

ANTONIETTA MELLO\*, PAOLA BONFANTE\*

## Un genoma di nicchia per tracciare il tartufo: dalla rizosfera alla tavola

La rizosfera è quel volume di suolo direttamente e immediatamente a contatto con le radici delle piante: è quindi un ambiente molto dinamico in cui pianta, suolo e microorganismi interagiscono. La rizosfera si forma in seguito al rilascio da parte delle radici di essudati radicali che costituiscono fonte di nutrimento per i microorganismi, principalmente batteri e funghi, associati alle radici (Walker et al., 2003). Tra i funghi presenti, un ruolo importante è svolto dai funghi ectomicorrizici che completano il loro ciclo biologico con lo sviluppo di un organo simbiotico (micorriza) e con la formazione di corpi fruttiferi che sono talora di cospicue dimensioni.

Quindi, quando parliamo di tartufo, dobbiamo in primo luogo considerare la rizosfera come il suo ambiente di origine. Lo scopo di questo articolo è di illustrare in quale modo sia oggi possibile monitorare i tartufi e tratteggiare le prospettive che si aprono nel campo della tracciabilità, alla luce della recente pubblicazione del genoma del tartufo nero (Martin et al., 2010).

DALL'IDENTIFICAZIONE DELLA SPECIE ALLA TRACCIABILITÀ  
DEL *TUBER MAGNATUM* E DEL *TUBER MELANOSPORUM*

I tartufi sono Ascomiceti che vivono in simbiosi con le radici di piante forestali e con arbusti del genere *Cistus* (Smith e Read, 1997). Alcune specie sono molto apprezzate a causa del loro gusto e aroma sin dagli antichi Greci e Romani (Mello et al., 2006). L'ultima revisione delle specie europee del ge-

\* Istituto per la Protezione delle Piante – CNR e Dipartimento di Biologia Vegetale, Università degli Studi di Torino

nere *Tuber* a cui appartengono i tartufi parte dalla straordinaria collezione di interesse museale, l'erbario di Oreste Mattiolo, che è situato nel Dipartimento di Biologia vegetale dell'Università di Torino (Ceruti et al., 2003). Dalla revisione storica di circa 200 specie gli Autori ne hanno considerate valide 28. La difficoltà nell'identificazione delle specie che nei corpi fruttiferi si basa sulla forma e dimensione delle spore, sull'ornamentazione della loro parete e sulla struttura del peridio e della gleba, è ancora maggiore per le micorrize.

Il problema della corretta identificazione delle specie di *Tuber* non è solo di interesse accademico. Alla fine degli anni 90/inizio 2000, soprattutto in Italia e in Francia, prevalse l'uso di inoculare piante forestali per ottenere micorrize di *Tuber magnatum*, *T. melanosporum*, *T. aestivum* e *T. borchii*, e quindi per incrementare la produzione dei corpi fruttiferi (Bencivenga, 2005). Di qui nacque l'esigenza da parte di tartufai, agenzie locali e acquirenti di piantine micorrizzate, di una corretta identificazione delle specie di tartufo da impiegare come inoculo e delle micorrize che si formavano. Erano anche gli anni in cui, sull'onda dell'invenzione della PCR (Mullis, 1998), in molti laboratori, tra cui il nostro, si sviluppavano analisi di biologia molecolare da affiancare a studi tradizionali. L'acquisizione di nuove tecnologie ci ha pertanto permesso di mettere a punto dei protocolli di diagnostica e monitoraggio per rispondere a diverse problematiche.

Dato che i geni del DNA ribosomale presentano regioni con storie evolutive diverse, vale a dire regioni più conservate, e quindi confrontabili tra famiglie o generi di organismi, e regioni più variabili e quindi confrontabili tra specie, essi sono stati scelti come target molecolari prioritari.

### *Il tartufo bianco: dai suoi fratelli bianchetti all'identificazione nel suolo*

Il primo problema affrontato è stato quello dell'identificazione di specie molto simili. Data la somiglianza del *T. magnatum*, il tartufo bianco più pregiato, il cui areale di distribuzione è limitato all'Italia, Croazia, Slovenia e Ungheria, con altri tartufi bianchi detti bianchetti, abbiamo sviluppato dei primer specifici in grado di distinguere questo fungo da tutti gli altri, anche a livello di micorriza (Mello et al., 1999). Tuttavia recenti ricostruzioni filogenetiche hanno svelato che i bianchetti, anche se simili a *T. magnatum* non sono così vicini (Jeandroz et al., 2008).

Grazie proprio all'identificazione delle strutture simbiotiche attraverso l'analisi molecolare, abbiamo potuto stabilire a ritroso le loro caratteristiche morfologiche e darne l'identikit (Mello et al., 2001). Una volta resa possibile

l'identificazione del *T. magnatum*, abbiamo certificato, in molte occasioni, piantine micorrizzate per conto di agenzie private. Su un totale di 80 campioni costituiti da 1400 apici micorrizzati sono state trovate micorrize di *T. magnatum* soltanto nel 20% dei casi, ma solo in situazioni controllate quali celle climatiche e serre. L'assenza di micorrize di *T. magnatum* nei vivai, insieme al frequente ritrovamento di bianchetti quali il *T. maculatum* e il *T. borchii*, suggerivano una scarsa competizione del *T. magnatum* in queste condizioni (Mello et al., 2001).

Tuttavia, la consapevolezza che la micorrizzazione del tartufo bianco non stava dando risultati simili a quelli ottenuti con il tartufo nero, e che *T. magnatum* non cresce *in vitro*, e quindi non può essere studiato in laboratorio, ci spinse a lavorare direttamente nella tartufaia: è questo l'habitat che meglio permette di comprendere lo stile di vita di *T. magnatum* e di rintracciarlo fin nella sua fase vegetativa.

Con questo fine, negli ultimi dieci anni, abbiamo seguito la dinamica di una popolazione di *T. magnatum* sita in Montemagno, provincia d'Asti dove abbiamo dapprima raccolto i corpi fruttiferi per 6 annate successive e tracciato una mappa con tutte le indicazioni relative alle piante ospiti e ai siti di raccolta dei tartufi. Durante questo studio sono emerse delle zone non produttive nella tartufaia, indipendentemente dall'età e dalle specie di piante. Grazie poi al ritrovamento di polimorfismi di un singolo nucleotide (SNP) in una regione SCAR (sequence characterized amplified region), abbiamo identificato 2 genotipi, sin dal primo anno di raccolta, e tracciato sulla mappa la struttura spaziale e temporale di questo fungo (Mello et al., 2004). In secondo luogo, abbiamo rintracciato le micorrize di *T. magnatum* direttamente in campo, per cui, nella stessa tartufaia, sono state campionate ectomicorrize che sono state identificate sia attraverso l'approccio morfologico che con quello molecolare. Le micorrize di *T. magnatum* sono risultate essere molto rare (circa il 5% del campionamento) se confrontate con la produzione di tartufo: questo punto ci fa riflettere sul fatto se la fase simbiotica sia poi così importante per lo sviluppo del tartufo. Tuttavia, è stato possibile osservare tra le poche micorrize di *T. magnatum* ritrovate, che queste erano presenti anche in un'area non produttiva, suggerendo quindi che non ci sia un legame diretto tra micorrize e corpo fruttifero (Murat et al., 2005).

Ma *T. magnatum* è un fungo ectomicorrizico: per una corretta analisi delle sue dinamiche di popolazione, esso deve essere rintracciato anche nella fase vegetativa. Diventano inoltre interessanti le relazioni con i microrganismi che caratterizzano il suolo della tartufaia. In questo contesto ci siamo proposti, da una parte di rintracciare il micelio del tartufo bianco nel suolo

per monitorare la sua distribuzione nella tartufaia, in un qualunque periodo dell'anno, e dall'altra, di caratterizzare la biodiversità microbiologica del suolo nelle 2 zone a differente capacità produttiva. Nell'ottica delle micorrize come interazioni tripartite (Bonfante e Anca, 2009), si ipotizza che le comunità microbiche indigene abbiano un impatto sullo sviluppo della micorrizzazione e sulla produzione dei corpi fruttiferi (Frey-Klett e Garbaye 2005; Frey-Klett et al. 2007).

Per affrontare questo progetto che rientra nell'ambito della *metagenomica*, l'attuale campo di interesse della ricerca internazionale (Venter et al., 2004; Vogel et al., 2009; Warnecke et al., 2007), per cui il DNA totale che rappresenta l'intera comunità dei microorganismi può essere trattato come un genoma singolo, abbiamo analizzato il DNA direttamente estratto da una matrice complessa, il suolo della tartufaia. Questo approccio permette un monitoraggio anche dei microorganismi che non crescono *in vitro* e che sfuggono all'identificazione con l'utilizzo delle tecniche tradizionali della microbiologia, ossia le colture *in vitro*.

Con un approccio di nested PCR di un frammento del gene per la beta-tubulina, abbiamo rintracciato la fase vegetativa in campionamenti di suolo effettuati nella stessa tartufaia (Zampieri et al., 2010). In particolare quasi tutti i campioni invernali sono risultati positivi al *T. magnatum*, a differenza del 30% di quelli primaverili, e questo è in linea col ciclo biologico del *T. magnatum* che, fruttificando appunto d'inverno, disperde le spore nel suolo. Inoltre è emerso che la distribuzione della fase miceliare è molto più ampia, rispetto alla mappa dei corpi fruttiferi raccolti, infatti *T. magnatum* era anche presente nella zona non produttiva, suggerendo quindi che non ci sia relazione diretta tra la presenza del micelio e quella del corpo fruttifero. Infine, un dato inaspettato rivela che nel suolo è presente una variabilità genetica maggiore di quella riscontrata nei corpi fruttiferi.

Per caratterizzare la biodiversità microbiologica (funghi e batteri) del suolo, abbiamo confrontato i profili DGGE dei microorganismi presenti nelle aree produttive con quelli trovati nelle aree non produttive (Mello et al., 2010). Fra le comunità fungine *Mortierella* e *Fusarium oxysporum* sembravano essere maggiormente associati ai siti produttivi della tartufaia. Mentre tra le popolazioni microbiche, che risultavano dall'analisi di immagine distinte in due gruppi corrispondenti, in linea generale, alle due tipologie-aree produttive e non-, *Moraxella osloensis* appariva essere associata con i siti produttivi. Questo è in accordo col fatto che ceppi delle moraxellaceae sono presenti nei corpi fruttiferi da cui sono stati isolati in passato (Citterio et al., 1995).

Quindi, da un'indagine di questo tipo emerge che oggi sono disponibili tutti gli strumenti per la tracciabilità della filiera del *T. magnatum* che garantisce tanto il consumatore quanto il tartuficoltore. In altre parole, fino a oggi l'unica indicazione disponibile per chi voleva allestire una tartufaia sperimentale era l'analisi chimico-fisica del suolo. Oggi è possibile affiancare a questa una vera carta d'identità, in grado di rilevare l'eventuale presenza del micelio di *T. magnatum* nel suolo, e quindi è possibile stabilire non solo se un terreno è vocato alla tartuficoltura, ma anche rilevarne la persistenza in tartufaie di impianto.

### *Il tartufo nero: un tartufo con minor pretese*

Parallelamente alla tracciabilità del pregiato bianco *T. magnatum*, è stato possibile anche tracciare il tartufo pregiato nero, *T. melanosporum*, che si trova naturalmente in Italia, Francia e Spagna ma viene anche ottenuto in tartufaie sperimentali in altri paesi quali Israele, Stati Uniti e Nuova Zelanda (Hall et al., 2003). Da un punto di vista ecologico la presenza di questo fungo nel suolo è associata, a differenza del *T. magnatum*, alla formazione del pianello (meglio noto con la parola francese *brulé*), una zona intorno alla pianta ospite caratterizzata da assenza o scarsità di vegetazione ed entro cui si raccolgono generalmente i tartufi. Ipotesi sulla formazione del pianello hanno suggerito un effetto fitotossico mediato da metaboliti del tartufo (Pacioni, 1991; Lanza et al., 2004; Splivallo et al., 2007), tuttavia sia i meccanismi con cui avviene che il ruolo ecologico del *T. melanosporum* sono del tutto sconosciuti. In uno studio condotto sul suolo di tartufaie francesi buone produttrici di tartufo abbiamo dimostrato, sia con la recente tecnica di sequenziamento (454 Pi-rosequenziamento a opera della BMR Genomics s.r.l. di Padova) che con il clonaggio molecolare e la DGGE, che il *T. melanosporum* è il fungo dominante in questo ambiente in cui diminuiscono in percentuale gli altri funghi ectomicorrizici, suggerendo quindi un effetto competitivo del *Tuber* e un ruolo importante nella formazione del pianello (Napoli et al., 2010). In tartufaie di impianto non produttive e con pianelli non ancora evidenti abbiamo messo a punto un protocollo per controllare se il *T. melanosporum* sia presente sulle radici della pianta introdotta, se si è diffuso nel suolo e se abbia colonizzato le radici di piante ospiti preesistenti. L'utilizzo di primer specifici sviluppati da Suz et al. (2008) sui morfotipi identificati come micorrize di *T. melanosporum* ha dimostrato che questa specie, a differenza del bianco, colonizza quasi completamente le radici della pianta ospite, confermando quindi la forte competitività rivelata nei suoli precedenti in cui si produce tartufo. In questi casi tutti

i campioni di suolo che vengono saggiati risultano positivi al *T. melanosporum*. Durante questo percorso, su un suolo inoculato con *T. melanosporum* è stato trovato incidentalmente *T. indicum*, una specie cinese molto simile dal punto di vista morfologico ma non altrettanto pregiata, del cui arrivo sui mercati Europei ci sono già svariate segnalazioni (Murat et al., 2008). In seguito a questo rinvenimento stiamo attualmente monitorando tartufoie piemontesi, su richiesta della Regione, per valutare quanto questa presenza sia estesa e se influenzi in qualche misura la produttività del tartufo pregiato.

#### UNA FINESTRA SUL GENOMA DEL TARTUFO NERO PREGIATO

Un altro ambito di ricerca che apre nuove prospettive, che vanno dalla conoscenza di base del complesso e affascinante processo della simbiosi a informazioni di carattere applicativo, è quello dei sequenziamenti dei genomi. Negli ultimi anni l'avanzamento delle tecniche di sequenziamento e assemblaggio delle sequenze, parallelamente a una diminuzione dei costi ha portato al sequenziamento di un gran numero di genomi fungini (vedi il sito per l'aggiornamento, [http://fungalgenomes.org/wiki/Fungal\\_Genome\\_Links](http://fungalgenomes.org/wiki/Fungal_Genome_Links)). Il primo fungo simbiote di cui è stato sequenziato il genoma è *Laccaria bicolor* (Martin et al., 2008). Nonostante questo fungo sia importante dal punto di vista forestale, esso non è commestibile. Sull'onda della disponibilità del genoma di un fungo simbiote è stato scelto di sequenziare il genoma di un altro simbiote che, a differenza del primo, fosse anche commestibile e rivestisse un'importanza agro-alimentare e culturale. Da tale idea nasce a Torino nell'aprile del 2007 il progetto del sequenziamento del genoma di *T. melanosporum* che, coordinato in Francia da Francis Martin, direttore del laboratorio di 'Ecogenomics of Interactions' dell'INRA di Nancy, e in Italia dai gruppi CNR-Università di Torino e Università di Parma, è stato condotto da Génoscope, il centro di ricerca francese dedicato ai sequenziamenti genomici. Analizzato e interpretato grazie a un consorzio di 50 ricercatori con una dimensione pari a 125 milioni di coppie di basi, il genoma del tartufo nero è il più grande tra quelli dei funghi fino a oggi sequenziati (Martin et al., 2010). Sequenze ripetute riconducibili a elementi genetici mobili ("trasposoni"), che rappresentano il 58% dell'intero genoma, sono responsabili di questa massiccia quantità di DNA che, insieme a un ridotto numero di geni e di famiglie geniche fanno del *T. melanosporum* un fungo particolare. Circa 6000 geni trovano corrispondenza con quelli di altri funghi, tuttavia, diverse centinaia di geni sono unici del tartufo e possono svolgere un ruolo

fondamentale nel controllo della formazione del corpo fruttifero (il tartufo) e nello sviluppo della relazione simbiotica che si stabilisce con la pianta ospite. Confrontato con il genoma di *Laccaria bicolor*, il genoma di *T. melanosporum* suggerisce quindi che la simbiosi micorrizica abbia seguito strade diverse nel corso dell'evoluzione. Parallelamente a queste informazioni, il genoma di *T. melanosporum* custodisce i geni del mating type che svelano, senza più ombra di dubbio, che questo fungo è eterotallico, in accordo con quanto suggerito da Riccioni et al. (2008). Sulla base di questa scoperta sarà presto possibile selezionare individui di segno opposto per garantire la compatibilità sessuale e il successo riproduttivo in programmi di tartuficoltura che si potranno svolgere finalmente su base scientifica. Questa scelta di bilanciamento degli individui si tradurrà in una maggiore produttività del tartufo nero nelle tartufaie di impianto in cui le piante ospiti presentano individui di sesso opposto.

Altre informazioni di carattere applicativo che emergono sono migliaia di marcatori genetici sparsi lungo tutto il genoma che potranno essere impiegati per evidenziare polimorfismi genetici nei tartufi provenienti da diverse aree e quindi per tracciare i tartufi sulla base della loro provenienza. L'analisi del genoma ha anche evidenziato il ridottissimo potenziale allergenico del tartufo, che viene pertanto riconosciuto come *safe*, in quanto in esso mancano i geni codificanti enzimi chiave nella biosintesi delle temibili micotossine. Inoltre sono stati individuati i geni responsabili della formazione dei composti volatili che costituiscono l'aroma del tartufo (isoprenoidi, alcoli provenienti dall'Ehrlich pathway e, soprattutto, composti solforati coinvolti nell'assimilazione dello zolfo e nel metabolismo della cisteina/metionina).

L'insieme di queste informazioni permetterà di definire un profilo genetico-molecolare che coniughi l'origine geografica dei tartufi neri con il loro aroma.

#### DALLA RIZOSFERA ALLA TAVOLA

Il fine ultimo della rintracciabilità si traduce nel controllo della qualità tanto dei tartufi freschi quanto dei prodotti al tartufo che hanno, ormai, un largo consumo. In Italia la commercializzazione del tartufo è possibile per un numero limitato di specie di *Tuber* ed è regolamentata da una apposita legge (N. 752 del 16/12/1985). Gli strumenti molecolari messi a punto negli ultimi 15 anni insieme a una conoscenza approfondita della sistematica dei tartufi, iniziata a Torino a partire dall'erbario di Oreste Mattiolo, permettono oggi di identificare con certezza le specie di tartufo presenti sulla nostra tavola. Anche i tartufi in scatola

possono essere identificati su questa base (Mabru et al., 2004). Per i prodotti al tartufo l'osservazione delle spore e la messa a punto di un metodo che permetta il recupero di DNA amplificabile in PCR costituiscono lo strumento per svelare il segreto contenuto, ad es., nelle varie creme al tartufo. Se oggi è possibile quindi sapere quali specie sono state usate in un prodotto, nulla si sa sulla loro origine. È quindi al genoma che si affidano le prospettive di rintracciare l'origine geografica dei tartufi che sono adoperati in vario modo nell'industria alimentare. Basti pensare che in Italia, il tartufo fresco e lavorato ha un mercato che supera i 300 milioni di euro (<http://www.millionaire.it/content/view/1823/>).

## CONCLUSIONI

Grazie allo sviluppo della biologia molecolare, agli insegnamenti della micologia tradizionale e alla bioinformatica è stato possibile rintracciare i tartufi nelle tre fasi del ciclo biologico, conoscere le relazioni tra questi e altri funghi del suolo fino a stabilire che *T. melanosporum* è il fungo dominante nel pianello, a differenza del *T. magnatum* che si rivela poco competitivo e, per questo, poco adattabile alla diversità degli ambienti. Tuttavia i progressi tecnologici hanno accelerato il sequenziamento del genoma di molti funghi tra cui il *T. melanosporum*. Le potenzialità raccolte in un genoma disponibile sono svariate: dalla conoscenza di base della biologia del fungo a un avanzamento delle tecniche di coltivazione e quindi a un aumento controllato della produttività.

## RINGRAZIAMENTI

Si desidera ringraziare i colleghi dell'IPP-CNR e del Dipartimento di Biologia vegetale che hanno collaborato ai temi qui riassunti, nonché il Consorzio di ricercatori che hanno realizzato il sequenziamento e l'annotazione del genoma di *T. melanosporum*. I progetti illustrati sono stati finanziati da: Progetto Strategico CNR-Regioni (1994-1999), Regione Piemonte (2007-2009), Compagnia San Paolo (2006-2009) e Commessa Biodiversità del CNR (2003-2005).

## RIASSUNTO

Il tartufo è un fungo di pregio che coniuga interessi commerciali con inattesi interessi scientifici. Per questi due motivi, questo fungo, che vive in simbiosi con la pianta e sviluppa in specifiche condizioni l'aromatico corpo fruttifero (il tartufo), è oggetto di studi

che richiamano l'attenzione non solo dei ricercatori, ma anche di tartufai, agenzie private ed acquirenti di piantine micorrizzate. La filiera del tartufo parte dal suo ritrovamento in campo, ad opera generalmente di un cane guidato dal cacciatore di tartufi, e finisce sulla tavola del consumatore. Quest'ultimo lo consuma fresco o sotto forma di prodotto derivato. Grazie alla messa a punto di strumenti molecolari, oggi è possibile riconoscere le specie pregiate di tartufo bianco e di nero, e quindi controllare l'inoculo utilizzato per le piantine destinate alla vendita e, non ultimo, stabilire se un terreno ha una vocazione naturale alla produzione di tartufo.

#### ABSTRACT

The rhizosphere is a dynamic area close to the roots where microbes interact and compete for root exudates. Among fungi, some ectomycorrhizal fungi accomplish their life cycle with the development of fruitbodies called truffles. Some species are highly appreciated in many countries because of their special taste and smell. The great demand since the end of '90 for species such as *T. magnatum*, *T. melanosporum*, *T. aestivum* and *T. borchii* pushed us to develop protocols to be used for the species identification in all the phases of truffles. Results from these projects revealed that *T. magnatum* is less competitive in field than *T. melanosporum* which is the dominant fungus in the brulé. Tracing these species in the soil of the truffle-grounds allows to monitor the truffle distribution, to test whether a given soil is naturally vocated for trufficulture, and to search for the persistence of the inoculum in an artificial truffle-ground. The fast improvement of molecular techniques recently offered the possibility to sequence the genome of *T. melanosporum*, which at about 125 megabases is by far the largest and most complex fungal genome sequenced so far. The availability of this genome is the most powerful tool to provide insights in the biology of the fungus, as well as to improve the practice of the trufficulture.

#### BIBLIOGRAFIA

- BENCIVENGA M. (2005): *Stato attuale della tartuficoltura italiana*, in Atti Seminario sullo Stato attuale della Tartuficoltura Italiana, a cura di M. Bencivenga, D. Donnini, A. Gobbini, Norcia, pp. 8-12.
- BONFANTE P., ANCA J. (2009): *Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions*, «Annual Review of Microbiology», 63, pp. 363-383.
- CERUTI A., FONTANA A., NOSENZO C. (2003): *Le specie europee del genere Tuber: una revisione storica*, a cura di Regione Piemonte, Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino, p. 467.
- CITTERIO B., CARDONI P., POTENZA L., AMICUCCI A., STOCCHI V., GOLA G., NUTI M. (1995): *Isolation of bacteria from sporocarps of Tuber magnatum Pico, Tuber borchii Vitt. and Tuber maculatum Vitt.*, in *Identification and Biochemical Characterization. Biotechnology of Ectomycorrhizae*, a cura di V. Stocchi et al., New York, Plenum Press, pp. 241-248.
- FREY-KLETT P., GARBAYE J. (2005): *Mycorrhiza helper bacteria: a promising model for the genomic analysis of fungal-bacterial interactions*, «New Phytologist», 168, pp. 4-8.
- FREY-KLETT P., GARBAYE J., TARKKA M. (2007): *The mycorrhiza helper bacteria revisited*, «New Phytologist», 176, pp. 22-36.

- HALL I.R., YUN W., AMICUCCI A. (2003): *Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms*, «Trends in Biotechnology», 21, pp. 433-438.
- JEANDROZ S., MURAT C., WANG Y., BONFANTE P., LE TACON F. (2008): *Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus Tuber, the "true truffles"*, «Journal of Biogeography», 35, pp. 815-829.
- LANZA B., OWEZAREK 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, pp. 1410-1414.
- MABRU D., DOUET J.P., MOUTON A., DUPRÉ C., RICARD J.M., MÉDINA B., CASTROVIEJO M., CHEVALIER G. (2004): *PCR-RFLP using a SNP on the mitochondrial Lsu-rDNA as an easy method to differentiate Tuber melanosporum (Perigord truffle) and other truffle species in cans*, «International Journal of Food Microbiology», 94, pp. 33-42.
- MARTIN F., AERTS A., AHRÉN D., BRUN A., DANCHIN E.G.J., DUCHAUSSOY F., GIBON J., KOHLER A., LINDQUIST E., PEREDA V., SALAMOV A. ET AL. (2008): *The genome of Laccaria bicolor provides insights into mycorrhizal symbiosis*, «Nature», 452, pp. 88-92.
- MARTIN F., KOHLER A., MURAT C., BALESTRINI R., COUTINHO P.M., JAILLON O., MONTANINI B., MORIN E., NOEL B., PERCUDANI R. ET AL. (2010): *Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis*, «Nature», 464, pp. 1033-1038.
- MELLO A., GARNERO L., BONFANTE P. (1999): *Specific PCR-primers as a reliable tool for the detection of white truffles in mycorrhizal roots*, «New Phytologist», 141, pp. 511-516.
- MELLO A., FONTANA A., MEOTTO F., BONFANTE P. (2001): *Molecular and morphological characterization of Tuber magnatum mycorrhizas in a long-term survey*, «Microbiological Research», 155, pp. 279-284.
- MELLO A., MURAT C., GAVAZZA V., VIZZINI A., BONFANTE P. (2005): *Tuber magnatum Pico, a species of limited geographic distribution: its genetic diversity inside and outside a truffle-ground*, «Environmental Microbiology», 7, pp. 55-65.
- MELLO A., MURAT C., BONFANTE P. (2006): *Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy*, «FEMS Microbiology Letters», 260, pp. 1-8.
- MELLO A., MIOZZI L., VIZZINI A., NAPOLI C., KOWALCHUCK G., BONFANTE P. (2010): *Bacterial and fungal communities associated to Tuber magnatum-productive niches*, «Plant Biosystems», 144.
- MULLIS K. (1998): *Ballando nudi nel campo della mente*, Baldini, Castoldi, Dalaj, Milano, p. 222.
- MURAT C., VIZZINI A., BONFANTE P., MELLO A. (2005): *Morphological and molecular typing of the below-ground fungal community in a natural Tuber magnatum a truffle-ground*, «FEMS Microbiology Letters», 245, pp. 307-313.
- MURAT C., ZAMPIERI E., VIZZINI A., BONFANTE P. (2008): *Is the Périgord black truffle threatened by an invasive species? We dreaded it and it has happened*, «New Phytologist», 178, pp. 699-702.
- NAPOLI C., MELLO A., BORRA A., VIZZINI A., SOURZAT P., BONFANTE P. (2010): *Tuber melanosporum, when dominant, affects fungal dynamics in truffle grounds*, «New Phytologist», 185: 237-247.
- PACIONI G. (1991): *Effects of Tuber metabolites on the rhizospheric environment*, «Mycological Research», 95, pp. 1355-1358.

- RICCIONI C., BELFIORI B., RUBINI A., PASSERI V., ARCIONI S., PAOLOCCI F. (2008): *Tuber melanosporum outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario*, «New Phytologist», 180, 466-478.
- SMITH S.E., READ D.J. (1997): *Mycorrhizal Symbiosis*, New York, Academic Press.
- SPLIVALLO R., NOVERO M., BERTEA C.M., BOSSI S., BONFANTE P. (2007): *Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in Arabidopsis thaliana*, «New Phytologist», 175: 417-424.
- SUZ L.M., MARTIN M.P., OLIACH D., FISCHER C.R., COLINAS C. (2008): *Mycelial abundance and other factors related to truffle productivity in Tuber melanosporum-Quercus ilex orchards*, «FEMS Microbiology Letters», 285, pp. 72-78.
- WALKER T.S., BAIS H.P., GROTEWOLD E., VIVANCO J.M. (2003): *Root exudation and Rhizosphere Biology*, «Plant Physiology», 132, pp. 44-51.
- WARNECKE F., LUGINBÜHL P., IVANOVA N. ET AL. (2007): *Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite*, «Nature», 450, pp. 560-565.
- ZAMPIERI E., MURAT C., BONFANTE P., MELLO A. (2010): *Soil analysis reveals the presence of an extended mycelial network in a Tuber magnatum truffle-ground*, «FEMS Microbiology Ecology», 71, pp. 43-49.

