

Traduzione in Italiano

I batteri associati ai corpi fruttiferi del tartufo contribuiscono all'aroma del tartufo

[Riccardo Splivallo](#), [Aur lie Deveau](#), [Nayuf Valdez](#), [Nina Kirchhoff](#), [Pascale Frey-Klett](#), [Petr Karlovsky](#)

Pubblicato per la prima volta: 05 giugno 2014 <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12521>

Citazioni: [107](#)

Contributi degli autori: RS e AD hanno redatto il manoscritto con il contributo di tutti gli altri coautori. RS ha progettato gli esperimenti, eseguito le statistiche e anche eseguito i test biologici con micelio/corpi fruttiferi/batteri/agenti antibatterici del tartufo. NV ha isolato i batteri ed ha eseguito l'analisi della sequenza batterica. NK, PK e RS hanno eseguito la profilazione volatile e l'analisi dei dati volatili sui corpi fruttiferi. AD, PF-K. e RS hanno progettato l'analisi FISH, mentre RS e AD hanno analizzato i dati FISH. Tutti gli autori hanno letto e approvato il manoscritto finale.

Riepilogo

I tartufi, funghi simbiotici noti per l'aroma accattivante dei loro corpi fruttiferi, sono colonizzati da una complessa comunit  batterica dalla funzione sconosciuta. Abbiamo caratterizzato la comunit  batterica del tartufo bianco *Tuber borchii* e testato il coinvolgimento del suo microbioma nella produzione di sostanze volatili contenenti zolfo. Abbiamo scoperto che le sostanze volatili contenenti zolfo come i derivati del tiofene, caratteristici di *T. borchii*, sono il risultato della biotrasformazione di precursori non volatili in composti volatili da parte di batteri. La comunit  batterica di *T. borchii* era dominata da α - e β - *Proteobacteria*.   interessante notare che tutti i tipi/classi di batteri testati in questo studio sono stati in grado di produrre sostanze volatili di tiofene da *T. borchii*, indipendentemente dalla fonte di isolamento (tartufo o altre fonti). Ci  indica che la capacit  di produrre sostanze volatili del tiofene potrebbe essere diffusa tra i batteri e possibilmente collegata al metabolismo primario. Il trattamento dei corpi fruttiferi con agenti antibatterici ha soppresso completamente la produzione di sostanze volatili del tiofene mentre i fungicidi non hanno avuto alcun effetto inibitorio. Ci  suggerisce che durante la fase sessuale del tartufo, i volatili del tiofene vengono sintetizzati esclusivamente dai batteri e non dal tartufo. In questa fase, l'origine del precursore dei tiofeni in *T. borchii* rimane sfuggente e non si pu  escludere il coinvolgimento di lieviti o altri batteri.

Introduzione

I tartufi sono funghi simbiotici che si sviluppano nel sottosuolo in associazione con le radici delle piante, formando ectomicorrize (Mello *et al.* , [2006](#)). Le associazioni ectomicorriziche, dominanti nelle foreste boreali e temperate, sono di elevata rilevanza ecologica poiché migliorano la nutrizione e la salute delle piante (Read, [1991](#) ; Buscot *et al.* , [2000](#) ; Martin *et al.* , [2001](#)). Circa 180 specie di tartufo (*Tuber spp*) si associano ad angiosperme e gimnosperme e si trovano naturalmente in Europa, Nord America e Asia (Bonito *et al.* , [2010](#)).

Il sequenziamento del genoma del tartufo nero del Périgord *Tuber melanosporum* ha ampliato lo status del tartufo da prelibatezza alimentare a modello scientifico prezioso per lo studio di complesse interazioni simbiotiche (Martin *et al.* , [2010](#)). Le ectomicorrize e i corpi fruttiferi del tartufo ospitano una comunità microbica diversificata che comprende batteri, lieviti e funghi filamentosi (Barbieri *et al.* , [2005; 2007](#) ; Buzzini *et al.* , [2005](#) ; Pacioni *et al.* , [2007](#)). Di questi microbi, solo i batteri sono stati ampiamente studiati nei tartufi. È stato segnalato che comunità batteriche complesse si stabiliscono in diverse specie di tartufo: *T.*

aestivum (Gryndler *et al.* , [2013](#)), *T. magnatum* (Barbieri *et al.* , [2007](#)), *T. melanosporum* (Antony-Babu *et al.* , [2013](#)) e *T. borchii* (Sbrana *et al.* , [2000](#) ; Barbieri *et al.* , [2005](#)). I batteri colonizzano sia la parte esterna (peridio) che quella interna (gleba) dei tartufi e sembrano essere selezionati dalle comunità del suolo durante la fase iniziale della formazione del tartufo (Antony-Babu *et al.* , [2013](#)). Sebbene le comunità batteriche differiscano a seconda delle specie di tartufo analizzate, un microbioma centrale composto da *α-proteobatteri* della famiglia delle *Bradyrhizobiaceae* sembra comune a tutte le specie finora studiate (Barbieri *et al.* , [2005; 2007](#) ; Antony-Babu *et al.* , [2013](#)). I fattori responsabili della selezione di questi batteri rimangono misteriosi. Tuttavia, questi batteri potrebbero avere un ruolo nello sviluppo, nella crescita e nella nutrizione dei corpi fruttiferi del tartufo (Sbrana *et al.* , [2000; 2002](#) ; Barbieri *et al.* , [2007; 2010](#) ; Antony-Babu *et al.* , [2013](#)); Pavić *et al.* , [2013](#)).

I corpi fruttiferi del tartufo emettono aromi intensi (Splivallo e Maier, [2011](#) ; Splivallo *et al.* , [2011](#)). Le sostanze volatili contenenti zolfo hanno un ruolo centrale nell'aroma del tartufo perché servono come attrattivi per i mammiferi e contribuiscono all'aroma del tartufo percepito dagli esseri umani (Talou *et al.* , [1990](#) ; Culleré *et al.* , [2010](#) ; Splivallo e Maier, [2011](#) ; Splivallo *et al.* , [2011](#)). L'origine delle sostanze volatili contenenti zolfo nei tartufi non è chiara in quanto potrebbero derivare dal fungo del tartufo stesso ma anche dalla comunità microbica che popola i corpi fruttiferi del tartufo (Buzzini *et al.* , [2005](#) ; Splivallo e Maier, [2011](#) ; Splivallo *et al.* , [2011](#)). L'analisi del genoma del tartufo nero *T. melanosporum* , tuttavia, ha suggerito che il tartufo nero può produrre i suoi composti volatili senza il coinvolgimento di batteri (Martin *et al.* , [2010](#) ; Maxmen, [2010](#)). Non è noto se altre specie di tartufo possano produrre da sole le loro sostanze volatili o richiedere la partecipazione di batteri associati.

Qui, abbiamo studiato il ruolo dei batteri associati al tartufo nella formazione dell'aroma di una specie di tartufo bianco, *Tuber borchii*. *T. borchii* è una specie di tartufo coltivato presente naturalmente in Europa e recentemente introdotto in Nuova Zelanda (Bonito *et al.*., [2010](#)). *T. borchii* è stato a lungo utilizzato nei laboratori come organismo modello per lo studio dei tartufi a causa della crescita relativamente più rapida del suo micelio rispetto ad altre specie di tartufo. I corpi fruttiferi di *T. borchii* emettono alcune sostanze volatili [derivati del tiofene come 3-metiltiofene, di seguito indicato come (1) e 3-metil-4,5-diidrotiofene, denominato (2)], che sono specie-specifici e potrebbero essere parzialmente responsabili del loro aroma caratteristico (Bellesia *et al.*., [2001](#); Mauriello *et al.*., [2004](#); Zeppa *et al.*., [2004](#); Splivallo *et al.*., [2007](#)). È stato riportato che le concentrazioni di tiofene volatili in *T. borchii* si verificano esclusivamente nei tartufi completamente maturi (maturità 71-100%) (Zeppa *et al.*., [2004](#)) e aumentano con la conservazione a temperatura ambiente (Bellesia *et al.*., [2001](#)), mettendo in discussione il ruolo dei batteri associati al tartufo nella produzione dell'aroma. Per verificare questa ipotesi, abbiamo analizzato l'evoluzione della composizione delle comunità batteriche durante lo stoccaggio e la produzione di derivati del tiofene. Quindi abbiamo testato la capacità degli isolati batterici di *T. borchii* di produrre sostanze volatili tiofene. Nel complesso, i nostri risultati hanno dimostrato che i composti volatili del tiofene caratteristici dei corpi fruttiferi di *T. borchii* sono stati prodotti dal microbioma che abita i corpi fruttiferi del tartufo.

Risultati

Composizione di *T. borchii* si evolvono durante la conservazione

Come primo passo, abbiamo caratterizzato la composizione delle comunità batteriche associate a *T. borchii* durante la conservazione. Sei tartufi *T. borchii* sono stati sottocampionati dopo 0, 2, 4 e 6 giorni di conservazione a temperatura ambiente. Le comunità batteriche sono state caratterizzate e quantificate mediante ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) utilizzando la sonda universale eubatterica EUB338 e sonde mirate specificamente

a *Firmicutes* (LGC354A), *Actinobacteria* (HGC69a), *Bacteroidetes* (CF319), α - (ALF1b), β - (BET42a), γ - *Proteobacteria* (GAM42a) ed *Enterobacteriales* (EntB e EntD). Poiché la distribuzione batterica all'interno dei corpi fruttiferi può essere altamente disomogenea (Antony-Babu *et al.*., [2013](#)), la quantificazione delle comunità batteriche è stata effettuata omogeneizzando i campioni di gleba mediante macinazione. La composizione della comunità batterica di *T. borchii* era paragonabile a quella precedentemente descritta in *T. borchii* (Barbieri *et al.*., [2007](#)), con una maggioranza complessiva di *proteobatteri* (Fig. 1) tra cui erano dominanti i *proteobatteri* α e β . γ - *Proteobatteri*, inclusi *Enterobacteriales*, e batteri appartenenti a *Sono stati rilevati anche batterioideti*, ma a un livello molto più

basso. Nessun *Firmicutes* o *Actinobacteria* è stato rilevato al giorno 0 (Fig. 1). La comunità batterica complessiva si è evoluta durante la conservazione con un cambiamento nella composizione della comunità nel tempo. La quantità di batteri tendeva dapprima ad aumentare dopo 2 giorni per poi ridursi al giorno 6. Una riduzione simile delle dimensioni della comunità nel tempo è stata osservata nei *proteobatteri* α - e β -. Le popolazioni di

Bacteroidetes, *Enterobacteriales*, *Actinobacteria* e γ -*Proteobacteria* sono rimaste piuttosto basse e stabili durante la conservazione. Infine, i *Firmicutes* la dimensione della popolazione è leggermente aumentata durante gli ultimi giorni di stoccaggio.

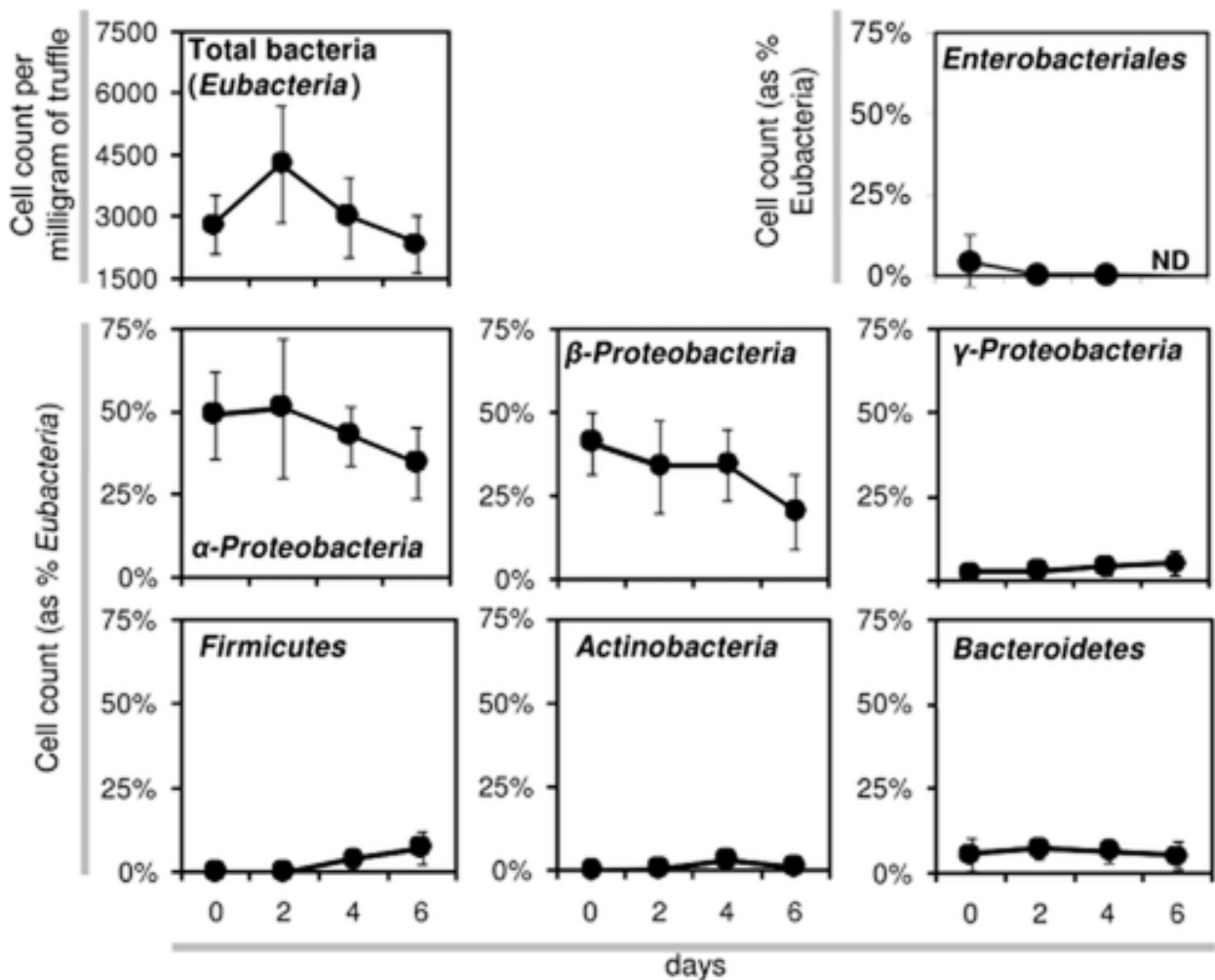
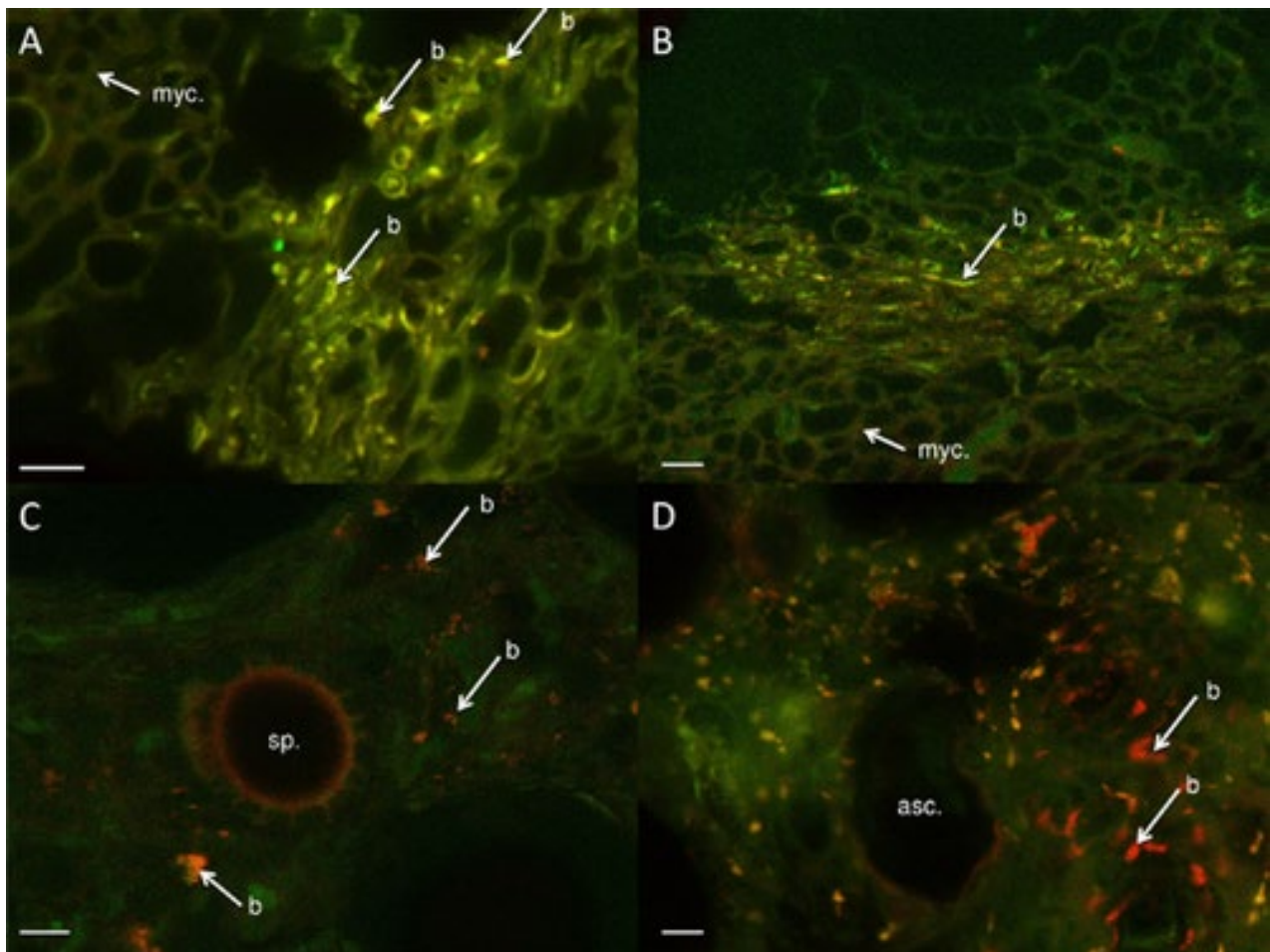


Figura 1

Cambiamento nella popolazione batterica all'interno di *T. borchii* in funzione del tempo di conservazione. I pannelli mostrano la dinamica della popolazione batterica ($\pm$ SE) di tutti i batteri [*Eubatteri* espressi come numero di cellule batteriche per milligrammo di corpo fruttifero del tartufo (peso secco)] e classi/gruppi specifici (espressi come percentuale del totale degli *Eubatteri*). La comunità era dominata da *roteobatteri* α - e β -*Pro*. Non è stata rilevata alcuna differenza statistica tra i giorni di conservazione all'interno degli *Eubatteri* o delle classi/gruppi batterici ($n = 6$ corpi fruttiferi del tartufo, per tutti gli ANOVA: $0,03 < F < 1,62$; $0,22 < P < 0,99$). Dati sugli *enterobatteri* provenienti dalla sonda FISH EntD (la sonda EntB ha fornito risultati comparabili – non mostrati).

Inoltre, per valutare la distribuzione delle cellule batteriche all'interno dei tessuti intatti del tartufo, sezioni sottili di *T. borchii* sono state ibridate con sonde FISH contro α - e β - *proteobatteri*, i due principali gruppi batterici identificati nei campioni macinati. I *proteobatteri* α - e β - potrebbero essere osservati sia nel peridio che nella gleba mediante imaging al microscopio confocale (Fig. 2). Nel peridio sono state osservate dense colonie di α - e β - *proteobatteri*. Tuttavia, questa colonizzazione era irregolare con una vasta area senza cellule batteriche visibili (Fig. 2 A e B). Le cellule batteriche erano presenti tra le cellule fungine ma non all'interno delle cellule fungine sia nella gleba che nel peridio. Colonie di α - *proteobatteri* non sembrava contenere batteri di altri phyla nel peridio, come illustrato dalla completa sovrapposizione di *eubatteri* e sonde alfa (Fig. 2 A). Al contrario, i β - *proteobatteri* sono stati trovati in una popolazione mista con altri batteri (Fig. 2 B), come dimostrato dall'assenza di sovrapposizione tra la sonda eubatterica (FITC, verde) e i β - *proteobatteri* (cy3, rosso). Nella gleba, gli α - *proteobatteri* sono stati trovati come cellule isolate e colonie dense (Fig. 2 C) mentre i β - *proteobatteri* erano distribuiti più uniformemente (Fig. 2 D



*Localizzazione dei roteobatteri α - e β - Pro in sezioni sottili di *T. borchii* peridio e gleba.*

A,B. Ibridazione di sezioni da 30 μ m di *T. borchii* del peridio.

CD. Ibridazione della gleba (C,D) con la sonda mix universale per eubatteri Eub338 accoppiata a FITC (A, B, C) o cy3 (D) e con sonda specifica per α - P roteobatteri

accoppiata a cy3 (A, C) o β -P sonda specifica per *roteobatteri* BET42A accoppiata a cy3 (B) o FITC (D) come osservato mediante microscopia confocale.

Le barre bianche rappresentano 10 μ m. asc., ascii; b, cluster batterico; myc., cellula fungina; sp., spora. Ogni immagine è rappresentativa delle osservazioni.

La composizione della comunità batterica differisce tra peridio e gleba

Antony-Babu e colleghi ([2013](#)) hanno recentemente dimostrato che le comunità batteriche del *Tuber melanosporum* differivano fortemente tra il peridio e la gleba. Per determinare se un modello simile fosse presente anche in *T. borchii* , abbiamo confrontato la composizione della comunità batterica FISH nei campioni di gleba e peridio al giorno 0. Solo la dimensione della popolazione di *Bacteroidetes* differiva significativamente tra gleba e peridio. La dimensione della popolazione di quest'ultimo phylum era cinque volte maggiore nel peridio rispetto alla gleba (gleba: 137 ± 122 ; peridio: 697 ± 101 ; unità: conta cellulare/mg di peso secco; valore P: 0,026, Mann - Whitney U-test). Nessuna differenza statistica tra peridio e gleba è stata osservata per i *Firmicutes* (gleba: 0 ± 0 ; peridio: 10 ± 10), *Actinobacteria* (gleba: 0 ± 0 ; peridio: 45 ± 45), α - *Proteobacteria* (gleba: 1370 ± 499 ; peridio: 947 ± 365), β - *Proteobacteria* (gleba: 1356 ± 453 ; peridio: 1336 ± 483), γ - *Proteobacteria* (gleba: 115 ± 82 ; peridio: 137 ± 43) ed *Enterobacteriales* (gleba: 240 ± 210 ; peridio: 6 ± 3).

Concentrazione di sostanze volatili del tiofene in *T. borchii* gleba è correlato all'abbondanza batterica

È stato riportato che le concentrazioni di sostanze volatili del tiofene aumentano con la conservazione dei corpi fruttiferi del tartufo a temperatura ambiente (Bellesia *et al.* , [2001](#)), suggerendo un potenziale ruolo dei batteri nella produzione di questi composti volatili. Abbiamo ipotizzato che le concentrazioni di sostanze volatili del tiofene fossero correlate alla composizione e all'abbondanza della comunità batterica all'interno dei corpi fruttiferi del tartufo. Per verificare questa ipotesi, i tiofeni prodotti dagli stessi campioni di gleba caratterizzati da FISH sono stati quantificati mediante microestrazione in fase solida - gascromatografia/spettrometria di massa (SPME-GC/MS). I volatili del tiofene **(1)** e **(2)** sono stati emessi lungo tutto il corso del tempo. La densità totale degli *eubatterierano* significativamente correlati solo con i livelli di tiofene volatile **(2)** [volatile **(1)** : Pearson $R^2 = 0,008$, $P = 0,686$; volatile **(2)** : $R^2 = 0,220$, $P = 0,021$). Una correlazione significativa per i volatili **(1)** e/o **(2)** **è stata osservata anche per gli α -proteobatteri** dominanti e un gruppo minore che rappresenta i *Bacteroidetes* (per α -proteobatteri , volatili **(1)** : $R^2 = 0,171$, $P = 0,045$; volatili **(2)** : $R^2 = 0,172$, $P = 0,044$; per *Bacteroidetes* , volatile **(1)** : $R^2 = 0,002$, $P = 0,821$; volatile **(2)** : $R^2 = 0,303$, $P = 0,005$).

Batteri isolati dai corpi fruttiferi, ma non *T. borchii* , sono in grado di generare tiofene volatili da *T. borchii*: corpi fruttiferi

La correlazione tra l'evoluzione delle comunità batteriche durante la conservazione e la concentrazione dei volatili del tiofene ha portato a ipotizzare che alcuni batteri potrebbero essere coinvolti nella produzione di questi composti. Per verificare questa ipotesi, abbiamo testato la capacità dei batteri isolati dai corpi fruttiferi di *T. borchii* di produrre composti tiofenici. I batteri sono stati isolati dal terreno aderente al peridio e dalla gleba dei corpi fruttiferi di *T. borchii* su piastre di agar triptico di soia (TSA 3%). Sulla base della PCR delle colonie e delle sequenze di rRNA 16S, i ceppi isolati appartenevano a β - e γ - *Proteobacteria* , *Bacteroidetes* , *Firmicutes* e *Actinobacteria* (Tabella [1](#)). Non siamo stati in grado di isolare ceppi del phylum *α -proteobatteri* nonostante la loro elevata abbondanza nel corpo fruttifero. Poiché questi batteri potrebbero essere coinvolti anche nell'aroma di *T. borchii* , abbiamo testato due ceppi di *Rhizobiales* ottenuti dalla Collezione tedesca di microrganismi e colture cellulari (Tabella [1](#)).

Tabella 1. Batteri testati in questo studio per la loro capacità di produrre sostanze volatili del tiofene. Elenco dei batteri isolati da *T. borchii* (da TartufLangue, Cuneo, Italia, e raccolta 03/2008) e altrove