

## Relazione scientifica di Short Term Mobility della Dott.ssa Beatrice Belfiori

Durante il soggiorno presso l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) di Nancy, svoltosi nel periodo dall'11 maggio 2015 al 1 giugno 2015, la Dottoressa Beatrice Belfiori ha svolto l'attività che era stata approvata nel programma presentato.

Uno degli scopi principali era quello di ottenere informazioni sulla struttura, l'organizzazione e la conservazione dei geni coinvolti nella riproduzione di varie specie appartenenti ai Pezizomiceti con particolare riferimento alle specie di *Tuber*. Per il raggiungimento di questo obiettivo la Dottoressa Beatrice Belfiori ha tratto vantaggio dalla grande mole di informazioni scaturite dai recenti progetti di sequenziamento, nell'Istituzione ospitante, di alcune specie di Pezizomiceti. In particolare sono state prese in considerazione le seguenti specie: *Tuber melanosporum*, *Tuber aestivum*, *Tuber magnatum*, *Pyronema confluens*, *Morchella conica*, *Ascobolus immersus*, *Terfezia bouderi*. L'analisi *in silico* e la comparazione di questi genomi, volte alla ricerca di regioni con alta similarità, con particolare riferimento alle regioni legate al sesso, ha permesso di individuare dei geni ortologhi nelle specie prese in considerazione. I funghi possono riprodursi o attraverso l'incrocio o attraverso il selfing. L'incrocio obbligato, conosciuto anche come eterotallismo, comporta la necessità di partner di sesso opposto per la riproduzione.

Nello specifico, gli ascomiceti filamentosi (Pezizomiceti) si riproducono o attraverso il selfing o attraverso l'incrocio. La riproduzione è geneticamente controllata da un locus chiamato mating type o MAT1, che contiene al suo interno due geni regolatori (geni MAT), *MAT1-1-1* e *MAT1-2-1*, che codificano per due fattori di trascrizione, contenenti rispettivamente un dominio  $\alpha 1$  o un dominio high mobility group (MATA\_HMG). Gli ascomiceti eterotallici sono caratterizzati dalla presenza di ceppi con due differenti versioni del locus MAT chiamate idiomorfi, caratterizzati da dissimilarità di sequenza, ognuno dei quali contiene o il gene *MAT1-1-1* o il gene *MAT1-2-1* e l'incrocio è obbligato in queste specie. Al contrario, nelle specie otoolalliche, entrambi i geni MAT sono presenti nello stesso ceppo. Pertanto fare luce sulla struttura e sulla organizzazione del locus MAT negli ascomiceti sopra menzionati rappresenta uno strumento fondamentale per comprendere la modalità riproduttiva di questi funghi, in particolare quelli appartenenti al genere *Tuber*, caratterizzati da difficoltà di crescita e dalla impossibilità di incrociarli in condizioni controllate. Lo studio *in silico* che è stato effettuato ha portato alla identificazione di ortologhi dei geni MAT in tutte le specie considerate, ad eccezione di *Terfezia bouderi*, come è mostrato in tabella 1. In particolare, per quanto riguarda le specie appartenenti al genere *Tuber*, queste sono risultate essere tutte eterotalliche poiché solo un singolo gene MAT, e più precisamente *MAT1-2-1*, è stato identificato nei genomi sequenziati di *Tuber magnatum* e *Tuber aestivum*. Pertanto l'eterotallismo sembra essere la modalità riproduttiva condivisa da tutte o dalla maggior parte delle specie appartenenti al genere *Tuber*. Infatti sono risultati appartenere a specie eterotalliche, non solo il ceppo sequenziato di *T. melanosporum*, ma anche quelli appartenenti alle specie *T. indicum* e *T. borchii*, presentando esclusivamente o il gene *MAT1-1-1* o il gene *MAT1-2-1* (Martin et al.2010, Rubini et al.2011, Belfiori et al. 2013, Belfiori et al, manoscritto sottomesso). *Coyromyces venosus* e *Ascobolus immersus* sono risultati anch'essi eterotallici mostrando entrambi nei genomi sequenziati solo il gene *MAT1-1-1*. Tra i Pezizomiceti sequenziati solo *Pyronema confluens* si è rivelata una specie otoolallica, avendo i geni *MAT1-1-1* e *MAT1-2-1* rispettivamente negli scaffolds 329 e 381.

La struttura del gene *MAT1-2-1* risulta essere abbastanza conservata tra i Pezizomiceti poiché in tutte e quattro le specie sono stati identificati 4 esoni, mentre i 3 introni sono posizionati nel dominio conservato HMG-box (figura 1). Al contrario, nel gene *MAT1-1-1* sia il numero che la posizione degli introni sono risultati essere non conservati, essendo solo uno in *A. immersus*, *P. confluens*, *C. venosus* e *T. melanosporum* mentre ne sono stati individuati due in *M. conica*. Invece la posizione dell'introne risulta essere conservata, ad eccezione di *A. immersus*, in *P. confluens*, *C. venosus* e *T. melanosporum*, ed è posizionata all'interno della regione conservata alpha box (figura 2).

Tabella 1. Presenza e ubicazione dei geni MAT nei genomi sequenziati di Pezizomiceti.

| Species                      | SCAFFOLD: position                               | MAT 1-1-1 | MAT 1-2-1 | Gene model/EST   |
|------------------------------|--|-----------|-----------|--|
| <i>Tuber melanosporum</i>    | 247: 87750-89020                                 | -         | X         | GSTUMT200009627001   |
| <i>Pyronema confluens</i>    | 329: 6063-7121 (5434-7496)<br>381: 101354-102332 | X         | X         | >jgi Pyrco1 6490 PCON_07491m.01<br>>jgi Pyrco1 7388 PCON_08389m.01 |
| <i>Choironomyces venosus</i> | 159: 78753-79727                                 | x         | -         | jgi Chove1 1715952 e_gw1.159.87.1                                  |
| <i>Morchella conica</i>      | 48: 247101-249135                                | X         | -         | jgi Morco1 527229 estExt_Genewise1Plus.C_480190                    |
| <i>Tuber aestivum</i>        | 16: 210496-209458                                | -         | x         | GSTUAT00001375001  |
| <i>Tuber magnatum</i>        | 4:1282485-1283549                                | -         | x         | jgi Tubma1 307776 fgenes1_kg.4_#_274_#_Tmag110907_rep_c419         |
| <i>Ascobolus immersus</i>    | 32: 211400-212645                                | x         | -         | fgenes1_kg.32_#_788_#_combest_scaffold_32_107283                   |
| <i>Terfezia boudieri</i>     | -  | -         | -         |  |

Figura1. Allineamento aminoacidico del gene *MAT1-1-1*. I triangoli neri mostrano la posizione degli introni. La linea nera indica la regione conservata HMG-box.



Gene models used in the alignment:

*P. confluens*: jgi|Pyrco1|7388|PCON\_08389m.01

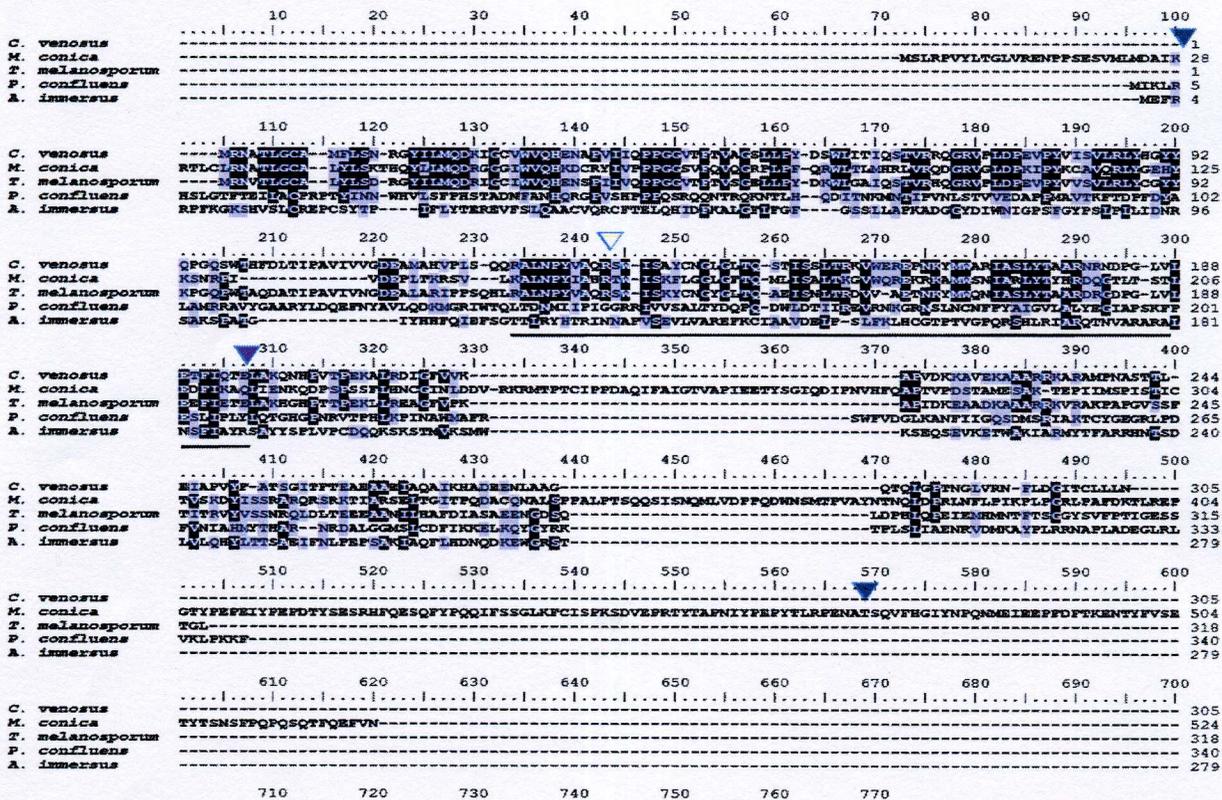
*T. aestivum*: GSTUA00001375001

*T. magnatum*: jgi|Tubma1|307776|fgenes1\_kg.4\_#\_274\_#\_Tmag110907\_rep\_c419

\* *T. melanosporum*: GSTM200009627001

\*\* *T. melanosporum*: XP\_002838423.1

Figura2. Allineamento aminoacidico del gene *MAT1-1-1*. I triangoli blu mostrano la posizione degli introni in *M. conica*, quello giallo la posizione dell'introne in *C. venosus*, *P. confluens* e *T. melanosporum*; quello viola indica la posizione dell'introne in *A. immersus*.

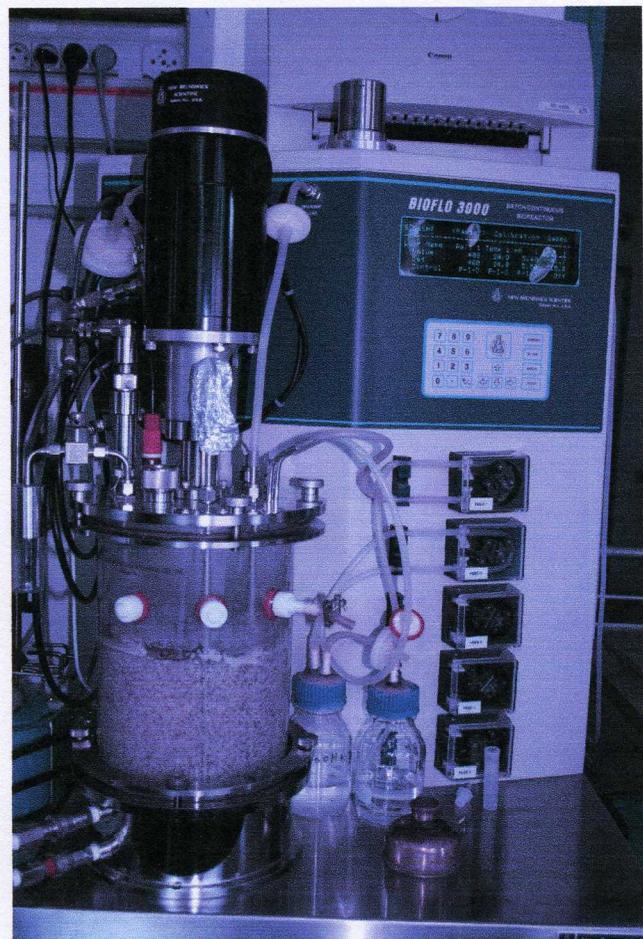


Un'altra attività che è stata condotta è stata quella di comparare nei genomi oggetto di studio, le regioni fiancheggianti il locus MAT. Tale locus nella maggior parte degli ascomiceti è fiancheggiato da geni codificanti per proteine SLA2 e APN2. Un altro gene codificante per la subunità della citocromo ossidasi (COX13) è qualche volta presente intorno a questo locus. Questo gene è risultato essere l'unico gene conservato in linkage con il locus MAT (GSTUMT200009623001) nel genoma di *T. melanosporum*. In questa specie il locus MAT è fiancheggiato anche da un gene codificante per una proteina simile alla proteina ribosomiale RSM22 (GSTUMT200009626001) e da un gene codificante per una proteina sconosciuta (gene model GSTUMT200009628001) (Martin et al. 2010; Rubini et al 2011). Questi due geni, insieme a un omologo del gene model GSTUMT200009623001 sono anche presenti in prossimità del locus MAT in *T. magnatum* e *T. aestivum*. Per quanto riguarda *M. conica* e *C. venosus*, sebbene in queste specie sia presente un gene simile a GSTUMT200009623001, che è ripetuto in tandem nella prima specie, non è stata riscontrata la presenza né di RSM22 o COX13 in linkage con i loro locus MAT. Omologhi a RSM22, COX13 e GSTUMT200009628001 sono inoltre risultati essere assenti nella zona intorno al locus MAT in *P. confluens* e *A. immersus*. Queste evidenze corroborano la tesi di un basso livello di sintenia nel locus MAT tra funghi appartenenti a differenti generi.

Tali regioni, cioè i geni MAT e le relative regioni fiancheggianti, sono state allineate nelle specie di tartufo economicamente più importanti (*T. melanosporum*, *T. indicum* e *T. magnatum*) e dall'allineamento è stato possibile disegnare primers specie- e mating type-specifici, da utilizzare in PCR quantitativa. Tali primers sono stati disegnati considerando una lunghezza dell'amplicone non superiore a 100-150 paia di basi e una lunghezza del primer intorno ai 18-24 nucleotidi, secondo le linee guida standard per PCR. Allo scopo sono stati anche utilizzati softwares specifici (OlogoPerfect, Primer Express, Vector NTI Software etc.). Il test di questi primers sulle specie oggetto di studio è tuttora in corso.

Un altro obiettivo del programma presentato era quello di ottimizzare le condizioni di crescita del micelio di tartufo viste le difficoltà di crescita di queste specie quando coltivate in condizioni controllate secondo le procedure convenzionali, con terreni agarizzati standard. In particolare, sono state messe a punto delle procedure che prevedono l'utilizzo di un bioreattore, presente nella struttura ospitante (figura 3). Esperimenti in questo senso sono tuttora in corso presso l'INRA di Nancy, a causa della lunghezza dei tempi nella crescita dei miceli e della difficoltà di identificazione di protocolli di successo per la conservazione a lungo termine. Tuttavia sono state messe a punto procedure di un protocollo con risultati incoraggianti per la fabbricazione di biglie di alginato di calcio contenenti inoculo di funghi micorrizici, relativamente alla quantità di prodotto e iniziale (peso secco del micelio da 0,1 a 1 g/l, alginato di sodio ad alta viscosità 10 g/l, torba secca setacciata a 0,4 mm in quantità di 30 g/l, cloruro di calcio anidro 10g/l) al procedimento per ottenere 20l di soluzione finale e allo stoccaggio in camera fredda a 4° C. Tuttora sono in corso ulteriori prove per l'ottimizzazione del protocollo.

Figura 3. Bioreattore presente presso l'INRA di Nancy.



Un' attività aggiuntiva che è stata condotta è stata quella analizzare dei campioni di micorrize precedentemente raccolti in una tartufaia al sud della Francia, in località Carpentras (Avignone). In tale tartufaia coltivata a *T. melanosporum* erano state precedentemente osservati dei carpofori non appartenenti alla specie. Pertanto si è proceduto al prelievo delle micorrize sottostanti gli alberi produttive e sono state dalla dott.ssa Beatrice Belfiori osservate sia a livello morfologico che a livello molecolare. Dall'osservazione morfologica tali micorrize sembravano appartenere alla specie *T. magnatum*. Al fine di confermare con metodi più affidabili l'appartenenza alla specie sono state condotte delle PCR con primers *T. melanosporum*-specifici insistenti sulla regione ITS del DNA ribosomale. I risultati molecolari hanno inequivocabilmente confermato l'appartenenza delle micorrize a tale specie, rivelando quindi, contrariamente a quanto era stato da sempre osservato, che anche in Francia è presente il *T. magnatum*.

Perugia 27 luglio 2015

In fede

Beatrice Belfiori