

## Studio di due raccolte atipiche di *Tuber borchii*

GIAN LUIGI RANA<sup>1</sup>, STEFANIA MIRELLA MANG<sup>1</sup>, IPPOLITO CAMELE<sup>1</sup>, ROCCO RACIOPPI<sup>2</sup>,  
MAURIZIO D'AURIA<sup>2</sup>, ANTONIO PAGANO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali, Università degli Studi della Basilicata, V.le Ateneo Lucano, 10 - I 85100 Potenza (PZ) - E-mail: gianluigi.rana@unibas.it

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze, stessa Università, stesso indirizzo

<sup>3</sup>Contrada Iscalunga, 56, I 85020 Filiano (PZ)

### RIASSUNTO

Si riportano i risultati di alcune analisi morfologiche, chimiche e molecolari effettuate su esemplari atipici di tartufi appartenenti al gruppo del “bianchetto” rinvenuti in Puglia nella primavera del 2014.

### ABSTRACT

Results of morphological, chemical and molecular analyses accomplished on atypical truffles belonging to the “bianchetto” truffle group, found in Apulia (southern Italy) in spring 2014, are reported.

**Key words:** atypical ascoma, COV, tartufo bianchetto, *Tuber borchii*, *T. foetidum*, molecular analysis.

### Introduzione

Da circa 15 anni, presso l'Università degli Studi della Basilicata (Facoltà di Agraria, attualmente Scuola di Scienze Agrarie, Forestali, Alimentari ed Ambientali - SAFE) si studiano i taxa di tartufo che crescono in natura nella regione e nella vicina Puglia. Le ricerche finora portate a termine hanno dimostrato che la Basilicata, pur non essendo dal punto di vista vegetazionale e pedoclimatico vocata alla produzione naturale del tartufo nero pregiato (*Tuber melanosporum* Vittad.), può essere considerata “terra di tartufi” (GRANETTI ET AL., 2005). Infatti, in essa sono presenti 27-29 taxa di *Tuber* e, complessivamente, circa 82-83 tra specie e varietà di funghi ipogei e semi-ipogei (RANA ET AL., 2011, 2013 e 2015). Questi numeri, se confrontati con quelli delle altre regioni italiane, pongono la Basilicata al primo posto per la biodiversità delle specie di *Tuber*, e nelle prime posizioni per il numero totale di tartufi e falsi tartufi. Il numero di specie e varietà di funghi ipogei rinvenuti in Puglia si attesta intorno a 55-60 unità (DIDONNA, 1997; RANA ET AL., 2013 e dati non ancora pubblicati). Le conoscenze a mano a mano acquisite nel settore consentono una sempre più facile e rapida identificazione dei funghi ipogei che pervengono al Laboratorio di Micologia della SAFE per un oggettivo riconoscimento.

Grande meraviglia ha pertanto suscitato “l'incontro” con alcuni esemplari di un tartufo attribuibile al gruppo del “bianchetto” che presentavano però un peridio più scuro rispetto alla norma e insolitamente spesso e fessurato, tanto da farlo

apparire crostoso (Fig. 1a). Per l'identificazione degli stessi sono state effettuate osservazioni microscopiche, analisi delle sostanze volatili e analisi molecolari, di cui si riferisce nell'articolo.

## Materiali e Metodi

Il ritrovamento dei tartufi oggetto dell'articolo è avvenuto nei primi di aprile 2014 in Puglia, in territorio di Spinazzola (BAT), in un'area rimboschita con *Pinus halepensis* Miller denominata bosco di Acquatetta; c. g.: 41° 00' 15" N 16° 09' 03" E, a un'altitudine di circa 350-400 m s.l.m. Scilla, la cagnetta che li ha fiutati è di razza Lagotto romagnolo e appartiene al quinto autore. Due degli ascomi raccolti nella suddetta zona, uno (A) con peridio scuro, spesso e fessurato, dimensioni di 7 × 4 cm (Fig. 1a) e un debolissimo odore di acetilene, l'altro (B) con rivestimento beige chiaro, del tutto simile a un "bianchetto" (*T. borchii* Vittad.) e misurante 2,5 × 4 cm (Fig. 1b), sono stati utilizzati per le osservazioni microscopiche, le analisi dei composti organici volatili (COV), e gli studi molecolari. Le prime sono state eseguite con uno stereomicroscopio e un microscopio ottico Axioscop (Karl Zeiss, Germania) muniti di fotocamera digitale mod. DS-U1 (Nikon, Giappone). Per le seconde, sono state utilizzate fettine di gleba prelevate da porzioni integre degli stessi tartufi ed è stata seguita la tecnica della microestrazione in fase solida seguita da gas-cromatografia e spettrometria di massa (solid phase micro-extraction coupled with gas-chromatography and mass-spectrometry, SPME-GC-MS) descritta in dettaglio da MAURIELLO ET AL. (2001). Gli studi molecolari hanno compreso l'estrazione del DNA totale dai singoli due campioni, utilizzando il DNeasy Plant Mini kit, secondo il protocollo fornito dalla ditta produttrice (Qiagen), l'amplificazione del DNA genomico, includente le regioni spaziatrici interne ITS1 e ITS2 e il gene dell'rDNA 5,8S, con la coppia di primer ITS4/ITS5 (WHITE ET AL., 1990), il successivo sequenziamento dell'amplicone e il confronto della sequenza ottenuta con quelle presenti in GenBank, utilizzando il programma BLAST (ALTSCHUL ET AL., 1997).

Come trattati idnologici di riferimento sono stati consultati quelli di MONTECCHI & SARASINI (2000), RIOUSSET ET AL. (2001) e GORI (2005). Gli exsiccata degli ascomi A e B sono stati depositati presso la Collezione Micologica dell'Herbarium Lucanum (HLUC) con le sigle M 101 e M 102.

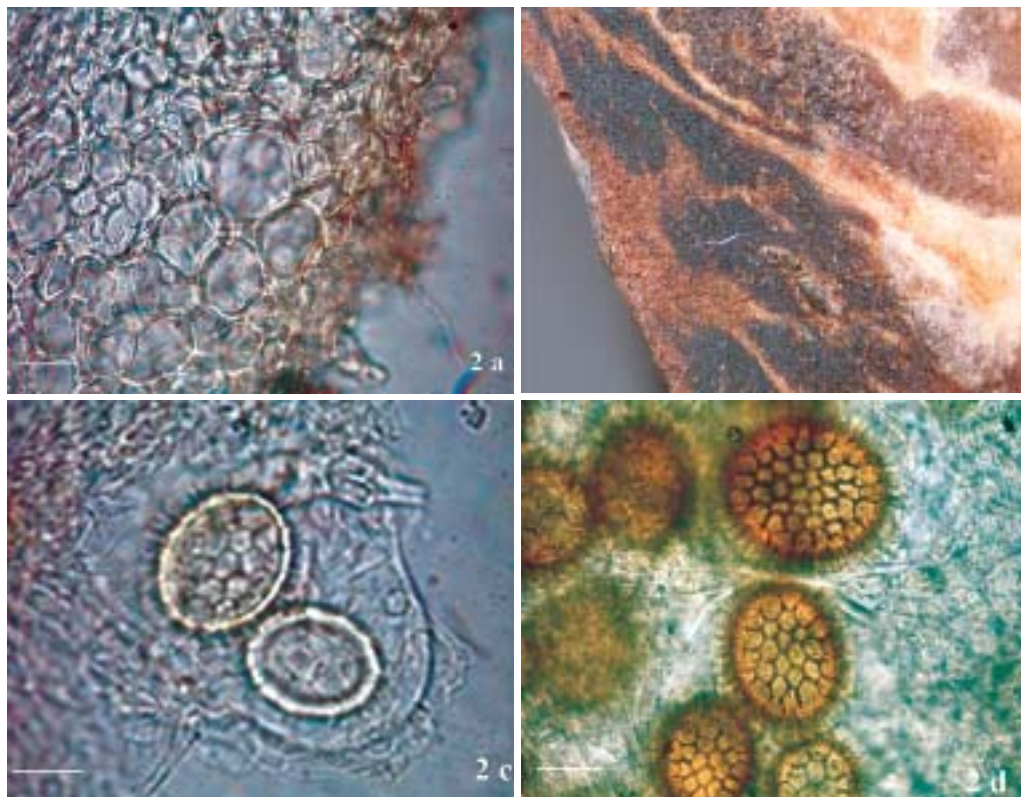
## Risultati

L'esame visivo e allo stereomicroscopio dell'esemplare di tartufo A ha evidenziato che le fessurazioni del peridio, in sezione longitudinale, avevano forma ad "u" o a "v", erano larghe alla sommità fino a 1,5-2 mm e profonde 2-3 mm. Le spaccature erano riempite da micelio fungino biancastro (Fig. 1c), segno evidente di un processo riparativo in corso. La gleba aveva colore nocciola e presentava numerose vene sterili biancastre che partivano dalla base dell'ascoma, disegnando verso l'alto una sorta di ventaglio. Un'estremità e una zona cava dello stesso tartufo presentavano colore più scuro, segno di un iniziale processo di degradazione (Fig. 1d). L'ascoma B, usato come controllo, aveva peridio più sottile, non fessurato e il colore tipico di un "bianchetto". La struttura del peridio, evidenziata con osservazioni microscopiche in A e B, è risultata di tipo



**Fig. 1a** - Uno degli ascomi anomali di tipo “bianchetto” trovati in agro di Spinazzola; **1b** - Aspetto esterno dell'esemplare di “bianchetto” tipico. Barre = 1 cm; **1c** - Particolare di una sezione del peridio dell'esemplare A mostrante il micelio bianco che tende a riempirne una delle spaccature del peridio. Barra = 1 mm; **1d** - Aspetto della gleba dell'ascoma A con le piccole parti avariate visibili in basso sia a sinistra sia al centro. Barra = 1 cm.

pseudoparenchimatico (Fig. 2a) e costituita da cellule a sezione poligonale o rotondeggiante con parete rosso-bruna negli strati più esterni. Nell'esemplare A, in particolare, queste ultime assisi cellulari erano più numerose e si presentavano a tratti necrotizzate e maggiormente incrostate di pigmenti bruno-rossastri in periferia (Fig. 2b). Dalla superficie peridiale di B emergevano corti peli ad apice più o meno arrotondato. Gli aschi, per lo più trisporici (meno spesso tetrasporici), avevano forma subsferica od ovale, dimensioni di  $58-100 \times 50-72 \mu\text{m}$  ed erano provvisti a volte di un corto pedicello. Le spore degli aschi trisporici, a seconda dello stadio di maturazione, avevano colore giallino o marrone chiaro, forma prevalentemente ellissoidale ma anche ovoidale e o sferica e dimensioni per lo più coincidenti con quelle riportate da MONTECCHI & SARASINI (2000) per *T. borchii*. L'esemplare atipico A è risultato senza dubbio poco maturo a giudicare dal numero di aschi vuoti o con ascospore incolori osservati in frammenti della gleba (Fig. 2c). L'ornamentazione delle spore mature era reticolato-alveolata, con maglie pentagonali, generalmente in numero di 4-6 (fino a 8-9) lungo l'asse maggiore (Fig. 2d). Non sono state notate differenze di rilievo nelle dimensioni sporiali tra i due ascomi presi in considerazione.



**Fig. 2.** **a** - Struttura pseudoparenchimatica del peridio dell'ascoma B. Barra = 10  $\mu$ m; **b** - Particolare di una sezione del peridio dell'esemplare A che ne mostra lo spessore anormale e le ampie aree necrotiche inframmezzate agli strati costituiti da ife ancora vive. Barra = 1 mm; **c** - Uno degli aschi con spore immature osservato in un frammento di gleba dell'ascoma A. Barra = 10  $\mu$ m; **d** - Ascospore tipiche del *T. borchii* trovate sia in A che in B. Barra = 10  $\mu$ m.

Le analisi SPME-GC-MS hanno evidenziato, sia in A che in B, la presenza del solo isoprene [nome IUPAC: 2-methyl-1,3-butadiene; formula chimica:  $C_5H_8$  ( $CH_2=C(CH_3)CH=CH_2$ ); massa molecolare: 68,1], molecola molto volatile, che figurava, tra l'altro, come unico componente, tra i COV di due degli esemplari di *T. borchii* analizzati in Basilicata in passato (MAURIELLO ET AL., 2001).

Le prove di amplificazione mediante PCR del rDNA, con la coppia di primer ITS4/ITS5, hanno permesso di ottenere dai due ascomi oggetto di studio, ampliconi di circa 570 paia di basi. Le sequenze nucleotidiche degli ampliconi ottenuti da A e B hanno mostrato una similitudine compresa tra il 96% e il 98% con due di quelle presenti in GenBank per *T. borchii* con i codici identificativi FJ554516 ed AM900420.

### Discussione

Sulla base dei risultati sopra esposti è possibile affermare con ragionevole certezza che i "bianchetti" atipici rinvenuti in agro di Spinazzola appartengono a *T. borchii*. La determinazione è sostenuta dalle seguenti principali considerazioni: a) la morfologia e le dimensioni sporiali riscontrate negli aschi trisporici dei



due ascomi studiati sono risultate coincidenti e collimanti con quelle riportate nella bibliografia specifica per la suddetta specie di *Tuber*; b) le analisi molecolari e, in particolare, il confronto delle sequenze nucleotidiche ottenute per gli ampliconi di A e B con quelle presenti in GenBank per *T. borchii* hanno oggettivamente confermato l'iniziale riconoscimento; c) il debole odore sgradevole emanato dall'ascoma A, che inizialmente aveva portato a pensare, in accordo con quanto riportato da MONTECCHI & SARASINI (2000), che potesse trattarsi di *T. foetidum* Vittad., in realtà era solo un segno d'iniziale deterioramento di una piccola parte del campione analizzato via SPME-GC-MS. Questa affermazione è sostenuta dai risultati di queste ultime analisi che hanno dimostrato che l'unico COV rilasciato dalle fettine di gleba sana di A e di B è stato l'isoprene, trovato, in passato, solo in due degli ascomi lucani di *T. borchii* (MAURIELLO ET AL., 2001), probabilmente poco maturi. Gli stessi autori e D'AURIA ET AL. (2012) avevano, infatti, evidenziato un aroma composto da parecchi altri COV in ascomi maturi della stessa specie di *Tuber*. I due campioni di *T. borchii* presi in considerazione in questo studio, come in precedenza sottolineato, presentavano, in effetti, alcuni aschi vuoti, che ne dimostravano la maturazione non completa. Per spiegare lo strano aspetto del rivestimento degli ascomi di *T. borchii* di tipo A raccolti in agro di Spinazzola, può essere considerato il particolare andamento climatico registrato dalla fine dell'inverno del 2013 fino alla metà della primavera del 2014 in Puglia e Basilicata. Si è trattato, infatti, di un periodo inizialmente piovoso e freddo seguito da una fase siccitosa abbastanza lunga, contraddistinta da temperature superiori alle medie normali e da un aprile molto piovoso e, in alcuni giorni, fresco. Ciò potrebbe avere determinato, come spesso succede anche in comuni basidiomiceti epigei [p. es., *Pleurotus eryngii* (DC. : Fr.) Qué., *Boletus aestivalis* (Paulet) Fr. (= *B. reticulatus* Schaeff.)], sia l'arresto di crescita degli sporofori nel periodo siccitoso e caldo e la ripresa del loro accrescimento con l'arrivo delle piogge dell'aprile 2014, sia i conseguenti fenomeni di necrosi e fessurazione degli strati protettivi degli ascomi, che sono anche diventati più spessi e scuri. D'altro canto, come accennato in precedenza, l'abbondante micelio bianco prodotto dagli strani *T. borchii* nelle spaccature peridiali rafforza la suddetta ipotesi ed è sicuro indice di un processo cicatriziale che avrebbe consentito un ulteriore accrescimento degli stessi tartufi, considerato pure che il loro stato di maturazione era incompleto e il terreno in cui sono stati trovati era particolarmente umido.

## Ringraziamenti

*Gli autori esprimono vivi ringraziamenti al Sig. Michele Palumbo della S.A.F.E. per la preziosa assistenza tecnica.*

## BIBLIOGRAFIA

- ALTSCHUL S.F., T.L. MADDEN, A.A. SCHÄFFER, Z. ZHANG, W. MILLER & D.J. LIPMAN - 1997: *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acid Research 25: 3389-3402.
- D'AURIA M., G.L. RANA, R. RACIOPPI & A. LAURITA - 2012: *Studies on volatile organic compounds of Tuber borchii and T. asa-foetida*. Journal of Chromatographic Science 50 (9): 775-778.
- DIDONNA F. - 1997: *Studi sul tartufo in Puglia*. Tesi di laurea, Università di Bari, Facoltà di Agraria; relatore: prof. D. SISTO; a.a. 1996-1997.

- GORI L. - 2005: *Funghi ipogei della Lucchesia, di altre province italiane e dall'estero*. M. Pacini Fazzi. Lucca.
- GRANETTI B., A. DE ANGELIS & G. MATEROZZI - 2005: *Umbria terra di tartufi*. Realizzazione: Gruppo Micologico Ternano. Regione Umbria, Assess. Agric., Foreste, Caccia e Pesca. Terni.
- MAURIELLO G., R. MARINO, M. D'AURIA, G. CERONE & G.L. RANA - 2001: *Determinazione dei componenti volatili dei tartufi lucani*. Micologia Italiana 30 (3): 11-29.
- MONTECCHI A. & M. SARASINI - 2000: *Funghi ipogei d'Europa*. A.M.B., Fondazione Centro Studi Micologici. Trento.
- RANA G.L., S.M. MANG & I. CAMELE - 2015. *Biodiversity of Hypogeous fungi in Basilicata*. Cap. 8: 305-317, in "The sustainability of Agro-Food and Natural Resource Systems in the Mediterranean Basin" Ed. A. Vastola. DOI 10.1007/978-319-16357-4\_20.
- RANA G.L., S.F. SIGNORE, A. BAGLIVO, R. BOCHICCHIO, I. CAMELE, T. ZOTTA & S.M. MANG - 2011: *Aggiornamento delle conoscenze sui funghi ipogei lucani e pugliesi*. Micologia e Vegetazione Mediterranea 26 (2): 151-168.
- RANA G.L., A. BAGLIVO, S.F. SIGNORE, R. BOCHICCHIO, I. CAMELE & S.M. MANG - 2013: *Studi recenti sui funghi ipogei lucani e pugliesi*. Atti IX Conv. Naz. Biodiversità, CIHEAM-IAMB, Valenzano (Bari), 5-7 sett. 2012, Vol. 1: 411-417.
- RIOUSSET L., G. CHEVALIER & M. BARDET - 2001: *Truffes d'Europe et de Chine*. INRA. Parigi.
- WHITE T.J., T. BRUNS, S. LEE & J.W. TAYLOR - 1990: *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: INNIS M.A., D.H. GELFAND, J.J. SNINSKY & T.J. WHITE (coord.) "PCR Protocols: a guide to methods and applications". Academic Press. San Diego: 315-322.

Associazione Micologica Bresadola "Comitato dott. Antonio Cicognani"

## 15° PREMIO DI STUDIO "A. CICOGNANI"

Riservato agli Autori che pubblicano su  
Rivista di Micologia e Pagine di Micologia

L'intero Bando di Concorso è pubblicato su RdM 3, 2014, pagine 268-269  
ed è consultabile on-line all'indirizzo

[www.ambbresadola.org](http://www.ambbresadola.org)