



**manuale
tecnico
pratico per
il
vivaista di
piante
tartufigole**

**GRUPPO OPERATIVO I.S.A.T
Giovanni Pacioni
Università degli Studi dell'Aquila**

Questo manuale, ideato e redatto dal Prof. Giovanni Pacioni nell'ambito del Progetto I.S.A.T. – Innovazione per lo Sviluppo dell'Attività tartufigena in Sicilia, nasce come strumento tecnico e operativo dedicato ai vivaisti che intendono specializzarsi nella produzione di piante tartufigene.

Attraverso un linguaggio chiaro e rigoroso, il testo fornisce indicazioni fondamentali sulla micorrizzazione controllata, sulla gestione vivaistica e sui protocolli di controllo qualità, con particolare attenzione alle condizioni agronomiche e climatiche della Sicilia.

Il suo valore risiede nella capacità di coniugare ricerca scientifica e applicazione pratica, contribuendo così alla crescita di una filiera tartufigena siciliana sostenibile, innovativa e ad alto valore ambientale.

Con gratitudine per il contributo del Prof. Pacioni e con l'auspicio che questo manuale possa essere un riferimento utile per chi lavora nella filiera del tartufo.

Il manuale è il risultato dell'esperienza fatta dall'intero Gruppo Operativo e finanziato della misura 16.1 del PSR Sicilia 2014-2022.

Il Capogruppo del GO I.S.A.T.

Orlando Daniele Carmelo

Innovation Broker del Progetto I.S.A.T.

Predielis Pericle

MANUALE PER IL PRODUTTORE DI PIANTE MICORRIZATE CON TARTUFI

Introduzione

Questo manuale è indirizzato ai vivaisti della Regione Sicilia che intendessero avviare una attività di produzione di piante micorrizate con funghi eduli, primi fra tutti i tartufi.

Iniziamo fornendo una indicazione per le soluzioni di varechina (ipoclorito di sodio) che il vivaista si troverà ad usare per sterilizzare le attrezzature.

Diluizioni di varechina di buona qualità che è in genere titolata al 5% circa di ipoclorito di sodio

5%	Varechina tal quale	Varechina tal quale
circa 3%	Acqua distillata 2 parti	Varechina 3 parti
circa 2%	Acqua distillata 3 parti	Varechina 2 parti
circa 1%	Acqua distillata 4 parti	Varechina 1 parte

PROTOTIPO DI SERRA PER PIANTE MICORRIZATE

Le serre per la produzione di piante micorrizate (semenzali, talee radicate e piante micro-propagate), con tartufi o altri funghi micorrizici hanno il compito principale di evitare la caduta atmosferica delle spore di funghi micorrizici indesiderati che inquinerebbero sia la produzione dei semenzali sterili sia i vasi contenenti le piantine inoculate.

Oltre che nell'atmosfera tali spore si trovano abbondanti anche nel suolo. Quindi le serre devono assicurare una copertura totale della volta e delle pareti laterali incluse quelle anteriore e posteriore sia con telo sia con lastre di materiale plastico.

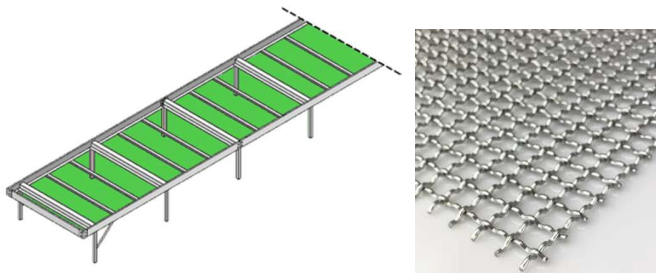
La aerazione può essere assicurata da pannelli avvolgibili laterali che però devono essere posti **sopra aperture protette fino a terra da reti, tipo zanzariere**, per evitare l'ingresso di animali (insetti, lumache, uccelli, lucertole, roditori etc.) che potrebbero danneggiare o inquinare semenzali o piante inoculate.



La serra di qualsiasi tipo e di copertura deve essere dotata di un sistema di areazione coperto da un telo apribile tramite arrotolamento come quello illustrato nell'immagine (freccia rossa) che però non deve essere completamente aperto ma protetto all'interno da una rete tipo zanzariera per evitare l'intrusione di piccoli animali compresi insetti.

Il fondo delle serre deve essere **completamente pavimentato** e lavabile anche con soluzioni disinfettanti, nel caso si usi la varechina il pavimento va poi risciacquato con acqua. Non devono essere ammessi pavimenti con mattonelle o piastrelle poggiate sul suolo nudo con fughe libere o teli di materiale plastico polimerico.

Tutti i bancali, supporti utilizzati nelle serre per sostenere i vasi la produzione di sementali e piante micorrizzate, devono essere distanziati dal suolo. Si consigliano bancali metallici con fondo di rete metallica di adeguato spessore che vanno lavati con soluzione di varechina almeno al 2%, e risciacquati ogni anno alla fine del ciclo di produzione. Il fondo dei bancali non deve essere continuo, tipo vasconi, perché in caso di inquinamento di uno solo dei vasi l'inquinamento si trasmette a tutti i vasi vicini interessando alla fine l'intero bancale. Il fondo a rete metallica evita questo rischio e impedisce la fuoriuscita delle radici dal fondo del vaso.



Un modello di bancale a sinistra, mentre le altre due immagini si riferiscono al tipo di rete di acciaio da porre come piano d'appoggio. Solitamente si preferisce la rete ondulata perché più resistente al peso dei vasi.

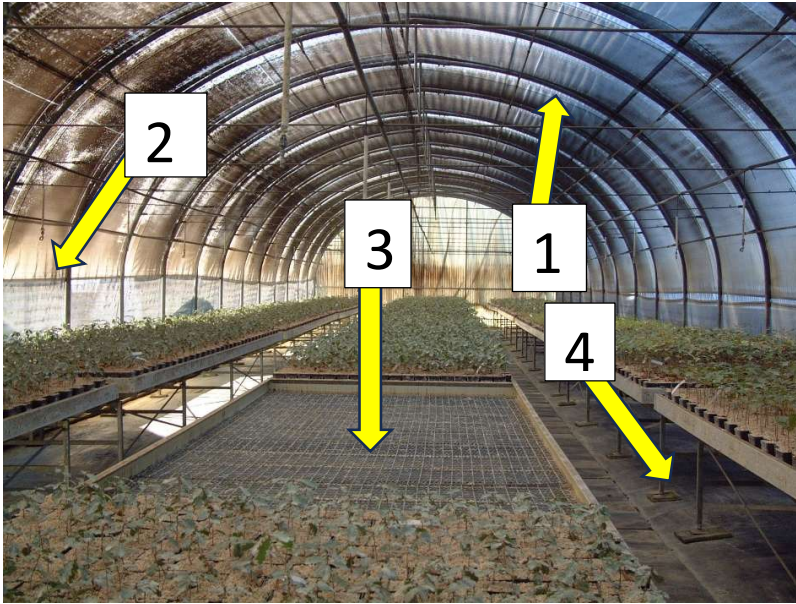
I bancali devono essere distanziati almeno 30 cm dal pavimento.

NON USARE MAI ACQUA DI SUPERFICIE PER IRRIGARE SEMENZALI O VASI CON PIANTE INOCULATE E MICORRIZATE PERCHÉ PORTATRICE DI SPORE DI FUNGHI MICORRIZICI.

L'accesso alle serre adibite alla produzione di semenzali sterili e piante micorrizzate deve avvenire o con soprascarpe monouso da mantenere sempre all'interno della serra o sterilizzando la suola delle scarpe passando su stracci da pavimento imbevuti con varechina assoluta contenuti in una bacinella, la bacinella deve essere tenuta all'interno della serra oppure in un apposito spazio con doppia parete realizzato tra la porta esterna ed una porta interna, una specie di anticamera.



La serra di produzione non andrebbe usata anche per la lavorazione del substrato (terreno) di riempimento dei vasi (sterilizzazione e preparazione dei vasi), vedi voce successiva "Laboratorio per inoculo".



Caratteristiche di una serra per piante micorrizate:

- 1 copertura della volta;*
- 2 areazione laterale protetta con zanzariere;*
- 3 bancali metallici sterilizzabili;*
- 4 pavimentazione sanificabile.*

PIANTE OSPITI

Il micelio dei tartufi può entrare in rapporto simbiotico con gli apparati radicali (micorriza o endofitismo) di tantissime piante erbacee, arbustive ed arboree, ma solo con alcune di esse può produrre i corpi fruttiferi detti "tartufi". Sono le cosiddette piante ospiti "ectomicorriziche" le piante che formano una particolare tipo di micorriza che porta alla trasformazione delle radici laterali che assumono una forma clavata.

Possono essere usate per la vivaistica e la conseguente tartuficoltura sia latifoglie (querce, noccioli, carpini, tigli, pecan, salici, pioppi, cisti) che aghifoglie (pini, abeti, cedri, douglas, etc.) un elenco delle piante ectomicorriziche più frequentemente usate in Italia e le specie di tartufo più idonee è riportato in Tabella 1.

Tabella 1- Abbinamenti piante ospiti-tartufo

Querce termofile (roverella, leccio, coccifera)	Tuber aestivum, T.melanosporum,
Querce mesofile (farnia, rovere, cerro)	Tuber magnatum, T. borchii, T.macrosporum, T.aestivum
Nocciolo	Tuber melanosporum, T.aestivum, T.borchii
Carpino nero	Tuber melanosporum, T. aestivum
Carpino bianco e orientale	Tuber aestivum, T. borchii, T. magnatum
Tiglio	Tuber aestivum, T.magnatum
Cisto	Tuber aestivum, T.melanosporum
Pecan	Tuber aestivum
Pioppi	Tuber magnatum, T.borchii
Pini	Tuber borchii, T.aestivum

La scelta delle piante da utilizzare è legata alla specie di tartufo che si intende inoculare e alle caratteristiche dell'ambiente dove creare la tartufaia. Tutte le querce autoctone e provenienti da altri continenti come la quercia rossa (*Quercus rubra*) producono ectomicorrize con i tartufi, ma se volessi coltivare il tartufo nero pregiato (*Tuber melanosporum*) che è una specie che si sviluppa su terreni sciolti, drenati e ben assalati non utilizzerei la quercia rossa, o la nostra farnia, due specie di querce che crescono su terreni profondi, freschi e che mantengono l'umidità. In questo caso vanno usate piante come la roverella (*Quercus pubescens*), il carpino nero (*Ostrya carpinifolia*) od anche il nocciolo (*Corylus avellana*) più confacenti alle esigenze ecologiche del tartufo nero pregiato.

PRODUZIONE DELLE PIANTE OSPITI STERILI

Possono essere usati semi, frutti e talee, ma negli ultimi tempi alcuni vivai propongono anche piante micro propagate in vitro. In ogni caso tutte le piante ospiti che dovranno essere inoculate per diventare piante tartufigene devono essere sterili.

Semi e frutti secchi tipo ghiande e nocciole vengono sterilizzati immergendoli per 10'-20' in una soluzione all'1 o 2% di ipoclorito di sodio, la comune varechina e poi abbondantemente sciacquati in acqua di rubinetto corrente. Le varechine di buona qualità hanno un contenuto di ipoclorito al 5%, per cui la soluzione sterilizzante può essere ottenuta usando 1 parte di varechina e diluendola con 4 parti di acqua distillata o deionizzata per avere una soluzione all'1%. I tempi di immersione e le concentrazioni di ipoclorito (1 o 2%) dipendono dal tipo di seme (es. pino, cisto) o frutto (ghianda o nocciola). I tempi

di permanenza nella soluzione di ipoclorito di sodio sono inversamente proporzionali alla concentrazione dell'ipoclorito. Usando ipoclorito al 5% i tempi si riducono a 1' circa ma il risciacquo è più lungo fino alla eliminazione totale dell'agente sterilizzante.

Con la sterilizzazione si eliminano i microrganismi esterni i semi o frutti ammuffiti non possono essere sterilizzati e vanno eliminati.

Le talee si sterilizzano spruzzando alcool denaturato sulla corteccia. Le piante micro propagate dovrebbero essere già sterili all'origine.

Possono essere usati altri agenti sterilizzanti più difficili da reperire e da usare per cui è sempre meglio utilizzare la varechina.

Le piante vanno scelte in base alle condizioni pedo-climatiche ed alla specie di Tuber che si vuole coltivare.

La produzione di piante micorrizzate con tartufo passano attraverso vari passaggi, il primo dei quali è rappresentato all'ottenimento delle piante ospiti sterili. Limitatamente alla produzione partendo da semi, considerando per comodità "semi" anche ghiande e nocchie che sono in realtà frutti, dopo le operazioni di sterilizzazione degli stessi, essi vanno messi a germinare per ottenere giovani piante dette "semenzali" prive di qualsiasi forma di micorrize: piante ospiti "sterile" o meglio "axeniche", perché prive di microrganismi estranei indesiderati.

1) Vanno usati contenitori nuovi di polistirolo senza fori, come le cassette utilizzate per il pescato, in genere 30x43 cm profonde circa 20 cm. Nel caso non fosse possibile trovarle perché vengo sostituite sempre più da quelle forate, si possono usare lo stesso avendo l'accortezza di chiudere prima i fori con schiuma poliuretana. Se nuove confezionate la sterilità nei confronti di funghi micorrizici è garantita dal processo di produzione altrimenti sarà sufficiente spruzzarle con varechina, lasciare agire con una decina di minuti e poi sciacquare abbondantemente con acqua corrente.

Cassette



Cassetta per il pescato senza fori



Cassetta per il pescato con fori

2) Riempire le cassette con Perlite espansa, nuova confezionata e sigillata in sacchi di plastica, il cui processo di produzione ad altissima temperatura ne garantisce la sterilità. Nelle cassette va messo uno strato di almeno 12-15 cm di agriperlite.





Agriperlite o perlite espansa

- 3) Mettere i semi precedentemente sterilizzati “a spaglio” e coprirli di agriperlite.
- 4) Porre le cassette su ripiani distanti almeno 30 cm dal pavimento. In mancanza di appositi bancali metallici possono essere usate cassette di plastica per la frutta pulite e sterilizzate spruzzandole con una soluzione di varechina.
- 5) Innaffiare manualmente o con un sistema automatizzato. **Non usare mai acqua di superficie perché inquinata da spore di microrganismi compresi funghi micorrizici a dispersione aerea**.che possono essere ricaduti sullo specchio od il corso d’acqua. **N.B.** Al comparire sulla superficie delle cassette di macchie brune o giallognole trattare subito con una soluzione di anticrittogamico tipo Folpan o Rizolex, non usare assolutamente anticrittogamici cuprici a base rame come poltiglia bordolese i cui residui che potrebbero pregiudicare i risultati del successivo inoculo con tartufi.



Piante a doppia produzione nocciolo, castagno, corbezzolo, pecan.

Periodicamente vengono proposte piante micorrizzate per la tartuficoltura sotto la voce di “piante a doppia produzione” cioè piante le quali oltre a produrre tartufi producono frutti commerciali.

A parte il nocciolo che viene ampiamente usato in tartuficoltura, tutte le altre piante rivestono un interesse hobbistico, come curiosità a livello di giardinaggio o orticoltura. Il castagno è molto recettivo all’infezione da parte del micelio di Tuber però il suolo calcareo che è idoneo ad una buona produzione di tartufi non è altrettanto idoneo alla produzione di castagne. Il castagno infatti predilige suoli tendenti al leggermente acido (pH 5.5-6.5) e non tollera i suoli calcarei. Lo stesso il corbezzolo che produce sì micorrizza con alcuni tartufi ma non è mai stato usato in maniera controllata in tartuficoltura. Produce ottimi frutti ed è una pianta mellifera. Il pecan, pregiata noce americana, è stata impiegata in tartuficoltura nel sud degli U.S.A. però come per il nocciolo è difficile trovare un compromesso tra la produzione di noci e quella dei tartufi. Particolarmente per i regimi di irrigazione e le concimazioni. I tartufi neri hanno necessità di irrigazioni di “soccorso” in determinati periodi dell’anno per indurre la formazione degli embrioni e poi guidare lo sviluppo dei corpi fruttiferi (tartufi) fino alla maturazione. Processo che richiede diversi mesi (6-7), con irrigazioni i cui tempi non sempre coincidono con quelli richiesti dalle piante di nocciolo per produrre in maniera ottimale le nocciole. Poi la produzione di nocciole richiede fertilizzazioni, estremamente negative per la produzione tartuficola. **Quindi bisogna fare una scelta o si producono bene i tartufi o si producono bene le noci.** Se si punta alla produzione di tartufi con piante produttrici di frutta a guscio bisogna accontentarsi di uno scarso raccolto di noci o nocciole.

Anche a livello vivaistico vanno evitate le proposte di vendita di piante a doppia produzione senza spiegare bene a cosa si va incontro evitando false illusioni.

LABORATORIO PER INOCULO

Premesso che con le dovute cautele ed esperienza la serra potrebbe utilizzata anche per le operazioni di inoculo, sarebbe opportuno affiancare alla/e serra/e un locale o uno spazio adibito esclusivamente alle operazioni legate all’inoculo dei semenzali o altro materiale vegetale (talee o piante micropropagate) sterile.

Sterilizzazione del substrato

Se si usa suolo agricolo per il riempimento dei vasi per i semenzali inoculati, questo va sterilizzato a caldo con vapore acqueo meglio se vapore sotto pressione. **Non utilizzare assolutamente fumiganti o bromuro di etile che agirebbero anche sullo sviluppo delle micorrize.**

Esistono appositi sistemi di sterilizzazione a vapore per vivai ma possono essere utilizzati anche altri sistemi realizzati artigianalmente in proprio.

Si tenga presente che i suoli naturali possono creare dei problemi durante la sterilizzazione con vapore acqueo in relazione al contenuto e tipo di argilla. Il suolo sterilizzato prima di essere invasato va lasciato raffreddare ed asciugare, meglio se mosso con uno scavino o altro attrezzo pulito e sterilizzato di volta in volta.

Se si usano substrati semisintetici confezionati in buste sigillate il rischio di inquinamento con funghi ectomicorrizici è minimo anche se vanno poi adottate le giuste precauzioni nelle fasi di svasamento e messa a dimora. I substrati sintetici sono molto incoerenti, facilmente disgregabili per cui andrebbero prima bagnati e compattati a pressione prima di essere svasati oppure essere bagnati prima dell'invasamento con una soluzione di carbossimetilcellulosa o altro addensante-gelificante per legare tra di loro le particelle che compongono il substrato.

Una ottima formulazione di substrato semisintetico è la seguente:

3 parti di vermiculite meglio quella grande di tipo edile;

1 parte di torba;

1 parte di brecciolino calcareo o sabbia calcarea di cava.

Il pH dovrebbe essere di circa 7 però tutto dipende dal tipo di torba che si usa. La torba è un deposito composto da resti vegetali sprofondati e impregnati d'acqua che, a causa dell'acidità dell'ambiente e da sostanze batteriostatiche, non riescono a decomporsi interamente. In genere è formata da accumulo di muschi acquatici detti Sfagni e nel formulato rappresenta la sostanza organica. Le tre componenti hanno una pressoché nulla probabilità di avere la presenza di spore di funghi ectomicorrizici. Nel caso il pH risultasse in base alla torba usata sotto 7 il pH può essere aggiustato con idrossido di calcio (calce spenta) facilmente reperibile sul mercato. Procedere per tentativi aggiungendo al substrato un certo quantitativo di idrossido di calcio, mescolando accuratamente e controllando il pH. Il pH può essere verificato con pH ne esistono alcuni elettronici molto economici o con cartine al tornasole reperibili nei consorzi agrari o negozi di materiale per l'agricoltura.

Dopo aver ben mescolato con una sessola le componenti del substrato ed eventualmente averlo bagnato con una soluzione all'1% di CMC lo si mette nei vasi nuovi o sterilizzati per almeno 30' in una soluzione al 3% di varechina e poi sciacquati in acqua corrente.

VASI

Di solito si usano vasi tronco-piramidali da 8 cm dotati di scanalature antispiralizzazione delle radici, tipo quelli illustrati.



Cautele da adottare

Tutti gli strumenti, contenitori, vasi, tavoli utilizzati devono essere o nuovi e/o preventivamente sterilizzati immergendoli o spruzzandoli con varechina al 3% attendendo almeno 15'-30' e risciacquati con acqua corrente potabile.

Anche il pavimento del locale va pulito con soluzione di un agente antisettico (Sali di tetrammonio, varechina, lisoform...) e sciacquato, meglio se con idropulitrice. Se si usa varechina l'ambiente va poi ben areato per allontanare i vapori di ipoclorito.

Attrezzatura

- tavolo con piano lavabile e non corrodibile (acciaio, granito, gres, laminato...)
- bagnarola da almeno 30L
- sessola per mescolare il substrato e per invasare



- caraffa graduata da almeno 1 L
- misuratore di pH

- Carbossimetilcellulosa in polvere
- frigorifero con surgelatore
- frullatore ad immersione tipo minipimer o tritatutto o frullatore
- cartellini
- varechina di qualità
- raccomandato Microscopio stereo ed ottico





Frullatore ad immersione, microscopio stereo, microscopio ottico

Irrigazione

Sia le cassette dei semenzali sia i vasi contenenti le piante inoculate devono essere regolarmente innaffiate. Si possono utilizzare metodi manuali o automatizzati, in ogni caso è utile sempre avere dei sistemi di monitoraggio dell'umidità connessi con l'interno di più vasi e della temperatura all'interno della serra.

Tecnica di inoculo

Esistono vari sistemi per raggiungere lo scopo di mettere in contatto gli apparati radicali dei semenzali "sterile" con le spore dei tartufi. In ogni caso, le spore dei tartufi devono omogeneizzate per essere liberate dalle ife della gleba. Anche l'omogenizzatore (frullatore, tritatutto ma non mortaio e pestello perché frantumerebbe anche le spore) deve essere preventivamente sterilizzato con varechina 3% e poi abbondantemente sciacquato con acqua corrente potabile.

In genere si calcola da 1 a 3 gr. di tartufo ben maturo e pulito con le tecniche tradizionali, adottando invece una tecnica brevettata per ogni grammo di tartufo si può prevedere l'inoculo di 3 piante.

Avendo già tutto l'occorrente (piante ospiti sterili, substrato sterilizzato o semisintetico, tartufi da inoculo) si procede alla omogenizzazione del quantitativo di tartufo necessario in acqua deionizzata o distillata o in una soluzione. Le tecniche più usate prevedono o il mescolamento di 1-3gr di omogenizzato di tartufo con il suolo da invasare o all'invasamento del suolo l'apertura di un foro centrale con un piantatore sterilizzato, l'inserimento della pianta ospite nel foro insieme alla sospensione sporale a contatto con le radici, chiudendo poi il foro. Un sistema molto più efficiente è quello di frullare i tartufi

in una soluzione di CMC, carbossimetilcellulosa una colla edibile (1-2% a seconda del tipo di CMC bassa-media o alta densità), immergervi gli apparati radicali che vengono coperti da una mucillagine piena di spore, e piantarli nel vaso. La CMC si può reperire in negozi specializzati per gelaterie e pasticcerie od in internet.

La CMC **deve essere pura** senza zuccheri ed aromi o altre sostanze.



Solitamente l'operazione di inoculo si effettua alla fine della primavera quando le piantine da semenzale hanno emesso almeno 3-5 foglie se latifoglie, o se siano comparsi gli aghi definitivi che sostituiscono quelli cotiledonari. Gli aghi cotiledonari del pino e altre conifere sono le prime foglie che compaiono nel germoglio di un seme di pino, e sono una caratteristica distintiva della fase iniziale di sviluppo della pianta. Diversamente dalle foglie mature, che sono riunite in fascicoli di 2, 3 o 5, gli aghi cotiledonari sono solitamente disposti in una disposizione spiralata attorno al germoglio.



Semenzali di Pino con foglie cotiledonari



Semenzali Pino con aghi maturi

I vasi messi in cassette pulite e sterilizzate vanno messe sui bancali o su cassette rigirate che tengano il fondo delle prime cassette, quelle che contengono i vasi, distanti dal pavimento. In questa maniera le radici che potrebbero fuoriuscire dal fondo si seccano e non ha il rischio di contaminazione con altri funghi. Mai utilizzare banconi a fondo continuo o tappetini idratanti ad es. di fibra di cocco.

Dopo 3 mesi circa le piante inoculate dovrebbero essere micorrizzate e poter essere sottoposte ad un eventuale controllo per la certificazione come "piante idonee alla tartuficoltura".

Per diversi motivi (temperature elevate sviluppo malattie delle piante tipo oidio formazione di depositi calcarei sulla superficie fogliare o altro) alcuni lotti di piante potrebbero non essere pronte per cui si possono ricontrollare successivamente fino al secondo anno dalla data dell'inoculo. Dopo di che è economicamente corretto eliminarle o venderle ad un prezzo inferiore, specialmente se non presentano inquinamento da parte di altre specie di funghi ectomicorrizici.

Laboratorio

Il vivaista potrebbe essere interessato ad avere una possibilità di controllo sulla sua produzione e linea produttiva avendo la possibilità di monitorare la produzione dal controllo del materiale di inoculo (tartufi) fino alla stima della micorrizzazione. L'obiettivo non è quello di produrre delle autocertificazioni senza alcuna validità legale ma verificare la corretta applicazione dei protocolli così da sottoporre al soggetto certificatore materiale già selezionato risparmiando notevolmente su questa voce.

Controllo macroscopico tartufi da inoculo

	Superficie esterna verrucosa e nerastra	Gleba scura con verruche non preminenti	Gleba porporanerastra con vene sottili		<i>TUBER MELANOSPORUM</i>
	Superficie nerastra quasi liscia	Gleba pallida, nocciola con bverruche preminente	Gleba grigio nerastra con vene larghe		<i>TUBER BRUMALE</i>
	Superficie liscia ocracea-giallastra	Gleba bruno-nerastra con vene sottili, interrotte	Gleba da nocciola a bruna		<i>TUBER AESTIVUM</i>
			Gleba invaginata		<i>TUBER MESENTERICUM</i>
					<i>TUBER MACROSPORUM</i>
		Gleba da pallida ad ocra, con vene biancastre sottilissime			<i>TUBER MAGNATUM</i>
		Gleba rossastra brunaa con vene sparse veins			<i>TUBER BORCHII</i>

Sembra facile riconoscere le varie specie di tartufo commerciali ma alcune sono facilmente confondibili con specie simili, ad esempio:

Tuber aestivum o scorzone o nero d'estate può avere una variante autunnale detta "uncinato" o confondersi con specie simili come *Tuber mesentericum*, *Tuber bituminatum*, *Tuber suave* e molte specie d'origine asiatica come *Tuber sinoaestivum*. Un carattere che permette una identificazione rapida dei veri *Tuber aestivum* europei è un particolare delle verruche del peridio che presentano una superficie con righe parallele.



Tuber melanosporum o nero pregiato o tartufo nero invernale si può confondere con *Tuber brumale*, *Tuber cryptobrumale*, *Tuber thracicum* e di tante specie molto simili di provenienza asiatica,

principalmente cinesi; *Tuber magnatum* di piccole dimensioni si possono confondere con i “bianchetti”, insieme di piccoli tartufi con peridio chiaro liscio come *Tuber borchii*, *Tuber maculatum*, *Tuber dryophilum* etc.

Solo l’analisi del DNA può risolvere questi dubbi dato che queste specie che però producono ectomicorrize molto simili morfologicamente. **Quindi si consiglia sempre di controllare microscopicamente uno ad uno i tartufi che verranno utilizzati come inoculo, di non usare frammenti o tritume e nel caso di *Tuber magnatum* non usare tartufi di piccole dimensioni.**

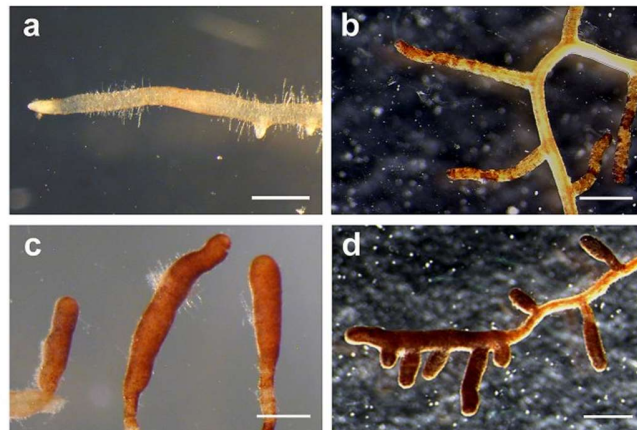
Controllo maturazione tartufi usati come inoculo

Per produrre buone piante tartufigene è importante usare tartufi ben maturi. Il controllo dello stato di maturazione dei tartufi si può effettuare microscopicamente utilizzando reattivi a base di iodio come il Melzer ed il Lugol. Gli aschi immaturi si colorano di giallo uovo come illustrato nell’immagine seguente.



Controllo ectomicorrize

Attenendosi al disciplinare in vigore nella Regione Sicilia si forniscono le indicazioni per determinare morfologicamente (morfotipizzazione) le ectomicorrize di alcune specie di tartufi commerciali. Le specie di tartufi appartenenti al genere *Tuber*, i veri tartufi, sono circa 200 duecento ed ognuna di loro produce micorrize tipiche della specie che varia con la specie arborea simbiote. Quindi verranno presentati solo i caratteri delle micorrize di: *Tuber aestivum*, *Tuber melanosporum*, *Tuber borchii*.



Variabilità delle radici sottoposte ad inoculo micorrizico:

- a) radice non micorrizzata con evidenti peli radicali;
- b) radice “elicitata” cioè che inizia a trasformarsi avendo ricevuto i segnali molecolari del fungo simbiote;
- c) micorriza matura e viva con dermocistidi;
- d) micorriza morta.

E' necessario uno stereo-microscopio per osservare le micorrize, selezionarle, prenderle con pinzette per fare vetrini e calcolare la percentuale di micorrizzazione (rapporto tra apici radicali micorrizzati con tartufo e/o altre specie e apici osservati)

Al microscopio ottico mettendo le micorrize raccolte allo stereo è possibile osservare la struttura della superficie (micoclona) ed eventuali peli (dermocistidi)

VALUTAZIONE DEL GRADO DI MICORRIZZAZIONE DELLE PIANTE TARTUFIGENE

In alcune Regioni, per essere ritenuta idonea ai fini della certificazione una pianta deve presentare contemporaneamente i seguenti requisiti:

1. la percentuale di micorrize del tartufo inoculato deve essere pari o superiore al 30% del totale degli apici radicali;
2. la percentuale massima tollerabile di apici micorrizzati da funghi diversi dal tartufo inoculato non può superare, in ogni caso, il 10% del totale degli apici radicali;
3. la differenza tra la percentuale degli apici micorrizzati dal tartufo inoculato e quella degli apici micorrizzati da altri funghi non deve essere inferiore a 30%;
4. non è ammessa la presenza di specie di Tuber diverse da quella dichiarata e inquinamenti dovuti a specie particolarmente competitive in pieno campo quali *Trichophaea* spp. (forma AD.).

REQUISITI DI IDONEITÀ DI UN LOTTO DI PIANTE MICORRIZATE

Modalità di campionamento

Per “lotto” si intende l’insieme di piante micorrizzate appartenenti alla stessa specie ottenute nello stesso giorno con l’inoculo con la stessa specie di tartufo della medesima provenienza, ed in genere deve essere costituito da non più di 500 piante, dai quali dovrà essere prelevato un campione di esemplari secondo il seguente schema.

Lotto di 100 piante almeno 3 campioni,

Lotto di 101-200 pianta almeno 4 campioni,

Lotto di 201-300 piante almeno 5 campioni,

Lotto di 301-400 piante almeno 6 campioni,

Lotto di 401-500 piante almeno 7 campioni.

La presenza e l'identificazione delle micorrize sulle piante si accerta con le seguenti operazioni:

- (a) si estrae la pianta dal contenitore, si sgrana il pane di terra e si lava accuratamente l'apparato radicale senza danneggiarlo;
- (b) si esamina al microscopio stereoscopico l'intero apparato radicale al fine di individuare la presenza di micorrize del genere Tuber e di eventuali altri funghi differenziabili in rapporto ai loro caratteri morfologici e biometrici;
- (c) si effettua quindi l'analisi microscopica delle diverse micorrize rilevate per procedere alla identificazione della specie di tartufo inoculata e alla individuazione di eventuali micorrize estranee. In caso di dubbi occorre ricorrere alla identificazione dei funghi micorrizici tramite caratterizzazione genetica.

Valutazione del grado di micorrizzazione della singola pianta

Il grado di micorrizzazione può essere stabilito mediante una stima visuale (F) o mediante il conteggio (G) degli apici micorrizzati. Ovvero facendo il rapporto tra il numero degli apici micorrizzati con la specie di Tuber dichiarata ed il numero di apici osservati (%).

MODALITÀ DELLA STIMA VISUALE (MORFOTIPIZZAZIONE)

Per una corretta gestione del vivaio produttore di piante micorrizzate è buona norma adottare un sistema di autocontrollo della produzione.

MATERIALE OCCORRENTE:

LAVANDINO CON ACQUA CORRENTE

SECCHI

MICROSCOPIO OTTICO STEREO

MICROSCOPIO OTTICO A TRASMISSIONE

VASCHETTE BASSE DI PLATICA O PIASTRA PETRI DI VETRO DA 20cm DIAMETRO

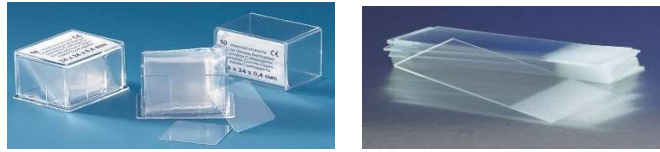
PINZETTE DA MICROSCOPIA a punta finissima, liscia non zigrinata



Trade-Leader-Shop

AGHI MONTATI

VETRINI PORTAOGGETTI E COPRIOGGETTI DA MICROSCOPIA



CONTATORE A 3 o 4 TASTI O BLOCCO NOTES

BOCETTA CON CONTAGOCCE

SOLUZIONE KOH 10%

PROVETTINE CON TAPPO

ALCOOL 95% NON DENATURATO

Morfotipizzazione

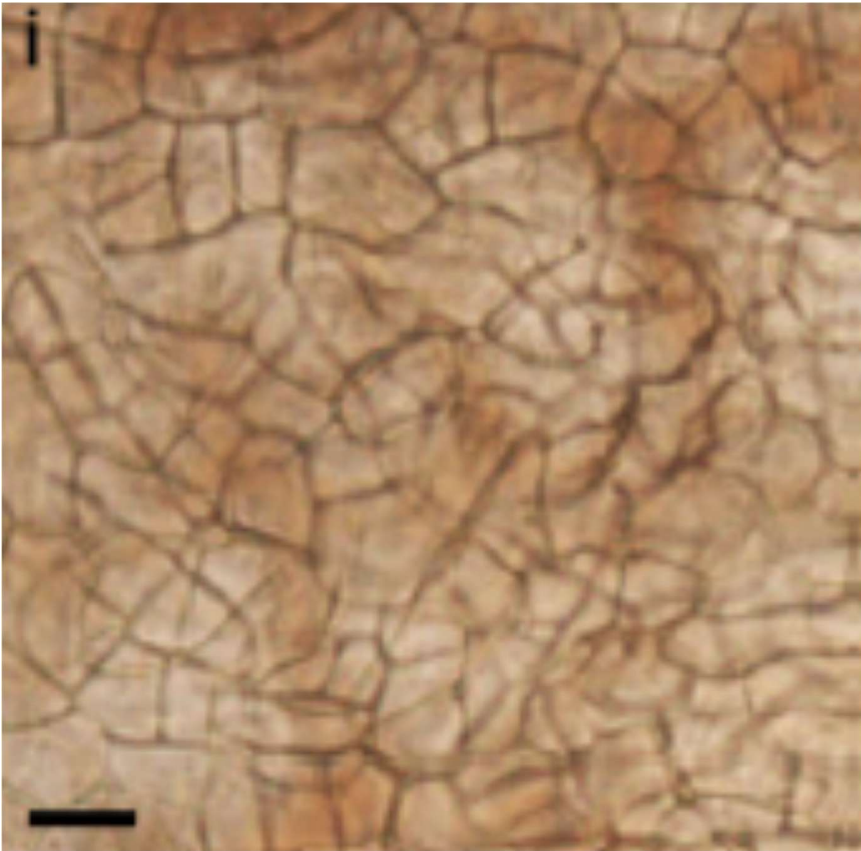
Si svasa la pianta da esaminare e la si libera dal terreno prima scuotendo leggermente l'apparato radicale a secco, poi le radici si mettono in ammollo in un secchio con acqua scuotendo sempre leggermente la pianta per liberarla dal terreno, infine si pone l'apparato radicale sotto il rubinetto con acqua corrente.

Poi, al microscopio stereo si esamina l'intero apparato radicale precedentemente pulito ponendo all'interno di una vaschetta la pianta da esaminare. Con le pinzette si prelevano alcune micorrize (sia presunte di Tuber sia non conformi alla morfologia di Tuber) per un controllo con il microscopio ottico a trasmissione per verificare la loro compatibilità morfologica con le micorrize del genere Tuber e la presenza dei caratteri delle micorrize della specie dichiarata. Su un vetrino portaoggetti pulito si mette una goccia di soluzione di KOH 10%, si mettono gli apici radicali micorrizati e si copre la goccia con un vetrino coprioggetti. Si schiaccia e con uno Scottex si elimina la soluzione in eccesso. Dopodiché si osservano al microscopio ottico a trasmissione i caratteri morfologici delle micorrize.

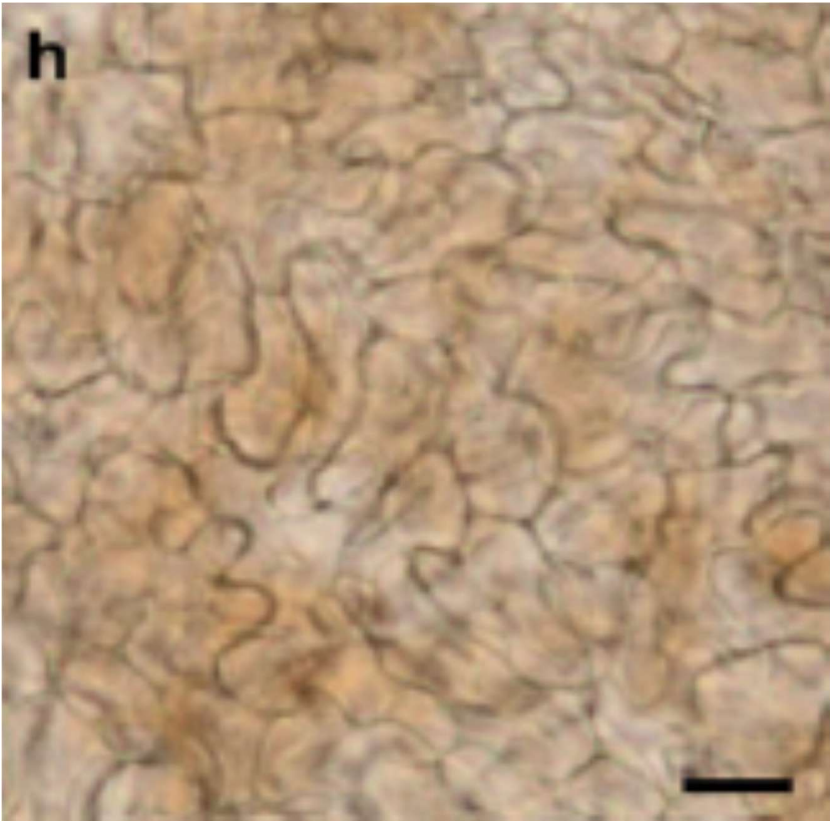
I principali caratteri per la identificazione microscopica delle ectomicorrize di Tuber si basano su due caratteri:

- La struttura della micoclona (superficie esterna della micorriza)
- Morfologia dei dermocistidi se presenti.

La micoclona può essere di due tipi, ovvero poligonale o puzzle-like, qui di seguito illustrate



Struttura poligonale



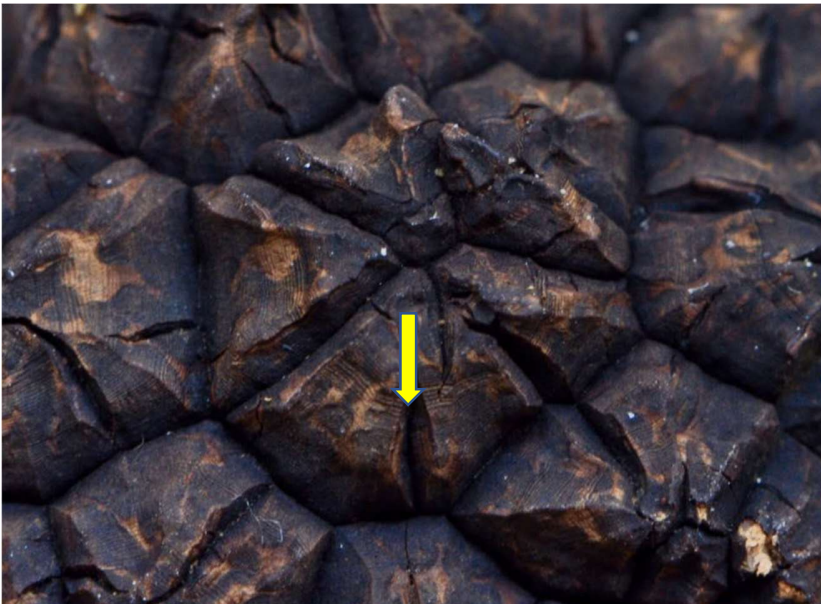
Struttura “puzzle.like”

Il primo tipo è caratteristico di *Tuber aestivum* e specie affini, il secondo nella maggior parte delle altre specie. Una combinazione di tartufo con peridio verrucoso striato parallelamente, spore reticolate e micorrize con micoclona poligonale ci dovrebbe assicurare sulla identificazione di *Tuber aestivum*.

Tuber aestivum

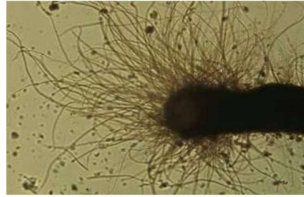


Corpo fruttifero di Tuber aestivum ben maturo, inizialmente la gleba è biancastra



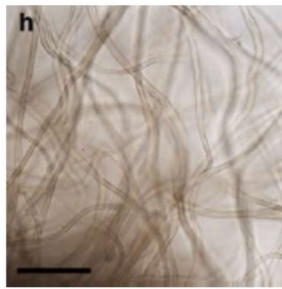
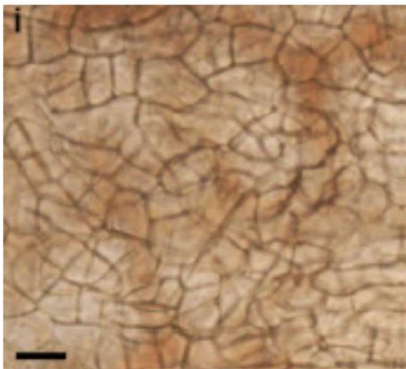
Verruche con le tipiche striature parallele

TUBER AESTIVUM



Micorrize allo stereomicroscopio, si notino i lunghi dermocistidi flessuosi

TUBER AESTIVUM



Tuber aestivum particolare della micoclena a struttura poligonale e lunghi dermocistidi flessuosi

TUBER BORCHII

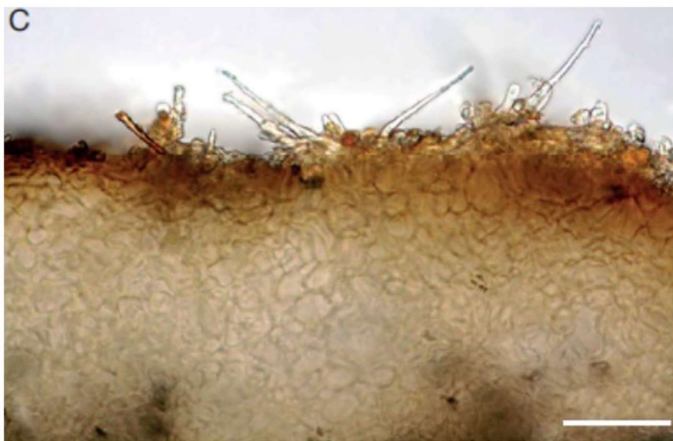


Matura in inverno-primavera
Non produce pianello



Tuber borchii

Corpi fruttiferi di Tuber borchii che mostrano una certa variabilità come caratteri macroscopici



Il peridio di Tuber borchii è costituito da uno strato di cellule rotondeggianti ed è ornamentato da dermocistidi appuntiti.

ATTENZIONE Questo carattere scompare, se si spazzola o pulisce il peridio.



Spore di *Tuber borchii* con reticolo a nido d'ape regolare e stretto.

Tuber melanosporum

TUBER MELANOSPORUM Vittad.

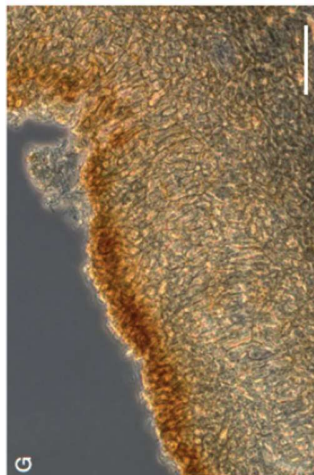
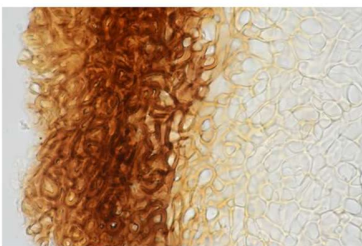


Maturazione tardo invernale-autunnale

«brucia» l'erba intorno alla pianta,
pianello o brûlis

In Sicilia il tartufo nero pregiato è molto raro ma presente per cui potrebbe essere proposto in tartuficoltura.

TUBER MELANOSPORUM



Peridio di Tuber melanosporum



Spore di *Tuber melanosporum* mature e poco mature a destra con ornamentazione spinosa e spine corte

Tuber brumale

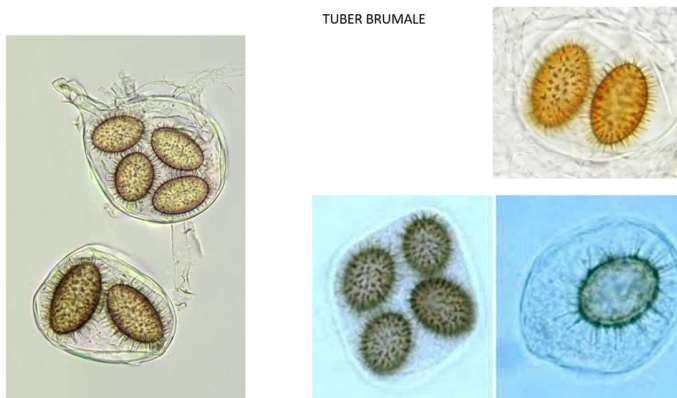
In Sicilia *Tuber brumale* è piuttosto frequente e potrebbe essere scambiato per *Tuber melanosporum* pur essendo di qualità nettamente inferiore. Si riconosce per le venature bianche larghe e per le spore con spine sottili e lunghe. **ATTENZIONE** a non confonderlo con *Tuber melanosporum* e produrre piante micorrizzate inutilizzabili commercialmente e dannose dal punto di vista ambientale.

TUBER BRUMALE (= *Tuber brumale* var. *moschatum*)



Peridio nero senza tracce di rossastro
Senza striature

Matura in inverno, errore di vivaio



Valutazione della percentuale di micorrizzazione

Si esamina l'intero apparato radicale o un tratto radicale tagliato al microscopio stereoscopico e si stima la percentuale di apici micorrizzati con il tartufo inoculato rispetto al totale di apici presenti nella pianta. Questo metodo può essere applicato solo qualora non siano stati preventivamente trovati funghi di altre specie con l'identificazione effettuata al punto precedente e qualora la percentuale di micorrizzazione sia superiore del 10% rispetto ai requisiti minimi richiesti. Nei casi dubbi si dovrà ricorrere al metodo del conteggio, di seguito descritto.

Se il grado di micorrizzazione stimato è superiore al 40% e sono assenti inquinanti, la pianta è considerata idonea alla certificazione.

Se il grado di micorrizzazione stimato è inferiore al 20% o sono presenti inquinamenti, la pianta non è considerata idonea alla certificazione.

Se il grado di micorrizzazione stimato è compreso fra il 20% e il 40%, si attua il metodo del conteggio.

Modalità del conteggio

Si individuano nell'apparato radicale, considerato nel suo insieme, a partire dal colletto e fino alla sua estremità, due settori di uguale lunghezza: uno prossimale (prima metà circa) e l'altro distale (seconda metà), non considerando la eventuale presenza di isolate e lunghe radici. Si prelevano casualmente, da punti diversi e distanti tra loro, almeno 4 porzioni di radici nella metà prossimale dell'apparato radicale e 4 porzioni nella metà distale. A partire dalla base (colletto) di ogni porzione di radice, che per comodità dell'operatore può essere anche recisa ed osservata isolatamente, si contano, senza alcuna esclusione, i primi 50 apici radicali separandoli in:

- micorrizzati dalla specie di tartufo inoculato;
- micorrizzati da altre specie di tartufo;
- non micorrizzati.

Si esprimono, per ciascun settore e per l'intera pianta, le percentuali degli apici micorrizzati dalla specie di tartufo inoculato, degli apici micorrizzati da altri tartufi, degli apici micorrizzati da altri funghi e di quelli privi di micorrize, riferite al totale degli apici contati; I dati analitici vanno riportati nella scheda di valutazione. Le schede sono conservate agli atti dell'azienda produttrice, a disposizione dell'ente certificante.

Ai fini dell'idoneità del lotto è inoltre necessario che tutte le piante risultino micorrizzate con il tartufo inoculato e che almeno l'80% di dette piante ricada nei limiti previsti dal punto D) del presente allegato.

Genotipizzazione controllo genetico- analisi DNA

Se si intendesse controllare molecolarmente la identità delle micorrize un certo numero di micorrize (almeno 5) dello stesso morfotipo vanno conservate in una provetta nuova, con tappo, ne esistono di specifiche (Eppendorf) ma anche una provetta per l'analisi delle urine va bene, contenente alcool NON DENATURATO, di tipo alimentare a 95-96%.

Le provette vanno inviate per le analisi del DNA a laboratori specializzati in genere presenti in molte Università italiane o Laboratori del CNR o CREA, alle quali si può richiedere anche la identificazione della specie no la semplice sequenza.

Obblighi

Informarsi presso gli uffici regionali sulle disposizioni in merito alla attività vivaistica specifica, in quanto esistono disposizioni diverse da regione a regione

“Si ringrazia l'autore per la competenza, la disponibilità e, la pazienza dimostrata durante tutto il progetto.

“Il Gruppo Operativo “



Azienda Agricola Orlando Daniele
Azienda Agricola Poggio Alcanterra

