

RAPPORTO DI PROVA

| | |
|--|---|
| N. identificativo | 124ACV20 |
| Descrizione di identificazione: | campione costituito da piantine micorrizate |
| Richiedente | Az. Agr. Francesco Ficcadenti |
| Campionamento effettuato da: | Richiedente |
| Data arrivo campione: | 15/09/2020 |

Campionamento: in data 15 Settembre 2020 sono state recapitate 33 piantine di diverse specie botaniche micorrizate con *Tuber melanosporum*, *T. aestivum* e *T. magnatum*, allo scopo di valutarne lo stato di micorrizzazione e di confermare l'identità del fungo simbiote.

Ogni pianta campionata è stata sottoposta ad analisi seguendo il “metodo di valutazione e certificazione delle piante micorrizate con funghi del genere *Tuber* basato sulla caratterizzazione morfologica delle micorrize integrata da analisi biomolecolare” (Regolamento regionale 16 luglio 2007, n°8 - art.2).

Analisi morfologiche: prima di procedere alla valutazione quali-quantitativa delle micorrize è stato accertato che le piante possedessero le caratteristiche bio-morfologiche di stato vegetativo, sviluppo dell'apparato aereo e radicale e sanità adeguate alle produzioni vivaistiche.

Le piante campionate sono state estratte dal contenitore ed il substrato è stato allontanato da ciascuna pianta lavando delicatamente l'apparato radicale, curando di ridurre al minimo la perdita per distacco degli apici micorrizzati. Le piante a radice nuda sono state subito sottoposte ad analisi onde evitare il loro deterioramento. L'entità della micorrizzazione di ciascuna pianta è stata accertata esaminando al microscopio stereoscopico l'intero apparato radicale al fine di individuare la presenza di micorrize attribuibili al gen. *Tuber* e di eventuali altre forme differenziabili per caratteri morfologici. Il conteggio degli apici micorrizzati è stato effettuato su 4 radici della porzione distale e 4 della porzione prossimale.

Gli apici radicali sono stati separati in:

- i) micorrizzati dalla specie di tartufo dichiarata;
- ii) micorrizzati da altre specie fungine;
- iii) non micorrizzati.

Phy.Dia. srl

Sede Legale – Via S. Camillo de Lellis, snc 01100 Viterbo - P. IVA 02116560562

Sono state quindi calcolate le percentuali degli apici micorrizzati dalla specie di tartufo dichiarato, degli apici micorrizzati da altre specie fungine e di quelli non micorrizzati, riferite al totale degli apici contati.

Alcuni tratti dell'apparato radicale sono stati prelevati per l'analisi molecolare e conservati in congelatore (-20°C).

Analisi molecolari: il DNA genomico (gDNA) totale è stato estratto dai campioni di radici seguendo il protocollo del kit NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel), basato su metodo CTAB, a partire da circa 100 mg di radici.

Il gDNA dei vari campioni è stato poi amplificato con i primers specie-specifici ITSML e ITS4LNG (Paolocci *et al.*, 1999) per verificare la presenza di *T. melanosporum* e BTAE-F e BTAEMB-R (Gryndler *et al.*, 2011) per verificare la presenza di *T. aestivum*, utilizzando in entrambi i casi la Xpert Hotstart 2X Master Mix (Grisp) e seguendo le istruzioni del produttore. In ogni fase sono stati utilizzati sia controlli positivi che negativi.

RISULTATI DELL'ANALISI

L'analisi visiva delle piantine ha evidenziato un livello di accrescimento uniforme.

L'analisi bio-morfologica delle micorrize ha evidenziato le percentuali di micorrizzazione riportate nella tabella sottostante. Non è stata rilevata la presenza di funghi simbionti non appartenenti al genere *Tuber*.

Di seguito i risultati delle piantine analizzate

Tabella 1 – Analisi morfologica delle piante micorizzate con *T. melanosporum*.

| Denominazione cartellino | Specie arborea | Specie simbionte | Media radici micorizzate (%) | Altri funghi (%) | Media radici non micorizzate (%) |
|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------|----------------------------------|
| CARPINO REINOCULATO N.P. | <i>Ostrya carpinifolia</i> | <i>Tuber melanosporum</i> | 92 | 0 | 8 |
| ROVERELLA REINOCULATA N.P.1 | <i>Quercus pubescens</i> | <i>Tuber melanosporum</i> | 100 | 0 | 0 |
| ROVERELLA REINOCULATA N.P.2 | <i>Quercus pubescens</i> | <i>Tuber melanosporum</i> | 92 | 0 | 8 |
| TILIA CORDATA N.P. | <i>Tilia sp.</i> | <i>Tuber melanosporum</i> | 92,5 | 0 | 7,5 |
| NOCCIOLO – LANGHE N.P. | <i>Corylus avellana</i> | <i>Tuber melanosporum</i> | 100 | 0 | 0 |
| ROVERELLA N.P. 1 | <i>Quercus pubescens</i> | <i>Tuber melanosporum</i> | 94,5 | 0 | 5,5 |
| ROVERELLA N.P. 2 | <i>Quercus pubescens</i> | <i>Tuber melanosporum</i> | 96,5 | 0 | 3,5 |
| ROVERELLA N.P. 3 | <i>Quercus pubescens</i> | <i>Tuber melanosporum</i> | 95 | 0 | 5 |
| NOCCIOLO – GIFFONI N.P. | <i>Corylus avellana</i> | <i>Tuber melanosporum</i> | 100 | 0 | 0 |
| PINO NERO REINOCULATO N.P. | <i>Pinus nigra</i> | <i>Tuber melanosporum</i> | 100 | 0 | 0 |
| LECCIO N.P.1 | <i>Quercus ilex</i> | <i>Tuber melanosporum</i> | 74 | 0 | 26 |
| LECCIO N.P.2 | <i>Quercus ilex</i> | <i>Tuber melanosporum</i> | 92,5 | 0 | 7,5 |
| CERRO REINOCULATO N.P.1 | <i>Quercus cerris</i> | <i>Tuber melanosporum</i> | 100 | 0 | 0 |
| CERRO REINOCULATO N.P.2 | <i>Quercus cerris</i> | <i>Tuber melanosporum</i> | 87,5 | 0 | 12,5 |

Tabella 2 – Analisi morfologica delle piante micorizzate con *T. magnatum*.

| Denominazione cartellino | Specie arborea | Specie simbionte | Media radici micorizzate (%) | Altri funghi (%) | Media radici non micorizzate (%) |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------|------------------|----------------------------------|
| NOCCIOLO T.M.PICO | <i>Corylus avellana</i> | <i>Tuber magnatum</i> | 100 | 0 | 00 |
| ROVERELLA T.M. PICO | <i>Quercus pubescens</i> | <i>Tuber magnatum</i> | 96,5 | 0 | 3,5 |
| FARNIA T.M. PICO1 | <i>Quercus robur</i> | <i>Tuber magnatum</i> | 93,5 | 0 | 6,5 |
| FARNIA T.M. PICO2 | <i>Quercus robur</i> | <i>Tuber magnatum</i> | 96 | 0 | 4 |
| TILIA CORDATA T.M.PICO | <i>Tilia sp.</i> | <i>Tuber magnatum</i> | 100 | 0 | 0 |

Tabella 3 – Analisi morfologica delle piante micorrizzate con *T. aestivum*.

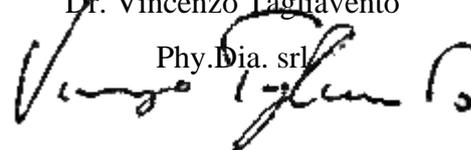
| Denominazione cartellino | Specie arborea | Specie simbionte | Media radici micorrizzate (%) | Altri funghi (%) | Media radici non micorrizzate (%) |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| NOCCIOLO GENTILE ROMANA | <i>Corylus avellana</i> | <i>Tuber aestivum</i> | 100 | 0 | 0 |
| LECCIO 1 | <i>Quercus ilex</i> | <i>Tuber aestivum</i> | 86,5 | 0 | 3,5 |
| LECCIO 2 | <i>Quercus ilex</i> | <i>Tuber aestivum</i> | 91 | 0 | 9 |
| ROVERELLA REINOCULATA 1 | <i>Quercus pubescens</i> | <i>Tuber aestivum</i> | 100 | 0 | 0 |
| ROVERELLA REINOCULATA 2 | <i>Quercus pubescens</i> | <i>Tuber aestivum</i> | 93 | 0 | 7 |
| CERRO 1 | <i>Quercus cerris</i> | <i>Tuber aestivum</i> | 88 | 0 | 12 |
| CERRO 2 | <i>Quercus cerris</i> | <i>Tuber aestivum</i> | 76,5 | 0 | 23,5 |
| ROVERELLA 1 | <i>Quercus pubescens</i> | <i>Tuber aestivum</i> | 100 | 0 | 0 |
| ROVERELLA 2 | <i>Quercus pubescens</i> | <i>Tuber aestivum</i> | 100 | 0 | 0 |
| TIGLIO | <i>Tilia</i> sp. | <i>Tuber aestivum</i> | 100 | 0 | 0 |
| NIOCCOLO GIFFONI | <i>Corylus avellana</i> | <i>Tuber aestivum</i> | 95,5 | 0 | 4,5 |
| LECCIO REINOCULATO 1 | <i>Quercus ilex</i> | <i>Tuber aestivum</i> | 74,5 | 0 | 25,5 |
| LECCIO REINOCULATO 2 | <i>Quercus ilex</i> | <i>Tuber aestivum</i> | 37,5 | 0 | 62,5 |
| LECCIO REINOCULATO 3 | <i>Quercus ilex</i> | <i>Tuber aestivum</i> | 90 | 0 | 10 |

In base ai risultati ottenuti dalla presente analisi, il materiale vivaistico oggetto dell'indagine risulta certificabile in base alla normativa vigente per la Regione Umbria*.

Viterbo, 30 Settembre 2020

Dr. Vincenzo Tagliavento

Phy.Dia. srl



NB Il presente report non costituisce certificazione ufficiale.