

FEDERICO VITA\*, VALENTINA LUCAROTTI\*, EMANUELE ALPI\*\*,  
FRANCESCA FANUCCHI\*, AMEDEO ALPI\*

## Caratterizzazione del tartufo bianco (*Tuber magnatum* Pico) tramite analisi proteomica del carpoforo\*\*\*

### INTRODUZIONE

I tartufi sono funghi ascomiceti ipogei appartenenti al genere *Tuber*. Conosciuti anche con il termine di ectomicorrize (Trappe, 1979), sono organismi eterotrofi la cui unità di base è rappresentata dalle ife, necessarie per la formazione di strutture più complesse come il micelio e il corpo fruttifero, detto anche ascocarpo, formatosi come conseguenza dell'attivazione della fase sessuale nel ciclo biologico (Peterson et al., 1994). I funghi del genere *Tuber* (fig. 1) prediligono condizioni climatiche caratterizzate da primavere calde umide, estati secche intervallate da temporali e inverni temperati. Generalmente entrano in simbiosi con piante forestali quali *Quercus*, *Alnus*, *Castanea*, *Populus*, *Salix* tra le angiosperme e *Pinus* e *Abies* tra le gimnosperme (Read, 1995). I *Tuber* più conosciuti e studiati sono: *Tuber magnatum* Pico, detto anche tartufo bianco; *Tuber borchii* Vittadini o *Tuber albidum* Pico, detto anche bianchetto o marzuolo; *Tuber aestivum* Vittadini, detto anche tartufo d'estate o scorzone o tartufo uncinato; *Tuber melanosporum* Vittadini, detto anche tartufo nero di Norcia e Spoleto o tartufo nero pregiato. L'ascocarpo rappresenta la parte edule del fungo ed è caratterizzato da particolari qualità organolettiche, in primo luogo l'aroma, che ne fanno un alimento pregiato e ricercato, nonché molto costoso, con quotazioni che possono arrivare fino ai 4000 €/Kg per le varietà più pregiate (Mello, 2006); tuttavia, come riportato dalle quotazioni della borsa del tartufo di Alba ([www.albatartufi.com](http://www.albatartufi.com)), i

\* Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie, Università degli Studi di Pisa

\*\* DiBiT2-hSR, San Raffaele Scientific Institute, Divisione di Genetica e Biologia Cellulare, Unità di Spettrometria di Massa Biomolecolare, Milano

\*\*\* Progetto finanziato dalla Provincia di Pisa

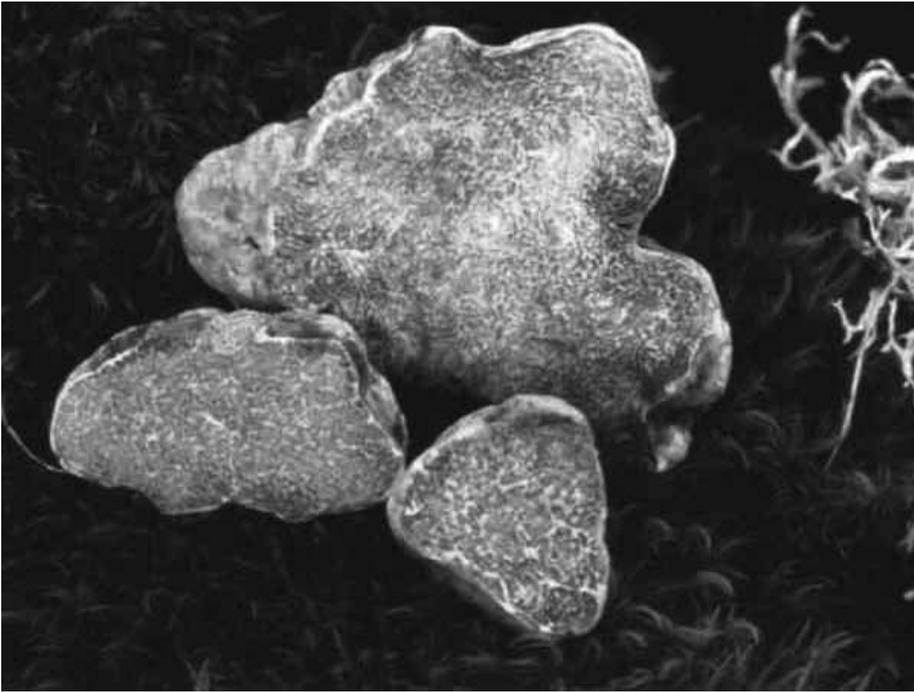


Fig. 1 *Carpoforo di Tuber magnatum Pico*

prezzi aggiornati al dicembre 2008 si attestavano sui 2500 €/Kg. Nel corso della stagione il prezzo e la qualità dei tartufi sono soggetti a periodiche fluttuazioni di mercato, legate alla qualità e disponibilità del prodotto, variabile e poco costante nel tempo. Particolarmente importanti dal punto di vista economico risultano essere le varietà di *Tuber magnatum* Pico che produce corpi fruttiferi bianchi; è il più pregiato ed è spesso richiesto in quantità superiori a quelle raccolte negli habitat naturali, in grado di svilupparsi in una ristretta gamma di condizioni chimico-fisiche del suolo, prediligendo determinati pedoambienti.

Sul territorio italiano è presente, in particolare, in alcune aree caratterizzate da un'importante vocazione produttiva, come le località di San Miniato (e limitrofe) in Toscana, Alba e Asti in Piemonte e di Acqualagna nelle Marche. La produzione del tartufo bianco in Toscana si estende nel fiorentino e nel pisano, principalmente nelle località di San Miniato, di Montaione e del Mugello, caratterizzate dalla presenza di terreni argillosi e ricchi di potassio, sufficientemente aerati, ma non troppo permeabili, ideali per la crescita e lo sviluppo di tale varietà di tartufo.

## LE METODOLOGIE TRADIZIONALI DI CLASSIFICAZIONE TASSONOMICA

Le metodologie tradizionali di classificazione tassonomica, basate sulla morfologia dell'ascocarpo e sull'analisi microscopica, si dimostrano sempre più spesso inadeguate nel poter dare una identificazione certa riguardo a esemplari della stessa specie, ma sviluppatasi in areali differenti. Al contrario, le metodologie molecolari basate sulla tecnica della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) hanno consentito l'identificazione di circa una decina di specie di tartufo, utilizzando test specifici quali l'amplificazione delle regioni ITS (*Internal Transcribed Spacers*), che permettono la diagnosi molecolare in una sola reazione PCR (Bertini, 1998). Con questa tecnica è stato, ad esempio, dimostrato che tartufi classificati come appartenenti a *T. aestivum* e *T. uncinatum* sulla base di dati morfologici, prelevati in otto differenti Stati europei, sono in realtà la stessa specie (Wedden, 2005). Quindi questo tipo di marcatori può essere utilizzato per una possibile certificazione delle varie specie di *Tuber*; ma le stesse metodiche non possono essere impiegate anche per identificare tartufi pregiati in relazione alle aree di crescita e di raccolta, tutelando la tipicità della loro produzione. Quest'ultimo aspetto è fondamentale per la valorizzazione effettiva del prodotto in tutti quei casi in cui esso è di elevato pregio se derivante da un particolare territorio. Purtroppo, mentre il problema dell'appartenenza a una specie può essere considerato in via di soluzione, più difficile appare, al momento, la certificazione dell'area di provenienza per linee appartenenti alla stessa specie. Una metodologia molecolare che può prestarsi alla certificazione degli alimenti è rappresentata dalla proteomica, che permette di caratterizzare specifici profili di proteine presenti esclusivamente nel materiale prodotto in un determinato ambiente. Infatti mentre il corredo genomico risulta sostanzialmente identico in tutti i prodotti appartenenti alla stessa specie, l'espressione genica (e cioè il profilo proteico) risulta fortemente influenzata da molteplici fattori, quali l'ambiente di crescita oppure lo stadio di sviluppo dell'organismo stesso. Il presupposto scientifico è rappresentato dalla produzione di proteine specifiche da parte dell'interazione dell'organismo in questione con l'ambiente inteso in senso lato. Si può aggiungere che, ormai da tempo, la teoria che supponeva come a ogni gene corrispondesse una sola proteina, si è dimostrata erronea. Anche nella specie umana si considera che a ciascun gene corrispondono mediamente quattro proteine (Ast, 2005); in alcune specie vegetali (ad es. *Arabidopsis thaliana*) il numero di proteine ottenibili da alcuni geni può essere anche più elevato. Pur rimanendo aperta la complessa questione del rapporto tra numero di geni e di proteine in un organismo, l'interazione tra un particolare ambiente e il genoma (nella fattispecie il genoma di *Tuber*) può generare proteine specifiche. Que-

ste proteine, una volta individuate, possono rappresentare *marker* specifici del luogo di produzione del tartufo in oggetto e consentirne l'identificazione. La tracciabilità di un prodotto (tradotta in inglese dal termine univoco *traceability*) viene spesso confusa tra due termini molto simili: rintracciabilità e tracciabilità, che facilmente traggono in errore non solo il consumatore, ma anche gli addetti ai lavori. Con il termine rintracciabilità si intende la capacità di seguire un prodotto alimentare, a partire dalle materie prime utilizzate per la sua produzione fino ad arrivare al consumatore finale, mentre con il termine tracciabilità è invece intesa la capacità di risalire all'origine del prodotto, al momento cioè del suo costituirsi iniziale, di conoscerne la storia, la composizione, le caratteristiche e, più in generale, una serie di informazioni che il consumatore vuole conoscere. Conoscere l'origine degli alimenti è un'esigenza sempre più sentita negli ultimi anni, in particolar modo per i prodotti caratterizzati da un elevato valore economico o per i quali il mercato di qualità è una componente rilevante e strettamente correlata con l'origine del prodotto stesso. Negli ultimi anni sono state importate in Europa, a basso costo, varie quantità di *T. indicum* morfologicamente simile al più pregiato *T. melanosporum*, ma con modeste qualità organolettiche e con un valore commerciale 6-10 volte inferiore. Tale immissione ha comportato turbative di mercato e rischi di frodi a carico dei consumatori. Pertanto, oltre all'esigenza di distinguere le specie tra di loro, appare sempre più necessario ottenere parametri che consentano di individuare linee diverse appartenenti alla stessa specie. Considerando l'elevato valore economico del prodotto, risulta perciò necessaria la presenza di una metodologia scientifica capace di distinguere in maniera univoca le varietà di pregio dalle altre.

#### LA PROTEOMICA: UNA NUOVA METODOLOGIA MOLECOLARE PER LA CERTIFICAZIONE DEGLI ALIMENTI

La proteomica – intesa come l'insieme delle tecnologie e degli approcci sviluppati per studiare il proteoma – mira a catalogare tutte le proteine espresse da una cellula in ogni momento del suo ciclo vitale. Il termine PROTEOMA è stato coniato nel 1995 dall'australiano Mark Wilkins per indicare l'insieme completo di PROTEine che è espresso dall'intero genOMA di un organismo. È infatti ormai chiaro che la funzione di un prodotto genico non è deducibile dalla sola sequenza nucleotidica del suo gene. La sfida della biologia post-genomica riguarda la caratterizzazione dell'intero patrimonio proteico di una cellula e la comprensione di come le informazioni genetiche si traducano nell'azione concertata nel tempo e nello spazio dei prodotti genici allo scopo di

generare funzioni biologiche specifiche. Tra le principali tecnologie necessarie per un progetto di proteomica vi sono l'elettroforesi bidimensionale su gel, la spettrometria di massa e la bioinformatica, che contribuisce con software specifici e banche dati all'identificazione delle proteine oggetto delle analisi; la prima di queste tecnologie può essere sostituita da cromatografia liquida ad alta pressione (FPLC), ma la metodologia dovrà subire ancora vari aggiustamenti prima di poter divenire universalmente applicata. L'elettroforesi bidimensionale permette la separazione contemporanea sia delle proteine primarie, sia delle modificazioni successive eventualmente presenti (Pierleoni et al., 2004). Si può quindi studiare come al variare delle condizioni sperimentali, cambi qualitativamente (presenza/assenza) e/o quantitativamente (intensità) l'espressione di gruppi o singole proteine, così come possono essere studiate le modificazioni post-traduzionali che coinvolgono singoli componenti o gruppi di proteine. L'identificazione di bande proteiche dal gel si ottiene mediante costruzione della mappa peptidica di massa utilizzando, ad esempio, la spettrometria di massa MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*) per ottenere informazioni, anche parziali, di sequenza sulle proteine in studio (Shevchenko et al., 1996; Fenyo et al., 1998). In un singolo esperimento si ottengono generalmente una consistente quantità di dati e l'analisi computazionale dei dati ottenuti (bioinformatica) è un passaggio essenziale per l'identificazione delle proteine (Kvasnicka, 2003).

#### SCOPO DEL LAVORO

L'ambiente condiziona l'espressione dei geni presenti in un organismo tramite modifiche della trascrizione e traduzione dei medesimi, determinando perciò la presenza di diverse proteine che, a cascata, modificheranno la quantità e il tipo di prodotti finali. Un approccio di tipo proteomico può aiutare nella certificazione d'origine dei prodotti agro-alimentari, attraverso l'estrazione e la separazione dei loro contenuti proteici (elettroforesi bidimensionali) e la successiva individuazione e caratterizzazione dei *markers* di interesse (analisi MALDI-TOF). Il fine ultimo di tali analisi è quello di sviluppare una metodologia che consenta l'identificazione del materiale per l'accertamento dell'origine territoriale, indispensabile per un prodotto di pregio come il tartufo. È proprio in questa ottica che è stato proposto di condurre una serie di analisi a livello proteomico su diverse accessioni di *Tuber magnatum* con l'obiettivo finale di verificare l'origine del tartufo bianco (*Tuber magnatum* Pico) di San Miniato tramite l'ottenimento di un profilo proteico nel quale

si possa identificare, senza possibilità di equivoci, una o più proteine esclusive della provenienza San Miniato, cioè espresse nelle specifiche condizioni ambientali-geografiche dell'area di San Miniato.

#### MATERIALI E METODI

Le analisi sono state condotte su campioni provenienti da differenti specie di *Tuber*, distinte sia sulla base della zona di origine, in particolare le aree di Toscana e Piemonte dotate di una vocazione produttiva qualitativamente elevata, sia sulla base della specie arborea simbiote (tab. 1). I campioni sono stati accuratamente ripuliti per evitare contaminazioni microbiche, polverizzati in azoto liquido e conservati alla temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$ . È stato necessario mettere a punto una efficace procedura di estrazione delle proteine, che fosse compatibile con le successive analisi di elettroforesi bidimensionale (fig. 2). La procedura di estrazione delle proteine cellulari totali si è articolata come segue: a 100 mg di ogni campione sono stati aggiunti 400  $\mu\text{l}$  di soluzione estraente (Urea 8M, CHAPS 2% w/v, DTT 20mM). Il campione è stato centrifugato a 10.000 Xg, per 10 minuti per poi recuperare il surnatante. Le proteine in soluzione sono state precipitate con acido tricloroacetico (TCA al 13% v/v). Scartato il surnatante, il precipitato proteico è stato risospeso in una soluzione compatibile con la successiva isoelettrofocalizzazione (IEF). L'IEF, realizzata utilizzando strisce di acrilammide con gradiente di pH immobilizzato (pH 4-7, 18 cm), è stata seguita dalla SDS-PAGE effettuata utilizzando un gel di poliaccrilammide al 12,5%. I profili proteici ottenuti, sono stati visualizzati utilizzando un protocollo di colorazione basato su di una soluzione di blu di Coomassie e successivamente analizzati con un programma informatico (PD-QUEST, BIO-RAD) in grado di identificare il punto isoelettrico e il peso molecolare di ogni

TUBER	PROVENIENZA	PIANTA SIMBIONTE
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Capannoli	<i>Populus alba</i>
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Abruzzo	zona boschiva
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Mugello	<i>Tilia</i>
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Crete Senesi	zona boschiva
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Lucca	<i>Populus alba</i>
<i>Tuber magnatum</i> Pico	San Miniato	<i>Populus alba</i>
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Montaione	zona boschiva
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Alba	<i>Populus tremula</i>
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Alba	<i>Quercus robur</i>

Tab. 1 *Elenco delle accessioni in analisi*

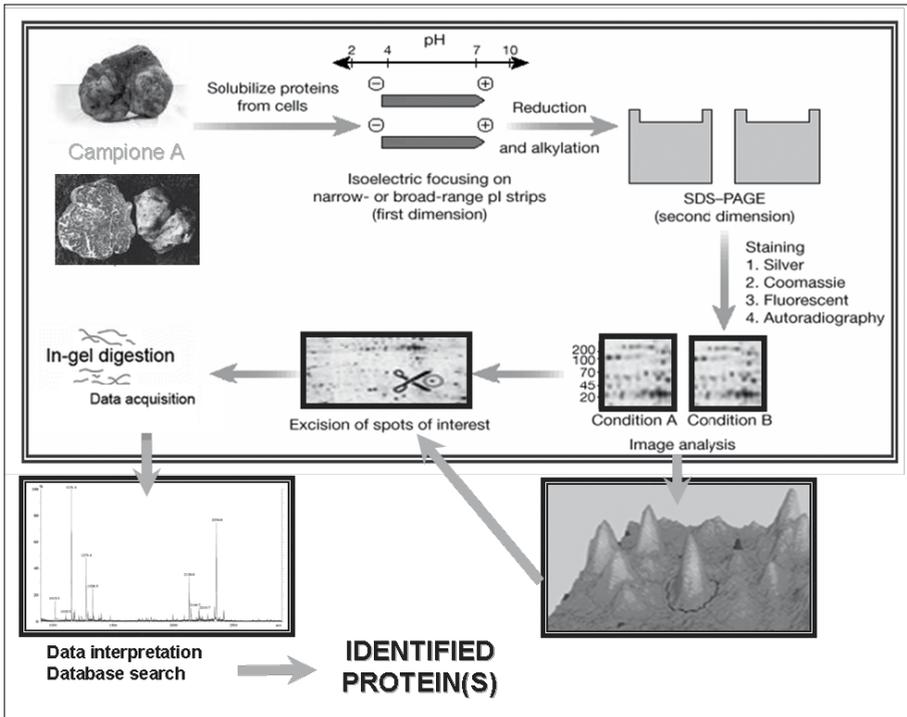


Fig. 2 La procedura sperimentale e le fasi caratteristiche della procedura di analisi. L'estratto proteico ottenuto dal campione di partenza viene separato in base al punto isoelettrico delle singole proteine (IEF) e successivamente in base al peso molecolare, su gel di poliaccrilammide mediante SDS-PAGE. Le proteine vengono visualizzate attraverso diversi tipi di colorazione del gel. Successivamente, le immagini relative a tali gel vengono acquisite e processate utilizzando software specifici. In seguito, le proteine presenti in tali spot vengono identificate mediante analisi di spettrometria di massa e interrogazione di banche-dati dedicate

*spot* (potenziale proteina) rilevato e verificarne la coincidenza o meno, tra i vari campioni in analisi. Quindi è stato possibile confrontare i profili proteici delle diverse accessioni di *Tuber* e individuare le proteine potenzialmente interessanti come marcatori proteici.

#### RISULTATI E PROSPETTIVE

Durante il lavoro finora svolto, è stata messa a punto la metodologia che ha permesso di ottenere i proteomi dei *Tuber magnatum* oggetto di studio (fig. 3). Le proteine sono state separate rispettivamente da sinistra (pH 4) a destra (pH 7) sulla base del punto isoelettrico, e dall'alto in basso sulla base del peso

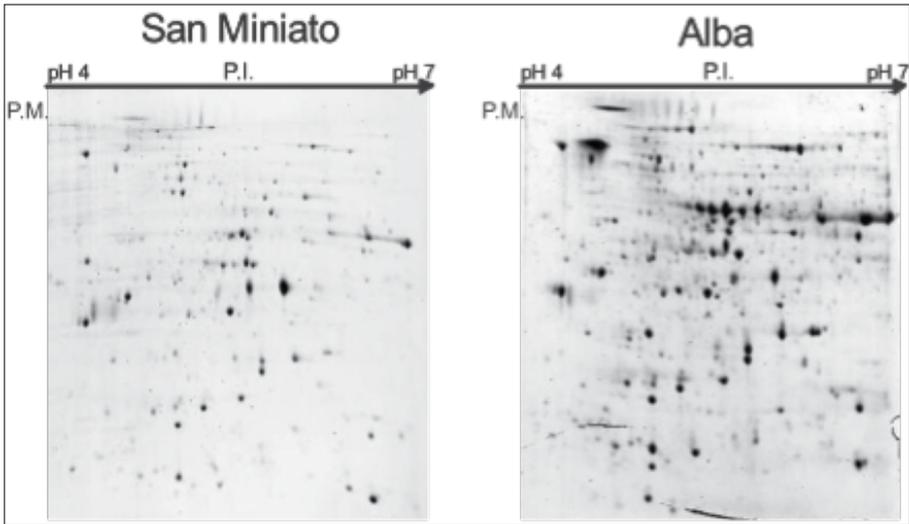


Fig. 3 Profili proteici su gel bidimensionali. Le proteine sono state separate mediante isoelettrofocalizzazione in base al loro punto isoelettrico (P.I.) e, in direzione ortogonale, mediante SDS-PAGE, sulla base del peso molecolare (P.M.)

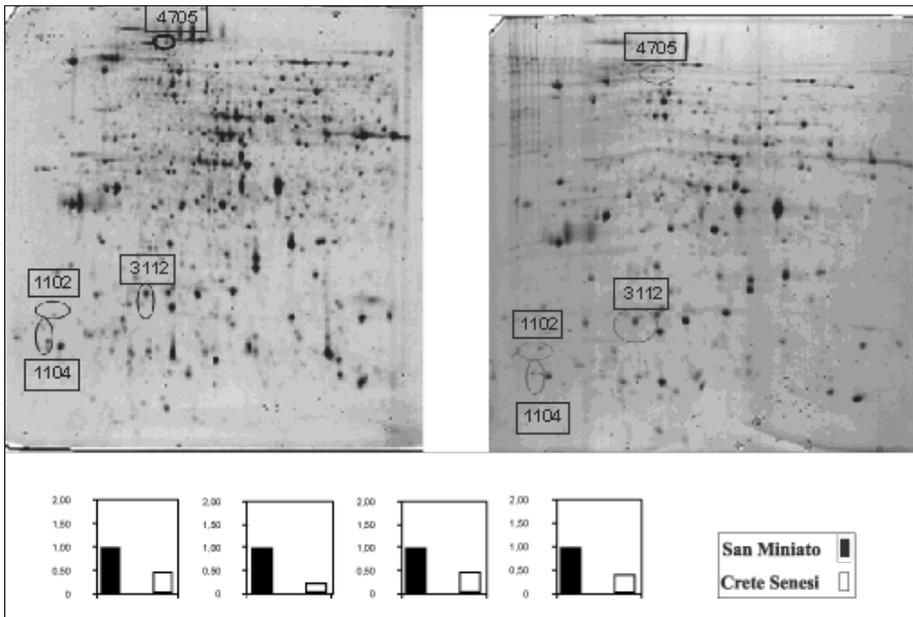


Fig. 4 Analisi bioinformatica relativa al confronto San Miniato (S.M.) - Crete Senesi (C.S.). Le immagini mostrano la presenza di 4 spot (n° 1102, 1104, 3112 e 4705) caratterizzati da una intensità media quantitativamente differente. I grafici sottostanti mostrano il rapporto tra le intensità medie degli spot (F.R. Fold Rapport)

SSP	SAN MINIATO VS ALBA I	SAN MINIATO VS ALBA 2	SAN MINIATO VS CRETE SENESI	SAN MINIATO VS MONTAIONE	SAN MINIATO VS MUGELLO	SAN MINIATO VS LUCCA 2008	ALBA I VS ALBA 2
1102			0,48				
1104	0,16		0,24				
2104						2,07	
3112			0,48				
3113	0,37						
3203					0,48		
4305	0,42						
4407		2,64					2,38
4705			0,42				
5105							2,79
5106		3,27					
5201			0,38				
5208	0,34			0,49			
5212						2,45	
5306						2,47	
6108	0,36					12,48	
6308			2,96	4,01	2,84	4,77	
6421							0,29
7414			2,89			10,53	
7501						2,43	
7613							0,31
8206	0,4						2,05
8210						2,59	
9105				2,3			
9402	0,31	0,4					

Tab. 2 *Analisi differenziale dei profili proteici effettuata su coppie di campioni. Il grafico illustra la presenza di alcuni spot positivi a entrambe le analisi (analisi quantitativa e statistica [t-test]) in almeno un confronto, utilizzando come elemento di riferimento il campione San Miniato (valore=1, in bianco) e il campione Alba 1 (valore=1, in grigio); i valori indicano l'intensità media dello spot, normalizzata sull'intensità totale degli spot presenti ed espressa come O.D. (optical density). I riquadri vuoti indicano l'assenza di tale spot nel confronto in analisi. SSP: single spot number*

molecolare; le analisi hanno mostrato buona risoluzione delle proteine separate in elettroforesi bidimensionale.

Per ciascuna accessione di *Tuber* sono state effettuate almeno tre repliche indipendenti, sei considerando le due annualità analizzate, mentre l'analisi bioinformatica ha dato ottima riproducibilità dei risultati. Il confronto dei profili proteici delle diverse accessioni di *Tuber*, ha evidenziato la presenza di differenze quantitative relative a differenze di intensità media relative ad alcuni spot co-

munque presenti nei campioni in analisi (fig. 4). Per verificare statisticamente tali differenze è stato utilizzato il t-test (test di Student), mentre l'analisi quantitativa ha evidenziato le differenze relative all'intensità media di ciascun spot, misurata in O.D. (optical density). Su di un totale di circa 15000 spot analizzati, 488 sono risultati positivi al t-test mentre 25 sono risultati positivi sia al t-test che all'analisi quantitativa, evidenziando differenze significative nella dimensione degli spot, come mostrato nella tabella 2. I confronti sono stati effettuati tra coppie di campioni. Tali spot evidenziano alcune differenze di tipo quantitativo tra il campione San Miniato e gli altri in analisi; è questo il dato che può essere usato come "marcatore" di provenienza. Le proteine presenti differenzialmente nei vari campioni saranno oggetto della prossima fase di lavoro, che consisterà nella effettiva identificazione mediante spettrometria di massa MALDI-TOF MS/MS (capace di fornire le sequenze amminoacidiche delle proteine analizzate) di tali proteine. Riteniamo il presente lavoro utilizzabile per la caratterizzazione del prodotto su base ambientale, in quanto le analisi indicano come i pattern proteici presentino differenze quantitative caratteristiche, legate all'ambiente di crescita e alla essenza simbiote di provenienza.

#### RIASSUNTO

Il tartufo bianco (*Tuber magnatum* Pico) è il tartufo più apprezzato dai consumatori e quindi quello che spunta i prezzi più elevati sul mercato. Cresce solo in aree delimitate della penisola ed in poche altre zone dell'Europa (ad es.: Slovenia); i prodotti di maggior pregio in Italia sono considerati quelli di Alba (Piemonte), San Miniato (Toscana) e Acqualagna (Marche). La produzione, derivata dalla raccolta da parte di esperti cercatori perché il *T. magnatum* non si presta ad essere coltivato come invece altre specie di *Tuber*, è nettamente inferiore alla richiesta dei consumatori; questo fatto genera due conseguenze: a) elevato prezzo, b) frodi assai frequenti che consistono nel vendere per tartufo bianco di una origine pregiata, quello invece proveniente da altre aree anche esterne all'Italia.

Tra i vari metodi a disposizione per individuare le frodi si annoverano alcune metodologie a base molecolare che, se pur complesse in una prima fase, possono essere standardizzate, semplificate e messe a disposizione per la certificazione della provenienza. Tra di esse particolarmente promettente è la metodologia proteomica che viene dettagliatamente descritta nell'articolo, insieme ai risultati sperimentali ottenuti confrontando tartufi bianchi di Alba, San Miniato e di altre aree della Toscana.

#### ABSTRACT

The white truffle (*Tuber magnatum* Pico) is the most appreciated by the consumers and therefore is the most priced in the market. It grows wildy in some Italian areas and in

other few parts all over the world (e.g. Slovenia); the best quality truffles are those grown in Alba (Piedmont), San Miniato (Tuscany) and Acqualagna (Marches). The amount collected by the expert seekers is usually far below the consumer demand and this causes two problems: a) high prices, b) frequent frauds consisting in selling normal truffles, coming from various areas, in the place of the high quality ones, obtained in the specific zones above mentioned.

To be able to detect such frauds, complex molecular technology have been elaborated; they could be simplified and than used to certify the area of origin. Between those the proteomic approach is promising and is described in this article reporting experimental results concerning comparisons between truffles of San Miniato, Alba and other Tuscan origin.

#### BIBLIOGRAFIA

- AST G. (2005): *The alternative genome*, «Scientific American», 292, pp. 58-65.
- BERTINI L., AGOSTINI D., POTENZA L., ROSSI I., ZEPPA S., ZAMBONELLI A., STOCCHI V. (1998): *Molecular markers for the identification of the ectomycorrhizal fungus Tuber borchii*, «New Phytologist», 139, pp. 565-570.
- ELISEI S., ZAZZI A. (1985): *Caratteri fisico-chimici dei suoli tartufigeni del centro Italia*, in «Annali ISS», 16, pp. 543-555.
- FENYO D., QIN J., CHAIT B.T. (1998): *Protein identification using mass spectrometric information*, «Electrophoresis», 19, pp. 998-1005.
- MELLO A., MURAT C., BONFANTE P. (2006): *Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy*, «FEMS Microbiological Letters», 260, pp. 1-8.
- KVASNICKA F. (2003): *Proteomics: general strategies and application to nutritionally relevant proteins*, «Journal of Chromatography», B 787, pp. 77-89.
- PETERSON R.L., BONFANTE P. (1994): *Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas*, «Plant Soil», 159, pp. 79-88.
- PIERLEONI R., BUFFALINI M., VALLORANI L., GUIDI C., ZEPPA S., SACCONI C., PUCCI P., AMORESANO A., CASBARRA A., STOCCHI V. (2004): *Tuber borchii fruit body: 2-dimensional profile and protein identification*, «Phytochemistry», 65, pp. 813-820.
- READ D.J. (1995): *Ectomycorrhizas in the ecosystem: Structural, functional and community aspects*, in *Biotechnology of Ectomycorrhizae: Molecular Approaches*, a cura di V. Stocchi, P. Bonfante, M. Nuti, Plenum, New York, pp. 1-23.
- SHEVCHENKO A., WILM M., VORM O., MANN M. (1996): *Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels*, «Analytical Chemistry», 68, pp. 850-858.
- TRAPPE J.M. (1979): *The orders, families and genera of hypogeous Ascomycotina (truffles and their relatives)*, «Mycotaxon», 9, pp. 327-340.
- WEDEN C., DANELL E., TIBELL L. (2005): *Species recognition in the truffle genus Tuber– the synonyms Tuber aestivum and Tuber uncinatum*, «Environmental Microbiology», 10, pp. 1535-1546.

