



Способ механической активации суспензии спор черного трюфеля

Н.А. Имидоева*✉, Е.В. Малыгина*, А.Ю. Бельшенко*, М.Е. Дмитриева*,
В.Н. Шелковникова*, М.М. Моргунова***, С.В. Кулинич*, Т.Н. Вавилина*,
С.Н. Евстафьев**, Д.В. Аксёнов-Грибанов*

*Иркутский государственный университет, г. Иркутск, Российская Федерация

**Иркутский национальный исследовательский технический университет,
г. Иркутск, Российская Федерация

Аннотация. Истинные трюфели, или грибы рода *Tuber*, являются одними из самых ценных, редких, дорогих и загадочных грибов на планете. Размножение трюфельных грибов в дикой природе является сложным процессом, который зависит от многих факторов, например, от присутствия подходящих деревьев-хозяев, оптимальных параметров температуры, влажности, pH почвы, почвенных симбионтов и других организмов. Так, для успешного производства и размножения трюфелей требуется соблюдение множества условий, а главное – высвобождение их спор из асков, прорастание в благоприятных условиях и распространение в природной среде. Целью представленного исследования являлась разработка метода механического разрушения асков для высвобождения спор черного трюфеля. Показано, что высокоэффективным способом разрушения асков является гомогенизация с использованием погружного блендера в tandem с вибрационным измельчителем. Микроскопирование образцов на всех этапах эксперимента позволило установить, что такой способ приводит к разрушению не менее 85% асков и высвобождению спор трюфеля. При использовании подходов центрифугирования представляется возможным отделить споры черных трюфельных грибов от обломков гифов, грибных симбионтов и различных ассоциированных организмов. Такие споры способны к образованию мицелия на питательных средах. Результаты исследования могут быть использованы для подготовки посевного материала *Tuber* sp. и получения их чистых культур. Таким образом, внедрение способов высвобождения спор из асков способствует повышению эффективности культивации черного трюфеля.

Ключевые слова: черный трюфель, *Tuber* sp., споры, гомогенизация, получение мицелия

Финансирование. Исследование проведено при поддержке Российского научного фонда, проект № 22-76-10036.

Для цитирования: Имидоева Н.А., Малыгина Е.В., Бельшенко А.Ю., Дмитриева М.Е., Шелковникова В.Н., Моргунова М.М. [и др.]. Способ механической активации суспензии спор черного трюфеля // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 4. С. 561–568. DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-561-568. EDN: HBUBNO.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

A way to mechanically activate a suspension of black truffle spores

Natalia A. Imidoeva*✉, Ekaterina V. Malygina*, Aleksandr Yu. Belyshenko*,
Maria E. Dmitrieva*, Victoria N. Shelkovnikova*, Maria M. Morgunova***,
Sophia V. Kulinich*, Tatyana N. Vavilina*, Sergei N. Evstaf'ev**, Denis V. Axenov-Gribanov*

*Irkutsk State University, Irkutsk, Russian Federation

**Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation

© Имидоева Н.А., Малыгина Е.В., Бельшенко А.Ю., Дмитриева М.Е., Шелковникова В.Н., Моргунова М.М., Кулинич С.В., Вавилина Т.Н., Евстафьев С.Н., Аксёнов-Грибанов Д.В., 2023

Abstract. True truffles, or fungi of the genus *Tuber*, are among the most valuable, rare, expensive, and mysterious fungi on the planet. The reproduction of truffle fungi in the wild is a complex process that depends on many factors, for example, the presence of suitable host trees, as well as the optimal parameters of temperature, moisture, soil pH, soil symbionts, and other organisms. Successful production and reproduction of truffles require a large number of conditions to be met, primarily the release of their spores from asci, germination under favorable conditions, and distribution in the environment. The present study aims to develop a method for mechanically breaking asci in order to release the spores of black truffle. It is shown that homogenization by means of an immersion blender together with a vibrating chopper is a highly effective way to break asci. The microscopic examination of the specimens at all stages of the experiment revealed that this method leads to the breakdown of at least 85% of asci and the release of truffle spores. The use of centrifugation approaches enables the separation of black truffle spores from hyphal debris, fungal symbionts, and various associated organisms. Such spores can form mycelium on growth media. The study results can be used to prepare *Tuber* sp. inoculum and obtain their axenic cultures. Thus, the introduction of methods for releasing spores from asci improves the efficiency of black truffle cultivation.

Keywords: black truffle, *Tuber* sp., spores, homogenization, mycelial production

Funding. The Russian Science Foundation (project no. 22-76-10036) financially supported the work.

For citation: Imidoeva N.A., Malygina E.V., Belyshenko A. Yu., Dmitrieva M.E., Shelkovnikova V.N., Morgunova M.M., et al. A way to mechanically activate a suspension of black truffle spores. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(4):561-568. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-4-561-568. EDN: HBUBNO.

ВВЕДЕНИЕ

Трюфельные грибы (*Tuber* sp.) являются сумчатыми грибами, плодовые тела которых формируются под землей в ассоциации с корнями определенных пород деревьев, таких как дуб, сосна, лесной орех и др. Этот симбиоз позволяет трюфелям получать необходимые питательные вещества от растений. В свою очередь, трюфельные грибы способствуют поглощению воды и минералов из почвы для роста корневой системы растений [1]. Данные грибы являются малоизученными организмами, а внимание их биотехнологической значимости практически не уделено. Особую актуальность исследованию придает тот факт, что в настоящее время происходит сокращение числа дикорастущих трюфелей [2], а в посевном материале коммерческого мицелия трюфеля, реализуемого в России, по данным наших собственных наблюдений 2022 года, основанных на метагеномном анализе коммерческих образцов, зачастую отмечается отсутствие трюфельных грибов. В связи с этим одним из перспективных направлений исследований является разработка методов выращивания трюфельных грибов в контролируемых лабораторных условиях. Проблемой в данном случае выступает наличие сложного и разнообразного симбионтного сообщества трюфельных грибов, представленного бактериями, грибами, беспозвоночными и другими организмами [3]. Они активно колонизируют трюфели на всех этапах их жизненного цикла, создавая трудности для получения чистой культуры [4, 5].

Трюфельные грибы являются уникальным и ценным продуктом и пользуются большим спросом в кулинарии, так как обладают характерным вкусом и ароматом [6]. В то же время они являются редкими и ограниченно доступными из-за своих специфических требований к климату и условиям почвы [7, 8]. Ввиду высокой стоимости и редкости трюфели стали предметом интереса для исследований и разработок в области сельского хозяйства [9]. Большое количество проведенных ранее исследований было направлено на оптимизацию и улучшение способов выращивания трюфелей с целью сделать их более доступными и коммерчески выгодными

[10, 11]. Так, известен патент KZ 23874A4 «Способ и устройство для получения биомассы трюфеля и других съедобных грибов», в котором описано получение из трюфельных грибов белкового продукта и мицелия [12]. В качестве маточной культуры авторами были использованы измельченные трюфельные грибы, которые помещались в ферментер и культивировались до прироста биомассы. Тем не менее в изобретении не приведено доказательства роста грибов рода *Tuber*, а принимая во внимание высокоразвитые симбиотические сообщества [1] внутри плодового тела грибов, можно утверждать, что заявленное изобретение фактически не решает техническую задачу касательно упомянутых грибов.

Одним из важных условий для размножения трюфельных грибов в дикой природе является высвобождение спор из асков. Аски служат защитной оболочкой для спор от воздействия негативных факторов. В них же происходит активное созревание спор. После освобождения из оболочек споры прорастают, образуя мицелий, который затем образует микоризу и формирует плодовое тело. В настоящее время существуют различные методы получения посевной суспензии спор трюфелей, но они зачастую неэффективны и требуют значительных затрат времени, ресурсов и специфических компонентов. Широко распространен метод микоризации споровой суспензией трюфелей саженцев растений-хозяев [13, 14]. При этом проблема заключается в том, что успешно установленная симбиотическая связь с трюфельными грибами может быть непостоянной и неустойчивой в связи с заражением растений-хозяев патогенами и другими грибами-симбионтами [15]. Кроме того, не все растения-хозяева могут быть успешно микоризованы трюфелями, что ограничивает выбор видов и сортов для получения трюфелей [16]. При отсутствии молекулярного контроля микоризация растения может произойти фитопатогенными грибами – симбионтами трюфеля, а не собственно трюфельными грибами.

Зачастую споры трюфелей распространяются в природе при помощи животных, в т.ч. микрофагов, которые потребляют их в пищу и с помощью ряда пищеварительных ферментов разрушают защитные оболочки

спор, тем самым рассеивая их в окружающую среду [17, 18]. Зрелые споры без сумок быстрее прорастают и эффективнее образуют микоризу, что необходимо для эффективного выращивания трюфелей [19]. Однако такой способ распространения спор трюфелевых грибов во многом зависит от перемещения животных и не позволяет обеспечить доступный поиск грибов.

В связи с вышесказанным целью данного исследования являлась разработка доступного метода механического разрушения асков для облегчения высвобождения спор черных трюфелевых грибов, а следовательно, и создания посевного материала, отличающегося наличием активированных спор черного трюфеля и их способности к росту.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследовании использовали плодовые тела черных трюфелевых грибов *Tuber* sp., собранные в городе Краснодаре ($N = 12$). Данные грибы имеют глобулярную форму и покрыты шероховатым плотным пирамидальным перидием. Цвет перидия черный или темно-коричневый. Размеры плодовых тел варьируют от 2 до 6 см, иногда достигают 15 см. Средний вес грибов составляет около 20 г.

Внутри плодового тела черного трюфеля находится глеба, имеющая серый, коричневый или кремовый цвет. Характерным признаком глебы трюфелей является наличие мраморного рисунка, который формируется множеством плотных извилистых прожилок белого цвета¹ [20].

В ходе осуществленных работ предложен метод механического разрушения асков, содержащих споры трюфеля, сопровождающийся наблюдением с помощью светового микроскопа «Микромед 2» (вар. 3-20, «Микромед», Россия) за спорами при их инокуляции на агаризованные питательные среды. Проведена серия экспериментов, включающая различные методы механического разрушения асков. Для этого стерильным скальпелем вырезали участок плодового тела черного трюфеля *Tuber* sp., после чего его переносили в микропробирку, в которую добавляли 1 мл стерильной дистиллированной воды/физраствора или микробиологических сред (1–5% LB, TSB, Сабуро, Гетчинсона, картофельно-глюкозный агар, среда Чапека и др.) и проводили измельчение (гомогенизацию) различными способами.

Наконец, часть образцов гриба гомогенизировали с помощью лабораторного вибрационного измельчителя БАБРх1 (НПК «Микотех», Россия) посредством интенсивного встряхивания со стальными шарами при 3000 об/мин. Образцы измельчали в течение 3 мин четырехкратно. В перерывах пробы охлаждали и проводили микроскопирование полученного материала.

К оставшимся образцам добавляли до 200 мл дистиллированной воды/физраствора или указанных ранее микробиологических сред и проводили измельчение с помощью погружного блендера. Мелкую фракцию плодового тела трюфеля отбирали в микропробирки. Один образец отправляли на микроскопический анализ, а ко второму добавляли металлические шары, после чего

проводили четырехкратное измельчение при температуре, не превышающей 45 °С. Для очистки споровой суспензии трюфеля от обломков гифов и его симбионтов проводили центрифугирование при скорости 12000 об/мин в течение 5 мин, в результате чего отделяли осадок от надосадочной жидкости. Для очистки образцов проводили пятикратную отмывку в растворах стерильной воды или питательных сред. Изменения в морфологии спор и асков трюфеля во всех трех пробах регистрировали с помощью светового микроскопа.

Далее подготавливали предметные стекла для микроскопирования гомогенизированных проб и детекции прорастания полученной споровой суспензии грибов. Для этого очищали стекло от пыли и обезжиривали его в течение 15–20 мин в 70%-м растворе спирта, затем промывали дистиллированной водой, сушили и стерилизовали. Каплю агаризованных питательных сред наносили на предметные стекла. Гомогенат, содержащий споры трюфеля, наносили на застывшие питательные среды, в т.ч. питательную среду Сабуро, среду Гетчинсона, картофельно-глюкозный агар, среду Чапека. Предметные стекла помещали в термостатируемые условия в стерильных чашках Петри при температурах от 18 до 30 °С на две недели для того, чтобы споры начали прорастать и образовывать грибные гифы. Микроскопию спор трюфеля проводили сразу после гомогенизации, а также на 7-е, 10-е и 14-е сутки эксперимента. Эксперименты проведены в 12 повторах для исключения влияния случайных факторов. Выполнено более 100 микробиологических посевов споровой суспензии на предметные стекла. Анализ каждого эксперимента проводили в трех микроскопических полях. Оценку достоверности осуществляли, используя U-критерий Манна – Уитни. Статистический анализ проводили с использованием программы Past 4.10.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Микрофотографии, полученные в ходе исследования, позволяют сравнить результаты эффективности разрушения асков в ходе измельчения плодовых тел черного трюфеля рода *Tuber* sp. различными методами. Получены репрезентативные микрофотографии до гомогенизации (рис. 1, а) и после гомогенизации с использованием погружного блендера (рис. 1, б), вибрационного измельчителя (рис. 1, с) и погружного блендера в тандеме с вибрационным измельчителем (рис. 1, д). На фотографии до гомогенизации (см. рис. 1, а) видно, что споры трюфелей находятся внутри асков (степень повреждения асков составляет не более $9,1 \pm 5,7\%$). После гомогенизации с помощью погружного блендера (см. рис. 1, б) было разрушено $22,4 \pm 9,1\%$ асков, а основная часть спор осталась внутри них. В случае гомогенизации с использованием вибрационного измельчителя (см. рис. 1, с) отмечали $51,7 \pm 12\%$ разрушенных асков, но $90 \pm 11,3\%$ спор все еще находилось внутри них. Наконец, гомогенизация с использованием погружного блендера в тандеме с вибрационным измельчителем (см. рис. 1, д) привела к разрушению $86,3 \pm 6,2\%$ асков и высвобождению $70,2 \pm 8,6\%$ спор. По результатам микроскопического анализа этот метод оказался наиболее эффек-

¹Ивойлов А.В., Большаков С.Ю., Силаева Т.Б. Изучение видового разнообразия микромицетов: учеб. пособие. Саранск: Изд-во Мордовского ун-та, 2017. 155 с.

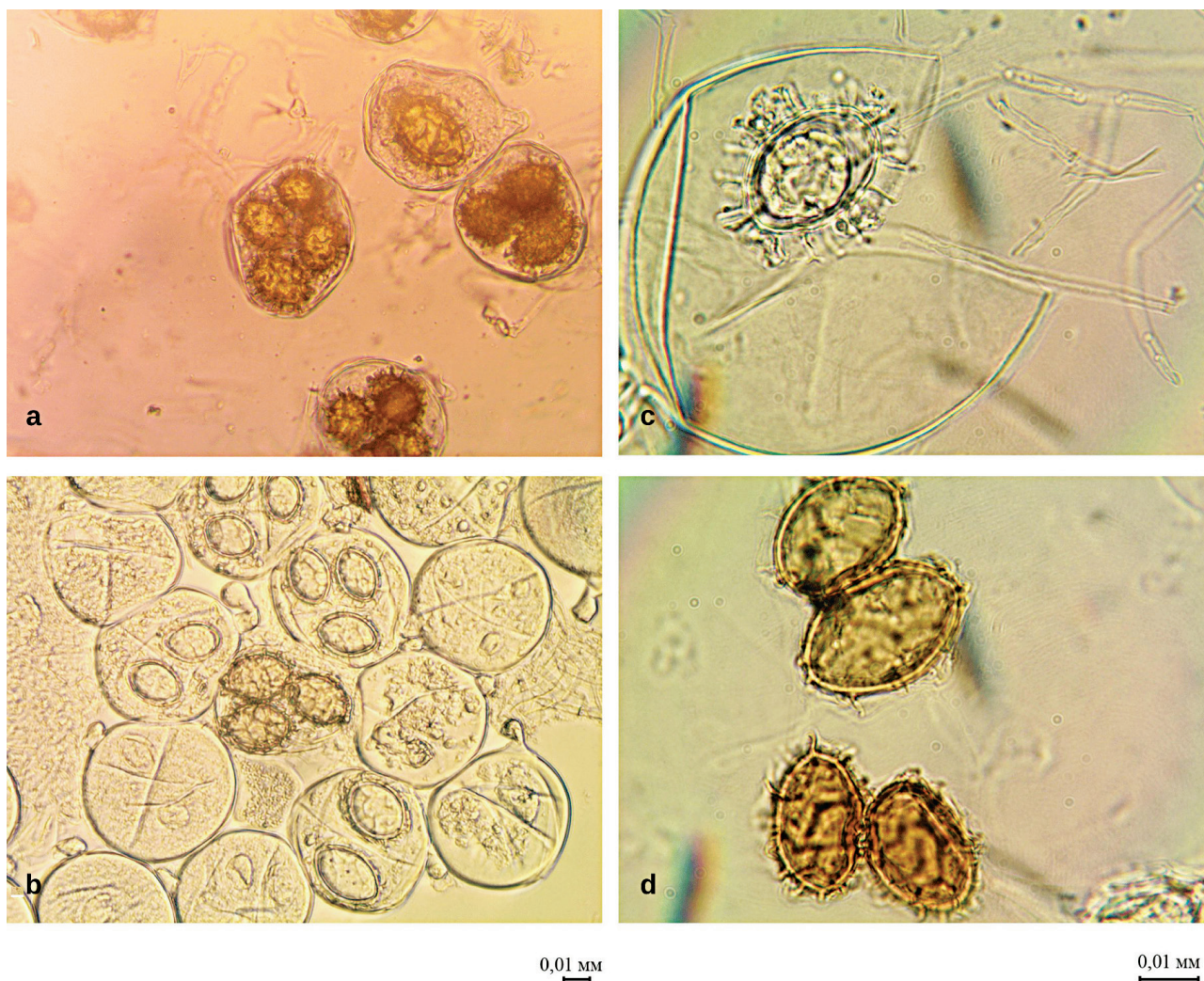


Рис. 1. Микрофотографии образцов до гомогенизации (а) и после гомогенизации с использованием погружного блендера (б), вибрационного измельчителя (с) и погружного блендера в тандеме с вибрационным измельчителем (д)

Fig. 1. Light micrographs before homogenization (a) and after homogenization using immersion blender (b), vibrating chopper (c) and immersion blender in tandem with vibrating chopper (d)

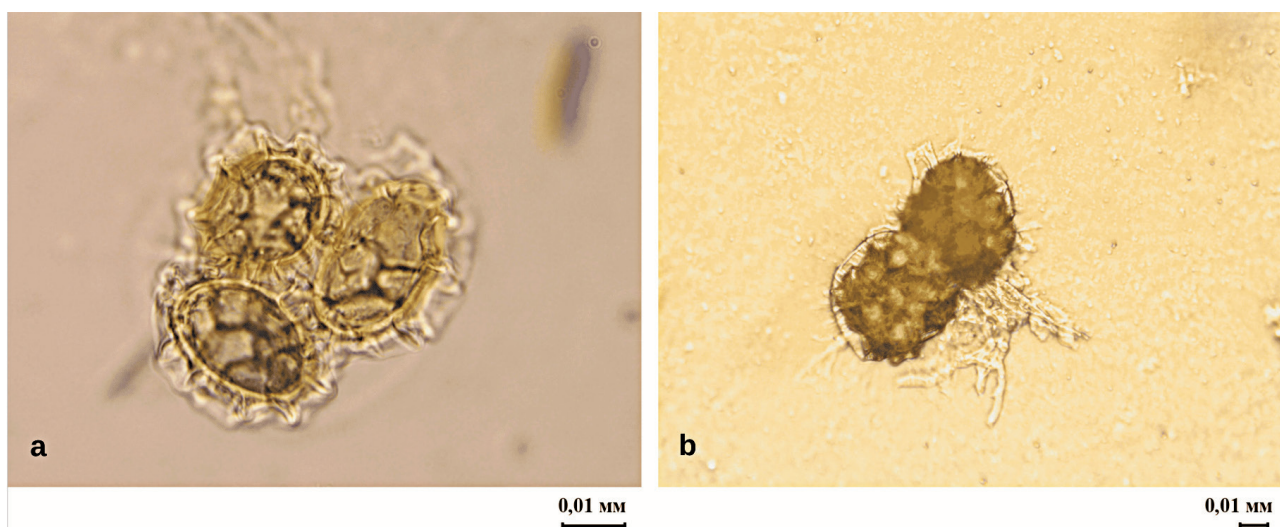


Рис. 2. Микрофотографии споровой суспензии, полученной после гомогенизации с использованием блендера и вибрационного измельчителя на 10-е (а) и 14-е (б) сутки

Fig. 2. Light micrographs of the spore suspension obtained after homogenization using a blender and a vibrating chopper on the 10th (a) and 14th (b) day

тивным в разрушении асков и высвобождении спор по сравнению с иными.

Вместе с тем в ходе исследования показано, что в результате центрифугирования образцов после гомогенизации споры трюфелевых грибов оседают на дно микроцентрифужной пробирки, в то время как обломки гифов, симбионтов и патогенов остаются в надосадочной жидкости. Применение пятикратной отмывки споровой суспензии, сопряженной с центрифугированием, позволяет достичь высокой степени чистоты споровой суспензии, что необходимо для получения чистой культуры трюфеля и снижения воздействия на нее симбиотных и патогенных микроорганизмов, присутствующих в нормальных условиях в составе плодового тела.

Работы, направленные на проращивание в термостатируемых условиях (22–24 °C) споровой суспензии, полученной после гомогенизации с использованием блендера и вибрационного измельчителя (шаровой мельницы), показали, что споры по истечении одной недели не образуют мицелий в 95,1±2% случаев. Споры сохранялись объемными и набухшими до 10 суток (рис. 2, а) и только через две недели в 75,8±9,4% случаев начинали формировать грибные гифы из спор трюфеля (рис. 2, б). Споры, проращиваемые на предметных стеклах, инкубируемых при температуре от 18 до

22 °C, набухли в объеме на 18±3% к 14 суткам эксперимента, однако следов прорастания спор при этом не наблюдали. Споры, проращиваемые на предметных стеклах и инкубируемые при температуре 26–30 °C, не изменили своей морфологии в ходе всего времени эксперимента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов установлено, что комбинированная гомогенизация с использованием погружного блендера и вибрационного измельчителя, а также очистка полученной суспензии при помощи центрифугирования является наиболее эффективным методом получения посевного материала спор трюфелевых грибов. Полученные результаты были подтверждены при помощи проращивания спор трюфелей на агаризованных питательных средах и микроскопического контроля. Использование данного метода может быть полезным для обеспечения более эффективного и быстрого прорастания спор трюфелевых грибов на различных субстратах в лабораторных контролируемых условиях. Принимая во внимание обнаруженное отсутствие трюфелевых грибов в посевном материале российских поставщиков, разработанный метод может быть применим для грибоводства и полезен при формировании производств черных трюфелевых грибов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Ori F., Hall I., Gianchino C., Iotti M., Zambonelli A. Truffles and morels: two different evolutionary strategies of fungal-plant interactions in the Pezizales // Plant microbe interface / eds A. Varma, S. Tripathi, R. Prasad. Cham: Springer, 2019. P. 69–93. DOI: 10.1007/978-3-030-19831-2_3.
2. True truffle (*Tuber* spp.) in the world / eds A. Zambonelli, M. Iotti, C. Murat. Cham: Springer, 2016. 436 p. DOI: 10.1007/978-3-319-31436-5.
3. Marozzi G., Benucci G.M.N., Turchetti B., Massaccesi L., Baciarelli F.L., Bonito G., et al. Fungal and bacterial diversity in the *Tuber magnatum* ecosystem and microbiome // Environmental Microbiology. 2023. Vol. 85. P. 508–521. DOI: 10.1007/s00248-021-01950-1.
4. Vahdatzadeh M., Deveau A., Splivallo R. Are bacteria responsible for aroma deterioration upon storage of the black truffle *Tuber aestivum*: a microbiome and volatolome study // Food Microbiology. 2019. Vol. 84. P. 103251. DOI: 10.1016/j.fm.2019.103251.
5. Splivallo R., Deveau A., Valdez N., Kirchhoff N., Frey-Klett P., Karlovsky P. Bacteria associated with truffle-fruited bodies contribute to truffle aroma // Environmental Microbiology. 2015. Vol. 17, no. 8. P. 2647–2660. DOI: 10.1111/1462-2920.12521.
6. Allen K., Bennet J.W. Tour of truffles: aromas, aphrodisiacs, adaptogens, and more // Mycobiology. 2021. Vol. 49, no. 3. P. 201–212. DOI: 10.1080/12298093.2021.1936766.
7. Zambonelli A., Iotti M., Hall I. Current status of truffle cultivation: recent results and future perspectives // Mycologia Italiana. 2015. Vol. 44, no. 1. P. 31–40. DOI: 10.6092/issn.2465-311X/5593.
8. Hall I.R., Fitzpatrick N., Miros P., Zambonelli A. Counter-season cultivation of truffles in the Southern Hemisphere: an update // Italian Journal of Mycology. 2017. Vol. 46. P. 21–36. DOI: 10.6092/issn.2531-7342/6794.
9. Reyna S., Garcia-Barreda S. Black truffle cultivation: a global reality // Forest Systems. 2014. Vol. 23, no. 2. P. 317–328. DOI: 10.5424/fs/2014232-04771.
10. Deveau A., Clowez P., Petit F., Maurice J.-P., Todesco F., Murat C., et al. New insights into black truffle biology: discovery of the potential connecting structure between a *Tuber aestivum* ascocarp and its host root // Mycorrhiza. 2019. Vol. 29. P. 219–226. DOI: 10.1007/s00572-019-00892-4.
11. Gómez-Molina E., Sánchez S., Puig-Pey M., Garcia-Barreda S. Sequential application of inoculation methods improves mycorrhization of *Quercus ilex* seedlings by *Tuber melanosporum* // Fungal Biology. 2023. Vol. 127, no. 10-11. P. 1328–1335. DOI: 10.1016/j.funbio.2023.07.004.
12. Пат. 23874A4, Республика Казахстан, C12N 1/14, C12M 1/24. Способ и устройство для получения биомассы трюфеля и других съедобных грибов / Р.К. Блиева, Д.Н. Козыбаева, Ж.Б. Сулейменова, Е.Н. Блиев, Д.Н. Блиев. Опубл. 15.04.2011. Бюл. № 4.
13. Пат. no. CN108934768B, China. Black spore truffle inoculation microbial inoculum, treatment method thereof and mycorrhiza cultivation method / X. Li, L. Ye, J. Zou, J. Zong, D. Wang, X. He, et al. Published 24.11.2020.
14. Пат. no. TW202038705A, Taiwan. Preparation method of truffle strain liquid and cultivation method of truffle mycorrhizal seedling / C.-M. Chen, H.-W. Huang, T.-C. Lin, S.-B. Lin. Published 01.11.2020.
15. Garcia-Barreda S., Marco P., Bonito G., Parladé J., Sánchez S., González V., et al. Interannual dynamics of *Tuber melanosporum* and fungal communities in productive black truffle orchards amended with truffle nests // FEMS Microbiology Ecology. 2023. Vol. 99, no. 8. DOI: 10.1093/femsec/fiad084.
16. Morte A., Arenas F., Marqués-Gálvez J.E., Andriano A.,

Guarnizo Á.L., Gutiérrez A., et al. Desert truffles (*Terfezia* spp.) breeding // *Advances in plant breeding strategies: vegetable crops* / eds J.M. Al-Khayri, S.M. Jain, D.V. Johnson. Cham: Springer, 2021. P. 479–504. DOI: 10.1007/978-3-030-66969-0_13.

17. Elliott T.F., Vernes K. Superb Lyrebird *Menura novae-hollandiae* mycophagy, truffles and soil disturbance // *IBIS*. 2019. Vol. 161, no. 1. P. 198–204. DOI: 10.1111/ibi.12644.

18. Ori F., Menotta M., Leonardi M., Amicucci A., Zambonelli A., Covès H., et al. Effect of slug mycophagy on *Tuber aestivum* spores // *Fungal Biology*. 2021. Vol. 125,

no. 10. P. 796–805. DOI: 10.1016/j.funbio.2021.05.002.

19. Thomas P.W., Thomas H.W. Mycorrhizal fungi and invertebrates: Impacts on *Tuber melanosporum* ascospore dispersal and lifecycle by isopod mycophagy // *Food Webs*. 2022. Vol. 33. P. e00260. DOI: 10.1016/j.fooweb.2022.e00260.

20. Mello A., Zampieri E., Zambonelli A. Truffle ecology: genetic diversity, soil interactions and functioning // *Mycorrhiza – function, diversity, state of the art* / eds A. Varma, R. Prasad, N. Tuteja. Cham: Springer, 2017. P. 231–252. DOI: 10.1007/978-3-319-53064-2_11.

REFERENCES

1. Ori F., Hall I., Gianchino C., Iotti M., Zambonelli A. Truffles and morels: two different evolutionary strategies of fungal-plant interactions in the Pezizales. In: Varma A., Tripathi S., Prasad R. (eds). *Plant microbe interface*. Cham: Springer; 2019, p. 69–93. DOI: 10.1007/978-3-030-19831-2_3.

2. Zambonelli A., Iotti M., Murat C. *True truffle (Tuber spp.) in the world*. Cham: Springer; 2016, 436 p. DOI: 10.1007/978-3-319-31436-5.

3. Marozzi G., Benucci G.M.N., Turchetti B., Massaccesi L., Baciarelli F.L., Bonito G., et al. Fungal and bacterial diversity in the *Tuber magnatum* ecosystem and microbiome. *Environmental Microbiology*. 2023;85:508–521. DOI: 10.1007/s00248-021-01950-1.

4. Vahdatzadeh M., Deveau A., Splivallo R. Are bacteria responsible for aroma deterioration upon storage of the black truffle *Tuber aestivum*: a microbiome and volatilomestudy. *Food Microbiology*. 2019;84:103251. DOI: 10.1016/j.fm.2019.103251.

5. Splivallo R., Deveau A., Valdez N., Kirchhoff N., Frey-Klett P., Karlovsky P. Bacteria associated with truffle-fruiting bodies contribute to truffle aroma. *Environmental Microbiology*. 2015;17(8):2647–2660. DOI: 10.1111/1462-2920.12521.

6. Allen K., Bennet J.W. Tour of truffles: aromas, aphrodisiacs, adaptogens, and more. *Mycobiology*. 2021;49(3):201–212. DOI: 10.1080/12298093.2021.1936766.

7. Zambonelli A., Iotti M., Hall I. Current status of truffle cultivation: recent results and future perspectives. *Mycologia Italiana*. 2015;44(1):31–40. DOI: 10.6092/issn.2465-311X/5593.

8. Hall I.R., Fitzpatrick N., Miros P., Zambonelli A. Counter-season cultivation of truffles in the Southern Hemisphere: an update. *Italian Journal of Mycology*. 2017;46:21–36. DOI: 10.6092/issn.2531-7342/6794.

9. Reyna S., Garcia-Barreda S. Black truffle cultivation: a global reality. *Forest Systems*. 2014;23(2):317–328. DOI: 10.5424/fs/2014232-04771.

10. Deveau A., Clowez P., Petit F., Maurice J.-P., Todesco F., Murat C., et al. New insights into black truffle biology: discovery of the potential connecting structure between a *Tuber aestivum* ascocarp and its host root. *Mycorrhiza*. 2019;29:219–226. DOI: 10.1007/s00572-019-00892-4.

11. Gómez-Molina E., Sánchez S., Puig-Pey M., Gar-

cia-Barreda S. Sequential application of inoculation methods improves mycorrhization of *Quercus ilex* seedlings by *Tuber melanosporum*. *Fungal Biology*. 2023;127(10–11):1328–1335. DOI: 10.1016/j.funbio.2023.07.004.

12. Blieva R.K., Kozybaeva D.N., Suleimenova Zh.B., Bliev E.N., Bliev D.N. *Method and device for obtaining biomass of truffle and other edible mushrooms*. Patent KZ, no. 23874 A4; 2011. (In Russian).

13. Li X., Ye L., Zou J., Zong J., Wang D., He X., et al. *Black spore truffle inoculation microbial inoculum, treatment method thereof and mycorrhiza cultivation method*. Patent CN, no. CN108934768B; 2020. (In Chinese).

14. Chen C.-M., Huang H.-W., Lin T.-C., Lin S.-B. *Preparation method of truffle strain liquid and cultivation method of truffle mycorrhizal seedling*. Patent TW, no. TW202038705A; 2020. (In Chinese).

15. Garcia-Barreda S., Marco P., Bonito G., Parladé J., Sánchez S., González V., et al. Interannual dynamics of *Tuber melanosporum* and fungal communities in productive black truffle orchards amended with truffle nests. *FEMS Microbiology Ecology*. 2023;99(8). DOI: 10.1093/femsec/fiad084.

16. Morte A., Arenas F., Marqués-Gálvez J.E., Andriano A., Guarnizo Á.L., Gutiérrez A., et al. Desert truffles (*Terfezia* spp.) breeding. In: Al-Khayri J.M., Jain S.M., Johnson D.V. (eds). *Advances in plant breeding strategies: vegetable crops*. Cham: Springer; 2021, p. 479–504. DOI: 10.1007/978-3-030-66969-0_13.

17. Elliott T.F., Vernes K. Superb Lyrebird *Menura novae-hollandiae* mycophagy, truffles and soil disturbance. *IBIS*. 2019;161(1):198–204. DOI: 10.1111/ibi.12644.

18. Ori F., Menotta M., Leonardi M., Amicucci A., Zambonelli A., Covès H., et al. Effect of slug mycophagy on *Tuber aestivum* spores. *Fungal Biology*. 2021;125(10):796–805. DOI: 10.1016/j.funbio.2021.05.002.

19. Thomas P.W., Thomas H.W. Mycorrhizal fungi and invertebrates: Impacts on *Tuber melanosporum* ascospore dispersal and lifecycle by isopod mycophagy. *Food Webs*. 2022;33:e00260. DOI: 10.1016/j.fooweb.2022.e00260.

20. Mello A., Zampieri E., Zambonelli A. Truffle ecology: genetic diversity, soil interactions and functioning. In: Varma A., Prasad R., Tuteja N. (eds). *Mycorrhiza – function, diversity, state of the art*. Cham: Springer; 2017, p. 231–252. DOI: 10.1007/978-3-319-53064-2_11.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Имидоева Наталья Александровна,
лаборант-исследователь,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
✉ nat.imidoeva@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6327-5517>

Малыгина Екатерина Владимировна,
научный сотрудник,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
cat.malygina@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-2673-0226>

Белышенко Александр Юрьевич,
научный сотрудник,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
al.belyshenko@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8812-2250>

Дмитриева Мария Егоровна,
младший научный сотрудник,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1,
Российская Федерация,
marriee.dmitrieva@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-9229-1954>

Шелковникова Виктория Николаевна,
лаборант-исследователь,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
shelkovnikova551@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4411-7521>

Моргунова Мария Михайловна,
научный сотрудник,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
аспирант,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
marymikhmorg@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7939-1432>

Кулинич София Владимировна,
студент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
kulinich.sophie@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0004-0701-2175>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Natalia A. Imidoeva,
Laboratory Assistant-Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
✉ nat.imidoeva@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6327-5517>

Ekaterina V. Malygina,
Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
cat.malygina@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-2673-0226>

Aleksandr Yu. Belyshenko,
Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
al.belyshenko@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-8812-2250>

Maria E. Dmitrieva,
Junior Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664033,
Russian Federation,
marriee.dmitrieva@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-9229-1954>

Victoria N. Shelkovnikova,
Laboratory Assistant-Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
shelkovnikova551@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4411-7521>

Maria M. Morgunova,
Researcher,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
Postgraduate Student,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
marymikhmorg@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7939-1432>

Sophia V. Kulinich,
Student,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
kulinich.sophie@gmail.com
<https://orcid.org/0009-0004-0701-2175>

Вавилина Татьяна Николаевна,
студент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
t.vavilina03@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0001-9725-9523>

Евстафьев Сергей Николаевич,
д.х.н., профессор, заведующий кафедрой,
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 83,
Российская Федерация,
esn@istu.edu
<https://orcid.org/0000-0002-3681-9478>

Аксёнов-Грибанов Денис Викторович,
к.б.н., доцент,
Иркутский государственный университет,
664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1,
Российская Федерация,
denis.axengri@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2020-6084>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 22.03.2023.
Одобрена после рецензирования 19.11.2023.
Принята к публикации 30.11.2023.

Tatyana N. Vavilina,
Student,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
t.vavilina03@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0001-9725-9523>

Sergei N. Evstaf'ev,
Dr. Sci. (Chemistry), Professor,
Head of the Department,
Irkutsk National Research Technical University,
83, Lermontov St., Irkutsk, 664074,
Russian Federation,
esn@istu.edu
<https://orcid.org/0000-0002-3681-9478>

Denis V. Axenov-Gribanov,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Irkutsk State University,
1, Karl Marx St., Irkutsk, 664003,
Russian Federation,
denis.axengri@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2020-6084>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Information about the article

*The article was submitted 22.03.2023.
Approved after reviewing 19.11.2023.
Accepted for publication 30.11.2023.*