

Analisi proteomica in *Tuber magnatum*

Federico VITA, Valentina LUCAROTTI, Amedeo ALPI

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali (DiSAAA-a), Via Mariscoglio 34, 56124 Pisa (PI) Italia

Indirizzi mail:

FV: federico.vita@for.unipi.it

VL: valentina.lucarotti@for.unipi.it

AA: aalpi@agr.unipi.it

Introduzione

I tartufi sono funghi ascomiceti ipogei ectomicorrizici appartenenti al genere *Tuber* (Trappe 1979). Organismi eterotrofi appartenenti all'ordine Pezizales, instaurano rapporti di simbiosi mutualistica con piante forestali quali *Quercus*, *Alnus*, *Castanea*, *Populus*, *Salix* tra le angiosperme e *Pinus* e *Abies*, tra le gimnosperme, prediligendo condizioni climatiche caratterizzate da primavere calde umide, estati secche intervallate da temporali ed inverni temperati. I corpi fruttiferi, o ascocarpi, rappresentano il prodotto finale del rapporto simbiotico e costituiscono la parte edule del fungo, conosciuta comunemente con il nome di tartufo ed apprezzata per il sapore intenso e l'aroma (Splivallo *et al.*, 2011). Il *Tuber melanosporum* ed il *Tuber magnatum* Pico rappresentano, da un punto economico ed organolettico, le specie più importanti sulle quali si è concentrata l'attenzione dei ricercatori negli ultimi anni. Conosciuto anche con il nome di Tartufo nero pregiato o Périgord black truffle, il *T. melanosporum* rappresenta la specie più studiata all'interno del genere *Tuber*, grazie anche alla recente pubblicazione del genoma ad opera di un consorzio interuniversitario Italo-Francese. Caratterizzato da un elevato valore di mercato (più di 1000 €/kg) (Garcia-Montero *et al.*, 2007), il tartufo nero pregiato ha subito negli ultimi anni una estensione del proprio areale di distribuzione, dal Mediterraneo (Spagna, Italia e Francia principalmente) fino ad arrivare al resto d'Europa, l'Australia, Nuova Zelanda, Cina e Stati Uniti, grazie ai numerosi contributi scientifici che ne hanno permesso

la coltivazione con buoni risultati in termini di quantità (Bonet *et al.*, 2009), con produzioni tali da bilanciare il decremento produttivo in corso nelle tartufaie naturali (Suz *et al.*, 2008). Il Tartufo bianco pregiato, o *T. magnatum* Pico., rappresenta invece la specie più rilevante da un punto di vista economico, con quotazioni che possono arrivare fino ai 4000 €/Kg (Mello *et al.*, 2006). Presente in alcune parti d'Italia (Toscana, Piemonte, Marche, Umbria, ecc), nell'Istria e in diverse regioni dei Balcani. Numerosi sono stati i tentativi effettuati per ottenere coltivazioni controllate di questo fungo che, ad oggi, non hanno portato ai risultati sperati. Come risultato, i corpi fruttiferi possono essere raccolti solo nel proprio ambiente naturale di crescita. Tale fattore, legato anche alla limitata disponibilità del prodotto, variabile e poco costante nel tempo, provoca periodiche fluttuazioni di mercato, mantenendo i prezzi costantemente elevati e rendendo il tartufo bianco pregiato oggetto di frodi e mistificazioni, che si attuano con sostituzioni con prodotti di minor pregio. L'espressione genica, e dunque il profilo proteico, risulta essere influenzato da numerosi fattori, come le condizioni di crescita e sviluppo, lo stadio di sviluppo stesso e piccole variazioni geniche. Questo ultimo fattore è stato recentemente correlato con la variabilità individuata nella produzione di composti volatili in *Tuber aestivum* (Splivallo *et al.*, 2012). Il ciclo biologico di un tartufo può essere distinto in fasi (Martin *et al.*, 2010) e numerosi tentativi sono stati fatti per caratterizzare specie simili da un punto di vista morfologico (ad esempio *Tuber borchii* e *T. magnatum*), individuando, ad esempio, differenze a livello delle ectomicorrize (Murat *et al.*, 2005) Utilizzando approcci basati su real-time pcr ed analizzando alcune sequenze ITS ribosomiali (Internal Transcribed Spacer) è stato possibile individuare dei fattori discriminanti capaci di caratterizzare alcune delle specie appartenenti al genere *Tuber*. L'utilizzo dei marcatori SSR (SSR) ha inoltre evidenziato la possibilità di utilizzare un marcatore molecolare per identificare le diverse fasi del ciclo biologico del *T. magnatum* (Paolocci *et al.*, 2006). I risultati sono incoraggianti, ma l'origine ambientale dei corpi fruttiferi non può essere determinata con queste metodologie. L'utilizzo di un approccio proteomico sembra dunque il più adatto risolvere il problema. I primi tentativi sono stati effettuati (Mouchès *et al.*, 1978) utilizzando il profilo proteico ottenuto dai carpofori come criterio tassonomico per la distinzione dei funghi superiori. L'utilizzo di questo approccio ha reso possibile la differenziazione di numerose specie di *Tuber*. Questi risultati basati soprattutto su analisi isoenzimatiche, hanno dato buoni contributi (Dupré *et al.*, 1984, Gandeboeuf *et al.*, 1994) ma il problema di differenziare le

aree di origine all'interno della stessa specie rimane irrisolto. L'elettroforesi bidimensionale (2DE) è stata utilizzata in numerosi studi per l'analisi dei profili proteici fungini. (de Oliveira and de Graaff 2011). I fattori responsabili della variabilità proteica sono numerosi, tra i quali lo splicing alternativo, le modificazioni post-traduzionali e quelle relative ai gruppi ammino e carbossi terminale, oppure la formazione di legami disolfuro, la glicosilazione o l'aggiunta di gruppi lipidici (Jorge *et al.*, 2006). L'interazione tra il genoma ed un particolare ambiente può generare diverse proteine, strutture proteiche diverse (differenze qualitative) o proteine presenti in quantità variabili (differenze quantitative). Sulla base di queste considerazioni, abbiamo scelto di utilizzare un approccio proteomico basato su elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa al fine di confrontare i profili proteici dei corpi fruttiferi di *T. magnatum* Pico, cresciuto naturalmente in diverse aree italiane, con l'obiettivo di caratterizzarne l'origine di provenienza. In questo contributo, vengono riportate alcune proteine che potrebbero consentire di ottenere tale risultato; l'obbiettivo futuro è la caratterizzazione completa dell'intero proteoma.

Materiali e metodi

Corpi Fruttiferi

I corpi fruttiferi appartenenti alle varie accessioni di *T. magnatum* sono stati raccolti, in due annate successive, nel centro e nel nord Italia (nelle regioni: Toscana, Piemonte, Marche e Umbria), come riportato nella Tab 1. Per ogni accessione, sono stati utilizzati almeno tre carpofori, i cui estratti proteici sono stati miscelati per incrementare l'omogeneità del campione. I campioni freschi sono stati ripuliti in maniera accurata ed immersi in una soluzione al 70% di alcol etilico per ridurre il livello di contaminazione microbica. Successivamente, lo strato più esterno (peridio) è stato rimosso mentre la parte più interna, la gleba, è stata utilizzata per le analisi proteomiche. L'analisi microbiologica, effettuata per verificare la presenza di microrganismi all'interno della gleba, ha dimostrato che il trattamento con etanolo non elimina completamente i contaminanti microbici, ma attenua comunque il numero di CFU raggiungendo un livello tale da impedire la rilevazione delle loro proteine (dati non mostrati). I campioni sono stati poi polverizzati in mortaio utilizzando azoto liquido ed infine conservati a -80°.

Estrazione Proteica

Circa 0,5 g di materiale fresco è stato polverizzato in azoto liquido e miscelato con 1.6 ml di buffer d'estrazione (Urea 8 M, Tris-HCl 40 mM, CHAPS 4%, DTT 60 mM) in accordo con (Yang *et al.*, 2006) per ciascun campione in analisi. Gli omogenati sono stati successivamente centrifugati per 15 min a 13.000 rcf (4°C) per separare la frazione solida da quella liquida. Le proteine, contenute nel soprannatante, sono state precipitate con il metodo TCA-acetone (TCA 13% e 0,007% β -mercaptoetanolo in acetone), trasferite a -20 ° C per 2 ore ed infine mantenute a 4 ° C per 2 ore. I campioni sono stati poi centrifugati per 15 minuti a 14000 rcf (4°C) ed il precipitato è stato ri-solubilizzato due volte in acetone freddo (100%), nuovamente centrifugato alla stessa velocità, miscelato con 50-500 μ l di buffer di estrazione ed infine centrifugato a 3000 rcf per 25 minuti (4°C). La quantificazione proteica è stata effettuata utilizzando il saggio Bradford (BIO-RAD Hercules, CA), utilizzando l'albumina di siero bovino (BSA) come standard.

Analisi elettroforetiche (2DE)

I gel bidimensionali relativi ai campioni in analisi sono stati ottenuti combinando la focalizzazione isoelettrica (IEF), o prima dimensione, con l'elettroforesi SDS-PAGE, o seconda dimensione, come descritto in (Corti *et al.*, 2005, Fanucchi *et al.*, 2012) Gli estratti proteici ottenuti (1 mg) sono stati caricati separatamente su strip IPG (Immobilized pH gradient) per le analisi. Strip IPG (18 cm, GE-Healthcare), con un range di pH 4-7, sono state reidratate con 350 μ L di Buffer (8 M urea, 2% w/v CHAPS, 40 mM DTT and 0.5% v/v IPG Buffer) contenente il campione. Le strip, contenenti il campione proteico, sono state coperte con olio minerale, applicando i seguenti parametri di corsa mediante l'apparato IPGphor (GE-Healthcare) per la separazione delle proteine (prima dimensione) : 12 h di reidratazione a temperatura ambiente seguita da elettroforesi, 2 h a 300 V, 6 h a 3500 V, 3 h a 8000 V ed una fase finale di 8000 V (totale 56000 Vhs). Avvenuta la focalizzazione isoelettrica le strip sono state condizionate in due step distinti, per rompere i ponti disolfuro ed impedirne la riformazione. (Primo step, buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 8 M urea, 30% v/v glicerolo, 2% w/v SDS, 40 mM DTT; Secondo step, buffer: stessa

composizione del precedente eccetto per la sostituzione del DTT con 40 mM IAA). La seconda dimensione, o SDS-PAGE, è stata effettuata utilizzando l'apparato Protean II XL (20 × 20 cm, BioRad) per elettroforesi verticali. I gel di poliacrilammide al 12% sono stati risolti a 15 ° C con corrente costante di 40 mA per gel. Il marker molecolare utilizzato presentava un range da 10 a 150 kDa (BioRad). Le proteine risolte in 2DE, sono state visualizzate mediante colorazione Coomassie (colloidale brillante blu, Sigma) per le analisi preparative. Per l'analisi bioinformatica sono stati utilizzati tre gel per ogni anno di raccolta di ogni accessione (per un totale di sei gel per due anni).

Analisi delle immagini ed analisi statistica

I gel 2D ottenuti sono stati acquisiti e le immagini ottenute, ad alta risoluzione (300 dpi), sono state utilizzate per la successiva analisi bioinformatica. Tali immagini sono state acquisite mediante il sistema CCD ProXpress (Perkin Elmer). L'analisi delle immagini è stata effettuata con il software ProGenesis SameSpots vs 3.2.3 (NonLinear Dynamics) utilizzando tre repliche tecniche (gel 2D) per ogni condizione biologica (diversi anni), ottenute in tre esperimenti indipendenti. La massa molecolare relativa (M_r) delle proteine è stata stimata tramite il confronto con il peso molecolare (M_w) del marker proteico utilizzato come riferimento (Precision, Bio-Rad, Hercules, CA), mentre i valori relativi al punto isoelettrico sono stati assegnati secondo quanto indicato nelle linee guida GE-Healthcare. La quantità di proteina è stata espressa come volume dello spot, definito come la somma della densità ottica di tutti i pixel che costituiscono lo spot, rilevato dal software. Le differenze relative ai livelli proteici (aumento o diminuzione di intensità) sono state quantificate confrontando i volumi normalizzati degli spot, come percentuale del volume relativo di ogni singolo spot sul totale di tutti gli spot presenti nel gel.

L'analisi bioinformatica ha identificato la presenza di spot caratterizzati da significativi valori ANOVA (q-value) e "fold change", utilizzati per le identificazioni proteiche mediante spettrometria di massa. Tali spot sono stati selezionati poiché capaci di discriminare i campioni in analisi, presentando proteine differenzialmente espresse. L'analisi post-test (test di Tukey) è stata effettuata sulla base dei risultati di ANOVA, al fine di individuare specifiche correlazioni tra i campioni. La rilevanza di ogni spot nel discriminare campioni provenienti da aree diverse è stata valutata mediante PCA

(principal component analysis) per le diverse combinazioni di spot espressi in maniera differenziale.

Identificazione delle proteine mediante spettrometria MALDI-TOF e nLC-ESI-MS \ MS

Gli spot di interesse sono stati "excisi" dal gel, ridotti, alchilati, e digeriti durante la notte con tripsina bovina (Roche Diagnostics Corp.) come precedentemente descritto da Shevchenko *et al.*, 1996. I prodotti della digestione (1 mL) sono stati utilizzati per l'analisi MS. Per tali analisi è stato utilizzato l'acido α -ciano-4-idrossicinnamico come matrice. Gli spettri di massa sono stati ottenuti con lo strumento MALDI-TOF Voyager DE-STR (Applied Biosystems / MDS Sciex). Gli ioni sono stati generati mediante irradiazione con laser pulsato (UV 337 nm, durata dell'impulso 3 ns, frequenza del polso 3 Hz), e rilevati in modalità reflector. Lo strumento è stato settato con i seguenti parametri: accelerazione 20'000 V e range di massa 750-4000 Da. Gli spettri sono stati acquisiti tramite il software Voyager 5.10 (Applied Biosystems). Una volta acquisiti, gli spettri sono stati elaborati utilizzando il software Explorer 4.0 (Applied Biosystems) e calibrati internamente con i prodotti di autolisi della tripsina ed i cluster di matrice. I dati MALDI-TOF sono stati estratti manualmente creando una lista di peptidi corrispondenti al picco monoisotopico (privato dei segnali della tripsina e della matrice) che sono stati confrontati utilizzando il programma Mascot Server 2.2.07 con i dati presenti nel database di riferimento, utilizzando un valore massimo di 50 ppm (peptide mass tolerance, errore standard) ed il valore $p < 0,05$ come soglia di significatività per il Mascot Score. Per l'analisi ESI, 5 μ l di campione digerito con tripsina è stato iniettato nel sistema cromatografico capillare (Agilent Serie 1100) equipaggiato con una pompa Nano, (Pompa Iso, Degaser), utilizzando un ciclo di iniezione di 8 microlitri (Agilent). La separazione dei peptidi è avvenuta utilizzando una colonna analitica RP (reverse phase) nano. La fase mobile consisteva di: acqua con 2% di acetonitrile, 0,1% di acido formico (v / v; tampone A) e acetonitrile con acqua 2%, acido formico 0,1% (v / v; tampone B). Per la separazione dei peptidi è stato utilizzato un gradiente da 8% a 80% di tampone B, con portata costante di 200 nL / min. I peptidi eluiti sono stati ionizzati da una sorgente di ioni nanoelectrospray (Proxeon Biosystems) ed analizzati utilizzando uno spettrometro di massa con tecnologia Qstar API

PULSAR (PE-Sciex). Il potenziale HV è stato settato a circa 1,8-2,0 kV. Gli spettri di massa sono stati selezionati in un range da m/z 350-1600 Da. Per ogni spettro MS, i due picchi più intensi che presentano carica di-e/o tri- isotopica sono stati selezionati per la successiva frammentazione (MS / MS, range da m / z 100-1600 Da).

I dati MS / MS derivati dall'analisi ESI sono stati convertiti in file mgf utilizzando Mascot.dll (versione 1.6b27) attraverso il software Analyst QS 1.1 (Applied Biosystems). La successiva ricerca in banca dati (via Daemon Mascot 2.2.2, Server Mascot 2.2.07) è stata effettuata, in primo luogo, contro un database personalizzato di contaminanti noti (quali: tripsina e cheratine derivate dalla collezione cRAP); di seguito solo i peptidi non identificati dal primo database sono stati confrontati con il secondo database Proteome_tuber UniProt_Complete 2012_07 (7679 sequenze; 3339250 residui). I parametri di tolleranza fissati per la ricerca in banca dati sono stati di 200 ppm e di 0.3 Da rispettivamente per i peptidi ed i frammenti ionici. Per quanto riguarda gli altri parametri utilizzati per l'identificazione, sono state selezionate l'alchilazione della cisteina (carbamidometilazione) e l'ossidazione della metionina come modificazioni fisse e variabili, impostando 20 come valore di cut-off per gli ioni. La qualità degli spettri MS / MS è stata controllata manualmente. Le proteine per le quali non è stata possibile un'identificazione funzionale, sono state caratterizzate attraverso analisi Blast (UniProtKB BLASTP), utilizzando le impostazioni predefinite.

Estrazione dell'RNA totale e Real-Time PCR

L'RNA totale è stato estratto da campioni polverizzati come precedentemente descritto da Chomczynski e Sacchi nel 2006. Questo protocollo è stato selezionato sulla base della sua capacità di rimuovere i contaminanti dai campioni di RNA estratti. La verifica dell'integrità dell'RNA ottenuto è stata eseguita, per tutti i campioni, attraverso elettroforesi su gel di agarosio all'1% mentre per verificarne la qualità, l'RNA è stato analizzato spettrofotometricamente. I campioni di RNA sono stati sottoposti a trattamento con DNasi (Turbo DNA-free kit, Ambion, USA) per rimuovere l'eventuale contaminazione da DNA. L'RNA ottenuto è stato quindi retrotrascritto utilizzando il kit SuperScript® III

Reverse Transcriptase (Life Technologies, UK) utilizzando primer random. L'analisi di espressione genica è stata effettuata utilizzando l'apparato ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, USA) come descritto da Licausi *et al.*, (2010). Le analisi qPCR sono state eseguite utilizzando 30 ng di cDNA ed il reagente iQ™ SYBR Green Supermix (BioRad laboratori), secondo le istruzioni del produttore. Due repliche tecniche sono state eseguite per ciascun replicato biologico (n = 4). Come gene housekeeping è stato utilizzato il 18S rRNA di *T. magnatum* (AF054901). I livelli di espressione relativi sono stati calcolati utilizzando Genorm (<http://medgen.ugent.be/genorm/>). I primer sono stati disegnati utilizzando Primer 3. Nell'elenco che segue viene riportata la lista dei primers utilizzati, con il codice specifico di identificazione del gene in Tuber (in parentesi è riportato il codice UniProt della proteina relativa):

GSTUM_00009270001 (D5GJY5), 5'-gcactggcaccactcctacc-3'(forward), 5'-gaagaaggtgcccccaaac-3' (reverse); GSTUM_00007439001 (D5GGN7), 5'-gaccaggaataccgcaccaa-3' (forward), 5'-tcctcctcagccttgtagc-3' (reverse); GSTUM_00008874001 (D5GJ78), 5'-gcgccatcaaggatattgga-3' (forward), 5'-aacaccagtggcgatgtcct-3' (reverse); GSTUM_00003332001 (D5G9M7), 5'-tcctcgcctcgctatgag-3' (forward), 5'-aacttcgacgaggtccacca-3' (reverse); GSTUM_00005271001 (D5GAF9), 5'-gttttgacaccgccgataa-3' (forward), 5'-aaggttcctgcaccacaga-3' (reverse); GSTUM_00000555001 (D5GC43), 5'-gttgaaaacgcagcctctc-3' (forward), 5'-gccctcatcctcgacaacac-3' (reverse); GSTUM_00005237001 (D5GAC6), 5'-acctgtgcgattctgggtgct-3' (forward), 5'-atccgtaggctcgccaaaat-3' (reverse); GSTUM_00006427001 (D5GE86), 5'-gaagccaatctcgaggtga-3' (forward), 5'-aaaacggcttcggtgtctt-3' (reverse); GSTUM_00001447001 (D5G5R4), 5'-gagctcctcgaaagcatca-3' (forward), 5'-ccaggaagaggggttgcc-3' (reverse); DQ223686.1 (Q1ACW3), 5'-gaaggctctccgctacgaca-3' (forward), 5'-accgcaagccttgacttga-3' (reverse); AF054901, 5'-actagggatcgggcatgtt-3' (forward), 5'-cagccttgcgaccatactcc-3' (reverse).

Risultati

Campioni raccolti in due anni (come descritto nella sezione "Materiali e metodi") e provenienti da diverse aree italiane sono stati utilizzati per l'analisi proteomica. Il grado di maturazione dei corpi fruttiferi è stato misurato secondo Zeppa *et al.*, (2002); i corpi fruttiferi, da noi impiegati negli esperimenti, avevano raggiunto una percentuale dell'80-100% di spore mature (fase 5) e presentavano un colore giallo-bruno-rossastro (Garnero *et al.*, 2000). Almeno sei replicati indipendenti (2D gel) sono stati realizzati per ogni accessione di Tuber, di cui tre per ogni anno di raccolta. I gel sono stati analizzati sulla base del numero, dimensione ed intensità degli spot ottenuti. Oltre 600 spot proteici riproducibili sono stati rilevati in ciascun gel. Il confronto dei profili proteici effettuato tra le diverse accessioni di Tuber ha rivelato la presenza di differenze quantitative (intensità degli spot) rimaste costanti nei diversi anni di raccolta (Fig. 1, Fig. 3). Completata l'analisi bioinformatica, 60 spot sono stati selezionati sulla base dei valori statistici di ANOVA e "fold change", fornendo una utile base per la distinzione dei campioni in analisi. Tra questi, 17 presentavano la maggior capacità discriminante, risultando più adatti per caratterizzare le zone di origine, come valutato mediante l'analisi delle componenti principali (PCA); sono stati quindi selezionati per l'analisi MS (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3). I risultati PCA (Fig. 2), mostrano che è possibile distinguere campioni provenienti da diverse regioni (Toscana, Piemonte, Marche, Umbria), analizzando le informazioni ottenute dagli spot selezionati. Gli spot 2 e 8 contribuiscono, ad esempio, a formare un cluster in cui il campione Umbria mostra valori di intensità normalizzata inferiori alle altre aree di raccolta (Fig. 3), mentre gli spot 6 e 7 sono in grado di differenziare i campioni provenienti dal Piemonte (Alba 1 e 2) da tutti gli altri. Anche il campione proveniente dalle Marche può essere distinto dagli altri (spot 12), mentre le accessioni provenienti dalla Toscana (il gruppo più rappresentativo) mostrano differenze a carico degli spot 3 e 5 (Fig. 3). L'analisi post-test (Tukey test), effettuata per analizzare i dati di ANOVA su coppie di campioni ha mostrato come alcune accessioni siano differenziabili all'interno della stessa regione di origine (Toscana). Ad esempio, il campione Crete Senesi presenta differenze di intensità a carico degli spot 1 e 3, mentre gli spot 4 e 10 distinguono il campione Lucca dalle altre accessioni in analisi.

Le analisi di spettrometria di massa hanno portato all'identificazione proteica in 15 spot su 17 punti selezionati. In due spot (10 e 12) non sono state identificate proteine mentre in ciascuno degli spot 5, 13, 16 e 17 sono state identificate due diverse proteine. Un totale di 17 diverse proteine sono state identificate (16 da analisi ESI-TOF e 1 mediante analisi MALDI), anche se negli spot 2 e 8, e 6 e 9 sono state individuate isoforme diverse della stessa proteina (Tab 2, Tab 3). Tutte le proteine, con l'eccezione di Q1ACW3 (mannitolo 2-deidrogenasi NADP+) erano state precedentemente identificate in *T. melanosporum* (Tab 2, Tab 3). Per garantire una corretta identificazione funzionale, una analisi blast (BLASTP, UniProtKB) è stata eseguita quando non erano disponibili altre informazioni.

Alcune delle proteine identificate possono essere raggruppate secondo le vie metaboliche a cui appartengono. Gli spot 4 e 5 appartengono al metabolismo della metionina. La metionin-adenosiltransferasi (denominata in lingua inglese S-adenosyl methioninesynthase) (spot 5, Tab 2) è un enzima che, similmente alla metionina solfossido reduttasi peptide (spot 4, Tab 4), potrebbe avere un ruolo nella protezione delle cellule contro il danno ossidativo (Weissbach *et al.*, 2002). La metionin-adenosiltransferasi sembra partecipare alla biosintesi ed alla interconversione cisteina / metionina, giocando un ruolo chiave nella produzione del solfuro di idrogeno (H₂S) (Martin *et al.*, 2010). Il solfuro di idrogeno è un precursore di molti composti volatili, tra cui il trisolfuro e disolfuro di dimetile (Landaud *et al.*, 2008), che sono tra i principali composti volatili responsabili dell'aroma in *T. magnatum*. Altre proteine possono essere raggruppate sulla base della loro attività redox. La diidrolipoil deidrogenasi (spot 3), svolge un ruolo nella omeostasi cellulare, mentre la gliosale ossidasi (spot 2 e 8) catalizza l'ossidazione di numerose aldeidi con produzione di H₂O₂ extracellulare (Kersten 1990). È interessante osservare come la gliosale ossidasi presenti alcuni tratti in comune con un altro enzima fungino, la galattosio ossidasi. I residui catalitici del sito attivo risultano essere conservati tra questi due enzimi (Whittaker *et al.*, 1999). La galattosio ossidasi catalizza l'ossidazione di alcoli primari ad aldeidi ed è conosciuta per essere un enzima monomero di 68,5 kDa (Jazdzewski and Tolman 2000), anche se in precedenza veniva considerato un dimero o un polimero superiore (Hamilton *et al.*, 1978). Nel nostro lavoro la gliosale ossidasi è stata identificata a due diversi pesi molecolari (91 e 162 kDa), anche se allo stesso valore di punto isoelettrico (pI). Anche i relativi valori di intensità risultano essere simili per

entrambi gli spot oltre che ben correlati con i dati dei trascritti (analisi qPCR), come dimostrato dai valori dei campioni Alba 1 ed Umbria che presentano rispettivamente il livello di espressione più alto e più basso.

Per ottenere ulteriori dati, oltre all'identificazione delle proteine è stata effettuata una analisi di espressione genica mediante qPCR su geni selezionati, riconducibili alle proteine identificate. Due repliche tecniche sono state eseguite per ogni analisi qPCR. Quando, a causa della mancanza di informazioni non è stato possibile disegnare primer specifici (ad esempio per la malato deidrogenasi), le analisi non sono state effettuate. L'analisi qPCR risulta essere utile anche nei casi di doppia identificazione in un singolo spot, per cercare di determinare quale delle due proteine risulti essere responsabile delle variazioni osservate tra i tartufi di origine diversa. I trascritti di 10 geni su 17 sono stati analizzati con questo metodo. Per i restanti 7 geni, non è stato possibile selezionare coppie di primer specifici a causa della attuale mancanza di informazioni disponibili. I geni analizzati nel campione Lucca presentavano mediamente bassi livelli di espressione rispetto agli altri campioni; ciò è probabilmente dovuto alla qualità dell'RNA, inferiore rispetto agli altri campioni. Con questa eccezione, i dati di espressione genica mostrano in genere una buona correlazione con i livelli delle proteine corrispondenti, come dimostrato dagli spot 2 e 7 (Fig. 3, Fig. 5). Nel punto 2, sia i livelli della proteina D5GJY5 (gliosiale ossidasi, Tab 4) che del trascritto associato risultavano più alti nel campione Crete Senesi. Stesso discorso può essere fatto per la proteina D5GAF9 (proteina per la biosintesi della piridossina) identificata nello spot 7, in cui sia i livelli proteici che del trascritto relativo risultano essere maggiori nel campione di San Miniato. In quattro casi (punti 5, 13, 16 e 17) sono state identificate due proteine per ciascuno spot. Per questi campioni, sono stati analizzati i livelli dei trascritti relativi ad entrambe le proteine, ad eccezione dello spot 16. Come mostrato in Figura 5, i livelli di trascritto dello spot 5 (proteine D5G9M7), confermano il trend. Allo stesso modo, nello spot 13, il livello di trascritto relativo alla proteina D5GAC6 è ben correlato con l'intensità dello spot. Questo può suggerire come tali proteine siano quelle che contribuiscono maggiormente alle differenze di intensità rilevate negli spot 5 e 13.

Conclusioni

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare i profili proteici relativi ai corpi fruttiferi di *T. magnatum* raccolti in due anni da diverse zone d'Italia. I carpofori sono stati raccolti, negli anni successivi, nella stessa zona e, quando possibile, dalla stessa pianta. Come mostrato dai risultati, sono state identificate alcune proteine in spot che variano a seconda del luogo di origine, ma che non cambiano, in intensità, da un anno all'altro. Anche se una caratterizzazione completa del proteoma del corpo fruttifero di *T. magnatum* richiederebbe ulteriore lavoro, le proteine identificate in questo lavoro rappresentano a nostra conoscenza il primo contributo su questo argomento. Ciò è stato reso possibile grazie anche al recente sequenziamento di *T. melanosporum*, che ha incrementato notevolmente le probabilità di identificare correttamente le proteine in un organismo appartenente allo stesso genere, il cui proteoma non è ancora stato analizzato. La disponibilità di queste informazioni di base ha reso possibile l'identificazione proteica delle proteine sopra citate.

Queste proteine (riportata in Tab 2, 3, 4) hanno distinte funzioni biochimiche e solo alcune di esse appartengono alla stessa via metabolica. Considerando tale aspetto, assieme alla limitata copertura del proteoma ottenuta, commenti generali di tipo biochimico o fisiologico potrebbero risultare preliminari. Abbiamo deciso di analizzare mediante spettrometria di massa solo quegli spot statisticamente significativi in seguito all'analisi bioinformatica, senza analizzare l'intero proteoma presente su gel, dal momento che tali spot caratterizzano in maniera migliore le diverse aree di raccolta.

Il fungo è un organismo eterotrofo che, quindi, basa il suo metabolismo sull'approvvigionamento di fonti esterne di carbonio organico, al fine di ottenere energia per il suo metabolismo. La mannitolo 2-deidrogenasi (NADP⁺) è legata al metabolismo dei carboidrati (Ceccaroli *et al.*, 2007). Questo enzima catalizza la conversione di mannitolo a mannosio, ma può risultare molto attivo nella conversione reversibile fruttosio-mannitolo (Ceccaroli *et al.*, 2011). Sembra logico supporre che corpi fruttiferi raccolti in ambienti diversi presentino modulazioni anche in un metabolismo fondamentale come quello dei carboidrati.

I carboidrati vengono convogliati verso la glicolisi ed il ciclo TCA per produrre energia e

metaboliti. Un enzima del ciclo di TCA (malato deidrogenasi) è una delle proteine influenzate dall'ambiente, dando supporto all'idea che il metabolismo respiratorio fungino risulti essere influenzato dal diverso ambiente. In alternativa, questo enzima potrebbe essere coinvolto nel ciclo del glicosilato e quindi nella gluconeogenesi (Abbà *et al.*, 2007) con la sua peculiare duplice funzione.

La proteina D5GJY5, identificata come gliossale ossidasi con un elevato livello di "e-value" ottenuto dall'analisi BLAST, rappresenta una proteina importante per la degradazione della lignina attraverso la produzione di H₂O₂ extracellulare (Kersten 1978, Whittaker *et al.*, 1996). D'altra parte, il *T. magnatum* utilizza diverse strategie nutrizionali (saprotrofica, endofitica e simbiotica) in relazione all'ambiente ed alla fase di sviluppo del ciclo vitale (Murat *et al.*, 2005).

Per le rimanenti proteine identificate risulta essere più difficile estrapolare specifici significati fisiologici, anche se tutte hanno importanti funzioni biologiche.

Certamente, con questi risultati si è dimostrato come numerose proteine di *T. magnatum*, una specie il cui genoma, al momento, non è stato ancora sequenziato, possano essere identificate ed un ruolo biochimico specifico possa essere assegnato ad ognuna di esse; con un numero maggiore di identificazioni proteiche, previste per il futuro, un quadro fisiologico più chiaro potrà essere disponibile.

I risultati di questo studio mostrano come sia possibile utilizzare un approccio proteomico per verificare la coerenza delle variazioni quantitative relative alle proteine di interesse. I risultati hanno mostrato una elevata riproducibilità dei pattern proteici ottenuti a partire da campioni raccolti in anni diversi. Abbiamo identificato 17 proteine in *T. magnatum* Pico, che forniscono una base per il futuro sviluppo della caratterizzazione proteomica basata su corpi fruttiferi provenienti da aree diverse.

Fig 1: Gel 2D gel relativo al campione San Miniato (1 mg di estratto proteico) colorato con Coomassie colloidale. Gli spot selezionati mediante analisi bioinformatica vengono riportati.

Fig 2: Analisi delle componenti principali (PCA) ottenuta sulla base della capacità dei 17 spot selezionati di discriminare l'area di origine dei campioni in analisi. I cerchi rosa rappresentano i campioni Toscani; i cerchi verdi rappresentano i campioni provenienti dall'Umbria; i cerchi gialli rappresentano i campioni provenienti dalle Marche ed i cerchi blu rappresentano i campioni provenienti dal Piemonte.

Fig 3: Livelli di intensità relative agli spot selezionati per le analisi di spettrometria di massa. Le aree ingrandite associate ai gel 2D-E mostrano le intensità relative (n= 6), riportate come valori espressi in volume normalizzato (\log_{10}) con \pm errore standard * = p value < 0,05, ** = p-value < 0,01, *** = p-value < 0,001, **** = p-value < 0,0001

Fig 4: Risultati del test di Tukey ottenuti sulla base dei valori di ANOVA. Tale test è stato effettuato per consentire il confronto di coppie di campioni. * = p value < 0,05, ** = p-value < 0,01, *** = p-value < 0,001, **** = p-value < 0,0001; Sm=San Miniato,

Fig 5: Valori di intensità dei trascritti correlati alle proteine identificate. Il campione Lucca è stato selezionato come standard interno e rappresenta il campione mediamente meno espresso. (n=4). A1=Alba 1, A2=Alba 2, Mo=Montaione, M=Mugello, S.=Crete Senesi, L=Lucca, Msa= Marche, Um=Umbria, Cas P=Casentino

Tabella 1: Campioni utilizzati per le analisi

Campioni (Luogo di raccolta)	Pianta Ospite	Regione	Periodo di raccolta
San Miniato	foresta	Toscana	Novembre 2008-2009
Crete Senesi	foresta	Toscana	Novembre 2008-2009
Mugello	<i>Tilia sp.</i>	Toscana	Novembre 2008-2009
Montaione	foresta	Toscana	Novembre 2008-2009

Lucca	(<i>Populus tremula</i>)	Toscana	Novembre 2008-2009
Umbria	foresta	Umbria	Novembre 2010-2011
Alba 1	(<i>Populus tremula</i>)	Piemonte	Novembre 2008-2009
Alba 2	(<i>Quercus ruber</i>)	Piemonte	Novembre 2008-2009
Msa Marche	(<i>Populus tremula</i>)	Marche	Novembre 2010-2011

Tabella 1: Campioni raccolti in due anni distinti da alcune aree Italiane. Per quattro accessioni non è stato possibile determinare la specifica pianta ospite. Campione Msa Marche da Sant'Angelo in Vado (PU), Campione Umbria da Corciano (PG).

Tabella2: Proteine identificate mediante analisi ESI-Quad TOF

Num. Spot. (a)	Cod. UniProtKB (b)	Nome della proteina	Organismo	Punteggio (c)	Copertura della sequenza % (d)	Mw kDa		pI		Peptidi identificati (MS/MS) (g)	Annotazione genica in <i>Tuber</i> (h)	Correll. Blast prot. (i)
						Oss/ Teor (e)		Oss/Teor (f)				
1	D5G797	Whole genome shotgun sequence assembly, scaffold_131, strain Mel28	<i>T. melanosporum</i> (Perigord truffle)	104	4	78	46,2	6,2	5,82	2	GSTUM_00002523001	A
2	D5GJY5	Whole genome shotgun sequence assembly, scaffold_55, strain Mel28	<i>T. melanosporum</i> (Perigord truffle)	378	11	162	86,3	5,4	5,16	7	GSTUM_00009270001	B
3	D5GGN7	Dihydropolyl dehydrogenase	<i>T. melanosporum</i> (Perigord truffle)	137	6	81	54	5,7	6,72	3	GSTUM_00007439001	
4	D5G8F0	Whole genome shotgun sequence assembly, scaffold_15, strain Mel28	<i>T. melanosporum</i> (Perigord truffle)	164	28	22,5	20	5,7	5,41	4	GSTUM_00004791001	C
5	D5GJ78	S-adenosylmethionine synthase	<i>T. melanosporum</i> (Perigord truffle)	871	47	57	41,8	5,8	5,7	15	GSTUM_00008874001	
	D5G9M7	Whole genome shotgun sequence	<i>T.</i>	114	12	57	57,8	5,8	9,93	5	GSTUM_00003332001	D

		assembly, scaffold_169, strain Mel28	<i>melanosporum</i> (Perigord truffle)										
6	D5GNA2	Whole genome shotgun sequence assembly, scaffold_8, strain Mel28	<i>T. melanosporum</i> (Perigord truffle)	125	22	22	22	5,5	6,21	4	GSTUM_00011192001	E	
7	D5GAF9	Whole genome shotgun sequence assembly, scaffold_18, strain Mel28	<i>T. melanosporum</i> (Perigord truffle)	146	8	45	33	5,1	6,02	4	GSTUM_00005271001	F	
8	D5GJY5	Whole genome shotgun sequence assembly, scaffold_55, strain Mel28	<i>T. melanosporum</i> (Perigord truffle)	170	9	91	86,3	5,4	5,16	6	GSTUM_00009270001		
9	D5GNA2	Whole genome shotgun sequence assembly, scaffold_8, strain Mel28	<i>T. melanosporum</i> (Perigord truffle)	1206	35	25	22	6,1	6,21	6	GSTUM_00011192001	G	
11	D5G6L6	Whole genome shotgun sequence assembly, scaffold_121, strain Mel28	<i>T. melanosporum</i> (Perigord truffle)	118	21	41	31,3	5,2	6,01	5	GSTUM_00002097001		
13	D5GC43	Whole genome shotgun sequence assembly, scaffold_201, strain Mel28	<i>T. melanosporum</i> (Perigord truffle)	149	18	38	33,5	5.1	5,06	5	GSTUM_00000555001	H	
	D5GAC6	Probable Xaa-Pro aminopeptidase P	<i>T. melanosporum</i> (Perigord truffle)	131	5	38	69,2	5.1	5,28	3	GSTUM_00005237001		
14	D5GCN2	Whole genome shotgun sequence assembly, scaffold_218, strain Mel28	<i>T. melanosporum</i> (Perigord truffle)	83	22	19	20,7	5.4	8,64	3	GSTUM_00000743001	I	
15	D5G620	Malate dehydrogenase	<i>T. melanosporum</i> (Perigord truffle)	115	8	18	36,7	5.5	8,79	3	GSTUM_00001731001		
16	D5GE86	Whole genome shotgun sequence assembly, scaffold_26, strain Mel28	<i>T. melanosporum</i> (Perigord	105	14	28,2	26,8	5.5	7,1	4	GSTUM_00006427001	L	

			truffle)									
17	D5G5R4	Whole genome shotgun sequence assembly, scaffold_112, strain Mel28	<i>T. melanosporum</i> (Perigord truffle)	376	11	45,6	46,9	5,7	5,97	4	GSTUM_00001447001	M
	Q1ACW3	NADP-dependent mannitol dehydrogenase	<i>Tuber borchii</i>	314	26	45,6	38	5,7	5,69	7	DQ223686.1	

Tabella 2: Lista delle proteine identificate mediante analisi ESI-Quad TOF. (a) come indicato in Figura 1; (b) codice univoco presente nella banca dati UniProtKB; (c) punteggio ottenuto (Mascot); (d) percentuale di copertura della sequenza; (e) pesi molecolari osservati su gel vs pesi molecolari teorici * I pesi molecolari osservati e teorici possono variare, sulla base del reale peso molecolare della proteina in *T. magnatum*; (f) punto isoelettrico osservato vs. punto isoelettrico teorico; (g) numero di peptidi identificati; (h) codice di annotazione genica; (i) correlazione con le proteine identificate mediante analisi BLASTP (Tabella 4). Spot 10 e Spot 12, nessuna identificazione proteica.

Tabella 3: Proteine identificate mediante analisi MALDI-TOF

Num. Spot. (a)	Cod. UniProtKB (b)	Nome della proteina	Organismo	Mw kDa Oss/ Teor (c)		pI Oss/Teor (d)		Punteggio (e)	Copertura della sequenza (f)	Peptidi identificati (MS) (g)	Proc. Biolog. (h)
16	D5GJE0	hypothetical protein	<i>T. melanosporum</i> Mel28	28.2	25.6	5.5	5.77	80	40%	11	Simile a: mitochondrial peroxiredoxin PRX1 UniProtKB Acc. no. (A7EHB2)

Tabella 3: Lista delle proteine identificate mediante analisi MALDI-TOF (analisi peptide mass fingerprint). (a) come indicato in Figura 1; (b) codice univoco presente nella banca dati UniProtKB; (c) pesi molecolari osservati su gel vs pesi molecolari teorici; (d) punto isoelettrico osservato vs. punto isoelettrico teorico; (e) punteggio ottenuto (Mascot); (f) percentuale di copertura della sequenza; (g) numero di peptidi identificati; (h) descrizione funzionale ottenuta dopo analisi BLASTP

Tabella 4: Informazioni proteiche aggiuntive ottenute dopo l'analisi BLASTP

Num. Spot (a)	Correll. Blast prot. (b)	Cod. UniProtKB (c)	Nome della proteina	Organism0	Lunghezza della proteina (d)	E-Value (e)
1	A	G2YT91	Similar to peptidase (Secreted protein)	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	383	1.0×10^{-120}
2, 8	B	B2WA62	Glyoxal oxidase	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	825	0.0
4	C	B2WK75	Peptide methionine sulfoxide reductase msrB/msrA	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	184	3.0×10^{-96}
5	D	Q4WLU4	RNP domain protein	<i>Neosartorya fumigata</i>	480	1.0×10^{-120}
6, 9	E	C4JW16	NAD(P)H:quinone oxidoreductase, type IV	<i>Uncinocarpus reesii</i>	203	1.0×10^{-100}
7	F	E5ABQ9	Similar to pyridoxine biosynthesis protein	<i>Leptosphaeria maculans</i>	307	1.0×10^{-176}
11	G	C5FLT9	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	<i>Arthroderma otae</i>	289	2.0×10^{-92}
13	H	A4D9A0	BAR protein	<i>Neosartorya fumigata</i>	305	1.0×10^{-137}
14	I	B8MCW9	AhpC/TSA family protein	<i>Talaromyces stipitatus</i>	181	3.0×10^{-50}
16	L	C1G7T9	HD domain-containing protein	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	224	4.0×10^{-62}
17	M	G0RU75	Fructose biphosphate aldolase	<i>Hypocrea jecorina</i>	360	0.0

Tabella 4: Risultati dell'analisi BLAST alle proteine identificate in Tabella 2. (a) come indicato in Figura 1; (b) correlazione alfabetica con le proteine riportate in Tabella 2; (c) codice univoco presente nella banca dati UniProtKB; (d) come riportato dal risultato BLASTP (e) Expect value, più basso è il valore di E-value maggiore è la significatività del risultato

Bibliografia

- Abbà S, Balestrini R, Benedetto A, Rottensteiner H, De Lucas JR, Bonfante P: **The role of the glyoxylate cycle in the symbiotic fungus *Tuber borchii*: expression analysis and subcellular localization.** *Curr Genet* 2007, **52**:159–170.
- Bonet, J. A., D. Oliach, et al. (2009). "Cultivation methods of the black truffle, the most profitable Mediterranean non-wood forest product, a state of the art review." *Modelling, Valuing and Managing Mediterranean Forest Ecosystems for Non-Timber Goods and Services*: 57.
- Ceccaroli P, Buffalini M, Saltarelli R, Barbieri E, Polidori E, Ottonello S, Kohler A, Tisserant E, Martin F, Stocchi V: **Genomic profiling of carbohydrate metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*.** *New Phytol* 2011, **189**:751-764.
- Ceccaroli P, Saltarelli R, Guescini M, Polidori E, Buffalini M, Menotta M, Pierleoni R, Barbieri E, Stocchi V: **Identification and characterization of the *Tuber borchii* D-mannitol dehydrogenase which defines a new subfamily within the polyol-specific medium chain dehydrogenases.** *Fungal Genet Biol* 2007, **44**:965-78.
- Chomczynski P, Sacchi N: **The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on:** *Nat Protoc* 2006, **1**: 581–585.
- Corti V, Cattaneo A, Bachi A, Rossi RE, Monasterolo G, Paolucci C, Burastero SE, Alessio M: **Identification of grass pollen allergene by 2D-electrophoresis and serological screening.** *Proteomics* 2005, **5**:729-736.
- de Oliveira JM, de Graaff LH: **Proteomics of industrial fungi: trends and insights for biotechnology.** *Appl Microbiol Biot* 2011, **89**:225-237.
- Dupré C, Chevalier G, Branlard G: **Caractérisation des mycorhizes de différents *Tuber* par l'étude du polymorphisme enzymatique.** *C.R. 1r Coll. Natl. sur le technies de purification des proteines.* Paris, 1-3 Octobre 1984. DIPC-INPL public, 465-467.
- Fanucchi F, Alpi E, Olivieri S, Cannistraci CV, Bachi A, Alpi A, Alessio M: **Acclimation increases freezing stress response of *Arabidopsis thaliana* at proteome level.** *Bioch Bioph Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2012, **6**:813-825.
- Gandeboeuf D, Dupré C, Chevalier G: **Differenciation des truffes europeennes d'interet commercial par analyse des isoenzymes.** *Acta botanica Gallica*, 1994, **141**: 455-463.
- Garcia-Montero, L. G., M. A. Casermeiro, et al. (2007). "Effect of active carbonate, exchangeable calcium, and stoniness of soil on *Tuber melanosporum* carpophore production." *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **35**(1): 139-146.
- Garnero L, Lazzari B, Mainieri D, Viotti A, Bonfante P: **TMpcp: a *Tuber magnatum* gene which encodes a putative mitochondrial phosphate carrier.** *DNA Sequence* 2000, **10**:407-410.
- Hamilton GA, Adolf PK, de Jersey J, DuBois GC, Dyrkacz GR, Libby RD: **Trivalent copper, superoxide, and galactose oxidase.** *J Am Chem Soc* 1978, **100**:1899-1912.

Jazdzewski BA, Tolman WB: **Understanding the copper-phenoxy radical array in galactose oxidase: contributions from synthetic modeling studies.** *Coord Chem Rev* 2000 **200**:633–685.

Jorge I, Navarro RM, Lenz C, Ariza S, Jorriñ J: **Variation in the holm oak leaf proteome at different plant developmental stages, between provenances and in response to drought stress.** *Proteomics* 2006, **6**:207-214.

Kersten PJ: **Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* : Its characterization and activation by lignin peroxidase.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, **87**: 2936-2940.

Landaud, S, Helinck, S, Bonnarme P: **Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008, **77**:1191–1205.

Licausi F, Van Dongen JT, Giuntoli B, Novi G, Santaniello A, Geigenberger P, Perata P: **HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Journal* 2010, **62**:302-315

Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R *et al*: **Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis.** *Nature* 2010, **464**:1033-1038.

Mello A, Murat C, Bonfante P: **Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy.** *FEMS Microbiol Lett* 2006, **260**:1-8.

Mouchès C, Duthil P, Bove JM, Valjalo J, Delmas J: **Caractérisation des champignons supérieurs par électrophorés de leurs protéines.** *Mushr. Sci* 1978, **10**: 491-503.

Murat C, Vizzini A, Bonfante P, Mello A: **Morphological and molecular typing of the below-ground fungal community in natural *Tuber magnatum* truffle-ground.** *FEMS Microbiology Letters* 2005, **245**:307–313.

Paolocci F, Rubini A, Riccioni C, Arcioni S: **Reevaluation of the life cycle of *Tuber magnatum*.** *Appl Envir Microbiol* 2006, **72**:2390-2393.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M: **Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.** *Anal Chem* 1996, **68**:850-858.

Splivallo R, Ottonello S, Mello A, Karlovsky P: **Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis.** *New Phytol* 2011, **189**:688-699.

Splivallo R, Valdez N, Kirchhoff N, Ona MC, Schmidt J-P, Feussner I, Karlovsky P: **Intraspecific genotypic variability determines concentrations of key truffle volatiles.** *New Phytol* 2012, **194**:823-835

Suz, L. M., M. P. Martin, et al. (2008). "Mycelial abundance and other factors related to truffle productivity in *Tuber melanosporum*-*Quercus ilex* orchards." *Fems Microbiology Letters* **285**(1): 72-78.

Trappe, J. M. (1979). "The orders, families, and genera of hypogeous Ascomycotina (truffles and their relatives) *Clelandia arenacea*, *Dingleya verrucosa*, *Choiromyces aboriginum*, *Peziza stuntzii*, new taxa, Fungi]." *Mycotaxon* **9**.

Weissbach H, Etienne F, Hoshi T, Heinemann SH, Lowther WT, Matthews B, St. John G, Nathan C, Brot N: **Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function.** *Arch Bioch Bioph* 2002, **397**:172-178.

Whittaker MM, Kersten PJ, Cullen D, Whittaker JW: **Identification of catalytic residues in glyoxal oxidase by targeted mutagenesis.** *J Biol Chem* 1999, **274**:36226–36232.

Whittaker MM, Kersten PJ, Nakamura N, Sanders-Loehr J, Schweizer ES, Whittaker JW: **Glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is a new radical-copper oxidase.** *J. Biol Chem* 1996, **271**(2):681–687.

Yang Q, Wang Y, Zhang J, Shi W, Qian C, Peng X: **Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by proteomic approach: cysteine synthase as a key player in Al response.** *Proteomics* 2007, **7**:737-749.

Zeppa S, Guidi C, Zambonelli A, Potenza L, Vallorani L, Pierleoni R, Sacconi C, Stocchi V: **Identification of putative genes involved in the development of *Tuber borchii* fruit body by mRNA differential display in agarose gel.** *Curr Genet* 2002, **42**:161–168.