e successiva traslocazione del fosforo sequestrato alla radice dell'albero ospite (Le Tacon 2017). Oltre al ruolo del fosforo, la decifrazione del genoma (Martin et al. 2010) ha mostrato come, benché siano stati persi quasi tutti i geni che permettono la degradazione di cellulosa, emicellulosa e lignine, le ectomicorrize siano in grado di frammentare la materia organica e di espellere le proteasi nel mezzo, così da mobilitare azoto da proteine del suolo o da proteine polifenoliche (Lindahl e Tunlid 2015). Pertanto, le ectomicorrize hanno anche un ruolo importante nel fornire azoto alla pianta ospite. A queste indagini si affiancano studi che hanno valutato le conseguenze sul fungo degli apporti minerali. Per le micorrize vescicolo-arbuscolari, Balzergue et al. (2013) hanno studiato gli effetti di aggiunte di fosfato sul fungo, sulle radici e sugli essudati radicali. Questi esperimenti hanno rivelato che le conseguenze più importanti dell'elevato apporto di fosfato erano sulle radici stesse, che diventavano incapaci di ospitare funghi micorrizici. Su *T. melanosporum* in Australia, Bradshaw (2005) ha mostrato come un'aggiunta di fosforo insolubile sotto forma di apatite ha ridotto la percentuale di colonizzazione delle radici da parte del fungo. Ancora Bradshaw (2005) ha rilevato come l'apporto di concimi (Fructitruf®, Phaligal®, Vegethumus® o Lombrisol®) possa ridurre il numero e le dimensioni dei corpi fruttiferi di *T. melanosporum*. Sempre in Australia, Eslick (2017) ha riscontrato effetti negativi della fruttificazione di *T. melanosporum* a seguito di apporti di azoto. Quindi, appare evidente che la presenza di micorrize è fortemente legata alla componente minerale, in particolare a

fosforo e azoto: più queste aumentano, più la percentuale di micorrize diminuisce (Marx et al., 1977). Quindi concimazioni minerali e materia organica ricca di azoto o fosforo (Fructitruf®, Phaligal®, Vegethumus®, Lombrisol® o letame fresco) dovrebbero essere evitate (Chevalier 1995; Bradshaw 2005; Le Tacon 2017). Va ricordato che i terreni usati per la realizzazione di tartufaie sono principalmente ex-seminativi, i quali con buona probabilità hanno ricevuto ricche concimazioni nel corso degli anni. Come sappiamo, fosforo e potassio sono elementi poco mobili, e i generosi apporti effettuati con le concimazioni garantiscono buone dotazioni ai suoli, tali da non giustificare altre aggiunte. Inoltre, anche nel caso dell'azoto la disponibilità già presente nei suoli sembra essere sufficiente (Le Tacon 2017). Diversamente, potrebbero essere favorevoli apporti localizzati di materia organica con il solo scopo di migliorare la struttura del suolo, essendo la struttura la componente più importante per un suolo produttivo di tartufo nero pregiato (Jaillard et al. 2016).

1.5.2 Sostanza organica

C'è una stretta relazione tra sostanza organica, pH, calcio in soluzione e complesso assorbente nei suoli produttivi di *Tuber melanosporum* (Jaillard et al., 2016; Le Tacon 2017). Come noto, i valori di pH in soluzione sono soggetti ad oscillazioni. I fattori che possono portare ad un abbassamento sono diversi: la CO₂ proveniente dall'atmosfera o dalla componente biologica, la liberazione di protoni da parte di microrganismi, gli anioni liberati nel suolo come i fosfati o nitrati. Ma una componente molto importante nella produzione di acidi nei suoli deriva dal rilascio di essudati radicali e dalla sostanza organica che dissolvendo rilascia numerosi acidi organici (alifatici, aminoacidi, citrici, malici, complessi, policondensati, polimeri anionici, ecc). In suoli con buon contenuto di carbonati, questi acidi contribuiscono alla dissoluzione dei carbonati, di conseguenza all'aumento della concentrazione di calcio nella soluzione circolante. Infatti, negli orizzonti organici, il contenuto di calcio in soluzione è corrispondente al contenuto di sostanza organica totale (Le Tacon 1976). Questo aspetto risulta di notevole importanza, perché sappiamo che il calcio in soluzione circolante, incontrando lo ione fosfato, formerà fosfato di calcio (nelle sue varie forme a seconda della quantità di calcio disponibile), la quale è una forma di difficile utilizzo da parte della radice, ma non per il fungo. In questa situazione, la micorrizza, grazie all'escrezione di radicali organici, è in grado di liberare lo ione fosfato rendendolo disponibile alla pianta (Cao et al., 2015). Modificazioni indotte dalla sostanza organica si ritrovano anche nella mineralizzazione dell'azoto, in quanto diminuisce la disponibilità di azoto ammoniacale, non a causa della nitrificazione, ma a causa della diminuzione della mineralizzazione

dell'azoto (ammonificazione) (Le Tacon 1978). Si può quindi mettere in evidenza una relazione tra contenuto di sostanza organica e contributo delle micorrize nell'approvvigionamento degli elementi della nutrizione da parte della pianta ospite (Le Tacon 2016; Lindahl e Tunlid 2015).

1.5.3 *Pascolo*

La tartuficoltura associata a pastorizia è una pratica che saltuariamente si può riscontrare in impianti (per lo più condotti a livello amatoriale), ma che è stata altresì proposta in letteratura (Oliver et al., 2018). Anche a questo riguardo dovrebbero essere osservati necessari accorgimenti. Solitamente si riscontrano due scenari: un pascolo con finalità migliorative prima della messa a dimora delle giovani piante, e un pascolo su tartufaia già in età produttiva. Per esaminare il primo caso, a titolo di esempio si riporta una comunicazione orale fornita dal dott. Gregori Gianluigi, il quale, concordemente con diversi testimoni locali, ha riferito di un caso nel nord delle Marche di produzioni straordinarie di tartufo su un terreno precedentemente adibito a pascolo non intensivo. A seguito del fatto, alcuni tartuficoltori ben disposti a prendere spunto dall'avvenimento, avevano utilizzato come sito per un nuovo impianto un appezzamento con caratteristiche simili, ma sottoposto ad un pascolo altamente intensivo. I risultati furono molto deludenti. “E' la dose che fa il veleno”, commentava lo studioso a conclusione dell'aneddoto. Questa testimonianza sembra in linea con quanto è stato esposto in precedenza. Infatti, l'alta produttività del pascolo leggero, si può spiegare con l'alto apporto di nutrienti fornito delle deiezioni che si sono incorporate al terreno, così un elemento molto presente come il fosforo (Cavigelli e Thien 2003) si è potuto mobilizzare facilmente con il calcio in soluzione formando il complesso difficilmente aggredibile dalla pianta. Il successivo avvento di piante con micorrize ha permesso un'efficace espressione dell'attività dell'organismo simbiote. Tuttavia, nel secondo caso, la forte pressione del pascolo non avrebbe creato condizioni favorevoli al tartufo. Nonostante un maggiore apporto di nutrienti nel sistema, l'alto sfruttamento avrebbe causato una forte riduzione della sostanza organica (necessaria come detto per mandare il calcio in soluzione) e provocato un compattamento del suolo (estremamente svantaggioso). Di conseguenza, nel secondo caso, risulta ipotizzabile una scarsa creazione delle condizioni che favoriscono l'instaurarsi dell'associazione pianta-fungo. Per quanto riguarda proposte di pascolo diretto su una tartufaia già in età produttiva (Oliver et al., 2018), tali attività dovrebbero necessariamente garantire un impatto estremamente ridotto, se non essere totalmente evitate (Robin et al. 2016), in quanto una condizione primaria per la funzionalità della micorriza è la buona struttura del suolo unita ad una buona areazione: la

prima per favorire la formazione del carpoforo, la seconda per garantire l'alta richiesta di ossigeno da parte delle micorrize (Jaillard et al. 2016). Quindi circostanze che non coincidono con le conseguenze di un pascolamento.

Pertanto, un pascolo leggero può rappresentare una base di partenza per una tartufaia a patto che avvenga prima della messa a dimora delle piante. Ciononostante, in tartufaie già produttive dove il suolo risulta ormai quasi del tutto sfruttato, il letame, se maturo, con aggiunta di ascospore di tartufo, potrebbe rappresentare un valido aiuto a patto che venga impiegato con una distribuzione localizzata, quindi non diffusa, con apporti effettuati a più riprese con lo scopo di rinnovare singole porzioni di suolo. Questa pratica culturale è ben nota in agronomia e potrebbe favorire il mantenimento della struttura del suolo nelle tartufaie. Tuttavia, è bene sottolineare la differenza della letamazione con inoculo, con un'altra pratica definita come "fosse per tartufi", che vede l'aggiunta di torba in buche scavate anche a grandi profondità. Scopo di quest'ultima è massimizzare le rese di impianti in piena produzione, scopo della letamazione con inoculo è ricreare un ambiente favorevole al rinnovo radicale per estendere la durata produttiva dell'impianto.

1.6 AMBIENTE NATURALE vs AMBIENTE COLTIVATO: DURATA E RESE

La durata della produttività di una tartufaia è da sempre oggetto di importate attenzioni per le conseguenze economiche che ne derivano. Le spiegazioni avanzate per motivare il calo di produzione si sono focalizzate sull'analisi di singoli aspetti: regime idrico, competizione con altre specie fungine e aumento dell'età della pianta ospite (Le Tacon 2017; Oliveir 2018); nessuno però ha finora usato un approccio d'indagine che adotti un punto di vista più ampio, *sensu* olistico (Tansley 1935), che quindi tenga conto del contesto ecosistemico di riferimento in cui la pianta e il fungo sono inseriti. In questo scenario, si può ipotizzare che le relazioni che si instaurano tra i due soggetti siano suscettibili alle interazioni con l'ambiente circostante. A tale scopo, si può partire confrontando due ambienti distinti in cui il tartufo può essere raccolto: quello spontaneo e quello artificiale. Le tartufaie spontanee sono popolazioni naturali di specie vegetali in grado di produrre carpofori del genere *Tuber*. Riferendoci a *Tuber melanosporum*, in ambiente mediterraneo sono tipicamente boschi di roverella o leccio alla quale si aggiungono specie arbustive simbiotiche con il genere *Tuber* come *Cistus incanus*, e altri arbusti non simbiotici come *Crataegus monogyna* o *Spartium junceum*, ma che sono

comunque buoni indicatori di idoneità di un terreno ad ospitare il tartufo nero pregiato (Gryndler 2016). Questa cenosi, ossia comunità di specie diverse, garantisce all'ecosistema una sopravvivenza e una stabilità nel lungo periodo. L'alta varietà biologica tipica di questi sistemi si riflette anche nel sottosuolo, dove apparati radicali diversi coesistono generando la complessità tipica degli ambienti naturali. Le radici infatti occupano porzioni di terreno, ovvero nicchie, che condividono con altri organismi e selettivamente con altre radici. La selettività è una conseguenza del funzionamento fisiologico della radice. Infatti, durante l'assorbimento, la radice emette degli essudati e arricchisce la nicchia di residui che agiscono come marcatori chimici del territorio, un segnale di presenza, utile per limitare la concorrenza con possibili apparati competitori che vengono allontanati (allelopatie negative o dispatie) ma anche per informare la pianta stessa di avvenuto sfruttamento delle risorse (autopatie) e altre piante affini (allelopatie positive o eupatie) della favorevole liberazione della nicchia (Zucconi 1996). Ne consegue una continua ricerca che spinge la radice verso nuovi territori da esplorare, e quindi da sfruttare, ma anche un arricchimento di sostanza organica nelle aree di suolo già sfruttate dovuta alla presenza di radici morte e quindi un arricchimento di residui di varia origine. In un ambiente naturale, è alta l'eterogeneità delle specie che lo compongono e la radice normalmente non trova ostacoli continui dovuti alla presenza della propria specie o di specie disaffini (autopatie e dispatie), tali da impedire il suo percorso, ma solo nicchie temporaneamente occupate da evitare, o nicchie, abbandonate da specie affini, da occupare (eupatie). Questo si ripercuote sulla dinamica della micorizzazione e di conseguenza sulla produzione di tartufi. Infatti, in ambienti naturali, non è raro trovare carpofori anche a decine di metri di distanza dal tronco della pianta simbiote (Zambonelli 2016).

Al contrario, questo non è possibile in un ambiente coltivato, dove la raccolta è sempre confinata entro un limite dato dal sesto d'impianto adottato, in condizioni di ridotta diversità. La ragione della prossimità della produzione dei carpofori è da imputare alla mancanza di complessità nel sistema e quindi alla notevole omogeneità biologica delle specie vegetali che lo compongono. Infatti, una monocoltura è caratterizzata da una marcata delimitazione degli apparati radicali, i quali sono impossibilitati nel superare quelli della pianta adiacente. Si crea così un vaso allelopatico, ossia un contenitore delimitato da segnali chimici prodotti da piante limitrofe (Zucconi 1996). Pertanto, una giovane pianta appena trapiantata in un suolo, in assenza di concorrenza, non avrà problemi nel colonizzare lo spazio che le è stato reso disponibile, potrà farlo fino a quando incontrerà l'apparato radicale della pianta confinante. Tuttavia, nel caso di una monocoltura arborea, dove gli alberi sono disposti a distanze prossimali, l'incontro degli apparati radicali sarà precoce, e rappresenta un momento cruciale

per l'avanzamento della radice che risulterà molto limitato. Il risultato è un modesto sviluppo di radici assorbenti (Zucconi 1996), ed essendo queste la dimora del micelio, ne deriva un livello decrescente nel tempo di radici con micorrize e quindi una riduzione della produzione dei corpi fruttiferi, fino al collasso. Tale momento segna l'esaurimento del ciclo produttivo di una tartufaia artificiale. Gli spazi da sfruttare possono essere maggiori nel caso si scelgano di adottare sestri d'impianto ampi, ma questo si tradurrà in un numero di piante inferiore per superficie coltivata, con ripercussioni sul quantitativo annuo di prodotto raccolto. Pertanto, la durata della produttività di un impianto è in funzione dello spazio di suolo da occupare, che si esaurirà inevitabilmente nei 20-30 anni successivi dalla messa a dimora delle piante.

Importanti differenze tra i due ambienti si mostrano anche in relazione alle rese produttive. Infatti, sappiamo che le produzioni medie in un contesto spontaneo molto raramente superano i 2 o 3kg per ettaro. Diversamente, la resa media di una coltivazione artificiale può arrivare a decine di kg per ettaro, con punte anche oltre i 70 kg (Barbieri et al. 2016).

1.7 NICCHIA ECOLOGICA IN UNA TARTUFAIA

In ecologia il concetto di nicchia assume una valenza multidimensionale e vede la coesistenza di una serie di fattori che interagiscono mutuamente. Spazio, risorse e tempo sono variabili utili a determinare come gli organismi interagiscono con le risorse e quale sia la loro organizzazione territoriale. Come già detto, nel caso di una monocoltura c'è un uso quasi esclusivo del territorio, e quindi della nicchia, nella quale la radice difende lo spazio occupato dalla compresenza di altre radici per esercitare più efficacemente la funzione d'assorbimento nutrizionale (Zucconi 1996; Phoenix et al. 2020). In aggiunta, in una coltivazione artificiale di tartufo, tempo e risorse hanno un ruolo ulteriormente caratterizzante:

Spazio

Come già descritto, ad un iniziale uso ordinato dello spazio in assenza di concorrenza, segue un arresto dell'espansione delle radici dovuto all'impossibilità di superare il limite dell'apparato radicale della pianta confinante. Questo uso dello spazio è tipico di tutte le monocolture (Zucconi 1996).

Risorse

Le ife del fungo hanno un'alta capacità nel rendere biodisponibili gli elementi della nutrizione che altrimenti non sarebbero accessibili (Martin et al. 2016), questo causa un rapido esaurimento della nicchia. Inoltre, l'estensione del complesso ifale che parte dall'epidermide della radice e si sviluppa verso l'esterno è tale da aumentare considerevolmente il volume di suolo sfruttato. (Figura 1)



Figura 1 Radice micorrizata di *Q. pubescens*. Viene evidenziata l'estensione ifale del fungo simbiote.

Tempo

Nei suoli ricchi, aventi cioè una buona fertilità, la migrazione radicale risulta lenta. Diversamente, nei suoli poveri l'avanzamento è più veloce (Zucconi 1996). Questo secondo caso è la condizione ambientale in cui vive *T. melanosporum*, in quanto si tratta di suoli poco dotati, forestali, tendenzialmente sciolti e con buona presenza di scheletro. Inoltre, Splivallo et al. (2019) hanno dimostrato come il micelio di *T. melanosporum* condizioni lo sviluppo radicale inducendo una maggiore produzione di radici fini, e quindi accelerando il processo di esaurimento dei nutrienti nella nicchia radicale.

L'unione di questi tre fattori fa sì che una nicchia che ospita una radice con micorrize sia maggiormente sfruttata, e quindi impoverita, se paragonata ad una nicchia di una radice priva di micorrize (Peay 2016; Gerz 2018; Tedersoo 2020). Pertanto, la ricolonizzazione della stessa nicchia da parte di una radice della stessa specie non sarà possibile nel breve periodo, poiché i tempi necessari saranno inevitabilmente lunghi, e non compatibili con le necessità di una redditività agricola. Dunque, nel caso di una tartufaia artificiale, abbiamo a che fare con un sistema molto semplificato se paragonato al contesto naturale, capace sì di esprimersi con rese molto elevate, ma che non è in grado di mantenersi autonomamente nel lungo periodo.

Tabella 3. Riepilogo delle caratteristiche della nicchia ecologica radicale e suo sfruttamento. Confronto tra fattori in tre differenti situazioni ambientali.

	AMBIENTE NATURALE (Zucconi 1996)	MONOCOLTURA (Zucconi 1996)	TARTUFAIA (Monocoltura altamente micorizzata) (Martin 2016; Peay 2016; Gerz 2018; Splivallo 2019; Tedersoo 2020)
SPAZIO	<ul style="list-style-type: none"> • Teoricamente illimitato • Condizionato da aspetti di natura edafica 	<ul style="list-style-type: none"> • Delimitato da apparato radicale della pianta adiacente 	<ul style="list-style-type: none"> • Delimitato da apparato radicale della pianta adiacente
RISORSE DISPONIBILI	<ul style="list-style-type: none"> • Alta diversità di residui • Elevata attività biologica • Veloce ritorno a condizioni precedenti 	<ul style="list-style-type: none"> • Nicchia poco diversificata • Lento ritorno a condizioni ottimali per lo sfruttamento • Possibilità di fare concimazione 	<ul style="list-style-type: none"> • Sovrasfruttamento della nicchia • Ricolonizzazione non possibile nel medio-breve periodo in quanto: <ul style="list-style-type: none"> - gli elementi della nutrizione sono stati assorbiti in modo più efficiente; - il volume di suolo esplorato è maggiore; - la produzione di radici assorbenti è maggiore; - è difficile effettuare la concimazione
TEMPO DI SFRUTTAMENTO	<ul style="list-style-type: none"> • Rapido o lento, in funzione dello stato di fertilità del suolo 	<ul style="list-style-type: none"> • Solitamente lento perché si preferisce coltivare in terreni fertili • Il ricorso a concimi può allungare ulteriormente i tempi 	<ul style="list-style-type: none"> • Rapido perché il tartufo non è presente in terreni fertili

1.8 FUNZIONI E CLASSIFICAZIONE DELLE RADICI

Per comprendere la relazione tra pianta simbiote e tartufo e quindi poter interagire a livello agronomico con questo sistema è necessario approfondire lo studio dell'apparato radicale. Le funzioni di un apparato radicale sono molteplici, esse vanno da aspetti di natura fisica (come l'ancoraggio al suolo), biochimica e di stoccaggio delle risorse.

Nondimeno, una delle principali funzioni riguarda l'assorbimento di sostanze come acqua e nutrienti, e il loro trasporto verso tutti gli altri organi della pianta. L'assorbimento è effettuato da radici specializzate, di struttura primaria, chiamate assorbenti o fini; esse si presentano chiare traslucide, sono corte, molto numerose e provviste di peli radicali.

Hanno vita breve (qualche giorno o settimana) e in inverno possono rimanere in vita anche per qualche mese. Queste radici rivestono un ruolo importante perché possono ospitare anche altri organismi (sia funghi che batteri) andando a formare una simbiosi mutualistica; nel caso dei funghi questa associazione si definisce micorriza (Fabbri e Barone 2012).

Di conseguenza, le radici assorbenti sono il luogo dove vive e si accresce il micelio delle ectomicorrize del genere *Tuber*. Una radice con micorrize presenta una forma definita "claviforme", ossia leggermente tondeggianti, ha un colore scuro con gradazioni che sono correlabili alla specie di fungo associata; *T. melanosporum* conferisce la colorazione più scura tra i tartufi (Zambonelli 2016). In natura esistono varie tipologie di micorrize, che si distinguono a seconda della specie di fungo simbiote e del tipo di strutture che radice e fungo creano.

Una caratteristica delle radici colonizzate dal gruppo delle ectomicorrize (quelle del genere *Tuber*) è la presenza di una struttura interna alla corteccia radicale dove le ife fungine penetrate si posizionano negli spazi intracellulari, questa formazione viene chiamata Reticolo di Hartig ed è la sede degli scambi degli elementi tra albero e fungo (Fabbri e Barone 2012).

Altra tipologia di radici che caratterizzano un apparato radicale sono le radici pioniere o esploranti, hanno una lunghezza che può raggiungere diversi centimetri, sono di colore chiaro e sottili, prolungano le radici principali, arrivano ad avere struttura secondaria ed hanno funzione di sondare nuove aree di terreno.

Le radici di transizione sono radici di assorbimento che non vengono abscisse, hanno funzione di trasporto e sono di colore grigio. Infine, le radici di conduzione, hanno funzione di trasporto e ancoraggio, non vengono abscisse e quindi aumentano in percentuale con la maturità della pianta (Kolesnikov 1971).

1.9 ACCRESCIMENTO RADICALE

L'apparato radicale di una pianta si accresce allungandosi, così da esplorare nuovi territori, ramificando, e solo per quelle radici che acquisteranno struttura secondaria, ci sarà un aumento del diametro. Per valutare la crescita radicale, uno dei parametri più usati è la misura della **lunghezza delle radici** e il **diametro medio** in funzione del tempo (Amato e Ritchie 2002).

Le radici più numerose di una giovane pianta sono le radici fini; tuttavia, sono poche quelle che andranno ad assumere una struttura secondaria. Infatti, la maggior parte imbrunisce, degenera e infine abscinde, andando così a far parte della sostanza organica del terreno (Barlow 1994).

La crescita avviene a ritmi che sono influenzati da fattori genetici (specie e varietà), ambientali e culturali. Generalmente, si possono distinguere due periodi ravvicinati di massima attività, separati in corrispondenza del periodo estivo dove aumenta la competizione con gli organi aerei. Anche in inverno si registra un'attività radicale, sebbene minima (Fabbri e Barone 2012).

La distribuzione di un apparato radicale nel suolo ha un accrescimento radiale, planare e di tipo centrifugo. I fattori che condizionano la crescita radicale sono in primo luogo riconducibili a proprietà edafiche del terreno come tessitura o struttura, l'areazione, l'umidità e la temperatura. In aggiunta, ci sono anche fattori di natura biotica che possono condizionare lo sviluppo, come l'antagonismo tra gli apparati radicali di piante contigue, o la stanchezza del terreno (o sindrome da reimpianto), dove determinate essenze arboree non possano essere messe a dimora in successione a sé stesse (Zucconi 1996).

Ne consegue che in una tartufaiia coltivata le radici assorbenti di ciascuna pianta hanno un'espansione radiale, allontanandosi dal tronco per trovare nicchie non sfruttate, ma al tempo stesso la zona precedentemente occupata viene abbandonata (nicchia diventata inospitale per la pianta simbiote). Questo è possibile fino al limite spaziale in cui le radici incontrano quelle delle piante vicine, le quali, essendo della stessa specie, creano un'area egualmente inospitale. Si comprende perciò che nel tempo ci sarà un momento di calo nel rinnovo radicale della pianta simbiote, e di conseguenza un calo della presenza del *Tuber melanosporum*.

Capitolo 2

OBIETTIVI

Lo scopo di questa indagine è valutare l'efficacia di apporti di sostanza organica matura arricchita con spore di *T. melanosporum* per il recupero produttivo di una tartufaia ormai a fine ciclo produttivo. Nell'esperimento si è ipotizzato che (i) gli apporti possano stimolare nuova crescita radicale in nicchie di terreno ormai esaurite ed abbandonate, (ii) si riscontri nelle zone trattate una quota di radici fini (sedi della micorrizzazione) maggiore rispetto al controllo (iii) si verifichi nelle zone trattate un progressivo aumento di radici fini (iv) siano presenti aree di bruciata più evidenti come conseguenza della maggiore presenza di micorrize.

Incidentalmente, dovrebbe essere atteso un aumento della produzione di carpofori a seguito del trattamento, ma questo potrebbe avverarsi solo dopo che la tesi sarà finita.

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

3.1 AREA DI STUDIO

L'indagine è stata condotta in una tartufaia di roverella (*Quercus pubescens* Willd., 1805) piantata nel 2005, situata nel comune di Venarotta (comune di Ascoli Piceno) e di proprietà dell'azienda Angelozzi Tartuficoltura. Il sito si trova a 520m sul livello del mare, con una esposizione a Sud-Sud Ovest. La temperatura media annua è di 13° C con medie minime e massime rispettivamente di 6,8° C e 20° C (database Protezione Civile delle Marche). I semenzali sono stati inizialmente micorizzati artificialmente con spore di *T. melanosporum* e poi messe a dimora con un sesto d'impianto di 4,5x4,5m. La forma di allevamento è conica, con rami basali che si trovano ad un'altezza di 60 cm circa dal suolo. Le operazioni di potatura sono ripetute ogni anno, così come trinciatura dell'interfilare.

3.2 PROVA SPERIMENTALE

Nel marzo del 2020 sono stati selezionati 3 gruppi di 5 piante in due zone distinte del campo seguendo lo schema sperimentale complete randomizzato. Dei 3 gruppi, uno non ha ricevuto alcun trattamento (*Controllo Esterno*). Nei 2 gruppi rimanenti, l'area attorno al tronco di ogni pianta è stata suddivisa in 4 quattro sezioni. All'interno di una sola sezione, ad una distanza di un metro dal tronco, è stata apportata della sostanza organica matura arricchita di spore di *T. melanosporum*, tracciando un perimetro avente 2m per lato. Nell'anno successivo è stata trattata la sezione speculare al primo apporto (Figura 2) seguendo la stessa modalità.

Il primo campionamento di suolo è avvenuto nell'autunno del 2020 usando un carotatore munito di un cilindro di acciaio. Il prelievo è avvenuto a due profondità: 5-15cm e 15-25cm, e a 3 distanze dal tronco: 100cm, 150cm e 200cm; lungo due transetti idealmente tracciati: uno nell'area trattata, l'altro nella zona non trattata, e uno nel controllo. Un secondo prelievo di terreno è stato eseguito nell'autunno del 2021. Usando la stessa metodologia, è stato campionato il transetto che ha ricevuto l'apporto del 2020, il transetto con l'apporto del 2021

e un terzo non trattato (Figura 3). I transetti sono stati definiti in base alla posizione rispetto al tronco (destra o sinistra), all'apporto o meno di sostanza organica e all'anno di campionamento. Lo schema con gli acronimi assegnati è riportato in tabella 2. Nei due anni sono stati raccolti un totale di 166 campioni.

Tabella 4. *Nomenclatura dei campionamenti*

	Lato	Apporto sostanza organica	Anno prelievo
<i>Sx 0 20</i>	<i>Sx</i> = Lato Sinistro	<i>0</i> = No	2020
<i>Dx L 20</i>	<i>Dx</i> = Lato Destro	<i>L</i> = Si	2020
<i>Controllo esterno</i>	Gruppo esterno	No	2020
<i>Sx L 21</i>	<i>Sx</i> = Lato Sinistro	<i>L</i> = Si	2021
<i>Dx 0 21</i>	<i>Dx</i> = Lato Destro	<i>0</i> = No	2021
<i>Controllo interno</i>	Lato mai trattato	No	2021

In laboratorio, le carote di suolo sono state messe una notte in stufa a 65° C per eliminarne l'umidità. Ogni campione è stato successivamente pesato e setacciato in acqua corrente così da separare il suolo dalle radici. L'analisi visiva ha permesso di distinguere le radici di roverella da quelle di specie erbacee. Le radici selezionate sono state preparate per essere scannerizzate e, mediante l'utilizzo del software WinRHIZO (Regent Instruments, Canada), di ogni immagine è stata misurata la lunghezza totale e il diametro medio delle radici (Bauhus and Messier 1999). Inoltre, il programma ha permesso di selezionare i pixel delle immagini, rendendo così possibile distinguere le radici assorbenti dalle radici pioniere. I valori della lunghezza sono stati armonizzati rapportandoli al peso di ogni campione di suolo ottenendo così la lunghezza della densità della radice (Root Length Density = RLD).

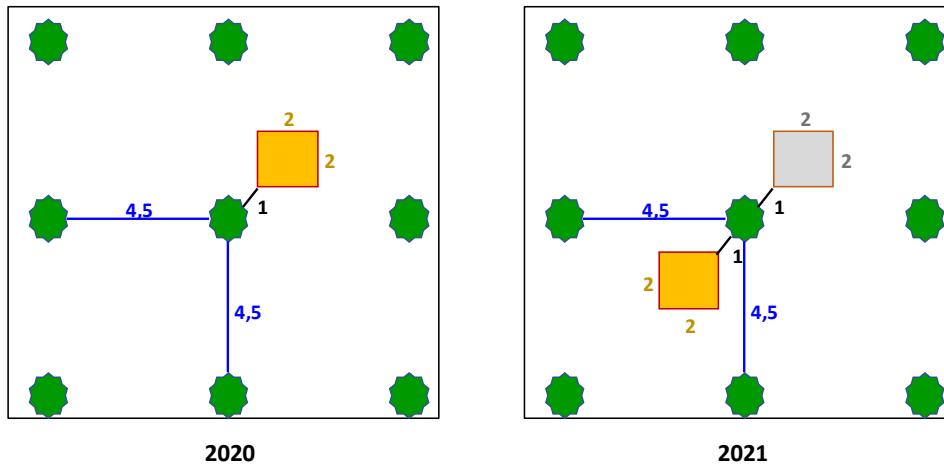


Figura 2. Rappresentazione grafica dello schema di applicazione della sostanza organica nei due anni di prova.

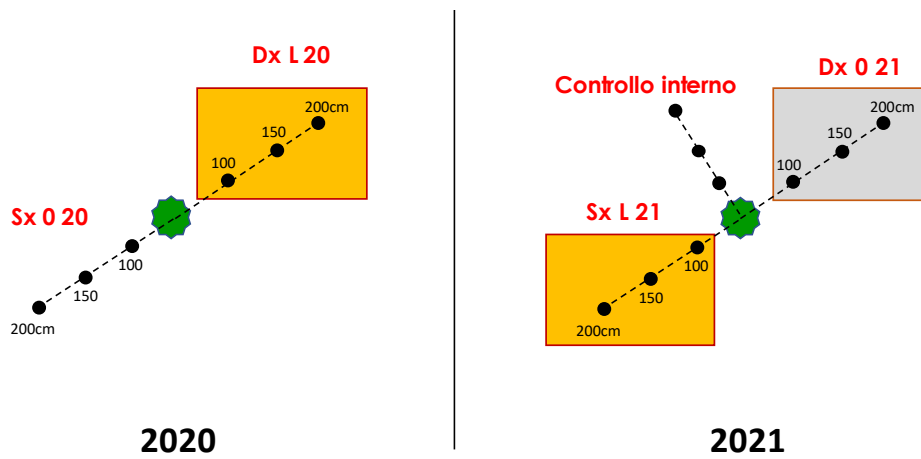


Figura 3. Schema del prelievo dei campioni di suolo per pianta nei due anni di prova.

3.3 ANALISI DELLA BRUCIATA

Per valutare l'espressione della bruciata a seguito dei trattamenti, è stato costruito un quadrato avente per lato 100 cm e suddiviso in sotto quadrati di 10 cm che è stato posizionato nell'area di suolo priva di vegetazione. In seguito sono stati annotati il numero di sotto quadrati che risultavano privi di vegetazione (Figura 4).



Figura 4. Immagine dello strumento realizzato per la valutazione della bruciata.

Capitolo 4 RISULTATI

L'analisi della densità delle lunghezze delle radici (RLD) mediante ANOVA, mostra differenze significative nel confronto tra radici assorbenti e radici pioniere nel controllo esterno e nel quadrante opposto a quello di apporto della sostanza organica, *Sx 0*, rivelando una presenza significativamente maggiore di radici pioniere. Al contrario, lo stesso quadrante *Sx 0 20*, nel secondo anno, a seguito dell'applicazione della sostanza organica, presenta una lunghezza di radici assorbenti significativamente maggiore rispetto alle radici (Figura 5). Più in generale, la lunghezza delle radici assorbenti supera la lunghezza delle radici pioniere al secondo anno in tutte le zone campionate: *Controllo interno*, *Sx L 21* e *Dx 0 21*.

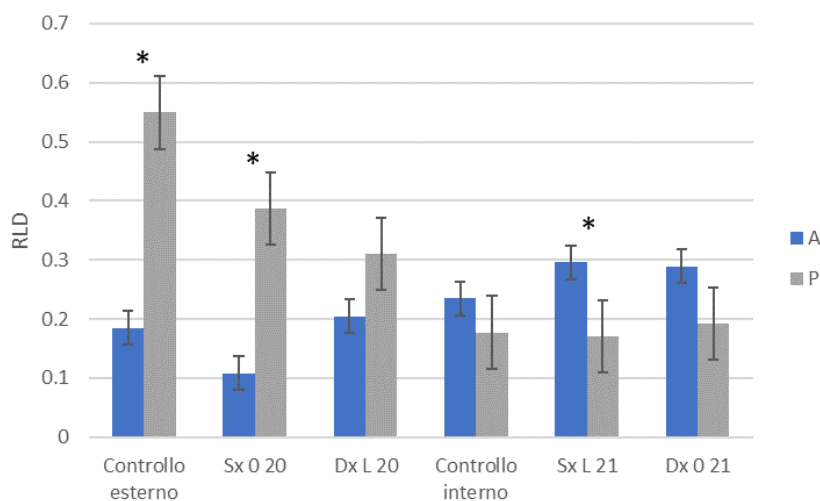


Figura 5. Confronto della densità di lunghezza delle radici (RLD) tra trattamenti. A = radici assorbenti, P = radici pioniere. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale (Tukey HSD test).

Confrontando il rapporto tra radici assorbenti su radici pioniere (A/P), i campioni prelevati nel secondo anno e che hanno ricevuto l'apporto di sostanza organica, sono significativamente

diversi rispetto a tutte le restanti prove, comprese le aree non trattate delle stesse piante (Figura 6).

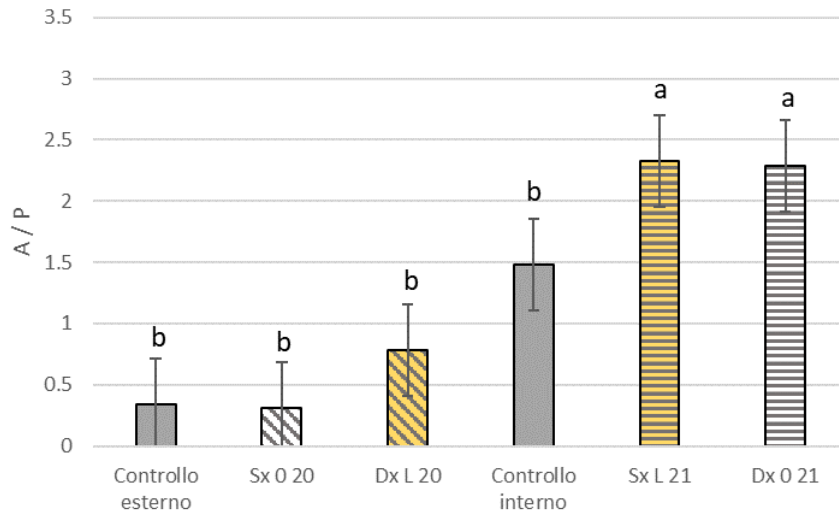


Figura 6. Rapporto radici assorbenti su radici pioniere tra i trattamenti. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale. In giallo le aree trattate nell'anno (Tukey HSD test.)

La densità della lunghezza radicale non mostra significative differenze se viene ripartita nelle due profondità di campionamento. In ogni caso, nello strato compreso tra i 5 e 15 cm la lunghezza di radici assorbenti risulta maggiore, rispetto allo strato sottostante, nelle zone che non hanno subito il trattamento (controllo esterno e SX 0 20), e nel quadrante DX 0 21, ossia la zona di suolo che ha ricevuto sostanza organica circa 18 mesi prima, con un valore assoluto più alto (Figura 7).

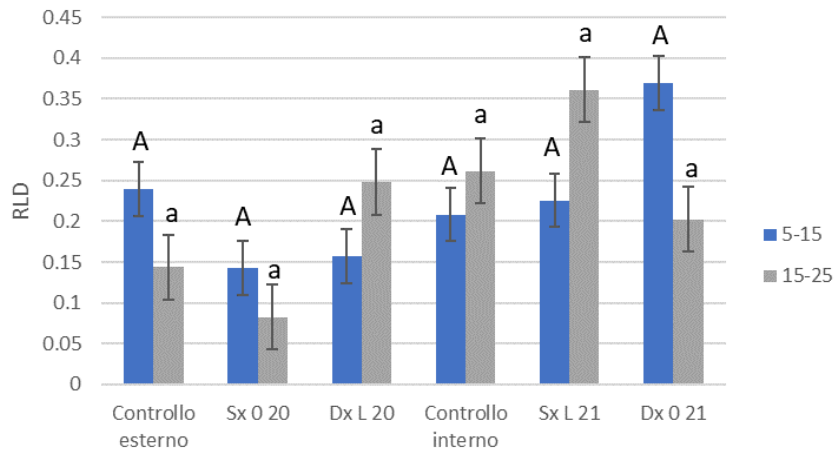


Figura 7. Densità della lunghezza delle radici tra i trattamenti nelle due profondità. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale (Tukey HSD test).

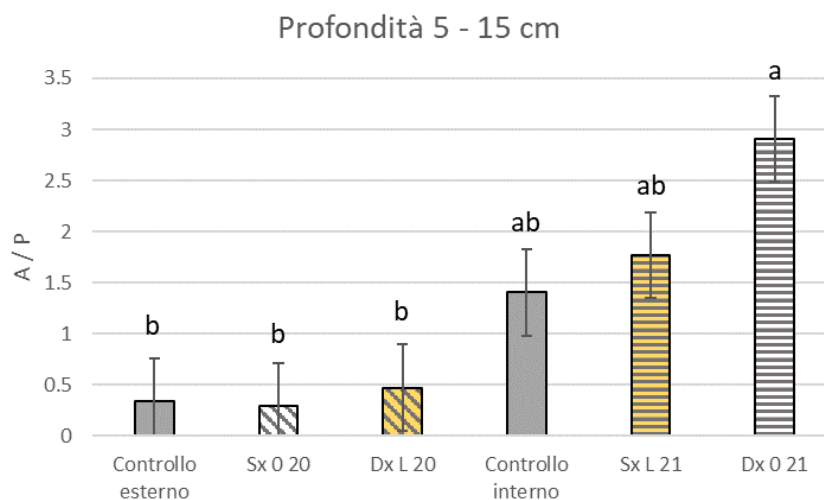


Figura 8. Rapporto radici assorbenti / radici pioniere nello strato compreso tra 5 e 15 cm di profondità. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale. In giallo le aree trattate nell'anno (Tukey HSD test).

Il rapporto A/P calcolato in base alla profondità mostra che, nella zona tra i 5 e 15 cm, la porzione di suolo che ha ricevuto l'apporto organico a distanza di 18 mesi, *Dx 0 21*, risulta significativamente diverso rispetto a tutte le zone campionate nel 2020 (*Controllo esterno*, *Sx 0 20* e *Dx L 20*) (Figura 8). Mentre nello strato sottostante, quello tra i 15 e 25 cm, risulta significativamente diverso rispetto alle zone campionate l'anno precedente, il quadrante che ha ricevuto l'apporto nello stesso anno *Sx L 21* (Figura 9).

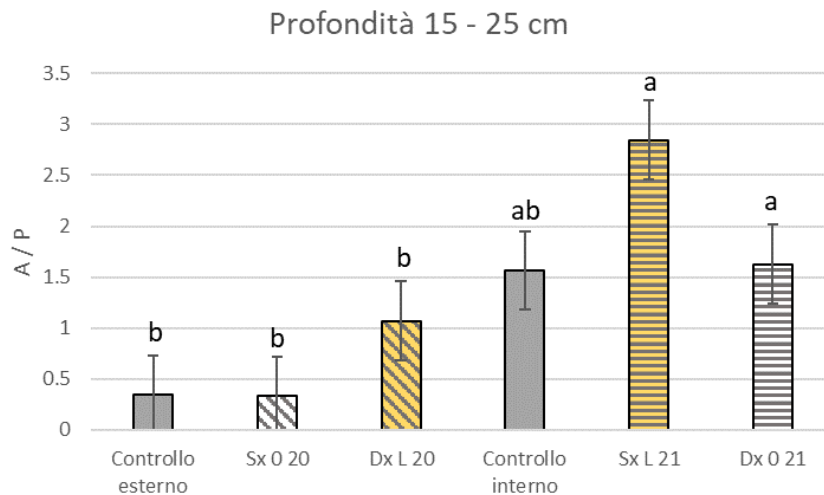


Figura 9. Rapporto radici assorbenti / radici pioniere nello strato compreso tra 5 e 15 cm di profondità. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale. In giallo le aree trattate nell'anno (Tukey HSD test).

Esaminando il rapporto A/P nelle tre distanze dal tronco considerate, esso sembra aumentare progressivamente allontanandosi dalla pianta nelle zone che hanno ricevuto il trattamento (Dx L 20, Sx L 21 e Dx 0 21) e complessivamente aumenta nella zona di controllo di piante trattate (Controllo interno) (Figura 10). Osservando le distanze nello specifico, a 100

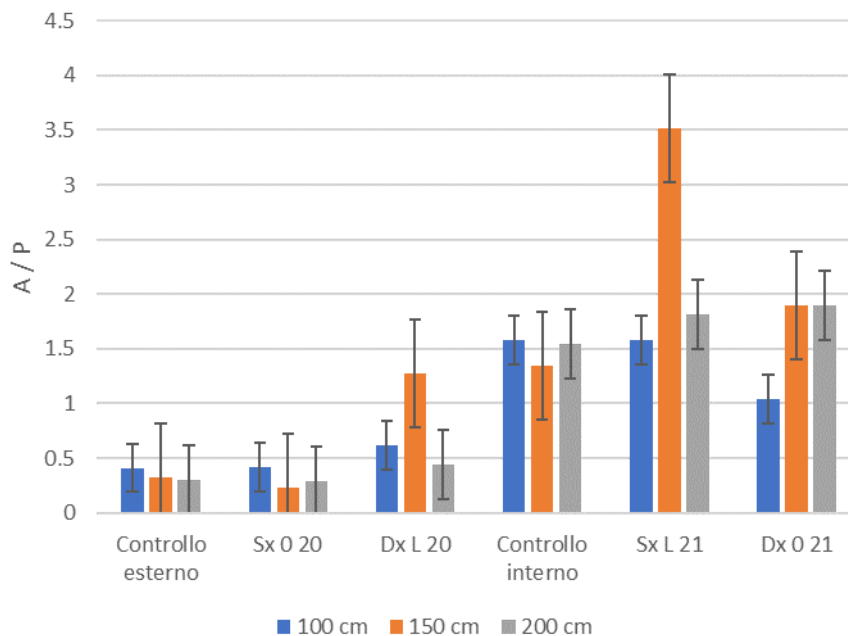


Figura 10. Rapporto radici assorbenti / radici pioniere nelle tre distanze dal tronco nei i trattamenti. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale (Tukey HSD test).

cm dal tronco risultano significativamente diversi il quadrante Sx L 21 e il *Controllo interno* rispetto al gruppo dell'anno precedente (Figura 11).

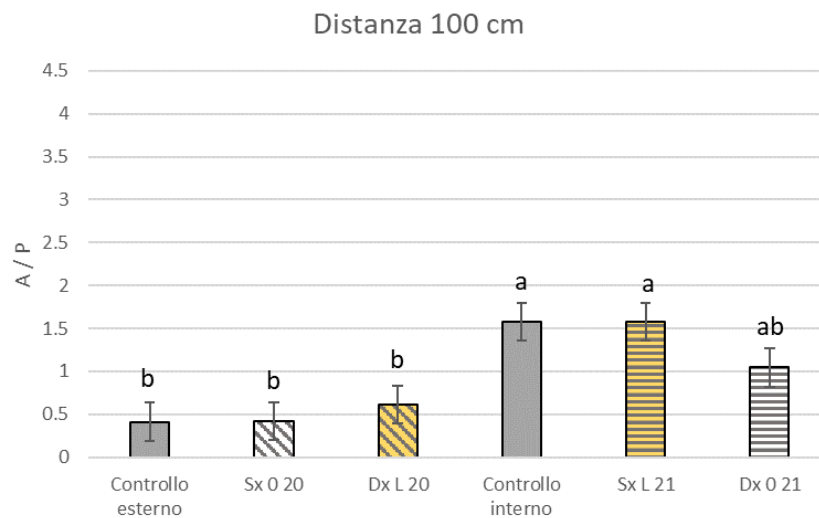


Figura 11. Rapporto radici assorbenti / radici pioniere a 100 cm dal tronco. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale. In giallo le aree trattate nell'anno (Tukey HSD test).

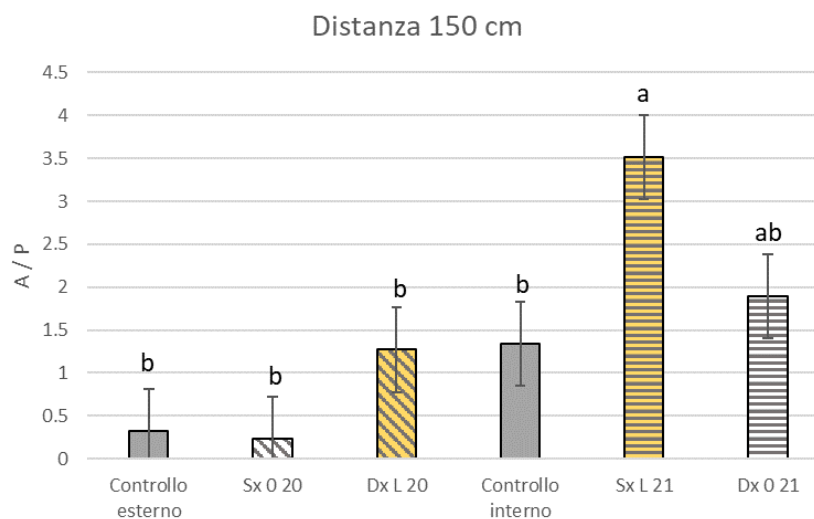


Figura 12. Rapporto radici assorbenti / radici pioniere a 150 cm dal tronco. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale. In giallo le aree trattate nell'anno (Tukey HSD test).

A 150 cm dal tronco, ancora il quadrante *Sx L 21* risulta significativamente diverso rispetto al gruppo dell'anno precedente, ma in questo caso anche nei confronti del *Controllo interno* (Figura 12). A 200 cm di distanza, nel secondo anno, le aree che hanno subito un trattamento (*Sx L 21* e *Dx 0 21*) sono significativamente diverse rispetto all'anno, nonostante l'apporto dell'ammendante organico come avvenuto nel lato destro della prova. Anche il *Controllo interno* risulta significativamente diverso se confrontato a tutte le aree non trattate (Figura 13).

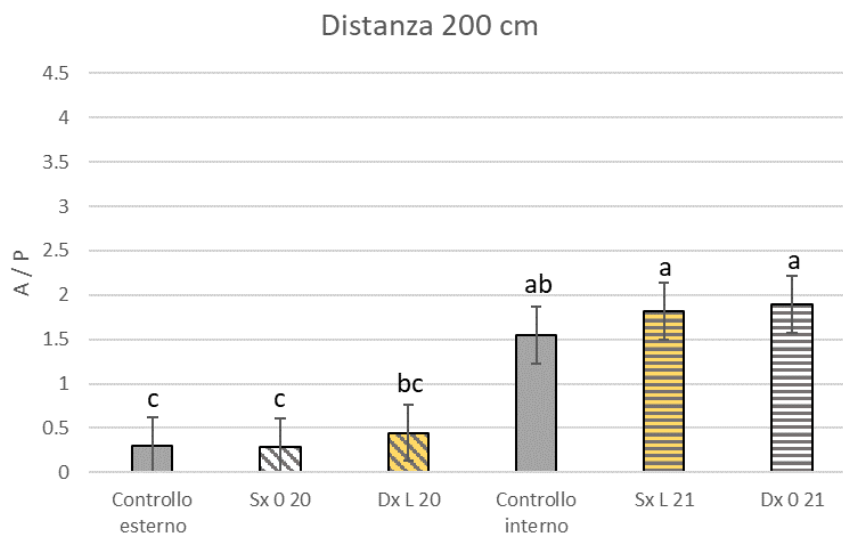


Figura 13. Rapporto radici assorbenti / radici pioniere a 2000 cm dal tronco. Controllo esterno = fuori dal gruppo sperimentale, Controllo interno = nel gruppo sperimentale. In giallo le aree trattate nell'anno (Tukey HSD test).

Analisi della bruciata

I dati raccolti per il confronto delle bruciate tra i trattamenti mostrano una differenza significativa nelle aree trattate al secondo anno di prova con quelle usate come controllo e quindi non trattate (Figura 14)

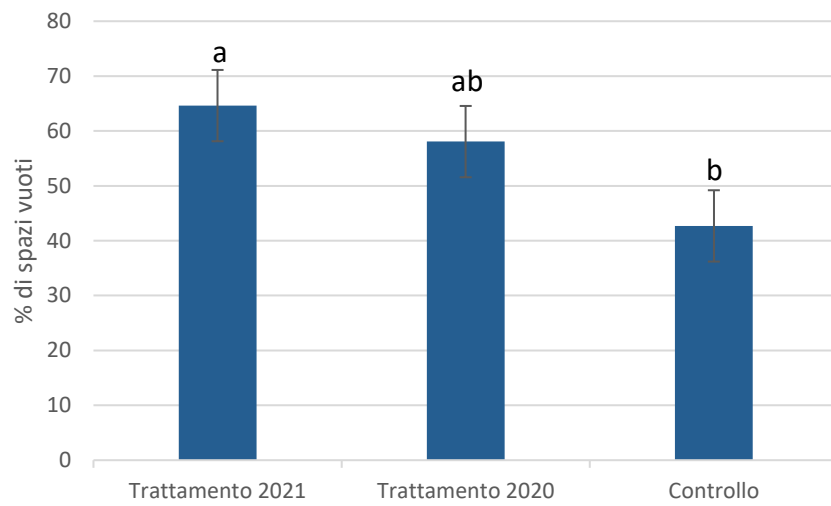


Figura 14. Confronto tra trattamenti e controllo in relazione alla presenza di vegetazione nella bruciata (Tukey HSD test).

Capitolo 5

DISCUSSIONE

5.1 Accrescimento radicale

I risultati mostrano tre informazioni principali sulla risposta radicale a seguito di apporti di sostanza organica.

Gli apporti stimolano una risposta radicale che non sembra vincolata all'area di applicazione

I dati mostrano un progressivo aumento di radici assorbenti a seguito dei trattamenti (Figura 5). Questo risultato era previsto, in quanto sono noti gli effetti degli apporti di ammendanti sulla crescita radicale (Zucconi 1996). Tuttavia, si evidenzia una risposta graduale in quanto solo nel secondo anno si hanno differenze significative, nello specifico la lunghezza di radici assorbenti è maggiore rispetto alle radici pioniere (Figura 6). Infatti la crescita risulta diversa nei due anni, più radici pioniere nel primo anno e più radici fini nel secondo, indicando un ritorno all'attività di assorbimento di nutrienti a scapito dell'esplorazione. E' interessante notare che, seppur non significativo, questo aumento sembra verificarsi anche nelle aree dell'apparato radicale che non hanno ricevuto apporti di sostanza organica (*Controllo interno*). Hodge 2004 riporta che le risposte radicali agli stimoli possono non essere uniformi, specificando che quando una porzione di radici individua una nuova nicchia da sfruttare, anche l'accrescimento delle radici nella zona di origine può essere soggetta a un maggiore ricambio se i nutrienti in quella zona originale sono esauriti e se la nuova nicchia contiene concentrazioni di nutrienti sufficienti per traslocare le risorse nonostante l'assorbimento di nutrienti nella vecchia zona sia ridotto. Pertanto, l'aumento di radici assorbenti nella porzione di suolo non soggetta ad alcuna azione potrebbe suggerire il verificarsi di uno stimolo al sistema radicale nel suo insieme. Tuttavia, lo stimolo non sembra verificarsi se al sistema viene fornito un solo apporto.

Lo strato più profondo non trattato mostra un aumento di radici fini più rapido

Confrontando la lunghezza delle radici assorbenti nei due strati di suolo in oggetto, al primo anno di trattamento viene evidenziata una presenza maggiore di radici assorbenti nello strato più profondo, quello tra i 15 e 25 cm (Figura 9). Questo dato non sorprende, in quanto il processo di incorporazione dell'ammendante mediante movimento meccanico del suolo può aver reciso parte delle radici. Infatti, l'anno successivo, lo stesso quadrante evidenzia una situazione rovesciata, in cui lo strato superficiale mostra un notevole sorpasso in termini di lunghezza totale di radici assorbenti. La zona del *Controllo interno*, anche in questo caso mostra un risultato inatteso, con un andamento paragonabile ad una zona trattata al primo anno. Infatti, se prima del trattamento le radici assorbenti erano relativamente poche in totale e maggiormente presenti nello strato superficiale, dopo il secondo trattamento apportato alla pianta, anche la porzione di radici che non ha mai ricevuto materiale mostra un aumento di radici assorbenti nello strato sottostante. Non è possibile interpretare questo dato da un punto di vista fisiologico a causa della natura dell'esperimento. Tuttavia, sembra essere in linea con quanto riportato in precedenza, ovvero di una ripresa dell'attività radicale anche in zone non coinvolte dal trattamento.

L'attività di assorbimento aumenta a poca distanza dal bordo del trattamento

I dati mostrano un generale recupero della presenza di radici assorbenti nelle tre distanze dal tronco considerate, ma tale recupero si verifica soprattutto dopo il secondo trattamento. Nello specifico, il progresso più significativo avviene a 150 cm dal tronco, che corrisponde a 50 cm di distanza dal bordo del trattamento (Figura 12). L'aumento riguarda sia il quadrante trattato nel primo anno, sia quello trattato nel secondo anno. Questi risultati sembrano suggerire un ripristino della corona di radici assorbenti che si allarga in maniera centrifuga dal tronco, condizione che sembrava ormai compromessa osservando la situazione di partenza. Infatti, la trasformazione delle radichette recise naturalmente in nuova sostanza organica è un processo lento. Van Praag et al. 1988 mostrano che dopo due anni, per faggio e abete rosso, le radici morte decomposte sono rispettivamente il 36,3% e il 23,7%, dove per una completa scomparsa sarebbero necessari 12 anni. Tempi non compatibili in un bilancio tra ricavi e costi di una attività agricola.

5.2 Valutazione della bruciata

In questa fase dello studio non è stato possibile effettuare un'analisi del livello di micorrize presenti nell'apparato radicale. Di conseguenza, per poter valutare un possibile effetto della prova sulla potenzialità produttiva di corpi fruttiferi di tartufo, si è usato come indicatore la valutazione qualitativa delle bruciature, in quanto, come noto, *T. melanosporum* è la specie che presenta le bruciate più evidenti quando le sue micorrize prevalgono sulle altre specie. Questo aspetto è stato assunto per conferire validità all'analisi. Va comunque precisato che ad oggi mancano studi che mettano in relazione l'espressione della bruciata con il livello di micorrize presenti. In ogni caso, l'apporto di sostanza organica arricchita con ascospore di *T. melanosporum* sembra aver avuto effetti positivi, mostrando aree di suolo a due anni dal trattamento con una presenza di vegetazione significativamente minore rispetto alle zone non trattate. Questo risultato sembra plausibile con un aumento della presenza di micelio fungino, in quanto le aree trattate, quindi più ricche in nutrienti, anziché mostrare una buona copertura vegetale, attesa a seguito di input di nutrienti, mostrano l'esatto contrario.

Capitolo 6

CONCLUSIONI

Benché lo scopo della prova non riguardasse l'aumento di nutrienti nel sistema ma un miglioramento della struttura del suolo per favorire un ritorno alla produzione di carpofori di *T. melanosporum*, lo studio ha osservato per la prima volta la risposta dell'apparato radicale di *Q. pubescens* se sottoposto a tecniche agronomiche come l'apporto di sostanza organica matura. Il risultato è stato un aumento delle radici assorbenti, sede del micelio fungino, ma solo nel secondo anno. Così, le ragioni del calo di produzione di radici fini nel tempo sembrano protendere verso una spiegazione che consideri il sovrasfruttamento delle risorse nel suolo. Oltre a confermare una ripresa dell'attività di assorbimento, i risultati fanno ipotizzare la presenza di uno stimolo generale al sistema radicale che si verifica al secondo anno di input. Ciononostante, per conferire maggiore robustezza ai dati, risultano necessari ulteriori approfondimenti con almeno un aggiuntivo anno di campionamento e di analisi. Se confermati, questi risultati possono avere ripercussioni positive in una migliore gestione delle tartufaie artificiali, oltre che ad apportare nuove conoscenze utili in ambito di pianificazione e di gestione forestale.

APPENDICE I CICLO BIOLOGICO

Il genere *Tuber* ha un ciclo biologico che si differenzia significativamente da quello degli altri funghi superiori. Infatti, la durata è di circa 9 mesi, con un periodo di maturazione che arriva a raggiungere i 4 mesi (Pacioni et al., 2014). Ad oggi, il ciclo biologico più studiato è quello di *Tuber melanosporum*, la quale si può riassumere nel modo seguente: i giovani corpi fruttiferi (tartufi) iniziano il loro sviluppo tra maggio e giugno, per poi subire un arresto nella stagione secca e quindi riprendere la crescita con le prime piogge alla fine dell'estate; la fase di maturazione inizia a cavallo tra novembre e dicembre e termina nel mese di marzo (Pacioni et al., 2014). Utilizzando come riferimento il ciclo di *T. melanosporum*, è presumibile estendere il modello anche alle altre specie commercialmente importanti del genere *Tuber*. Il risultato è raffigurato in Figura 15 dove viene evidenziato il periodo di maggiore criticità idrica di un clima tipicamente mediterraneo.

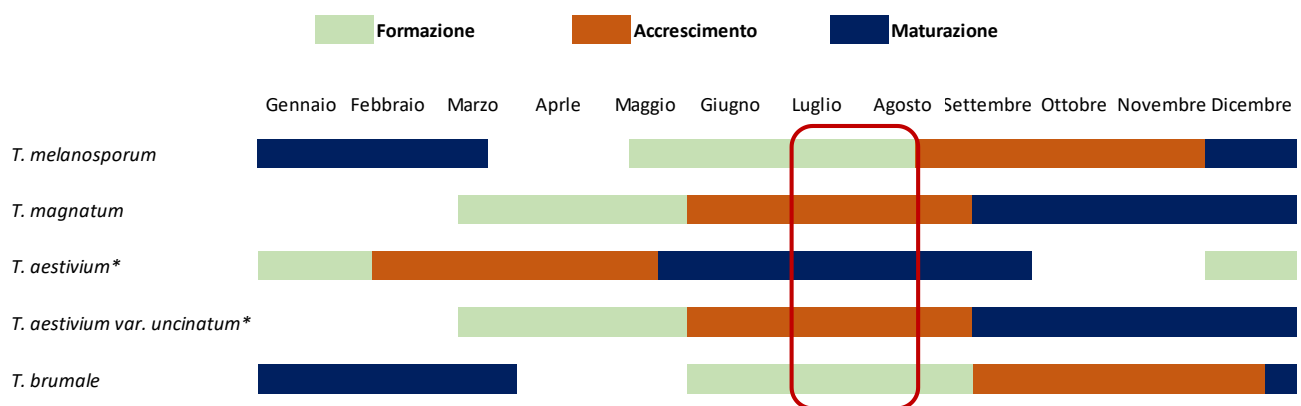


Figura 15. Sviluppo annuale del carpoforo delle principali specie del genere *Tuber*. In rosso viene evidenziato il periodo di stress idrico estivo. **T. aestivum* e *T. aestivum var. uncinatum* sono state riportate separatamente. C'è dibattito tra i membri della comunità scientifica sull'esatta classificazione tassonomica.

APPENDICE II

INOCULO SPORALE

La pratica degli apporti di ascospore è verosimilmente la tecnica che più contraddistingue la tartuficoltura rispetto alle altre pratiche agronomiche. Essa è quella che ha permesso di affrancare il genere *Tuber* da ambienti prettamente spontanei, favorendo così la creazione delle prime tartufaie artificiali. E' una tecnica praticata da secoli, e la più antica testimonianza di successo sembra essere quella di Buffon nel 1755, che dichiarò di essere riuscito ad ottenere una moltiplicazione di tartufo nero mediante inoculo su ospiti già stabili (Chatin 1869). La pratica simula il processo che normalmente avviene in natura da parte degli animali, assicurando così il rimescolamento e la dispersione del materiale fino a notevoli distanze. In una tartufaia artificiale questo può essere agevolato dalle attività di lavorazione del terreno, ma per essere davvero efficace, essa deve essere eseguita regolarmente e adeguatamente (Bonet 2006; Murat 2015). Le ragioni che inducono ad essere definita come una pratica essenziale sono due: la prima riguarda il ciclo sessuale del tartufo, la seconda si riferisce alla competizione interspecifica tra le micorrize.

Ciclo sessuale

Come tutti gli Ascomiceti, *T. melanosporum* è una specie eterotallica, ovvero la sua riproduzione richiede l'incontro di due diverse strutture, o tipi di accoppiamento, che non sono presenti nello stesso micelio (Murat et al. 2013). Le giovani piante inoculate con ascospore di *T. melanosporum* hanno, fino ad almeno tre anni, il 50% di micorrize di ogni tipo di accoppiamento (Rubini et al., 2011), ma dopo qualche anno dalla semina, o in un tartufo naturale, non più (Murat et al., 2013; De La Varga et al, 2016). Infatti, piantagioni giovani di *T. melanosporum* possono mostrare solo micorrize di un singolo tipo di accoppiamento (Linde e Selmes 2012) oppure essere costituiti da aree contigue di uno solo dei tipi di accoppiamento (Murat et al., 2013). Invece, nelle aree dove si formano i carpofori, i due tipi di accoppiamento sono presenti contemporaneamente nel suolo (Murat et al 2013) e la fruttificazione può essere innescata solo se vengono fatti incontrare. Quindi, queste aree di terreno possono rimanere

sterili se non ci sono spore di tipo opposto. In natura questo è favorito dalla fauna che rimescola il terreno e disperde nello spazio i residui. Finché questo apporto non avviene, la fruttificazione è impossibile. Dopo la prima fruttificazione, il processo si autoalimenta. Il perché avvenga l'esclusione di uno dei due tipi non è stata ancora individuata (Le Tacon 2017).

Competizione tra micorrize

Una cenosi forestale può ospitare un'ampia varietà di micorrize tanto che alcune stime parlano di svariate decine di specie per un ettaro di suolo (Anthony et al. 2022). La diversità delle ectomicorrize che colonizzano l'apparato radicale di un albero varia con l'età. Una giovane pianta, sia in bosco che in vivaio, ha un numero ridotto di specie simbiotici (Last et al, 1987; Buée et al, 2011). Con l'aumentare dell'età aumenta anche il numero di micorrize associate, tanto che nell'ultima fase del suo ciclo di vita, una pianta può ospitare anche decine di specie. *T. melanosporum* è una specie di primo stadio, cioè che colonizza un apparato radicale di giovani piante; col tempo si aggiungeranno altre specie senza necessariamente sostituirlo (Last et al, 1987). Questa successione di organismi simbiotici è inevitabile. L'alta diversità favorisce l'albero nell'affrontare le condizioni ambientali durante il suo ciclo vitale, in quanto ogni specie svolgerà un ruolo diverso, inoltre promuove una stabilità di lungo periodo negli ecosistemi (van der Heijden et al 1998). Tuttavia, questo porta ad una grande difficoltà nella coltivazione del tartufo. Infatti, anche quando è presente una bruciata nel terreno che testimonia la presenza di tartufo, la comunità micorrizica può essere molto diversificata. Ma quando diventa un produttore, *T. melanosporum* può diventare temporaneamente il secondo più importante colonizzatore di radici dell'albero (Taschen et al., 2015). Quindi, l'apporto di ascospore non arresta la naturale successione di micorrize, ma può rallentarla, marginalizzando la presenza di competitori e aumentando la probabilità di colonizzazione da parte di *T. melanosporum*. Gli apporti possono essere eseguiti già dopo i primi anni dalla messa a dimora delle piante e dovrebbero essere effettuati per tutta la durata della tartufaia. In letteratura sono riportate diverse modalità. Ad esempio, Le Tacon (2017) propone di portare già nei primi anni alcuni grammi di tartufo maturo, sano, tenuto congelato, poi schiacciato e sospeso in acqua, infine distribuito su un cerchio di 1 m di raggio dall'albero. La superficie verrà gradualmente aumentata fino a raggiungere tutta la tartufaia dopo il ventesimo anno. Oliver et al. (2012) raccomandano di fornire da 10 a 30 g di tartufo tritato per albero mescolato con vermiculite. Gli apporti possono essere seguiti da una lavorazione superficiale per facilitare il rimescolamento.

BIBLIOGRAFIA

- Anthony M.A., Crowther T.W., van der Linde S. et al. 2022. Forest tree growth is linked to mycorrhizal fungal composition and function across Europe. *ISME J* 16, 1327–1336.
- Amato M. and Ritchie J. 2002. Spatial Distribution of Roots and Water Uptake of Maize (*Zea mays* L.) as Affected by Soil Structure. *Crop Science* 42, 773-780.
- Astiko W., Sastrahidayat I.R., Djauhari S., and Muhibuddin A., 2013. The Role of Indigenous Mycorrhiza in Combination with Cattle Manure in Improving Maize Yield (*Zea Mays* L) on Sandy Loam of Northern Lombok, Eastern of Indonesia. *J Trop Soils*, 18 (1), 53-58.
- Balergue C., Chabaud M., Barker D. G., Bécard G. and Rochange S. F. 2013. High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking responses to the fungus. *Plant Nutr.* 4:426.
- Barbieri E., Ceccaroli P., Agostini D., Zeppa S. D., Gioacchini A. M., and Stocchi V. 2016. “Truffle-associated bacteria: extrapolation from diversity to function,” in *True Truffle (Tuber spp.) in the World Soil Biology*, eds A. Zambonelli, M. Iotti, and C. Murat (Cham: Springer), 301–317.
- Barlow P.W. 1994. The Origin, Diversity and Biology of Shoot-Borne Roots. In: Davis, T.D., Haissig, B.E. (eds) *Biology of Adventitious Root Formation*. Basic Life Sciences, vol 62. Springer, Boston, MA.
- Bencivenga M., Calandra R., Granetti B. 1990. Ricerche sui terreni e sulla flora delle tartufo naturali di *Tuber melanosporum* Vitt. M. Bencivenga, B. Granetti (Eds.), *Atti Del II Congresso Internazionale Sul Tartufo*, Comunità Montana dei Monti Martani e del Serano, Spoleto, Italy (1990), pp. 337-374.
- Bencivenga M. e Baciarelli Falini L. 2012. *Manuale di tartuficoltura. Esperienze di coltivazione dei tartufi in Umbria*. Regione Umbria. Assessorato regionale agricoltura e foreste.

- Bonet J. A., Fischer C. R., Colinas C. 2006. Cultivation of black truffle to promote reforestation and land-use stability. *Agron Sustain Dev* 26(1):69–76
- Bradshaw B.P. 2005. Physiological aspects of *Corylus avellana* associated with the French black truffle fungus *Tuber melanosporum* and the consequence for commercial production of black truffles in Western Australia. PhD thesis, University of Murdoch. 225 p.
- Bruschi P., Vendramin G., Bussotti F., and Grossoni P. 2000. Morphological and molecular differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Wild. (Fagaceae) in Northern and Central Italy. *Ann. Bot.* 85, 325–333.
- Buée M., Maurice J. P., Zeller B., Andrianarisoa S., Ranger J., Courtecuisse R., Marcais B., Le Tacon F. 2011. Influence of tree species on richness and diversity of epigeous fungal communities in a French temperate forest stand. *Fungal Ecology* 4, 22–31.
- Cao, J., Wang, C. & Huang, Y. 2015. Interactive impacts of earthworms (*Eisenia fetida*) and arbuscular mycorrhizal fungi (*Funneliformis mosseae*) on the bioavailability of calcium phosphates. *Plant Soil* 396, 45–57.
- Cavigelli M. A. e Thien S. J. 2003. Phosphorus bioavailability following incorporation of green manure crops. *Soil Sci Soc Am J* 67, 1186–1194.
- Chevalier G., 1998. The truffle cultivation in France: assessment of the situation after 25 years of intensive use of mycorrhizal seedlings. In: Danell, E., ed. *Proceedings of the First International Meeting on Ecology, Physiology, and Cultivation of Edible Mycorrhizal Mushrooms*. Uppsala, Sweden, 3–4 July 1998.
- Chiucchiarelli I., Santucci S., Paolanti M. 2008. I suoli delle tartufaie naturali in Abruzzo. *Atti 3° Congresso Internazionale di Spoleto sul Tartufo*.
- Delmas J., Brian C., Delpech P., Soyer J.P. 1981. Application de l'analyse en composantes principales à une tentative de caractérisation physico-chimique de sols trufficoles français. *Mushroom Sci* 11(2):855–867
- Eslick H. 2017. *Factors Affecting Truffle Production and Quality in Western Australia*. PhD thesis, Murdoch University.
- Fabbri A. e Barone E. 2012. *Struttura dell'albero*. In: Sansavini S., Costa G., Gucci R., Inglese P., Ramina A., Xiloyannis C. 2012. *Arboricoltura generale*. Patron Editore, Bologna.

- Gerz M., Guillermo Bueno C., Ozinga W.A., Zobel M., Moora M. 2018. Niche differentiation and expansion of plant species are associated with mycorrhizal symbiosis. *Journal of Ecology*. 106, 254–264.
- Gregori G. 2012. Nella tartuficoltura il futuro della produzione di tartufo nero pregiato. *L'umbira dei sapori*. Anno 11, n. 1, 12-16.
- Gričar J., Hafner P., Lavrič M., Ferlan M., Ogrinc N., Krajnc B., Eler K., Vodnik D. 2020. Post-fire effects on development of leaves and secondary vascular tissues in *quercus pubescens*. *Tree Physiology*, 40, 796–809.
- Gryndler M. 2016. True Truffle Host Diversity. In: Zambonelli A., Iotti M., Murat C. Eds. 2016. *True Truffle (Tuber spp.) in the World: Soil Ecology, Systematics and Biochemistry*. Springer Verlag. *Soil Biology*; 47.
- Di Iorio A., Montagnoli A., Scippa G. S., Chiatante D. 2011. Fine root growth of *Quercus pubescens* seedlings after drought stress and fire disturbance. *Environmental and Experimental Botany*. Volume 74, 272-279.
- Hall I.R., Brown G., Zambonelli A., 2007 - *Taming the Truffle. The History, Lore, and Science of the Ultimate Mushroom*. Timber Press, Portland, Oregon.
- Haldimann P., Gallé A., Feller U. 2008. Impact of an exceptionally hot dry summer on photosynthetic traits in oak (*Quercus pubescens*) leaves. *Tree Physiology*, Volume 28, Issue 5, 785–795.
- Hodge A. 2004. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist*, 162: 9-24.
- Jaillard B., Barry-Etienne D., Colinas C., de Miguel A. M., Laurent G., Aline L., et al. 2014. Alkalinity and structure of soils determine the truffle production in the Pyrenean Regions. *Forest Systems*, 2014, vol. 23, num. 2, 364-377.
- Jaillard B, Oliach D, Sourzat P, Colinas C. 2016. Soil characteristics of *Tuber melanosporum* habitat. In: Zambonelli A., Iotti M., Murat C. Eds. 2016. *True Truffle (Tuber spp.) in the World: Soil Ecology, Systematics and Biochemistry*. Springer Verlag. *Soil Biology*; 47.
- Kolesnicov V., 1971. *The root system of fruit plants*. Moscow, Mir Publisher.
- Last F. T., Dighton J., Mason P. A. 1987. Successions of sheathing mycorrhizal fungi. *Trends Ecol Evol* 2, 157–161.

- Le Tacon F. 1978. La Présence de calcaire dans le sol. Influence sur le comportement de l'Épicéa commun (*Picea excelsa* Link.) et du Pin noir d'Autriche (*Pinus nigra nigricans* Host). *Annales des Sciences forestières*, 35: 165-174.
- Le Tacon F. 2016. Influence of Climate on Natural Distribution of Tuber Species and Truffle Production. In: Zambonelli A., Iotti M., Murat C. Eds. 2016. True Truffle (Tuber spp.) in the World: Soil Ecology, Systematics and Biochemistry. Springer Verlag. Soil Biology; 47.
- Le Tacon F. 2017. Les truffes. Biologie, écologie et domestication. AgroParisTech.
- Lindahl B. D., Tunlid A. 2015. Ectomycorrhizal fungi - potential organic matter decomposers, yet not saprotrophs. *New Phytol.* 205, 1443–7.
- Linde C. C. e Selmes H. 2012. Genetic diversity and mating type distribution of *Tuber melanosporum* and their significance to truffle cultivation in artificially planted truffières in Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 6534–6539.
- Lulli L., Bragato G., Gardin L. 1999 Occurrence of *Tuber melanosporum* in relation to soil surface layer properties and soil differentiation. *Plant Soil*, 214 (1999), pp. 85-92.
- Martin F., Kohler A., Murat C., Balestrini R., Coutinho P. M., Jaillon O., Montanini B., et al. 2010. Perigord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464 (7291), 1033–1038.
- Martin F., Kohler A., Murat C. et al. 2016. Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nat Rev Microbiol* 14, 760–773.
- Marx D.H., Hatch A.B., Mendicino J.F. 1977. High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*. *Can J Bot* 55, 1569–1574.
- Murat C., Rubini A., Riccioni C., De La Varga H., Akroume E., Belfiori B., Guaragno M., Le Tacon F., Robin C., Halkett F., Martin F., Paolocci F. 2013. Fine scale spatial genetic structure of the black truffle (*Tuber melanosporum*) investigated with neutral microsatellites and functional mating type genes. *New Phytol* 199(1), 176–187.
- Murat C. 2015. Forty years of inoculating seedlings with truffle fungi: past and future perspectives. *Mycorrhiza* 25(1):77–81

- Olivera A., Fischer C. R., Bonet J. A., Martínez de Aragón J., Oliach D., Colinas C. 2011. Weed management and irrigation are key treatments in emerging black truffle (*Tuber melanosporum*) cultivation. *New Forests*, 42(2), 227–239.
- Olivier J.M., Savignac J.C. and Sourzat P. 2018. *Truffe et trufficulture*. Fanlac, France.
- Palazón C., Delgado I., Barriuso J., Sánchez S., & Asensio C. 2008. Obtención de trufa negra (*Tuber melanosporum* Vitt.) a partir de plantación cultivada, en terreno tradicional de regadío. *Información Técnica Económica Agraria*, 104(4), 472–481.
- Pacioni G., Leonardi M., Di Carlo P. et al. 2014 Instrumental monitoring of the birth and development of truffles in a *Tuber melanosporum* orchard. *Mycorrhiza* 24 (Suppl 1), 65–72.
- Pasta S., de Rigo D., Caudullo G. 2016. *Quercus pubescens* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (Eds.), *European Atlas of Forest Tree Species*.
- Peay G. K. 2016. The Mutualistic Niche: Mycorrhizal Symbiosis and Community Dynamics. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 47, 143–64.
- Phoenix G. K., Johnson D. A., Muddimer S. P., Leake J. R. & Cameron D. D. 2020. Niche differentiation and plasticity in soil phosphorus acquisition among co-occurring plants. *Nat. Plants* 6, 349–354.
- Poitou N. 1990. Les Sols Truffiers Français. In: Bencivenga M, Granetti B (eds) *Proceedings of the second international congress on truffle*, Spoleto, 24–27 Nov 1988. *Comunità Montana dei Monti Martani e del Serano*, Spoleto, pp 391–401.
- Raglione M., Owczarek M. 2005. The soils of natural environments for growth of truffles in Italy. *Mycologia Balcanica*, 2, 209-216.
- Reyna S. 2000. *Trufa, truficultura y selvicultura trufera*. 229 p. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Robin C., Goutal-Pousse N., Le Tacon F. 2016. Soil characteristics for *Tuber aestivum* (syn. *T. uncinatum*). In: Zambonelli A, Iotti M, Murat C (eds) *True truffle (Tuber spp.) in the world, soil biology*, vol 47. Springer International Publishing, Cham, 211–231.
- Rubini A., Belfiori B., Riccioni C., Tisserant E., Arcioni S., Martin F., Paolocci F. 2011. Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete *Tuber melanosporum*. *New Phytol* 189(3), 710–722.

- Sáez R (1991) Trufa y truficultura en Navarra. *Navarra Agraria* 67:5–11.
- Saez R., De Miguel A.M. 1995. Guía práctica de truficultura. ITG Agrícola SA y Universidad de Navarra, Pamplona.
- Salvini D, Bruschi P., Fineschi S., Grossoni P., Kjaer E. D., Vendramin G.G. 2009. Natural hybridization between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. within an Italian stand as revealed by microsatellite fingerprinting *Plant Biol.*, 11, 758-76.
- Sexton J. P., Montiel J., Shay J. E., Stephens M. R. & Slatyer R. A. 2017. Evolution of ecological niche breadth. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 48, 183–206.
- Si Ho Han, Ji Young An, Jaehong Hwang, Se Bin Kim & Byung Bae Park. 2016. The effects of organic manure and chemical fertilizer on the growth and nutrient concentrations of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera* Lin.) in a nursery system, *Forest Science and Technology*, 12:3, 137-143.
- Sourzat P. 2017. Truffle cultivation in the south of France: technical progress and prospects. *Scientia Fungorum* vol. 46, 63-72.
- Splivallo R., Fischer U., Gobel C., Feussner I., and Karlovsky P. 2009. Truffles Regulate Plant Root Morphogenesis via the Production of Auxin and Ethylene. *Plant Physiology*, August 2009, Vol. 150, 2018–2029.
- Taschen E., Sauve M., Taudiere A., Parlade J., Selosse M. A., Richard F. 2015. Whose truffle is this? Distribution patterns of ECM fungal diversity in *Tuber melanosporum* br[^]ule's developed in multi-host Mediterranean plant communities. *Environ Microbiol* 17(8), 2747–2761.
- Tansley A. G. 1935. The use and abuse of vegetational concepts and terms. *Ecology*, 16, 284-307.
- Tedersoo L., Bahram M., Zobel M. 2020. *Science* 367. Issue 6480.
- Timbal J., Aussenac G. 1996. An overview of ecology and silviculture of indigenous oaks in France. *Ann. For. Sci.*, 53 (1996), pp. 649-661.
- van der Heijden M., Klironomos J., Ursic M. et al. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396, 69–72
- Vittadini C. 1831. *Monographia Tuberacearum* (Milano): 36.

Zambonelli A., Iotti M., Murat C. Eds. 2016. True Truffle (*Tuber* spp.) in the World: Soil Ecology, Systematics and Biochemistry. Springer Verlag. Soil Biology; 47.

Zucconi F. 1996. Declino del suolo e stanchezza del terreno. Ed., Spazio Verde, Padova.