

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE



DIPARTIMENTO AGRICOLTURA, AMBIENTE E ALIMENTI

DOTTORATO DI RICERCA IN
"DIFESA E QUALITÀ DELLE PRODUZIONI AGRO-
ALIMENTARI E FORESTALI"

XXIV CICLO

TESI

**"Interazioni pianta – micorriza – insetto: il
modello *Quercus* spp. – *Tuber* spp. –
Leiodes cinnamomea (Panzer)"**

Dott. Patrick Di Santo

Coordinatore: Prof. P. Trematerra

Tutor: Prof. A. De Cristofaro

Co-Tutor: Prof. B. Paura

Anno Accademico 2011/2012

INDICE

Riassunto	III
1 Introduzione	1
1.1 Le micorrize	1
1.1.1 Ectomicorrize	1
1.1.1.1 Il genere <i>Tuber</i>	2
1.1.2 Endomicorrize (micorrize arbuscolari)	5
1.1.2.1 Il genere <i>Glomus</i>	6
1.2 Le interazioni micorriza – pianta – insetto: lo stato della ricerca	8
1.3 Scopo del lavoro e fasi della ricerca	13
2 La micorriza e la comunità vegetale	15
2.1 Lo stato della ricerca	15
2.2 Obiettivi dell'indagine	16
2.3 Materiali e metodi	18
2.4 Risultati e discussione	19
3 La micorriza e l'entomofauna	27
3.1 Gli insetti infeudati al genere <i>Tuber</i>	27
3.1.1 <i>Leiodes cinnamomea</i> (Panzer)	29
3.2 Studio dell'attività biologica di VOCs di <i>Tuber</i> spp. su <i>L. cinnamomea</i>	34
3.2.1 Stato della ricerca	34
3.2.2 Materiali e metodi	36
3.2.2.1 Estrazione dei VOCs da carpofori del genere <i>Tuber</i>	36
3.2.2.2 Insetti	37
3.2.2.3 Biosaggio comportamentale	38
3.2.2.4 Caratterizzazione chimica dei composti volatili estratti	40
3.2.3 Risultati	41
3.2.3.1 Biosaggio comportamentale	41
3.2.3.2 Caratterizzazione chimica dei composti volatili estratti	46
3.3 Risposte EAG di <i>L. cinnamomea</i> a composti identificati in <i>Tuber</i> spp.	48
3.3.1 Lo stato della ricerca	48
3.3.2 Materiali e metodi	50
3.3.2.1 Insetti	50
3.3.2.2 Elettroantennografia	50
3.3.2.3 Curve dose-risposta EAG con composti sintetici	52
3.3.3 Risultati	53
4 Interazione micorriza-pianta	56
4.1 Le piante ospiti delle micorrize	56
4.1.1 <i>Quercus pubescens</i> Willd.	56
4.2 Studio dei VOCs di <i>Q. pubescens</i>	56
4.2.1 Materiali e metodi	57
4.2.1.1 Materiale vegetale	57
4.2.1.2 Estrazione dei composti volatili	58
4.2.1.3 Insetti	59
4.2.1.4 Biosaggio comportamentale	59
4.2.1.5 Caratterizzazione chimica dei composti volatili estratti	59
4.2.2 Risultati	59

4.2.2.1	Risposte comportamentali ad estratti di <i>Q. pubescens</i>	59
4.2.2.2	Caratterizzazione chimica dei composti volatili estratti	61
4.3	Studio dei VOCs di <i>Q. pubescens</i> micropropagata e micorrizzata in vitro.....	63
4.3.1	La micorrizzazione di piante micropropagate	63
4.3.2	Micropropagazione di <i>Q. pubescens</i>	65
4.3.2.1	Materiali e metodi	68
4.3.2.2	Risultati	70
4.3.3	Micorrizzazione <i>in vitro</i> di <i>Q. pubescens</i>	72
4.3.3.1	Stato della ricerca.....	73
4.3.3.2	Materiali e metodi	74
4.3.3.3	Risultati	77
4.3.4	Estrazione dei composti volatili da <i>Q. pubescens</i> micorrizzata in vitro.....	79
4.3.4.1	Materiali e metodi	79
4.3.4.2	Caratterizzazione chimica dei composti volatili estratti	80
4.3.4.3	Risultati	81
5	Discussione e conclusioni	82
6	Bibliografia	86
7	Appendice	102
	Allegato I: Elenco delle specie vegetali.....	102
8	Ringraziamenti	105

Riassunto

L'attività di ricerca è stata finalizzata allo studio, condotto con un approccio multidisciplinare, delle interazioni tra il tartufo e l'ambiente, in particolare del rapporto tra il tartufo, gli insetti ad esso infestati, le piante simbionti e la comunità vegetale.

Tartufo e comunità vegetale

Per studiare il rapporto tra tartufo e comunità vegetale, sono stati condotti rilievi fitosociologici in una tartufaia naturale (Gildone, CB) a *Tuber aestivum* Vittadini (Tartufo nero estivo o scorzone). La finalità dello studio fitosociologico è stata quella di mettere in relazione la presenza della micorriza, e delle sostanze emesse, con la presenza/assenza di particolari specie vegetali. Una volta individuata la pianta micorrizzata, evidenziata dalla presenza della tipica "bruciata", sono stati effettuati rilievi all'interno e all'esterno della zona di bruciata, nonché nella zona di ricolonizzazione. Le specie vegetali raccolte sono state essiccate a costituire un erbario. Per ciascuna specie identificata è stato determinato il grado di copertura, basandosi su una scala convenzionale (Braun-Blanquet).

Dall'analisi fitosociologica è emerso che alcune forme biologiche (Terofite ed Emicriptofite) sono dominanti nell'ambiente delle tartufaie. Nella zona della bruciata mancano le Geofite e le Fanerofite. Le Fanerofite, tuttavia, sono le prime forme biologiche a ricomparire nella zona di ricolonizzazione, dove la pressione allelopatica esercitata dalle sostanze emesse dal micelio inizia a diminuire. Le Geofite sono, invece, le ultime forme biologiche a ricomparire: potrebbero essere le più sensibili alla pressione allelopatica, e risultano, pertanto, candidate come "piante indicatrici".

Tartufo e piante ospiti

Per quanto concerne il rapporto tra il tartufo e le sue piante ospiti, è stato condotto uno studio dei composti organici volatili (VOCs) emessi da *Quercus pubescens* Willd. (Roverella), pianta ospite di *T. aestivum*. Tale indagine ha avuto la finalità di valutare eventuali variazioni nell'emissione di composti volatili da parte di piante micorrizzate rispetto a quelle non micorrizzate.

Per l'estrazione dei VOCs sono state utilizzate foglie prelevate da piantine di roverella, micorrizzate e non micorrizzate con *T. aestivum*, allevate in condizioni di laboratorio. Per ciascuna estrazione, 10 g di foglie sono state esposte per 24 ore ad un flusso costante di aria (125 ± 5 SCCM, Standard Centimeter Cubic Minute) umidificata e purificata. Gli odori

sono stati catturati su cartuccia di carbone attivo; il successivo lavaggio della cartuccia con 5 ml di esano ha fornito l'estratto per la caratterizzazione chimica ed i biosaggi comportamentali.

Sono state condotte, con la stessa metodica, estrazioni di VOCs da carpofori di *Tuber magnatum* Pico, *T. borchii* Vittadini, *T. melanosporum* Vittadini, *T. mesentericum*, *T. uncinatum* Vittadini, *T. brumale* Vittadini e *T. aestivum*, al fine di determinare, nelle diverse specie di tartufo, eventuali differenze in termini qualitativi e quantitativi. Analogamente agli estratti da foglie, anche gli estratti da carpoforo sono stati utilizzati come stimoli per indagini comportamentali.

I dati delle analisi chimiche hanno evidenziato differenze nel profilo dei composti volatili emessi dai carpofori di *Tuber* spp.; differenze quali-quantitative emergono anche dai profili delle piantine di *Q. pubescens* micorrizzate e non micorrizzate.

Al fine di proseguire le indagini sui composti volatili emessi, è stato messo a punto un protocollo di micropropagazione di piantine di *Q. pubescens* in condizioni controllate. Tale procedura ha apportato due vantaggi: ottenere piantine di roverella clonate, per limitare la variabilità individuale nell'emissione dei VOCs; poter procedere alla micorizzazione delle stesse piantine direttamente *in vitro*, al fine di ottenere nuove piantine micorrizzate da cui effettuare ulteriori estrazioni di VOCs. Il protocollo di micropropagazione è stato impostato partendo da gemme ascellari di piante di *Q. pubescens* di due anni di età. Gli espianti sono stati posti in coltura, in apposito terreno, e mantenuti in condizioni controllate (temperatura 24±1°C; fotoperiodo 16L:8B; intensità luminosa 3.000 lux). È stata verificata, inoltre, l'efficacia di due diversi metodi di induzione della radicazione. Dal confronto delle due metodologie adottate, è stato possibile ottimizzare la procedura, permettendo di raggiungere un'elevata percentuale di radicazione, e quindi di stabilizzazione, della quasi totalità delle piantine in coltura.

Le piantine ottenute con tale metodica sono state successivamente sottoposte a micorizzazione *in vitro*, seguita dall'estrazione dei composti volatili emessi (VOCs), per lo studio della loro attività biologica sugli insetti infeudati al tartufo. Al fine di realizzare *in vitro* la micorizzazione di *Q. pubescens*, è stato messo a punto un protocollo sperimentale che utilizza simbionti arbuscolari (*Glomus intraradices* Schenck and Smith MUCL strain 41833). Nella fase preliminare di tale protocollo, due sistemi (aperto, HAM-P; chiuso, AM-P) sono stati messi a confronto per verificare quale dei due potesse favorire la

micorrizzazione *in vitro*. Dopo aver verificato che, con entrambi i sistemi, la piantina di *Q. pubescens* risulta micorrizzata, si è scelto di proseguire le prove utilizzando i sistemi chiusi. Le piantine di roverella da micorrizzare sono state messe a contatto, su terreno MRS, con radici micorrizzate di *Medicago truncatula* Gaertn. Dopo 4 settimane di contatto con il micelio, è stato valutato lo sviluppo della simbiosi che si è instaurata tra pianta e fungo. È stato, quindi, calcolato un indice di micorrizzazione (IM) che nel caso specifico di *Q. pubescens*, si è attestato intorno a valori del 20%. Dalle piantine micorrizzate adottando questo protocollo, è stata successivamente effettuata l'estrazione dei VOCs, successivamente sottoposti a caratterizzazione chimica.

Tartufo ed entomofauna

Il lavoro è stato orientato alla valutazione dell'attività biologica dei VOCs emessi dalle piante micorrizzate e dai carpofori del genere *Tuber* sugli insetti ad esso infeudati. In relazione a tale obiettivo, lo studio ha focalizzato l'attenzione sul coleottero *Leiodes cinnamomea* (Panzer), particolarmente dannoso al tartufo nelle principali aree di produzione, la cui presenza è stata accertata in tartufaie naturali della provincia di Ancona. Gli insetti (larve ed adulti) utilizzati per gli esperimenti sono stati raccolti in diversi periodi (gennaio - marzo 2010; novembre - dicembre 2011; gennaio - marzo 2012; novembre - dicembre 2012) e mantenuti in condizioni di laboratorio per la durata degli esperimenti.

Sono state registrate, mediante tecnica elettroantennografica (EAG), le risposte di maschi e femmine (n=10) di *L. cinnamomea* a 13 composti volatili, identificati da vari autori nello spazio di testa di diverse specie di *Tuber*, e ad un aroma sintetico di tartufo, disponibile in commercio e correntemente utilizzato dall'industria alimentare. Dei composti saggiati sono state calcolate le curve dose-risposta (5 dosi per ogni sostanza, da 0,01 µg/µl a 100 µg/µl).

I risultati indicano che gli adulti del micofago sono in grado di percepire, con diversa intensità, la maggior parte dei composti saggiati, componenti dell'aroma del carpoforo, e che l'ampiezza della risposta elettrofisiologica è dipendente dalla dose somministrata. La dipendenza della risposta dalla dose è stata osservata a partire dalla somministrazione di una dose compresa tra 0,1 µg/µl e 1 µg/µl.

Gli estratti delle foglie di *Q. pubescens* micorrizzata e non, come pure gli estratti dai carpofori, sono stati utilizzati come stimoli in un biosaggio comportamentale a doppia scelta, del tipo "a caduta". Sono state osservate le risposte comportamentali di femmine (n=10) di *L. cinnamomea*, esposte a dosi crescenti degli estratti (5 per ciascun estratto in

esano, da 0,01 µg/µl a 100 µg/µl, oltre all'estratto tal quale), confrontate con quelle al solvente controllo (esano). I risultati evidenziano come alcuni estratti da carpoforo (*T. mesentericum*, *T. borchii*, *T. melanosporum*) abbiano elicitato, a varie dosi, una risposta comportamentale positiva (orientamento verso la sorgente odorosa) da parte delle femmine saggiate, che hanno mostrato una preferenza significativa per gli estratti rispetto al controllo. Analogo risultato è stato osservato in risposta agli estratti di *Q. pubescens* micorrizzata rispetto sia al controllo (esano) che allo stesso estratto da pianta non micorrizzata.

In conclusione, è possibile affermare che la diversa emissione di composti volatili, tra pianta micorrizzata e non micorrizzata, riveste un ruolo fondamentale nel regolare i rapporti trofici che si instaurano tra vegetale e fitofago sia nella parte ipogea che epigea della pianta. La complessità della tematica ha reso indispensabile la contestualizzazione delle indagini ad un modello ben definito: la roverella, il tartufo e il suo principale fitofago. I risultati ottenuti, importanti da un punto di vista ecologico, ancorché ottenuti studiando uno specifico modello, potrebbero fungere da spunto per ulteriori indagini e condurre ad una più ampia generalizzazione dei fenomeni osservati.

1 Introduzione

1.1 Le micorrize

La prima definizione di “micorriza” (dal greco *mykes*: fungo e *rhiza*: radice) risale al 1885, quando B. Frank identificò con tale nome “la struttura costituita da un intreccio di ife, che include o riveste gli apici radicali delle piante, ricoprendole a mò di mantello”.

Le micorrize sono associazioni simbiotiche tra un fungo ed una pianta. Il fungo colonizza le radici ed ottiene i carboidrati prodotti dalla pianta, mentre in cambio la pianta ottiene i benefici derivanti da una maggiore capacità di assorbimento sia dell’acqua che dei nutrienti minerali. Nel corso degli anni la ricerca scientifica ha permesso di approfondire le conoscenze e di capire il funzionamento delle micorrize.

In base alla capacità o meno del fungo di penetrare all’interno delle cellule radicali della piantina ospite, e all’aspetto dell’unione, possiamo individuare due forme di micorrize:

1. ectomicorriza
2. endomicorriza

1.1.1 Ectomicorrize

Le ectomicorrize (EM) sono così definite perché le ife non penetrano mai all’interno delle cellule dell’ospite. In questo tipo di simbiosi, inizialmente le ife avvolgono le radici assorbenti formando un mantello chiamato “micoclina”; il colore, lo spessore e la forma variano secondo la specie di fungo simbiote. Dal mantello, le ife si insinuano tra le cellule della corteccia radicale formando un intreccio intercellulare, chiamato “reticolo di

Hartig”. Questo reticolo può essere più o meno sviluppato: nelle conifere raggiunge gli strati cellulari più profondi, mentre nelle latifoglie è limitato ai primi strati della corteccia. In ogni caso, le ife che si sviluppano attorno alle radici secondarie non giungono mai ad interessare i tessuti che trasportano la linfa elaborata. Sempre dal mantello, si diparte una fitta rete di ife che si espandono notevolmente nel terreno circostante e, allorquando le condizioni siano ottimali, possono dar luogo a strutture riproduttive dette carpofori. Quando la radice è micorrizzata, generalmente risulta trasformata in profondità: la crescita è rallentata e la scomparsa dei peli radicali fa assumere alla radice una forma clavata. Un classico esempio di questa tipologia di micorriza è certamente il tartufo. I tartufi appartengono a funghi afferenti al genere *Tuber*, dotati di un carpoforo ipogeo, che vivono in un rapporto di simbiosi ectomicorrizica con piante arboree ed arbustive.

1.1.1.1 Il genere *Tuber*

I funghi del genere *Tuber*, comunemente noti come Tartufi, e caratterizzati dalla presenza di un carpoforo ipogeo, vivono in un rapporto di simbiosi micorrizica con piante arboree ed arbustive.

La classificazione dei tartufi, fino a vent’anni fa, si basava su criteri morfologici macroscopici; grazie al progresso tecnologico, che ha messo a disposizione strumentazioni ottiche sempre più sofisticate, è stato possibile prendere in considerazione molti più caratteri microscopici. Se in passato i tartufi erano classificati solo in base alla dimensione, al colore, alla forma e ad alcune caratteristiche delle spore (Fig. 1), oggi si considerano anche caratteri relativi alla forma e dimensione delle cellule del peridio (la scorza esterna che riveste il tartufo), e delle spore, oltre che alle ornamentazioni di queste ultime.

Negli ultimi anni, inoltre, le più recenti tecniche di biologia molecolare hanno permesso una classificazione delle specie del genere *Tuber* che consideri la loro filogenesi, ossia le loro relazioni evolutive, basandosi sull'esame di specifiche regioni del DNA. Si comprende, quindi, che la classificazione dei tartufi dal punto di vista sistematico, è attualmente controversa e diversa, a seconda che vengano considerati i criteri tradizionali morfologici o quelli innovativi di filogenesi molecolare.



Figura 1 - Chiave di riconoscimento delle diverse specie di *Tuber* sp., basata su caratteristiche morfologiche.

Per il genere *Tuber*, è possibile rifarsi alla classificazione tradizionale secondo Trappe (1979) o alla classificazione filogenetica secondo O' Donnel *et al.*, 1997 e Percurdani *et al.*, 1999 (Fig. 2).

Il tartufo è un carpoforo ipogeo, che si sviluppa nel terreno ad una profondità variabile da pochi centimetri a 40-50 cm, in prossimità della pianta simbionte, e che a maturità emette un aroma penetrante e tipico a seconda della specie. Il tartufo è formato da una parte esterna detta “peridio” o

“scorza”, e una polpa interna detta “gleba”. Il peridio può essere liscio o rugoso, chiaro (dal bianco al giallo nei tartufi bianchi) o scuro (dal bruno al nero nei tartufi neri). La gleba è caratterizzata da linee sinuose chiare che si alternano a quelle scure; le venature più chiare sono formate da ife sterili (parafisi), mentre le venature più scure sono costituite da ife fertili (ife ascogene). Il colore della gleba diventa sempre più scuro con l’aumentare del grado di maturazione. Le ascospore contenute negli aschi, in numero variabile da 1 a 6, rappresentano il mezzo di propagazione dei tartufi. Un ruolo molto importante sulle possibilità di sviluppo del tartufo è giocato dall’acqua, dato che tutti i funghi sono costituiti da almeno il 70% di questo elemento. L’aroma del tartufo ha come funzione quella di attirare insetti e roditori che, nutrendosene, indirettamente ne diffondono le spore.

CLASSIFICAZIONE TRADIZIONALE	CLASSIFICAZIONE FILOGENETICA
Regno Funghi	Regno Funghi
Classe Ascomycetes	Classe Ascomycetes
Ordine Pezizales	Ordine Pezizales
Famiglia Pezizaceae	Famiglia Pezizaceae
Famiglia Helvellaceae	Genere <i>Terfezia</i>
	Genere <i>Mattirolomyces</i>
Famiglia Pyronemataceae	Famiglia Helvellaceae
Genere <i>Stephensia</i>	Genere <i>Balsamia</i>
Famiglia Balsamiaceae	Famiglia Pyronemataceae
Genere <i>Balsamia</i>	Genere <i>Stephensia</i>
Famiglia Geneaceae	
Genere <i>Genea</i>	
Famiglia Tuberaceae	Famiglia Geneaceae
Genere <i>Tuber</i>	Genere <i>Genea</i>
Famiglia Terfeziaceae	
Genere <i>Terfezia</i>	Famiglia Tuberaceae
Genere <i>Choiromyces</i>	Genere <i>Tuber</i>
	Genere <i>Choiromyces</i>
(Trappe, 1979)	(O'Donnel et al., 1997; Percurdani et al., 1999)

Figura 2 - Classificazione tradizionale secondo Trappe (1979), e classificazione filogenetica secondo O' Donnel et al. (1997) e Percurdani et al. (1999).

Le specie e varietà di tartufo presenti in Italia allo stato spontaneo e commestibili, anche per legge, sono:

- *Tuber melanosporum* Vittadini – Tartufo nero pregiato
- *Tuber magnatum* Pico – Tartufo bianco
- *Tuber aestivum* Vittadini – Tartufo nero estivo
- *Tuber aestivum* var. *uncinatum* Chat. – Tartufo uncinato
- *Tuber brumale* Vittadini – Tartufo brumale
- *Tuber brumale* forma *moschatum* De Ferry – T. nero moscato
- *Tuber mesentericum* Vittadini – Tartufo nero di Bagnoli
- *Tuber macrosporum* Vittadini – Tartufo nero liscio
- *Tuber borchii* Vittadini – Tartufo bianchetto o marzuolo

1.1.2 Endomicorrize (micorrize arbuscolari)

Le endomicorrize o micorrize arbuscolari (AM) sono così definite perché, a differenza delle ectomicorrize, il fungo penetra all'interno delle cellule dell'ospite, e mancano, inoltre, di un mantello fungino esterno; sono considerate più antiche delle ectomicorrize.

Le spore presenti nel terreno germinano in presenza di radici ospiti per effetto degli essudati radicali. Esse si sviluppano fino a raggiungere la radice stessa, e la colonizzano penetrando sia attraverso gli spazi intercellulari sia direttamente nelle cellule. Il fungo si diffonde così attraverso le cellule corticali, senza invadere mai il cilindro centrale e le cellule dell'apice radicale. All'interno delle cellule, le ife si diramano a formare delle strutture ramificate, gli arbuscoli, responsabili degli scambi nutrizionali tra i due simbionti: la pianta cede i carboidrati eccedenti prodotti attraverso la

fotosintesi, il fungo a sua volta cede i sali minerali assorbiti dal suolo circostante. Gli arbuscoli hanno vita breve: dopo pochi giorni infatti degenerano. Un'altra struttura prodotta dalle ife fungine è la vescicola, rigonfiamento tondeggianti intracellulare che rappresenta un organo di accumulo di granuli di grasso con funzione di riserva.

Anche se la radice non subisce variazioni morfologiche notevoli, come avviene, invece, nel corso di una simbiosi da ectomicorrize, l'apparato radicale risente della presenza del fungo: possono infatti variare il grado di ramificazione e le dimensioni delle radici stesse, fino ad aumentare di centinaia di volte.

Formano endomicorrize arbuscolari circa 130 specie di funghi appartenenti all'ordine Glomales (Zygomycetes); esse interessano molte piante erbacee, ortive, da frutto, forestali e tropicali. Tale varietà di potenziali piante simbionti è, quindi, indice di mancanza di specificità: micorrize arbuscolari si possono ritrovare anche in Pteridofite ed Epatiche; non si ritrovano invece in ambienti asfittici.

Un classico esempio di micorriza arbuscolare è rappresentata dalle simbiosi di piante con funghi del genere *Glomus*.

1.1.2.1 Il genere *Glomus*

Come con altri funghi AM, tutte le specie del genere *Glomus* sono ritenute dei simbionti obbligati, e quindi dipendono dall'associazione micorrizica con le radici delle piante per poter completare il loro ciclo vitale. Non possono essere coltivate in laboratorio in assenza di una pianta ospite. Le specie di *Glomus* sono del tutto asessuali, e sono presenti in quasi tutti gli habitat terrestri, compresi i terreni coltivabili, deserti, praterie, foreste tropicali e tundra. Le spore sono prodotte nella punta delle ife, all'interno della radice

della pianta ospite o al di fuori della radice, nel terreno. Quando le spore germinano, il tubo germinativo che viene prodotto cresce attraverso il suolo fino ad entrare in contatto con le radici. Il fungo penetra poi la radice e si sviluppa tra le cellule della stessa, o può penetrare la parete cellulare e crescere all'interno delle cellule radicali. All'interno della radice, il fungo forma arbuscoli, che sono molto ramificati e che fungono da siti di scambio di nutrienti con la pianta. Gli arbuscoli si formano all'interno delle pareti cellulari delle piante, ma sono circondati da una membrana cellulare invaginante. Il fungo può anche formare vescicole, strutture gonfie che si ritiene possano funzionare come organi di conservazione dei nutrienti.

I funghi micorrizici arbuscolari sono in grado di fornire numerosi vantaggi alle piante ospiti, incluso un maggiore assorbimento dei nutrienti, resistenza alla siccità e resistenza alle malattie.

1.2 Le interazioni micorriza – pianta – insetto: lo stato della ricerca

Le associazioni con i funghi micorrizici non influenzano solo la *performance* di singole piante, ma anche l'intera struttura della comunità vegetale, la produttività delle piante e i cicli dei nutrienti (Smith & Read, 2008). Anche gli insetti si associano alle piante in moltissimi ecosistemi, in cui essi influenzano le singole piante, la comunità vegetale e gli ecosistemi stessi, attraverso i loro molteplici ruoli di erbivori, parassitoidi, impollinatori e diffusori di spore/semi (Price, 1997). Recenti ricerche hanno dimostrato che insetti e funghi micorrizici interagiscono in modo complesso, con vantaggi che possono essere importanti per gli insetti, i funghi ed anche per le piante ospiti. Diverse *reviews* sintetizzano i risultati di tali lavori, e riportano indicazioni circa i modelli di studio che potrebbero contribuire a migliorare la comprensione del complesso mondo delle interazioni tritrofiche (Gehring & Whitham, 1994, 2002; Gange & Bower, 1997; Bennett *et al.*, 2006; Gange, 2007). Gehring & Bennett (2009) nella loro *review* hanno esaminato diverse ricerche, allo scopo di descrivere le relazioni indirette che esistono tra i funghi micorrizici e gli insetti, discutendone i potenziali meccanismi. Essi sottolineano, inoltre, l'importanza di collocare insetti, funghi micorrizici e piante ospiti in un più ampio contesto comunitario, che includa molte altre interazioni.

Gli studi condotti nel corso degli anni hanno interessato i due principali tipi di micorrize (ecto- ed endomicorrize). Variazioni funzionali tra le specie micorrizzate sono state ben dimostrate sia per quanto riguarda funghi ectomicorrizici che endomicorrizici, in termini di riproduzione di risorse utilizzate e tolleranza a condizioni ambientali estreme (Taylor & Bruns, 1999,

Hart & Reader, 2002). Queste variazioni sulla funzionalità delle piante influenzano anche le relazioni con gli insetti (Klironomos, 2003; Nara, 2006).

Le modalità con cui gli insetti sono in grado di influenzare i funghi simbiotici delle piante non sono state investigate in maniera completa. È noto che alcuni insetti, detti micofagi, si nutrono di funghi e micelio, permettendo in questo modo la dispersione delle spore (Friesse & Allen, 1993; Smith & Read, 2008). I predatori di insetti erbivori potrebbero, inoltre, influenzare in maniera indiretta i funghi micorrizici per mezzo di una “cascata trofica” ma tale possibilità non è stata ben studiata (Gehring & Bennett, 2009). Altrettanto, anche gli impollinatori potrebbero influenzare i funghi micorrizici in maniera indiretta, attraverso un’alterazione della *fitness* della pianta, ma tali possibilità non sono state ben investigate (Gehring & Bennett, 2009). Gli studi condotti sugli insetti erbivori e sulle micorrize si sono concentrati, in generale, dapprima su fitofagi sotterranei (Currie *et al.*, 2006) e sui loro effetti sulla colonizzazione micorrizica, in termini di stima della percentuale di micorrizzazione delle radici.

Molti studi hanno focalizzato l’attenzione sull’effetto indiretto che ecto- ed endomicorrize hanno sui fitofagi, cioè in che modo i funghi micorrizici possono influenzare le interazioni tra le piante e i suoi erbivori. Questi studi si basano su un protocollo abbastanza consolidato. La pianta viene micorrizzata con un fungo simbiote determinato (per le micorrize arbuscolari è molto usato il genere *Glomus*); per quel che concerne gli erbivori, è utilizzata una singola specie, di cui sono indagati diversi parametri (crescita, sopravvivenza, contenuto chimico della pianta, tolleranza della pianta al fitofago) che poi sono confrontati con il controllo (la pianta non inoculata).

Gli insetti fitofagi sono generalmente influenzati in maniera negativa da parte dei funghi ectomicorrizici (Gehring & Whitham, 1991; Del Vecchio *et*

al., 1993; Gehring *et al.*, 1997; Kolb *et al.*, 1999; Mueller *et al.*, 2005), tanto che si sviluppano meglio su piante che presentano una bassa colonizzazione di ectomicorrize (Kolb *et al.*, 1999). I fitofagi possono rispondere in maniera diversa a radici micorrizzate con micorrize arbuscolari (endomicrorrize): la risposta può essere sia negativa (Gange *et al.*, 2002a; Wamberg *et al.*, 2003) che positiva (Wamberg *et al.*, 2003; Currie *et al.*, 2006; Kula *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2005).

Sia funghi ectomicorrizici che endomicorrizici hanno mostrato la capacità di aumentare la dimensione delle piante e di alterare la qualità dei nutrienti scambiati (Smith & Read, 1997); la micorriza altera anche l'interazione pianta-erbivoro a seguito di cambiamenti sia nei composti costitutivi che in quelli di difesa indotti, nonché i meccanismi di tolleranza (Bennett *et al.*, 2006; Guerrieri *et al.*, 2004). Le ipotesi che sono state fatte circa le modalità con cui la micorriza influenzi l'interazione tra pianta ed erbivori (Bennett *et al.*, 2006; Gange *et al.*, 2002), riguardano soprattutto le differenze comportamentali nella modalità di alimentazione; tali differenze, infatti, possono rendere i fitofagi più o meno sensibili ai cambiamenti di concentrazione di nutrienti che si osservano in presenza di micorrize arbuscolari. Secondo tali ipotesi, gli insetti molto specializzati, e con apparato boccale succhiatore, possono rispondere in modo positivo alla micorrizzazione con micorrize arbuscolari, mentre quelli generalisti, con apparato boccale masticatore, quasi sicuramente rispondono in modo negativo alla micorrizzazione con funghi arbuscolari (Bennett *et al.*, 2006).

Un aspetto interessante, che da più di un decennio è oggetto di indagini e di ricerche approfondite, riguarda l'emissione di composti volatili (VOCs = Volatile Organic Compounds), da parte di piante che siano state danneggiate da insetti erbivori. In questo specifico caso si parla di HIPVs (Herbivore-Induced Plant Volatiles). È noto che questo fenomeno rappresenti una forma

di difesa indiretta ed indotta. Si è osservato che i composti volatili emessi da diverse parti delle piante (organi epigei, radici) possono variare in maniera drastica sia a livello quantitativo che qualitativo quando le piante risultano danneggiate (Turlings *et al.*, 1995; Tumlinson *et al.*, 1999). Le indagini condotte hanno permesso di stabilire che i VOCs inducono nelle piante una difesa indiretta (Dicke & Sabelis, 1988; Dicke *et al.*, 1990; Turlings *et al.*, 1990). È ormai ampiamente accettato che i VOCs sono in grado di attrarre artropodi predatori e/o respingere insetti erbivori e, quindi, fungono da meccanismo di resistenza nei vegetali (Dicke, 1999; Tumlinson *et al.*, 1999). A causa della loro diretta influenza sulle funzioni fisiologiche, è stato suggerito che i VOCs potrebbero avere un ruolo anche nelle interazioni tritrofiche (Peñuelas & Llusà, 2004). Questo fenomeno, molto studiato per quanto riguarda l'ambiente soprassuolo, è stato investigato di meno per quel che riguarda, invece, il sottosuolo, in riferimento alle emissioni di VOCs, data la maggiore difficoltà nell'esaminare un ambiente sotterraneo (Schausberger *et al.*, 2012). Altro fenomeno poco noto, sul quale si è concentrato recentemente il numero di indagini, riguarda gli effetti di microrganismi mutualistici del sottosuolo (come rizobatteri e funghi micorrizici) sulle difese indirette ed indotte delle piante nei confronti di insetti fitofagi. Solo pochi studi finora hanno analizzato gli effetti delle simbiosi micorriziche sui composti volatili emessi da parti epigee di pianta, potenzialmente in grado di influenzare gli insetti associati alle piante stesse. In seguito alla micorrizzazione con *Glomus* sp., ad esempio, sono stati evidenziati cambiamenti sostanziali nella produzione di VOCs da parte di *Artemisia annua* L. (Rapparini *et al.*, 2008). Fontana *et al.* (2009) e Leitner *et al.* (2010) hanno dimostrato come *Glomus intraradices* Schenck and Smith, una micorriza arbuscolare, riesca ad indurre dei cambiamenti nell'emissione di VOCs da parte di porzioni epigee di *Plantago lanceolata* L. (Fontana *et al.*,

2009) e di *Medicago truncatula* Gaernt. (Leitner *et al.*, 2010) quando le stesse sono danneggiate da larve di lepidotteri del genere *Spodoptera*.

Un altro importante studio sul ruolo che i funghi AM hanno sull'emissione dei composti volatili della pianta è stato condotto da Guerrieri *et al.* (2004), ed ha messo in evidenza che sostanze volatili rilasciate da piantine di pomodoro associate a funghi simbiotici attraggono un maggior numero di parassitoidi rispetto al blend di VOCs costitutivo emesso da piantine di pomodoro non micorrizate. Tale lavoro mette in evidenza l'importanza delle varie interazioni, a più livelli, tra piante, funghi simbiotici ad esse associati, insetti erbivori e loro predatori/parassitoidi. A conferma di ciò, un recentissimo studio di Schausberger *et al.* (2012), ha confermato questo tipo di interazione, osservando come, in piante di *Phaseolus vulgaris* L., l'emissione di composti volatili indotti (HIPVs) in seguito all'attacco dell'acaro *Tetranychus urticae* Koch sia alterata dalla presenza contemporanea della simbiosi micorrizica con il fungo *Glomus mosseae* (Nicol.& Gerd.) Gerdemann & Trappe. Inoltre, il blend di composti volatili HIPVs emesso in condizioni di micorrizzazione, si è dimostrato maggiormente attrattivo per l'acaro predatore *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot, rispetto al blend costitutivo delle piantine attaccate dall'acaro litofago, ma non micorrizate.

1.3 Scopo del lavoro e fasi della ricerca

Dal momento che la colonizzazione delle radici da parte delle micorrize sembra indurre una variazione nella risposta degli insetti erbivori, si ritiene opportuno migliorare la comprensione dei meccanismi che sottendono ad essa. Data la complessità dell'argomento l'indagine è stata contestualizzata ad un modello ben specifico di fattori interagenti, uno per ciascuna categoria (pianta, insetto, micorriza), particolarmente funzionale allo scopo. La scelta ha tenuto conto anche delle vocazioni del territorio in cui è stata svolta la tesi, quello molisano, dove la micorriza per eccellenza è rappresentata dal tartufo (*Tuber* spp.).

Lo studio delle interazioni pianta - micorriza – insetto si è concretizzato, dunque, in un'indagine relativa ai rapporti che intercorrono tra *Quercus pubescens* Willd. (roverella), *Tuber* spp. (tartufo) e *Leiodes cinnamomea* (Panzer). Lo studio, condotto con un approccio multidisciplinare, ha coinvolto, oltre alla pianta ospite suddetta, anche l'intera comunità vegetale delle tartufaie.

La ricerca è stata suddivisa in diverse fasi, in relazione ai fattori considerati.

- Per studiare il rapporto tra tartufo e comunità vegetale, sono stati condotti rilievi, secondo il metodo fitosociologico, in una tartufaia naturale a *T. aestivum*, con la finalità di mettere in relazione la presenza della micorriza con la presenza/assenza di particolari specie vegetali.
- Relativamente al rapporto tra tartufo e insetti ad esso infeudati, il lavoro è stato orientato alla valutazione dell'attività biologica dei VOCs emessi dalle piante micorrizzate e dai carpofori del genere *Tuber* sul coleottero *L. cinnamomea*, particolarmente dannoso al tartufo nelle principali aree di produzione.

- Per quanto concerne il rapporto tra il tartufo e le sue piante ospiti, è stato condotto uno studio dei composti volatili emessi da *Q. pubescens* (roverella), pianta ospite di *T. aestivum*. Tale indagine ha avuto la finalità di valutare eventuali variazioni nell'emissione di composti volatili da parte di piante micorrizzate rispetto a quelle non micorrizzate.

2 La micorriza e la comunità vegetale

2.1 Lo stato della ricerca

Quando alcune specie di tartufo, come *T. aestivum* e *T. melanosporum*, instaurano un rapporto di simbiosi con una pianta ospite, colonizzandone le radici, lo sviluppo di alcune piante erbacee e della maggior parte dei cespugli intorno ad essa è inibito dalla produzione di numerose sostanze, tra cui vari composti volatili (VOCs) emessi dal micelio (Splivallo *et al.*, 2007); di conseguenza, il suolo resta quasi privo di vegetazione. Questo effetto, noto come “bruciata”, può essere permanente o temporaneo, a seconda dell’andamento climatico e della stagione (Plattner & Hall, 1995).

Le prime piante a scomparire dall’area interessata sono le erbacee dicotiledoni, lasciando da ultime solo quelle piante indicatrici di una potenziale zona tartuficola (Olivier *et al.*, 2002). Specificatamente per le ectomicorrize, prima che la produzione di tartufo abbia inizio, gli unici indizi relativi alla presenza effettiva della micorriza sulla pianta sono rilevabili sulle radici e non esternamente (De Miguel & Sáez, 2005). Successivamente, la presenza delle aree di bruciata assume importanza diagnostica per confermare la presenza di micorriza e di tartufo nel sottosuolo.

Lo studio delle relazioni tra la presenza della micorriza (in questo caso del genere *Tuber*) e la comunità vegetale coesistente riveste una notevole importanza ecologica, dal momento che la presenza della prima influenza in modo notevole la sopravvivenza e la selezione di specie vegetali in quell’habitat, contribuendo alla creazione di uno specifico ecosistema.

La crescita e lo sviluppo delle ectomicorrize, nel caso specifico di diverse specie di tartufo nero, sono stati oggetto di numerosi studi negli anni ’80 e ’90, in particolare nelle aree a maggiore vocazione tartuficola (Italia e

Francia) (Chevalier *et al.*, 1982; Giraud, 1988; Granetti & Angelini 1992; Mamoun & Olivier 1993; Bencivenga *et al.* 1992, 1995; Donnini & Bencivenga 1995; Di Massimo *et al.* 1996; Granetti & Baciarelli Falini, 1997).

Meno numerosi sono, invece, gli studi che hanno indagato la specifica composizione floristica delle tartufaie. Mentre in Francia le indagini sono state focalizzate sulla specie più pregiata di tartufo nero (*T. melanosporum*) (Chatin, 1892; Delmas, 1976), così come pure in Spagna (González-Armada *et al.*, 2005), in Italia le indagini sono state estese anche al tartufo nero estivo (*T. aestivum*), al tartufo nero di Bagnoli (*T. mesentericum*) ed al tarufo uncinato (*T. uncinatum*) (Bencivenga *et al.*, 1996). Ancora meno frequenti, inoltre, sono stati gli studi che hanno focalizzato l'attenzione alla zona della bruciata, mettendone in risalto i cambiamenti della composizione floristica rilevata (Olivier *et al.*, 1996; Martegoute, 2002; González-Armada *et al.*, 2010).

2.2 Obiettivi dell'indagine

È stato pianificato uno studio di catalogazione delle specie vegetali presenti all'interno di una tartufaia naturale a *T. aestivum* sita nell'agro di Gildone (CB) (Fig. 3).

Lo scopo dell'indagine è stato quello di approfondire le conoscenze sull'ecologia della tartufaia, analizzando l'influenza di *T. aestivum* sulla composizione floristica. L'unico studio analogo a cui si può far riferimento è stato effettuato in Italia da Bencivenga *et al.* (1996) in tartufaie a specie di “tartufi minori”, anche se i rilievi floristici, riportati con il solo dato di presenza, sono riferiti all'intera area della tartufaia e non tengono in alcun

conto della ripartizione delle zone determinate dall'influenza del micelio del tartufo sulle specie vegetali.

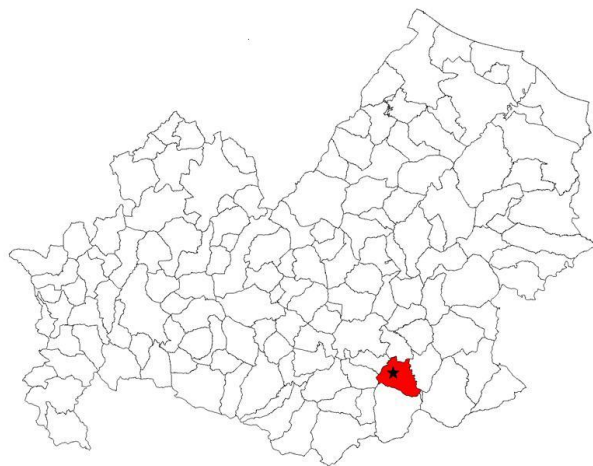


Figura 3 - Localizzazione della tartufaia a *T. aestivum* (agro di Gildone –CB).

L'analisi floristica servirà quindi, nel nostro caso, ad evidenziare e a correlare le differenze presenti tra le 3 zone determinate dallo sviluppo del micelio e cercare eventuali indicatori della micorrizzazione e della presenza del carpoforo.

A tal scopo sono stati individuati e calcolati alcuni indici originali o già riportati per la letteratura quali il rapporto dicotiledoni/monocotiledoni (Olivier *et al.*, 2002), la ricchezza floristica, la rappresentatività in percentuale delle famiglie nonché gli spettri delle forme biologiche secondo Raunkiaer (1934).

Sono stati infine compiuti dei rilievi secondo il metodo fitosociologico classico (Braun-Blanquet, 1964) nella prateria, nel cespuglieto e nel bosco, secondo una logica seriale. Da questi rilievi è stato possibile desumere le alleanze o le associazioni di riferimento per ciascuna comunità vegetale rilevata e ricostruire la serie di vegetazione presente, così da fornire un chiaro quadro di riferimento ambientale.

2.3 Materiali e metodi

Una volta individuata la pianta micorrizata per la presenza della tipica “bruciata”, sono stati effettuati, nell’ultima decade del mese di maggio del 2011 e 2012, dei campionamenti floristici nella corona prossima al tronco (detta anche zona di ricolonizzazione), nella bruciata e nella prateria adiacente a dominanza di *Brachypodium rupestre* (Host) R. et S.. Uno schema della localizzazione delle zone campionate per ciascuna pianta è illustrato in Fig. 4.

Per ciascuna specie identificata è stato determinato il grado di copertura, basandosi sulla scala di abbondanza-dominanza di Braun-Blanquet (1964).

Il campionamento, ripetuto in due stagioni successive, è stato effettuato per cogliere eventuali fluttuazioni delle specie in dipendenza dell’andamento climatico e verificare i caratteri essenziali del pattern floristico nelle zone della tartufaia.

L’elenco delle specie vegetali, dettagliato con le sue forme biologiche, ed i rilievi floristici e fitosociologici effettuati, sono riportati nell’Allegato I.

Parallelamente sono stati realizzati, nella stessa area, dei rilievi fitosociologici delle principali fisionomie (erbacee, arbustive ed arboree) presenti nelle aree adiacenti alla tartufaia naturale, tenendo presente l’omogeneità delle condizioni ambientali.

Lo scopo è stato quello di pervenire ad un inquadramento fitosociologico delle comunità vegetali rilevate e determinare la serie di vegetazione di riferimento.

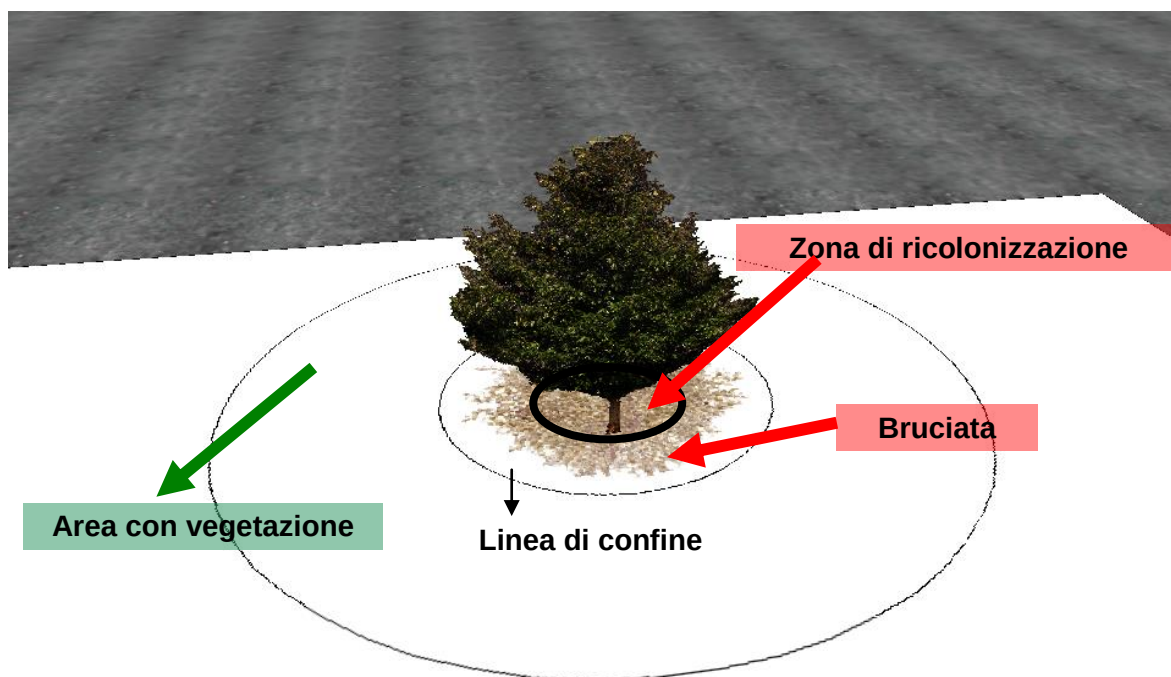


Figura 4 - Schema delle zone di campionamento delle essenze vegetali in prossimità della pianta micorrizata (*Q. pubescens*).

2.4 Risultati e discussione

Dall'analisi dei dati raccolti nelle stagioni 2011 e 2012, si evince come l'area dove è stato rinvenuto il maggior numero di specie è rappresentata dalla prateria con 33 specie, seguita dalla zona posta in prossimità del tronco (23 specie). Come atteso, nella zona di “bruciata” sono state campionate un numero di specie inferiore, ridotte di circa la metà rispetto a quelle riscontrate nella prateria (Fig. 5).

Questo andamento evidenzia l'attività dei composti allelopatici che esercita una funzione di controllo o di inibizione su molte specie ritrovate nella zona prossima al tronco o nella prateria adiacente.

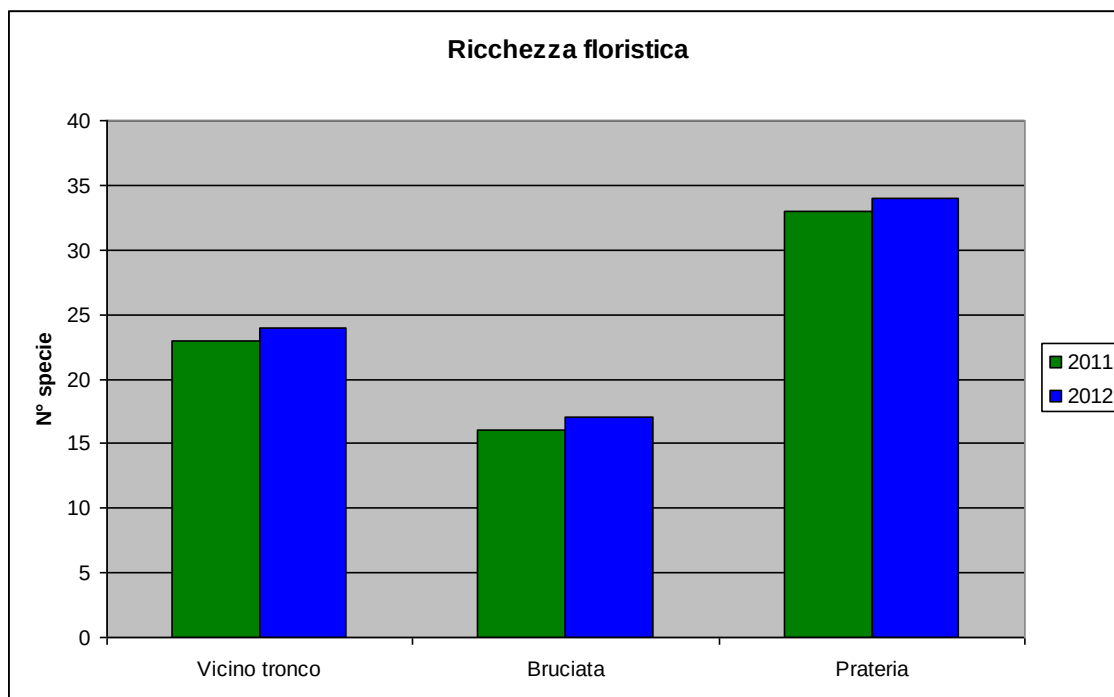


Figura 5 - Numero totale di specie rinvenute nei tre settori campionati in una tartufaia a *T. aestivum* (Gildone, CB) negli anni 2011 e 2012.

Per quanto riguarda la percentuale tra monocotiledoni e dicotiledoni (Fig. 6), si denota che le percentuali maggiori di dicotiledoni si rinvencono in prossimità della bruciata, dove si raggiungono percentuali che si attestano intorno al 75% delle specie rilevate.

Questo dato è quindi in netta contraddizione rispetto a quanto affermato da Olivier *et al.* (2002) secondo cui le prime piante a scomparire dall'area in oggetto sono le erbacee dicotiledoni. Sebbene ci si renda perfettamente conto che il campionamento proviene da una sola area campione, i risultati preliminari che provengono da altre tartufaie naturali a *T. aestivum* del Molise (Di Santo, dati inediti) sembrerebbero confermare la tendenza di incremento di specie dicotiledoni nella zona della bruciata.

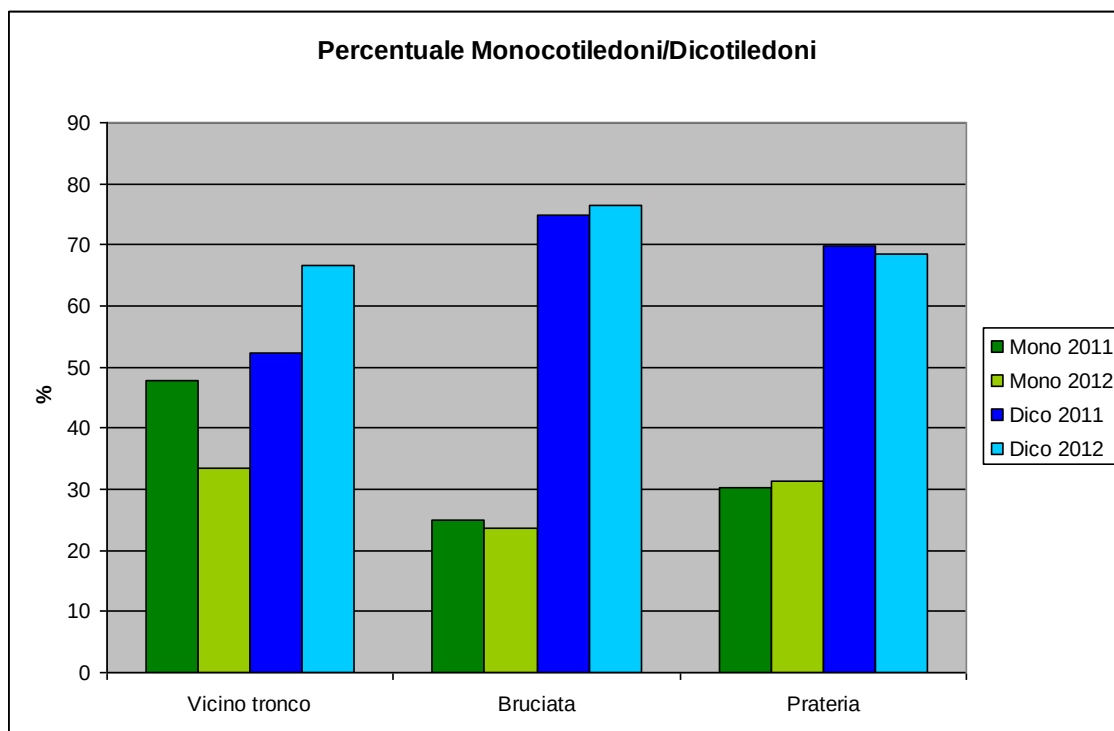


Figura 6 – Valori percentuali tra Monocotiledoni e Dicotiledoni nei tre settori campionati in una tartufaia a *T. aestivum* (Gildone, CB) negli anni 2011 e 2012.

Le famiglie botaniche complessivamente più rappresentative sono Composite, Fabacee, Graminacee e Labiate. Nella zona di ricolonizzazione, nei pressi del tronco, si sono riscontrate 9 famiglie. La più rappresentativa è quella delle Graminaceae, seguita rispettivamente dalle Fabaceae e dalle Compositae con valori decisamente più ridotti (Fig. 7).

Il grafico mette in risalto i bruschi cambiamenti nelle percentuali tra le diverse famiglie riscontrati nelle due stagioni vegetative. L'incremento delle Fabaceae nel 2012 è da ricondurre al forte dinamismo presente nella zona di ricolonizzazione prossima al tronco che, espandendosi velocemente e lontana dall'influenza allelopatica, ingloba parte delle specie della bruciata, dominata dalle Fabaceae.

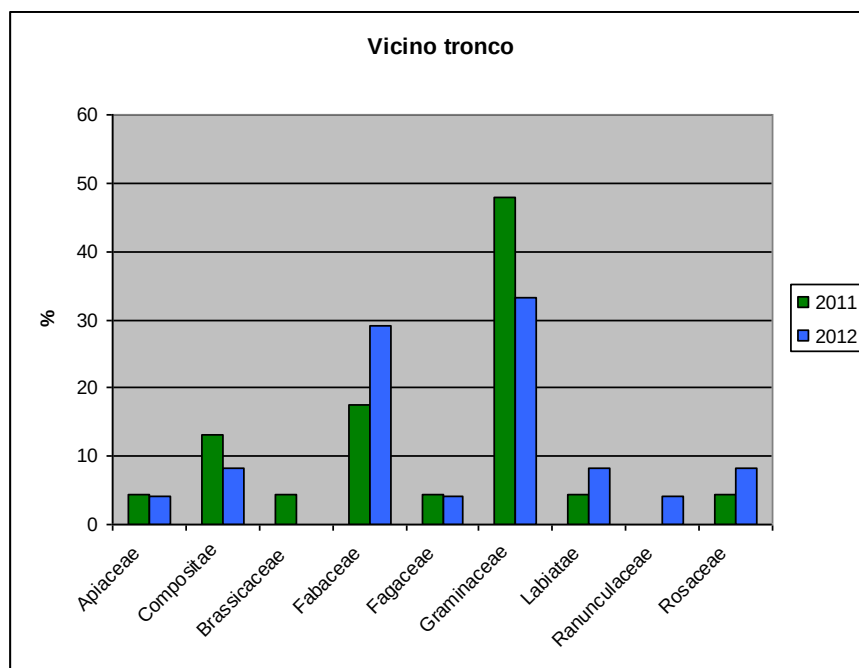


Figura 7 - Famiglie botaniche maggiormente rappresentative (%) della zona di vicino al tronco (zona di ricolonizzazione) in una tartufaia a *T. aestivum* (Gildone, CB) negli anni 2011 e 2012.

Nella zona della bruciata sono presenti 8 famiglie. La famiglia maggiormente rappresentata è quella delle Fabacee, seguita dalle Graminacee, dalle Compositae e Labiatae, queste ultime due con valori più contenuti (Fig. 8). I valori percentuali delle famiglie, nelle due stagioni di vegetazione, ad eccezione delle Compositae, si sono mostrati stabili, confermando la forte attività allelopatica delle sostanze emesse, che risultano tollerate soprattutto dalle Fabaceae.

Nella prateria si lascia il posto ad un maggiore numero di famiglie botaniche (12); le Fabaceae e le Graminaceae risultano le famiglie dominanti che, insieme, rappresentano circa la metà delle specie presenti (Fig. 9). Seguono con percentuali minori, le Compositae, le Labiatae e le Rosaceae. I valori percentuali riscontrati nei due anni di rilevamento si sono mostrati stabili.

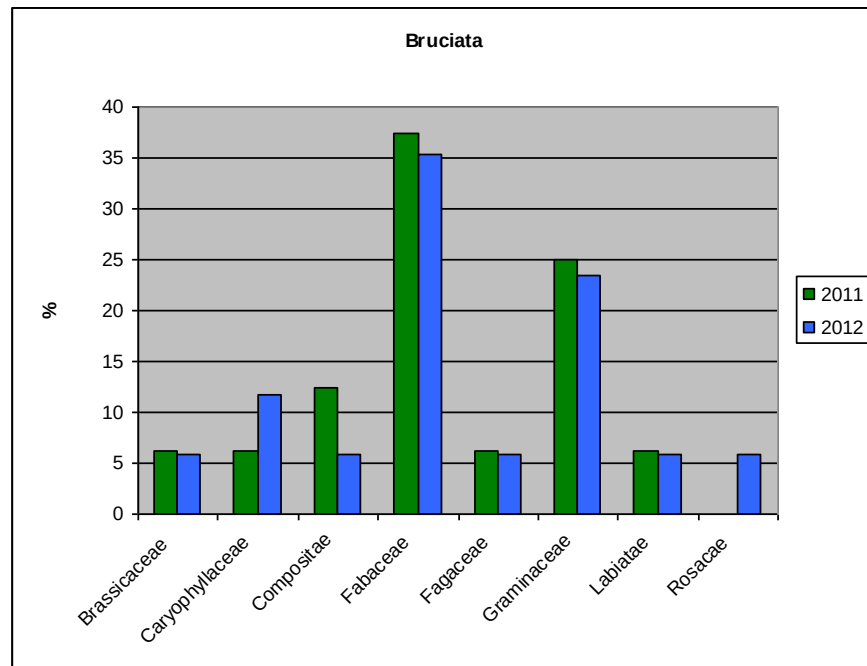


Figura 8 - Famiglie botaniche maggiormente rappresentative (%) della zona di bruciata in una tartufaia a *T. aestivum* (Gildone, CB) negli anni 2011 e 2012.

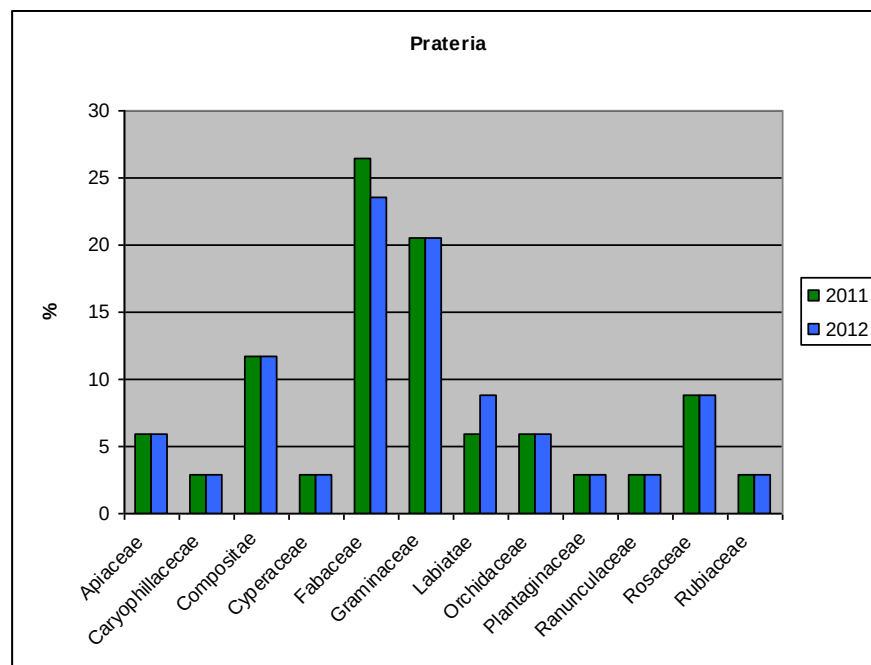


Figura 9 - Famiglie botaniche maggiormente rappresentative (%) della zona esterna alla bruciata (prateria) in una tartufaia a *T. aestivum* (Gildone, CB) negli anni 2011 e 2012.

Gli spettri biologici realizzati per la prateria (Fig. 10) ci mostrano il campione di riferimento e confronto per le altre due zone (vicino al tronco e bruciata) influenzate dall'attività del micelio e dal carpoforo di *T. aestivum*. Il primo dato evidente è la riduzione delle forme biologiche, in termini di presenza e frequenza, sia nella zona di ricolonizzazione che in quella della bruciata, quest'ultima in forma ancora più accentuata.

Nella zona prossima al tronco (Fig. 11), si osserva la predominanza delle Emicriptofite (H) (scapose e cespitose) a discapito delle Terofite (T), Camefite (Ch) e Fanerofite (P), indice di una progressiva ricolonizzazione, conseguenza di una minore pressione allelopatica. Nella zona della bruciata (Fig. 12), caratterizzata solo da tre forme biologiche (T, H, P) è emerso il netto predominio delle Terofite che mostra un ulteriore incremento nel susseguirsi delle due stagioni vegetative. Questo dato è perfettamente coerente con la pressione allelopatica che spinge verso una selezione di specie a ciclo annuale (Terofite) o biennali (Emicriptofite biennali).

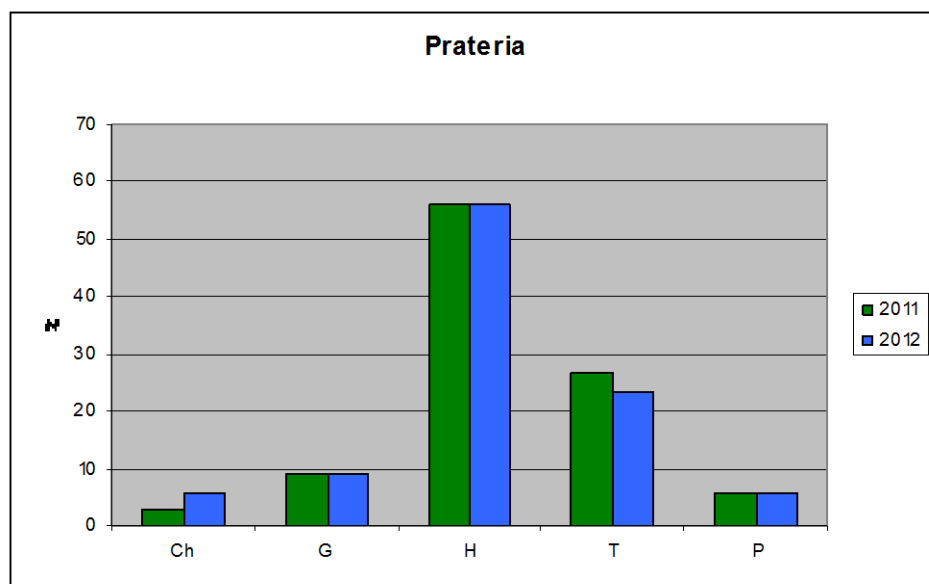


Figura 10 - Forme biologiche maggiormente rappresentative della prateria.

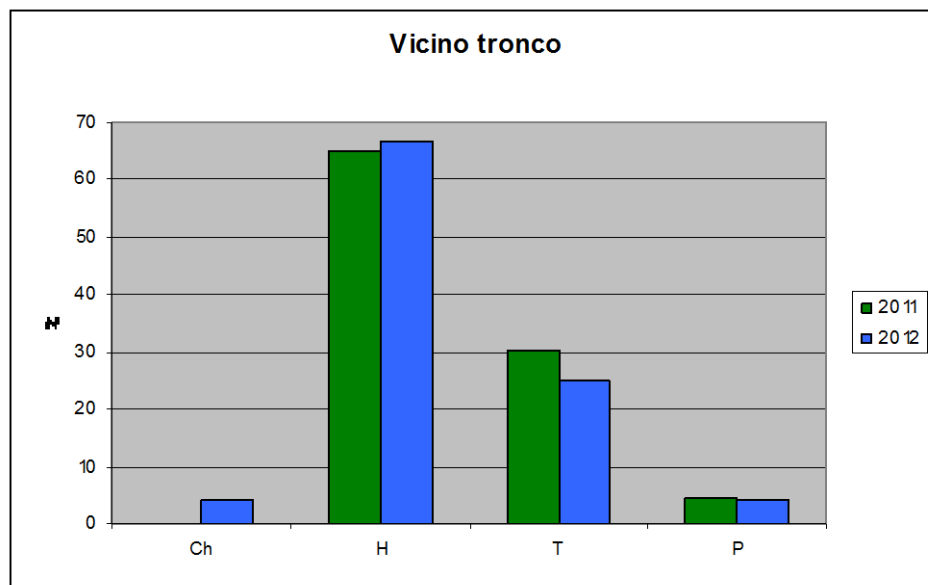


Figura 11 - Forme biologiche maggiormente rappresentative della zona di ricolonizzazione (vicino al tronco).

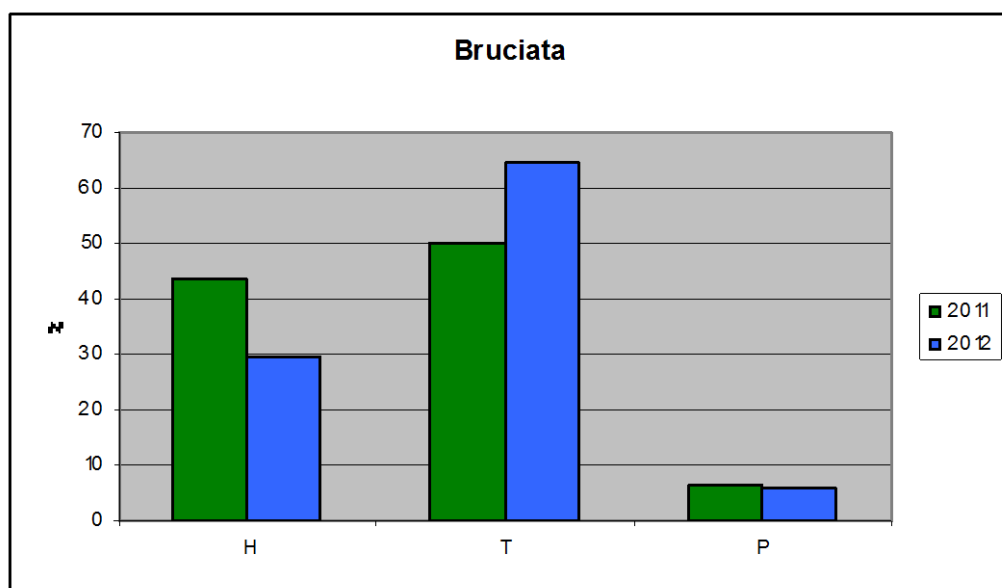


Figura 12 - Forme biologiche maggiormente rappresentative della zona di bruciata.

Le Geofite (G) sono presenti unicamente nella prateria. Sarebbero quindi le ultime forme biologiche a ricomparire e considerate come “forme biologiche indicatrici” in quanto le più sensibili alla pressione allelopatica.

L'analisi fitosociologia ha permesso di inquadrare le praterie a dominanza di *B. rupestre* nell'associazione *Centaureo bracteatae-Brometum erecti* Biondi, Ballelli, Guitian, Taffetani 1986, i cespuglieti a dominanza di *Crataegus monogyna* Jacq. e *Prunus spinosa* L., nell'associazione *Pruno-Ligustretum* R. Tx nom inv. Oberd. 1970 e i boschi a cerro e roverella nell'associazione *Daphno laureolae-Quercetum cerridis* Taffetani *et al.*, 2012. Le tre associazioni sono state ricondotte alla serie adriatica neutrobasifila del cerro e della roverella (*Daphno laureolae - Querco cerridis sigmetum*), già riconosciuta per i substrati argillosi-pelitici della Regione Temperata con termotipo collinare e ombrotipo umido e subumido dei settori centrali del Molise (Paura *et al.*, 2010).

3 La micorriza e l'entomofauna

3.1 Gli insetti infeudati al genere *Tuber*

Per i funghi ipogei, come i tartufi, il meccanismo attivo di dispersione delle spore è venuto a mancare nel corso della loro evoluzione, per essere sostituito da un meccanismo di dispersione dovuto ad animali. Alcuni animali, infatti, hanno sviluppato la capacità di alimentarsi sui tartufi, e attraverso la loro attività trofica, sono divenuti agenti attivi di dispersione delle spore stesse (Pacioni, 1989). La distruzione dei carpofori di funghi del genere *Tuber* da parte di molti animali, vertebrati ed invertebrati, diventa, quindi, un evento naturale da considerare molto importante per la sopravvivenza e la propagazione delle diverse specie. Gli animali selvatici che ricercano e si nutrono di tartufi sono fattori ecologici estremamente importanti, in quanto contribuiscono attivamente alla diffusione delle spore e quindi alla riproduzione e diffusione dei tartufi. Gli animali che scavano gallerie nel terreno contribuiscono, inoltre, a creare lo spazio e le condizioni ottimali per lo sviluppo dei corpi fruttiferi; da un punto di vista economico, tuttavia, la produzione potrebbe risultare pregiudicata.

Contro cinghiali e volpi, principali animali che apprezzano il tartufo, sono utilizzate delle recinzioni. Per i topi, le arvicole e gli uccelli, che non sono controllati dalle recinzioni, possono essere utilizzate delle trappole o esche velenose. La dieta di certi animali, come mammiferi (roditori, cervi, cinghiali), uccelli o limacce, include anche i tartufi; a volte i carpofori rappresentano invece l'unico substrato alimentare: è il caso di alcune specie di insetti, principalmente Coleotteri e Ditteri.

Il vero problema dei proprietari delle tartufaie, quindi, resta quello di riuscire a controllare i piccoli invertebrati infeudati al genere *Tuber*. Gli insetti ritenuti più dannosi per il tartufo appartengono agli ordini dei Ditteri e dei Coleotteri. Essi sono accomunati dal fatto che scelgono i tartufi come sito per la deposizione delle loro uova, e pertanto è possibile ritrovarli presso il luogo dove successivamente sono rinvenuti i carpofori.

La letteratura relativa alla presenza di insetti micofagi infeudati al tartufo non è molto recente: lavori che descrivono le specie di Ditteri e Coleotteri infeudati al tartufo risalgono agli anni '60 e '70, e riguardano tra i Ditteri, quelli appartenenti al genere *Suillia* (Famiglia Helomyzidae) (Janvier, 1963), e tra i Coleotteri, insetti appartenenti alla famiglia Leiodidae (Arzone, 1970; 1971). Diversi studi sono stati condotti tra gli anni '80 e '90 in Italia per la comprensione delle relazioni tra gli insetti ed il tartufo, in particolare per dimostrare in che modo essi risultassero attratti dal carpoforo. Partendo dall'ipotesi che gli odori prodotti dallo stesso carpoforo fossero un importante adattamento ecologico, e che avessero tra le funzioni principali quella di attirare potenziali "dispersori" di spore (Pacioni & Lalli, 1981), sono stati condotti indagini circa la composizione chimica dell'aroma del tartufo, con la finalità di identificare quale dei composti emessi dal tartufo fosse responsabile dell'attrazione degli insetti (Pacioni *et al.*, 1991).

Tra i Ditteri, come già detto, si annoverano insetti appartenenti alla famiglia Helomyzidae (generi *Suillia* ed *Helomyza*), mentre tra i Coleotteri, il principale micofago di cui è stata accertata la dannosità su *Tuber* sp. è *L. cinnamomea*.

3.1.1 *Leiodes cinnamomea* (Panzer)

Comunemente noto come *Truffle beetle*, “Scarafaggio” del tartufo, *L. cinnamomea* è un Coleottero appartenente alla famiglia Leiodidae.

Ordine	Coleoptera	Linnaeus
Sub-ordine	Polyphaga	Emery
Superfamiglia	Staphylinoidea	Latreille
Famiglia	Leiodidae	Fleming
Sottofamiglia	Leiodinae	
Tribù	Leiodini	
Genere	<i>Leiodes</i>	Latreille, 1796
Specie	<i>Leiodes cinnamomea</i> (Panzer)	

Il leiode (Fig. 13) è in grado di arrecare danni severi ai corpi fruttiferi maturi di diverse specie di *Tuber*, tra cui uno dei tartufi più importanti a livello economico, il tartufo nero pregiato (*T. melanosporum*).

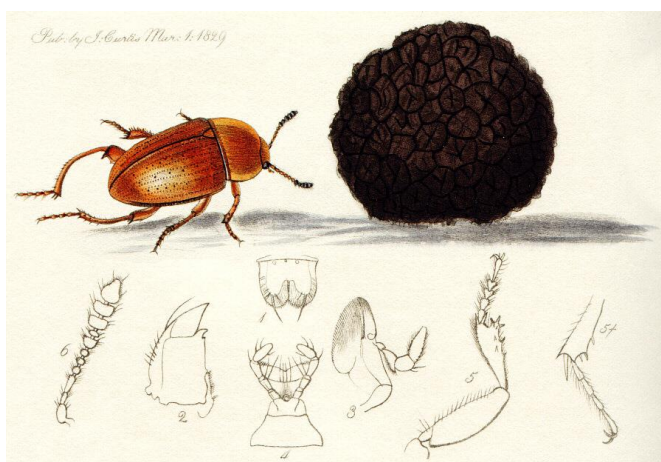


Figura 13 - *L. cinnamomea*, Truffle Beetle (John Curtis, www.nhm.ac.uk)

Micofago univoltino, con una distribuzione a livello europeo, si alimenta preferenzialmente su corpi fruttiferi di diverse specie di tartufo e completa il ciclo vitale nelle vicinanze dei carpofori (Arzone, 1970; Newton, 1984). Le pupe si possono ritrovare nel periodo autunnale (da ottobre a novembre), mentre gli adulti si rinvencono da novembre a marzo (Arzone, 1970). I danni sui tartufi sono provocati sia dagli adulti che dalle larve. Gli adulti del micofago si nutrono dei carpofori, e le femmine, dopo l'accoppiamento, depongono le uova in prossimità dei corpi fruttiferi. Le larve, munite di forti mandibole, si sviluppano tra i mesi di gennaio e aprile, e risultano maggiormente dannose, devastando completamente i carpofori con la loro attività trofica (Fig. 14) (Arzone, 1970).

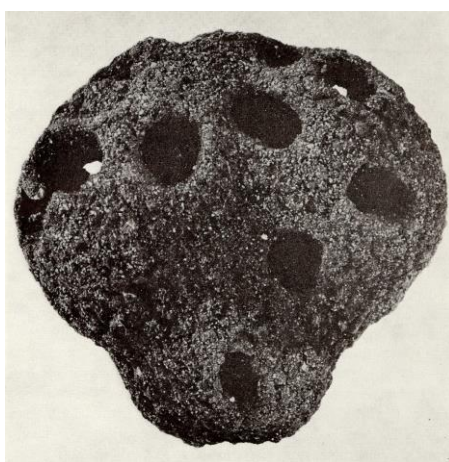


Figura 14 - Corpo fruttifero di *T. melanosporum* con gallerie scavate da adulti di *L. cinnamomea* (Foto da Arzone, 1970).

La letteratura relativa a questo micofago è estremamente povera: gli studi più dettagliati, che contengono informazioni relative alla sua ecologia e alla sua morfologia risalgono agli anni '70 (Arzone, 1970; 1971). Anche la collocazione sistematica del genere e della specie ha subito numerose

vicende, essendo stato oggetto di qualche confusione nella corretta denominazione, recentemente risolta (Halliday & Majka, 2010).

Secondo le osservazioni riportate da Arzone (1970), l'uovo di *L. cinnamomea* ha forma rotondeggiante e colore bianco, e appare rivestito da una mucillagine translucida e trasparente (Fig. 15). Al completamento dello sviluppo embrionale, esso misura 1,3-1,4 mm. Le femmine depongono le uova nei primi strati di terreno, ad una profondità variabile, ma sempre in prossimità di un carpoforo. La schiusura delle uova avviene dopo 12-15 giorni. La larveta neonata (Fig. 15) è già agilissima nel muoversi in ambiente ipogeo e si dirige immediatamente verso il tartufo più vicino, la cui gleba rappresenta il suo esclusivo substrato nutritivo. La scelta del sito di ovideposizione da parte delle femmine risulta fondamentale: le uova sono deposte in modo da permettere alle larvette di raggiungere velocemente una fonte di cibo.

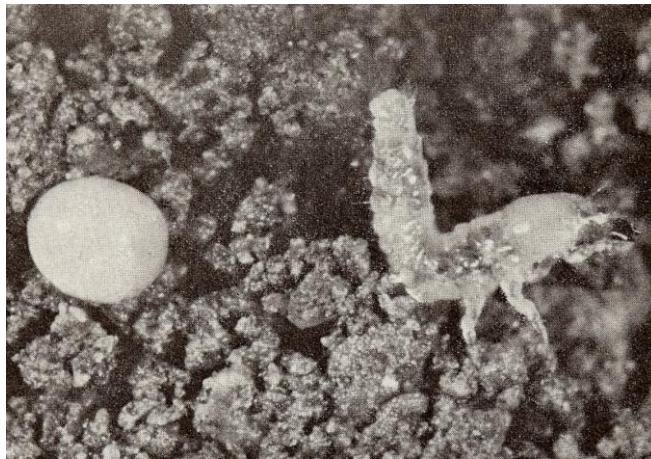


Figura 15 - *L. cinnamomea*: uovo appena deposto e larveta neonata. (Foto da Arzone, 1970).

Una volta raggiunto il carpoforo, la larva si insedia in esso per nutrirsi, ma lo utilizza anche come rifugio. Ciascuna larva può usufruire, per i propri spostamenti all'interno del carpoforo, delle gallerie scavate dagli adulti, anch'essi impegnati nell'attività trofica sullo stesso substrato. La larva

di *L. cinnamomea* è di tipo campodeiforme e anoftalma (Fig. 16A). Durante la prima età si presenta di colore biancastro, con capo grande e zampe robuste. Le mandibole sono fortemente sclerificate e sfumate di rossiccio, ed hanno la particolarità di essere asimmetriche (Arzone, 1970). Le larve sono lucifughe, come gli stessi adulti, ed assumono un comportamento terrifico se stuzzicate o esposte alla luce, inarcando l'addome quasi fino a richiudersi su se stesse. A maturità, dopo aver attraversato 3 età larvali (circa 25 giorni), la larva raggiunge le dimensioni di 8-9 mm. In questa condizione, essa abbandona il tartufo in cui si è alimentata ed ha vissuto e si spinge in profondità (almeno 15 cm) per trascorrere la stagione estiva e l'inizio dell'autunno. In ottobre, avviene la ninfosi, che dura circa 20 giorni, nel corso della quale la pupa, di tipo exarato (Fig. 16B), vira da un colore bianco alabastro ad un rosso mattone.

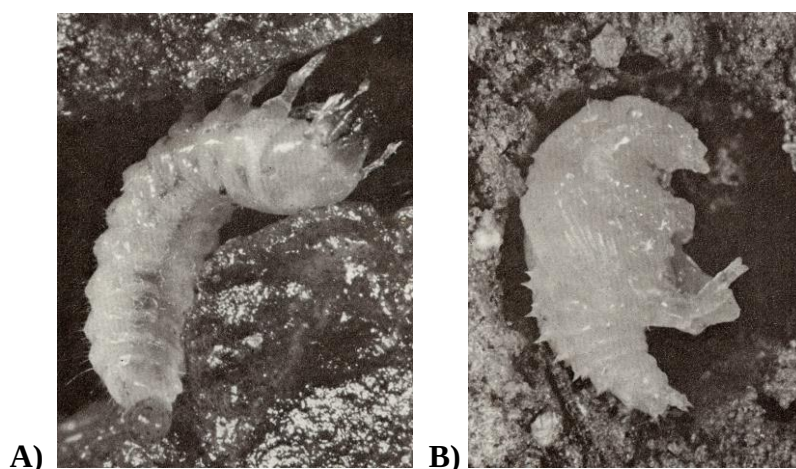


Figura 16 - A) Larva di *L. cinnamomea* in una galleria scavata dagli adulti in *T. melanosporum*; B) Pupa di *L. cinnamomea* appena formata (Foto da Arzone, 1970).

Gli adulti che fuoriescono presentano grossi femori e tibie robuste, come atteso da un agile insetto ipogeo. Le femmine (Fig. 17 dx) hanno un corpo più piccolo dei maschi: le prime raggiungono dimensioni di 3,5-5 mm, i secondi variano da 5 a 7 mm di lunghezza (Fig. 17 sx) (Arzone, 1970).

Caratteri diagnostici per la distinzione dei sessi sono, inoltre, il pronoto, leggermente più piatto nelle femmine, e le tibie posteriori, meno ingrossate e non arcuate nelle femmine, ma più robuste, nonché spesso fortemente arcuate nei maschi. Tali caratteri spesso non sono molto evidenti, e questo rende non agevole la distinzione dei sessi a colpo d'occhio (Arzone, 1970; Hochberg *et al.*, 2003).

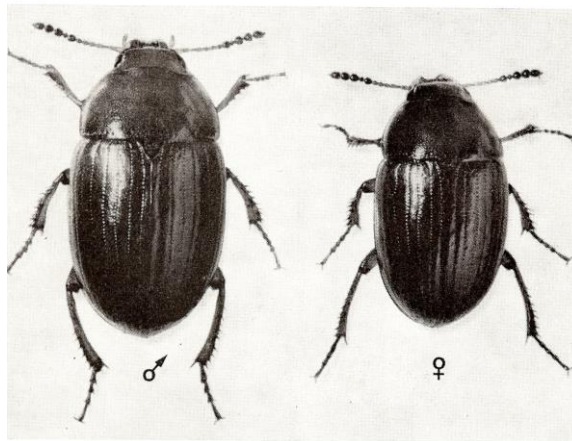


Figura 17 - Adulti di *L. cinnamomea*; sx: maschio; dx: femmina (Foto da Arzone, 1970).

Le informazioni relative al comportamento degli adulti sono limitate, in particolare fuori dal terreno, o quelle concernenti le sue modalità di dispersione. Non si conoscono completamente, inoltre, le relazioni ecologiche che portano all'infestazione dei tartufi da parte dell'insetto. In Arzone (1970), si riconosce l'importanza ecologica di questo micofago nella disseminazione delle spore di *T. melanosporum*, ma non è stato possibile verificare la corretta germinazione delle spore di tartufo rilasciate attraverso gli escrementi dell'insetto.

3.2 Studio dell'attività biologica di VOCs di *Tuber* spp. su *L. cinnamomea*

3.2.1 Stato della ricerca

Non è noto quali possano essere i composti volatili responsabili dell'attrattività del tartufo per *L. cinnamomea*. Come accennato, uno degli studi finalizzati alla comprensione dei meccanismi chimici alla base dell'attrattività del tartufo per gli insetti micofagi risale ai primi anni '90. Pacioni *et al.*, (1991) nelle catture di diversi insetti, attratti con trappole innescate con componenti dell'aroma del tartufo, hanno identificato numerosi esemplari di *L. cinnamomea*, la specie più rappresentata tra i coleotteri rinvenuti nelle trappole. Studi specifici su questo insetto, tuttavia, sono stati condotti solo dopo molti anni. Uno dei pochi studi condotti in laboratorio su questo coleottero ha mostrato che il suo comportamento nei confronti del fungo non dipende esclusivamente dall'odore proveniente da esso (Hochberg *et al.*, 2003). I maschi, infatti, non sembrano attratti dall'odore del tartufo maturo, ma piuttosto da carpofori già infestati con presenza di femmine conspecifiche. Ciò suggerisce che essi possano utilizzare un feromone emesso dalle femmine per localizzare il tartufo a breve distanza. Al contrario, le femmine non mostrano attrazione per il tartufo, sia sano che infestato, suggerendo che esse possano impiegare altri segnali, probabilmente legati a odori agenti da caïromoni ed emessi dal tartufo prima della piena maturazione. Si ipotizza che la composizione chimica dei volatili del tartufo cambi durante la vita del corpo fruttifero, e che esso sia attrattivo per gli insetti solo prima della sua decomposizione (Hochberg *et al.*, 2003).

Data la scarsità di altri studi riguardanti le interazioni tra insetto e tartufo, nel presente lavoro di ricerca si è cercato di chiarire il ruolo biologico

dei composti emessi dai carpofori su femmine accoppiate di *L. cinnamomea*. I VOCs sono stati estratti da carpofori di diverse specie di *Tuber*, tra cui l'ospite privilegiato del micofago, *T. melanosporum*. Tali estratti sono stati utilizzati come stimoli in un biosaggio comportamentale, e sottoposti a caratterizzazione chimica.

3.2.2 Materiali e metodi

3.2.2.1 Estrazione dei VOCs da carpofori del genere *Tuber*

L'estrazione dei VOCs dai carpofori è stata condotta utilizzando corpi fruttiferi maturi di tartufi (Tab. 1) forniti da cavatori locali o raccolti direttamente in tartufaie naturali e/o controllate delle regioni Molise, Abruzzo e Marche.

Tabella 1: Specie di *Tuber* spp. su cui sono state eseguite estrazioni di VOCs.

<i>Tuber aestivum</i>	<i>Tuber mesentericum</i>
<i>Tuber uncinatum</i>	<i>Tuber borchii</i>
<i>Tuber brumale</i>	<i>Tuber melanosporum</i>
<i>Tuber magnatum</i>	

Per ciascuna estrazione, 30 grammi di tartufo sono stati immessi in una campana di vetro e sottoposti a flusso d'aria umidificato tramite gorgogliamento in acqua distillata e purificato previo passaggio attraverso una cartuccia di carbone attivo (Fig. 18). I carpofori sono stati esposti per 72 ore ad un flusso costante di aria (125 ± 5 SCCM, Standard Centimeter Cubic Minute), monitorato con un flussimetro (Alltech, Digital Flow Check). L'estrazione è avvenuta in condizioni di oscurità.

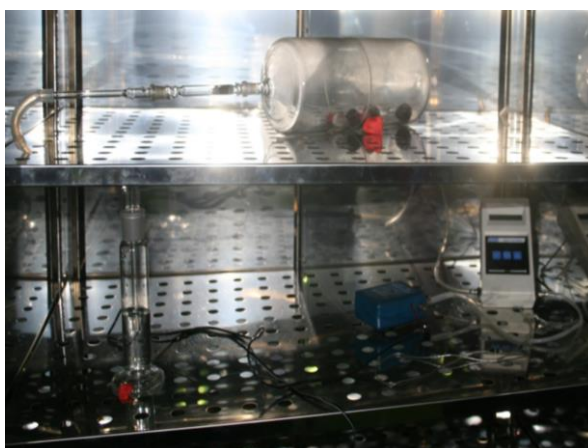


Figura 18 - Estrazione di VOCs da *Tuber* spp.

Gli odori sono stati adsorbiti su cartuccia di carbone attivo; il lavaggio della cartuccia con 5 ml di esano (Sigma-Aldrich, Germany) ha fornito l'estratto per la caratterizzazione chimica e per i saggi elettroantennografici e comportamentali.

3.2.2.2 Insetti

Adulti (maschi e femmine) di *L. cinnamomea* sono stati raccolti presso tartufaie controllate di *T. melanosporum* (tartufo nero pregiato) site nelle province di Ancona e Pescara. In laboratorio, gli adulti sono stati mantenuti a contatto con i tartufi, nel terreno in cui erano stati rinvenuti, periodicamente umidificato mediante nebulizzazione di acqua. Tale procedura permetteva il completamento del ciclo di sviluppo da parte di larve e/o pupe eventualmente presenti nei carpofori infestati (Fig. 19).



Figura 19 - Adulti di *L. cinnamomea* mantenuti su substrato naturale.

Ventiquattro ore prima dell'esecuzione dei biosaggi comportamentali, le femmine sono state isolate dal substrato e poste in contenitori di polistirene (200 ml) coperti con una garza.

3.2.2.3 Biosaggio comportamentale

La risposta comportamentale di *L. cinnamomea* ad estratti di *Tuber* spp. è stata valutata utilizzando un biosaggio a caduta a due scelte (Germinara *et al.*, 2008), simile a quello descritto da Phillips *et al.* (1993) e Pike *et al.* (1994) (Fig. 20). L'arena in cui è stato condotto il biosaggio era rappresentata da un contenitore d'acciaio ($\varnothing$ 32 cm $\times$ altezza 7 cm), in cui erano praticati due fori ($\varnothing$ = 3 cm) diametralmente opposti, praticati a 3 cm dai bordi laterali.



Figura 20 - Biosaggio comportamentale su *L. cinnamomea*.

Gli stimoli da saggiare o il controllo (20 μ l) sono stati adsorbiti su un pezzo di carta da filtro (Albet[®] 400) di forma quadrata (2 cm x 2 cm), sospeso al centro di ciascun foro per mezzo di un fil di ferro, fissato alla base dell'arena (Fig. 21B). Beute di vetro (500 ml) sono state collocate sotto ciascun foro (Fig. 21A), e la superficie interna del collo delle stesse è stata ricoperta da un sottile strato di olio minerale, al fine di prevenire l'eventuale risalita degli insetti dalla beuta all'arena, dopo la caduta. Il pavimento dell'arena è stato ricoperto con carta da filtro bianca (Whatman No. 1) per

fornire agli insetti una superficie uniforme e facilitarne i movimenti (Pike *et al.* 1994; Germinara *et al.*, 2008).



Figura 21 - Biosaggio comportamentale su *L. cinnamomea*. A) arena per il biosaggio; B) particolare dello stimolo, sospeso al centro di ciascuna beuta.

Dieci femmine di *L. cinnamomea*, private di cibo da almeno 24 ore, sono state collocate al centro dell'arena, sotto una piastra Petri capovolta ($\varnothing = 6$ cm; h = 1,2 cm), e lasciate acclimatare per 30 minuti. Successivamente, sono state rilasciate nell'arena e il loro comportamento è stato monitorato per 50 minuti. Durante il biosaggio, l'arena è stata chiusa con un coperchio d'acciaio, per impedire la fuga degli insetti.

Nel corso del biosaggio le femmine avevano la possibilità di scegliere tra stimolo saggio ed rispettivo controllo (esano). Per ciascun biosaggio sono state realizzate 4 repliche, utilizzando gli insetti una sola volta. Gli estratti utilizzati e le rispettive dosi saggate sono indicate in Tab. 2. Per tutti gli estratti sono state saggate almeno 3 dosi (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; estratto tal quale). L'estratto di *T. melanosporum*, ospite d'elezione dell'insetto, è stato saggiato a tutte le dosi. Per gli estratti che, dopo le prime prove, hanno

elicitato risposte significative, sono state successivamente saggiate le restanti dosi. I dati sono stati analizzati statisticamente mediante test *t* di Student.

Tabella 2 - Stimoli saggiati durante i biosaggi comportamentali.

Specie	Dosi saggiate					
<i>Tuber aestivum</i>	0,01 µg/µl		1 µg/µl			Tal quale
<i>Tuber uncinatum</i>	0,01 µg/µl		1 µg/µl			Tal quale
<i>Tuber brumale</i>	0,01 µg/µl		1 µg/µl			Tal quale
<i>Tuber magnatum</i>	0,01 µg/µl		1 µg/µl			Tal quale
<i>Tuber mesentericum</i>	0,01 µg/µl	0,1 µg/µl	1 µg/µl	10 µg/µl	100 µg/µl	Tal quale
<i>Tuber borchii</i>	0,01 µg/µl	0,1 µg/µl	1 µg/µl	10 µg/µl	100 µg/µl	Tal quale
<i>Tuber melanosporum</i>	0,01 µg/µl	0,1 µg/µl	1 µg/µl	10 µg/µl	100 µg/µl	Tal quale

3.2.2.4 Caratterizzazione chimica dei composti volatili estratti

Gli estratti sono stati analizzati tramite gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS) presso il Laboratorio della Fondazione E. Mach (FEM) di San Michele all'Adige (TN), utilizzando un gascromatografo Hewlett-Packard 5890, con una colonna polare Innowax (30 m×0,32 mm; J & W Scientific, Folsom, CA, USA), programmato per una temperatura crescente da 60°C a 220°C ed interfacciato con un detector Hewlett-Packard 5970B MS con ionizzazione ad impatto d'elettroni (70 eV) (Faccoli *et al.*, 2008).

L'identità dei composti volatili è stata determinata per comparazione con composti sintetici forniti da Sigma-Aldrich e Fluka Chemie; in assenza dello standard ci si è avvalsi dell'ausilio del database Wiley mass spectral. I composti volatili sono stati quantificati percentualmente comparando l'area dei loro picchi.

3.2.3 Risultati

3.2.3.1 Biosaggio comportamentale

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti dalle prove comportamentali su *L. cinnamomea*.

Alle tre dosi saggate (0,01 µg/µl, 1 µg/µl e tal quale), gli estratti di *T. aestivum* (Fig. 22), *T. uncinatum* (Fig. 23) e *T. magnatum* (Fig. 24) non hanno fatto registrare preferenze olfattive statisticamente significative da parte degli insetti saggiati.

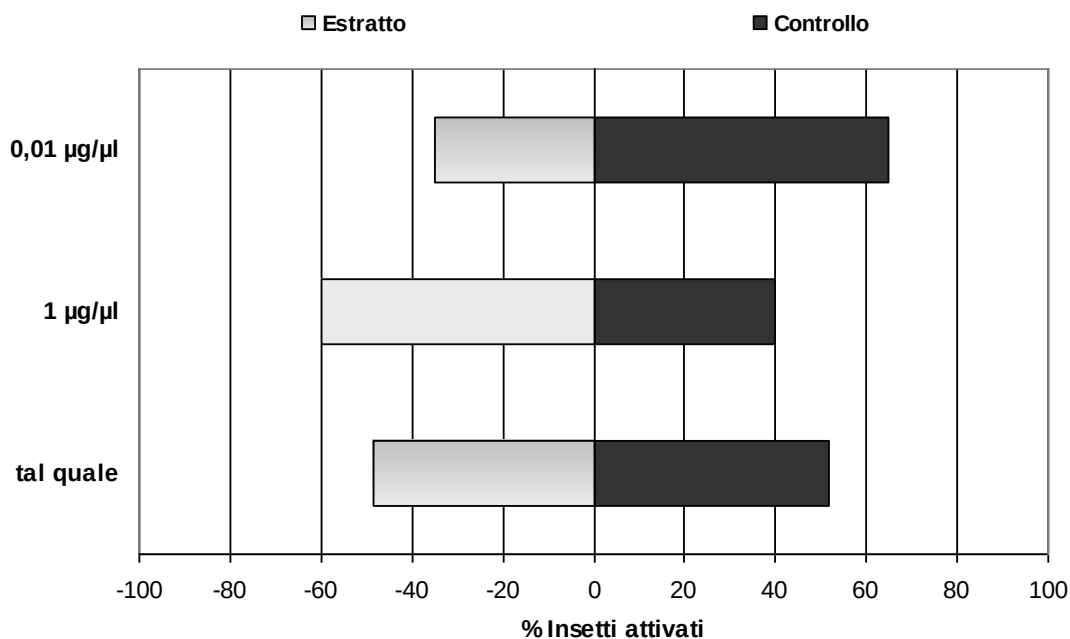


Figura 22 - Risposta olfattiva di femmine di *L. cinnamomea* a dosi crescenti di estratto da *T. aestivum* in biosaggio a caduta. Controllo: esano. (* = differenza significativa; $P < 0,05$; test *t* di Student).

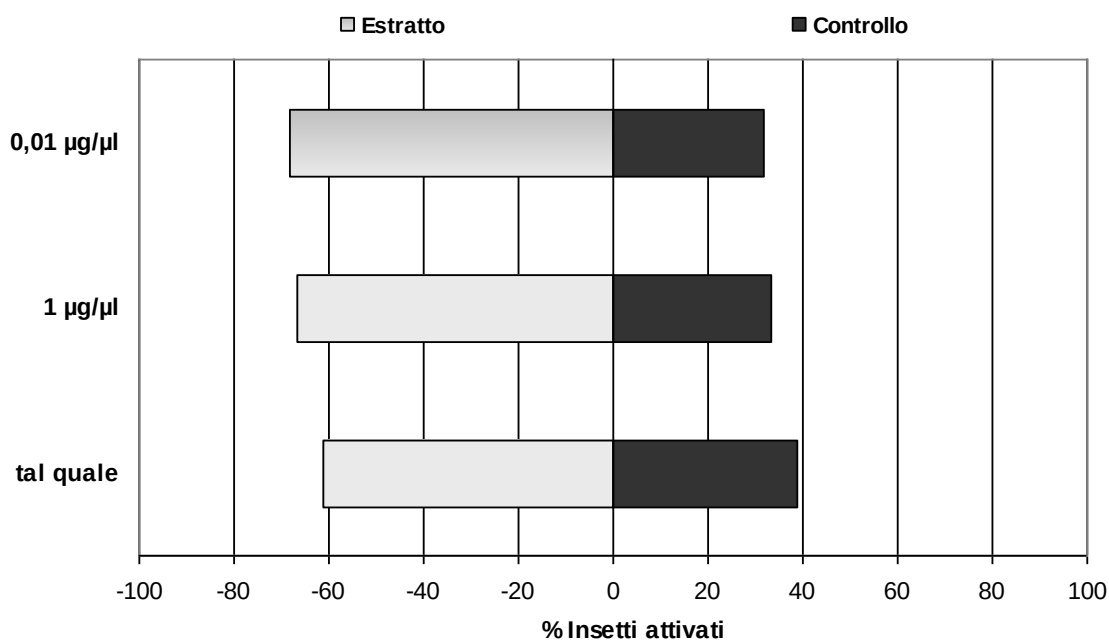


Figura 23 - Risposta olfattiva di femmine di *L. cinnamomea* a dosi crescenti di estratto da *T. uncinatum* in biosaggio a caduta. Controllo: esano. (* = differenza significativa; $P < 0,05$; test *t* di Student).

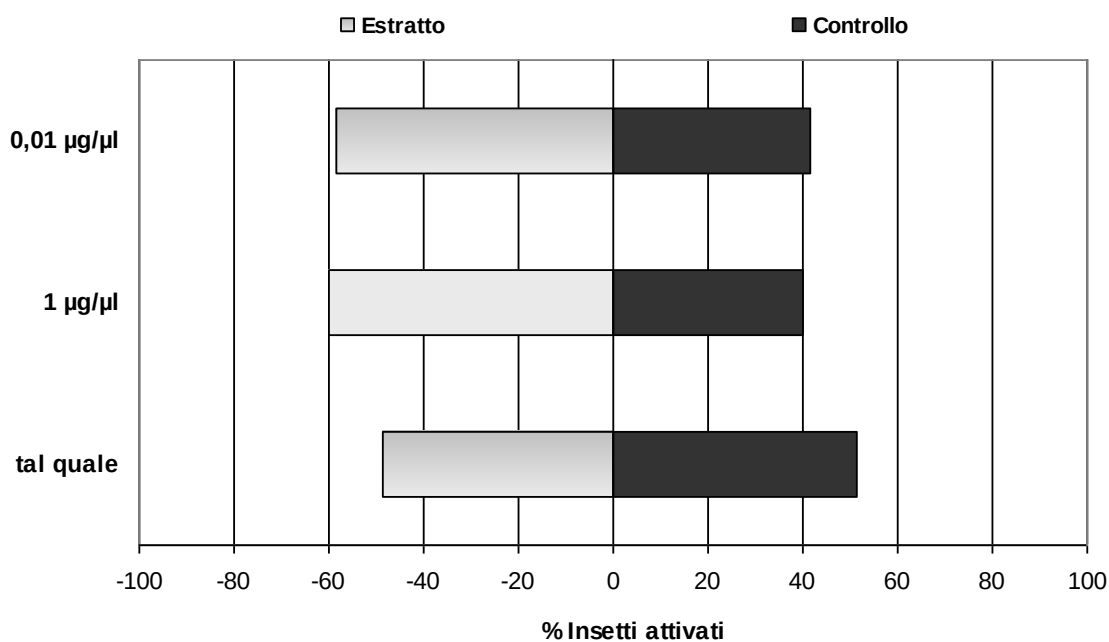


Figura 24 - Risposta olfattiva di femmine di *L. cinnamomea* a dosi crescenti di estratto da *T. magnatum* in biosaggio a caduta. Controllo: esano. (* = differenza significativa; $P < 0,05$; test *t* di Student).

L'estratto di *T. brumale*, invece, evidenzia una preferenza statisticamente significativa da parte delle femmine di *L. cinnamomea*, quando saggiato alla dose di 1 µg/µl (Fig. 25).

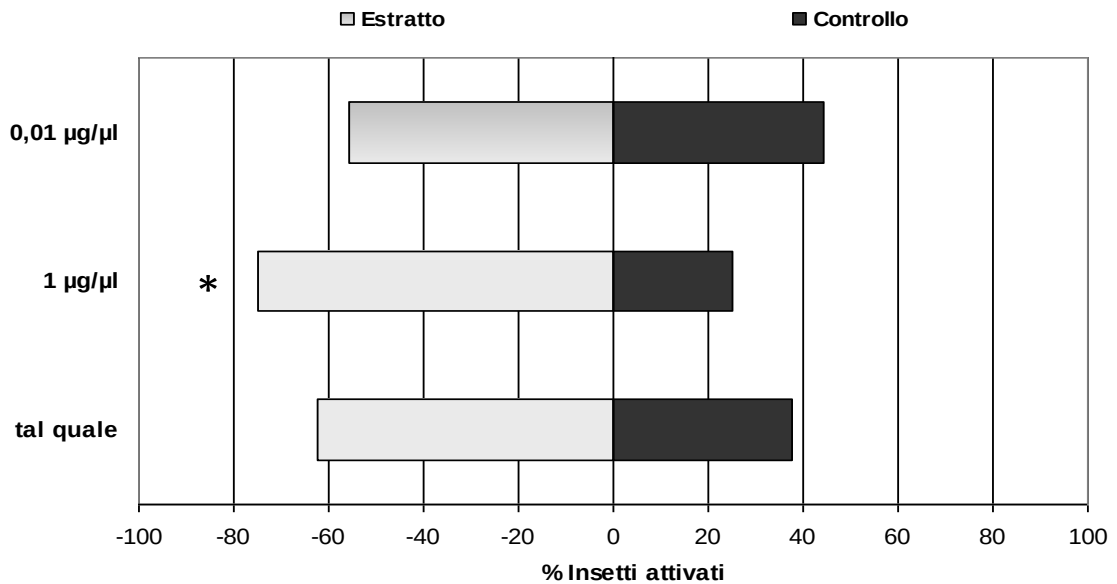


Figura 25 - Risposta olfattiva di femmine di *L. cinnamomea* a dosi crescenti di estratto da *T. brumale* in biosaggio a caduta. Controllo: esano. (* = differenza significativa; $P < 0,05$; test *t* di Student).

L'estratto di *T. melanosporum*, induce preferenze statisticamente significative, da parte delle femmine di *L. cinnamomea*, solo quando saggiato tal quale (Fig. 26).

L'estratto del carpoforo di *T. mesentericum*, invece, evidenzia preferenze statisticamente significative rispetto al controllo quando saggiato alle concentrazioni più basse. La dose tal quale non ha elicitato risposte significative rispetto al controllo (Fig. 27).

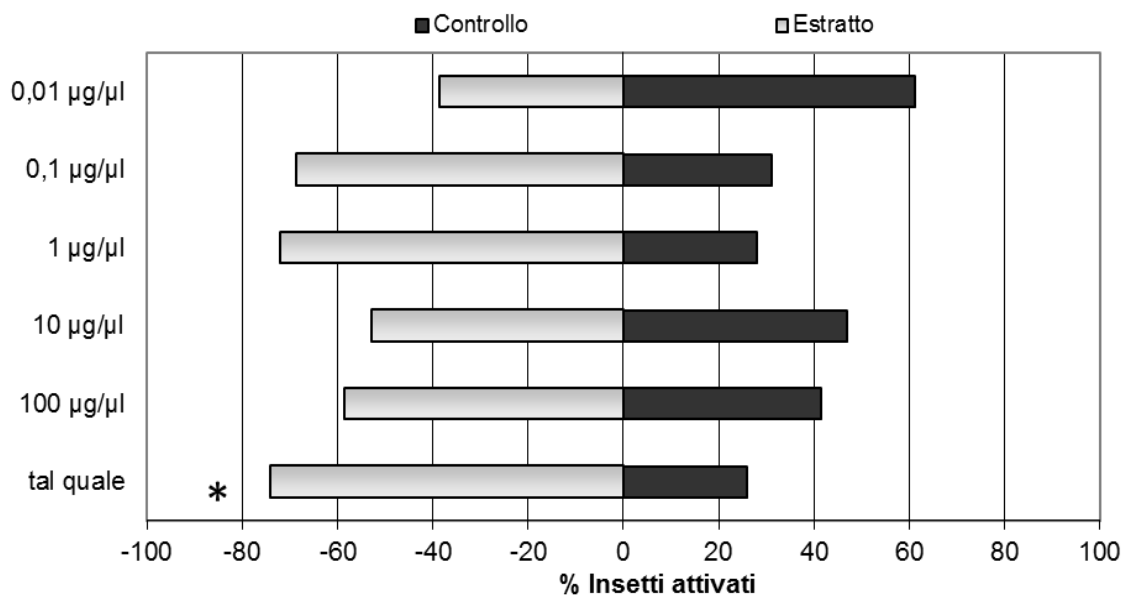


Figura 26 - Risposta olfattiva di femmine di *L. cinnamomea* a dosi crescenti di estratto da *T. melanosporum* in biosaggio a caduta. Controllo: esano. (* = differenza significativa; $P < 0,05$; test *t* di Student).

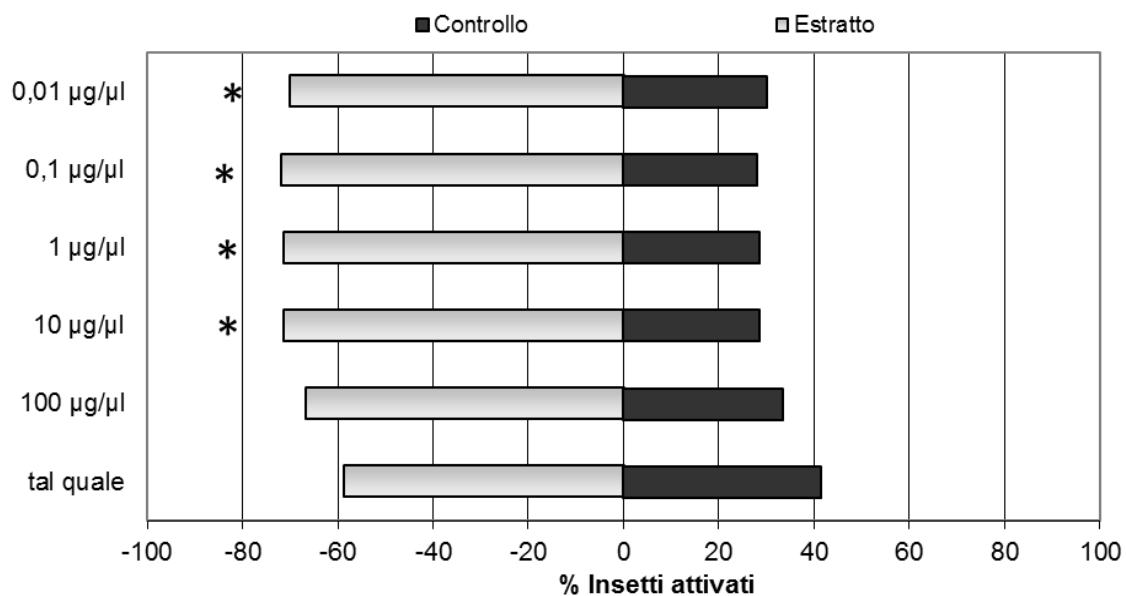


Figura 27 - Risposta olfattiva di femmine di *L. cinnamomea* a dosi crescenti di estratto da *T. mesentericum* in biosaggio a caduta. Controllo: esano. (* = differenza significativa; $P < 0,05$; test *t* di Student).

Estratti di *T. borchii* a diverse concentrazioni, hanno stimolato la risposta positiva delle femmine, che li hanno significativamente preferiti al controllo (Fig. 28).

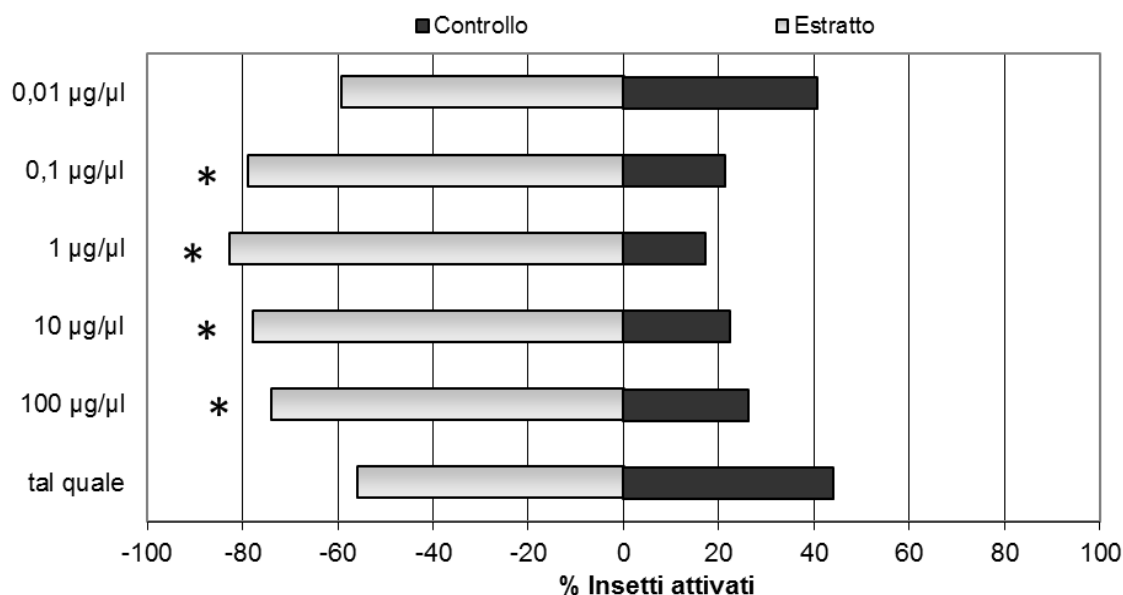


Figura 28 - Risposta olfattiva di femmine di *L. cinnamomea* a dosi crescenti di estratto da *T. borchii* in biosaggio a caduta. Controllo: esano. (* = differenza significativa; $P < 0,05$; test *t* di Student).

I biosaggi eseguiti hanno mostrato come gli estratti di *Tuber* giochino un ruolo certamente importante sull'orientamento dell'insetto; i composti volatili in essi contenuti, sembrano fungere da intermediari, in particolare per le femmine accoppiate, nella ricerca del sito ottimale di ovideposizione. La scelta del carpoforo adatto, infatti, è cruciale sia per la sopravvivenza della progenie allo stato larvale, che per la localizzazione di un microhabitat che garantisca protezione adeguata e substrato nutritivo abbondante all'adulto. I risultati comportamentali ottenuti sono stati integrati dalla caratterizzazione chimica di alcuni degli estratti maggiormente attivi, condotta per individuare la presenza di composti chiave nel profilo odoroso.

3.2.3.2 Caratterizzazione chimica dei composti volatili estratti

L'analisi gascromatografica è stata condotta sugli estratti che hanno elicitato nelle femmine accoppiate una preferenza statisticamente significativa nei biosaggi comportamentali. Tali estratti corrispondono a quelli di *T. mesentericum*, *T. melanosporum* e *T. borchii*. Essi mostrano profili differenti nella composizione chimica, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo (Fig. 29). È stata evidenziata la presenza di 18 sostanze, ordinate in tabella 3 secondo un tempo di ritenzione crescente e corrispondenti ai numeri indicati sui tracciati (Fig. 29).

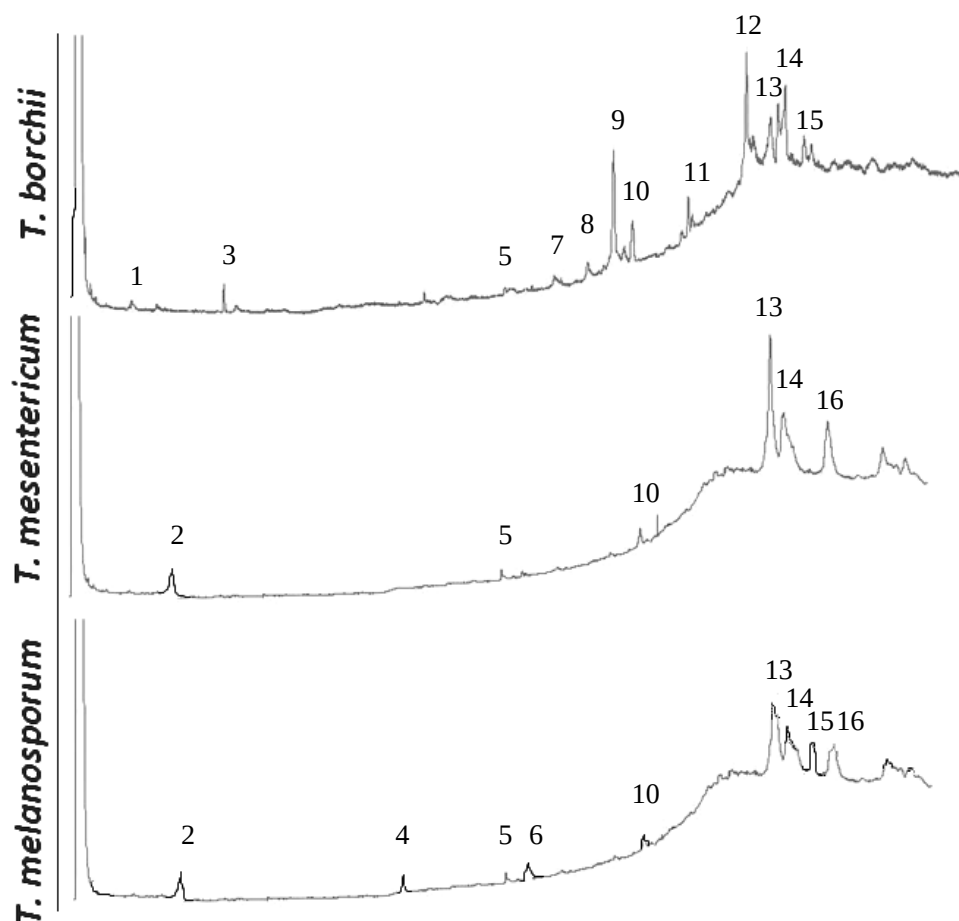


Figura 29 - Profilo gascromatografico di estratti di *T. borchii* (in alto), *T. mesentericum* (al centro) e *T. melanosporum* (in basso).

Tabella 3 - Risultati dell'analisi gascromatografica di estratti di *T. borchii*, *T. mesentericum* e *T. melanosporum*. I numeri corrispondono ai picchi identificati in Fig. 29:

Composti	
1. eptano	2. isoamil acetato
3. β -pinene / α -limonene	4. metil esanoato
5. etil esanoato	6. exil acetato
7. (z)-3-esenil acetato	8. nonanale
9. (z)-3-esen-1-olo	10. 1-octen-3-olo
11. acido acetico	12. octanolo
13. linaiolo	14. (e)-cariofillene
15. farnesene	16. metil salicilato
17. acido esanoico	18. β -ionone

3.3 Risposte EAG di *L. cinnamomea* a composti identificati in *Tuber* spp.

3.3.1 Lo stato della ricerca

I VOCs emessi dai corpi fruttiferi dei tartufi sono stati ampiamente studiati, principalmente con intenti commerciali, per le specie più pregiate e ricercate dal mercato, come *T. melanosporum*, *T. magnatum*, *T. borchii*, *T. uncinatum*, e *T. aestivum*. La maggior parte di questi studi è stata finora mirata alla descrizione dell'aroma, e solo recentemente l'attenzione si è spostata sul potenziale ruolo ecologico di alcuni VOCs (Zeppa *et al.*, 2004; Splivallo, 2007; Splivallo *et al.*, 2007a, 2007b, 2011).

La composizione dei VOCs emessi dai carpofori può variare molto (Mauriello *et al.*, 2004) e tale variazione può dipendere da vari fattori, come lo stadio di maturazione del corpo fruttifero (Zeppa *et al.*, 2004) e la sua origine (Diaz *et al.*, 2003).

Splivallo (2007) riporta una tabella (Fig. 30) che riassume i VOCs più frequentemente riportati in letteratura come identificati in carpofori del genere *Tuber*, selezionati tra gli oltre 200 riportati. Si tratta di composti molto semplici appartenenti alle categorie di idrocarburi, alcoli, aldeidi, chetoni, esteri, composti aromatici e solforati.

Da questa tabella sono stati selezionati alcuni VOCs, rappresentativi per ciascuna categoria di composto chimico, da utilizzare come stimoli per prove di elettrofisiologia (Elettroantennografia, EAG) su *L. cinnamomea*.

Non si hanno, infatti, evidenze relative alle modalità di percezione di singoli componenti dell'aroma del tartufo da parte dell'insetto.

Molecule	Aroma Description	MEL	BORC	IND	AEST	MAGN
<u>Fatty Acid Derived VOCs</u>						
1-octen-3-ol	Fungal	(a)	(b),(c)	(z)	(a)	-
3-octanone	Fungal, sweet	(a)	(e)	(z)	(a),(e)	-
2-methyl-1-butanol	Pungent	(e)	(b)(c)(e)	(d)	(a)(e)	(b)
3-methyl-1-butanol	Whiskey	(a)(b)(e)	(b)(c)(e)	(d)	(a)(e)	-
2-methyl-1-butanal	Green, malty	(a)(e)(b)	(c)(e)	(d)	(a)(e)	(b)(e)
3-methyl-1-butanal	Sweet, malty	(a)(e)	(c)(e)	(d)	(a)(e)	(b)(e)
Hexanal	Cut grass	(a),(e)	(c)	(d)	(a)	(b)
<u>Terpenoids</u>						
trans-ocimene	Warm, herbaceous	-	(f)	-	-	-
D-limonene	Pine, citrus	-	(f)	-	-	-
Aromadendrene	ND	-	(f)	-	-	-
<u>Aromatics</u>						
Phenylethanol	Rose	(a)	(z)	(z)	(a)	-
1-methoxy-3-methylbenzene	ND	(a)	(f)	-	(e)	-
Benzaldehyde	Almond	(a)	-	(d)	(a)(e)	-
Anisole (methoxybenzene)	Anise	(e)	-	-	-	-
Naphthalene	Naphtalene	(a)	(f)	-	(a)	-
<u>Sulfur Compounds</u>						
Dimethyl sulfide	Garlic	(a)	-	-	(a)	(e)
Dimethyl disulfide	Rubber	(a)	-	-	(a)	(e)(b)
Dimethyl trisulfide	Fecal	(a)	-	-	(a)	(e)
2-methyl-4,5-dihydrothiophene	ND	-	(f)	-	-	-
2,3-dihydro-5-methylthiophene	ND	-	(f)	-	-	-

Non exhaustive list of VOCs reported in literature for the following truffle species: *T. melanosporum* (MEL), *T. borchii* (BORC), *T. indicum* (IND), *T. aestivum* (AEST), *T. magnatum* (MAGN). Letters in parenthesis refer to the following publications: (a) Diaz et al, 2003; (b) Bellesia et al, 1996; (c) Bellesia et al, 2001; (d) Bellesia et al, 2002; (e) Mauriello et al, 2004; (f) Zeppa et al., 2004 (z) R.Splivallo et al. (unpublished data). A bar (-) means that the VOCs have not been detected so far to the best of our knowledge. Not determined (ND).

Figura 30 – Composti volatili selezionati tra gli oltre 200 indentificati in carpofori del genere *Tuber*. Tabella tratta da Splivallo, 2007, PhD Thesis, Torino).

Come indicato in Fig. 30, la lista non è esaustiva, e si riferisce ai VOCs maggiormente frequenti negli elenchi presenti in letteratura.

3.3.2 Materiali e metodi

3.3.2.1 Insetti

Gli insetti saggiati nelle prove di elettroantennografia sono stati prelevati dalla popolazione presente in laboratorio (cfr. par. 3.2.2.2). Sono stati utilizzati individui maschi e femmine, isolati dal substrato 24 ore prima dello svolgimento delle registrazioni.

3.3.2.2 Elettroantennografia

L'elettroantennografia (EAG) (Schneider, 1957) è una tecnica utilizzata per lo studio delle risposte olfattive degli insetti a seguito di stimolazione con diversi composti volatili (Rotundo & Tremblay, 1993). L'uso di questa tecnica è rivolto principalmente alla registrazione di risposte a feromoni sessuali (Roelofs, 1984) ed a componenti volatili delle piante (Visser, 1986).

Dopo somministrazione di uno stimolo specifico sulle antenne degli insetti da saggiare, è possibile registrare una risposta elettrica, data dalla somma dei potenziali di depolarizzazione delle singole cellule nervose (Boeckh *et al.*, 1965). Tale fenomeno quantifica la sensibilità del sistema olfattivo: la depolarizzazione registrata rispetto a quella di stimoli di controllo (es. solventi) risulta direttamente proporzionale alla sensibilità dell'antenna nei confronti della sostanza in esame.

La tecnica utilizzata è simile a quella descritta in precedenti lavori (Van der Pers, 1981; Rotundo & Tremblay, 1993; Den Otter *et al.*, 1996; De Cristofaro *et al.*, 2000; Vitagliano *et al.*, 2005). In tutte le prove EAG, il capo dell'insetto è stato amputato ed alla sua base è stata inserita una micropipetta di vetro ($\varnothing=1$ mm), riempita con soluzione salina fisiologica di Kaissling, aggiunta di 5g/l di polivinilpirrolidone K90 (Fluka Chemie). La micropipetta

aveva la funzione di elettrodo di riferimento; l'elettrodo di registrazione era costituito da una micropipetta simile, portata a contatto dell'apice antennale. Due fili d'argento sono stati inseriti all'interno delle micropipette, e connessi a loro volta ad un'apparecchiatura portatile per registrazione EAG (Portable Recording Unit INR-01[®], Syntech, Hilversum, The Netherlands); in tal modo il circuito elettrico viene chiuso. I risultati sono stati registrati usando un apposito programma (EAG 2.0, Sintech, Hilversum, The Netherlands).

L'antenna era continuamente investita da un flusso d'aria a temperatura ambiente (23°C), purificata attraverso passaggio in filtro di carbone attivo ed umidificata attraversando una bottiglia di gorgogliamento. La velocità del flusso era tenuta sotto controllo mediante un apposito apparecchio regolatore (Syntech CS-01). Sull'antenna fluiva una quantità d'aria pari a 50 cm³/s attraverso un tubo (Ø 8 mm) di acciaio inox, la cui uscita era posizionata a circa 10 mm dalla preparazione. Metà dell'aria arrivava al tubo attraverso una pipetta Pasteur, il cui apice era sistemato in un foro (Ø 4 mm) praticato a 9 cm dall'uscita del tubo. Gli stimoli sono stati aggiunti al flusso d'aria attraverso lo stesso foro iniettando, durante 0.1 s, 2.5 cc del vapore di una cartuccia odorosa. Gli intervalli tra gli stimoli sono stati di un minuto.

Durante l'iniezione, il flusso d'aria attraverso la pipetta vuota era temporaneamente interrotto, e metà dell'aria iniettata attraverso la cartuccia odorosa, in modo da mantenere il flusso totale costante.

La cartuccia odorosa era costituita da una pipetta Pasteur, in cui era stata inserita della carta da filtro (1,5 cm²) imbibita di aliquote di 25 µl delle soluzioni dei diversi composti da saggiare. Le pipette, chiuse con parafilm e conservate a -25°C tra un esperimento e l'altro, sono state utilizzate per 3 esperimenti.

3.3.2.3 Curve dose-risposta EAG con composti sintetici

Sono state registrate, mediante tecnica elettroantennografica (EAG), le risposte di maschi e femmine di *L. cinnamomea* a 13 composti volatili, identificati da vari autori nello spazio di testa di diverse specie di *Tuber*, e ad un aroma sintetico di tartufo, disponibile in commercio e correntemente utilizzato dall'industria alimentare (Tab. 4).

Dei composti saggiati sono state calcolate le curve dose-risposta (5 dosi, da 0,01 a 100 µg/µl). L'aroma commerciale di tartufo è stato saggiato alle dosi descritte e tal quale. I composti (tutti forniti da Sigma-Aldrich, Germany) sono stati disciolti in olio minerale leggero (Sigma-Aldrich).

Tabella 4 - Composti volatili, identificati in *Tuber* sp., utilizzati in prove EAG su *L. cinnamomea*.

Composto
1. 3-metil-2-butanone
2. 2,3-butanedione
3. 2-metil-1-butanolo
4. 3-metil-1-butanolo
5. 2-metil-propan-1-olo
6. 1-octen-3-olo
7. feniletanolo
8. esanale
9. 2-octenale
10. acetaldeide
11. benzaldeide
12. naftaline
13. metildisulfide
14. aroma commerciale

Sono state realizzate 10 repliche per ciascun composto saggiato, sia per i maschi che per le femmine. All'inizio ed alla fine di ciascuna registrazione le antenne sono state stimulate con olio minerale ed esano, come stimoli di controllo. Le risposte EAG assolute (mV) sono state calcolate come descritto in Den Otter *et al.* (1988).

Le risposte EAG in mV ai 13 composti saggiati alla dose più alta sono state confrontate mediante ANOVA seguita da Tuckey test ($P=0,05$).

3.3.3 Risultati

Tutti i composti saggiati sulle antenne di femmine di *L. cinnamomea* hanno elicitato risposte EAG, ma solo per alcuni di essi la percezione olfattiva risulta significativamente più elevata: 3-metil-2-butanone, 2,3-butanedione, 2-metil-propan-1-olo, esanale e metildisulfide (Fig. 31).

Come si può osservare dalle curve dose-risposta EAG, per tutti i composti saggiati l'intensità della risposta registrata è risultata dipendente dalla concentrazione dello stimolo utilizzato. La dipendenza della risposta dalla dose si osserva a partire dalla somministrazione di una dose compresa tra 0,1 µg/µl e 1 µg/µl (Fig. 32).

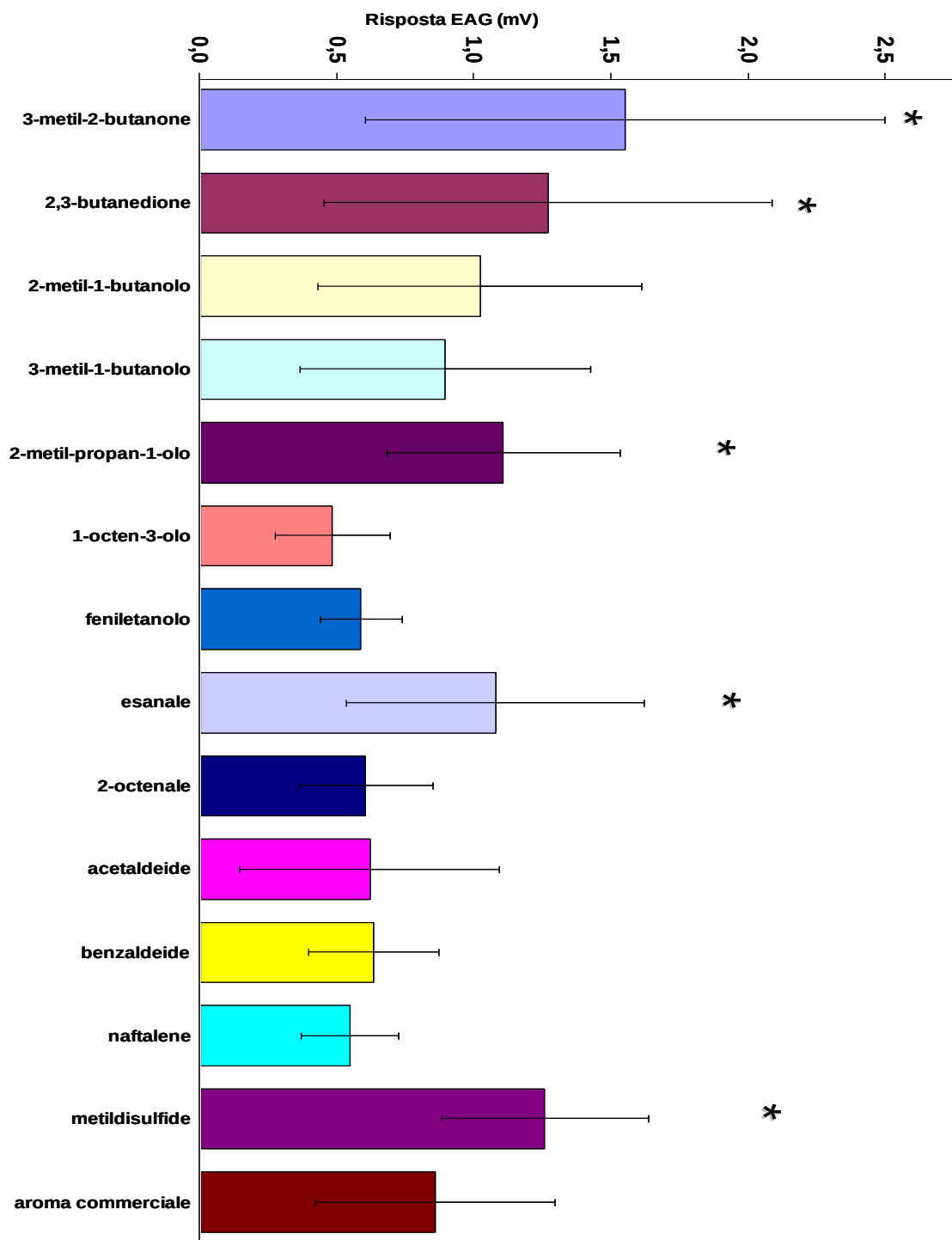


Figura 31 - Risposte EAG ($mV \pm DS$) di femmine accoppiate di *L. cinnamomea* a composti volatili identificati in *Tuber* spp. ed all'aroma sintetico di tartufo. Differenze significative: * (ANOVA, Tuckey test, $P = 0,05$).

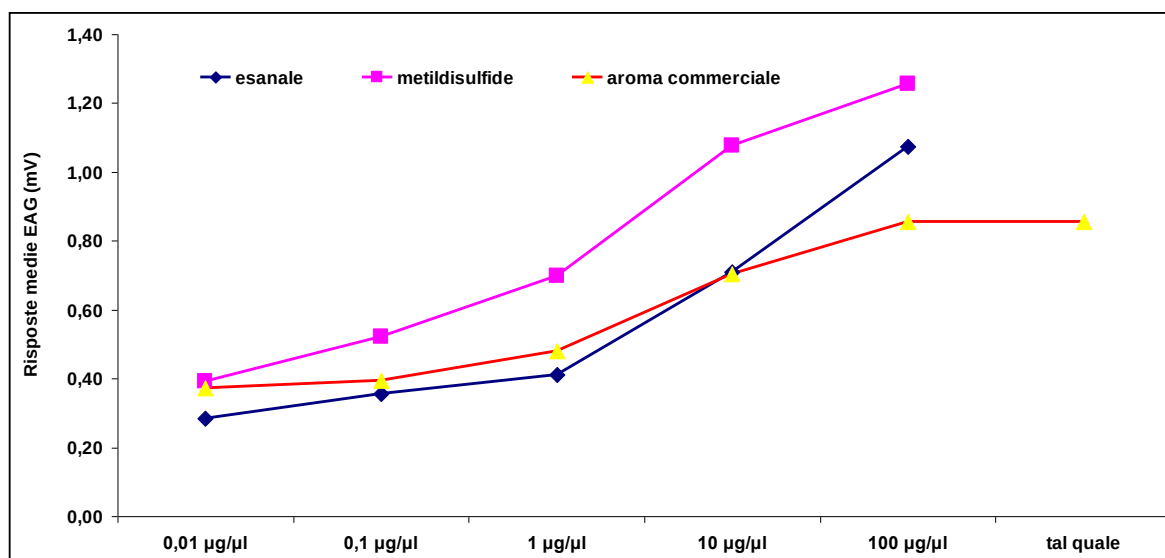
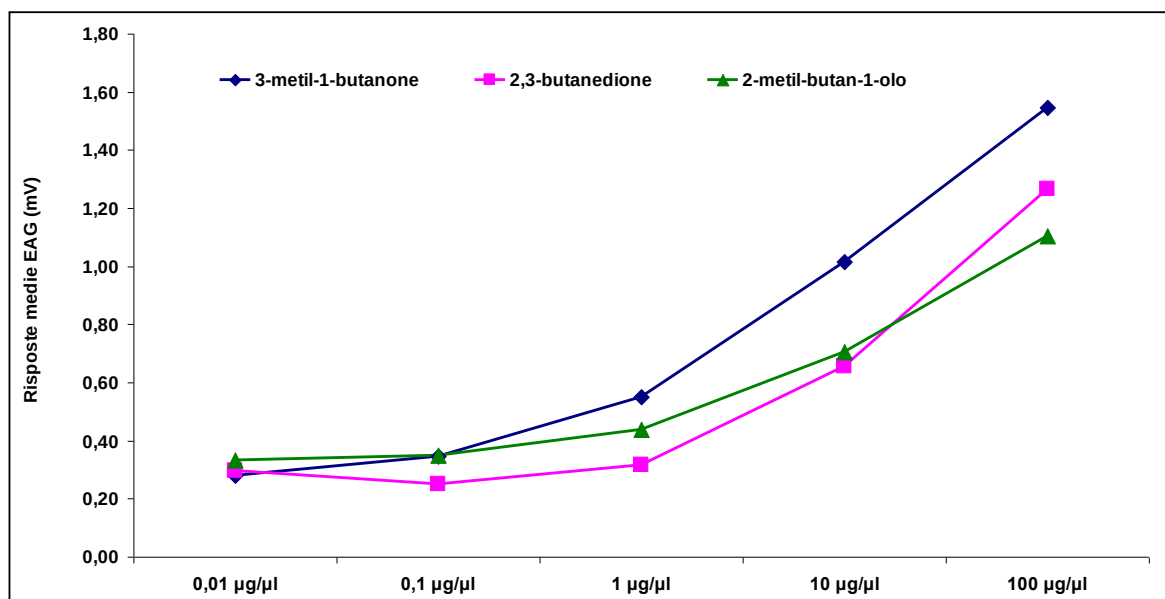


Figura 32 – Curve dose-risposta EAG (mV) di femmine di *L. cinnamomea* a dosi crescenti di composti volatili di *Tuber* spp. e dell'aroma sintetico di tartufo.

4 Interazione micorriza-pianta

4.1 Le piante ospiti delle micorrize

4.1.1 *Quercus pubescens* Willd.

Q. pubescens, comunemente nota con il nome di “roverella”, è una specie forestale ampiamente diffusa nell’Europa centro-meridionale. In Italia e in Molise tale specie rappresenta un elemento caratteristico del paesaggio forestale collinare. Dal punto di vista economico, la roverella costituisce una risorsa per l’industria del legno ed è strettamente legata alla presenza di tartufo (*T. aestivum*, *T. brumale*, *T. melanosporum*), con il quale instaura rapporti simbiotici.

4.2 Studio dei VOCs di *Q. pubescens*

Lo studio dei composti volatili (VOCs) emessi da *Q. pubescens*, pianta ospite di *T. aestivum*, è stato condotto al fine di valutare eventuali variazioni (quali-quantitative) nell’emissione di composti volatili da parte di piante micorrizzate rispetto a quelle non micorrizzate.

4.2.1 Materiali e metodi

4.2.1.1 Materiale vegetale

Per l'estrazione dei VOCs sono state utilizzate foglie prelevate da piante di *Q. pubescens*, dell'età di 2 anni, fornite dal Vivaio Forestale Valmetauro (S. Angelo in Vado, PU). Le piantine erano micorrizate con *T. aestivum* e certificate dal vivaio produttore. Come controllo, presso lo stesso fornitore, sono state acquistate piantine di roverella non micorrizate, provenienti dalla stessa pianta madre. Le piantine sono state mantenute in condizioni di laboratorio (fotoperiodo naturale), in vasi in plastica (9x9x12 cm) contenenti un substrato terroso (Fig. 33).



Figura 33 - Piantine di *Q. pubescens* provenienti da Vivaio Valmetauro (S. Angelo in Vado, PU).

4.2.1.2 Estrazione dei composti volatili

Foglie di *Q. pubescens* sono state asportate dalle piantine e il picciolo è stato sigillato con un film di paraffina. Per ciascuna estrazione, 10 g di foglie sono state chiuse in una campana di vetro e sottoposte a flusso d'aria umidificato tramite gorgogliamento in acqua distillata e purificato previo passaggio attraverso una cartuccia di carbone attivo (Fig. 34). Le foglie sono state esposte per 24 ore ad un flusso costante di aria (125 ± 5 SCCM, Standard Centimeter Cubic Minute), monitorato con un flussimetro (Alltech, Digital Flow Check).

Gli odori sono stati catturati su una cartuccia di carbone attivo; il lavaggio della cartuccia con 5 ml di esano (Sigma-Aldrich, Germany) ha fornito l'estratto per la caratterizzazione chimica e per i successivi test comportamentali.



Figura 34 - Particolare dell'estrazione di VOCs da foglie di *Q. pubescens*.

4.2.1.3 Insetti

I riferimenti metodologici relativi a questo aspetto sono riportati nel paragrafo 3.2.2.2.

4.2.1.4 Biosaggio comportamentale

La risposta comportamentale di *L. cinnamomea* ad estratti tal quali di *Q. pubescens* micorrizzata e non micorrizzata è stata misurata utilizzando il biosaggio a caduta a due scelte (cfr. par. 3.2.2.3). Per ciascun biosaggio, sono state realizzate 4 repliche, utilizzando gli insetti una sola volta.

4.2.1.5 Caratterizzazione chimica dei composti volatili estratti

Gli estratti sono stati analizzati tramite GC-MS presso il Laboratorio della Fondazione E. Mach (FEM) di San Michele all'Adige (TN) (cfr. par. 3.2.2.4).

4.2.2 Risultati

4.2.2.1 Risposte comportamentali ad estratti di *Q. pubescens*

In Fig. 35 sono riportati i risultati delle prove comportamentali. Come si può osservare dai grafici riportati, gli insetti saggiati hanno operato una scelta significativa nei confronti dell'estratto da pianta micorrizzata rispetto a quello da pianta non micorizzata (Fig. 35A). Il risultato è supportato anche dai biosaggi successivi, in cui l'estratto da roverella micorrizzata è nettamente preferito dalle femmine di *L. cinnamomea* rispetto al controllo (Fig. 35B); allo stesso tempo, l'estratto da pianta non micorrizzata non risulta diverso dal controllo, quando le femmine devono scegliere tra i due (Fig. 35C).

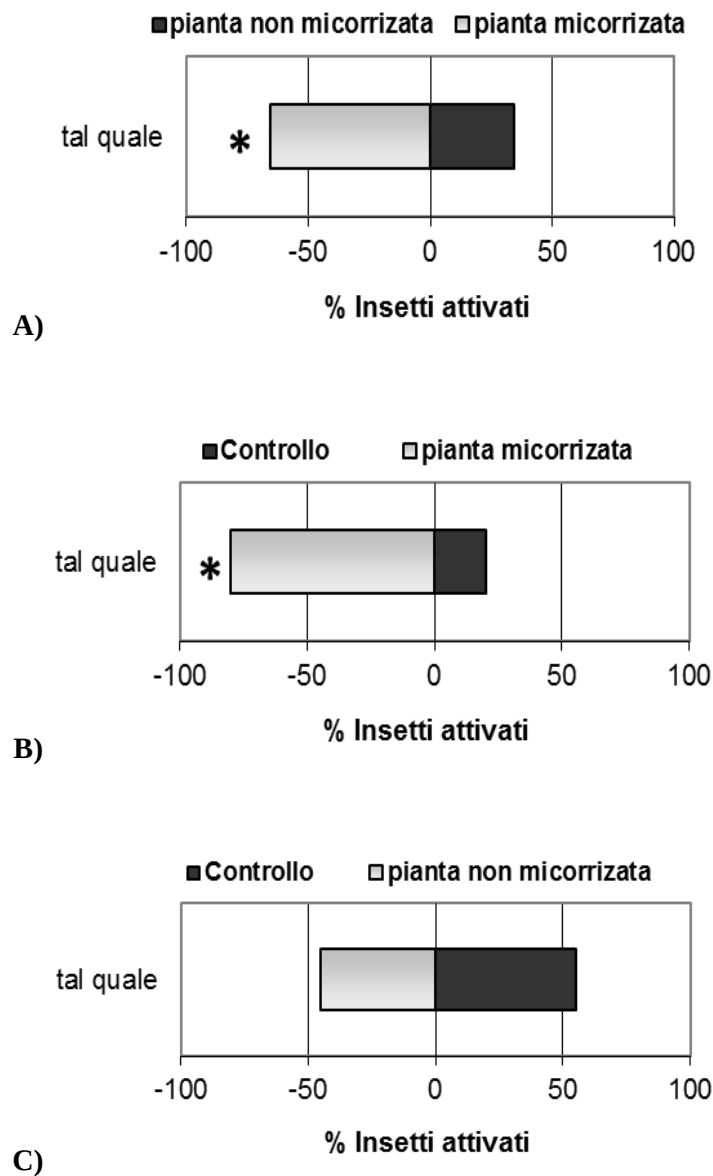


Figura 35 - Risposta olfattiva di femmine di *L. cinnamomea* a estratti di *Q. pubescens* micorrizzata e non micorrizzata in biosaggio a caduta. Controllo: esano. A) confronto estratto da pianta micorrizzata vs non micorrizzata; B) confronto estratto pianta micorrizzata vs controllo; C) confronto estratto pianta non micorrizzata vs controllo (* = differenza significativa; $P < 0,05$; test *t* di Student).

4.2.2.2 Caratterizzazione chimica dei composti volatili estratti

L'analisi gascromatografica degli estratti da foglie di roverella micorrizate e non micorrizate mostra due profili differenti nella composizione chimica, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo (Fig. 36).

È stata evidenziata la presenza di 18 sostanze, riportate in tabella 5 secondo l'ordine crescente del tempo di ritenzione e corrispondenti ai numeri indicati sui tracciati in Fig. 36.

Come si può notare dall'analisi del profilo della pianta micorrizata (tracciato 2), sono presenti composti in quantità minore (metil esanoato, etil esanoato, exil acetato, 1-octen-3-olo, *e*-cariofillene, metil salicilato), mentre è assente un picco che è presente nel tracciato della pianta non micorrizata (tracciato 1), corrispondente al β -pinene.

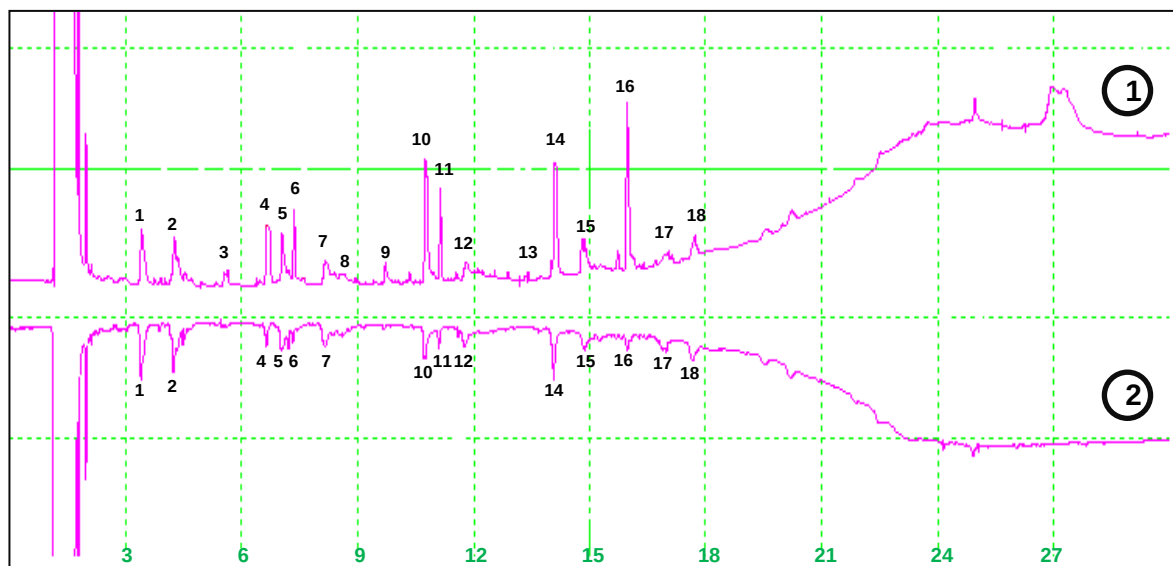


Figura 36 - Profilo gascromatografico dell'estratto da foglie di *Q. pubescens* non micorrizata (tracciato 1) e micorrizata (tracciato 2).

Tabella 5- Risultati dell'analisi gascromatografica dell'estratto da foglie di *Q. pubescens* micorrizata (tracciato 2) e non micorrizata (tracciato 1). I numeri corrispondono ai picchi identificati in Fig. 36.

Composti	
1. eptano	2. isoamil acetato
3. β -pinene / α -limonene	4. metil esanoato
5. etil esanoato	6. exil acetato
7. (z)-3-esenil acetato	8. nonanale
9. (z)-3-esen-1-olo	10. 1-octen-3-olo
11. acido acetico	12. octanolo
13. linaiolo	14. (e)-cariofillene
15. farnesene	16. metil salicilato
17. acido esanoico	18. β -ionone

4.3 Studio dei VOCs di *Q. pubescens* micropropagata e micorrizata in vitro

4.3.1 La micorrizzazione di piante micropropagate

Tradizionalmente, le piante di quercia utilizzate per la riforestazione sono ottenute da seme e solo raramente attraverso le colture di tessuti vegetali. La micropropagazione è un potenziale strumento per una rapida moltiplicazione delle essenze forestali, oltre che per la conservazione del germoplasma di specie rare. Si tratta di una tecnica di propagazione agamica ormai diventata, per molte specie, un sistema di moltiplicazione alternativo alle tecniche tradizionali di propagazione. L'obiettivo di tale metodologia è quello di ottenere in tempi brevi ed a costi contenuti, un grande numero di piantine identiche, sia genotipicamente che fenotipicamente, alla pianta di partenza, precedentemente selezionata per caratteristiche fisiologiche e produttive di pregio. Essa consiste nell'allevare le gemme o le microtalee su idonei mezzi di coltura addizionati di ormoni vegetali, in maniera tale da esaltare al massimo la produzione di nuovi germogli.

Per le querce, si è cercato, nel corso degli ultimi anni, di migliorare i protocolli per la propagazione vegetativa, da sempre considerata difficoltosa. Numerosi studi sono stati condotti sulla micropropagazione di diverse specie di *Quercus* spp. (Manzanera & Pardon, 1990; Chalupa, 1993; Sanchez *et al.*, 1996), ma molto poco si conosce circa le possibilità di propagazione *in vitro* di *Q. pubescens*.

Molto spesso, l'efficienza della micropropagazione è influenzata dalla perdita di piante durante l'ambientamento. L'ambientamento è una fase molto delicata in generale, ma in particolar modo per le piante ottenute mediante micropropagazione (Martins, 2008). Le piante micropropagate sono, infatti,

affette negativamente da stress idrico, che può essere dovuto sia alla bassa capacità di assorbimento delle loro radici, sia a ridotta regolazione della perdita d'acqua da parte degli stomi (Bonga, 1977; Flick *et al.*, 1983). L'acclimatazione di piantine micropropagate corrisponde ad un periodo di transizione nel quale le radici si adattano ad un substrato con i nutrienti meno disponibili, e ad una condizione autotrofica. In questa fase, la presenza di micorrize potrebbe incrementare la disponibilità di nutrienti limitanti come il fosforo e l'azoto, facilitandone l'assorbimento (Martins, 2008). Lo stress idrico può essere responsabile della bassa sopravvivenza di molte piante legnose micropropagate durante il processo di acclimatemento e *Q. pubescens* è una di queste. Le piante micropropagate si sviluppano in condizioni di elevata umidità e bassa luminosità, spesso con bassi livelli di lignificazione e una diminuita funzionalità dei sistemi radicali che può causare un basso tasso di sopravvivenza allo "svezzamento" (Martins, 2008). La micorizzazione di piante micropropagate, prima dell'acclimatemento, incrementa la sopravvivenza, migliorando la funzionalità del sistema radicale e la nutrizione minerale della pianta (Rancillac, 1982; Grellier *et al.*, 1984; Heslin & Douglas, 1986; Poissonier, 1986; Tonkin *et al.*, 1989; Martins, 2004, 2008; Martins *et al.*, 1996; Martins & Pais, 2005; Herrmann *et al.*, 1998; Díez *et al.*, 2000). Allo stesso modo, la micorizzazione *in vitro* delle piante micropropagate può essere usata per incrementare la sopravvivenza e la crescita durante lo "svezzamento" *ex vitro* (Nowak, 1998).

Tentativi di micorizzazione sono stati eseguiti con diverse specie di piante micropropagate: pino (Rancillac, 1982; Normand *et al.*, 1996), betulla (Grellier *et al.*, 1984), pioppo (Heslin & Douglas, 1986), eucalitpo (Poissonier, 1986; Tonkin *et al.*, 1989), quercia (Herrmann *et al.*, 1998), castagno (Strullu *et al.*, 1986; Martins, 2004, 2008; Martins *et al.*, 1996; Martins & Pais, 2005), quercia da sughero (Díez *et al.*, 2000). Questi tentativi

sono stati fatti al fine di rendere la micropropagazione un metodo sostenibile per propagare specie recalcitranti alla propagazione convenzionale, incrementando le performances delle piantine *in vitro*.

Herrmann *et al.* (1998) ha utilizzato un sistema di micorrizzazione *in vitro* per piante di *Quercus robur* L. micropropagate, con l'intenzione di sviluppare un metodo per analizzare la micorrizzazione di specie forestali senza i limiti dei metodi che utilizzano i semenzai. L'eterogeneità dei semenzai (che si riflette nei differenti tempi di germinazione), il vigore delle plantule e lo sviluppo asincrono sono solo alcuni di questi limiti. Questi esperimenti sono stati realizzati per lavorare con piante geneticamente uniformi private di cotiledoni per funzionare come piante più adulte, con materiale selezionato per garantire l'uniformità delle repliche e con un sistema di micorrizzazione che permetta di seguire lo sviluppo nel corso delle prove, al fine di caratterizzare gli effetti delle micorrize sulla morfologia della pianta.

4.3.2 Micropropagazione di *Q. pubescens*

La tecnica di micropropagazione può essere distinta in sette fasi:

1. Stadio 00 (scelta del materiale di partenza)
2. Stadio 0 (allevamento piante madri)
3. Stadio I (ottenimento di un impianto sterile)
4. Stadio II (moltiplicazione rapida per disporre di un'elevata quantità germogli)
5. Stadio III (allungamento per predisporre i germogli alla radicazione)
6. Stadio IV (radicazione *in vitro* o *in vivo*)

7. Stadio V (acclimatazione in serra per adattare gradatamente le piante all'ambiente esterno)

Scelta del materiale di partenza (stadio 00)

La scelta del giusto materiale di partenza è fondamentale; basti pensare che con la micropropagazione è sufficiente una sola gemma per produrre in un anno diverse centinaia di migliaia di piantine. Un'errata valutazione iniziale delle caratteristiche genetiche e sanitarie della pianta madre, avrebbe conseguenze disastrose, in quanto l'errore iniziale sarebbe replicato a dismisura.

Allevamento della pianta madre (stadio 0)

Laddove possibile, è opportuno allevare piante madri virus-esenti entro serra anti-insetto, avendo cura di verificare periodicamente il loro stadio sanitario. Nel momento in cui ciò non fosse possibile o risultasse molto difficile avere a disposizione la pianta madre, è preferibile il trasporto di una sua porzione, da cui eseguire l'espianto, facendo attenzione a non compromettere in modo irreversibile il materiale.

Prelievo di un espianto sterile (stadio I)

Una volta individuata la pianta madre da moltiplicare *in vitro*, è necessario l'ottenimento di un suo espianto sterile. La pianta madre, anche se allevata in condizioni igieniche controllate, non sarà mai sterile, ma sicuramente infetta da un'ampia gamma di microrganismi. Per questa ragione, è necessaria un'operazione che permette la sterilità dell'espianto senza danneggiarlo irreversibilmente.

Moltiplicazione (stadio II)

Una volta ottenuto un espianto sterile, viene stimolata la formazione di nuove gemme. La proliferazione, per germogliazione ascellare e/o avventizia, ha come scopo l'ottenimento di un notevole numero di germogli nel più breve tempo possibile.

Allungamento (stadio III)

Si tratta di una fase intermedia che ha lo scopo di predisporre i germogli alla tappa finale della micropropagazione: la radicazione. In realtà, la fase di allungamento è necessaria per ottenere germogli ben sviluppati, con uno stelo allungato e lamina fogliare ben distesa. L'allungamento viene eseguito trasferendo i germogli in un substrato di coltura in cui viene ridotta la dose di citochinine rispetto al mezzo utilizzato in moltiplicazione.

Radicazione (stadio IV)

E' la fase conclusiva della micropropagazione, in quanto permette di ottenere una piantina morfologicamente completa, in grado di vivere autotroficamente. Se viene indotta *in vitro*, le plantule dovranno essere trasferite in un secondo momento in serra di acclimatazione, mentre se la radicazione avviene "*in vivo*" si ha contemporaneamente un adattamento all'ambiente esterno.

Acclimatazione in serra per adattare gradatamente le piante all'ambiente esterno (stadio VI)

Una volta ottenute le piantine radicate *in vitro*, si procede al loro trasferimento in serra. Il procedimento di trapianto in serra del materiale *in vitro* avviene nel seguente ordine:

- 1 Apertura dei vasi di coltura ed estirpazione dall'agar dei germogli radicati.
- 2 Lavaggio degli apparati radicali al fine di eliminare l'agar residuo che, durante l'ambientamento, rappresenta una pericolosa fonte di sviluppo di funghi patogeni.
- 3 Trapianto a mano di ciascuna piantina su substrato torboso.
- 4 Irrigazione delle piante con acqua addizionata a fungicidi.
- 5 Sistemazione delle piantine nei bancali della serra e ricopertura degli stessi con film plastico che garantisca un'umidità relativa del 90-100%.

4.3.2.1 Materiali e metodi

Per l'avvio delle colture sono state utilizzate gemme ascellari di piante di *Q. pubescens* di due anni di età, provenienti dal Vivaio Forestale Valmetauro (S. Angelo in Vado – PU) (Fig. 37).

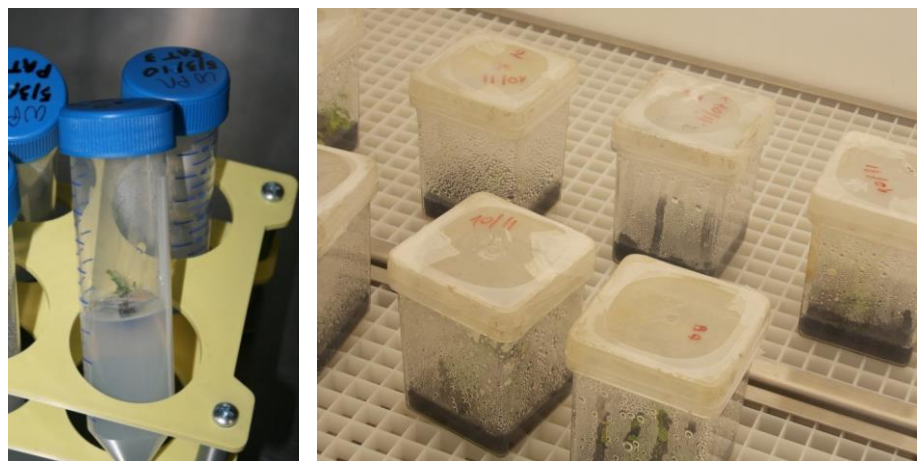


Figura 37 – sx. Gemme ascellari per avvio delle colture. dx. Contenitori tipo Magenta per la moltiplicazione degli espianti.

Gli espianti sono stati posti in coltura in contenitori Magenta™ GA-7 (Sigma Aldrich, Germany) su terreno McCown Woody Plant Medium

(WPM) arricchito in vitamine (Duchefa Biochemie, The Netherlands) contenente 30 g/l di saccarosio (Sigma Aldrich) e 7 g/l di agar (Plant Agar, CAS number 9002-18-0, Duchefa Biochemie), a pH 5,6.

Al terreno è stata aggiunta benzyl-adenina (BA, Duchefa Biochemie) in concentrazioni crescenti (da 0,25 ad 1 mg/l), per stimolare la moltiplicazione e stabilire il valore ottimale di BA per l'ottenimento di una moltiplicazione ottimale.

Gli espianti sono stati mantenuti in camera climatica (Angelantoni), in condizioni controllate ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$; 16L:8B; 3.000 lux).

L'induzione della radicazione è stata determinata con due diverse modalità:

- nella prima, è stato utilizzato un terreno di coltura WPM privo di regolatori di crescita, contenente 20 g/l di saccarosio e 6 g/l di agar, addizionato con 1 g/l di carbone attivo (100 mesh) (Sigma Aldrich);
- nella seconda, le piantine sono state dapprima poste in terreno WPM, contenente 30 g/l di saccarosio e 6 g/l di agar, addizionato con 20 mg/l di acido indolbutirrico (IBA, Duchefa Biochemie), per essere trapiantate, dopo 24 h, in WPM privo di regolatori di crescita, contenente 20 g/l di saccarosio e 6 g/l di agar, addizionato con 1 g/l di carbone attivo.

Dopo aver accertato la presenza di radici, le piantine sono state trasferite in piastre Petri ($\varnothing = 12\text{ cm}$) contenente terreno Strullu Romand modificato (MSR) privo di vitamine e di zuccheri (Declerck *et al.*, 1998), e coperte con un sacchetto di materiale plastico munito di filtri. In tali condizioni l'acclimatazione delle piantine è avvenuta a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ e al 70% di U.R.

4.3.2.2 Risultati

In tabella 6 sono riportati i dati relativi alla moltiplicazione degli espianti. Dalle osservazioni sugli espianti si nota come, in fase di moltiplicazione, la presenza di BA influenzi la formazione dei germogli. Dosi crescenti di BA nel mezzo di crescita hanno indotto una maggiore proliferazione, che si riduce, tuttavia, alle concentrazioni più alte.

La concentrazione ottimale di BA per ottenere un maggior numero di piantine per trapianto, nonché piantine mediamente più lunghe è di 0,75 mg/l.

Tabella 6 – Influenza della concentrazione di BA (mg/l) sulla moltiplicazione in vitro di *Q. pubescens*. Parametri esaminati: numero medio di piantine per trapianto, lunghezza media delle piantine, dimensioni della pianta più lunga.

WP medium			
BAP mg/l	Numero medio di piantine per trapianto	Lunghezza media delle piantine	Dimensioni della pianta più lunga
0,0	0,0	—	—
0,25	1,6	2,1	4,1
0,50	1,8	2,0	3,6
0,75	2,1	2,2	3,2
1,00	1,6	1,5	3,0

Per quanto riguarda, invece, l'induzione della radicazione, i risultati indicati nella tabella 7 mostrano come dal confronto delle due metodologie

adottate per la radicazione, si possa evincere che la seconda abbia fornito risultati migliori in termini di percentuale di radicazione (60%) rispetto alla prima (20%).

Tabella 7 – Confronto tra due metodologie per l'induzione della radicazione *in vitro* di *Q. pubescens*. Parametri esaminati: numero medio di radici, lunghezza media delle radici in cm.

METODO 1					
Carbone attivo	N. di piantine iniziali	Piantine radicate	% di radicazione	N. medio radici	Lunghezza media radici (cm)
1 g/l	30	6	20	1,4	2,5

METODO 2					
IBA per 24 ore	N. di piantine iniziali	Piantine radicate	% di radicazione	N. medio radici	Lunghezza media radici (cm)
20 mg/l	30	18	60	4,5	3,0

Le condizioni di acclimatazione descritte sono risultate ottimali per la stabilizzazione della quasi totalità delle piantine ottenute.

4.3.3 Micorrizzazione *in vitro* di *Q. pubescens*

L'elevata attitudine delle querce di instaurare un rapporto simbiotico con le ectomicorrize (es. tartufo), induce spesso a pensare che queste non possano instaurare un rapporto simbiotico con le endomicorrize. Il genere *Quercus* è infatti quasi sempre associato con ectomicorrize (Zhou *et al.*, 1997). Tuttavia, inoculazioni con micorrize arbuscolari (AM) sono state riportate da vari autori nel corso degli anni, per esempio in *Quercus rubra* L. (Henry, 1933; Grand, 1969; Watson *et al.*, 1990), *Q. falcata* Michaux (Grand, 1969), *Q. palustris* Münchhausen (Watson *et al.*, 1990), *Q. alba* L. (Watson *et al.*, 1990), ed in semenzai di *Q. imbricaria* Michaux (Rothwell *et al.*, 1983).

Pochi studi hanno esaminato se la crescita di piante del genere *Quercus* possa essere influenzata dall'infezione con AM. Watson *et al.* (1990) suggeriscono che la capacità di essere “infettati” sia da ectomicorrize che da micorrize arbuscolari è la strategia chiave che permette a *Q. palustris* e *Q. rubra* di sopravvivere in un ampio range di condizioni di substrato terroso.

Numerose specie vegetali, anche diverse dal genere *Quercus*, mancano di “fedeltà” nei confronti di un singolo tipo di micorriza, e normalmente possono essere inoculate sia con funghi ectomicorrizici che con funghi AM. Si ritrovano esempi a riguardo tra le Salicaceae, Betulaceae, e Myrtaceae (Smith & Read, 1997). Infezioni da AM in Pinaceae (normalmente specie ectomicorriziche) sono state descritte in passato (Vardavakis, 1992; Cázares & Trappe, 1993; Cázares & Smith, 1996; Smith *et al.*, 1998), come pure vi sono evidenze circa inoculazioni endomicorriziche su *Vaccinium* spp. (Stevens *et al.*, 1997). Una specie di fungo ectomicorrizico normalmente legato specificamente ad una pianta ospite, può infettare altri ospiti, anche in presenza della sua pianta preferita (Massicotte *et al.*, 1994). Viceversa, piante

ospiti non AM possono essere facilmente infettate da funghi AM, quando questi sono presenti nell'ecosistema. Dickie *et al.* (2001) hanno osservato elevati livelli di infezione da parte di funghi AM su *Q. rubra* cresciuta in pieno campo, in particolare su semenzai di *Q. rubra* piantati nelle vicinanze di *Acer rubrum* L., pianta ospite di funghi AM. Essi suggeriscono che l'infezione da endomicorrize di *Q. rubra* sia incrementata dalla presenza di piante ospiti prevalentemente endomicoriziche.

In *Q. rubra*, Dickie *et al.* (2001) hanno osservato sia ife che vescicole di endomicorrize, ma non gli arbuscoli. Gli arbuscoli AM sono stati osservati e fotografati da Grand (1969) in *Q. rubra* e *Q. falcata*. Watson *et al.* (1990) riportano la presenza, ma non la frequenza di arbuscoli sia in *Q. rubra* che in *Q. palustris*. Rothwell *et al.* (1983) hanno ritrovato vescicole ed ife di *Glomus* sp. su *Q. imbricaria*, ma non hanno osservato nè arbuscoli nè avvolgimenti di ife, e solo rarissime vescicole intracellulari.

In questa fase del lavoro si è cercato di ottenere piante di *Q. pubescens* micorrizzate *in vitro* con un'endomicorriza, mediante la tecnica di micorrizzazione con pianta autotrofa.

4.3.3.1 Stato della ricerca

In vitro vengono utilizzate le radici trasformate di carota e di cisto per instaurare un rapporto simbiotico con micorrize arbuscolari e ectomicorrize (Bécard & Fortin, 1988). Questa tecnica è stata molto utilizzata per indagare la biologia dei funghi (rivisitata da Declerck *et al.*, 2005). Non essendo distruttiva, tale procedura permette di osservare e studiare i fenomeni per un periodo molto lungo, consentendo così di acquisire delle informazioni che sono difficili da ottenere in altri modi: l'architettura miceliare (Bago *et al.* 1998; de la Providencia *et al.* 2005; Voets *et al.* 2006) e lo sviluppo dinamico

dei funghi (Declerck *et al.* 1996, 2001; de Souza & Declerck, 2003). D'altro canto, limiti della stessa tecnica sono rappresentati dall'impossibilità di studiare alcuni parametri come l'attività fotosintetica, lo stress idrico, e nel nostro caso, l'estrazione dei composti volatili di foglie da piante micorrizzate. Alcuni autori hanno provato a mettere a punto una tecnica di micorrizzazione *in vitro* con piante autotrofe. Un lavoro pioniero è stato condotto da Hepper (1981) con *Trifolium* sp. associato *in vitro* con *Glomus caledonium* (T.H. Nicolson & Gerd.) Trappe & Gerd. e *G. mosseae*. Successivamente, Elmeskaoui *et al.* (1995) hanno sviluppato una tecnica che ha permesso di studiare l'effetto dello stress idrico e del contenuto di CO₂ sulla micorriza. Voets *et al.* (2005) e Duprè de Boulois *et al.* (2006) hanno micorrizzato *in vitro*, mediante il sistema di coltura autotrofica, *Solanum tuberosum* L. e *M. truncatula* con spore di funghi arbuscolari.

4.3.3.2 Materiali e metodi

Per la micorrizzazione *in vitro* è stato utilizzato il fungo AM *G. intraradices*, MUCL 41833, allevato su ROC (Root Organ Culture) di radici di carota (*Daucus carota* L.) trasformate con Ri T-DNA. Il ceppo è stato fornito da GINCO (BCCM/MUCL, Microbiology unit, Université Catholique de Louvain, Belgium). Il ceppo è stato collocato in una piastra Petri (Ø = 90 mm) su un substrato Strullu Romand modificato (MSR) (Declerck *et al.*, 1998, modificato da Strullu & Romand, 1986), e solidificato con 3 g l⁻¹ GelGro™ (ICN, Biomedicals, Inc., Irvine, CA, USA). La subcultura è stata condotta seguendo il metodo descritto in Cranenbrouck *et al.* (2005). Semi di *M. truncatula* cv. Jemalong, strain A17 (SARDI, Australia) sono stati sterilizzati in superficie attraverso immersione in ipoclorito di sodio (8% cloro attivo) per 10 minuti, risciacquati in acqua deionizzata sterile (121°C per 15

min) e lasciati germinare in piastre Petri ($\varnothing = 90$ mm) riempite con 35 ml di MSR medium privo di saccarosio e vitamine, e solidificato su 3 g l^{-1} GelGro™. Venticinque semi sono stati piantati in ciascuna piastra. Le piastre sono state incubate al buio a 27°C. La germinazione è avvenuta in 3-4 giorni, e i semenzai erano pronti per l'utilizzo dopo 6-7 giorni. Le piantine di *M. truncatula* così ottenute sono state micorrizate con il fungo AM summenzionato ed utilizzate per indurre la micorrizazione in piantine di *Q. pubescens* micropropagate in precedenza (Fig. 38).

La micorrizazione *in vitro* è avvenuta con sistema chiuso (AM-P). Le piantine di *Q. pubescens* sono state poste a contatto con il micelio presente sulle radici di *M. truncatula* attraverso una piastra Petri contenente lo stesso substrato nutritivo di *G. intraradices*, che in prove preliminari si era dimostrato essere adatto anche alla crescita *in vitro* di *Q. pubescens*. In ogni piastra, una piantina di roverella micropropagata è stata collocata sul substrato, e coperta con un sacchetto in materiale plastico. Le radici della piantina potevano arrivare a contatto con quelle di *M. truncatula* sulle quali si era già sviluppato il micelio di *G. intraradices* (Figg. 39, 40). Le piantine sono rimaste a contatto con il micelio per un totale di 4 settimane. Già dopo 2 settimane di contatto, è stato effettuato un primo campionamento delle radici, per monitorarne lo stato di colonizzazione.

A verifica dell'avvenuta micorrizazione, per ciascuna piantina è stato calcolato l'IM (indice di micorrizazione), che rappresenta, in percentuale, il numero dei frammenti micorrizati sul numero totale delle osservazioni condotte.



Figura 38 – Piantine di *Q. pubescens* micropropagate ed utilizzate per la micorrizzazione *in vitro* con *G. intraradices*, mediante sistema chiuso AM-P.



Figura 39 – Piantine di *Q. pubescens* micorrizzate *in vitro* con *G. intraradices*, mediante sistema chiuso AM-P.

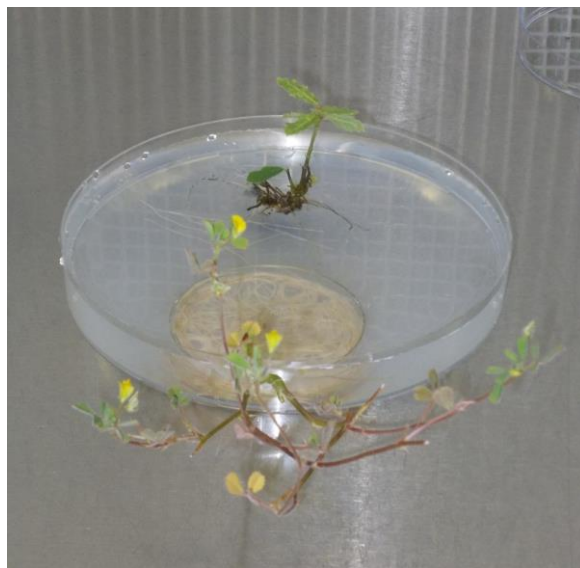


Figura 40 – Particolare del sistema chiuso AM-P per la micorrizzazione *in vitro* di *Q. pubescens* con *G. intraradices*.

4.3.3.3 Risultati

Le radici di *Q. pubescens* hanno presentato un indice di micorrizzazione pari al 20%, e si è potuto, in questo modo, osservare tutti gli organi strutturali di *Glomus* che correttamente si sono formati all'interno delle radici di roverella (Figg. 41, 42, 43).

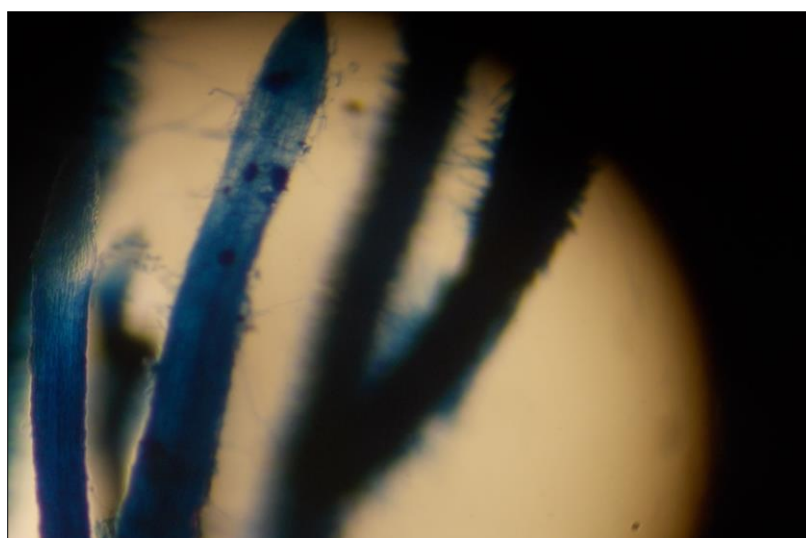


Figura 41 - Radici di *Q. pubescens* micorrizate *in vitro* con *G. intraradices*, mediante sistema chiuso AM-P.

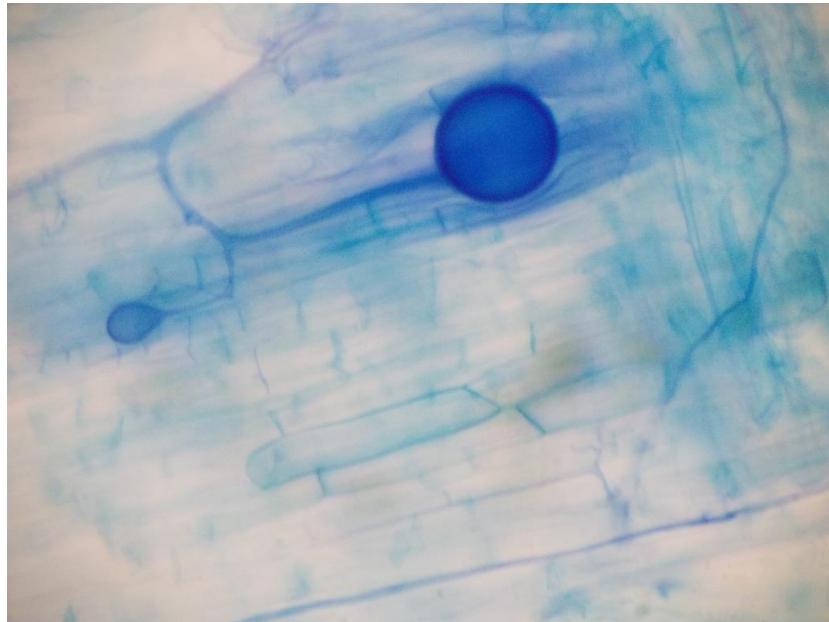


Figura 42 – Vescicole in radici di *Q. pubescens* micorrizate *in vitro* con *G. intraradices*, mediante sistema chiuso AM-P.

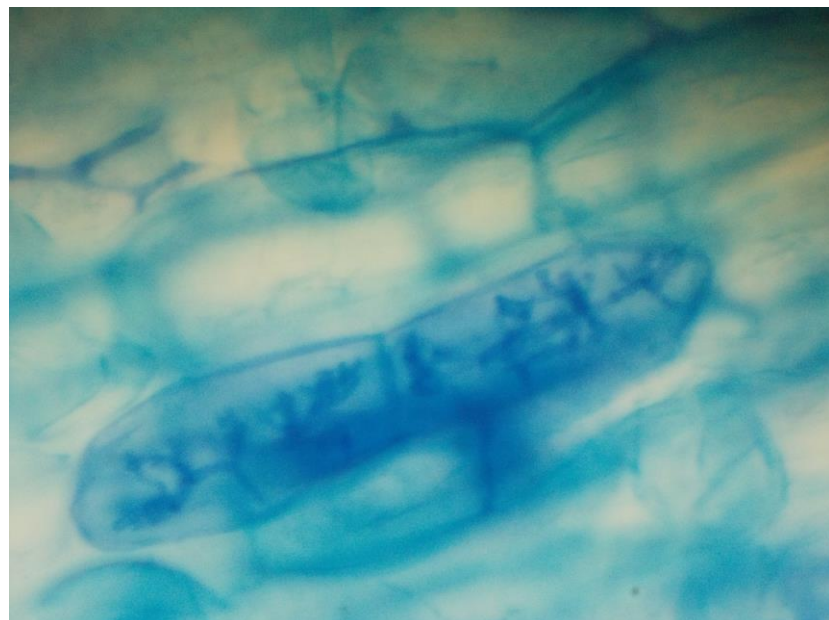


Figura 43 – Arbuscolo in radici di *Q. pubescens* micorrizate *in vitro* con *G. intraradices*, mediante sistema chiuso AM-P.

4.3.4 Estrazione dei composti volatili da *Q. pubescens* micorrizzata *in vitro*

Come già descritto nel paragrafo 4.2, è stato condotto un ulteriore studio dei VOCs emessi da *Q. pubescens*, utilizzando piantine micropropagate e micorrizzate *in vitro*. La finalità è stata sempre quella di valutare eventuali variazioni (quali-quantitative) nell'emissione di composti volatili da parte di piante micorrizzate rispetto a quelle non micorrizzate. La differenza fondamentale rispetto all'indagine precedente consiste nell'assenza di ulteriori elementi di variabilità, trattandosi di piantine clonate.

4.3.4.1 Materiali e metodi

Piantine intere micropropagate e micorrizzate *in vitro* sono state raccolte in un sacchetto in materiale plastico (Fig. 45), per intrappolarne la parte aerea, e sottoposte a flusso d'aria umidificato tramite gorgogliamento in acqua distillata e purificato previo passaggio attraverso una cartuccia di carbone attivo (Fig. 44). Le piantine sono state esposte per 24 ore ad un flusso costante di aria (125 ± 5 SCCM, Standard Centimeter Cubic Minute), monitorato con un flussimetro (Alltech, Digital Flow Check).

Gli odori sono stati adsorbiti su una cartuccia di carbone attivo; il lavaggio della cartuccia con 2 ml di esano (Sigma-Aldrich, Germany) ha fornito l'estratto per la caratterizzazione chimica.

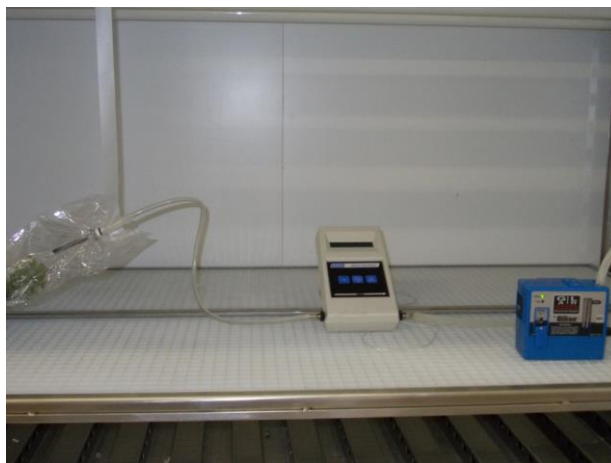


Figura 44 – Sistema di raccolta dei VOCs da piantine di *Q. pubescens* micropropagate e micorrizzate *in vitro*.



Figura 45 – Sistema di raccolta dei VOCs da piantine di *Q. pubescens* micropropagate e micorrizzate *in vitro*. Particolare della piantina racchiusa nel sacchetto in plastica.

4.3.4.2 Caratterizzazione chimica dei composti volatili estratti

Gli estratti sono stati analizzati tramite GC-MS presso il Laboratorio della Fondazione E. Mach (FEM) di San Michele all'Adige (TN), utilizzando la stessa procedura descritta nel paragrafo 3.2.2.4.

4.3.4.3 Risultati

Dal profilo degli estratti analizzati (Fig. 46), si evidenzia nuovamente che l'emissione dei composti volatili varia a seconda dello stato di micorrizzazione della pianta. Possiamo osservare come le piantine micropropagate, pur possedendo lo stesso materiale genetico ed allevate in condizioni identiche, mostrano una differente emissione di composti volatili, a seconda se siano micorrizzate o meno. Methylsalicylate, presente nelle piante non micorrizzate, è assente nelle stesse piante micorrizzate; analogamente, Z3-hexenylacetate è presente solo nelle piante micorrizzate.

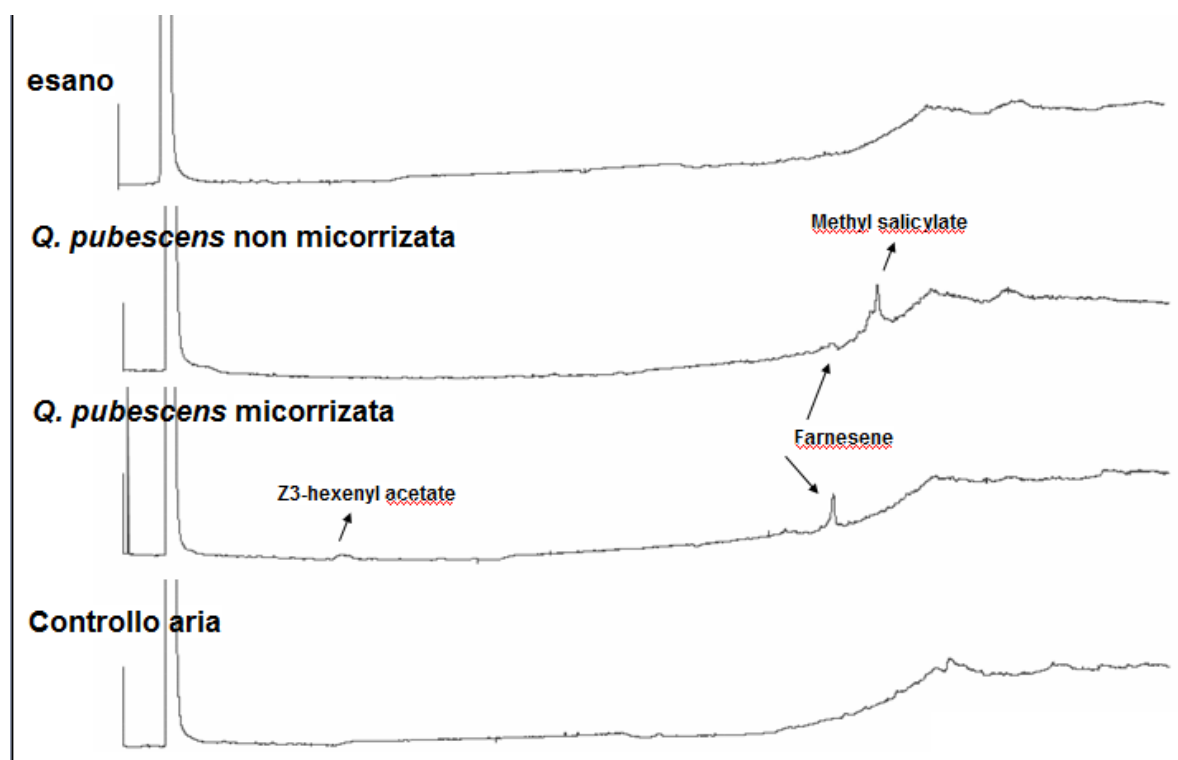


Figura 46 – Profilo gascromatografico degli estratti da foglie di *Q. pubescens* micropropagata, micorrizzata e non micorrizzata *in vitro*. Controlli: in alto il solvente (esano), in basso l'aria.

5 Discussione e conclusioni

L'importanza delle interazioni tra le diverse componenti dell'ecosistema delle tartufaie è stato messo in evidenza dai dati fitosociologici raccolti, che hanno mostrato come la presenza della micorriza, e del suo sintomo più evidente, la bruciata, possa condizionare la vegetazione circostante. Tale fenomeno rappresenta una strategia ecologica molto importante, come dimostra l'interesse crescente nei confronti del fenomeno negli ultimi anni. In aggiunta alla ricerca sui metaboliti coinvolti nello scambio nutritivo tra il fungo e la pianta nella simbiosi micorrizica, un crescente interesse è attualmente destinato proprio dallo studio e dalla ricerca sistematica dei composti volatili emessi dai tartufi, e della loro funzione ecologica.

L'effetto fitotossico dei VOCs emessi dalle piante micorrizzate è stato notato per la prima volta nei primi anni '90 (Pacioni, 1991). Splivallo (2007) afferma che i composti volatili emessi dalle radici micorrizzate con alcune specie di *Tuber* spp. sono in grado di indurre il fenomeno della bruciata, che si manifesta con una scarsa presenza di vegetazione nelle vicinanze della pianta micorrizzata. Nel 2010 González-Armada *et al.* evidenziano come la flora presente all'interno e all'esterno della bruciata vari notevolmente in composizione, molto probabilmente a causa dell'influenza dei composti volatili.

In questa tesi è stato messo in evidenza come la bruciata influenzi negativamente la ricchezza floristica spingendo la selezione verso specie dicotiledoni afferenti alla famiglia delle Fabaceae. Le Terofite e, secondariamente, le Emicriptofite biennali, risultano le forme biologiche dominanti, a testimonianza della pressione allelopatica dei composti volatili

emessi dalle radici micorrizzate che selezionano specie vegetali a ciclo annuale o al massimo biennale.

Attualmente, circa 200 VOCs sono stati identificati in varie specie di tartufo, alcuni di essi descritti per la prima volta (Splivallo, 2007), ed il loro numero è in continua crescita (Tarkka & Piechulla, 2007). Una lista dei metaboliti secondari dei tartufi riportati in letteratura è presente in Splivallo (2007), ed ha rappresentato il punto di partenza dell'indagine svolta per lo studio dell'attività biologica di VOCs sull'insetto infeudato al tartufo, *L. cinnamomea*. L'insetto saggiato, un coleottero che da tempo ha stabilito una relazione trofica esclusiva con i carpofori del genere *Tuber*, si è dimostrato attratto significativamente dalla miscela di composti emessa da alcuni carpofori di tartufi neri. Si conferma, quindi, l'azione attrattiva dei VOCs dei tartufi, ipotizzata anche in passato (Pacioni *et al.*, 1991; Hochberg *et al.*, 2003), con la funzione di attrarre insetti che indirettamente ne diffondano le spore e garantiscano la diffusione della micorriza nell'ambiente. Tra le sostanze sintetiche saggiate sul sistema olfattivo dell'insetto, inoltre, le femmine di *L. cinnamomea* hanno mostrato di percepire in maniera significativa i composti solforati (es. dimetilsulfide). Questa sostanza è un componente dello spettro di quasi tutte le specie di *Tuber* (Mauriello *et al.*, 2004) ed è responsabile del tipico e pungente aroma di molti tartufi. Il risultato è in accordo con studi precedenti (Pacioni *et al.*, 1991), in cui questo composto era stato ritenuto responsabile della maggiore attrazione di coleotteri micofagi (tra cui spiccava anche allora *L. cinnamomea*).

I VOCs sono rilasciati nel corso dell'intero ciclo vitale del tartufo, che include il micelio, la micorriza e il carpoforo (Talou *et al.*, 1989; Menotta *et al.*, 2004; Zeppa *et al.*, 2004; Splivallo *et al.*, 2007a, 2011). Per questo motivo, l'indagine svolta nel presente lavoro ha esaminato anche i VOCs

emessi dalle foglie di *Q. pubescens* micorrizate e non, ipotizzando una differenza nell'emissione delle sostanze, sia in quantità che in qualità.

Come già messo in evidenza da Tumlinson *et al.* (1996) i composti volatili giocano un ruolo fondamentale nell'indurre nelle piante attaccate da fitofagi un processo di difesa indiretta. Guerrieri *et al.* (2004) e Schausberger *et al.* (2012) hanno dimostrato come le piante micorrizate rispetto a quelle non micorrizate varino l'emissione dei composti volatili aumentando le proprie difese nei confronti dei nemici naturali. Anche dagli estratti analizzati in questo studio, provenienti da piante di roverella micorrizate e non, i gascromatogrammi hanno messo in evidenza differenze nell'emissione di VOCs, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo. Sebbene le differenze qualitative siano risultate minime, quelle quantitative risultano più evidenti: alcune sostanze emesse elevata quantità dalle piante non micorrizate, presentano un'emissione drasticamente ridotta nelle piante micorrizate. Questo fa presupporre che le osservazioni fatte in passato in diversi studi (Gehring & Whitham, 1991; Del Vecchio *et al.*, 1993; Gehring *et al.*, 1997; Kolb *et al.*, 1999; Mueller *et al.*, 2005), dove si afferma che le piante micorrizate con ectomicorrize influenzano in maniera negativa la presenza dei fitofagi, siano proprio dovute alla differenza nell'emissione dei composti volatili e soprattutto al fatto che le piante micorrizate con ectomicorrize emettono un quantitativo minore di composti volatili attrattivi per i fitofagi.

A verifica di tutte le osservazioni fatte, si è cercato di mettere a punto un modello di studio che permettesse di controllare tutte le variabili indesiderate. Per tale motivo sono state ottenuti cloni di roverella mediante la tecnica della micropropagazione; la successiva micorrizzazione *in vitro*, ottenuta con endomicorrize del genere *Glomus*, ha permesso di operare in un ambiente controllato e controllabile, identico per entrambe le tesi considerate (piante micorrizate e non), con la finalità di ottenere piantine micorrizate

identiche a quelle non micorrizzate, per eseguire ulteriori estrazioni dei composti volatili. In questo caso, dall'analisi effettuate al GC-MS, si è confermata la variazione dei composti volatili emessi da piante micropropagate e micorrizzate *in vitro*. Data la presenza di sostanze differenti nei profili chimici delle due tesi analizzate, e sulla base delle ricerche precedenti che hanno messo in risalto la capacità delle piante micorrizzate con endomicorrize di difendersi meglio rispetto ad altre piante non micorrizzate (Guerrieri *et al.*, 2004; Schausberger *et al.*, 2012), si può ipotizzare che le micorrize, in generale, influenzino l'emissione dei composti volatili; inoltre, a seconda del tipo (ecto o endo-micorriza), possono essere presenti delle variazioni qualitative o quantitative nell'emissione dei composti. La differenza nelle emissioni dei composti volatili può influenzare in maniera diversa le interazioni con i diversi organismi a diversi livelli trofici.

È opportuno, quindi, considerare che una stessa pianta può comportarsi e interagire diversamente con l'ambiente che la circonda in dipendenza delle micorrize con cui instaura un rapporto di simbiosi. In conclusione, è possibile affermare che la differente emissione dei composti volatili riveste un ruolo fondamentale nel regolare i rapporti trofici che si instaurano tra vegetale e fitofago sia nella parte ipogea che epigea della pianta micorrizzate.

Il lavoro è stato reso possibile solo adottando un approccio multidisciplinare, necessario per integrare i diversi aspetti affrontati. La complessità della tematica ha reso essenziale la contestualizzazione delle indagini ad un modello ben definito: la roverella, il tartufo e il suo principale fitofago. Nonostante si sia fatto riferimento ad uno specifico sistema, i risultati ottenuti, importanti da un punto di vista ecologico, potrebbero fungere da spunto per ulteriori indagini e condurre ad una maggiore generalizzazione dei fenomeni osservati.

6 Bibliografia

- Arzone A., 1970 - Reperti ecologici ed etologici di *Liodes cinnamomea* Panzer vivente su *Tuber melanosporum* Vittadini (Coleoptera Staphylinoidea). *Annali della Facoltà di Scienze Agrarie della Università Degli Studi di Torino*, 5: 317–357.
- Arzone A., 1971 – Nuovi reperti sulla biologia di *Liodes cinnamomea* Panzer in *Tuber magnatum* Pico (Coleoptera Staphilinoidea). *Alligna*, Vol. 17: 121-129.
- Bago B., Azcon-Aguilar C., Piché Y., 1998 - Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia*, 90:52–62.
- Becard G., Fortin J. A., 1988 - Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.*, 108, 211–218.
- Bellesia F., Pinetti A., Bianchi A., Tirillini B., 1996 – I composti solforati dell'aroma del tartufo: loro evoluzione durante la conservazione. *Atti Soc Nat e Mat Di Modena*, 127: 177–187.
- Bellesia F., Pinetti A., Bianchi A., Tirillini B., 1998 - Volatile compounds of the white truffle (*Tuber magnatum* Pico) from middle Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 11:239–243.
- Bellesia F., Pinetti A., Tirillini B., Bianchi A., 2001 – Temperature dependent evolution of volatile organic compounds in *Tuber borchii* from Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 16: 1–6.
- Bellesia F., Pinetti A., Tirillini B., Paolocci F., Rubina A., Arcioni S., Bianchi A. 2002 - The headspace volatiles of the Asian truffle *Tuber indicum* Cooke et Mass. *J. of Essential Oil Research*, 14:3–5.

- Bencivenga M., Donnini D., Di Massimo G., 1992 - Analisi delle micorrize in una tartufaia coltivata di *Tuber melanosporum* undici anni dopo l'impianto. *Micol. Vegetazione Mediterr.*, 7:159–171.
- Bencivenga M., Di Massimo G., Donnini D., Tanfulli M., 1995 - Micorrize inquinanti frequenti nelle piante tartufigene. Nota 1—Inquinanti in vivaio. *Micol. Ital.*, 2:167–178
- Bencivenga M., Calandra R., Giovagnotti E., Russi L., 1996 - Aspetti pedologici e vegetazionali delle tartufaie di alcune specie di “tartufi minori”. *Annali Facolta' di Agraria, Universita' di Perugia* vol 50, pp 7–45.
- Bennett A. E., J. Alers-Garcia, J. D. Bever, 2006 - Threeway interactions among mutualistic mycorrhizal fungi, plants, and plant enemies: hypotheses and synthesis. *Am. Nat.*, 167: 141-152.
- Boeckh J., Kaissling K.E., Schneider D., 1965 - Insect olfactory receptors. *Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 30:263-280.
- Bonga, J. M., 1977 - Applications of tissue culture in Forestry. In: *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. eds. J. Reinert and Y. P. S. Bajaj, pp. 93-107. Springer-Verlag, New York.
- Bowen, G. D., 1973 - Mineral nutrition of mycorrhizas. In: *Ectomycorrhizas*. eds. G. C. Marks and T. T. Kozlowski, pp. 151-201. Academic Press, New York and London.
- Boyd, R., Furbank, R. T., Read D. J., 1986 - Ectomycorrhiza and the water relations of trees. In: *Mycorrhizae, Physiology and Genetics*. eds. Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., pp. 689-693. INRA, Paris.
- Braun-Blanquet J., 1964 – Pflanzensoziologie - 3st ed. Springer, Wien.
- Chalupa V., 1993 - Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture. *Ann. Sci. For.*, 50, Suppl 1, 295s-303s.

- Chatín A.D., 1892 - La truffe. Libraire J. B. Baillèe`re et Fils, Paris.
- Chevalier G., Giraud M., Bardet M.Ch, 1982 - Interactions entre les mycorhizes de *Tuber melanosporum* et celles d'autres champignons ectomycorhiziens en sols favorables á la truffe. *Les mycorhizes: biologie et utilisation*. In: Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V, Trouvelot A (eds) Les Colloques de l'INRA, vol 13. INRA, Paris, pp 313–321.
- Currie A. F., Murray P. J., Gange A. C., 2006 - Root herbivory by *Tipula paludosa* larvae increases colonization of *Agrostis capillaris* by arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.*, 34: 1994-1997.
- De Cristofaro A., Germinara G. S., Rotundo G., 2000 - Electrophysiological and olfactory responses of *Ephestia kuehniella* Zeller adults to cereals' semiochemicals. *Integrated Protection of Stored Products-IOBC Bulletin*, 23 (10):189-194.
- de la Providencia E. I., de Souza F. A., Fernández F., Séjalon Delmas N., Declerck S., 2005 - Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenic groups. *New Phytol.*, 165, 261–271.
- de Souza F. A., Declerck S., 2003 - Mycelium development and architecture, and spore production of *Scutellospora reticulate* in monoxenic culture with RiT-DNA transformed carrot roots. *Mycologia* 95: 1004-1012.
- De Miguel A. M., Saéz R., 2005 - Algunas micorrizas competidoras de plantaciones truferas. *Publ Bio Univ Navarra Ser Bot* 16:1–18, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Navarra. S.A.
- Declerck S., Strullu D. G., Plenchette C., 1996 - *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycol. Res.*, 100, 1237–1242.
- Declerck S., Strullu D. G., Plenchette C., 1998 - Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a

- proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia*, 90, 579–585.
- Declerck S., D_Or D., Cranenbrouck S., Le Boulengé, E., 2001 - Modelling the sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in monoxenic culture. *Mycorrhiza*, 11, 225–230.
- Declerck S., Strullu D. G., Fortin J. A., 2005 - In Vitro Culture of Mycorrhizas. Springer, Heidelberg, 400pp.
- Del Vecchio T. A., Gehring C. A., Cobb N. S., Whitham T. G., 1993 - Negative effects of scale insect (*Matsucoccus acalyptus*) herbivory on the ectomycorrhizae of pinyon pine (*Pinus edulis*). *Ecology*, 74: 2297-2302.
- Delmas J., 1976 - La truffe et sa culture. INRA: Institut National de la Recherche Agronomique, SEI CNRA, Versailles.
- Den Otter C.J., Tchicaya T., Van Der Berg B., 1988 - Olfactory sensitivity of five species of tsetse (*Glossina spp.*) to 1-octen-3-ol, 4-heptanone, 3-nonanone and acetone. *Insect Sci. Applic.*, 9:213-218.
- Den Otter C.J., De Cristofaro A., Voskamp K.E., Rotundo G., 1996 - Electrophysiological and behavioural responses of chestnut moths, *Cydia fagiglandana* and *C. splendana* (Lep., Tortricidae), to sex attractants and odours of host plant. *Journal of Applied Entomology*, 120:413-421.
- Díaz P., Ibañez E., Señoráns F. J., Reglero G., 2003 - Truffle aroma characterization by headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography*, A 1017:207–214.
- Dicke M., Sabelis M. W., 1988 - How plants obtain predatory mites as bodyguards. *Netherlands Journal of Zoology*, 38:148–165.
- Dicke M., van Beek T. A., Posthumus M. A., Ben Dom N., van Bokhoven H., de Groot A. E., 1990 - Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator–prey interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 16, 381–396.

- Dicke M., van Loon, J. J. A., 2000 - Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomol. Exp. Appl.*, 97: 237/249.
- Di Massimo G., García-Montero L. G., Manjón J. L., Díez J., 1996 - Hongos micorrícicos competidores de *Tuber nigrum* Bull. (*T. melanosporum* Vitt.) presentes en ecosistemas naturales y de viveros del centro de España. *Bol. Soc. Micol. Madrid* 21:189–199.
- Díez, J., Manjón, J. L., Kovács, G. M., Celestino, C., Toribio, M., 2000 - Mycorrhization of vitroplants raised from somatic embryos of cork oak (*Quercus suber* L.) *Appl. Soil Ecol.* 15: 119-123.
- Donnini D., Bencivenga M., 1995 - Micorrize inquinanti frequenti nelle piante tartufigene. Nota 2—Inquinanti in campo. *Micol. Ital.*, 2:185–207.
- Duddridge, J. A., Malibari, A., Read, D. J., 1980 - Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* 287: 834-836.
- Dupré de Boulois H., Voets L., Delvaux B., Jakobsen I., Declerck S., 2006 - Transport of radiocaesium by arbuscular mycorrhizal fungi to *Medicago truncatula* under *in vitro* conditions. *Environ. Microbiol.*, 8:1926–1934.
- Elmeskaoui A., Damont J. P., Poulin M. J., Piché Y., Desjardins Y., 1995 - A tripartite culture system for endomycorrhizalinoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro*. *Mycorrhiza*, 5, 313–319.
- Faccoli M., Anfora G., Tasin M., 2008 - Responses of the Mediterranean pine shoot beetle *Tomicus destruens* (Wollaston) to pine shoot and bark volatiles. *J. Chem. Ecol.*, 34(9):1162-9.
- Feil, W., Kottke, I., Oberwinkler, F., 1988 - The effect of drought on mycorrhizal production and very fine root system development of Norway spruce under natural and experimental conditions. *Plant Soil* 108: 221-231.

- Flick, C. E., Evans, D. A., Sharp, W. R., 1983 - Organogenesis. In: *Handbook of Plant Cell Culture. Vol. I-Techniques for Propagation and Breeding.* eds. D. A. Evans, W. R., Sharp, P. V., Ammirato, Y., Yamada, pp. 13-81. McMillan Publishing Co. New York.
- Fontana A., Reichelt M., Hempel S., Gershenzon J., Unsicker S. B., 2009 - The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on direct and indirect defense metabolites of *Plantago lanceolata* L. *Journal of Chemical Ecology*, 35, 833–843.
- Frank B., 1885 - Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber Dtsch Bot Ges* 3:128–145
- Friese C.F.; Allen M. F., 1993 – The interaction of harvester ants and VA mycorrhizal fungi: in a patchy environment: the effects of mound structure on fungal dispersion and establishment. *Functional Ecology*, 7: 13 – 20.
- Gange A. C., 2007 - Insect-mycorrhizal interactions: patterns, processes, and consequences, pp. 124-143. In T. Ohgushi, T. P. Craig, and P. W. Price (eds.), *Ecological communities: plant mediation in indirect interaction webs*. Cambridge University Press, London, United Kingdom.
- Gange A. C., Bower E., 1997 - Interactions between insects and mycorrhizal fungi, pp. 115-132. In A. C. Gange and V. K. Brown (eds.), *Multitrophic interactions in terrestrial systems*. Blackwell, Oxford, United Kingdom.
- Gange A. C., Bower E., Brown V. K., 2002 - Differential effects of insect herbivory on arbuscular mycorrhizal colonization. *Oecologia*, 131, 103–112.
- Gehring C. A., Whitham T. G., 1994 - Interactions between aboveground herbivores and the mycorrhizal mutualists of plants. *Trends Ecol. Evolut.*, 9: 251-255.

- Gehring C. A., Cobb N. S., Whitham, T. G., 1997 – Three-way interactions among ectomycorrhizal mutualists, scale insects, and resistant and susceptible pinyon pines. *American Naturalist*, 149: 824-841.
- Gehring C. A., Whitham, T. G., 2002 - Mycorrhizae-herbivore interactions: population and community consequences, pp. 295-320. In M.G.A. van der Heijden and I. R. Sanders (eds.), *Mycorrhizal ecology*. Springer, Berlin, Germany.
- Gehring C., Bennett A., 2009 - Mycorrhizal fungal-plant-insect interactions: the importance of a community approach. *Environmental Entomology*, 38, 93–102.
- Germinara G. S., De Cristofaro A., Rotundo G., 2008 - Behavioral Responses of Adult *Sitophilus granarius* to Individual Cereal Volatiles. *J. Chem. Ecol.*, 34:523–529.
- Giraud M., 1988 - Prélèvement et analyse de mycorhizes. In: CTIFL (ed) *La truffe*. FNPT 10. *Proceedings of the Congrès de la trufficulture*, Saintes, 1987, pp 49–63.
- González-Armada B., Cervero R. Y., De Miguel A. M. 2005 - Diversidad florística de zonas truferas de Navarra. In: *Proceedings of the IV Congreso Forestal Español*, Zaragoza, 2005, Sociedad Española de Ciencias Forestales SECF.
- González-Armada B., De Miguel A. M, Cervero R. Y.,. 2010 - Ectomycorrhizae and vascular plants growing in brûlés as indicators of below and above ground microecology of black truffle production areas in Navarra (Northern Spain). *Biodivers Conserv.*,19:3861–3891.
- Granetti B., Angelini P., 1992 - Competizione tra alcuni funghi ectomicorrizici e *Tuber melanosporum* in una tartufaia coltivata. *Micol. Vegetazione Mediterr.*, 7(1):173–188.

- Granetti B., Baciarelli Falini L., 1997 - Competizione tra le micorrize di *Tuber melanosporum* Vitt. e quelle di altri funghi in una tartufaia coltivata a *Quercus ilex* L. *Micol. Ital.*, 3:45–59.
- Grellier, B., Letouzé, R., Strullu, D. G., 1984 - Micropropagation of birch and mycorrhizal formation *in vitro*. *New Phytol.* 97: 591-599.
- Guerrieri E., Lingua G., Digilio M. C., Massa M., Berta G., 2004 - Do interactions between plant roots and the rhizosphere affect parasitoid behaviour? *Ecol. Entomol.*, 29: 753-756.
- Halliday R. B., Majka C. G., 2010 - Clarification of the status of the Genus names *Leiodes* Latreille 1796 (Coleoptera), *Liodes* von Heyden 1826 (Acari) and *Neoliodes* Berlese 1888 (Acari). *Zootaxa*, 2600: 61–65.
- Harley, J. L., Smith, S. E., 1983 - Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press.
- Hart M. M., Reader R. J., 2002 - Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 153: 335-344.
- Hepper C., 1981 - Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytol.* 88, 641–647.
- Herrmann, S., Munch, J. C., Buscot, F., 1998 - A gnotobiotic culture system with oak microcuttings to study specific effects of mycobionts on plant morphology before and in the early phase of ectomycorrhiza formation by *Paxillus involutus* and *Piloderma croceum*. *New Phytol.* 138: 203-212.
- Heslin, M. C., Douglas, G. C., 1986 - Effects of ectomycorrhizal fungi on growth and development of poplar plants derived from tissue culture. *Sci. Hort.* 30: 143-149.
- Hochberg, M. E., Bertault, G., Poitrineau, K., Janssen, A., 2003 - Olfactory orientation of the truffle beetle, *Leiodes cinnamomea*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Volume 109, Number 2, pp. 147-153.

- Hoeksema J. D., Bala Chaudhary V., Gehring C. A., Collins Johnson N., Karst J., Koide R. T., Pringle A., Zabinski C., Bever J. D., Moore J. C., Wilson G. W. T., Klironomos J. N., Umbanhowar J., 2010 - A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology Letters*, 13: 394 – 407.
- Jones, M. D., Durall, D. M., Tinker, P. B., 1991 - Fluxes of carbon and phosphorus between symbionts in willow ectomycorrhizas and their changes with time. *New Phytol.* 119: 99-106.
- Klironomos J. N., 2003 - Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, 84: 2292-2301.
- Kolb T. E., Dodds K. A., Clancy K. M., 1999 - Effect of western spruce budworm defoliation on the physiology and growth of potted Douglas-Pr seedlings. *Forest Sci.*, 45: 280-291.
- Kula A. A. R., Hartnett D. C., Wilson G.W.T., 2005 - Effects of mycorrhizal symbiosis on tallgrass prairie plant-herbivore interactions. *Ecol. Lett.*, 8: 61-69.
- Leitner M., Kaiser R., Hause B., Boland W., Mithöfer A., 2010 - Does mycorrhization influence herbivore-induced volatile emission in *Medicago truncatula*? *Mycorrhiza*, 20, 89–101.
- Mamoun M., Olivier J.M. 1993 - Competition between *Tuber melanosporum* and other ecomycorrhizal fungi under 2 irrigation regimes. 1. Competition with *Tuber brumale*. *Plant Soil*, 139:265–273.
- Manzanera J. A., Pardon J. A., 1990 - Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21: 1-8.
- Martegoute J. C., 2002 - Plantes des causses et des truffières. Fédération Départementale des Trufficulteurs du Périgord, Périgueux.
- Martins, A., 2004 - Micorrização controlada de *Castanea sativa* Mill.: Aspectos fisiológicos da micorrização in vitro e ex vitro. Dissertação de

doutoramento em Biologia/Biotecnologia Vegetal. Faculdade de Ciências de Lisboa. Universidade Clássica de Lisboa. pp. 506.

- Martins, A., 2008 - *In vitro* mycorrhization of micropropagated plants: studies on *Castanea sativa* Mill. Chapter 14 in Siddiqui, Akhtar and Futai (eds.), *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*, 319-334, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Martins, A., Barroso, J., Pais, M. S., 1996 - Effect of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* Mill. *Mycorrhiza* 6: 265-270.
- Martins, A., Pais, M. S., 2005 - Mycorrhizal inoculation of *Castanea sativa* Mill. micropropagated Plants: Effect of mycorrhization on growth. *Acta Hortic.* 693: 209-217.
- Marx, D. H., 1969 - The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.
- Marx, D. H., Cordell, C. E., 1989 - Use of ectomycorrhizas to improve forestation practices. In: *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth*. eds. J. M., Whipps and R. D., Lumsden. Cambridge.
- Mauriello G., Marino R., D'Auria M., Cerone G., Rana G. L., 2004 – Determination of Volatile Organic Compounds from Truffles via SPME-GC-MS. *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 42: 299 – 305.
- Meyer, F. H., 1987 - Extreme site conditions and ectomycorrhizae (especially *Cenococcum geophilum*). *Angew. Bot.* 61: 39-46.
- Mueller R. C., Martinez T., Sthultz C. M., Gehring C. A., Whitham T. G., 2005 - The relationship between stemgalling wasps and the mycorrhizal colonization of *Quercus turbinella*. *Can. J. Botany* ,83: 1349-1353.

- Murashige T., Skoog F., 1962 - A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473–497.
- Nara, K. 2006. Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. *New Phytologist*, 169: 169-178.
- Newton A. F., 1984 - Mycophagy in Staphylinidae (Coleoptera). *Fungus–Insect Relationships. Perspectives in Ecology and Evolution* (ed by Q Wheeler & M Blackwell). Columbia University Press, New York.
- Normand, L., Bartschi, H., Debaud, J. C., Gay, G., 1996 - Rooting and acclimatization of micropropagated cuttings of *Pinus sylvestris* are enhanced by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Physiol Plant*. 98: 759-766.
- Nowak, J., 1998 - Benefits of *in vitro* “biotization” of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 34: 122-130.
- O’Donnell K., Cigelnik E., Weber N. S., Trappe J. M., 1997 - Phylogenetic relationships among ascomycetous truffles and the true and false morels inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. *Mycologia*, 89:48–65.
- Olivier J.M., Savignac J.C., Sourzat P., 1996 - Truffe et trufficulture. Fanlac, Périgueux.
- Olivier J.M., Savignac J.C., Sourzat P., 2002 - Truffe et trufficulture. Fanlac, Périgueux.
- Pacioni G., 1989 – Biology and ecology of the truffles. *Acta Medica Romana*, 27: 104-117.
- Pacioni G., Lalli G., 1981 – Biologia ed ecologia del tartufo nero (*Tuber melanosporum* Vitt.). In: *Atti Symposium Internazionale di Micologia*, pp. 69-86. Borgo Va di Taro, Italy: Centro Studi Flora Mediterranea.
- Pacioni G., Bologna M. A., Laurenzi M., 1991 - Insect attraction by *Tuber*: a chemical explanation. *Mycological Research*, 95: 1359–1363.

- Paura B, Stanisci A., Di Marzio P., Fortini P., 2010 - Le serie di vegetazione del Molise. In Blasi C. (ed.). La vegetazione d'Italia. Palombi & Partner S.r.l. Roma. Pg.: 338-349.
- Percurdani R., Trevisi A., Zambonelli A., Ottonello S., 1999 - Molecular phylogeny of truffles (Pezizales: Terfeziaceae, Tuberaceae) derived from nuclear rDNA sequence analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13:169–180.
- Phillips T. W., Jiang X.-L., Burkholder W. E., Phillips J. K., Tran, H. Q., 1993 - Behavioral responses to food volatiles by two species of stored-product Coleoptera, *Sitophilus oryzae* (Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae). *J. Chem. Ecol.*, 19:723–734.
- Pike V., Smith J. L., White R. D., Hall D. R., 1994 - Studies on responses of stored-product pests, *Prostephanus truncates* (Horn) and *Sitophilus zeamais* Motsch., to food volatiles, pp. 566–569, in E. Highley, E. J. Wright, H. J. Banks, and B. R. Champ (eds.). *Proceedings of the Sixth International Working Conference on Stored Product Protection*, Canberra, Australia-CAB International, Wallingford, Oxon.
- Plattner I., Hall I.R., 1995 - Parasitism of non-host plants by the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Mycol. Res.*, 99 (11):1367–1370.
- Poissonier, M., 1986 - Mycorrhization *in vitro* de clones d'eucalyptus. Note de laboratoire, *Annales de Recherches Sylvicoles* v.1985, 81-93.
- Price P. W., 1997 - Insect ecology, 3rd ed. Wiley, New York.
- Rancillac, M., 1982 - Multiplication végétative *in vitro* et synthèse mycorrhizienne: pin maritime, Hebelome, Pisolithes. Les colloques de l'INRA. 13: 351-355.
- Rapparini F., Llusia, J., Peñuelas J., 2008 - Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) colonization on terpene emission and content of *Artemisia annua* L. *Plant Biology*, 10, 108–122.

- Raunkiaer C., 1934 – The life forms of the plants and statistical plant geography. Clarendon, Oxford.
- Roelofs W.L., 1984 - Electroantennogram assays: rapid and convenient screening procedures for pheromones. In: Techniques in pheromone research (ed. by H.E. Hummel and T.A. Miller), Springer-Verlag New York Inc.:131-159.
- Rotundo G., Tremblay E., 1993 - Electroantennographic responses of chestnut moths (Lepidoptera: Tortricidae) and their parasitoid *Ascogaster quadridentatus* Wesmael (Hymenoptera: Braconidae) to volatiles from chestnut (*Castanea sativa* Miller) leaves. *Redia* 76:361-373.
- Sanchez M. C., San-Jose M. C., Ballester A., Vieitez A. M., 1996 - Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. *Tree Physiology*, 16, 673-680.
- Schausberger P., Peneder S., Jürschirk S., Hoffmann D., 2012 – Mycorrhiza changes plant volatiles to attract spider mite enemies. *Functional Ecology*, 26: 441-449.
- Schneider D., 1957 - Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo- und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L.. *Z. Vergl Physiol.*, 40:8-41.
- Smith S. E., Read D. J., 1997 - Mycorrhizal symbiosis, 2nd ed. Academic, London, United Kingdom.
- Smith, S. E., Read D. J., 2008 - Mycorrhizal symbiosis, 3rd ed. Academic, London, United Kingdom.
- Splivallo R., 2007 - Truffles Volatiles and Exudates Investigation of their Role in Truffle/Plant Interactions. PhD Dissertation Thesis, University of Torino, Italy.

- Splivallo R., Bossi S., Maffei M., Bonfante P., 2007a - Discrimination of truffle fruiting body versus mycelial aromas by stir bar sorptive extraction. *Phytochemistry*, 68: 2584–2598.
- Splivallo R., Novero M., Berteà C.M., Bossi S., Bonfante P., 2007b - Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 175(3):417–424.
- Splivallo R., Ottonello S., Mello A., Karłowsky P., 2011 – Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis. *New Phytologist*, 189: 688–699.
- Strullu, G., Grellier, B., Marciniak, D., Letouzé, 1986 - Micropropagation of chestnut and conditions of mycorrhizal synthesis *in vitro*. *New Phytol.* 102: 95-101.
- Taylor D. L., Bruns T. D., 1999 - Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Molecular Ecology*, 8:1837–1850.
- Tonkin, C. M., Malajczuk, N., McComb, J. A., 1989 - Ectomycorrhizal formation by micropropagated clones of *Eucalyptus marginata* inoculated with isolates of *Pisolithus tinctorius*. *New Phytol.* 111: 209-214.
- Trappe J. M., 1979 - The orders, families, and genera of hypogeous Ascomycotina (truffles and their relatives). *Mycotaxon*, 9:297–340.
- Tumlinson J. H., Pare P. W., Lewis W. J., 1999 - Plant production of volatile semiochemicals in response to insect-derived elicitors, pp. 95–109, in D. J. Chadwick and J. Goode (eds.). *Insect–Plant Interactions and Induced Plant Defence*. Novartis Foundation Symposium 223, Wiley, Chichester, United Kingdom.

- Turlings T. C. J., Tumlinson J. H., Lewis W. J., 1990 - Exploitation of herbivore-induced plant odours by hostseeking parasitic wasps. *Science*, 250: 1251/1253.
- Turlings T. C. J., Loughrin J. H., McCall, P. J. et al. 1995 - How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 92: 4169 /4174.
- Van Der Pers J.C.N., 1981 - Comparison of electroantennogram response spectra to plant volatiles in seven species of *Yponomeuta* and in the tortricid *Adoxophyes orana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 30:181-192.
- Visser J.H., 1986 - Host odour perception in phytophagous insects. *Ann. Rev. Entom.*, 31:121-144.
- Vitagliano S., Anfora G., Tasin M., Germinara G.S., Ioriatti C., Rotundo G., De Cristofaro A., 2005 - Electrophysiological and olfactory responses of *Lobesia botrana* (Den. et Schiff.) (Lepidoptera: Tortricidae) to odours of host plant. *IOBC wprs Bulletin*, Vol. 28 (7) 2005: 429-435.
- Voets L., Dupré de Boulois H., Renard L., Strullu D.G., Declerck S., 2005 - Development of an autotrophic culture system for the in vitro mycorrhization of potato plantlets. *FEMS Microbiol. Lett.*, 248:111–118.
- Voets L., de la Providencia I. E., Declerck S., 2006 - Glomeraceae and Gigasporaceae differ in their ability to form mycelium networks. *New Phytol.*, 172:185–188.
- Wamberg, C., Christensen S., Jakobsen, I., 2003 - Interaction between foliar-feeding insects, mycorrhizal fungi, and rhizosphere protozoa on pea plants. *Pedobiologia*, 47:281-287.
- Zeppa S., Gioacchini A. M., Guidi C., Guescini M., Pierleoni R., Zambonelli A., Stocchi V., 2004 - Determination of specific volatile organic compounds synthesised during *Tuber borchii* fruit body development by

solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry.
Rapid Communications in Mass Spectrometry, 18: 199–205.

7 Appendice

Allegato I: Elenco delle specie vegetali

<i>Forma biologica</i>	<i>Specie</i>	<i>2011</i>	<i>2012</i>	<i>Monocot</i>	<i>Dicot</i>	<i>Famiglia</i>
Vicino al tronco						
H scap	<i>Acinos arvensis</i> (Lam.) Dandy	+	1		x	Labiatae
H scap	<i>Agrimonia eupatoria</i> L.		1		x	Rosaceae
H bien	<i>Anthemis tinctoria</i> L.	+	+		x	Compositae
H scap	<i>Anthyllis vulneraria</i> L.		+		x	Fabaceae
H scap	<i>Arabis hirsuta</i> (L.) Scop.	+			x	Cruciferae
T scap	<i>Avena barbata</i> Potter	+		X		Graminaceae
T scap	<i>Avena sterilis</i> L.	1	+	x		Graminaceae
H caesp	<i>Brachypodium sylvaticum</i> (Hudson) Beauv.	2	2	x		Graminaceae
H caesp	<i>Brachypodium rupestre</i> (Host) R. et S.	1	1	x		Graminaceae
T scap	<i>Bromus sterilis</i> L.	1	+	x		Graminaceae
T scap	<i>Catapodium rigidum</i> (L.) Hubbard	+		x		Graminaceae
H caesp	<i>Dactylis glomerata</i> L.	+	+	x		Graminaceae
H bienn	<i>Daucus carota</i> L.	+	+		x	Apiaceae
H caesp	<i>Festuca circummediterranea</i> Patzke	3	3	x		Graminaceae
H caesp	<i>Festuca pratensis</i> Hudson	+	+	x		Graminaceae
T scap	<i>Lathyrus aphaca</i> L.	+	1		x	Fabaceae
T scap	<i>Medicago minima</i> (L.) Bartal var. minima	1	1		x	Fabaceae
H scap	<i>Picris hieracioides</i> L.	+	+		x	Compositae
H caesp	<i>Poa bulbosa</i> L.	+	+	x		Graminaceae
H caesp	<i>Poa trivialis</i> L.	+		x		Graminaceae
P caesp	<i>Quercus pubescens</i> Willd.	+	+		x	Fagaceae
	<i>Ranunculus bulbosus</i> L. ssp. aleae (Willk.)					
H scap	Rouy et Fouc.		+		x	Ranunculaceae
H scap	<i>Sanguisorba minor</i> Scop.	+	+		x	Rosaceae
Ch suffr	<i>Teucrium chamaedrys</i> L.		+		x	Labiatae
H bienn	<i>Tragopogon porrifolius</i> L.	+			x	Compositae
T scap	<i>Trifolium stellatum</i> L.		+		x	Fabaceae
H scap	<i>Trifolium pratense</i> L.		1		x	Fabaceae
H scap	<i>Vicia grandiflora</i> Scop.	+	+		x	Fabaceae
T scap	<i>Vicia sativa</i> L.	+	+		x	Fabaceae
Tot specie		23	24	11	18	

Bruciata

H scap	<i>Acinos arvensis</i> (Lam.) Dandy	+	+		x	Labiatae
H scap	<i>Agrimonia eupatoria</i> L.		+		x	Rosaceae
H bienn	<i>Anthemis tinctoria</i> L.	+			x	Compositae
H scap	<i>Anthyllis vulneraria</i> L.	+	+		x	Fabaceae
H bienn	<i>Arabis hirsuta</i> (L.) Scop.	+	+		x	Brassicaceae
T scap	<i>Avena sterilis</i> L.		+	x		Graminaceae
T scap	<i>Bromus sterilis</i> L.	+	+	x		Graminaceae
T scap	<i>Catapodium rigidum</i> (L.) Hubbard	1	+	x		Graminaceae
T scap	<i>Cerastium ligusticum</i> Viv.	+	1		x	Caryophyllaceae
T scap	<i>Lagurus ovatus</i> L.	+	+	x		Graminaceae
T scap	<i>Lathyrus aphaca</i> L.	+	1		x	Fabaceae
T scap	<i>Medicago minima</i> (L.) Bartal var. minima	+	+		x	Fabaceae
H scap	<i>Picris hieracioides</i> L.	+	+		x	Compositae
H caesp	<i>Poa bulbosa</i> L.	1		x		Graminaceae
P caesp	<i>Quercus pubescens</i> Willd.	+	+		x	Fagaceae
T rept	<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.		+		x	Caryophyllaceae
T scap	<i>Trifolium angustifolium</i> L.	+	+		x	Fabaceae
T scap	<i>Trifolium stellatum</i> L.	+	+		x	Fabaceae
H scap	<i>Vicia grandiflora</i> Scop.	+			x	Fabaceae
T scap	<i>Vicia sativa</i> L.		+		x	Fabaceae
Tot specie		16	17	5	15	

Prateria

H scap	<i>Acinos arvensis</i> (Lam.) Dandy	+	+		x	Labiatae
H scap	<i>Agrimonia eupatoria</i> L.	+	1		x	Rosaceae
H bien	<i>Anthemis tinctoria</i> L.	+	+		x	Compositae
T scap	<i>Avena barbata</i> Potter	+	+	x		Graminaceae
H caesp	<i>Brachypodium rupestre</i> (Host) R. et S.	3	3	x		Graminaceae
H caesp	<i>Brachypodium sylvaticum</i> (Hudson) Beauv.	1	1	x		Graminaceae
H caesp	<i>Bromus erectus</i> Hudson	1	1	x		Graminaceae
G rhiz	<i>Carex flacca</i> Schreber	1	1	x		Cyperaceae
H scap	<i>Carlina corymbosa</i> L.	+	+		x	Compositae
P lian	<i>Clematis vitalba</i> L.	+	+		x	Ranunculaceae
H caesp	<i>Dactylis glomerata</i> L.	1	1	x		Graminaceae
H bienn	<i>Daucus carota</i> L.	+	+		x	Apiaceae
H scap	<i>Dorycnium pentaphyllum</i> Scop.	1	1		x	Fabaceae
H scap	<i>Eryngium campestre</i> L.	+	+		x	Apiaceae
H caesp	<i>Festuca circummediterranea</i> Patzke	3	3	x		Graminaceae
H caesp	<i>Festuca pratensis</i> Hudson	+	+	x		Graminaceae
H scap	<i>Valium lucidum</i> All.	1	1		x	Rubiaceae
T scap	<i>Lathyrus aphaca</i> L.	1	+		x	Fabaceae
T scap	<i>Medicago minima</i> (L.) Bartal var. minima	+	+		x	Fabaceae
T scap	<i>Melilotus solcata</i> Desf.	1	1		x	Fabaceae
G bulb	<i>Orchis purpurea</i> Hudson	+	+	x		Orchidaceae
G bulb	<i>Ophrys bertolonii</i> Mor.	+	+	x		Orchidaceae
T scap	<i>Pallenis spinosa</i> (L.) Cass.	+	+		x	Compositae
H caesp	<i>Petrorhagia saxifraga</i> (L.) Link	+	1		x	Caryophyllaceae
H ros	<i>Plantago lanceolata</i> L.	1	1		x	Plantaginaceae
P caesp	<i>Prunus spinosa</i> L.	+	+		x	Rosaceae
H scap	<i>Sanguisorba minor</i> Scop.	+	+		x	Rosaceae
T scap	<i>Scorpiurus muricatus</i> L.	+			x	Fabaceae
Ch suffr	<i>Teucrium chamaedrys</i> L.	1	1		x	Labiatae
Ch rept	<i>Thymus oenipontanus</i> H. Braun		1		x	Labiatae
T scap	<i>Tragopogon porrifolius</i> L.	+	+		x	Compositae
T scap	<i>Trifolium angustifolium</i> L.	+	+		x	Fabaceae
T scap	<i>Trifolium campestre</i> Schreber	1	1		x	Fabaceae
H scap	<i>Trifolium pratense</i> L.	+	+		x	Fabaceae
H scap	<i>Vicia grandiflora</i> Scop.	+	+		x	Fabaceae
Tot specie		34	34	10	25	

8 Ringraziamenti

Ringrazio tutti coloro che hanno contribuito, a vario titolo e in diversi momenti, alla realizzazione di questo lavoro:

- *I tutors, prof. Antonio De Cristofaro e prof. Bruno Paura che mi hanno sempre appoggiato e sostenuto in questo progetto, supervisionando le attività di ricerca.*
- *La Dr.ssa Silvia Vitagliano per l'assistenza fornitami costantemente durante tutta la mia attività di ricerca, aiutandomi con professionalità e competenza.*
- *Il prof. Bruno Mezzetti e il suo gruppo di ricerca di Arboricoltura (Dip. SAPROV) dell'Università Politecnica delle Marche, per la gentile ospitalità presso i loro laboratori e la disponibilità ad "iniziarmi" alle tecniche di micropropagazione delle piante.*
- *Il prof. Stéphan Declerck e il suo gruppo di ricerca presso il Laboratoire de Mycologie du Earth and Life Institute dell'Université Catholique de Louvain-la-Neuve (Belgio), per avermi dato la possibilità di trascorrere un periodo di studio, ricerca e formazione personale di elevato profilo, professionale ed umano. Un ringraziamento particolare al Dr. Hervé Duprè de Boulois e al collaboratore tecnico Sig. François Ferraire per l'assistenza fornitami costantemente durante il mio soggiorno e per la conduzione delle misurazioni conclusive dopo la mia partenza.*
- *Il Dr. Gianfranco Anfora e il Dr. Marco Valerio Rossi Stacconi della Fondazione Edmund Mach di S. Michele all'Adige (TN), per loro gentile collaborazione nella caratterizzazione chimica degli estratti di Quercus pubescens e Tuber sp..*
- *Il prof. Nunzio Isidoro, la Dr.ssa Paola Riolo (Dip. SAPROV) dell'Università Politecnica delle Marche, e il Dr. Roberto Bruni per la collaborazione nella fornitura dei campioni entomologici.*
- *Il Dr. Salvatore Germinara, per la sua collaborazione nell'elaborazione statistica dei dati raccolti e per la disponibilità a discutere con competenza risultati e metodologie.*
- *Il prof. Giovanni Pacioni (Università degli Studi dell'Aquila), la prof.ssa Alessandra Arzone (Università degli Studi di Torino), la prof.ssa Sylvie Herrmann (Helmholtz-Center for Environmental Research, Halle – Germany) e la prof.ssa Ingrid Kottke (University of Tübingen, Germany), che sebbene a distanza, hanno arricchito la mia conoscenza su diversi argomenti della mia ricerca, supportandomi con l'invio di pubblicazioni e consigli tecnici, nel nome dell'amore disinteressato per la ricerca.*
- *Il sigg. Adelmo Castagna, tartufaio esperto e preciso cavatore, che pazientemente ha collaborato alla raccolta diretta degli insetti nel corso delle sue battute di ricerca di tartufi.*
- *I professori Giuseppe Rotundo, Giuseppe Lima, Elisabetta Brugiapaglia e Claudio Massimo Colombo (Dipartimento Agricoltura, Ambiente, Alimenti dell'Università degli Studi del Molise), per avermi dato la possibilità di accedere ai loro laboratori e di utilizzare le attrezzature necessarie per lo svolgimento della mia ricerca.*

- *Il dott. Giuseppe Palumbo, la Dr.ssa Lucia Maiuro, Michele Della Loggia, il Dr. Domenico Vitullo, Erika Di Iorio, Sandra Molinaro e Carmela Latella per la loro amicizia e collaborazione in vari momenti dell'attività di ricerca.*
- *La mia famiglia tutta, che ha sempre sostenuto le mie scelte, e mi ha appoggiato nei momenti di difficoltà.*