

Accademia dei Georgofili- Accademia Italiana della Cucina

Giornata di studio. Il tartufo: biologia e gastronomia Pisa 7/3/2013

Sesso e Genoma

Andrea Rubini, Claudia Riccioni, Beatrice Belfiori, Francesco Paolocci.

CNR, Istituto di Genetica Vegetale sez. di Perugia - Via Madonna alta 130, 06128, Perugia. Tel. 075 5014863, E-mail: andrea.rubini@cnr.it; francesco.paolocci@cnr.it

I tartufi sono corpi fruttiferi ipogei prodotti da ascomiceti del genere *Tuber* a seguito della relazione simbiotica con radici di varie specie di piante forestali che si instaura mediante la differenziazione di strutture di scambio pianta/fungo note come ectomicorrize. Alcune specie di *Tuber* producono tartufi eduli apprezzati per il loro inconfondibile bouquet, tra questi spiccano il Tartufo nero Pregiato, *T. melanosporum*, ed il Tartufo Bianco Pregiato *T. magnatum*.

A fronte di una crescente domanda per questi funghi, delizia dei gourmet di tutto il mondo, ha fatto riscontro negli ultimi decenni una produzione naturale in continuo declino (Hall *et al.*, 2003). Pertanto, incrementare la produzione di tartufi pregiati sia mediante interventi di gestione e recupero delle tartufaie naturali che mediante la coltivazione *ex novo* è vista come una reale opportunità di ricavare profitto in maniera del tutto sostenibile da aree marginali. Questa possibilità è ora largamente esplorata anche in paesi e continenti dove questi funghi non sono endemici come ad esempio il Sud e Nord America, l'Australia e Nuova Zelanda ed il Sudafrica.

E' interessante infatti sottolineare come pratiche empiriche ed anche pionieristiche abbiano dimostrato la possibilità di coltivare le varie specie di tartufo. La successiva messa a punto di metodiche sperimentali per l'ottenimento di piante ospiti micorrizzate è stato il motore che ha dato il via alla tartuficoltura oramai da diversi decenni (Fontana 1967; Chevalier e Grente 1978). Ciononostante, persistono ancora oggi molte difficoltà nell'ottenere tartufaie coltivate pienamente produttive, in particolare per il *T. magnatum*, la cui coltivazione ad ora ha dato esiti poco incoraggianti. Ciò ha determinato la necessità di affiancare alla sperimentazione in campo, studi volti ad acquisire maggiori informazioni e conoscenze sul ciclo biologico e sull'ecologia di questi organismi per la costituzione di tartufaie coltivate effettivamente produttive e per il recupero di quelle già impiantate (Rubini *et al.*, 2001; Paolocci *et al.*, 2006; Riccioni *et al.*, 2008).

A questo proposito notiamo come solo da pochi anni la ricerca si sia indirizzata allo studio della biologia e ciclo vitale di questi funghi. I primi studi condotti mediante marcatori molecolari hanno evidenziato bassa variabilità genetica tra popolazioni naturali di tartufi pregiati ed assenza di eterozigosi nei corpi fruttiferi, ritenuti strutture dicariotiche. Ciò ha indotto i ricercatori ad ipotizzare che i tartufi fossero funghi omotallici con una marcata prevalenza di autofecondazione (Bertault *et al.*, 1998, 2001). Tuttavia, successivi studi di genetica di popolazione, grazie ad un campionamento rappresentativo e la disponibilità di marcatori molecolari codominanti ed altamente polimorfici come i microsatelliti (Rubini *et al.*, 2004, Riccioni *et al.*, 2008), hanno evidenziato non solo la presenza di una notevole variabilità genetica in *T. magnatum* e in *T. melanosporum*, ma anche la presenza di flussi genici (fenomeni di incrocio) entro popolazioni e tra popolazioni limitrofe (Rubini *et al.*, 2005; Riccioni *et al.*, 2008). L'esistenza di fenomeni di incrocio è stata poi confermata attraverso un approccio diretto mirato ad indagare la variabilità allelica tra spore e gleba da singoli corpi fruttiferi. Nello specifico, l'uso di marcatori microsatellitari polimorfici congiuntamente alla messa a punto di protocolli per l'isolamento ed analisi parallela del DNA dalle ascospore e dalle ife che compongono la gleba hanno consentito di dimostrare la presenza di alleli addizionali all'interno delle ascospore rispetto a quelli presenti nella gleba circostante. Ciò ha permesso di concludere che gli alleli addizionali evidenziati nelle spore sono il risultato del contributo di un partner sessuale (paterno) e che la gleba dei tartufi, indipendentemente dalla specie, è al contrario costituita da ife aploidi di origine uniparentale (materna) (Paolocci *et al.*, 2006; Riccioni *et al.*, 2008).

La dimostrazione della presenza di fenomeni di incrocio non è stata tuttavia sufficiente a risolvere il quesito circa le modalità riproduttive dei *Tuber* perché rimaneva inesausta la domanda se questi funghi erano o meno obbligati ad una fecondazione incrociata (Rubini *et al.*, 2007). Negli ascomiceti, infatti, esistono due principali modalità riproduttive: l'omotallismo e l'eterotallismo. La modalità riproduttiva dipende dalla struttura ed organizzazione del locus del Mating Type (*MAT*) in cui sono presenti i due geni per la riproduzione sessuale, denominati *MAT1-2-1* e *MAT1-1-1*. Nelle specie omotalliche i due geni *MAT* sono presenti nello stesso individuo aploide, quindi queste specie non hanno sessi distinti ed ogni ceppo è in grado sia di autofecondarsi che di incrociarsi con qualsiasi altro individuo. Nelle specie eterotalliche, al contrario, i due geni *MAT* sono presenti in ceppi diversi, in tal modo l'autofecondazione viene impedita e la riproduzione sessuale può avvenire solo tra individui di polarità sessuale opposta. Le due forme alternative del locus *MAT* in questi funghi sono state chiamate idiomorfi (*MAT1-1* e *MAT1-2*) invece di alleli a causa delle loro differenti sequenze (Metzenberg e Glass, 1990).

Recentemente, il sequenziamento del Genoma del *T. melanosporum* ad opera di un consorzio Franco-Italiano di Ricercatori ci ha consentito di identificare il locus del mating type per la prima volta in una specie di *Tuber* (Martin *et al.*, 2010). Le analisi del genoma hanno mostrato la presenza del solo gene *MATI-2-1* suggerendo una organizzazione di tipo eterotallico. Ciò è stato confermato da ulteriori ricerche che ci hanno prima consentito di clonare il gene *MATI-1-1* da un ceppo differente rispetto a quello sequenziato e poi di dimostrare come ogni singolo ceppo fungino sia portatore di un singolo gene *MAT* (Rubini *et al.*, 2011a).

La dimostrazione della presenza di ceppi di *T. melanosporum* con diverso mating type ci ha quindi indotto ad indagare la distribuzione di ceppi con diversa sessualità i tartufoie naturali, coltivate ed in piante artificialmente inoculate mediante sospensioni sporali di *T. melanosporum*. Queste indagini hanno dimostrato una distribuzione “sbilanciata” dei due sessi sulle piante ospiti suggerendo l’esistenza di possibili fenomeni di competizione tra ceppi di *T. melanosporum* di sessualità opposta (Rubini *et al.*, 2011b; Murat *et al.*, 2013).

Indagini parallele condotte studiando i miceli presenti in campioni di suolo hanno tuttavia evidenziato la presenza di ceppi con entrambi i mating type nello stesso sito di campionamento. Rimane da indagare se questi miceli non associati alle radici delle piante campionate derivino dalla germinazione delle ascospore presenti nel terreno o derivino dalle ife che si sviluppano e si accrescono da micorrize di piante vicine, percorrendo anche lunghe distanze nel suolo. Indipendentemente dalla loro origine, questi miceli di sessualità diversa rispetto a quella dei ceppi presenti sulle radici delle piante ospiti sembrano rappresentare il partner sessuale necessario alla fruttificazione e quindi al compimento del ciclo biologico di questo fungo.

Tuttavia notiamo come nei funghi del genere *Tuber*, a differenza di molti altri ascomiceti saprofiti e patogeni, non sono state osservate le tipiche strutture deputate alla riproduzione sessuale (ascogoni ed anteridi) e le modalità con cui avviene la fecondazione in questi funghi rimangono ancora da determinare (Rubini *et al.*, 2007).

A tale proposito è da rilevare che negli ascomiceti ed in particolare nelle specie eterotalliche la comunicazione tra ceppi di polarità sessuale opposta avviene tramite la produzione di peptidi segnale chiamati feromoni i quali interagiscono con specifici recettori prodotti dalle cellule di polarità sessuale opposta, il cosiddetto sistema feromone-recettore (Pöggler, 2011).

Grazie all’analisi del Genoma, molti dei geni ortologhi a quelli del sistema feromone-recettore degli ascomiceti sono stati identificati in *T. melanosporum* suggerendo che tale pathway è presente anche in *Tuber*. Inoltre, i primi risultati di uno studio tuttora in corso, basato sull’analisi funzionale attraverso espressione eterologa in lievito, indicano che il sistema feromone-recettore è funzionante

in *T. melanosporum*. Ciò apre la strada alla possibilità di studiare in maniera mirata a livello molecolare i meccanismi della fecondazione in *Tuber* e di valutare gli stimoli fisico-chimici e biologici necessari affinché essa abbia luogo.

La caratterizzazione dei loci e dei geni del mating type è in corso in altre specie di *Tuber* e risultati preliminari indicano che l'eterotallismo è un fenomeno comune in queste specie.

In sintesi, l'approccio biomolecolare ci ha consentito di risolvere questioni di base sulla biologia dei tartufi, aspetti che hanno anche un impatto pratico-applicativo di forte rilevanza. Queste ricerche suggeriscono infatti in maniera inequivocabile come non solo i fattori ecologici, ma anche fattori biologici come la distribuzione delle diverse polarità sessuali siano parametri da dover tenere in considerazione per una tartuficoltura moderna e remunerativa

Bibliografia:

- Bertault G, Raymond M, Berthomieu A, Callot G, Fernandez D (1998). Trifling variation in truffles. *Nature* 394:734.
- Bertault G, Rousset F, Fernandez D, Berthomieu A, Hochberg ME, Callot G, Raymond M (2001). Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. *Heredity* 86:451–458.
- Chevalier G, Grente J (1978). Applications pratiques de la symbiose ectomycorhizienne: production á grande échelle de plants mycorhizés par la truffe (*Tuber melanosporum*). *Mushroom Science* 10:483–505.
- Fontana A (1967). Sintesi micorrizica tra *Pinus strobus* e *Tuber maculatum*. *Giornale Botanico Italiano* 101:298–299.
- Hall IR, Yun W, Amicucci A (2003). Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in Biotechnology* 21: 433–438.
- Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, Porcel B, Rubini A, Amicucci A, Amselem J, Anthouard V, Arcioni S, Artiguenave F, Aury JM, Ballario P, Bolchi A, Brenna A, Brun A, Buée M, Cantarel B, Chevalier G, Couloux A, Da Silva C, Denoeud F, Duplessis S, Ghignone S, Hilselberger B, Iotti M, Marçais B, Mello A, Miranda M, Pacioni G, Quesneville H, Riccioni C, Ruotolo R, Splivallo R, Stocchi V, Tisserant E, Viscomi AR, Zambonelli A, Zampieri E, Henrissat B, Lebrun MH, Paolocci F, Bonfante P, Ottonello S, Wincker P (2010). Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464:1033–1038.
- Metzenberg RL, Glass NL (1990). Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *Bioessays* 12:53–59.
- Murat C, Rubini A, Riccioni C, De la Varga H, Akroume E, Belfiori B, Guaragno M, Le Tacon F, Robin C, Halkett F, Martin F, Paolocci F (2013). Fine scale spatial genetic structure of the black truffle (*Tuber melanosporum*) investigated with neutral microsatellites and functional mating type genes. *New Phytol* In corso di stampa.
- Paolocci F, Rubini A, Riccioni C, Arcioni S (2006). Reevaluation of the life cycle of *Tuber magnatum*. *Appl Environ Microbiol* 72:2390–2393
- Pöggeler S, O’Gorman C., Hoff B, Kuck U (2011). Molecular organization of the mating type loci in the homothallic ascomycetes *Eupenicillium crustaceum*. *Fungal Biol.* 115:615–624.
- Riccioni C, Belfiori B, Rubini A, Passeri V, Arcioni S, Paolocci F (2008). *Tuber melanosporum* outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario. *New Phytol* 180:466–478.
- Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Tisserant E, Arcioni S, Martin F, Paolocci F (2011a). Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete *Tuber melanosporum*. *New Phytol* 189:710–722.
- Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Arcioni S, Martin F, Paolocci F (2011b). *Tuber melanosporum*: mating type distribution in a natural plantation and dynamics of strains of different mating types on the roots of nursery-inoculated host plants. *New Phytol* 189:723–735.
- Rubini A., Paolocci F, Granetti B, Arcioni S (2001). Morphological characterization of molecular-typed *T. magnatum* Pico ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 11:179–185.
- Rubini A, Paolocci F, Riccioni C, Vendramin GG, Arcioni S (2005). Genetic and phylogeographic structure in the symbiotic fungus *Tuber magnatum*. *Appl Environ Microbiol* 71:6584–6589.
- Rubini A, Riccioni C, Arcioni S, Paolocci F (2007). Troubles with truffles: unveiling more of their biology. *New Phytol* 174:256–259.
- Rubini A, Topini F, Riccioni C, Paolocci F, Arcioni S (2004). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in white truffle (*Tuber magnatum*). *Mol Ecol Notes* 4:116–118.