

Abschlussbericht

Kooperation

Trüffelanbau in Thüringen

Vorhaben

Wissenschaftlich fundierte Anbauversuche in der Pilzwirtschaft mit verschiedenen Trüffelspezies zum Aufbau neuer regionaler Wertschöpfungsketten in der Land- und Forstwirtschaft, im Gastgewerbe und Tourismus

Projektnummer: **2020 LFE 0016**

Laufzeit: **01.06.2021 – 31.12.2024**

Gefördert durch die Thüringer Aufbaubank nach der Förderrichtlinie „Förderung der Zusammenarbeit in der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft in Thüringen“ (LFE).



Ministerium
für Infrastruktur
und Landwirtschaft

Antragsteller und Kooperationspartner

1. Antragsteller/Ideengeber:

- Thüringer Freilandpilze GmbH (TFP) Anja Kolbe-Nelde (AKN) Geschäftsführerin, Pilz- und Landwirt, Projektleitung, Trüffelpilzschule Jägerstraße 15a | 06571 Roßleben-Wiehe OT Schönewerda | info@freilandpilze.de | 0 34 672 / 93 28 64

2. Kooperationspartner bzw. Mitglieder der operationellen Gruppe (O.G.):

- LWB Happy Horst GmbH, Landwirt, Mark & Kirsten Tänzer
- TBV Thüringer Bauernverband - Koordination & Controlling Yvonne Küntzer
- Friedrich-Schiller-Universität Jena (FSU) - Institut für Mikrobiologie Prof. Dr. Erika Kothe und Prof. Dr. Philipp Franken (FHS Erfurt) + Dr. Katrin Krause + Aswathi Gopa Kumar Nair
- Christiane Fritz, Projektmitarbeiterin (ausgeschieden)
- mediadee Nürnberger & Boehmer GbR, Sabrina Nürnberger (GF)

Assoziierte Partner:

- Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante (IPSP), Institut für nachhaltigen Pflanzenschutz, Prof. Dr. Raffaella Ballestrini, 10125 Torino, Italien
- Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE) Nationales Forschungsinstitut für Landwirtschaft, Ernährung und Umwelt, Frankreich Dr. Claude Murat (Ingénieur de Recherche) 54280 Champenoux, Frankreich

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abschlussbericht	4
Arbeitspaket 1 - Standort-Analyse	4
Ermittlungen zur natürlichen Verbreitung in Thüringen mit	
Erkundung potenzieller Anbaugebiete	4
Aufbau regionaler Wertschöpfungsketten	5
Neue Erkenntnisse: Weitere marktfähige Trüffeln nachgewiesen	6
Neue Erkenntnisse: Ausgangsgesteine Keuper-Röt-Travertin	6
Neue Erkenntnisse: weitere Mykorrhizapartner	7
Gewollte Zuarbeit durch Bevölkerung	8
Neue Erkenntnisse: Beispiel Fundstelle Wieling, Reifegradverteilung	11
Neue Erkenntnisse: Ermittlungen zum Größenzuwachs	11
Analyse von Fundstellen	12
Kartierung von Vorkommen zur Ermittlung positiver Standortfaktoren	16
Arbeitspaket 2 – Wissenschaftliche Begleitung	19
Analyse der bakteriellen Gemeinschaft an, in und um die Fruchtkörper	20
Zusammensetzung des Mikrobioms	22
Wichtigkeit des Stickstoffzyklus	24
Physiologische Charakterisierung von Isolatn der Testfelder	28
Interaktionen von Bakterien mit <i>Tuber</i> -Mycelium	29
Einfluss abiotischer Faktoren auf Interaktionen mit <i>Tuber</i>	30
Herstellung eines eigenen Inokulats zur Förderung der Trüffelbildung	
in Trüffelpärten	31
Laborversuche zum Trüffelpwachstum	31
Arbeitspaket 3 – Herstellung Trüffelpbäume	33
Fruchtifikation/Produktionsbedingungen	34
Arbeitspaket 4 – Anbauversuche im Feld	35
Analyse von Standortfaktoren für die Testfelder	38
Arbeitspaket 5 – Verbesserung Rahmenbedingungen	41
Maßnahmen zur Aufklärung und Wissensverbreitung	42
Literatur	50
Abschlussarbeiten und wissenschaftliche Veröffentlichungen	50
Fazit und Ausblick	53

Abschlussbericht

Die Arbeiten sollten die Möglichkeiten des Trüffelanbaus in Thüringen ausloten, wobei sowohl natürliche Fundstellen als auch die Anlage von Trüffelplantaten sowie eine wissenschaftliche Begleitung geplant waren. Die Arbeiten gliederten sich in 5 Arbeitspakete. Deren Stand nach Abschluss des Projekts ist im Folgenden dargestellt.

Arbeitspaket 1 – Standort-Analyse

Ermittlungen zur natürlichen Verbreitung in Thüringen mit Erkundung potenzieller Anbauggebiete

Der Start zum Nachweis natürlicher Fundstellen von *Tuber aestivum* (Sommertrüffel) bzw. *Tuber uncinatum* (Burgundertrüffel) erfolgte am 01. Juli 2021. Dabei entpuppte sich die Trüffelsaison 2021 rein zufällig und überraschend als vorzügliches Trüffeljahr. Teilweise unterstützt durch hochqualifizierte und zertifizierte Suchteams der Forschungsgruppe Hypogäen (FGH) aus Oberhausen, Mönchengladbach, Aachen, Osnabrück und Würzburg konnten wir erste Nachweise von natürlichen Trüffelstellen für Thüringen in insgesamt 14 Landkreisen erbringen. Über diese Aktivitäten, insbesondere innerörtliche Sucherfolge berichteten wir Landkreis für Landkreis mit bebilderten Kurzberichten und kurzen Videosequenzen von Beginn an auf unserer Website www.thüringer-trüffelanbau.de. Darüber hinaus setzten wir die regionale Presse, Radio und Fernsehsender in Kenntnis. Mehrfach begleiteten uns verschiedene Redaktionen des mdr, um Trüffelvorkommen und Trüffelanbau aus verschiedenen Sichtweisen der Bevölkerung näher zu bringen.

Mindestens 100 Trüffelstellen insgesamt in Thüringen nachzuweisen, war die ursprüngliche Zielsetzung. Dazu hatten wir die Definition der Forschungsgruppe Hypogäen (FGH) übernommen, was eine „Trüffelstelle“ ausmacht. Danach zählt eine weitere Trüffelstelle dann, wenn diese mindestens 20 m von der nächsten Stelle entfernt ist. Überraschend und erstaunlich war die große Dichte bzw. Verteilung der Vorkommen. Wie so häufig im Startjahr 2021 erreichten wir nicht einmal die vorher im Büro festgelegten Untersuchungsgebiete, da wir auf dem Weg dorthin jeweils die Fahrstrecke ab Schönewerda nach potenziellen Stellen mit den Augen absuchten. Wenn wir so einen verdächtigen Bereich direkt an der Fahrstrecke ausmachten, hielten wir an, um zunächst den Boden auf CaCO_3 zu prüfen. Bei positivem Testergebnis wurde der Bereich sofort mit einem der Suchhunde überprüft. Da (fast) jeder Halt in den Kalkgebieten ein Treffer war, dauerte es nur wenige Wochen, bis wir 100 Stellen nachgewiesen hatten.

Allerdings bestätigte sich die Ermittlungen und Erfahrungen der FGH aus anderen Bundesländern, dass mindestens 150 – 200 Standorte in einer Region ausfindig gemacht werden müssen, um eine besonders ergiebige Stelle nachzuweisen. Es erfolgte die sofortigen Grobkartierung dieser Fundstellen vor Ort. Als vorläufiges Fazit teilten wir die Fundstellen bzw. Standorte nach der Produktivität nach unserer Einschätzung von 0 – VI ein. Fundstellen der Kategorie V oder VI sind mit Abstand am häufigsten, kommen nach unserer Überzeugung aber für den Trüffelanbau nicht in Frage. Bereiche der Kategorie IV und III stehen dagegen nur bedingt als Vorbilder für den

kommerziellen Anbau. Gelingt es, Trüffelstellen nach den natürlichen Vorgaben der Kategorie II bis 0 nachzubauen, erhält man Hohertragsplantagen. Diesem Ziel sind wir deutlich nähergekommen.

Es folgten die sehr schlechten Trüffeljahre 2022 und 2023 mit der mehrfachen Begehung bekannter Trüffelstellen im Jahr, und der erfolgreichen Erkundung von natürlichen Trüffelstellen in den Landkreisen Eichsfeld, Hildburghausen und Sonneberg. Hier konnten jetzt auch Gewicht, Reifegrade und Größe im Labor ermittelt werden. Aus Zeitmangel und wegen fehlendem Personal konnten nicht alle Landkreise auf das Vorkommen der Sommertrüffel (*Tuber aestivum*) untersucht werden. Externe Suchteams konnten wegen der großen Entfernungen nicht mehr gewonnen werden, so dass wir frühzeitig begannen, Interessenten mit ihren Hunden zu „Bürgerforschern“ auszubilden und bei Wochenend-veranstaltungen in den weiter entfernten Regionen mit einzusetzen.

Aufbau regionaler Wertschöpfungsketten

Gleichzeitig verbanden wir unsere Aktivitäten mit der Gründung und dem Aufbau regionaler Wertschöpfungsketten wie z.B. im Unstrut-Hainich Kreis mit Gastronomie/Tourismus, Hotelkette mit eigener Trüffelerzeugung (Gordon Keiling)

- Ilm-Kreis:
Gastronomie/Tourismus Gaststätte Riechheimer Berg, Landwirtschaft, Gastgewerbe und Tourismus
- Landkreis Gotha:
Landwirtschaft/Gartenbau/mdr
- Stadt/Jena:
Innerstädtische Nachweise mit Start in Jena direkt vor dem Gebäude der FSU



- Unstrut-Hainich Kreis
Gastronomie/Tourismus, Hotelkette
mit eigener Trüffelerzeugung (Gordon
Keiling)
- Ilm-Kreis
Gastronomie/Tourismus Gaststätte
Riechheimer Berg, Landwirtschaft,
Gastgewerbe und Tourismus
- Landkreis Gotha
Landwirtschaft/Gartenbau/mdr
- Stadt/Jena
Innerstädtische Nachweise mit Start in
Jena direkt vor dem Gebäude der FSU

Copyright by Thüringer Freilandpilze GmbH

Neue Erkenntnisse: Weitere marktfähige Trüffeln nachgewiesen

Neben einigen für den menschlichen Verzehr eher ungeeigneten Trüffelarten konnten wir mit *Tuber mesentericum* (Teertrüffel), *Tuber brumale* (Wintertrüffel), und *Tuber macrosporum* (Großsporige Trüffel) drei weitere marktfähige Trüffelarten nachweisen. Die letzten beiden Arten reifen erst zum Winterbeginn. Um diese ebenfalls in Thüringen in Kultur zu bringen, wären in einem Folgeprojekt zunächst die genauen IST-Daten zur Ökologie zu ermitteln, um dann Anbauversuche auf separaten Flächen zu etablieren. Mittel- bis langfristig könnten sie die Wertschöpfungskette bereichern und den Erzeugern zusätzliche Einnahmen bescheren.



Tuber macrosporum (Großsporige Trüffel)

- Erreicht marktfähige Größen bei uns
- Ähneln im Aussehen und Aroma der Perigord-Trüffel
- Oktober bis Dezember
- Preise etwa wie Perigord-Trüffel
- Vorkommen: Waldbereiche mit Auwaldcharakter
- Anbauversuche ggf. im Nachfolgeprojekt

Copyright by Thüringer Freilandpilze GmbH

Neue Erkenntnisse: Ausgangsgesteine Keuper-Röt-Travertin

Unsere bis 2023 durchgeführten Untersuchungen führten zu einigen neuen Erkenntnissen auch bei den bodenbildenden Ausgangsgesteinen. So konnten wir Funde über Keuper und Röt nachweisen. Nachweise über Travertin dagegen gab es durch die FGH z.B. schon in Brandenburg. Nun auch Erstnachweise in Thüringen im Hausgarten einer Forschungsbeteiligten in Jena. Während die Funde über Travertin und Röt vorläufig in die Kategorie V bzw. VI einzuordnen sind, überraschten Fundstellen über mittlerem und unterem Keuper mit bis hin zur Einordnung in Kategorie II.



Seite 7/54

Die in 2021 – 2023 gemachten geballten Erfahrungen, Erkenntnisse und Einsichten, darüber hinaus permanenter Personal- und Zeitmangel für Forschungsarbeiten neben der Erwerbstätigkeit führten dazu, sich anders zu organisieren. So galt es über neue Wege neue Mitwirkende in der Region zu finden und diese für die Tätigkeit zunächst als ehrenamtliche Bürgerforscher zu gewinnen, um später auch als Erntehelfer eingesetzt werden zu können. Insgesamt neun Grundkurse Trüffelsuche mit Hund, dazu zehn Weiterbildungskurse für Trüffelsucher führten zu neuen Nachweisen in 2024 nun auch in den geologisch nicht so begünstigten Landkreisen Greiz und Saale-Orla-Kreis.



Diese temporäre Unterstützung durch ausgebildete Trüffelsucher und Kartierer von Trüffelstellen führte zur Gründung einer externen Trüffelgruppe Thüringen/Sachsen, die bei Bedarf TFP Hilfestellung gewähren kann.

Gewollte Zuarbeit durch Bevölkerung

Um eine gewollte Zuarbeit durch die Bevölkerung zu ermöglichen, platzierten wir Aufrufe auf unsere Website und Wiederholungen in regionalen Zeitungen sich bei Trüffelfunden im eigenen Garten oder anderswo zu melden. Dies führte zu zusätzlichen Erfolgen, wie die zwei beispielhaft angeführten Ereignisse zeigen:



- Im Juni 2024 bat ein Trüffelschüler aus Arnstadt (Vortrag an der VHS in 2022) um Begutachtung seines Trüffelfundes aus seinem Garten
- Insgesamt 37 Trüffeln mit einem Gewicht von 1.260 g präsentierte er uns. Sie wurden sofort dokumentiert und bewertet.
- 150 bis 200 Fundstellen müssen ermittelt werden, um eine einzige hochproduktive Trüffelstelle – wie diese - zu entdecken.
- Insbesondere solche Fundstellen dienen aus unserer Sicht als Vorbild für die Optimierung der Anbauverfahren im Trüffelanbau.

Copyright by Thüringer Freilandpilze GmbH

So bat Im Juni 2024 ein Trüffelschüler aus Arnstadt, er hatte an unserem Vortrag zum Trüffelanbau an der VHS im Jahr 2022 teilgenommen, um Begutachtung seines Trüffelfundes aus seinem Garten. Er präsentierte insgesamt 37 Trüffeln mit einem Gewicht von 1.260 g. Sie wurden sofort gewogen, vermessen und dokumentiert, sowie Stückchen davon für Laboruntersuchungen sichergestellt. Wie und woraus sich die Ökologie der Fundstelle zusammensetzt und ob es sich um eine hochproduktive Fundstelle handelt, wurde dann bei einer Begehung mit Nachsuche geklärt. Diese ergab 25 weitere Trüffeln, die im Boden markiert wurden und dort verbleiben. Eine Bodenprobe förderte versehentlich noch elf kleinere Trüffeln zutage. Drei große, bereits von Maden befallene Exemplare waren stark beschädigt und verbleiben im Erdreich. Das sind insgesamt $37 + 25 + 11 + 3 = 76$ Trüffeln. Die vorläufige Einstufung erfolgte mindestens in Kategorie II, eventuell sogar I.

Fazit:

Insbesondere solche Fundstellen dienen aus unserer Sicht als Vorbild für die Anlage und Optimierung der Anbauverfahren im Trüffelanbau. Daher wurden hier noch zeitnah mit der Uni Jena Proben genommen und gesichert, um diese in unserem Folgeprojekt auswerten zu können.

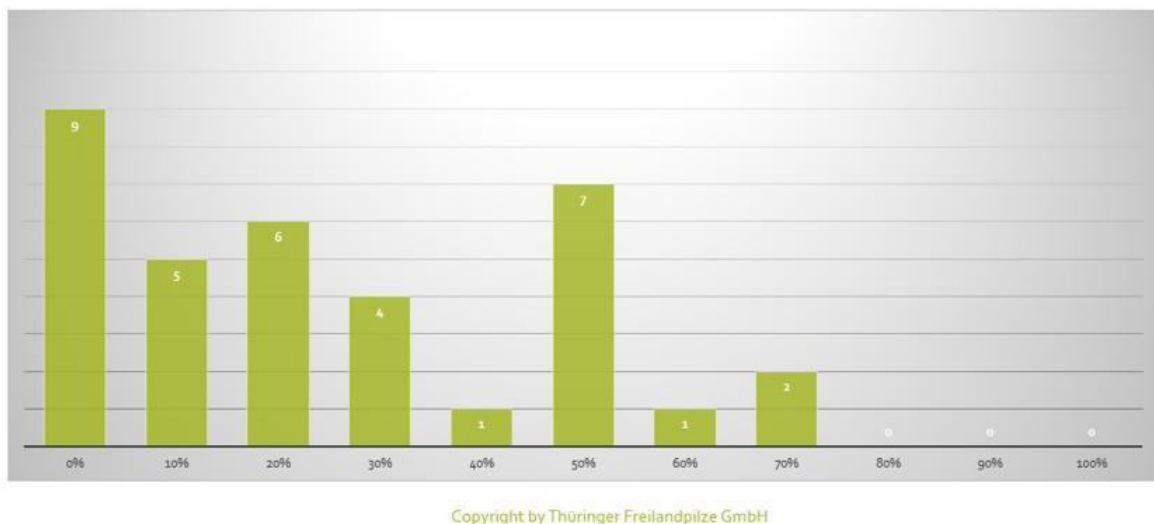
In einem weiteren Beispiel entdeckte die Anruferin in ihrem Garten in Waltershausen im Landkreis Gotha ebenfalls ohne Hund einige Trüffeln, die mit dem Scheitel aus dem Moospolster lugten. Bei ihrer Nachsuche am nächsten Tag, so erläuterte sie, folgte sie den Resten von Schleimspuren, um weitere Trüffeln zu finden, andere Fruchtkörper hatte sie dabei mit den Füßen erfüllt. Nach unserer ersten Einschätzung vor Ort kamen wir zu einer Einstufung in Kategorie V.

Fazit:

Diese natürliche Trüffelstelle ist kein Vorbild für die Inkulturnahme

Aufgrund unserer Aufklärungsarbeit durch Wissensverbreitung über die Medien erreichten uns weitere Fundmeldungen von aufmerksamen Gartenbesitzern, ratsuchenden Pilzsachverständigen und sonstigen Bürgern außer aus Thüringen sogar aus den benachbarten Bundesländern. Den meisten Ratsuchenden konnten wir aus Zeitgründen gar nicht persönlich nachgehen. Interessant aber ist die Tatsache, dass Sommertrüffeln außerdem bei der Entfernung/Rodung von Bäumen, Sträuchern oder Arbeiten im Garten gefunden wurden. Das unterstreicht die Omnipräsenz dieser Trüffelart.

Neue Erkenntnisse: Beispiel Fundstelle Wieling, Reifegradverteilung



Die aktuelle Lage im Jahr 2024 mit nur kleinörtlich zum Teil gutem Trüffelaufkommen bot uns die Gelegenheit, unsere Suchstrategien weiter anzupassen und vielversprechende Trüffelstandorte mit deutlich günstigerer Niederschlagsverteilung zu analysieren. Die Aufsammlung der Fundstelle Arnstadt entsprach in etwa der **Reiferadverteilung** (Bild) anderer Standorte in Thüringen. Die Daten weisen auf einen längeren Fruktifikationszeitraum hin. Diese stark gestreute Reifegradverteilung spiegelt sich von Ende April bis Ende Juni auf den internationalen Märkten wider: Sie werden mit unreifen Trüffeln überschwemmt.

Neue Erkenntnisse: Ermittlungen zum Größenwuchs

Unsere Trüffelanlagen sind noch zu jung, um hier die oben vorgestellte Feldforschung zu betreiben. Ermittlungen zum Entwicklungszyklus und Größenwuchs fanden daher auf einer Versuchsstelle der Forschungsgruppe Hypogäen statt. Unabhängig von den tatsächlichen, direkt an der Fundstelle gemessenen natürlichen Niederschlägen und der Niederschlagsverteilung wurden in einem bestimmten Rhythmus Wasserzugaben an einer Untersuchungsstelle in Delligsen in Niedersachsen verabreicht.

Damit ließ sich das Größenwachstum im Verhältnis zu unbeeinflussten „Regentrüffeln“ ermitteln. Die genauen Ergebnisse und deren Bewertung stehen noch aus, da die Untersuchung noch anhält und im Folgejahr über den gesamten Entwicklungszyklus fortgesetzt werden soll.

Ø cm	Vol. cm ³	Gewicht in g
1	0,52	0,5
2	4,18	4
2,5	8,17	8 bis 10
3	14,12	12 bis 15
3,5	20,15	20 bis 25
4	33,49	30 bis 35
4,5	47,68	40 bis 50
5	65,41	55 bis 65
5,5	87,07	60 bis 75

- **Ermittlungen zum Größenzuwachs**
Unabhängig von den tatsächlichen, direkt an der Fundstelle gemessenen natürlichen Niederschlägen und der Niederschlagsverteilung wurden alle 14 Tage Wasserzugaben an einer Untersuchungsstelle in Niedersachsen verabreicht. Damit ließ sich das Größenwachstum im Verhältnis zu unbeeinflussten „Regentrüffeln“ ermitteln.
- Zuwachs von 100 - >200% bei Bewässerung von April – August möglich
- Die genauen Ergebnisse und dessen Bewertung stehen ebenfalls noch aus, da die Untersuchung noch anhält und im Folgejahr über den gesamten Entwicklungszyklus fortgesetzt werden soll.

Copyright by Thüringer Freilandpilze GmbH

Analyse von Fundstellen

Projektziele aus wissenschaftlicher Sicht waren der Vergleich natürlicher Trüffelstandorte in Thüringen, um so einen Überblick über die bevorzugten Umweltbedingungen wie Bodenbeschaffenheit, Wirtsbäume, oder Vorkommen anderer Mykorrhizapilze zu gewinnen. Die Aufnahme ausgewählter, produktiver Plantagen in Deutschland, Italien und Frankreich bezüglich abiotischer und biotischer Eigenschaften sollte zum Vergleich herangezogen werden; Reisen mussten allerdings Corona-bedingt verschoben werden. Dies sollte in einem möglichen Folgeprojekt wieder aufgenommen werden.

Das Verständnis der Rolle von Mikroben und Bodenchemie bei der Trüffelentwicklung sollte durch Probennahmen natürlicher Vorkommen bestimmt und für Pflege von Anbauflächen sowie dem Wachstum von Trüffelisolaten im Labor nutzbar gemacht werden. Sowohl Mikroben als auch Bodenbiogeochemie und -physik sind wichtige Faktoren für die Trüffelentwicklung (Reifung, Aromaprofil, Sporen-Entwicklung, Wachstum). Daher waren im ersten Projektjahr die Entnahme von Trüffeln, Erde und Wurzeln aus der Natur mit ausführlicher Kartierung, die Morphotypisierung der Ektomykorrhizen an den Wirtsbäumen, die Untersuchung der Bodenchemie, Anzuchtversuche der Trüffel im Labor und die Isolierung und Charakterisierung trüffelassoziierten Bakterien und Pilze geplant.

Es wurden chemische, mikrobiologische und bioinformatische Ansätze zu gesammelten Trüffeln und dem sie umgebenden Boden in der Natur verwendet. Da Thüringen ein Bundesland mit besonders diversen Bodentypen auf unterschiedlichen anstehenden Gesteinen ist (s. S. 7), sind die Ergebnisse der Kartierungen von besonderer Relevanz.

Über 100 natürliche Trüffelstandorte wurden kartiert und auf gemeinsame Umweltfaktoren biotischer wie abiotischer Faktoren überprüft. An allen Stellen wurden Boden- und Wurzelpollen entnommen (Tab. 1). Die Bodenproben wurden neben der Bestimmung des

Boden-pH-Werts weiterhin auf das Vorkommen von Metallen und deren Bindungsform an verschiedene Bodenfraktionen durch sequentielle Extraktion getestet.

Tab. 1: Beispiele für Trüffelvorkommen und Entnahmestrategie.

Probe	Probentyp (Probentiefe in cm)	Fruchtkörpergröße (cm)	Vegetation
1	Fruchtkörper (4), Boden der Mykorrhizosphäre (4-7), Freier Boden (10), Wurzeln aus der Mykorrhizosphäre (4-10)	2	Gras, Laubschicht, <i>Tilia</i> sp.
2	Fruchtkörper (10), Boden der Mykorrhizosphäre (10-14), Freier Boden (10), Wurzeln aus der Mykorrhizosphäre (10-15)	4 – 4,5	Gras, <i>Tilia</i> sp.
3	Fruchtkörper (0-1), Boden der Mykorrhizosphäre (1-6), Freier Boden (5), Wurzeln aus der Mykorrhizosphäre (0-10)	5 – 6	Gras, <i>Tilia</i> sp.
4	Fruchtkörper (5), Boden der Mykorrhizosphäre (5-10), Freier Boden (7-10), Wurzeln aus der Mykorrhizosphäre (5-10)	3 - 4	Laubschicht, Elfenblume <i>Epimedium</i> sp., Bleiwurz <i>Ceratostigma plumbaginoides</i> , Stinkende Nieswurz <i>Helleborus foetidus</i> , <i>Fagus sylvatica</i>
5	Fruchtkörper (5), Boden der Mykorrhizosphäre (5-10), Freier Boden (7-10), Wurzeln aus der Mykorrhizosphäre (5-10)	4,5 - 5	Laubschicht, Elfenblume <i>Epimedium</i> sp., Bleiwurz <i>Ceratostigma plumbaginoides</i> , Stinkende Nieswurz <i>Helleborus foetidus</i> , <i>Fagus sylvatica</i>
6	Fruchtkörper (5), Boden der Mykorrhizosphäre (5-10), Freier Boden (7-10), Wurzeln aus der Mykorrhizosphäre (5-10)	3 - 4	<i>Tilia</i> sp., <i>Pinus</i> sp.
7	Fruchtkörper (0-1), Boden der Mykorrhizosphäre (1-3), Freier Boden (5), Wurzeln aus der Mykorrhizosphäre (0-7)	2 – 2,5	Laubschicht, Büsche, <i>Tilia</i> sp., <i>Acer</i> sp.
8	Fruchtkörper (2), Boden der Mykorrhizosphäre (2-4), Freier Boden (5), Wurzeln aus der Mykorrhizosphäre (2-10)	2 – 2,5	Laubschicht, Gebüsch, <i>Corylus</i> sp.

Um die Entwicklung von Fruchtkörpern im Jahreszyklus gezielt untersuchen zu können, wurde ein Standort in Jena auf privatem Gelände ausgewählt, der für Probennahmen weiterhin zur Verfügung steht und der nicht durch Spaziergänger (mit Hunden wegen des Düngeeffekts), Wildschweine, Baumaßnahmen oder andere Störungen beeinträchtigt ist. Dies erlaubt auch eine langfristige wissenschaftliche Beprobung und sollte auch in einer erneuten möglichen Förderphase weiter untersucht werden.



Abb. 1: Beispiele für Trüffelfunde. (Proben 7, 1 und 2)

An sechs Standorten wurden mit Sondergenehmigung Trüffel sowie Bodenproben und Wurzeln an und um Trüffel entnommen (Abb. 1) und die Mikrobiome untersucht. Laut dieser Sondergenehmigung dürfen die Standorte nicht veröffentlicht werden und sind daher auch in diesem Bericht nicht beigefügt.

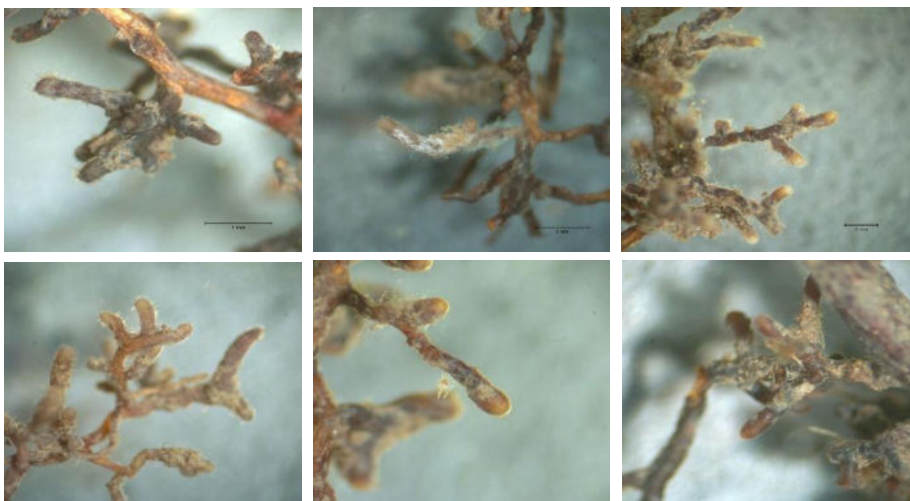


Abb. 2: Einige Beispiele der typisierten Kurzwurzelproben, die unterschiedliche Pilzpartner in der Symbiose mit dem Wirtsbaum der Trüffel zeigen und daher mit der Trüffel vergesellschaftet vorkommen. Von oben links nach unten rechts: Morphotypen MT4, MT5, MT1, MT7, MT3 und MT2.

Aus den Daten wurde im Rahmen einer Masterarbeit mittels *canonical correspondence analysis* der Zusammenhang zwischen Standortfaktoren und Trüffelvorkommen ermittelt. Diese Arbeiten sollen ohne Standortangaben veröffentlicht werden. Neben der Isolierung von Bakterien, die dann in Reinkulturen für Folgeexperimente zur Verfügung stehen, sind auch Mikrobiomanalysen erfolgt. Die Morphotypisierung von Ektomykorrhiza an Kurzwurzeln der Bäume ist nach dem Klassifizierungssystem von Agerer (1987-2006; 2001) erfolgt (Tab. 2; Abb. 2).

Tab. 2: Beispielhafte Darstellung der Datenerhebung zur Morphotypisierung von Ektomykorrhiza-Kurzwurzeln eines Wirtsbaums mit Trüffelfund.

Morpho- typ	Typ der Verzweigung	Form unverzweigter Enden	Mantel typ	Rhizomorph en	Ausstrahlen de Hyphen, Farbe	Farbe der ECM	ECM-Explorations- typen
MT1	unverzweigt, monopodial-pyramidal	gerade, gebogen	glatt, lokal wollig	Fehlen	selten, weiß	dunkel-braun; Spitze gelb, viel heller	Kontakt
MT2	unverzweigt, monopodial-pyramidal	gerade, gebogen	wattig	fehlen	keine	braun, Kurzwurzel mit weißlichen Mantel	Kontakt
MT3	unverzweigt, monopodial-pyramidal	gerade, gebogen	glatt, lokal wollig	fehlen	selten, weiß	hellbeige; Spitze fast transparent	Kontakt
MT7	unverzweigt	gerade, zylindrisch	glatt, lokal wollig	fehlen	ja, weiß und schwarz	hellbraun; Spitze heller	Kurz
MT4	unverzweigt, unregelmäßig-gefiedert	gerade, gebogen	glatt	fehlen	ja, weiß	dunkel-braun	Kontakt
MT5	unverzweigt	gerade, gebogen, gewunden	wattig	fehlen	ja, weiß	beige, glänzend weißer Mantel	Kurz

Für eine Anzucht der Trüffel müssen sterile Proben aus dem Inneren der Fruchtkörper entnommen werden, um eine Reinkultur des Pilzes zu erhalten. Das Vorgehen ist in Abb. 3 dargestellt. Hierbei wurden Desinfektionsmittel (H₂O₂), Antibiotikazugabe im Medium (Ampicillin, Kanamycin), verschiedene Wachstumsmedien (CYM, MMNb), Inkubationstemperaturen (10 °C, Raumtemperatur) oder die Inokulation von möglichen Wirtspflanzen variiert. Mit diesem Vorgehen ließen sich gleichzeitig Schadpilze identifizieren, die die Qualität der Trüffel beeinträchtigen können. In aus der Natur entnommenen Proben wurden beispielsweise Schimmelpilze wie *Penicillium expansum*, *Xylaria primorskensis*, *Acremonium alternatum* oder *A. pteridii* nachgewiesen.

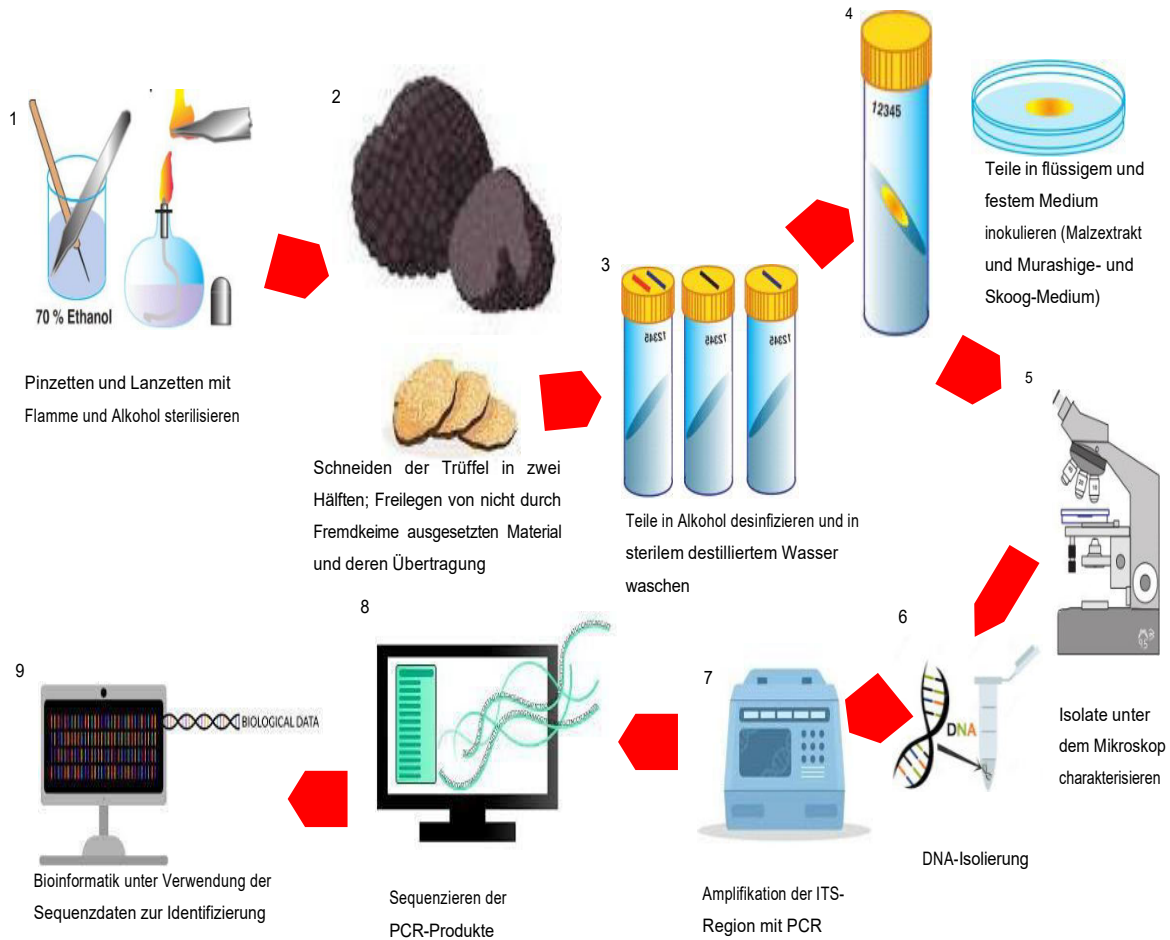


Abb. 3: Vorgehen zur Bestimmung der entnommenen Trüffel und Versuche zur Anzucht der Trüffelpilze auf sterilem Nährmedium.

Kartierung von Vorkommen zur Ermittlung positiver Standortfaktoren

In einer Abschlussarbeit wurden die vom Projektpartner Freilandpilze zur Verfügung gestellten Fundstellen kartiert und mit Bodenparametern und der Zusammensetzung des Mikrobioms korreliert. Die physiko-chemischen Bodenparameter sowie Elementanalysen sowohl für Metalle als auch für Carbonat-Fractionen (Tab. 3) und andere chemische Bodenparameter ergaben interessanterweise für einige der Fundstellen in öffentlichen Parks in Thüringen erhöhte Metallkonzentrationen, die teilweise über den erlaubten Grenzwerten liegen, was allerdings für den Trüffelanbau auf Agroforstflächen keine Rolle spielen sollte. Diese Daten wurden dann in entsprechende geologische Karten eingearbeitet und damit die unterschiedlichen Standorte in Bezug auf natürliche Vorkommen von Trüffeln in Thüringen eingegrenzt.

Tab. 3: Bodenparameter an ausgewählten Fundstellen.

Probe	pH _{aqua}	pH _{CaCl2}	EC	Ton	Schluff	Sand	C _{org}	N	CaCO ₃
			µS/cm	%					
MR1	7,12	6,77	416	1,6	47,9	50,5	7,16	0,56	7,8
BS1	7,24	6,77	250	1,5	46,9	51,4	3,75	0,35	9,6
MR2	7,52	6,89	169,6	2,4	64,2	33,5	2,17	0,2	12,7
BS2	7,4	6,96	252	2,2	62,4	35,5	2,65	0,25	9,5
MR3	7,11	6,75	539	1,9	54,3	43,7	3,96	0,35	14,7
BS3	7,35	6,97	294	1,8	53,8	44,3	3,47	0,32	17,7
MR4	7,30	7,01	308	4,4	71,8	23,9	4,89	0,43	9,9
BS4	7,43	7,00	264	3,4	71,2	25,3	5,06	0,39	9,1
BS5	7,31	6,88	238	3,8	68,6	27,6	4,15	0,36	8,4
MR5	7,42	7,08	285	3,8	69,7	26,5	3,62	0,32	11,4
MR6	7,15	6,83	402	1,9	61,5	36,6	4,78	0,43	7,5
BS6	7,25	6,99	251	2,1	69,9	28,1	4,71	0,39	5,8

Legende: MR: Boden aus der Mykorrhizosphäre, BS: Freier Boden

Die Ergebnisse der Korrelationen legen Bedingungen nahe, die auf das Wachstum von Trüffeln in verschiedenen Bodenarten einen positiven Einfluss haben. Dabei zeigte sich die Wichtigkeit von Schwarzerde als Substrat für das Wachstum von Trüffeln. Die optimalen Bedingungen des Bodens entsprechen dabei neutralen bis schwach alkalischen Böden, die einen erhöhten Carbonatanteil aufweisen (Tab. 4). Partikelgrößen und elektrische Leitfähigkeit korrelierten dagegen nicht. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass eine Kalkung von Böden dem Wachstum von Trüffelfruchtkörpern durchaus zuträglich sein könnte. Zudem zeichneten sich die natürlichen Standorte durch erhöhte Konzentrationen von Ca, K und Mn, aber niedrige Na-Konzentration aus, was einer schwachen Osmotoleranz entsprechen würde. Zudem korrelierte die Fruchtkörpergröße stark negativ mit dem Gesamtgehalt an Ni, auch die Reife zeigte eine negative Korrelation, während moderat positive Abhängigkeit zum bioverfügbaren Ni in löslichen und mobilisierbaren Bodenfraktionen gefunden wurde.

Die Elementgehalte der Mykorrhizosphäre wiesen mit der Fruchtkörpergröße mäßig positive Korrelationen für Ca, Mn, Na, As, Sr & Ti sowie mäßig negative Korrelationen für P und S auf. Die Elementgehalte der Mykorrhizosphäre zeigten zudem mit dem Reifegrad mäßig positive Korrelationen für Ca, Mn, As & Ti und stark negative Korrelationen für P (- 0,89) & S (-0,74). Diese Ergebnisse sind hilfreich, um für zukünftigen Trüffelanbau geeignete Flächen ausweisen zu können.

Tab. 4: Korrelationsfaktoren für den Einfluss von Bodenparametern auf Fruchtkörpergröße und -reife.

Bodenfaktoren	Fruchtkörper-Größe	Reifegrad
Corg	-0,75	-0,87
N	-0,71	-0,81
CaCO₃	0,83	0,61
C/N ratio	-0,75	-0,91

Um die Verbreitung urbaner Fundstellen für Trüffel besser zu charakterisieren, wurden insgesamt 15 Fruchtkörper an drei Orten innerhalb der Stadtgrenzen Jenas untersucht. An diesen drei Stellen wurden jeweils 6, 6 und 3 Fruchtkörper-Fundstellen aufgenommen, die Begleitflora bestimmt und Bodenproben zur weiteren Analyse direkt um die entnommenen Fruchtkörper sowie im umgebenden Boden entnommen. Es konnten insgesamt 99 Bakterienstämme und 40 Pilze in Reinkultur genommen werden, die für die Untersuchung spezifischer mikrobieller Kommunikation zwischen Trüffel und Bodenmikroben genutzt wurden. Dabei wurden morphologisch unterschiedliche Isolate in Reinkultur gebracht, durch physiologische und molekularbiologische Charakterisierung bestimmt, und verschiedene Medien für optimiertes Wachstum in Dualkulturen mit *Tuber borchii* getestet (Abb. 4).



Abb. 4: Vier bakterielle sowie ein pilzliches Isolat in Reinkultur.

Die Fundstellen sind in das bestehende Datennetzwerk eingefügt und damit Teil der bereits vorgelegten Charakterisierung von abiotischen Wachstumsparametern.

Arbeitspaket 2: Wissenschaftliche Begleitung

Ziel/Aufgabe der FSU Jena war hier mikrobiologische Grundlagenforschung, Analyse abiotischer und biotischer Faktoren, molekulare Untersuchung der Trüffelentwicklung, Identifikation fördernder Bakterienverbindungen und Untersuchung von Trüffelstellen in Thüringen.

Von besonderem Interesse für die Mikrobiologie der Trüffelproduktion sind assoziierten Bakterien, die bei Mykorrhizierung und Fruchtkörperentwicklung als Helfer fungieren. Dass Bakterien die Funktionen von Mykorrhizapilzen unterstützen, weiß man schon seit den 1960er Jahren. Garbaye et al. (1994) führte bei seinen Untersuchungen an Ektomykorrhiza den Begriff „*mycorrhizal helper bacteria*“ ein. Solche Bakterien unterstützen auch die Bildung von Mykorrhizen zwischen Trüffelpilzen und ihren Wirtspflanzen (Navarro-Róderas et al., 2016). Dazu wurden Mikrobiomanalysen (Wagner et al., 2016) sowie die Isolierung von Stämmen aus Boden- sowie Trüffelproben und nachfolgend gezielte Mikrokosmos- und Topfversuche zur Mykorrhizierung von Baumkeimlingen durchgeführt. Zukünftig sollte auch die Fruchtkörperbildung im Jahresverlauf und die Reifung bis zur Sporenproduktion im Jahresverlauf aufgeklärt werden, um die Fruchtkörperbildung auf der Plantage zukünftig aktiv steuern zu können.

Volatile Signale, die die Mykorrhizierung beeinflussen, konnten mit Sesquiterpenen anhand des Mykorrhizapilzes *Tricholoma vaccinum* gezeigt werden (Ezediokpu et al., 2022). Hier konnten α -Barbaten, Sativen, Isocaryophyllen, α -Cuprenen, β -Cedren, β -Copaen, 4-epi- α -Acoradien und Chamigren in axenischen Kulturen des Pilzes nachgewiesen werden. Die drei Hauptkomponenten β -Barbaten, $\Delta 6$ -Protoilluden sowie ein oxygeniertes Sesquiterpen zeigten erhöhte Mengen in mykorrhizierter Fichte. Für die beiden letztgenannten Naturstoffe konnte ein Biosynthesegen, *pie1*, identifiziert werden, für das eine erhöhte Expression während der Mykorrhizierung gefunden wurde.

Zudem wurden von Thüringer Freilandpilze GmbH und einem weiteren Landwirt, Happy Horst GmbH je eine Trüffelplantage nach dem Thüringer Modell als Hohertragskultur mit mehreren Tausend Trüffelpäumchen angelegt. Um diese als Versuchsflächen zu nutzen, erfolgte eine Aufteilung in je drei Plots. Während auf beiden Anlagen Plot 1 und 2 jeweils mit bereits zwei auf dem Markt erhältlichen Bakterienkulturen inokuliert wurden, erfolgte im Jahr 2024 die Inokulation mit eigenem Konsortium auf Plot 3 (Abb. 5). Ob und welche Bakterienstämme sich als MHB (Mykorrhizahelferbakterien) für das Wachstum von Fruchtkörpern von *Tuber aestivum* beweisen, zeichnet sich frühestens mit dem Nachweis der ersten Trüffeln ab.



Copyright by Thüringer Freilandpilze GmbH

Abb. 5: Inokulation im Feldversuch.

- Analyse abiotischer und biotischer Faktoren, molekulare Untersuchung der Trüffelfentwicklung, Identifikation fördernder Bakterienverbindungen und Untersuchung von Trüffelstellen in Thüringen
- 3 Plots à 72 Subplots
- Behandlungsarten (Bakterium A, Bakterium B, Mischung A + B, Kontrolle 0)
- 3. Plot mit eigenem Konsortium

Analyse der bakteriellen Gemeinschaft an, in und um die Fruchtkörper

Die in AP1 kartierten über 100 natürlichen Trüffelstandorte wurden auf gemeinsame physiko-chemische, abiotische Bedingungen überprüft, die Mykorrhizierung und Fruchtkörperentwicklung fördern können. Dies wird zur Identifizierung von Klima- und Bodenparametern genutzt und mit biotischen Faktoren wie assoziierte Pflanzenarten und Mikroorganismen kombiniert. So können Eigenschaften natürlicher Standorte mit hoher Produktivität korreliert werden und damit eine Vorhersage geeigneter Standorte zukünftig erleichtern. Gleichzeitig wurden für die entnommenen Fruchtkörper Reifegrad-Bestimmungen durchgeführt, da der Reifegrad auch mit veränderten mikrobiellen Assoziationen einhergeht (Abb. 6)). Der Reifegrad wird über die Anteile von Asci mit ausgefärbten Sporen in der Gleba der Fruchtkörper ermittelt und beträgt bei den in Abb. 6 gezeigten Proben 1-6 0%, ca. 80, 70, 50, 80, bzw. 70%.

Neben den Trüffel-Fruchtkörpern wurden auch Bodenproben entnommen, aus denen die gesamt-DNA aller mit den Trüffeln gemeinsam vorkommenden Organismen isoliert wurde. Diese werden mittels Amplikon-Sequencing genauer betrachtet, um Erkenntnisse über den Einfluss mikrobieller Interaktionen auf die Trüffelfentwicklung und Identifizierung von Mikroben, die zur Trüffelfentwicklung beitragen zu gewinnen. Gleichzeitig wurden Reinkulturen assoziierter Bakterien angelegt (Abb. 7). Die entnommenen Trüffel wurden mit molekularbiologischen wie mikroskopischen Analysen identifiziert und die Inkulturnahme dieser Trüffel-Stämme für weitergehende Untersuchungen erprobt.

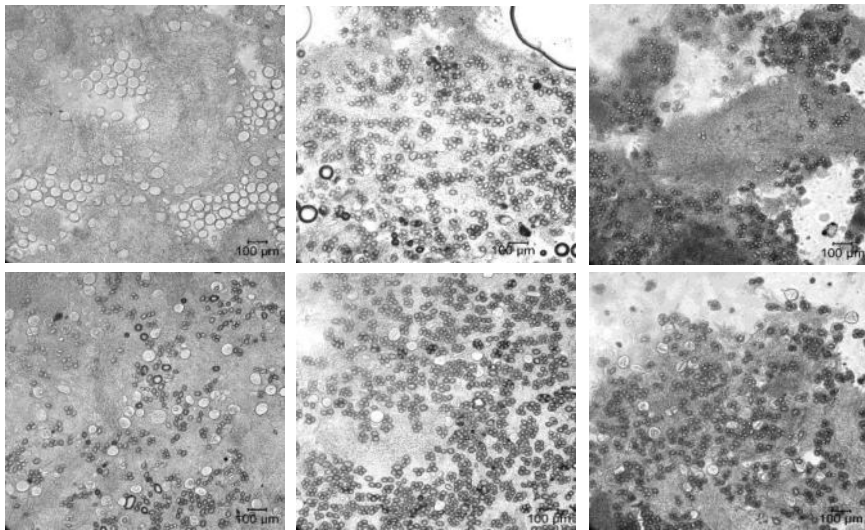


Abb. 6: Zur Reifegradbestimmung werden mikroskopisch Asci und Sporen in der Gleba der Trüffel-Fruchtkörper ausgewertet. Beispielhaft sind sechs Fruchtkörperquerschnitte der Proben 1-6 von oben links nach unten rechts gezeigt.

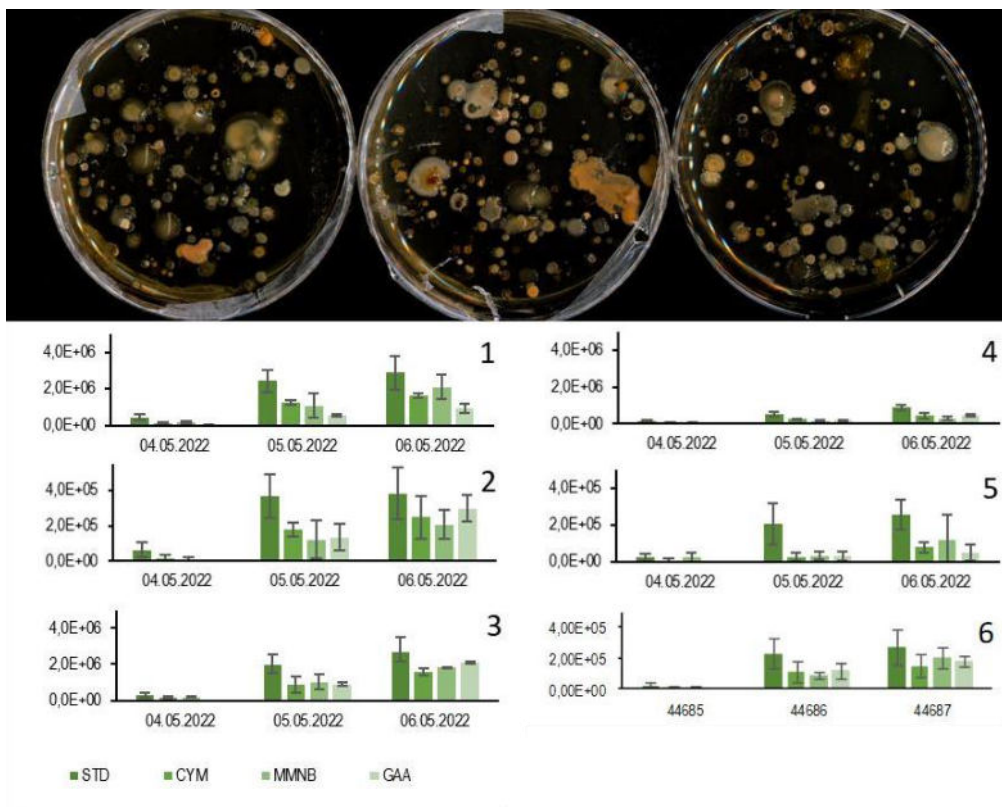


Abb. 7: Anzahl koloniebildender Einheiten nach Plattieren der Bodenproben beispielhaft für sechs Trüffellentnahmestellen. Beispielhaft sind drei GAA-Platten der Verdünnungsstufe 10^{-3} gezeigt, um die mikrobielle Diversität sichtbar zu machen (oben). Es wurden vier verschiedene Medien (STD: Standard I, CYM: complex yeast medium, MMNB: Modifiziertes Melin-Nokrans-Medium b, GAA: Glycerin-Arginin-Agar) verwendet und an drei aufeinanderfolgenden Tagen ausgezählt, um auch langsam wachsende Kolonien zu berücksichtigen (unten).

Es wurden mutualistische Bakterien in Reinkultur gewonnen, die physiologisch charakterisiert wurden, um sie dann für Mykorrhizierungsexperimente einzusetzen. Gleichzeitig sollten diffundierende und volatile Naturstoffe, die von diesen Bakterien gebildet werden, gefunden werden.

Zusammensetzung des Mikrobioms

Es wurden Mikrobiome der Gleba, des Bodens rund um die Fruchtkörper, im Vergleich zum umgebenden Boden analysiert. Diese Daten sind für die Kultivierung von Trüffeln von besonderer Bedeutung und in dieser Form erstmals vorgelegt worden. In der Untersuchung der assoziierten Mikroorganismen wurden zunächst koloniebildende Einheiten durch Kultivierung verglichen und die Isolate identifiziert und eingeordnet. Diese Arbeiten sind zusätzlich zur Mikrobiomanalyse notwendig, um die kultivierbaren Mikroben aus den Daten der Sequenzierungen herauszufiltern, die tatsächlich in erhöhter Abundanz vorliegen. Da bekannt ist, dass nur ca. 0,1 % der Bodenbakterien kultivierbar ist, sind nur diese für Kultivierungsversuche zugänglich und relevant. Dabei wurde auf die relative Abundanz Wert gelegt, was auch für isolierte Stämme durchaus eine relevante Größe ist, die in den meisten bisher veröffentlichten Publikationen nicht mit untersucht wird. Hier sind Isolate von *Streptomyces*, aber auch anderen Actinobakterien sowie *Firmicutes* tatsächlich dominierend. Die Identifizierung durch 16S rRNA-Sequenzierung ergab dann ein etwas anderes Bild des umgebenden Mikrobioms, in dem neben weiteren Actinobakterien durchaus Gram-negative als dominante Gruppen auftraten. Insbesondere α -Proteobakterien kamen hier im umgebenden Boden vor. Dabei fallen insbesondere *Verrucomicrobia* und α -Proteobakterien als dominante Klassen auf. Eine zu den Acidobakterien gehörende Gruppe, *Vicinamibacteria*, die sonst nicht häufig in Bodenproben vorkommen, war hier ebenfalls angereichert. In der Mykorrhizosphäre wird diese letzte Anreicherung noch deutlicher (Abb. 8). Die Archaeen sind - wie immer im Boden - unterrepräsentiert, wobei auffällig ist, dass am Stickstoffzyklus beteiligte Taxa den Großteil ausmachen. Hieraus könnten für eine Amelioration der Trüffel in Plantagen durchaus wichtige Informationen abgeleitet werden. Bei den Pilzen sind insbesondere Mortierellamyceten, aber auch andere Asco- und Basidiomyceten wichtig, was durchaus anderen Bodenergebnissen aus Ektomykorrhizastandorten entspricht. Das Vorkommen von Gruppen der *Zoophagomycota*, aber auch *Kickxellomycota* oder *Glomeromycota* ist allerdings etwas höher, als das in anderen Bodenproben häufig gefunden wurde (Abb. 8).

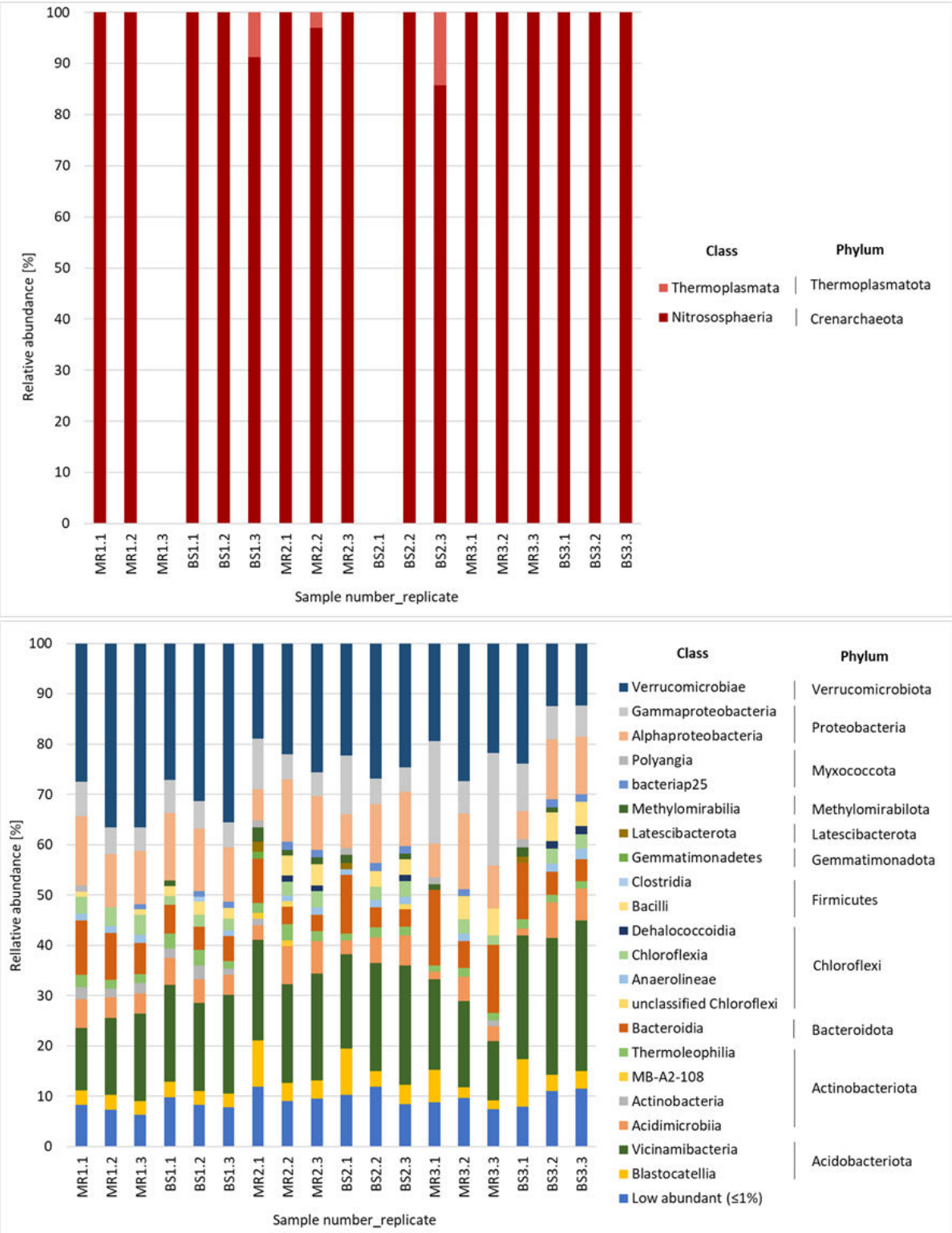


Abb. 8: Mikrobiomanalysen im Feldversuch: Archaea und Bacteria. Legende: MR: Boden aus der Mykorrhizosphäre, BS: Freier Boden.

Wichtigkeit des Stickstoffzyklus

Die unterschiedlichen Teile des Fruchtkörpers mit Gleba und Peridium zeigen eine deutliche Dominanz von α -Proteobakterien, wobei insbesondere *Bradyrhizobium* im Vorkommen deutlich angereichert ist. Dies ist ein Ergebnis, das bisher unbekannt war und das sich mit dem Vorkommen von *Nitrososphaera* in der Gruppe der Archaeen (also der am Stickstoffzyklus beteiligten Archaeen) sehr gut zu einem Gesamtbild zusammenfügt, das einer Stickstofffixierung und Umsetzung des Stickstoffs in und um die Fruchtkörper eine große Rolle für das Wachstum der Fruchtkörper einräumt. Eine Ableitung für die Anwendung könnte sein, dass in diesem Fall eine Stickstoffdüngung den natürlichen Zustand - und damit dem Wachstum der Trüffel - durchaus entgegenstehen könnte. Auch die Pilze in Gleba und Peridium wurden untersucht und hier *Rozellomycota* als überrepräsentiert gefunden (Abb. 9).

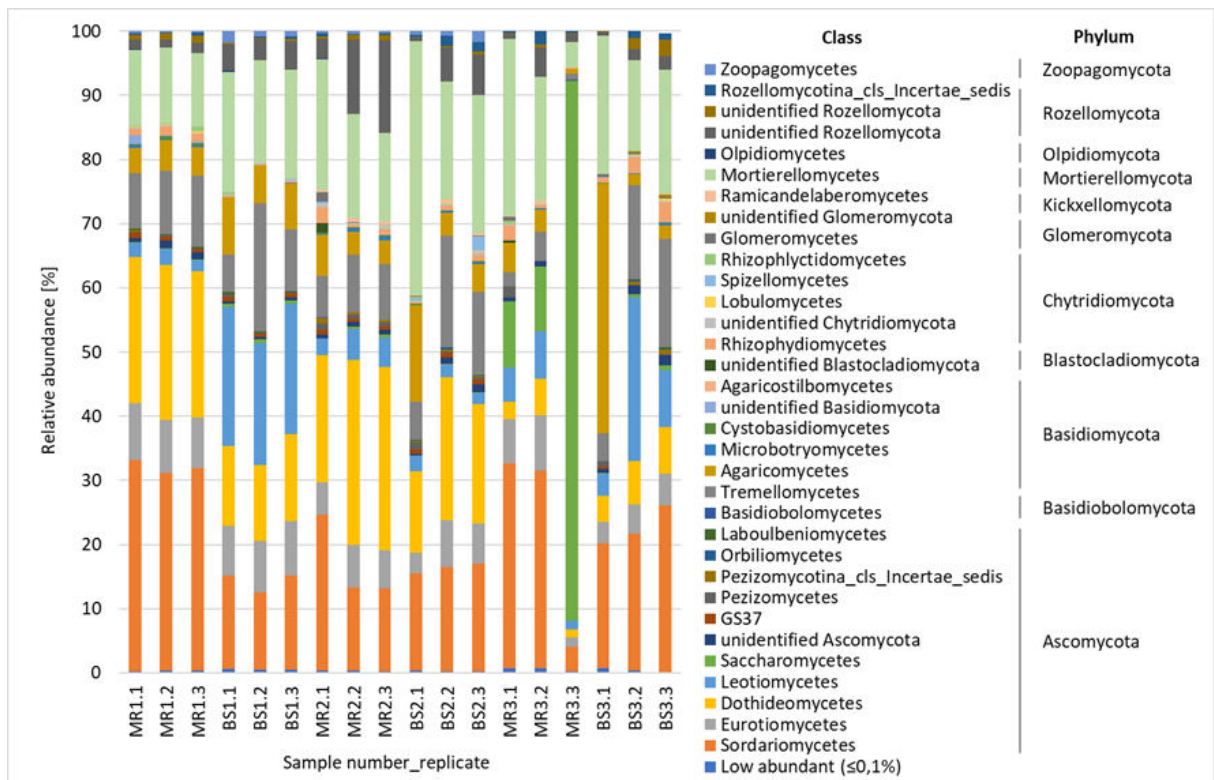
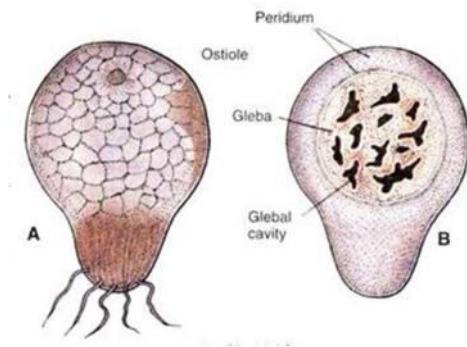


Abb. 9: Mykobiomanalysen im Feldversuch. Legende: MR: Boden aus der Mykorrhizosphäre, BS: Freier Boden.

Für einige Pilzklassen konnten Korrelationen zu Fruchtkörpergröße und Reifegrad ermittelt werden (Abb. 10). Hier bietet sich einerseits die weitere Untersuchung zum Einfluss auf die Haltbarkeit der Fruchtkörper, andererseits der von den Fremdpilzen gebildeten Geruchsstoffe an.



Trüffeltgewebe	Pilzklasse	Fruchtkörpergröße	Reifegrad
Peridium	Sordariomycetes	-0,58	-0,72
	Mortierellomycetes	0,74	0,92
	Dothideomycetes	0,29	0,41
	Pezizomycetes	-0,07	-0,29
	Eurotiomycetes	-0,03	0,29
Gleba	Sordariomycetes	-0,76	-0,85
	Mortierellomycetes	-0,04	-0,16
	Dothideomycetes	0,27	0,12
	Pezizomycetes	0,57	0,53
	Eurotiomycetes	0,34	0,57

Abb. 10: Korrelation von anderen Pilzen mit Fruchtkörperwachstum.

Die ersten Analysen von Fruchtkörper-assoziierten Bakterien sollten zeigen, ob spezifische bakterielle Taxa in und ggf. an den Fruchtkörpern der Trüffel existieren. Für diese könnte ein Beitrag zum Trüffel-typischen Geschmack und Geruch existieren. Daher wurden Bodenproben zur Kontrolle außerhalb der Fundstelle, Bodenproben direkt um die gefundenen Fruchtkörper sowie die Mikrobiome in Peridie und Gleba der Fruchtkörper von jeweils drei Funden derselben Fundstelle analysiert.

Dies zeigte, dass die Trüffel-Fruchtkörper offensichtlich eine Auswahl der im Boden vorhandenen Bakterien attrahieren und deren Wachstum im und am Fruchtkörper unterstützen. So sind die Mikrobiomanalysen basierend auf den bakterielle 16S rDNA-Sequenzen für den umgebenden Boden und die Mykorrhizosphäre sehr ähnlich, was zeigt, dass die Wurzelassoziation noch keinen bedeutenden Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft nimmt. Dagegen sind insbesondere die Gamma-Proteobakterien in und an den Fruchtkörpern deutlich angereichert (Abb. 11). Die macht die Untersuchung von Isolaten in der Interaktion mit dem Trüffelpilz besonders aussichtsreich.

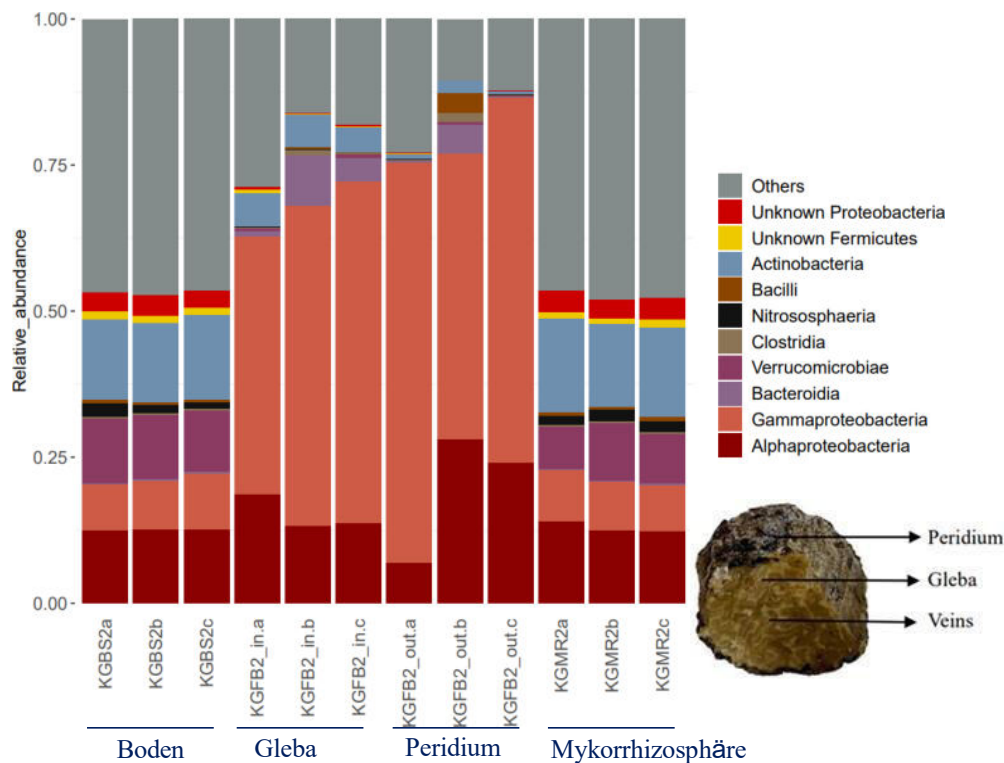


Abb. 11: Mikrobiomanalysen durch Sequenzierungen der 16S rDNA von Proben um (umgebender Boden und Mykorrhizosphäre), an (Peridium) und in (Gleba) den Trüffelfunden am Beispiel einer Fundstelle.

Dieselben DNA-Extraktionen wurden für die Analysen assoziierter Pilze verwendet. Hier werden als die Sequenzen der internen transkribierten Regionen (ITS) der rRNA- kodierenden längeren Transkripte genutzt. Diese Mycobiome zeigten ebenfalls eine spezifische Assoziation von Pilzen, die für Interaktionsstudien damit ebenfalls interessant sind (Abb. 12). Hierbei zeigte sich ein anderes Bild, in dem sich zunächst ebenfalls der umgebende Boden und die Mykorrhizosphäre bereits unterscheiden (Abb. 12). Hier waren insbesondere die Zygomyceten (Mortierellomycota) in der Mykorrhizosphäre angereichert. Diese Gruppe wurde aber in Peridium und Gleba offensichtlich nicht vom Trüffel geduldet und ist damit in den Fruchtkörper-assozierten Mycobiomen unterrepräsentiert. Weiterhin unterschieden sich hier Gleba und Peridium deutlich. Auffällig ist, dass die Basidiomyceten mit den Agaricomyceten in der Gleba als assoziierte Pilze vorherrschen, während dies im Peridium (noch) nicht der Fall ist. Um hier Interaktionen zu untersuchen, war es wichtig zu wissen, um welche Pilze es sich handelt. Es konnte aus den Daten die Information gewonnen werden, dass in der Gruppe mit 75 % bzw. 35 % ein Pilz der Gattung *Amanita* vorherrscht. Einer der analysierten Fruchtkörper war so unreif, dass sich das Mycobiom hier noch nicht von dem der Peridie unterschied. Damit lassen sich erste Hinweise auf eine spezifische, vom Reifegrad abhängige Interaktion mit anderen Pilzen ableiten.

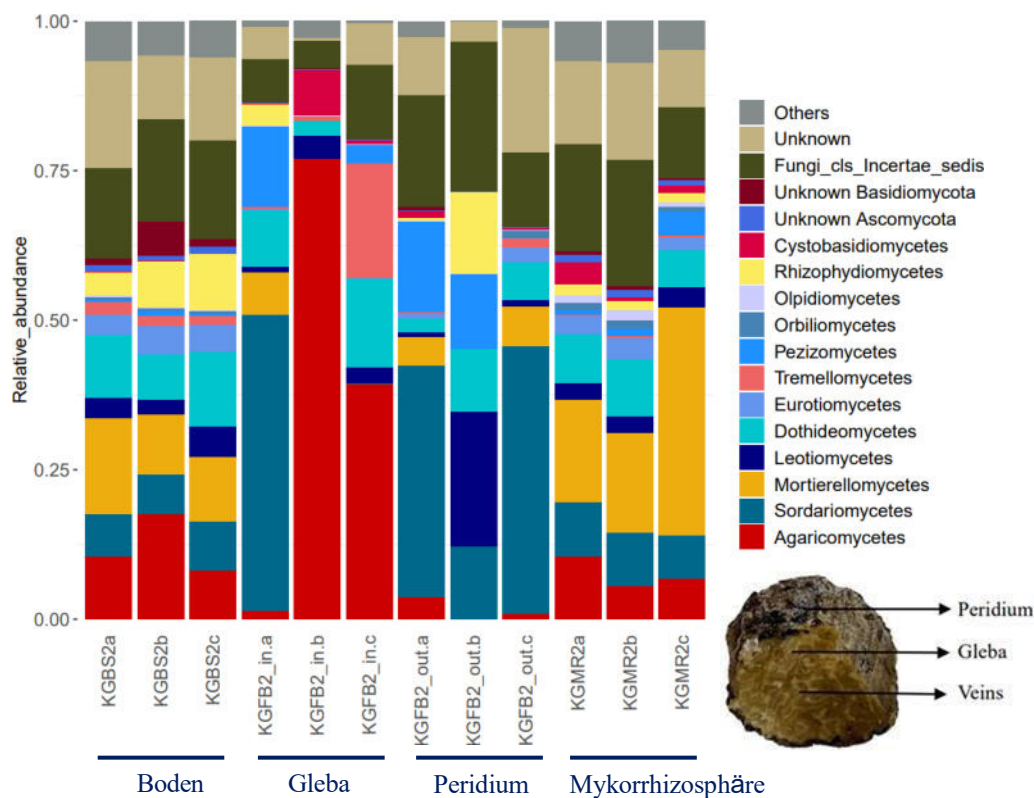


Abb. 12: Mycobiomanalysen durch Sequenzierungen der ITS-DNA von Proben um (umgebender Boden und Mykorrhizosphäre), an (Peridium) und in (Gleba) den Trüffelfunden am Beispiel einer Fundstelle.

Dieselben DNA-Extraktionen wurden für die Analysen assoziierter Pilze verwendet. Hier werden als die Sequenzen der internen transkribierten Regionen (ITS) der rRNA- kodierenden längeren Transkripte genutzt. Diese Mycobiome zeigten ebenfalls eine spezifische Assoziation von Pilzen, die für Interaktionsstudien damit ebenfalls interessant sind.

Physiologische Charakterisierung von Isolaten der Testfelder

Wie bei der Mikrobiomanalyse wurden auch die isolierten Stämme in Bezug auf ihre Herkunft analysiert. Damit konnte über die drei Jahre des Förderzeitraums der Effekt der mikrobiellen Inokulation von zwei kommerziell erwerbzbaren Präparaten auf die isolierbare Vielfalt der Bakterien untersucht werden (Abb. 13). Es zeigt sich ein erwartbarer Rückgang der bakteriellen Vielfalt nach Umnutzung der vormals agrarwirtschaftlichen Flächen. Gleichzeitig lässt sich ein größerer Einfluss des Präparats 1 als von 2 erkennen. Ein eigenes Inokulat konnte in 2024 mit einer höheren Erfolgchance eingesetzt werden.

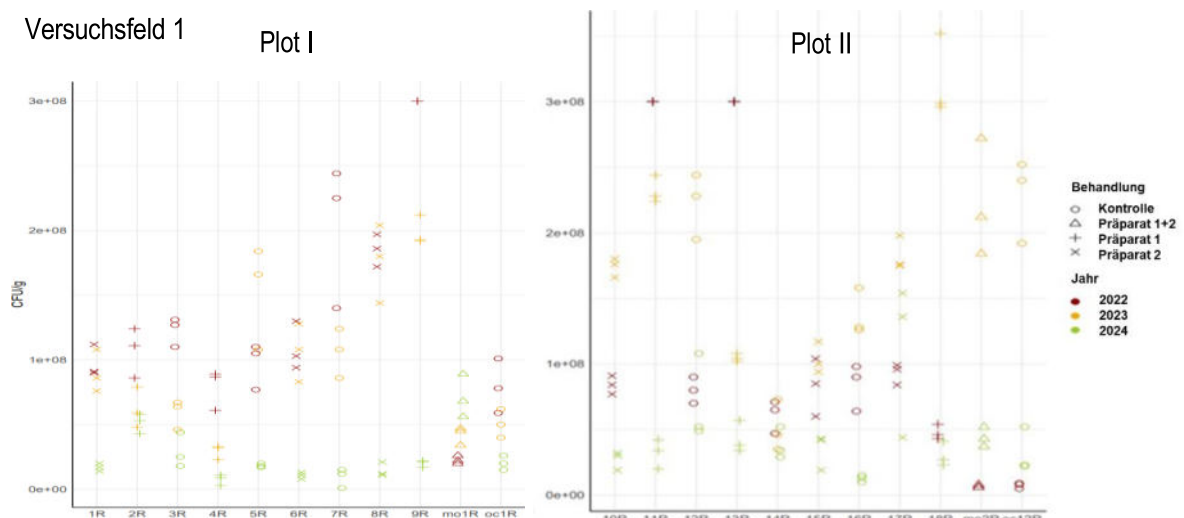
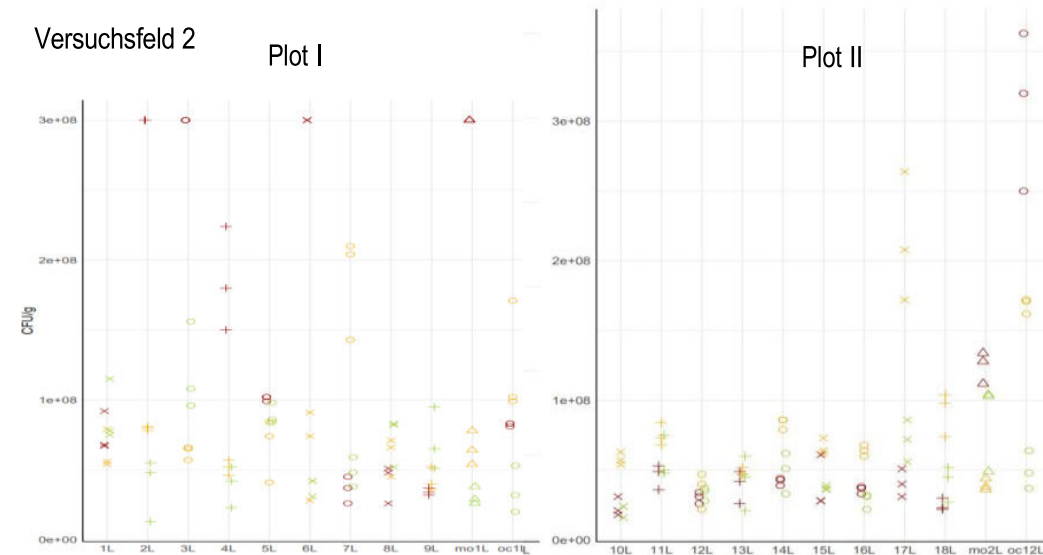


Abb. 13: Isolierbare Bakterien der einzelnen Subplots der beiden Versuchsfelder und



Veränderungen zwischen dem Jahr der Anlage, dem Folgejahr mit erneuter Inokulation und vor der zweiten Inokulation in 2024. Die koloniebildenden Einheiten (cfu) sind mit Bezug zur erfolgten Inokulation und der Lokalisierung auf den einzelnen Subplots aufgetragen. Die Isolate wurden aus subplotspezifischen Bodenmischproben in einer Aufschlammung von 10 g Boden in 50 ml 0,9 % NaCl jeweils direkt nach der Probenahme im Mai vor der (erneuten) Inokulation gewonnen.

Interaktionen von Bakterien mit *Tuber*-Mycelium

Um mögliche Mykorrhiza-Helferbakterien zu identifizieren, wurden die Isolate in Co-Kultur mit *Tuber* in *in vitro*-Kulturen getestet. Dabei zeigten sich einige Isolate wie bspw. ein *Pseudomonas* oder ein *Nocardia* als für das Mycelwachstum des Pilzes förderlich (Abb. 14). In Co-Kultur mit anderen Pilzen zeigte sich *Tuber* dagegen als konkurrenzschwächer und wurde im Wachstum beeinträchtigt (Abb. 15). Ein Inokulat sollte also eher Bakterien als Pilze enthalten.

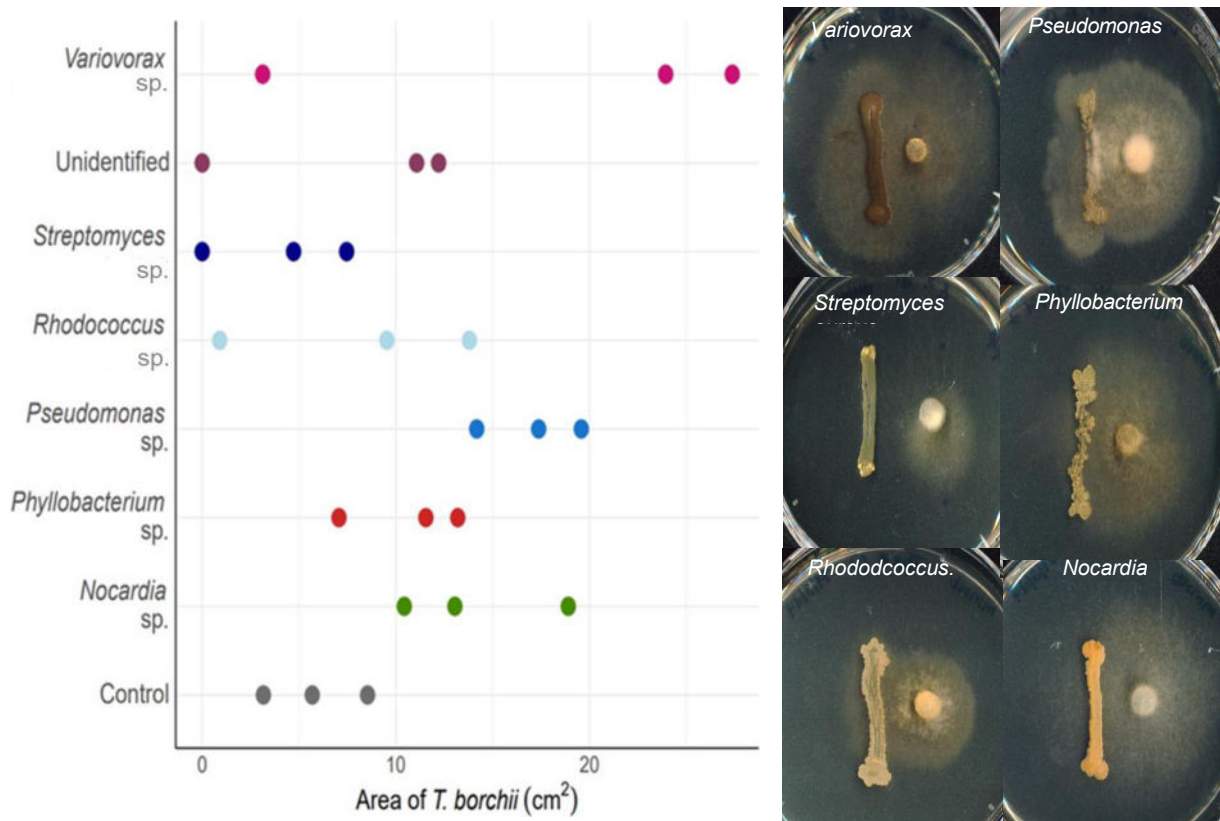


Abb. 14: Co-Kultivierung von Bakterien (Impfstrich jeweils links auf der Kultivierungsplatte mit Mycel von *Tuber borchii* (jeweils als rundes Inokulum rechts aufgebracht) und Analyse des Mycelwachstums des Pilzes im radialen Durchmesser von drei biologischen Replikaten.

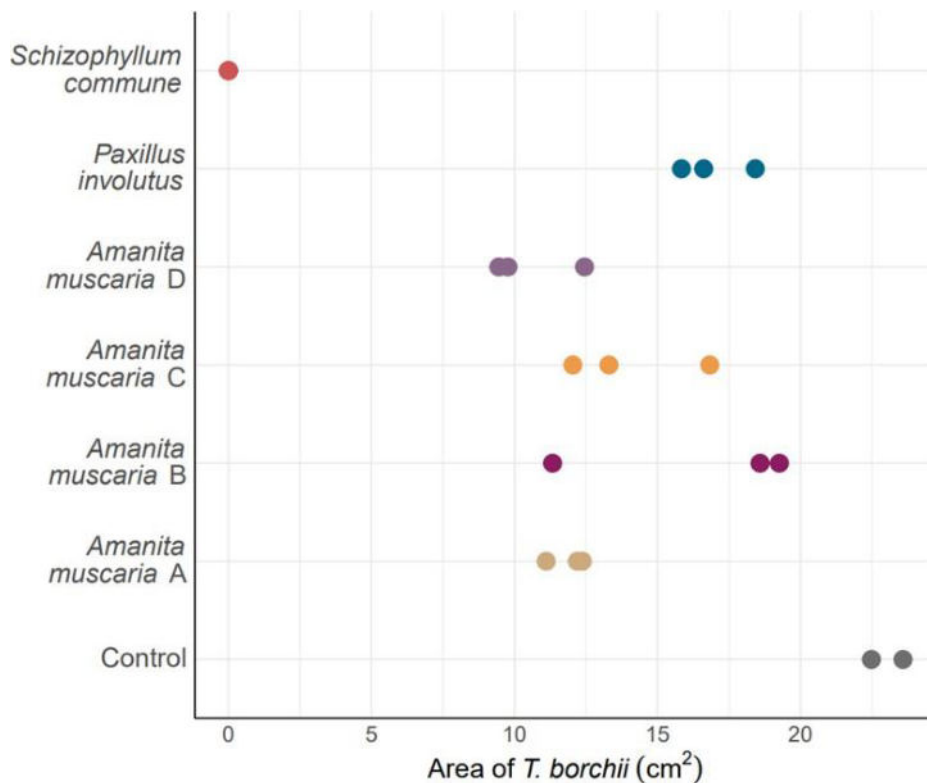


Abb. 15: Co-Kultivierung von Pilzen mit *Tuber borchii*. Analyse des Mycelwachstums von *Tuber* im radialen Durchmesser von drei biologischen Replikaten.

Einfluss abiotischer Faktoren auf Interaktionen mit *Tuber*

Zunächst konnte festgestellt werden, dass *T. borchii* unter Dauerdunkel-Bedingungen – im Gegensatz zu den anderen getesteten Bodenpilzen - deutlich schneller wuchs als unter Normalbedingungen. Es wäre daher möglich, dass der Ascomycet *Tuber* im Gegensatz zu Basidiomyceten durch Weisslicht im vegetativen Mycelwachstum beeinträchtigt wird. Ob ein Zusammenhang dieses Wachstumsparameters mit der hypogäischen Fruchtkörperbildung steht, ist damit ein bisher nicht erforschtes Phänomen. Dies könnte aber auch für die Isolierung von Reinkulturen aus *T. aestivum* von Bedeutung sein, was bisher nicht untersucht wurde.

Des Weiteren wurde untersucht, ob in Co-Kulturen mit möglichen Mykorrhiza-Helferbakterien der Abstand zwischen den Inokulaten eine Rolle spielt. Gleichzeitig wurde eine getrennte Co-Kultivierung in Platten mit einer Barriere studiert, die lediglich den Austausch von gasförmigen Molekülen für die Kommunikation zwischen Bakterien und Pilz ermöglicht. Dabei zeigte sich nach 40 Tagen Co-Kultur kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen 2 und 2,5 cm Anfangsdistanz zwischen Bakterien und Pilz. Der Austausch von Volatilen dagegen führte zu einer leichten Verringerung des Mycelwachstums (Abb. 16). Daraus kann geschlossen werden, dass das Ausbringen eines Inokulats im Feld unabhängig von der Nähe zu einem vorhandenen Mycel von *Tuber* wirksam wäre.

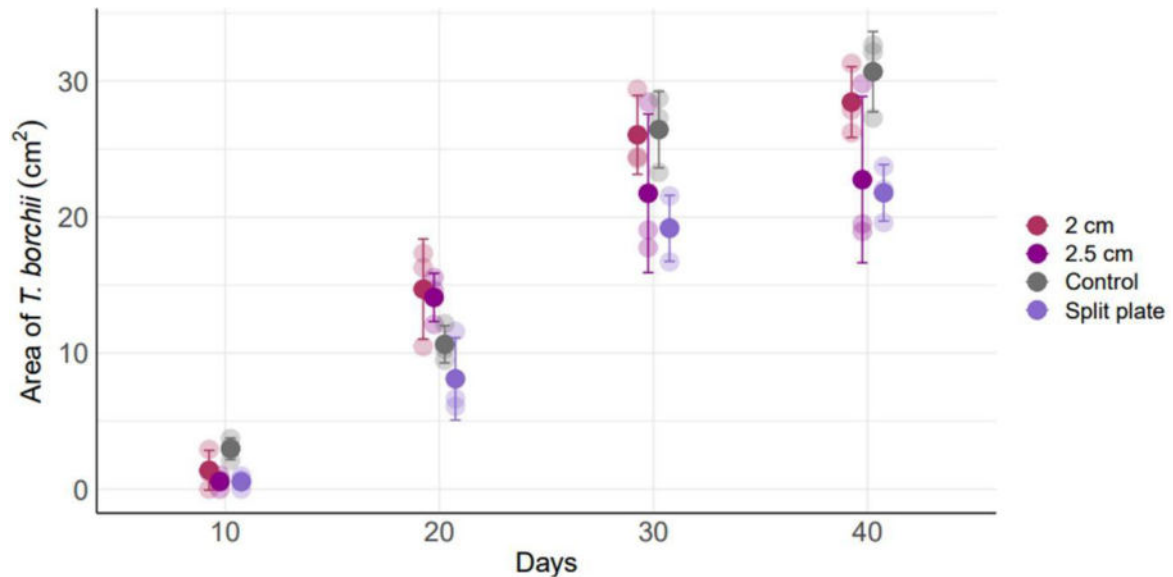


Abb. 16: Mycelwachstum von *T. borchii* in Reinkultur (Control) und in Co-Kultur mit *Variovorax* sp. nach Inokulation im Abstand von 2 cm bzw. 2,5 cm auf einer Kultivierungsplatte, bzw. auf den beiden Hälften einer getrennten Petrischale (split plate), auf der lediglich der Austausch volatiler Signalmoleküle möglich ist.

Herstellung eines eigenen Inokulats zur Förderung der Trüffelformung in Trüffelgärten

Aus den untersuchten Isolat von Bakterien wurde ein erstes eigenes Inokulat erstellt und im Feldversuch erstmalig im Mai 2024 ausgebracht. Dazu wurden acht ausgewählte Bakterienstämme in flüssigem Wachstumsmedium kultiviert, ihre Zellzahl mikroskopisch bestimmt und durch Mischung der ermittelten Mengen aus jeder Kultur ein Inokulat erzeugt, das gleiche Anteile der acht Bakterien enthielt. Dieses frische und an die Kultivierungsbedingungen im Feld angepasste Inokulat wurde dann direkt an die Wurzeln der neu gesetzten Bäume auf den beiden Testfeldern (Plot III) ausgebracht. Eine Analyse des Erfolgs benötigt ausreichende Zeit für zukünftige Analysen und wird daher erst in einem Folgeprojekt ermittelt werden können.

Laborversuche zum Trüffelwachstum

Es konnten 366 Isolate aus Mykorrhizosphären und Fruchtkörpern gewonnen werden, von denen 156 identifizierte Isolate (28 *Streptomyces* sp., 15 *Bacillus* sp., 6 *Rhodococcus* sp., 3 *Pseudarthrobacter* sp., 3 *Agromyces* sp.) weiter bearbeitet wurden. Neben der Konservierung und Charakterisierung über Mikroskopie und Gram-Test wurden Mykorrhiza- relevante Eigenschaften untersucht, um Interaktionen mit Trüffel in Petrischalen (vollständige physikalischer Kontakt bzw. lediglich Austausch von Volatilen möglich) und Interaktionen mit Pflanzen zu ermöglichen.

Die Isolierung von *Tuber aestivum* ist mehrfach gelungen, allerdings besteht ein aus der Literatur bekanntes Problem in der Langzeitkultivierung axenischer Pilzkulturen. Daher wurde ein Isolat von *Tuber borchii* durch die internationalen Kooperationspartner zur Verfügung gestellt, um die Co-Kultivierungsexperimente zu ermöglichen.

Arbeitspaket 3: Herstellung Trüffelbäumchen

Die verschiedenen Verfahren zur Mykorrhizierung wurden übernommen, weiterentwickelt und in verschiedenen Testreihen in der Praxis erprobt. TFP optimierte das komplette Herstellungs- und Pflegeverfahren der Trüffelpflanzen. Als Teil des Anbauerfolgs ist es eingebettet im "Thüringer Modell". Das von uns in den verschiedenen Phasen der Trüffelpflanzen-/Trüffelbaumherstellung optimierte Verfahren weicht von den üblichen im Einsatz befindlichen Verfahren deutlich ab. Die technischen und strategischen Innovationen zeichnen unsere erfolgsorientierte Anbaumethode aus durch:

1. Beginn einer früheren Produktion
2. Höhere Produktionsergebnisse

Das hat zur Folge, dass ab etwa 8. bis 10. Jahr die jährlichen Einnahmen höher sind als die Gesamtinvestition.

Nach diesen Anbauprinzipien wurden die Plantagen der TFP (Feld 1, 2 und 3) und zwei Plantagen mit Happy Horst GmbH angelegt. Die Keimung und Entwicklung der Trüffelpflanzen mit Anzucht von zeitweilig zehn verschiedenen Trüffelbaumarten erfolgt inzwischen in acht Gewächshäusern. Die Gesamtproduktion von derzeit etwa 80.000 Trüffeleinheiten wird ab 2025 stufenweise auf eine Jahresproduktion von bis zu 200.000 erweitert.



Anmerkung: Mit den von uns selbst auf diese Weise produzierten Trüffelpflanzen bestückten wir unsere Musterplantage „Feld 1“ auf dem Betriebsgelände und konnten hier im Jahr 2024 wie geplant im 5. Standjahr nach Auspflanzung die ersten Trüffeln ernten.

Fruktifikation/Produktionsentwicklung

Die einzelnen Trüffelindividuen fruktifizieren nach aller Erfahrung nicht gleichzeitig. Wovon dies außer vom geeigneten Baumpartner noch abhängig ist, haben wir mit der FGH teilweise geklärt, aber eben noch nicht alles. Rein statistisch gesehen setzt im 5. Jahr bei den ersten 1-3 Trüffelpäumchen (von 100) die Fruktifikation ein. Im 6. Jahr sind es dann schon 3-7 Stellen und im 7. Jahr etwa 8-15 Bäumchen, bei denen Trüffeln wachsen. So nimmt bei richtiger Bewirtschaftung der Anlage die Produktivität von Jahr zu Jahr zu, weil immer mehr Trüffelmycelien fruktifizieren. Andererseits nimmt auch die Anzahl der Fruchtkörper jährlich zu. Von Hochertragsplantagen sprechen wir dann, wenn spätestens im 10. Standjahr die 100kg - Marke überschritten wird. Wir erreichten diese Produktionszahlen auf Versuchsanlagen der FGH schon im 8. Jahr.

Arbeitspaket 4: Anbau/Optimierungsversuche im Feld

Dazu wurden von Thüringer Freilandpilze GmbH im Urstromtal der Unstrut und einem weiteren Landwirt, Happy Horst GmbH im Hügelland je eine Trüffelplantage nach dem Thüringer Modell als Hohertragskultur mit insgesamt mehreren Tausend Trüffelbäumchen angelegt. Die Ausbringung der Trüffelkulturen/Trüffelbäumchen geschah im Jahr 2022 und 2023. Um diese Truffiären als Versuchsflächen zu nutzen, erfolgte eine Aufteilung der Anlagen in je drei Plots mit einer entsprechenden Anzahl Subplots. Während Plot 1 und 2 auf beiden Anlagen mit zwei bereits auf dem Markt erhältlichen Bakterienkulturen inokuliert wurden, erfolgte im Jahr 2024 eine Wiederholung und zusätzlich eine erste Inokulation mit eigenem Konsortium auf Plot 3.



Einweisung durch AKN wo sich die Plots und Subplots befinden

Copyright by Thüringer Freilandpilze GmbH

- Anlage von zwei gleichgroßen Versuchsflächen der Kooperationspartner Kirsten Tänzer im Hügelland und Anja Kolbe-Nelde im Urstromtal der Unstrut
- Plot 1 und Plot 2 wurden jeweils mehrfach von der Uni mit zwei verschiedenen Bakterienkulturen inokuliert.
- Auf Plot 3 wurde in 2024 erstmals ein eigenes Konsortium an potentiellen Helferbakterien (MHB) ausgebracht.
- Zum Teil wurde die Zwischenräume mit einer vermutlich die Trüffelproduktion förderlichen Grasart bepflanzt.
- Drei verschiedene Bewässerungssysteme, Versorgung über Brunnen

Ob und welche Bakterienstämme sich als MHB (Mykorrhizahelferbakterien) in der Folgezeit für das Wachstum von Fruchtkörpern von *Tuber aestivum* als förderlich beweisen, zeichnet sich frühestens mit dem Nachweis der ersten Trüffeln ab. Neben der Anfangsmulchung mit Holzhackschnitzeln innerhalb der Reihen, wurden die Zwischenräume mit verschiedenen Grasarten bepflanzt. Erkenntnisse liegen hier noch nicht vor, sondern werden in einem Folgeprojekt ermittelt und bewertet. Die Bewässerung der Anlagen in der Anwuchsphase geschieht über verschiedene Bewässerungssysteme gespeist aus einem bei TFP eigens gebohrten Brunnen. Bei Happy Horst erfolgt die Wasserversorgung durch Lieferung mit Tankwagen.

Versuchsfeld Thüringer Freilandpilze GmbH



- Erkenntnisse
Mulchung
Zwischenpflanzung (Gras)
Überschwemmungsgebiet
Bewässerung
Windschutz
- Erwartungen
Auspflanzung: 2022 und 2023
Produktionsbeginn: 2027 bzw. 2028
Ertragserwartung ab 10 Jahr. >200 kg
- Ertragsentwicklung
Prognoseerstellung im Projekt ab 2025-2027

Copyright by Thüringer Freilandpilze GmbH

Unabhängig von der Einflussnahme durch die FSU rechnen wir mit dem Produktionsbeginn, wie auf unserer Musterplantage Feld 1 im 5. Standjahr (voriges Bild o.r.) vorgelegt, ab etwa Juli 2027 bzw. 2028 für den im Jahr 2023 ausgebrachten Teil an Trüffelpflanzen. Welchen Einfluss dabei die kurzzeitige Überschwemmung zum Jahreswechsel 2023/24 (Bild) ausgeübt hat, bleibt abzuwarten. Eine genauere Prognose zum Erntebeginn und zur Ertragsentwicklung lässt sich erst nach erneuten Mykorrhizierungskontrollen im Jahr 2025 prognostizieren.



Versuchsfeld Happy Horst GmbH



- Erkenntnisse
Mulchung
Zwischenpflanzung (Gras)
Bewässerung
- Erwartungen
Produktionsbeginn
Ertragserwartung bis 10 Jahr
- Ertragsentwicklung

Copyright by Thüringer Freilandpilze GmbH

Die Anlage ist für Vergleichszwecke mit der vorherigen aufgebaut, bestückt und in drei Plots aufgeteilt genau wie bei TFP. Sie unterscheidet sich durch andere Bodenverhältnisse und Höhenlage, eingerahmt von bebuschten Hügeln mit möglicher Mykorrhizaabstrahlung/-ausbreitung in den Untersuchungsbereich und anderen kleinklimatischen Unterschieden. Die Prognose zum Erntebeginn und zur Ertragsentwicklung ist zunächst einmal identisch mit der Bruderplantage.

Die Testfelder wurden angelegt (Abb. 17). Baumbepflanzung mit verschiedenen Baumarten in definierten Reihen- und Baumabständen und wie geplant jährlich (am 18.05.2022, 04.05.2023 und 06.05.2024) inokuliert.

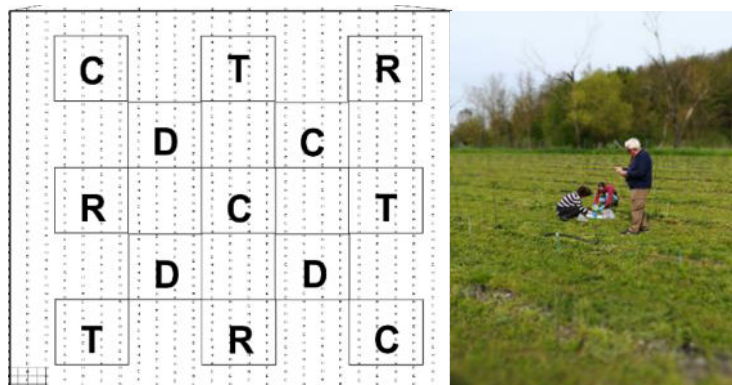


Abb. 17: Schema zur Inokulation der Testfelder bei beiden Landwirtinnen. C: Kontrolle: keine Inokulation, D: Inokulation mit zwei, R: Inokulation mit einem, T: Inokulation mit dem anderen kommerziell erhältlichen Präparat, die schon in Trüffelpplantagen zur Förderung der Fruchtkörperbildung eingesetzt wird (Sharma et al., 2021).

Im Frühjahr 2022 wurden die zuvor detailliert geplanten und wissenschaftlich auswertbaren Feldversuche etabliert und inokuliert (Abb. 17-18). Es wurde auf beiden landwirtschaftlichen Flächen jeweils ein Plot mit Unterpflanzung durch Ansaat von Grasarten und ein zweiter mit Aufbringen einer Mulchschicht angelegt.

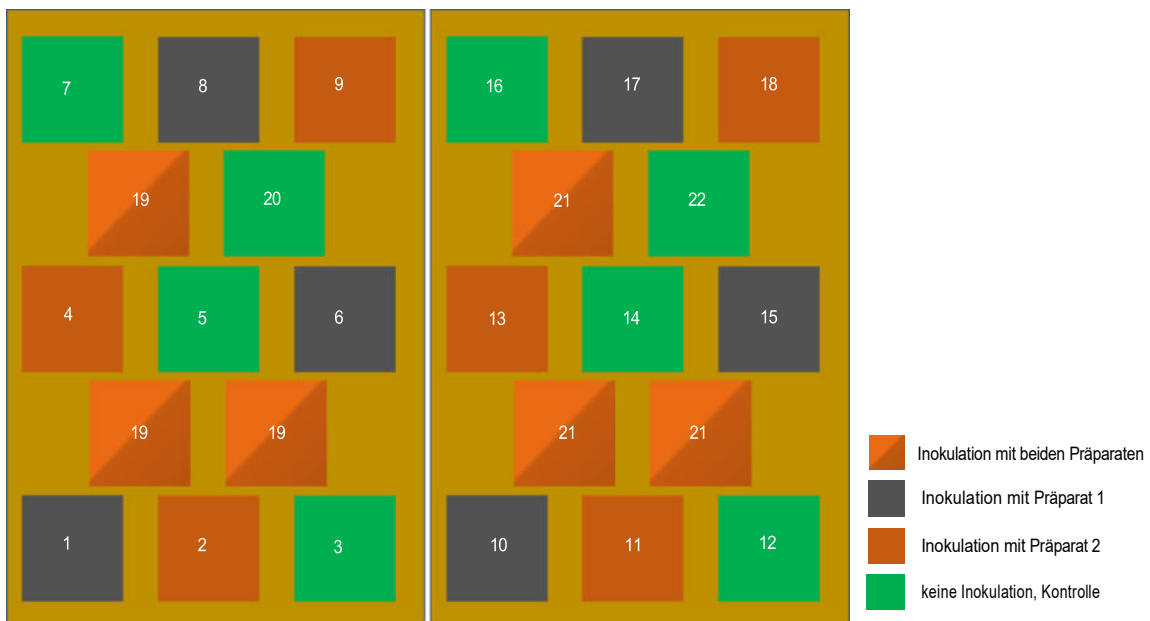


Abb. 18: Versuchsaufbau der Testflächen. Die Inokulationen der ausgewiesenen Subplots auf dem jeweiligen, durchgehend bepflanzten Plot sind farblich markiert. Die Subplots sind zur genauen Identifizierung nummeriert.

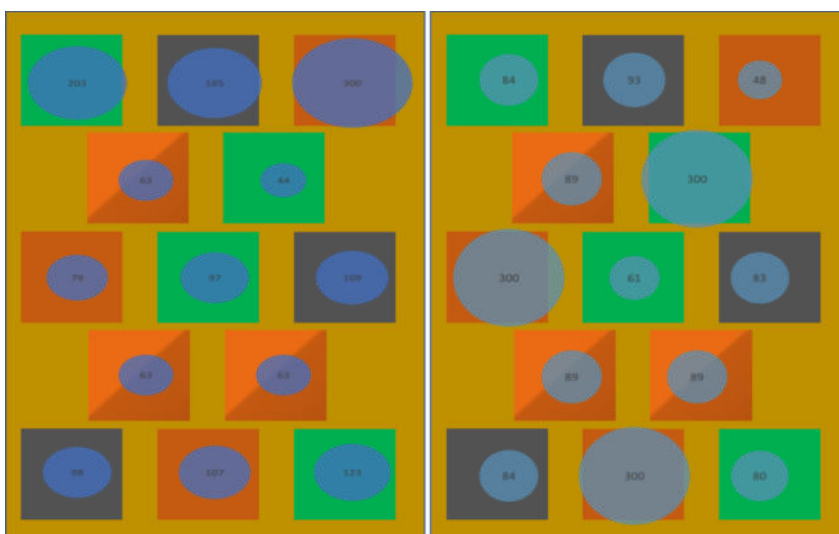


Abb. 19: Die Inokulationen der ausgewiesenen Subplots mit unterschiedlichen Zahlen der Mikroben ist durch die Größe der Kreise dargestellt.

Analyse von Standortfaktoren für die Testfelder

Es wurden von beiden Testfeldern 40 Bodenproben entnommen, um eventuelle Heterogenitäten später unterschiedlicher Produktivität zuordnen zu können. Diese Heterogenität ist bereits bei der Bestimmung der zum Zeitpunkt vor der Inokulation vorhandenen mikrobiellen Vielfalt erkennbar (Abb. 19).

Die Langzeit-Entwicklung der Trüffelmyzelien wurde im Versuchszeitraum weitergeführt. Der aufwendige Versuchsaufbau dient der multifaktoriellen Varianzanalyse von Einflussfaktoren, die nach aktuellem Wissensstand das anfängliche Myzel- und spätere Fruchtkörper- wachstum positiv beeinflussen.

Tab. 5: Morphotypisierung von Baumwurzeln aus dem Feldversuch.

M	Farbe	Verzweigung	Form	Mantel	Rhizo- morphe	Hyphen	Gra d (%)
MT1	braun	unverzweigt, monopodial pyramidal	gerade	wollig	fehlen	häufig, transpa- rent bis grau	50
MT2	hellbraun	unverzweigt, monopodial pyramidal gefiedert	gerade, ge- krümmt	glatt	fehlen	spärlich	10
MT3	braun mit hellen Spitzen	monopodial pyramidal	gerade, ge- krümmt	glatt mit wolgigen Bereiche n	fehlen	spärlich	35
MT4	braun	unverzweigt, monopodial gefiedert	ge- krümmt	locker kurz- dornig	vorhanden	gelblich	5
MT5	hell- braun, meist trans- parent	unverzweigt, monopodial pyramidal	gerade, ge- krümmt	glatt	fehlen	keine	35
MT6	hellbraun, meist transpa rent	unverzweigt, monopodial pyramidal	gerade	glatt/ gemasert mit wolligen Bereiche n	fehlen	einige grau bis transpa- rent	60
MT7	hell- braun, meist trans- parent	unverzweigt	ge- krümmt	glatt, gemasert	fehlen	spär- lich keine	>5
MT8	hellbraun	unverzweigt momopodial pyramidal, -verzweigt	gerade, ge- krümmt	glatt, wollige Bereiche	fehlen	gelblich	30
MT9	Hell- braun	unverzweigt, monopodial pyramidal	gerade, ge- krümmt	wollig	fehlen	gelblich	70

Die im Testfeld ein Jahr nach Pflanzung und ersten Inokulation entnommenen Wurzelproben zeigten eine exzellente Mykorrhizierung mit Morphotypen, die auf *Tuber aestivum* hindeuten (Tab. 5; Abb. 20).

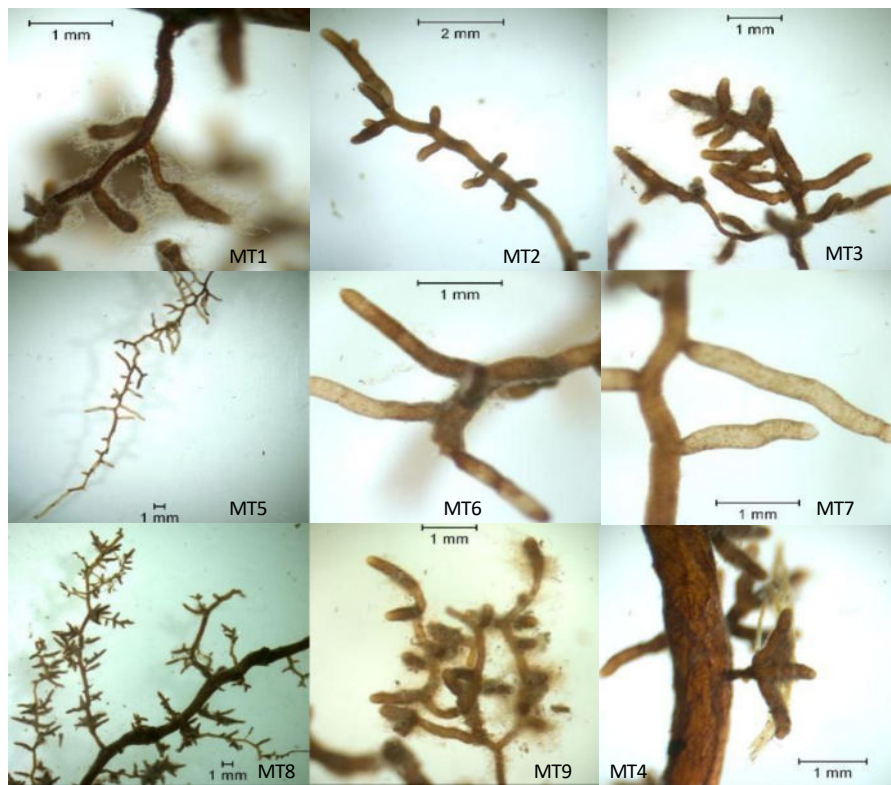


Abb. 20: Kurzurzeln mit Morphotypen der Mykorrhiza im Feldversuch.

Arbeitspaket 5: Verbesserung der Rahmenbedingungen

Die Ausgangslage beschreibt die größte Herausforderung

Ausgangslage: In einem Land, wo Pilze noch nicht einmal in den Lehrplänen der Schulen Platz gefunden haben, nicht in den Schulbüchern erwähnt werden und es keine Ausbildung oder Studium zum Pilzkundler oder Pilzanbauer gibt, ist der Glaube allgegenwärtig und zutiefst verwurzelt Trüffeln gäbe es nur in Frankreich oder Italien. Wenn an deutschen Hochschulen und Universitäten gelehrt und verbreitet wird, Trüffeln könne man nicht anbauen, muss man sich nicht wundern, wenn anders lautende Meldungen herabschauend belächelt, Anträge bei Behörden abgewiesen, Trüffelanbauer für verrückt gehalten und verspottet werden. Die größte Herausforderung war und ist gegen die Unwissenheit in allen Teilen der Bevölkerung anzukämpfen, und zwar mit allen verfügbaren Mitteln und an allen Fronten. Die anfänglichen Schwierigkeiten allein mit den Vertretern der Naturschutzbehörden zeigten beispielhaft auf, dass nur umfangreiche, flächendeckende, hartnäckige und wiederholte Aufklärungskampagnen in der gesamten Bevölkerung, die notwendige Wahrnehmung erzeugt und dann Akzeptanz bis hin zur Nachfrage generiert.

Die wichtigsten Erfolge unserer Pionierarbeiten im Umgang mit Behörden in Stichworten:

- Anerkennung als ordnungsgemäße Landwirtschaft
- Trüffelanbau ist ausdrücklich keine Forstwirtschaft
- Trüffelanbau auch in Hochwassergebieten möglich (Renaturierung von Flussbereichen)
- Aufnahme im Kulturartenkatalog
- Trüffellentnahme aus der freien Natur zu Forschungszwecken, auch in Naturschutzgebieten

			Dauerkulturen	DA
219	861	717111	Artischocken	DK
220	860	717150	Spargel	DK
221	766	730500	Pfingstrosen, Peonien	DK
222	856	750000	Hopfen	DK
223	827	811700	Beerenobst, z.B. Johannis-, Stachel-, Himbeeren u. Holunder	DK
224	835	820100	Schalenfrüchte (Walnuss, Haselnuss)	DK
225	838	830000	Baumschulen	DK
226	983	846000	Weihnachtsbäume	DK
227	851	890920	Rhabarber	DK
228	865	890922	Kultur von Speisepilzen im Freiland	DK
229	980	890923	Kultur von Speisepilzen in Räumen	DK
230	850	890999	Sonstige Dauerkulturen (Art ist anzugeben)	DK
231	850	916101	Sonstige Paludikulturen (nach Anhang 1 AEUV) als Dauerkultur	DK

Kulturartenkatalog Thüringen 2024

Maßnahmen zur Aufklärung und Wissensverbreitung

- Zwei Websites mit fortlaufenden Berichten über Sucherfolge nach Landkreisen geordnet
- Videosequenzen zur Trüffelsuche und Trüffelfunde auf YouTube

Wissensverbreitung: Wissen, statt Glaube

Vorträge mit Betriebsführungen
z.B. Fastengruppe, Touristikgruppen



Pilzzuchtseminare von Pilzen an Holz
bis Trüffelanbau



- Pilzlehrwanderungen für Pilzsucher in Thüringen
- Öffentliche Pilzberatung in Schönewerda
- Spezialseminare für Pilzfinder und Morchelsucher
- Aus- und Weiterbildungsveranstaltungen in verschiedenen Landkreisen für Trüffelsucher mit Ausbildung zu Erntehelfern und Bürgerforschern

Pilzlehrwanderungen/-seminare:
Morchel- und Pilzkurse



Aus- und Weiterbildung:
exklusiv für Kunden



- Aus- und Weiterbildungsveranstaltungen für Trüffelanbauer mit der FGH

- Weiterbildungsseminare exklusiv für Trüffelanbauer der TFP
- Vorträge zu Trüffelvorkommen und Trüffelanbau an Volkshochschulen verschiedener Landkreise in Thüringen auch benachbarter Bundesländer
- Unterstützung von Abiturienten bei Abschlussarbeiten mit Wahlthema Trüffelanbau



- Bereitstellung Arbeitsplatz für Freiwilliges ökologisches Jahr (FÖJ)



- Vorträge zum Trüffelanbau und Beratung auf Messen wie Grüne Woche Berlin, Grüne Tage Erfurt, Landwirtschaftsmesse Feldtage in Erwitte



- Vorträge zum Trüffelanbau vor Berufsverbänden, Interessengruppen, IHK, Bauernverband, Unternehmertreffen, Gastronomie, Lions Club

- Vorträge zum Vorkommen von Hypogäen und Trüffelanbau auf mykologischen Fachtagungen
- Vorträge einschl. Pilze an Holz und Führungen auf dem Betriebsgelände für Fastengruppen, Interessengemeinschaften, Touristikgruppen



- Vorträge mit Vorführungen Trüffelsuche mit Hund



- Gezielte Einbindung von zufällig anwesenden Kindern, Erwachsenen, Passanten, Bauarbeitern etc. bei der innerörtlichen Trüffelsuche oder Begehung von Trüffelstellen



- Vorträge und Einbindung von Politikern von den Landräten über Fachminister bis Ministerpräsidenten



- Einbindung der Medien wie öffentliche und private Fernsehsender, z.B. mdr, ZDF, u.a. Regionale Presse: Thüringer Zeitung, Mitteldeutsche Zeitung, diverse Wochenblätter



- Überregionale Presse und Fachzenungen: Welt, FAZ, Bild der Frau, Bauernzeitung, u.v.a.m.



- Rundfunkbeiträge: Deutschlandfunk, Antenne Thüringen

Begleitend zu den Einzelmaßnahmen unserer Aufklärung führten unsere Bewerbungen zu zwei öffentlichen Würdigungen: Die Verleihung des Innovationspreis 2022 durch das Thüringer Ministerium für Landwirtschaft und den CeresAward mit dem Titel Unternehmerin des Jahres 2024

Überregionale Presse: landesweit bis bundesweit, dpa, Bild,



Radiointerviews: Deutschlandfunk, Antenne





<https://www.ardmediathek.de/video/Y3JpZDovL21kci5kZS9iZWl0cmFnL2Ntcy84MTE0NTcwYS04YzI3LTQzYjYtYjEyOS05MDNiYmEzNDIxN2M>

- bis Juli 2025 in der Mediathek

<https://www.agrarheute.com/management/unternehmerin-jahres-geschaeftsidee-gewinnt-anja-kolbe-nelde-628164>

Literatur

- Agerer R. 1987-2006. Colour atlas of ectomycorrhizae (Einhorn-Verlag: Schwäbisch Gmünd).
- Agerer R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 11, 107-14.
- Ezediokpu MN, **Krause K**, Kunert M, Hoffmeister D, Boland W, **Kothe E**. 2022. Ectomycorrhizal Influence on the dynamics of sesquiterpene release by *Tricholoma vaccinum*. *J Fungi* 8, 555.
- Garbaye J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128, 197-210.
- Navarro-Ródenas A, Berná LM, Lozano-Carrillo C, Andrino A, Morte A. 2016. Beneficial native bacteria improve survival and mycorrhization of desert truffle mycorrhizal plants in nursery conditions. *Mycorrhiza* 26, 769-779.
- Sharma, S, Compant S, **Franken P**, Ruppel S, Ballhausen M-B (2021) It takes two to tango: a bacterial biofilm provides protection against a fungus-feeding bacterial predator. *Microorganisms* 9, 1566.
- Wagner K, **Krause K**, Gallegos-Monterrosa R, Sammer D, Kovács ÁT, **Kothe E**. 2019. The ectomycorrhizospheric habitat of Norway spruce and *Tricholoma vaccinum*: Promotion of plant growth and fitness by a rich microorganismic community. *Front Microbiology* 10, 307

Abschlussarbeiten und wissenschaftliche Veröffentlichungen (wird weitergeführt)

Für die Arbeiten relevante Publikationen:

- Abdulsalam O, Ueberschaar N, Krause K, Kothe E. 2022. Geosmin synthase ges1 knock-down by siRNA in the dikaryotic fungus *Tricholoma vaccinum*. *J Basic Microbiol* 62, 109-115.
- Abdulsalam O, Wagner K, Wirth S, Kunert M, David A, Kallenbach M, Boland W, Kothe E, Krause K. 2021. Phytohormones and volatile organic compounds, like geosmin, in the ectomycorrhiza of *Tricholoma vaccinum* and Norway spruce (*Picea abies*). *Mycorrhiza* 31, 173-188.
- Arantza S-J, Medrano-Roldán H, Kothe E, Chávez-Avilés MN, Valiente-Banuet JI, Fierros-Romero G. 2021. Bio- and phytoremediation: plants and microbes to the rescue. of heavy metal polluted soils. *SN Appl Sci* 4, 59.
- Bogdanova O, Kothe E, Krause K. 2023. Ectomycorrhizal community shifts at a former uranium mining site. *J Fungi* 9, 483.
- Dudeja SS, Kothe E. 2021. Bacterial endophytes: molecular interactions with their hosts. *J Basic Microbiol* 61, 475-505.
- Ezediokpu MN, Halitschke R, Krause K, Boland W, Kothe E. 2023. Pre-symbiotic response of the compatible host spruce and low-compatibility host pine to the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma vaccinum*. *Front Microbiol* 14:1280485.
- Ezediokpu MN, Krause K, Kunert M, Hoffmeister D, Boland W, Kothe E. 2022. Ectomycorrhizal Influence on the dynamics of sesquiterpene release by *Tricholoma vaccinum*. *J Fungi* 8, 555.
- Kothe E. 2021. Special Focus: Bioremediation and biosynthesis. *J Basic Microbiol* 61, 959.

Kothe E. 2022. Special Focus: Ecological services of Gram-positives. J Basic Microbiol 62, 763.

Kothe E. 2023. Special issue: From mushrooms to sustainable agriculture. J Basic Microbiol 63, 3.

Kothe E. 2023. Special issue: Plant growth promotion to biomass degradation. J Basic Microbiol 63, 689.

Kothe E. 2023. Special issue: Plant protection and growth promotion. J Basic Microbiol 63:1179.

Kothe E. 2024. Special issue: Fungal ecology. J Basic Microbiol 21:e2400267.

Kothe E. 2024. Special issue: Soil microbiology and agriculture. J Basic Microbiol 64:e2400025.

Kothe E. Special focus: Rhizosphere microbes. J Basic Microbiol 64:e2400591.

Kothe E. Special Issue: Fungal Diversity. J Basic Microbiol 65:e2400775.

Traxler L, Krause K, Kothe E. Basidiomycetes to the rescue: Mycoremediation of metal-organics co-contaminated soils. Adv Appl Microbiol 129:83-113.

Für die Arbeiten relevante Abschlussarbeiten:

Abdulsalam O. 2021. Biological chemistry of ectomycorrhizal interactions. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Bogdanova O. 2021. Microbial processes in mycorrhizosphere of plants growing at a former uranium mining site. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Bredau S. 2021. Mykorrhiza-Gemeinschaften am Teststandort Ronneburg. Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Chen X. 2023. Charakterisierung der stickstofffixierenden Bakterien auf den Flächen eines ehemaligen Uranbergbaugebiets. Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Engelhardt F. 2023. Interaktionen in der Trüffel Ektomykorrhizosphäre. Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Ezediokpu MN. 2023. Terpenes in the ectomycorrhizal association between Norway spruce (*Picea abies*), or Scots pine (*Pinus sylvestris*) and *Tricholoma vaccinum*. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Fürst D. 2023. Einfluss mikrobiologischer Behandlungen auf das Phytoremediationspotential verschiedener Baumarten auf metallbelasteten Böden eines ehemaligen Bergbaustandortes. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Gopa Kumar Nair A. Microorganisms associated with *Tuber aestivum*: Natural and post inoculation soil microbiome in the fields. Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Gopa Kumar Nair A. Interaction of microorganisms in truffle. Dissertation seit 01.01.2024

Harpke M. Microbial adaptation and community dynamics in a former uranium mining and milling site. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Jeckstiess MJ. 2023. *Tuber aestivum*: Effect of soil parameters and microorganism composition on growth and cultivation. Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

- Kienle L. 2022. Isolation of ectomycorrhizal fungi and investigation of their nitrogen metabolism. Bachelorarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Majhi AK 2022. Investigation of hydrophobins in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma vaccinum*. Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Neetu N. 2023. Investigation of beneficial microbe-microbe/plant-interaction in sustainable horticulture. Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Nushrat N. 2023. Investigation of mating types genes in the basidiomycete *Tricholoma vaccinum*. Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Östreicher M. Metal stress response of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma vaccinum*. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Proma RT. 2023. Characterization of microbes and microbial consortia from rhizosphere and their impact on plant growth of different *Petunia* genotypes. Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Traxler LC. 2021. The potential of *Schizophyllum commune* for mycoremediation at the Chernobyl Exclusion Zone. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Warthöfer J. 2023. Stabilisierung organischer Bodensubstanz im ehemaligen Bergbauggebiet Ronneburg durch kalkhaltige und mikrobielle Zusätze. Masterarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Fazit und Ausblick

Wir haben uns mit unserer Trüffelbaumschule in den vergangenen Jahren mit großer Entschlossenheit und Ausdauer gegen die weit verbreitete Unwissenheit über den Trüffelanbau in Deutschland gestemmt. Trotz anfänglicher Widerstände durch Behörden, Wissenschaft und Öffentlichkeit ist es gelungen, Akzeptanz und Anerkennung für den Trüffelanbau als landwirtschaftliche Kulturform zu erlangen. Die zahlreichen erfolgreichen Initiativen zur Wissensvermittlung, die intensive Öffentlichkeitsarbeit und die enge Zusammenarbeit mit Medien, Fachverbänden und politischen Entscheidungsträgern haben entscheidend dazu beigetragen, dass Trüffel als heimische Kulturpflanze zunehmend wahrgenommen und gefördert werden. Die öffentliche Würdigung durch den Innovationspreis 2022 und den CeresAward 2024 unterstreicht den Erfolg dieser Pionierarbeit.

Doch der Weg ist noch nicht zu Ende. Der nächste Schritt wird sein, die Grundlagen für eine langfristige Etablierung des Trüffelanbaus in Deutschland weiter auszubauen. Dazu gehören verstärkte Forschungsk Kooperationen, die Entwicklung gezielter Ausbildungsprogramme sowie die Integration des Trüffelanbaus in agrarwissenschaftliche und forstwirtschaftliche Lehrpläne. Ebenso wird die rechtliche Anerkennung des Trüffelanbaus als eigenständige landwirtschaftliche Disziplin weiter vorangetrieben, um langfristige Planungssicherheit für Anbauer zu schaffen.

Darüber hinaus soll die gesellschaftliche Akzeptanz weiter gestärkt werden – sei es durch Bildungsinitiativen an Schulen, die Ausweitung von Fachexkursionen oder die verstärkte Einbindung der Gastronomie, um Trüffel als nachhaltiges und regionales Produkt zu etablieren. Auch die Zusammenarbeit mit politischen Entscheidungsträgern wird fortgeführt, um Rahmenbedingungen für den Trüffelanbau weiter zu optimieren.

Die bisherigen Erfolge sind ein Beweis dafür, dass der Trüffelanbau in Deutschland nicht nur möglich, sondern eine wertvolle Bereicherung für die heimische Landwirtschaft ist. Mit Beharrlichkeit, Innovationsgeist und einem starken Netzwerk wird die Trüffelbaumschule auch in Zukunft eine Vorreiterrolle einnehmen und den Trüffelanbau in Deutschland nachhaltig prägen.

An wissenschaftlicher Begleitforschung sind längerfristige Arbeiten auf den angelegten Testfeldern notwendig. Dabei ist das durch die Inokulation veränderte Mikrobiom weiter anzupassen, insbesondere nachdem weitere physiologische und Interaktionsstudien erfolgt sind, um optimierte Fruchtkörperbildung zu erreichen. Für eine Probe eines hochproduktiven Standorts mit geringem Reifegrad (und daher zu Bedingungen am Beginn der Fruchtkörperbildung) wird eine Meta-Transkriptionsanalyse, gekoppelt an Metagenomik, durchgeführt.

Die Nachhaltigkeit einer Inokulation (z.B. durch strenge Winter, das Wachstum und Alter der Bäume, etc.) sollte unbedingt weiterhin untersucht werden. Der Einfluss von Helferbakterien auf die Trüffelbildung soll über den Austausch von Geruchsstoffen der Pilze bearbeitet werden. Dabei werden die Hypothesen untersucht, dass Mykorrhizahelferbakterien aus der Nähe und aus den Trüffeln isoliert werden können, die einen positiven Einfluss auf die Trüffel nehmen und dass Helferbakterien und Trüffelpilz über Geruchsstoffe (volatile organische Verbindungen) kommunizieren. Die etablierten Testfelder können dazu uneingeschränkt verwendet werden. Aus der Kartierung von Vorkommen zur Ermittlung positiver Standortfaktoren ergab sich eine besondere Relevanz des Kalkgehalts der Böden. In Laboruntersuchungen sollten daher zukünftig auch die pH-Abhängigkeit der

Mykorrhizierungsraten untersucht werden. Schliesslich können die hier aus AP 1 erhaltenen Daten genutzt werden, um die Entwicklung der Fruchtkörper im Jahresverlauf (in Abhängigkeit von Geologie, Bodentyp, Landschaftsmorphologie, botanischer Bedeckungsgrad, Temperatur, aktueller Bodentemperatur und Niederschlagsmenge) mit einer kleinräumigen Kartierung von Pflanzen (inklusive Leguminosen für Stickstoffkreislauf und Endomykorrhizapflanzen) verbunden werden.

Als besonders relevant für die Rolle von Mikroorganismen für die Trüffelentwicklung ergaben sich arbuskuläre Endomykorrhiza, die durch die Unterpflanzung bereits in die ersten Untersuchungen auf den Testflächen einbezogen wurden. Die Korrelation sollte durch weitere Beprobung von Kurzwurzeln der Bäume statistisch abgesichert werden und in der Aufsammlung an hoch- vs. gering produktiven Standorten mit eingebunden werden. Gleichzeitig ergibt sich Forschungsbedarf bei der Frage nach der Wichtigkeit des Stickstoffzyklus. Mit weiteren Probennahmen und Mikrobiomanalysen und umfassender Datenerfassung mit anschließender biometrischer und bioinformatischer Analyse lassen sich potenzielle Mykorrhizahelferbakterien identifizieren und sie Hypothesen-basiert zu verschiedenen Konsortien zusammenstellen. Die Inokulation mit geeigneten Konsortien aus 10 Bakterienisolaten ist erstmalig im Testfeld 3 an den beiden Standorten erfolgt und sollte unbedingt weiter untersucht und durch angepasste Konsortien ergänzt werden. Die Plantagen sind vorbereitet, um auch weitere Konsortien im Feld zu testen und zu optimieren. Diese Chance ist einmalig und kann nur durch weitere Forschung vorangetrieben werden.