

Marta Siebyła^{1*}, Dorota Hilszczańska²

¹Zakład Ochrony Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa

²Zakład Ekologii Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa

Wpłynęło w czerwcu 2016 r.

Zaakceptowano we wrześniu 2016 r.

1. Charakterystyka trufli. 2. Różnorodność gatunkowa bakterii. 3. Podsumowanie

Species diversity of bacteria associated with fungi of the genus *Tuber* (truffles)

Abstract: Truffles (*Tuber* spp.) are ascomycete hypogeous fungi, which form ectomycorrhizae with roots of trees, shrubs and herbaceous plants. Their fruiting bodies are valued for their distinctive aroma. The aroma might be partially due to complex bacterial community which colonizes their fruiting bodies. Some bacterial species are also believed to promote the truffle's fruitification due to the fixation of nitrogen inside the developing truffles. Although truffles, especially of the species *Tuber aestivum*, are getting more popular and are widely cultivated, little is still known about their biology, composition and the role of their associative microbes. The aim of this study was to present the current knowledge about the bacterial communities associated with black truffles and their potential influence on the truffle life cycle and maturation.

1. Characteristics of truffles. 2. Diversity of bacterial species. 3. Conclusion

Słowa kluczowe: owocnikowanie, społeczność bakteryjna, trufle

Key words: fructification bodies, bacterial community, truffles

1. Charakterystyka trufli

Trufle należą do grzybów charakteryzujących się podziemnym, hypogeicznym trybem życia. Tworzą symbiozę o charakterze mutualistycznym z wieloma gatunkami drzew leśnych, m.in. dębem, bukiem, lipą, grabem i leszczyną [36]. Ta symbioza, nazywana ektomykoryzą, jest typowa dla drzew leśnych strefy borealnej i umiarkowanej. Pełni niezwykle ważną rolę, warunkując prawidłowy status zdrowotny i pokarmowy roślin [7, 17, 22]. Trufle (*Tuber* spp.) jako naturalny komponent ekosystemów leśnych występują w Europie, Ameryce Północnej i Azji [6]. Trufle należące do workowców nazywane są trufkami prawdziwymi. Według bardziej dokładnej definicji (opisu taksonomicznego) prawdziwe trufle obejmują tylko rodzaj *Tuber*, w którym znajduje się trufka perigordzka (*T. melanosporum*), nazywana też „czarnym diamentem”, trufka zimowa (*T. brumale*) i trufka letnia (*T. aestivum*). Ta ostatnia posiada czarne perydium, składające się z 4–6-kątnych, płaskich i ściśle do siebie przylegających brodawek (Rys. 1). Do rodzaju *Tuber* należą także gatunki o białym, gładkim perydium, np. biała trufka piemoncka (*T. magnatum*) oraz trufka biaława (*T. borchii*) [21]. Wysoka wartość kulinarna i handlowa trufli jest efektem charakterystycznego zapachu owocników [18]. Wśród trufli tylko kilka gatunków przedstawia wysoką wartość kulinarną wynikającą z właściwości smakowo-zapachowych. Trufka letnia zwana też trufką burgundzką (*Tuber aestivum*)

jest jednym z cenionych gatunków, a ponadto charakteryzuje się największym zasięgiem występowania na obszarze Europy [15, 21]. Wartość handlowa trufli jest zachętą do zakładania upraw truflowych, które zyskują coraz większą popularność w krajach, do tej pory nie związanych z uprawą tych grzybów, takich jak: Wielka Brytania, Szwecja i Polska [14–16, 29, 34]. Plon trufli jest ściśle związany z warunkami klimatycznymi i glebowymi, szczególnie jej strukturą, odczynem i zasobnością w kationy wapnia [8, 20]. Niemniej, wiele innych czynników kształtujących plonowanie trufli pozostaje nierozpoznane. Są to głównie czynniki biotyczne, takie jak fizjologia roślin i interakcje z innymi grzybami zasiedlającymi glebę oraz bakteriami [1].

Trufle, we wszystkich stadiach ich cyklu życiowego, są kolonizowane przez różnorakie mikroorganizmy: bakterie, drożdże, grzyby strzępkowe i wirusy. Drobnoustroje występują w stadium symbiotycznym, gdy grzyb pozostaje w związku z rośliną (ektomykoryza), w stadium seksualnym (owocniki) (Rys. 1) oraz w stadium saprotroficznym (wolno żyjąca grzybnia). Jak dotąd najlepiej rozpoznano zbiorowiska mikroorganizmów zasiedlające owocniki czterech najbardziej cenionych kulinarnie, a tym samym ekonomicznie, gatunków trufli: trufli białej (*T. magnatum*), trufli białawej (*T. borchii*), trufli perigordzkiej (*T. melanosporum*) i trufli letniej (*T. aestivum*).

Celem pracy jest przedstawienie wiedzy (na podstawie danych literaturowych) na temat zbiorowisk

* Autor korespondencyjny: Zakład Ochrony Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn; tel. 22 715 06 67; e-mail: m.siebyla@ibles.waw.pl



Rys. 1. Owocniki trufli letniej *Tuber aestivum**
(fot. Zbigniew Sierota)

bakterii związanych z truflami i ich potencjalnej roli w tworzeniu specyficznego aromatu tych grzybów. Lotne związki zapachowe wydzielane przez trufle stały się przedmiotem wielu badań, przy czym uwagę poświęcano głównie tym gatunkom trufli, które charakteryzują się dużą wartością rynkową, tj. wspomnianym już: *T. melanosporum*, *T. magnatum*, *T. borchii*, *T. aestivum* [11, 13, 26, 27, 31–33]. Stężenie substancji zapachowych może się zmieniać wraz ze stadium rozwojowym owocnika trufli [19, 37]. Obecnie szacuje się, że występuje ponad 300 lotnych związków chemicznych wytwarzanych przez różne gatunki trufli [28, 29]. Zidentyfikowane związki należą do prostych węglowodorów, zawierających grupy alkoholowe, aldehydowe, estrowe, ketonowe, aromatyczne i siarkowe. Wciąż jednak nie ustalono pełnego profilu aromatycznego charakterystycznego dla trufli. Poznanie roli jaką w procesie tworzenia zapachu odgrywają mikroorganizmy zasiedlające trufle przyczyniłoby się zapewne do wypełnienia tej luki w naszej wiedzy [35]. Wydaje się, że substancje zapachowe powstają dzięki kooperacji grzybów i bakterii, i są ich wspólnym dziełem [35]. Wyjaśnienie szlaku biosyntezy poszczególnych substancji zapachowych pozwoli na identyfikację tego gatunku bakterii, który dany zapach wytwarza. W tym aspekcie, obiecujące wydaje się wykorzystanie innowacyjnych technik, np. czujnika nazywanego „nosem elektronicznym (EN)”, reagującego na zmiany stężenia aromatu. Próby zastosowania elektronicznego nosa do wykrywania trufli podjęto we Francji w latach 80. ubiegłego wieku [32]. W 2000 r. Raynaud i współpracownicy [23] opisali ich wyniki pracy nad przenośnym urządzeniem, dzięki któremu zidentyfikowano zapach trufli czarnej, znajdującej się wśród owocników innych gatunków trufli. Falasconi i współpracownicy [12] połączyli technikę zastosowaną w elektronicznym nosie (Pico2-electronic nose) z metodą SPME-GC-MS,

co pozwoliło na określenie zmian zapachu białej trufli (*T. magnatum* Pico) wraz upływem czasu od terminu zbioru. Elektroniczny nos jest zdolny wychwycić zapach trufli na podstawie substancji lotnych emitowanych z bardzo małej próbki tj. ok. 10 mg owocnika. Wyniki wymienionych prac są obiecujące i wydaje się, że połączenie techniki zastosowanej w EN z innymi analitycznymi metodami ułatwiłoby pozyskiwanie truflii kontrolę jej jakości.

2. Zbiorowisko bakterii

Bakterie zasiedlają zarówno wewnętrzną jak i zewnętrzną część owocników trufli (Tab. I), a ich zagęszczenie może wynosić od miliona do biliona komórek na gram suchej masy owocnika [3, 4, 21]. Skład zbiorowiska bakterii związany jest z dojrzewaniem owocnika, starzeniem się, etapem cyklu życiowego (np. mykoryza a owocnik) oraz rodzajem tkanki (gleba, zarodnikonośna warstwa owocnika a perydium, warstwą zewnętrzną owocnika).

Z dotychczasowych badań przeprowadzonych przez Antony-Babu i wsp. [1] wynika, że wszystkie analizowane do tej pory owocniki trufli są zasiedlane przez zbiorowiska bakterii, w których skład wchodzi przedstawiciele *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Actinobacteria* [10, 20]. W owocnikach wszystkich badanych gatunków trufli stwierdzono dominację α -*Proteobacteria* i niskie zagęszczenie *Firmicutes* oraz *Actinobacteria*. Stwierdzono natomiast większą różnorodność β - i γ -*Proteobacteria* oraz *Bacteroidetes* u trufli białawej (*T. borchii*) w porównaniu z truflą perigordzką (*T. melanosporum*) i białą (*T. magnatum*). Odnotowano, że izolat *Bacterioides* może koegzystować wewnątrz grzybni *T. borchii*, rosnącej w warunkach laboratoryjnych [2], co wskazuje na ścisłą zależność bakterii i trufli. W przypadku innych, badanych gatunków trufli, jak dotąd, nie wykazano obecności endosymbionta.

Skład różnorodności gatunkowej bakterii obecnych na okrywie (perydium) i we wnętrzu owocnika trufli może się zmieniać w czasie i jest zależny od fizjologii rośliny będącej gospodarzem trufli. Jednym z ważniejszych czynników jest stopień przekazywania węglowodanów do grzybni regulowany m.in. warunkami pogodowymi (Rys. 2). Podczas dojrzewania owocnika trufli zmienia się barwa gleby (wewnętrznej warstwy owocnika), następuje jej ciemnienie (melanizacja), które jest wynikiem tworzenia i dojrzewania zarodników we wnętrzu worków (Rys. 2). Proces dojrzewania owocników trufli rosnących w Europie trwa na ogół kilka miesięcy. Zmiany różnorodności gatunkowej bakterii wraz z dojrzewaniem owocników ma inny przebieg w glebie owocnika i w jego perydium. Mikroflora bakteryjna oznaczana w perydium ma bardzo zbliżony

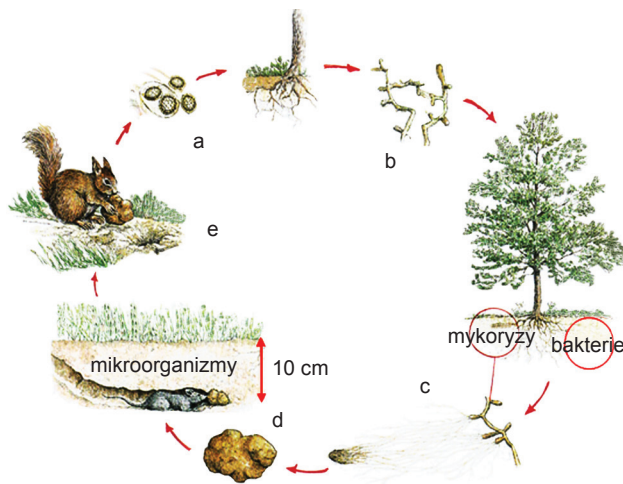
* Fotografia w artykule pt.: „Owocniki trufli letniej *Tuber aestivum*” została umieszczona za zgodą autora prof. dr. hab. Zbigniewa Sieroty.

Tabela I
Różnorodność gatunkowa bakterii związanych z truflami

Nr	Pobrano materiał	Badana tkanka	Baza danych – GenBank	Rodzaj
1	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599740, AY599742	<i>Actinobacterium</i>
2	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599743 – AY599745	<i>Bacillus</i>
3	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599734	<i>Beta-proteobacterium</i>
4	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	KC618437, KC618438	<i>Brochothrix</i>
5	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599653 – AY599655 KC618434	<i>Chryseobacterium</i>
6	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	KC618439, KC618440	<i>Comamonas</i>
7	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599656, AY599666	<i>Flavobacterium</i>
8	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	KC618433	<i>Microbacterium</i>
9	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599662 – AY599664	<i>Pedobacter</i>
10	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599711 – AY599713, AY599703, AY599715 AY599717 – AY599722, KC618442, KC618443	<i>Pseudomonas</i>
11	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599702	<i>Rhizobium</i>
12	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	KC618441	<i>Serratia</i>
13	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599691 – AY599694	<i>Sinorhizobium</i>
14	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	KC618435, KC618436	<i>Sphingobacterium</i>
15	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	KC618444, KC618445, AY599705	<i>Stenotrophomonas</i>
16	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599706	<i>Xanthomonas</i>
17	<i>Tuber borchii</i>	–	AF274244, AF274246 – AF274248	<i>Bacillus</i>
18	<i>Tuber borchii</i>	–	AF274245	<i>Paenibacillus</i>
19	<i>Tuber borchii</i>	–	AF274240 – AF274243	<i>Pseudomonas</i>
20	<i>Tuber borchii</i>	–	AY505130 – AY505141	<i>Sinorhizobium</i>
21	<i>Tuber borchii</i>	–	AF532915 – AF532917	<i>Staphylococcus</i>
22	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123892	<i>Bosea</i>
23	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123954	<i>Ensifer</i>
24	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123868	<i>Kocuria</i>
25	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123902 JX123903 JX123940	<i>Lysobacter</i>
26	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123893	<i>Microbacterium</i>
27	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123915 JX123874 JX123875	<i>Micromonospora</i>
28	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123909	<i>Moraxella</i>
29	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123878	<i>Nocardia</i>
30	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123883	<i>Nocardioopsis</i>
31	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123913, JX123914, JX123916 JX123925 – JX123927, JX123929, JX123933 JX123935, JX123942, JX123943, JX 123945 JX123952, JX123953, JX123955, JX123956 JX123872, JX123876, JX123886, JX123889 JX123894, JX123896, JX123898	<i>Phyllobacterium</i>
32	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123873, JX123890 JX123895, JX123919 JX123932, JX123941	<i>Rhizobium</i>
33	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123939	<i>Rhodococcus</i>
34	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123881	<i>Rothia</i>
35	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123869 – JX123871, JX123877, JX123879 JX123880, JX123882, JX123884, JX123885 JX123887, JX123888, JX123891, JX123897 JX123910 – X123912, JX123917, JX123918 JX123920, JX123921, JX123922, JX123923 JX123924, JX123928, JX123930, JX123931 JX123934, JX123936, JX123937, JX123938 JX123944, JX123946, JX123948, JX123949 JX123950, JX123951, JX123899 – JX123901 JX123904, JX123905, JX123907, JX123908	<i>Streptomyces</i>
36	<i>Tuber aestivum</i>	–	JX123867	<i>Streptomyces</i>

Źródło: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

* brak danych odnośnie do bakterii zasiedlających inne niż *T. borchii* i *T. aestivum* gatunki trufl



Rys. 2. Cykl rozwojowy trufla

Haploidalna grzybnia (typ MAT⁻ lub MAT⁺) kiełkuje z zarodników (a). Mycelium kolonizuje korzenie dając początek ektomykoryzie. Strzępki oplatają korzenie roślin tworząc muflę i wnikają do wnętrza tkanek przez przestwory międzykomórkowe, tworząc sieć Hartiga. Grzybnia kolonizuje glebę (b). Rezultatem połączenia dwóch typów grzybni jest powstanie owocników, w pierwszej fazie rozwoju określanych jako *primordium* (c). We wnętrzu owocnika, dikariotyczne tkanki grzybni wytwarzają worki, w których dochodzi do procesów kariogamii oraz mejozy i powstaje dojrzały owocnik (d). Ostatecznie, w workach powstają haploidalne zarodniki, których głównym wektorem są ssaki i owady mykofagiczne (e) [29, 30].

skład do tej, która występuje w glebie otaczającej młode owocniki, jednak wyraźnie różny od zbiorowiska gleby otaczającej dojrzałe owocniki. Różnice obserwowane w składzie ilościowym bakterii w perydium związane są głównie z postępującym wzrostem liczebności *Bacteroidetes* i α -*Proteobacteria* a zmniejszaniem się liczebności β -*Proteobacteria*. Z kolei zbiorowiska bakterii obecne w glebie (warstwa zarodnikonośna) od wczesnej fazy rozwoju owocników są zdominowane przez przedstawicieli α -*Proteobacteria*. Ich dominacja utrzymuje się wraz z dojrzewaniem owocników, podobnie jak ma to miejsce w przypadku perydium. Uzyskane obserwacje skłoniły autorów [1] do zaproponowania wniosku, że bakterie glebowe kolonizują owocniki trufla w najwcześniejszej fazie ich rozwoju, zanim nastąpi zróżnicowanie tkanek owocnika na warstwę zewnętrzną i wewnętrzną. Następnie bakterie znajdujące się w warstwie zarodnikonośnej owocnika zostają w niej uwięzione i częściowo izolowane od gleby przez brodawkowate perydium. Z powodu takiego podziału zbiorowisk bakterii w owocniku ich skład zależy przede wszystkim od zmian w fizjologii dojrzewającego owocnika [1].

Zmiany w składzie zbiorowiska bakterii związanego z truflami może wywoływać także ich zbiór. Czynność ta powoduje zmiany parametrów fizykochemicznych gleby w której rosną, takich jak temperatury i zawartości CO₂ [24]. Dla przykładu, u owocników *T. borchii* liczba bakterii reprezentujących α - i β -*Proteobacteria* jest wyższa w chwili ich zbioru niż u tych samych owocników przechowywanych w laboratorium i analizowanych sześć dni później [25].

Nie tylko stadium dojrzałości owocnika wpływa na skład zbiorowiska bakterii, ale również stadium cyklu rozwojowego grzyba. Porównanie bakterii obecnych na owocnikach *T. melanosporum* i na mykoryzach wykazało ogromne różnice w składzie tych dwóch zbiorowisk. Bakterie zatem odnajdują odmienne warunki do wzrostu w różnych elementach morfologii grzyba. Dla przykładu, z ektomykoryzami *T. melanosporum* związana jest klasa bakterii należąca do *Actinobacteria*, natomiast ich liczebność na owocnikach jest niewielka [1]. Bakterie należące do kilku rodzajów *Actinobacteria* szczególnie liczne są w ogrodach truflowych *T. melanosporum* w strefie wokół sadzonek inokulowanych tym grzybem i nazywanych „brule” (okręgi wypalonej ziemi), charakteryzujących się obfitością grzybni trufla [29].

Z dotychczasowych badań wynika, że niezależnie od gatunku trufla, podstawowym komponentem bakteryjnym są bakterie należące do rodzin *Bradyrhizobiaceae* i *Rhizobiaceae*, należące do α -*Proteobacteria*. Nieznane są wciąż czynniki decydujące o takim stanie zbiorowisk bakterii. Hipoteza, że trufla są więcej niż tylko siedliskiem dla bakterii wydaje się kusząca. Nie można wykluczyć mutualistycznych interakcji między grzybami i zasiedlającymi je mikroorganizmami. Znane są bowiem zdolności bakterii należących do *Rhizobiales*, do przyswajania azotu, zarówno gdy występują jako wolno żyjące organizmy lub w symbiozie z rośliną [9]. Wiązanie azotu wewnątrz owocników trufla białej (*T. magnatum*) zostało wykazane przez Barbieri i współautorów [5]. Geny różnych gatunków bakterii odpowiedzialne za ten proces stwierdzono także w owocnikach trufla perigordzkiej (*T. melanosporum*) [1]. Być może część azotu, którą zgromadziły bakterie jest wykorzystywana przez gospodarza, w tym przypadku truflę.

3. Podsumowanie

Poznanie roli bakterii w rozwoju trufla pozwoli na czynną ochronę tych grzybów oraz na możliwości gospodarowania terenami leśnymi i rolniczymi. Stosowane obecnie w nauce dynamicznie rozwijające się metody molekularne pozwalają na szczegółowe poznanie składu zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających gleby, w tym gleby sprzyjające rozwojowi trufla. Dzięki analizom DNA zdołano zidentyfikować niektóre gatunki bakterii występujące u dwóch gatunków trufla, tj. *T. borchii* i *T. aestivum* (Tab. I). Identyfikacja bakterii promujących tworzenie się owocników *Tuber* spp. ma szczególne znaczenie dla ochrony *ex situ* tych cennych grzybów poprzez zakładanie i prowadzenie upraw truflowych. Wymiernym efektem tej wiedzy może być również stworzenie szczepionek bakteryjnych stymulujących plonowanie trufla i/lub chroniących ją przed atakiem patogenów glebowych.

Piśmiennictwo

1. Antony-Babu S., Deveau A., Van Nostrand J.D., Zhou J., Le Tacon F., Robin C., Frey-Klett P., Uroz S.: Black truffle-associated bacterial communities during the development and maturation of *Tuber melanosporum* ascocarps and putative functional roles. *Environ. Microbiol.* **16**, 2831–2847 (2014)
2. Barbieri E., Potenza L., Rossi I., Sisti D., Giomaro G., Rossetti S., Beimfohr C., Stocchi V.: Phylogenetic characterization and in situ detection of a *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* phylogroup bacterium in *Tuber borchii* Vittad. ectomycorrhizal mycelium. *Appl. Environ. Microb.* **66**, 5035–5042 (2000)
3. Barbieri E., Bertini L., Rossi I., Ceccaroli P., Saltarelli R., Guidi C., Zambonelli A., Stocchi V.: New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **247**, 23–35 (2005)
4. Barbieri E., Guidi C., Bertaux J., Frey-Klett P., Garbaye J., Ceccaroli P., Saltarelli R., Zambonelli A., Stocchi V.: Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation. *Environ. Microbiol.* **9**, 2234–2246 (2007)
5. Barbieri E., Stocchi V., et al.: New evidence for nitrogen fixation within the Italian white truffle *Tuber magnatum*. *Fungal Biol.* **114**, 936–942 (2010)
6. Blom D., Fabbri C., Connor E.C., Schiestl F.P., Klauser D.R., Bollner T., Eberl L., Weiskopf, L.: Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ. Microbiol.* **13**, 3047–3058 (2011)
7. Bonito G., Trappe J.M., Donovan S., Vilgalys R.: The Asian black truffle *Tuber indicum* can form ectomycorrhizas with North American host plants and complete its life cycle in non-native soils. *Fungal Ecol.* DOI:10.1016/j.funeco.201.08.003 (2008)
8. Buscot F., Munch J.C., Charcosset J.Y., Gardes M., Nehls U., Hampp R.: Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 601–614 (2000)
9. Callot G.: La truffe, la terre, la vie. INRA Editions, Paris (1999)
10. Carvalho F.M., Souza R.C., Barcellos F.G., Hungria M., Vasconcelos A.T.R.: Genomic and evolutionary comparisons of diazotrophic and pathogenic bacteria of the order *Rhizobiales*. *BMC microbiol.* **10**, 1 (2010)
11. Claus R., Hoppe H.O., Karg H.: The secret of truffle: a steroidal pheromone? *Experientia*, **37**, 1178–1179 (1981)
12. Falasconi M., Pardo M., Sberveglieri G., Battistutta F., Piloni M., Zironi R.: Study of white truffle aging with SPME-GC-MS and the Pico2-electronic nose. *Sens. Actuators. B Chem.* **106**, 88–94 (2005)
13. Flament I., Chevalier G., Debonneville C.: Analysis of the volatile flavor constituents of Périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vitt.). *Riv. Ital. EPPOS.* **9**, 280–299 (1990)
14. Gryndler M., Soukupová L., Hřšelová H., Gryndlerová H., Boro- vička J., Streiblová E., Jansa J.: A quest for indigenous truffle helper prokaryotes: *Tuber aestivum*-associative prokaryotes. *Environ. Microbiol. Rep.* **5**, 346–352 (2013)
15. Hilszczańska D.: Propozycja mikoryzacji sadzonek drzew leśnych z udziałem trufli letniej (*Tuber aestivum*) w Polsce. *Sylwan*, **153**, 281–286 (2009)
16. Hilszczańska D., Rosa-Gruszecka A., Szmidla H.: Characteristic of *Tuber* spp. localities in natural stands with emphasis on plant species composition. *Acta Mycol.* **49**, 267–277 (2014)
17. Hilszczańska D.: Popularyzacja upraw trufli letniej i zagospodarowania terenów nieleśnych. Studia i Materiały CEPL w Rogowie R. 17. Zeszyt **44** /3 s. 119–129 (2015)
18. Martin F., Duplessis S., Ditengou F., Lagrange H., Voiblet C., Lapeyrie F.: Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytol.* **151**, 145–154 (2001)
19. Mauriello G., Marino R., D'Auria M., Cerone G., Rana G.L.: Determination of volatile organic compounds from truffles via SPME-GC-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **42**, 299–305 (2004)
20. Mello A., Murat C., Bonfante P.: Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy. *FEMS Microbiol. Lett.* **260**, 1–8 (2006)
21. Olivier J., Savignac J., Sourzat P.: Truffe et Trufficulture. Péri-gueux, France: FANLAC (2012)
22. Pacioni G., Comandini O.: *Tuber* (w) Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile, red. J.W.G. Cairney, S.M. Chambers, Springer, Berlin Heidelberg, 1999, s. 163–186
23. Raynaud M., Doumenc-Faure P.J., Pébeyre T. Talou. Investigation of the use of a portable electronic nose device in the truffle industry, in: J.W. Gardner, K.C. Persaud (Eds.), Electronic nose and Olfaction 2000. 1 253–256, Sensors Series (2000), pp. 253–256
24. Read D.J.: Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia*, **47**, 376–391 (1991)
25. Rivera C.S., Blanco D., Oria R., Venturini M.E.: Diversity of culturable microorganisms and occurrence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. In *Tuber aestivum* and *Tuber melanosporum* ascocarps. *Food Microbiol.* **27**, 286–293 (2010)
26. Rossi S.: Tartufi. Frutti della terra, figli degli dei. Series: I preziosi della gastronomia. SAGEP 2011
27. Rubini A., Belfiori B., Riccioni C., Paolucci F.: Genomics of *Tuber melanosporum*: new knowledge concerning reproductive biology, symbiosis, and aroma production. W: Edible ectomycorrhizal mushrooms, current knowledge and future prospects. red. A. Zambonelli, G.M. Bonito, Soil Biol. 34, Springer-Verlag, Berlin: 57–72 (2012)
28. Splivallo R., Bossi S., Maffei M., Bonfante P.: Discrimination of truffle fruiting body versus mycelial aromas by stir bar sorptive extraction. *Phytochem.* **68** p. 2584 (2007)
29. Splivallo R., Deveau A., Valdez N., Kirchhoff N., Frey-Klett P., Karlovsky P.: Bacteria associated with truffle-fruiting bodies contribute to truffle aroma. *Environ. Microbiol.* DOI: 10.1111/1462-2920.12521 (2014)
30. Suz L.M., Martin M.P., Oliach D., Fischer C.R., Colinas C.: Mycelial abundance and other factors related to truffle productivity in *Tuber melanosporum* – *Quercus ilex* orchards. *FEMS Microbiol. Lett.* **285**, 72–78 (2008)
31. Talou T., Delmas M., Gaset A.: Principal constituents of black truffle (*Tuber melanosporum*) aroma. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 774–777 (1987)
32. Talou T., Delmas M., Gaset A.: Analysis of headspace volatiles from entire black truffle (*Tuber melanosporum*). *J. Sci. Food Agric.* **48**, 57–62 (1989)
33. Talou T., Delmas M., Gaset A.: Direct Capture of Volatiles Emitted from entire black Périgord truffle. *J. Ess. Oil Res.* **1**, 281–286 (1989)
34. Thomas P.: The role of pH in *Tuber aestivum* syn. *uncinatum* mycorrhiza development within commercial orchards. *Acta Mycol.* **47**, 161–167 (2012)
35. Vahdatzadeh M., Deveau A., Splivallo R.: The role of the microbiome of truffles in aroma formation: a meta-analysis approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 6946–6952 (2015)
36. Wedén C., Pettersson L., Danell E.: Truffle cultivation in Sweden: results from *Quercus robur* and *Corylus avellana* field trials on the island of Gotland. *Scand. J. Forest Res.* **24**, 37–53 (2009)
37. Zeppa S., Gioacchini A.M., Guidi C., Guescini M., Pierleoni R., Zambonelli A., Stocchi V.: Determination of specific volatile organic compounds synthesized during *Tuber borchii* Fruit body development by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. Rapid communication in mass spectrometry **18**, 199–205 (2004)