

|                                     |                        |
|-------------------------------------|------------------------|
| <b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b> | <b>102021000023342</b> |
| <b>Data Deposito</b>                | <b>09/09/2021</b>      |
| <b>Data Pubblicazione</b>           | <b>09/03/2023</b>      |

Classifiche IPC

| Sezione | Classe | Sottoclasse | Gruppo | Sottogruppo |
|---------|--------|-------------|--------|-------------|
| C       | 12     | N           | 1      | 14          |

Titolo

UTILIZZO DI TESSUTO NON TESSUTO COMPRENDENTE ACIDO POLILATTICO (PLA) PER L'INOCULAZIONE DI PIANTE DA MICORRIZARE, SPECIALMENTE PER TARTUFICOLTURA

**DESCRIZIONE****Titolo**

**UTILIZZO DI TESSUTO NON TESSUTO COMPRENDENTE ACIDO  
POLILATTICO (PLA) PER L'INOCULAZIONE DI PIANTE DA  
5 MICORRIZARE, SPECIALMENTE PER TARTUFICOLTURA.**

\* \* \* \* \*

**Campo tecnico**

La presente invenzione appartiene al campo tecnico della  
micologia, più specificamente appartiene al settore della  
10 colonizzazione con tartufo delle piante micorrizate.

In dettaglio la presente invenzione tratta di un materiale  
innovativo per migliorare e standardizzare le tecniche di  
inoculazione, sia miceliare che sporale, nell'ambito della  
tartuficoltura.

15 **Stato della tecnica**

La tartuficoltura rientra ormai a pieno titolo tra le pro-  
duzioni agricole e molte aziende stanno avvicinandosi a que-  
sta coltura. La tartuficoltura moderna si basa sulla messa  
a dimora di piante micorrizate in vivaio con tartufo, più  
20 esattamente si basa sulla simbiosi micorrizica tra la pianta  
tartufigena e la specie del genere *Tuber* che si intende  
coltivare.

Poiché la coltivazione abbia successo è necessario che le  
piante micorrizate siano di ottima qualità ossia colonizzate  
25 in modo esteso con tartufo e prive di inquinanti.

Per questo motivo nasce la necessità di standardizzare e  
migliorare la produzione delle piante micorrizate con tar-  
tufo.

Le micorrize rientrano nell'ambito di una simbiosi mutuali-  
30 stica tra un fungo terricolo (micobionte) e l'apparato ra-  
dicale della pianta (fitobionte), nello specifico le radici  
secondarie.

Il risultato finale della simbiosi si traduce in continui

scambi nutrizionali tra i due contraenti di questo rapporto: il carbonio organicato viene ceduto dalla pianta al fungo mentre quest'ultimo fornisce alla pianta acqua ed elementi nutritivi importanti quali azoto, fosforo, magnesio, zinco e rame. Il micelio fungino protraendosi dalle radici colonizzate, garantisce alla pianta una maggiore superficie assorbente (fino a 1000 metri di micelio per metro di radice) e una maggiore capacità esplorativa della porzione di suolo presente intorno all'apparato radicale. In assenza di tale fenomeno simbiotico, molte piante si troverebbero in perenne condizione di stress e il loro sviluppo ne soffrirebbe. I tartufi sono funghi ascomiceti appartenenti a diverse famiglie dell'ordine Pezizales, ma soltanto le specie del genere *Tuber* vengono considerate veri tartufi. Il tartufo non è altro che il corpo fruttifero (ascocarpo o ascoma) del fungo, risultato della simbiosi micorrizica con piante arbustive o arboree.

La colonizzazione dell'apparato radicale della pianta si concretizza attraverso numerosi avvolgimenti ifali intorno all'apice radicale, che assume la caratteristica forma clavata, perde i peli assorbenti ed è stimolato dal fungo nella produzione di nuovi abbozzi radicali che sono anch'essi soggetti all'avvolgimento miceliare, il quale continua il proprio sviluppo seguendo il profilo dell'apparato radicale in continuo cambiamento.

I principali funghi micorrizici utilizzati a scopo alimentare sono i seguenti: *Amanita* spp., *Boletus* spp., *Cantharellus* spp., *Lactarius* spp., *Suillus* spp., *Tricholoma* spp., *Tuber* spp.

Nella produzione di piante micorrizzate il metodo dell'inoculazione sporale è stato elaborato per primo, resta il metodo più semplice ed attualmente è ancora quello più utiliz-

zato, prevede la disgregazione del corpo fruttifero del tartufo con aggiunta di acqua sterile per ottenere una sospensione di spore che viene posta direttamente a contatto con gli apparati radicali di piantine allevate su substrati sterili; secondo la tecnica nota la coltivazione del materiale di propagazione da inoculare deve avvenire su substrati inerti, quali la vermiculite a scaglie lamellari, l'agripelite o simili, come descritto in CN105103947.

5  
10 In tempi successivi ha iniziato a prendere piede il metodo dell'inoculazione miceliare, nella quale il micelio della specie fungina di *Tuber* che si vuole utilizzare per l'inoculo viene isolato e coltivato su appropriati mezzi di coltura fino ad ottenerne la quantità necessaria e poi utilizzato per micorrizzare giovani piantine micropropagate *in vitro*,  
15 talee o giovani semenzali.

Il micelio fungino può essere ricavato da frammenti di corpo fruttifero, dalle ascospore in fase di germinazione o da micorrize a loro volta ottenute da colture pure; l'uso di colture pure garantisce che gli inoculi siano privi di funghi o contaminanti indesiderati che possono inibire la colonizzazione delle radici delle specie fungine bersaglio. I miceli sono in grado di colonizzare le radici più sottili più rapidamente delle spore, riducendo così il rischio di contaminazione durante la crescita delle piante.

20  
25 È un metodo che offre gli stessi vantaggi del precedente e che permette inoltre di risolvere problemi legati all'inquinamento da parte di altre specie fungine. In questo modo, poi, essendo svincolati dalla stagionalità delle operazioni vivaistiche, si possono ottenere piantine micorrizzate in  
30 tutti i periodi dell'anno.

Attualmente le aziende vivaistiche produttrici di piante tartufigene sentono sia la necessità di migliorare i risultati dell'inoculazione sporale, attualmente in uso nella

maggior parte dei vivai, sia di introdurre a livello commerciale la tecnica dell'inoculazione miceliare.

Per migliorare la tecnica di inoculazione con spore e il contatto di queste con le radici delle piante è stato messo  
 5 a punto un metodo in cui le spore vengono messe a contatto con un tessuto non tessuto a base di cellulosa che poi viene avvolto attorno alle radici da micorrizzare; questa tecnica consente di aumentare la superficie della pianta che si trova a contatto con le spore, di contro il tessuto di cellulosa  
 10 impiega molto tempo per degradarsi e scomparire e le sue caratteristiche meccaniche ostacolano lo sviluppo dell'apparato radicale della piantina micorrizzata.

A titolo di esempio non limitativo si indicano alcune dei simbionti più utilizzati per la produzione di piante micor-  
 15 rizzate, in particolare con tartufi: *Arbutus unedo* L., *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch, *Cistus* spp., *Corylus* spp., *Fagus sylvatica* L., *Ostrya carpinifolia* Scop., *Picea* spp., *Pinus* spp., *Populus* spp., *Quercus* spp., *Salix* spp., *Tilia* spp.

## 20 **Scopi e sommario dell'invenzione**

Scopo della presente invenzione è dunque quello di fornire una tecnica ed un materiale per velocizzare, semplificare e standardizzare la produzione di inoculo sporale, mantenendo i vantaggi manifestatisi con l'impiego del tessuto di cel-  
 25 lulosa, ma superandone gli svantaggi, con particolare riferimento alla lenta biodegradabilità.

Ulteriore scopo della presente invenzione è stato quello di fornire un metodo e un materiale che consentissero di impiegare un substrato in grado di garantire un elevato ed omo-  
 30 geneo sviluppo del micelio, al fine di migliorare e standardizzare la tecnica di inoculazione miceliare.

Non ultimo scopo della presente invenzione è stato quello di mettere a punto un metodo che prevede l'uso di un diverso

materiale per aumentare il tempo di conservazione dell'inoculo miceliare.

Questi e altri scopi che verranno chiari all'esperto del settore sono stati raggiunti usando del tessuto non tessuto  
5 a base di acido polilattico (PLA) per trasferire il fungo all'apparato radicale delle piantine micorrizate.

Si fa presente che nel presente testo brevettuale con l'espressione "tessuto non tessuto" di acido polilattico o, a base di acido polilattico, si intende un tessuto non tessuto comprendente acido polilattico.  
10

L'acido polilattico (PLA) è un poliestere alifatico biodegradabile, derivato completamente da risorse rinnovabili ed in agricoltura trova impiego principalmente nella produzione di teli pacciamanti biodegradabili.

15 I risultati sperimentali hanno confermato che l'utilizzo del tessuto non tessuto a base di acido polilattico in tartuficoltura permette di ottenere delle piante più estesamente e uniformemente micorrizate rispetto alle tecniche attualmente utilizzate che prevedono utilizzo di vermiculite, o di inerti simili, come supporto per il micelio e anche rispetto all'uso  
20 di tessuto di cellulosa.

Ne consegue che adottando il tessuto non tessuto a base di acido polilattico la formazione delle micorrize avviene normalmente entro 50 giorni con la tecnica di inoculazione miceliare e entro tre mesi con la tecnica dell'inoculazione  
25 sporale, a fronte dei 3-4 mesi necessari con le tecniche attualmente in uso.

Il tessuto non tessuto a base di acido polilattico riesce a trattenere tra le sue maglie il micelio permettendo un più  
30 efficace trasferimento del fungo alle piante. In particolare il micelio si organizza fra le fibre lasse del tessuto non tessuto a base di acido polilattico, quest'ultimo è sufficientemente sottile da non impedire lo sviluppo delle radici

delle piantine, le quali riescono a romperlo facilmente.

Il tessuto non tessuto di PLA colonizzato dal micelio del tartufo può essere conservato a temperature di 4°C per due mesi senza alterare le sue capacità d'infettività.

5 Utilizzando il tessuto non tessuto a base di acido polilattico si riducono in maniera considerevole i tempi di ottenimento delle micorrize mediante inoculazione miceliare (circa 50 giorni). Infatti utilizzando la vermiculite o altri materiali inerti per il trasferimento del micelio i tempi  
10 dell'ottenimento delle micorrize sono di circa 90-120 giorni (3-4 mesi).

Oltre alla rapida e completa biodegradabilità e alla facilità con la quale le radici delle piante possono attraversarlo, il tessuto non tessuto a base di acido polilattico  
15 presenta diversi altri vantaggi, fra i quali si nota il fatto che non supporta la crescita microbica, è morbido, leggero ed inodore e proviene da fonti rinnovabili.

Inoltre il tessuto non tessuto a base di acido polilattico resiste molto bene alle temperature elevate, senza deformarsi e mantenendo una distribuzione lassa e non compatta  
20 delle proprie fibre.

Prove sperimentali hanno anche messo in luce che il tessuto non tessuto a base di acido polilattico, una volta immerso in un liquido, è in grado di attrarre il micelio fungino, facendolo aderire in modo omogeneo su tutta la sua superficie.  
25

Buoni risultati si sono ottenuti con tessuto non tessuto di PLA con grammature (spessori) variabili fra 10 grammi al metro quadrato e 40 grammi per metro quadrato. I risultati  
30 migliori si sono ottenuti con grammature di 20 grammi per metro quadrato.

#### **Breve descrizione dei disegni**

La **Fig. 1** e la **Fig. 2** mostrano un'immagine al microscopio

elettronico a scansione (SEM) raffiguranti il micelio di *Tuber borchii* intrecciato alle fibre del tessuto non tessuto in PLA, le frecce indicano il micelio.

La **Fig. 3** e la **Fig. 4** mostrano delle micorrize di *Tuber borchii*, indicate dalle frecce, osservate allo stereomicroscopio relative agli apparati radicali di piante inoculate con il tessuto non tessuto in PLA.

La **Fig. 5** mostra le diverse percentuali di micorrizzazione misurate in un lotto di piante di quercia che sono state oggetto di valutazione comparata. La colonna a sinistra mostra la percentuale di micorrizzazione ottenuta con l'inoculo miceliare classico, usando la vermiculite, mentre la colonna di destra mostra la percentuale di micorrizzazione ottenuta il tessuto non tessuto a base di acido polilattico.

#### 15 **Descrizione dettagliata di due possibili attuazioni dell'invenzione**

Secondo una prima attuazione il tessuto non tessuto a base di acido polilattico è impiegato eseguendo la tecnica dell'inoculazione sporale.

20 La disgregazione preliminare del corpo fruttifero del tartufo può avvenire con tecniche e modalità diverse, solitamente con l'uso di un mortaio o di un frullatore elettrico. Per facilitare la macinazione dei tessuti fungini, nel processo di frantumazione è possibile aggiungere acqua sterile  
25 accoppiata a sabbia o altri tipi di particelle fini abrasive. La sospensione di spore così ottenuta può essere posta direttamente a contatto con il tessuto non tessuto a base di acido polilattico. Quest'ultimo, dopo essere stato così inoculato, deve essere avvolto attorno all'apparato radicale di  
30 giovani piantine sterili che devono poi essere allevate in vaso su substrato sterile per tre-sei mesi a seconda della specie fungina.

Le spore, una volta germinate, sviluppano un micelio che



rimarrà intrappolato nel tessuto non tessuto a base di acido polilattico e così potrà colonizzare meglio l'apparato radicale delle piantine con le quali è messo a contatto.

In una seconda attuazione il tessuto non tessuto a base di  
5 acido polilattico è impiegato eseguendo la tecnica dell'inoculazione miceliare, quest'ultima dipende dall'ottenimento di una coltura miceliare pura del fungo. Il micelio fungino può essere ricavato da frammenti di corpo fruttifero, dalle ascospore in fase di germinazione o da micorrize a loro volta  
10 ottenute da colture pure.

L'uso di colture pure garantisce che gli inoculi siano privi di funghi o contaminanti indesiderati che possono inibire o soppiantare la colonizzazione delle radici delle specie fungine bersaglio. I miceli sono in grado di colonizzare le  
15 radici più sottili più rapidamente delle spore, riducendo così il rischio di contaminazione durante la crescita delle piante.

È da sottolineare che l'inoculo miceliare consente di micor-  
rizzare le piante con genotipi fungini appositamente selezionati per infettività, affinità con la pianta ospite, condi-  
20 zioni ecologiche e per le caratteristiche qualitative e quantitative legate al corpo fruttifero.

La maggior parte delle colture pure di funghi si ottiene da corpi fruttiferi freschi, che offrono minori rischi di con-  
25 taminazione e richiedono procedure di isolamento più semplici. Per isolare il micelio dai corpi fruttiferi, piccoli frammenti di tessuto fungino di lunghezza non superiore a un millimetro, vengono asportati dalla gleba (funghi ipogei) o dai tessuti interni della zona di intersezione tra il gambo  
30 e il pileo (per i funghi epigei) e poi trasferiti su mezzi di coltura agarizzati.

Una volta ottenuto il micelio, esso viene poi coltivato in beute come coltura sommersa in cui sono inseriti pezzi di

tessuto non tessuto a base di acido polilattico.

Il mezzo culturale può avere una composizione diversa a seconda della specie fungina. Per *Tuber* spp. è consigliato un substrato liquido quale ad esempio il Woody Plant Medium (WPM).

Il micelio in coltura liquida viene attirato dal tessuto non tessuto a base di PLA e sviluppa le sue ife fra le trame del tessuto non tessuto, come mostrato nelle figure.

Dopo un periodo variabile fra un minimo di una settimana e un massimo di due mesi, a seconda del fungo micorrizico, il tessuto non tessuto a base di acido polilattico, su cui è sviluppato il micelio può essere avvolto attorno agli apparati radicali di giovani piantine che devono poi essere allevate in vaso su substrato sterile per due - quattro mesi, a seconda della specie fungina.

L'applicazione vivaistica su larga scala di questo tipo di inoculo dipende fortemente dal potenziale delle specie fungine di interesse e dalla loro capacità di produrre grandi quantità di micelio in condizioni axeniche.

A scopo esemplificativo si riporta la composizione tipica del substrato liquido Woody Plant Medium modified, utilizzato con buoni risultati per lo sviluppo del micelio fungino di *Tuber* spp.

Macroelementi:

- 0,5 g/l  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 0,2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 0,3 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,1 g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,9 g/l  $\text{K}_2\text{SO}_4$
- 0,4 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

Microelementi:

- 0,014 g/l  $\text{FeSO}_4$

- 1 ml/l di  $\text{Na}_2$  EDTA (9,325g in 250ml di  $\text{H}_2\text{O}$ )
- 1 ml/l di soluzione micro (3,1 g/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 11,15 g/l  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 4,3 g/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,0125 g/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,125 g/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

5 Vitamine:

- asparagina 0,1g/l
- tiamina 0,1g/l
- biotina 0,01g/l

Zuccheri:

- 10
- Glucosio 5g/l
  - Saccarosio 5g/l
  - mio-innositolo 0,1g/l

**RIVENDICAZIONI**

1. Metodo per la inoculazione di piante da micorrizzare con spore comprendente le seguenti fasi:

- A) disgregazione del corpo fruttifero di un fungo per l'ottenimento di spore;
- B) preparazione di una sospensione di dette spore in acqua sterile;

**caratterizzato dal fatto** di comprendere le seguenti ulteriori fasi:

- C) inoculazione di tessuto non tessuto comprendente fibre di acido polilattico (PLA) per imbibizione in detta sospensione di spore;
- D) avvolgimento dell'apparato radicale della pianta da micorrizzare con detto tessuto non tessuto imbibito.

2. Metodo per la inoculazione di piante da micorrizzare comprendente la fase di:

- A1) isolamento del micelio dal corpo fruttifero di un fungo; e **caratterizzato dal fatto** che detta fase A1 è seguita dalle fasi di:

- B1) immersione di detto micelio in un mezzo colturale nel quale è immerso anche del tessuto non tessuto comprendente fibre di acido polilattico;

C1) estrazione da detto mezzo colturale di detto tessuto non tessuto e suo risciacquo;

- D1) avvolgimento dell'apparato radicale della pianta da micorrizzare con detto tessuto non tessuto.

3. Metodo per l'inoculazione di piante da micorrizzare come da rivendicazione che precede **caratterizzato dal fatto** che detta fase B1 di immersione si prolunga per un periodo di tempo compreso fra 7 e 40 giorni, a seconda della specie fungina.

4. Metodo per l'inoculazione come da una delle rivendicazioni da 2 a 3 che precedono **caratterizzato dal fatto** che

l'apparato radicale della pianta da micorrizzare viene sfit-tonato prima di essere avvolto in detto tessuto non tessuto comprendente acido polilattico.

5     5.     Metodo per l'inoculazione miceliare di piante micorri-zate come da rivendicazione che precede **caratterizzato dal fatto** che detto mezzo di coltura comprende un substrato Woody Plant Medium.

10     6.     Tessuto non tessuto per l'inoculazione di piante da micorrizzare **caratterizzato dal fatto** di comprendere fibre di acido polilattico (PLA).

7.     Tessuto non tessuto come da rivendicazione che precede **caratterizzato dal fatto** che la sua grammatura è compresa fra 10 e 40 grammi per metro quadrato.

15     8.     Tessuto non tessuto come da una delle rivendicazioni che precedono **caratterizzato dal fatto** che la sua grammatura è di 20 grammi per metro quadrato.

\* \* \*

Il Mandatario

Dott. Ing. Stefano Fanfani

1/3

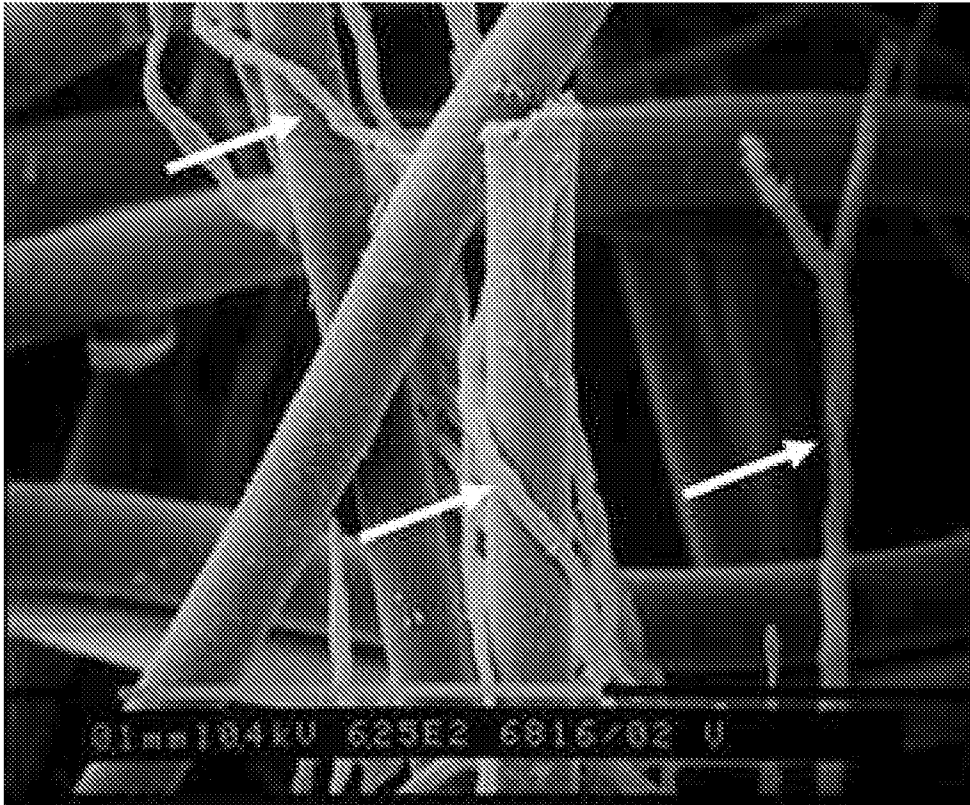


FIG. 1

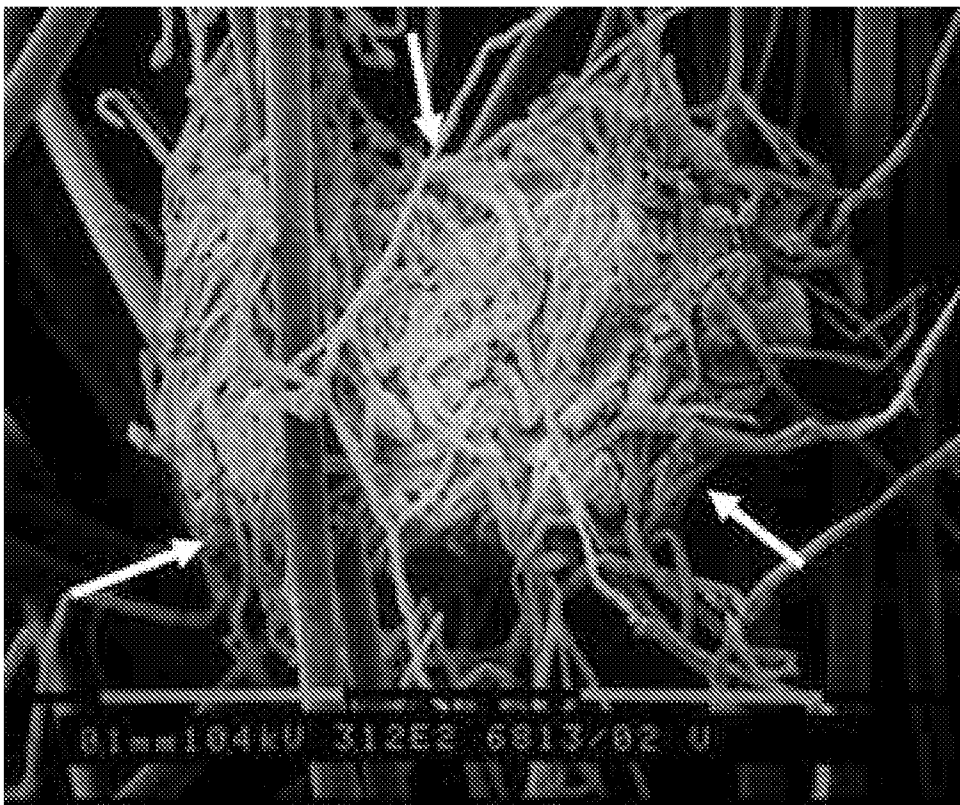


FIG. 2

2/3

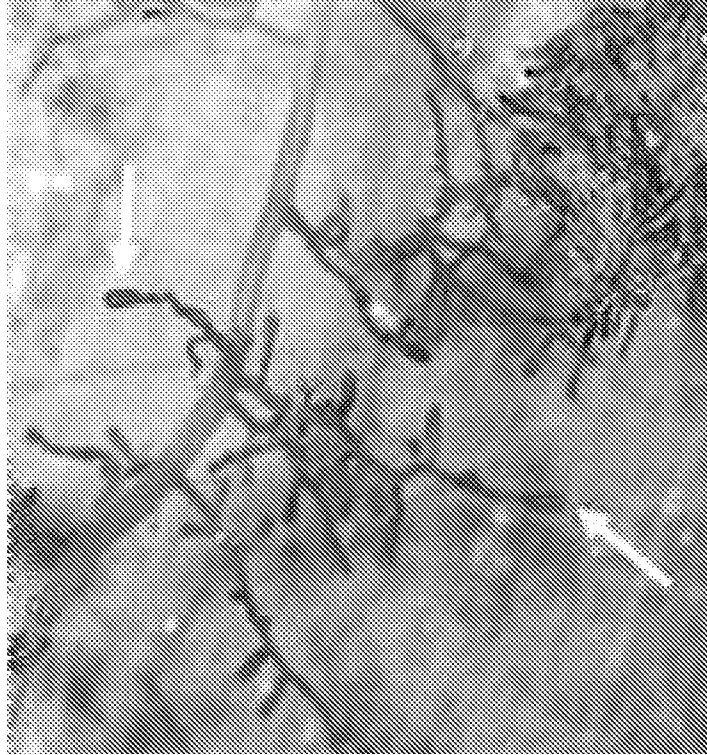


FIG. 3

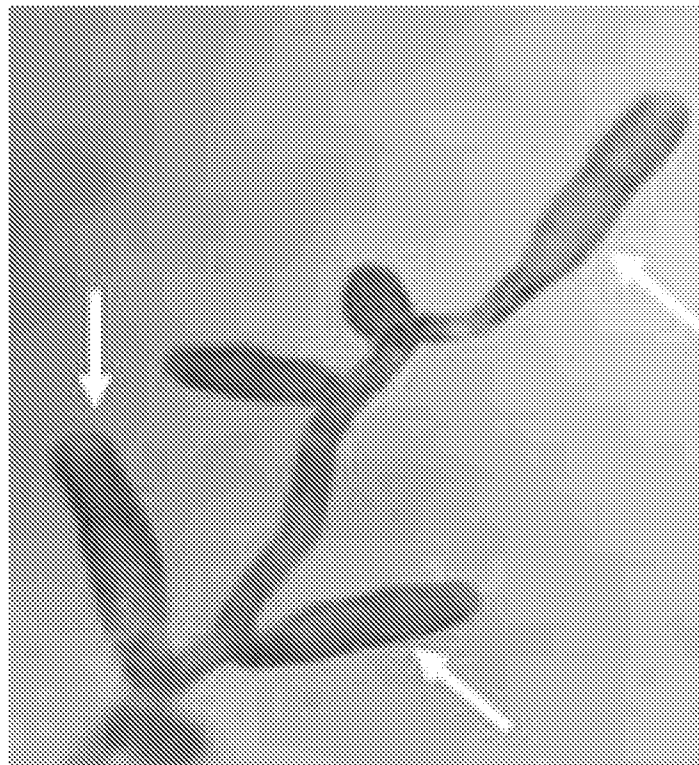


FIG. 4

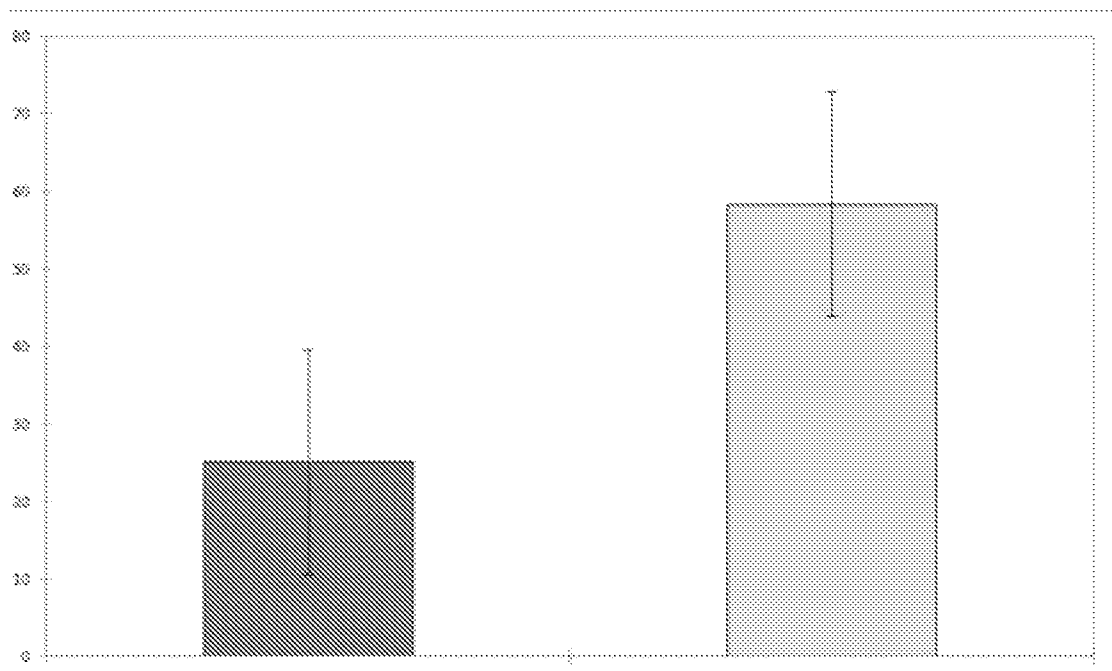


FIG. 5