

# PRVA POTVRDA O PRISUTNOSTI TARTUFA (*TUBER AESTIVUM VITTAD.*) U ZADARSKOJ ŽUPANIJI

## THE FIRST REPORT OF TRUFFLES (*TUBER AESTIVUM VITTAD.*) IN ZADAR COUNTY

SLAVEN ZJALIĆ<sup>1</sup>, MARZIA SCAPARI<sup>2</sup>, ANICA ČUKA<sup>3</sup>, ZORAN ŠIKIĆ<sup>1\*</sup>, MASSIMO REVERBERI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sveučilište u Zadru, Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu, Trg kneza Višeslava 9, 23 000 Zadar, Hrvatska / *University of Zadar, Department of Ecology, Agronomy and Aquaculture, Zadar, Croatia*, e-mail: szjalic@unizd.hr, zsikic@unizd.hr

<sup>2</sup> Sveučilište Sapienza u Rimu, Odjel za okolišne studije, Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Rim, Italija / *Sapienza University Rome, Department of Environmental Studies, Rome, Italy*, e-mail: marzia.scapari@uniroma1.it, massimo.reverberi@uniroma1.it

<sup>3</sup> Sveučilište u Zadru, Odjel za geografiju, Franje Tuđmana 24 i, 23 000 Zadar, Hrvatska / *University of Zadar, Department of Geography, Zadar, Croatia*, e-mail: acuka@unizd.hr

\* kontakt autor / corresponding author

DOI: 10.15291/geoadria.2891

UDK: 581.9:582.28(497.5-35 Zadar)=163.42=111

Izvorni znanstveni rad / *Original scientific paper*

Primljeno / *Received*: 8-12-2019



Tartufi (rod *Tuber*) su jedne od najcjenjenijih gljiva u gastronomiji. Zbog njihova posebnog okusa i ograničene dostupnosti, cijene tih podzemnih gljiva su iznimno visoke. U Istri se nalaze najvažnije zone pronalaska gljiva iz roda *Tuber* na prostoru Hrvatske. Već sedam – osam desetljeća šire se usmene predaje o postojanju tartufa na prostoru Zadarske županije, no dosad nije dokumentiran njihov pronalazak. U okviru ovoga istraživanja tartufi su traženi na različitim lokacijama u Zadarskoj županiji, a nakon što su pronađeni identificiranje je provedeno molekularnom analizom. Rezultati su nedvojbeno pokazali da je ljetni tartuf, *Tuber aestivum* Vittad., prisutan na području Zadarske županije.

**KLJUČNE RIJEČI:** tartufi, *Tuber aestivum* Vittad., Zadarska županija

True truffles (*Tuber* spp.) are among the most appreciated mushroom in gastronomy. Due to their particular taste and limited natural availability the price of these underground mushrooms is high. In Croatia, the most important presence of *Tuber* spp. was reported in Istria. Since seven to eight decades ago there have been stories of Zadar's truffles which are transmitted orally from generation to generation but, till now, no written document that could confirm it has been found. In this study, truffles were searched for on different locations in Zadar County, the presumed truffles were harvested and molecular analyses were performed to identify them. The results undoubtedly show that the summer truffle, *Tuber aestivum* Vittad. is present in Zadar County.

**KEY WORDS:** truffles, *Tuber aestivum* Vittad., Zadar County

## UVOD

Tartuf je uobičajen naziv za hipogene mikorizne gljive. Ovo ime uključuje različite rodove, ali prvim tartufima smatra se samo rod *Tuber*. Procjenjuje se da rod *Tuber* uključuje više od 180 vrsta, od kojih neke imaju prilično veliku rasprostranjenost, dok ostale rastu u manje ili više ograničenim geografskim područjima (ZAMBONELLI I DR., 2015.). Crni ljetni tartuf (*T. aestivum*) spada među najrasprostranjenije vrste, a prisutnost mu je zabilježena u gotovo cijeloj Europi, od Španjolske do zemalja Istočne, Sjeverne i Srednje Europe, Sjeverne Afrike i Kine (WEDEN I DR., 2004.; GAZO I DR., 2005.; HILSZCZANSKA I DR., 2008.; ZAMBONELLI I DR., 2012.; BUNGTEN I DR., 2017.). S druge strane, geografska rasprostranjenost bijelog tartufa (*T. magnatum*) znatno je manja. Zabilježen je u ograničenim područjima Italije, južne Francuske, hrvatske regije Istre, Slovenije, Srbije, Švicarske i Mađarske (POMARICO I DR., 2007.; VASQUEZ I DR., 2014.; RICCONI I DR., 2016.). Ekologija i fiziologija roda *Tuber* nije u potpunosti poznata te se istraživanja i dalje provode. Različiti biotski i abiotski čimbenici mogu utjecati na životni ciklus i geografsku rasprostranjenost tartufa. Razmjerno širok raspon vrsta domaćina zajednički je za sve vrste tartufa, te pitanje dostupnosti vrste domaćina ne bi trebalo biti presudno za rasprostranjenost. Naprotiv, vezano za abiotske čimbenike, vrlo je izvjesno da sastav tla ima vrlo važnu ulogu. Tartuf se obično nalazi u vapnenastim, blago bazičnim tlima (pH između 7 i 8), s izuzetkom *T. borchii* koji dolazi i na blago kiselim tlima. Klimatski uvjeti važni su za rasprostranjenost nekih vrsta tartufa (THOMAS, 2014.; BODDY I DR., 2014.). M. Gryndler i dr. (2017.) naglašavaju utjecaj temperature na prisutnost *T. aestivum* u Češkoj, gdje se ljetni tartuf pronalazi samo na toplijim lokacijama.

Od davnina su se tartufi cijenili zbog njihova posebnog ukusa i koristili kao hrana (HALL I DR., 2007.; ROSSI, 2011.). Zapisi o prisutnosti tartufa kao kulinarske delicije prisutne su u knjigama od 17. stoljeća do danas (ROSA-GRUSZECKA I DR., 2017.). Zbog ograničene dostupnosti, cijene tartufa su visoke. Bijeli tartuf, *T. magnatum*, jedna je od najskupljih namirnica, a ovisno o raspoloživim godišnjim količinama, cijene mogu dosegnuti i 4.000 eura za kilogram (FIGLIUOLO I DR., 2013.). Cijene

## INTRODUCTION

Truffle is a common name for hypogenous mycorrhizal mushrooms. This name includes different genera, but true truffles are considered only those of the genus *Tuber*. The genus *Tuber* is estimated to include over 180 species, some of which have a rather wide distribution while the other grow in more or less restricted geographic areas (ZAMBONELLI ET AL., 2015). The black summer truffle (*T. aestivum*) is among the most widespread species. Its presence was reported almost in all Europe from Spain to Eastern European countries, Northern and Central Europe, North Africa and China (WEDEN ET AL., 2004; GAZO ET AL., 2005; HILSZCZANSKA ET AL., 2008; ZAMBONELLI ET AL., 2012; BUNGTEN ET AL., 2017). On the other hand, the geographical distribution of *T. magnatum*, the white truffle, is much more limited. It was reported to be found in restricted areas of Italy, Southern France, Istria, a Croatian region, Slovenia, Serbia, Switzerland and Hungary (POMARICO ET AL., 2007; VASQUEZ ET AL., 2014; RICCONI ET AL., 2016). The ecophysiology of the genus *Tuber* is not completely understood and the research is still ongoing. Different biotic and abiotic factors can influence truffles life cycle and geographic distribution. The relatively wide host species range is common for all truffle species and therefore the host availability should be a minor issue. Among the abiotic factors, the soil composition seems to have an important role. Generally speaking, truffles are found in calcareous, slightly basic soils (pH between 7 and 8), with the exception of *T. borchii* which can grow in slightly acidic soils. The climatic conditions seem to be important for the distribution of some *Tuber* species (BODDY ET AL., 2014; THOMAS, 2014). M. Gryndler et al. (2017) underline the influence of temperature on the presence of *T. aestivum* in the Czech Republic, since the summer truffle was found only on warmer locations.

Since the ancient times truffles have been appreciated for their particular taste and used as food (HALL ET AL., 2007; ROSSI, 2011). The records of the presence of truffles as delicacies are present in books from the 17th century to the present day (ROSA-GRUSZECKA ET AL., 2017). Due to the limited availability, the price of true truffles is high. White truffle, *T. magnatum*, is among the most expensive food; depending

za *T. aestivum* su znatno niže i to zbog većih dostupnih količina i rasprostranjenosti, duljeg razdoblja branja i mogućnosti uzgoja (MELLO I DR., 2006).. Unatoč tome, cijena ljetnih tartufa i dalje je visoka, a ovisno o prinosu može dosegnuti i nekoliko stotina eura. Crni ljetni tartuf stoga je zanimljiv i za uzgoj i zbog branja u prirodi. Tartufi su lako kvarljivi pa se više istraživanja da im se produži trajnost (ROMANAZZI I DR., 2016). U Hrvatskoj je Istra jedina regija poznata po branju tartufa (ZAMBONELLI I DR., 2015.; RICCIONI I DR. 2016.). Jedno od najvažnijih područja rasprostranjenosti bijelog tartufa (*Tuber magnatum*) u Istri je Motovunska šuma u kojoj se tartufi beru od 1930-ih (BRAGATO I DR., 2004.). Tek je odnedavno uloženo više napora u dokumentiranje i istraživanje i drugih područja rasprostranjenosti i pogodnosti za uzgoj tartufa u Hrvatskoj. I. Tikvić i dr. (2017.) istraživali su prirodnu rasprostranjenost tartufa u Hrvatskoj, ali je njihovo istraživanje obuhvaćalo samo područje Posavine (regija uz rijeku Savu) i SZ Hrvatsku gdje su pronašli primjerke crnih i bijelih tartufa. Prema I. Tikviću i dr., druge poznate lokacije tartufa, osim Istre, postoje na različitim područjima u Slavoniji, a samo je jedno poznato područje u cijeloj južnoj Hrvatskoj i to na poluotoku Pelješcu. Dakle, do sada se nigdje nije navodilo zadarsko područje koje ima sve okolišne i prirodne uvjete za rast tartufa, međutim činjenica je da do sada tartufi nisu ni traženi na tome području. Po usmenoj predaji, tartufi su se u prošlosti povremeno nalazili u različitim dijelovima zadarskog područja. Spominje se i da je u novinama tijekom talijanskog upravljanja gradom objavljen članak koji govori o golemom tartufu pronađenom u blizini Zadra. Nažalost, istraživanje ovoga članka u arhivima nije dalo rezultata jer nije pronađen. Uzimajući kao polazište u obzir ovu usmenu informaciju te okolišno-prirodne preduvjete za rast tartufa, 2014. su potvrđeni nalazi tartufa na različitim lokacijama Zadarske županije.

## PRIRODNE OSOBITOSTI MJESTA ISTRAŽIVANJA

Istraživanja mogućih nalaza tartufa provedena su na različitim potencijalnim lokacijama u Zadarskoj županiji, preciznije u okolici Novigrada,

on year's harvest the prices can reach 4,000 euro per kg (FIGLIUOLO ET AL., 2013). The prices of *T. aestivum* are much lower, due to the major presence and distribution, longer harvesting period and a major possibility of cultivation (MELLO ET AL., 2006). Nevertheless, the price of summer truffles is still high; depending on yield it can reach a few hundred euro per kg. That makes the black summer truffle interesting both for cultivation and harvesting in the wild. Truffles are highly perishable, and strategies to extend their shelf life are under evaluation (ROMANAZZI ET AL., 2016). In Croatia, the only region known for collecting truffles is Istria (ZAMBONELLI ET AL., 2015; RICCIONI ET AL. 2016). One of the most important production area for *T. magnatum* in Istria is Motovun Forest, where truffles have been collected since the 1930s (BRAGATO ET AL., 2004). Recently more effort has been made in documenting other areas in Croatia suitable for truffles growth. I. Tikvić et al. (2017) researched natural distribution of truffles in Croatia but their research comprised only the area of Posavina (a region along Sava River) and NW Croatia where they found black and white truffle specimens. According to I. Tikvić et al. (2017), other known truffle locations, besides Istria, are in different areas in Slavonia and there is only one known location in all Southern Croatia (on Pelješac peninsula). There is no mention of Zadar region which also has all environmental conditions for truffle growth, but they were never even searched for in that area. According to the tales of older population, in the past the truffles were occasionally found in different parts of the County. Apparently, there was an article in a newspaper during the Italian governance of the city about a huge truffle found near the city of Zadar. Unfortunately, the search for this article in archives gave no results. Considering this story and the environmental conditions suitable for spontaneous truffle growth, in 2014 we verified the presence of truffles in different locations of Zadar County.

## NATURAL FEATURES OF STUDY SITE

The search for truffles was conducted in different meadows in Zadar County, and to be more precise, in the surroundings of cities of Sv. Rok, Novigrad, Benkovac, Maslenica, Miljevci area, Rovanska and

Benkovca, Maslenice i Rovanjske. Lokacije su odabrane na temelju prirodnih značajki tih područja s obzirom na to da su klima i tla slična područjima rasta tartufa u Istri. Od svih istraživanih područja tartufi su u Zadarskoj županiji pronađeni na tri lokacije: Žegar, Rovanjskoj i Maslenici.

Sve lokacije su u krškom području, uglavnom vapnenačke i dolomitne geološke građe, najčešće sa smeđim tlima (kalkokambisoi) ili rendzinama na vapnencu, te ponešto crnice na vapnencu (BAŠIĆ, 2012.).

Područja pripadaju mediteranskoj vegetacijskoj regiji, mediteransko-obalnom vegetacijskom pojasu i submediteranskoj vegetacijskoj zoni (TRINAJSTIĆ, 1998.). Tipična biljna zajednica ovoga područja je šuma hrasta medunca i bijeloga graba (*Quercus-Carpinetum orientalis*, HORVATIĆ, 1939.) (VUKELIĆ I DR., 2008.). Svojevrsne biljne vrste su: hrast medunac (*Quercus pubescens* Willd.), bijeli grab (*Carpinus orientalis* Mill.), hrast cer (*Quercus cerris* L.), crni jasen (*Fraxinus ornus* L.) i druge (TRINAJSTIĆ, 1998.).

Zadarsko zaleđe, što je područje istraživanja, ima umjerenu klimu (klimatska zona C prema Köppenovoj klasifikaciji) te pripada klimatskim tipovima Csa (sredozemna klima s vrućim ljetom) i Csb (sredozemna klima s toplim ljetom) (FILIPČIĆ, 2000.) koji u SI dijelu županije prelaze u hladniju i vlažniju klimu Cfa (umjereno topla vlažna klima s vrućim ljetom) i Cfb (umjereno topla vlažna klima s toplim ljetom). Zanimljivo je da se sva tri područja gdje su pronađeni tartufi u sjevernoj Dalmaciji nalaze na granici između klimatskih tipova Cs i Cf. U Istri su glavna područja tartufa u unutrašnjosti istarskog poluotoka (poput Motovunske šume) s klimatskim tipom Cfb. Isti klimatski tip prisutan je u SZ i istočnoj Hrvatskoj (FILIPČIĆ, 2000.) gdje su i druge lokacije pronalaska tartufa.

## MATERIJALI I METODE

### *Uzimanje uzoraka tartufa*

Tartufi su traženi na različitim lokacijama makije i gariga u Zadarskoj županiji. Točnije, traženi su u okolici Svetoga Roka, Novigrada, Benkovca, Maslenice, Rovanjske i drugdje. Za traženje tartufa korištena su dva psa trenirana za traženje tartufa pasmine *Lagotto Romagnolo* i njihov voditelj s do-

other. Locations were chosen based on natural features of the area since climate and soils are similar to the sites where truffles can be found in Istria. Out of all research area, truffles were found in three locations: in Žegar, Rovanjska and Maslenica area, all situated in Zadar County.

All locations are in karst area, mostly built of limestone and dolomite and covered with brown soils (kalkokambi soil) or rendsina soil on limestone and also black soil (BAŠIĆ, 2012)

Those areas belong to the Mediterranean vegetation region, Mediterranean-littoral vegetation belt and the Submediterranean vegetation zone (TRINAJSTIĆ, 1998). The typical plant community of this area is forest of pubescent oak and oriental hornbeam (*Quercus-Carpinetum orientalis*, HORVATIĆ, 1939) (VUKELIĆ ET AL. 2008). Common species are: pubescent oak (*Quercus pubescens* Willd.), oriental hornbeam (*Carpinus orientalis* Mill.), turkey oak (*Quercus cerris* L.), South European flowering ash (*Fraxinus ornus* L.) and others (TRINAJSTIĆ, 1998).

Zadar hinterland, including researched area, has a temperate climate (C climate zone according to Köppen classification), mostly Csa (hot-summer Mediterranean climate) and Csb (warm-summer Mediterranean climate) climate types (FILIPČIĆ, 2000) which in NE part of the County change to cooler and more humid Cfa (humid-subtropical climate) and Cfb (temperate oceanic climate) climate types. It is interesting that all three areas where truffles were found in the North Dalmatia, are situated on the border between Cs and Cf climate types. In the Istria the main locations of truffles are in the hinterland of the peninsula (such as Motovun forest) which is situated in Cfb climate zone. The same climate type is present in the NW and East Croatia (FILIPČIĆ, 2000) where others truffle locations were found.

## MATERIAL AND METHODS

### *Truffle hunt*

The search for truffles was carried out in different meadows in Zadar County, and, to be more precise in the surroundings of cities of Sv. Rok, Novigrad, Benkovac, Maslenica, Rovanjska and other. A truffle hunter and his two *Lagotto Romagnolo* dogs trained for truffle hunt were recruited for

zvolom za branje tartufa. Uzorci za koje se postavilo da su *T. aestivum* stavljeni su u sterilnu papirnatu vrećicu, zatvoreni i čuvani u zamrzivaču na -20 °C do početka molekularnih analiza.

### Molekularne analize

Ekstrakcija DNK iz *T. aestivum* provedena je prema sljedećoj metodi. Tuberi su isprani pod mlazom tekuće vode, zatim su oprani u demineraliziranoj vodi i liofilizirani. Oko 30 mg plodnog tijela samljeveno je u tekućem dušiku i inkubirano preko noći na 55 °C u 1 mL C-TAB pufera za ekstrakciju (NaCl 2,8 M; Tris-HCl 200 mM pH 8,0; EDTA 40 mM; C-TAB 4 % w/v; proteinaze K 100 mg/mL). Nakon inkubacije uzorci su 20 minuta stavljeni na 65 °C i zatim u led na 10 minuta. Uzorci su centrifugirani 15 minuta na 4 °C i 12,000 rpm i supernatantu je dodan isti volumen mješavine fenol-kloroforma i izoamilnog alkohola (Phe:Chl:IAA 25:24:1 v:v:v). Nakon 30 minuta inkubacije na 25 °C i 10-minutnog centrifugiranja na 8,000 rpm gornjoj vodenoj fazi dodano je 1/10 volumena C-TAB II pufera (C-TAB 10 % w/v, NaCl 0,7 M) i 1 volumen mješavine Chl:IAA 24:1 v:v. Otopina je centrifugirana 5 minuta na 13,000 rpm. Gornja vodena faza je sakupljena i dodan je isti volumen CTAB III otopine (C-TAB 1 % w/v; Tris -HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM) i Chl:IAA 24:1 v:v te je ostavljeno na 25 °C 30 minuta. Uzorak je centrifugiran na 13,000 rpm 5 minuta, a nukleinske kiseline su precipitirane dodavanjem 0,6 volumena hladnog 2-propanola. Pelet je ispran sa 70 % (v/v) hladnim etanolom, osušen i resuspendiran u 30 µL sterilne vode koja je sadržavala 20 mg/mL RNA-ze.

DNK (10ng) je korišten kao predložak u PCR analizi kako bi se provjerilo pripadaju li uzorci vrsti *T. aestivum*. PCR je izveden kako su opisali Gryndler i dr. (2011.), pomoću sljedećih specifičnih početnica (primera): Tu2sekvF 5'-AGAGCACCAAACCACAG-3'; Tu2sekvR 5'-ACCACAGCGTCTACCAA-3'. PCR je izveden s REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Merck, US) u totalnom volumenu od 25 µL. Program upotrijebljen za izvođenje PCR bio je: 4' na 95 °C i koraci na 94° 30", 56 °C 30" i 72 °C 5' ponovljeni su u 35 ciklusa. Rezultati su vizualizirani metodom elektroforeze na agaroznom gelu (1 % w / v).

the research. The presumed truffles were collected, put in sterile paper bag, sealed and put in freezer at -20 °C until the analysis.

### Molecular analysis

The DNA from *T. aestivum* was extracted using the following method. The truffles were first brushed under a stream of tap water and subsequently washed with deionized water and lyophilized. About 30 mg of fruiting bodies was ground in liquid nitrogen and incubated o/n at 55 °C with 1 mL C-TAB extraction buffer (NaCl 2.8 M; Tris-HCl 200 mM pH 8.0; EDTA 40 mM; C-TAB 4% w/v; proteinase K 100 mg/mL). After incubation, samples were placed at 65 °C for 20 min and then on ice for 10 min. The samples were centrifuged at 12,000 rpm at 4 °C for 15 min and, the same volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (Phe:Chl:IAA 25:24:1 v:v:v) was added to the supernatant. After 30 min incubation at 25 °C and centrifugation at 8,000 rpm for 10 min, 1/10 volume of C-TAB II buffer (C-TAB 10% w/v, NaCl 0,7 M) and 1 volume of Chl:IAA 24:1 v:v was added to the upper aqueous layer. The solutions were centrifuged at 13,000 rpm for 5 min and collect upper aqueous layer. The same volume of CTAB III solution (C-TAB 1% w/v; Tris -HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM) and Chl:IAA 24:1 v:v were added and left at 25 °C for 30 min. After centrifuge at 13,000 rpm for 5 min, the nucleic acids were precipitated by adding 0.6 volume of cold 2-propanol. The pellet was washed with 70% v/v cold EtOH, dried and resuspended in 30 µL sterile water containing 20 mg/mL RNase.

The DNA (10ng) was used as template to proceed with the PCR analysis to check if the samples belong to the *T. aestivum* species. The PCR was performed as reported by Gryndler et al. (2011) using the following species-specific primers: Tu2sekvF 5'-AGAGCACCAAACCACAG-3'; Tu2sekvR 5'-ACCACAGCGTCTACCAA-3'. The PCR was performed with the REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Merck, US) in a total volume of 25 µL. The program used to perform the PCR was: 4' at 95 °C and steps of 94° for 30", 56 °C for 30" and 72 °C for 5' were repeated for 35 cycles, and the results were visualized on agarose gel (1% w/v) electrophoresis.

## REZULTATI

Tartufi su pronađeni na različitim lokacijama. Za molekularnu analizu odabrana su tri pronađena uzorka prikupljena na različitim lokacijama i povezana uz biljke domaćine. Uzorak A pronađen je u okolini Maslenice, uz korijenje bijeloga graba (*Carpinus orientalis* Mill.), a težio je 71 gram. Uzorak B pronađen je na lokaciji Žegar uz korijenje hrasta medunca (*Quercus pubescens* Willd.), a težio je 43 grama. Uzorak C pronađen je na lokaciji Rovanjaska također uz korijenje hrasta medunca, a težio je 69 grama (Sl. 1.).

Slika 2. prikazuje akrilamidni gel s rezultatima sekvenciranja DNK pronađenih primjeraka. Veličina sekvence (800 bp) dobivene kod vršno specifične početnice *Tuber aestivum* (GRYNDLER I DR., 2014. pokazala je da tri prikupljena uzorka pripadaju toj vrsti.

## RESULTS

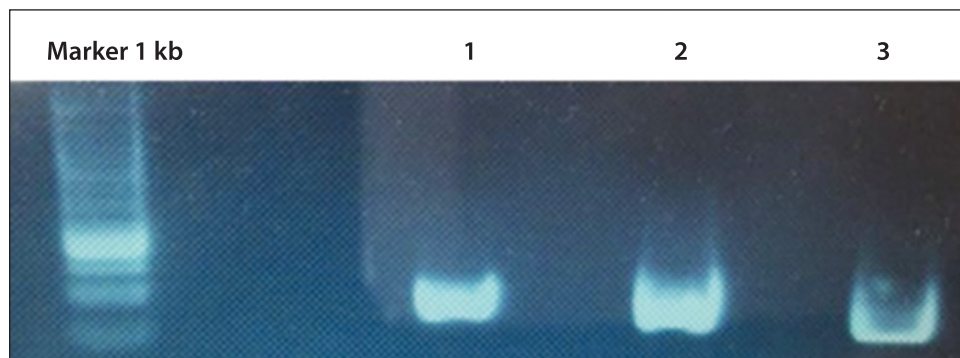
Truffles were found in different locations. Three samples collected in different locations and associated with different host plants were chosen for molecular analysis. Sample A was found in the surroundings of Maslenica associated with the roots of oriental hornbeam (*Carpinus orientalis* Mill.) and weighed 71 g. Sample B was found on a location Žegar associated to the roots of a pubescent oak (*Quercus pubescens* Willd.) and it weighed 43 g. Sample C was found on location Rovanjaska, it was also associated with pubescent oak (*Quercus pubescens* Willd.) and weighed 69 g (Fig. 1).

In Figure 2 the agarose gel with the amplification results of the DNA of our samples is shown. The amplicon size (800 bp) obtained with the species-specific primers of *T. aestivum* (GRYNDLER ET AL., 2014) demonstrating that three collected fruiting bodies belong to that species.



SLIKA 1. Crni ljetni tartufi pronađeni na lokacijama Maslenica (A), Žegar (B) i Rovanjaska (C)

FIGURE 1 The black summer truffle fruiting bodies found in Maslenica (A), Žegar (B) and Rovanjaska (C)



SLIKA 2. Rezultati sekvenciranja uzorka (Linije 1, 2, 3) s početnicama Tu1- sekvF/Tu2sekvR

FIGURE 2 Products of sample amplification (Lane 1, 2, 3) with primers Tu1- sekvF/Tu2sekvR

## RASPRAVA I ZAKLJUČAK

Rezultati nedvojbeno upućuju na to da je *T. aestivum*, ljetni crni tartuf, prisutan na području Zadarske županije. Pronađeno je nekoliko primjeraka na različitim lokacijama što upućuje na to da postoji mogućnost da je rasprostranjen i na širem području. Budući da nisu postojale spoznaje o njegovoj prisutnosti te se nije ni prikupljao, tartuf je vjerojatno kolonizirao široko područje i ima ga u većim količinama. Dobiveni rezultati su važni sa znanstvenog aspekta. Bilo bi zanimljivo vidjeti kako su zadarski tartufi povezani s ostalim *T. aestivum* kolonijama rasprostranjenim diljem Europe. Jedina hrvatska renomirana regija što se tiče tartufa je Istra (GRYNDLER I DR., 2017.), pa se nameće pitanje u kakvoj su vezi zadarski i istarski tartuf. Uzevši u obzir razmjerno malu udaljenost između tih dviju regija (oko 250 km) postoji vjerojatnost da te dvije populacije imaju zajedničke pretke. To je bitno s aspekta budućih genetičkih studija koje bi se trebale provesti tako da se prikupe uzorci tartufa u oba područja i analiziraju njihovi genomi. Drugo pitanje koje se postavlja jest je li bilo ili još postoji kontinuirani rast tartufa na području od Istre, duž jadranske obale do zadarskog područja te eventualno i južnije. Provest će se i istraživanje prisutnosti *T. aestivum* između zadarskog područja i Istre. Istraživanje genetike populacije trebalo bi se provesti kako bi se potvrdila povezanost između dviju populacija te da bi se utvrdilo imaju li isto podrijetlo. Druga mogućnost, koju se ne može isključiti, je da su zadarski tartufi više povezani s talijanskim nego s istarskim. Tijekom dugogodišnje povijesti zajedničke uprave, primjerice za vrijeme Mletačke Republike i Austro-Ugarskog Carstva, bila je omogućena lakša trgovina između Zadra i nekih talijanskih regija. Mnoge talijanske regije bogate su tartufima, a među njima je i nekoliko apeninskih regija s druge strane Jadranskog mora poput regija Marche, Umbrija i Abruzzo (POMARICO I DR., 2007.; VASQUEZ ET AL., 2014.; ZAMBONELLI ET AL., 2015.). Moguće je da su tartufi slučajno uvezeni iz Italije (ili i iz Istre) s nekim drvećem te su se kasnije spontano proširili regijom. Odgovor na ova pitanja može dati samo dublja analiza genetike populacije što se planira provesti u nastavku istraživanja.

Rezultati također mogu imati utjecaja na gospo-

## DISCUSSION AND CONCLUSION

The results show that *T. aestivum*, the black summer truffle, is present in Zadar County. It was found on different locations indicating that its presence could be widespread. The ignorance of its presence, and therefore non-harvesting, has probably allowed the mushroom to colonize a large area and to be present in abundance. From the scientific point of view these results are important. It would be interesting to understand how Zadar's truffles are related to other *T. aestivum* colonies present in Europe. In Croatia the only renowned region for truffles is Istria (GRYNDLER ET AL., 2017), and the question 'What is the relation between Zadar and Istrian truffles?' arises spontaneously. Considering a relatively short distance between these two regions (around 250 km) it is rather probable that the two populations have the same ancestors. It is important for further population genetic studies by collecting truffles in both area and analysing their genomes. Another question is if there was or still is a continuous growth of truffles from Istria along the Adriatic coast to Zadar County and, possibly further south. The research of *T. aestivum* presence in the area between Zadar and Istria will be undertaken. The study of population genetics should be performed to verify the links between the two populations and establish whether they have a common origin. The other possibility, that cannot be excluded, is that Zadar truffle population is more linked to the Italian population than to the Istrian one. A long history of common governance, like the Republic of Venice and the Austro-Hungarian Empire, has facilitated the trade between Zadar and some Italian regions. Many Italian regions are reported to be rich with truffles, among whom are also Appennine regions across the Adriatic Sea such as Marche, Umbria and Abruzzo (POMARICO ET AL., 2007; VASQUEZ ET AL., 2014; ZAMBONELLI ET AL., 2015). The truffles might have been were accidentally imported from Italy (as well as from Istria) with some trees and afterwards spontaneously spread over the region. The answer to these questions could be given only by an in-depth population genetics analysis which is in future plans.

The results could also have an impact on the economy in the region. The truffles are among

darstvo ovoga područja. Kao što je spomenuto, tartufi spadaju u najskuplju vrstu hrane. Na zadarskom području pronađeni su u zaleđu, a neka od područja koja su bogata tartufima izrazito su depopulirana.

Tartufi mogu pokrenuti lokalno gospodarstvo i pružiti šansu lokalnom stanovništvu, pogotovo onom mlađem, za bolji životom i omogućiti im opstanak u njihovim selima. Na zadarskom je području razvijen turizam što omogućuje lakši plasman tartufa na lokalno tržište. Spontana prisutnost tartufa upućuje na to da je ovo područje povoljno za njihov rast te da bi se tamo tartuf mogao i uzgajati. Najbolji način za tako nešto možda bi bio reforestacijom stablima mikoriziranim autohtonim izolatima.

#### ZAHVALA

Autori posebno zahvaljuju gospodinu Ivanu Matak koji je sa svojim treniranim psima proveo potragu za tartufima na području Zadarske županije.

Istraživanje je djelomično financirala Agencija za ruralni razvoj Zadarske županije (AGRRA).

the most expensive food, as already told. In Zadar County, they were found in hinterland and some of the areas rich with truffles are depopulated. The truffles could enhance the local economy and give an opportunity for younger population to remain in their villages. The developed tourism in the region could both benefit from the presence of truffles and help the local population to place their truffle products on the market. The spontaneous presence of truffles indicates that this territory is suitable for their growth and therefore in these areas some truffle cultivation could be undertaken. Maybe the best way could be through the reforestation using trees mycorrhized with autochthon strains.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express their gratitude to Mr Ivan Matak who, with his trained dogs, performed the search for truffles in Zadar County.

This research was partially granted by the Agency for Rural Development of Zadar County-AGRRA.



## LITERATURA / BIBLIOGRAPHY

- BAŠIĆ, F. (2012): Tla Hrvatske – temelj održivog razvoja, u: *Šume, tla i vode – neprocjenjiva bogatstva Hrvatske*, Zbornik radova, (ur. Matić, S., Tomić, F., Anić, I.), Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb, 37-56.
- BODDY, L., BUNTGEN, U., EGLI, S., GANGE, A.C., HEEGAARD, E., KIRK, P.M., MOHAMMAD, A., KAUSERUD, H. (2014): Climate variation effects on fungal fruiting, *Fungal Ecology*, 10, 20-33, DOI: 10.1016/j.funeco.2013.10.006
- BRAGATO, G., SLADONJA, B., PERŠURIĆ, Đ. (2004): The soil environment for *Tuber Magnatum* growth in Motovun Forest, Istria, *Natura Croatica*, 13 (2), 171-185.
- BUNTGEN, U., BAGI, I., FEKETE, O., MOLINIER, V., PETER, M., SPLIVALLO, R., VAHADATZADEH, M., RICHARD, F., MURTAT, C., TEGEL, W., STOBBE, U., MARTINEZ-PENA, F., SPROLL, L., HULSMANN, L., NIEVERGELT, D., MEIER, B., EGLI, S. (2017): New insight into the complex relations between weight and maturity of burgundy truffle (*Tuber aestivum*), *PLoS ONE*, 12 (1), e0170375, DOI: 10.1371/journal.pone.0170375.
- FIGLIUOLO, G., TRUP, G., MANG, S. (2013): A realized *Tuber magnatum* niche in the upper Sinni area (Southern Italy), *Open Journal of Genetics*, 3, 102-110, DOI: 10.4236/ojgen.2013.32013
- FILIPČIĆ, A. (2000): Razgraničenje Köppenovih klimatskih tipova Cf i Cs u Hrvatskoj, *Acta Geographica Croatica*, 35, 7-18.
- GAZO, J., MIKO, M., CHEVALIER, G. (2005): First results of inventory research on economically important species of truffles (*Tuber*) in the Tribec Mountains, *Acta Fytotech Zootech*, 8 (3), 66-71.
- HALL, I. R., BROWN, G., ZAMBONELLI, A. (2007): *Taming the Truffle: The History, Lore and Science of the Ultimate Mushroom*, Timber Press, Portland, pp. 304.
- HILSZCZANSKA, D., SIEROTA, Z., PALENZONA, M. (2008): New *Tuber* species found in Poland, *Mycorrhiza*, 18, 223-226, DOI: 10.1007/s00572-008-0175-4
- GRYNDLER, M., HRŠELOVÁ, H., SOUKUPOVÁ, L., STREIBLOVÁ, E., VALDA, S., BOROVIČKA, J., GRYNDLEROVÁ, H., GAŽO, J., MIKO, M. (2011): Detection of summer truffle (*Tuber aestivum* Vittad.) in ectomycorrhizae and in soil using specific primers., *FEMS Microbiology Letters*, 318, 84-91, DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02243.x
- GRYNDLER, M., TRILČOVÁ, J., HRŠELOVÁ, H., STREIBLOVÁ, E., GRYNDLEROVÁ, H., JANSKA, J. (2013): *Tuber aestivum* Vittad. mycelium quantified: advantages and limitations of a qPCR approach, *Mycorrhiza*, 23, 341-348, DOI: 10.1007/s00572-012-0475-6
- GRYNDLER, M., ČERNÁ, L., BUKOVSKÁ, P., HRŠELOVÁ, H., JANSKA, J. (2014): *Tuber aestivum* association with non-host roots, *Mycorrhiza*, 24, 603-610, DOI: 10.1007/s00572-014-0580-9
- GRYNDLER, M., ŠMILAUER, P., ŠTROVOČEK, V., NOVAKOVA, K., HRŠELOVA, H., JANSKA, J. (2017): Truffle biogeography – A case study revealing the ecological niche separation of different *Tuber* species, *Ecology and Evolution*, 7 (12), 4275-4288, DOI: 10.1002/ece3.3017
- MELLO, A., MURAT, C., BONFANTE, P. (2006): Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy, *FEMS Microbiological Letters*, 260, 1-8, DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00252.x
- POMARICO, M., FIGLIUOLO, G., RANA, G. L. (2007): *Tuber* spp. biodiversity in one of the southernmost European distribution, *Biodiversity and Conservation*, 16, 3447-3461, DOI: 10.1007/s10531-006-9013-1
- RICCIONI, C., RUBINI, A., BELFIORI, B., GREGORI, G., PAOLOCCI, F. (2016): *Tuber magnatum*: The Special One, What makes it so different from the other *Tuber* spp?, u: *True truffle (Tuber spp.) in the world*, (ur. Zambonelli A., Iotti M., Murat C.), Springer International Publishing, Switzerland, 87-103.
- ROMANAZZI, G., SERVILI, A., MUROLO, S. (2016): Postharvest diseases of *Tuber melanosporum*, *Acta Horticulturae*, 1144, 129-131, DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1144.18
- ROSA-GRUSZECKA, A., HILSZCZANSKA, D., GIL, W., KOSEL, B. (2017): Truffle renaissance in Poland – hi-

story, present and prospects, *Journal of Ethnobiology and Etnomedicine*, 13 (36), 1-11, DOI: 10.1186/s13002-017-0163-x

ROSSI, S. (2011): *Tartufi. Frutti della terra figli degli dei*, SAGEP, Genova, 2011, pp. 224.

THOMAS, P. W. (2014): An Analysis of Climatic Parameters needed for *Tuber melanosporum* cultivation incorporating data from six continents, *Mycosphere*, 5 (1), 137-142, DOI: 10.5943/mycosphere/5/1/5

TIKVIĆ, I., UGARKOVIĆ, D., ZEČIĆ, Ž., KORIJAN, P., GAŠPAR, D. (2017): Prirodna nalazišta tartufa u Hrvatskoj i ekološki problem njihovog razvoja, *Šumarski list*, 5-6, 263-269, DOI: 10.31298/sl.141.5-6.5

TRINAJSTIĆ, I. (1998): Fitogeografsko raščlanjenje klimazonalne šumske vegetacije Hrvatske, *Šumarski list*, 9-10, 407-421.

VASQUEZ, G., GARGANO, A., ZAMBONELLI, A., VENTURELLA, A. (2014): New distributive and ecological data on *Tuber magnatum* (*Tuberaceae*) in Italy, *Flora Mediterranea*, 24, 239-245, DOI: 10.7320/FIMedit24.239

VUKELIĆ, J., MIKAC, S., BARIČEVIĆ, D., BAKŠIĆ, D., ROSAVEC, R. (2008): *Šumska staništa i šumske zajednice u Hrvatskoj*, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, pp. 263.

WEDEN, C., DANELL, E., CAMACHO, F. J., BACKLUND, A. (2004): The population of the hypogeous fungus *Tuber aestivum* syn. *T. uncinatum* on the island of Gotland, *Mycorrhiza*, 14 (1), 19-23, DOI: 10.1007/s00572-003-0271-4

ZAMBONELLI, A., IOTTI, M., PIATTONI, F. (2012): Chinese *Tuber aestivum sensu lato* in Europe, *The Open Mycology Journal*, 6, 22-26, DOI: 10.2174/1874437001206010022

ZAMBONELLI, A., IOTTI, M., HALL, I. (2015): Current status of truffle cultivation: recent results and future perspectives, *Micologia Italiana*, 44 (1), 31-30, DOI: 10.6092/issn.2465-311X/5593