

SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA

GRUPPO DI LAVORO PER LA MICOLOGIA

CONVEGNO

SU

**LA RICERCA MICOLOGICA NELLA
SOCIETÀ BOTANICA ITALIANA, ANNO 2002.
STATO ATTUALE E PROSPETTIVE FUTURE**

Torino
15-16 novembre 2002

PREMESSA

Nei giorni 15-16 novembre 2002 si è svolto a Torino, presso il Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università, un Convegno di Micologia, dal titolo "La ricerca micologica nella Società Botanica Italiana, anno 2002. Stato attuale e prospettive future", organizzato nell'ambito delle attività del Gruppo di Lavoro per la Micologia della S.B.I. In questo numero dell'Informatore Botanico Italiano vengono pubblicati, come lavori *in extenso*, la maggior parte degli interventi, suddivisi nei tre Simposi dai seguenti temi:

- La biodiversità fungina: significato, censimento e conservazione

- I funghi come biosensori nella protezione dell'Ambiente e della Salute
- Caratterizzazione biologica e molecolare di macro- e microfunghi

Su invito, hanno introdotto il primo e terzo Simposio il prof. Walter Gams del CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht) e il prof. Georgios I. Zervakis del National Research Foundation, Institute of Kalamata.

[a cura di V. FILIPELLO MARCHISIO]

1° Simposio

La biodiversità fungina: significato, censimento e conservazione

- W. GAMS. Fungal diversity - relevance, estimates, needed data, projects
G. VENTURELLA. La biodiversità fungina in Sicilia
A. SAITTA, A. BERNICCHIA e G. VENTURELLA. Contributo alla conoscenza dei funghi lignicoli della Sicilia
C. PERINI, E. SALERNI e A. LAGANÀ. Conservazione della biodiversità fungina nell'area mediterranea: l'esperienza senese
E. SAVINO, C. BURATTI, E. SALERNI e C. PERINI. Check-list dei basidiomiceti della Regione Lombardia
A. VIZZINI, V. FILIPELLO MARCHISIO e C.A.M.P.A.L. La Check-list dei basidiomiceti del Piemonte e della Valle d'Aosta: passato e futuro
C. RIPA, L. ZUCCONI e S. ONOFRI. La Banca Dati Micologica Nazionale: strumento base per le strategie di gestione, monitoraggio e conservazione ambientale
A. E. VAUGHAN, P. BUZZINI e A. MARTINI. Una federazione di collezioni di colture microbiche per promuovere l'attività dei centri per risorse microbiologiche italiane
G.C. VARESE, S. VOYRON, A. VIZZINI, A. INGARAMO e V. FILIPELLO MARCHISIO. Conservazione ex situ della biodiversità dei basidiomiceti: problemi metodologici

2° Simposio

I funghi come biosensori nella protezione dell'Ambiente e della Salute

- G.C. VARESE, V. PRIGIONE, A. ANASTASI, L. CASIERI, S. VOYRON e V. FILIPELLO MARCHISIO. L'aerosol fungino negli impianti di compostaggio: rischio per la salute e per l'ambiente
A.M. PICCO e M. RODOLFI. Aerospore fungine in ambienti ospedalieri
V. PRIGIONE, G. LINGUA e V. FILIPELLO MARCHISIO. La citofluorimetria a flusso può risolvere i problemi di misura dell'aerosol fungino?
A.M. PICCO, M. BRUSONI, G. DEL FRATE, M. GUGLIELMINETTI, E. SAVINO, S. TOSI e G. CARETTA. Valutazione della componente microfungina secondo un gradiente di biodiversità lichenica

3° Simposio

Caratterizzazione biologica e molecolare di macro- e microfunghi

- G.I. ZERVAKIS. The necessity to exploit multifaceted approaches for resolving the systematics in *Basidiomycotina*: case studies on edible mushrooms
O. COMANDINI. Un approccio multidisciplinare allo studio della tassonomia del genere *Lactarius* in Europa
L. SELBMANN, S. DE HOOG, A. MAZZAGLIA e S. ONOFRI. Caratterizzazione biologica e molecolare di microfunghi isolati da comunità criptoendolitiche in Antartide
S. FLORIO, F. DE LEO, G. DAMIANI, E. SAVINO e C. URZI. Funghi meristemati isolati da monumenti medievali
M. GIRLANDA, S. GHIGNONE, R. BERGERO, S. PEROTTO e A.M. LUPPI. Caratterizzazione di miceli sterili demaziacei e moniliacei associati a piante a diverso *status* micorrizico in ambiente mediterraneo
A. MELLO, A. CANTISANI, A. VIZZINI e P. BONFANTE. Variabilità in *Tuber uncinatum*: un'analisi molecolare
S. TOSI, G. DEL FRATE, G. CARETTA e G. VIDARI. Funghi predatori di nematodi in Antartide Continentale
P. BUZZINI, A. E. VAUGHAN, B. TURCHETTI e A. MARTINI. La biodiversità dei lieviti isolati da ambienti tropicali: una fonte potenziale di molecole di interesse biotecnologico
A. ANASTASI, G.C. VARESE, S. SCANNERINI e V. FILIPELLO MARCHISIO. Caratterizzazione biologica dei funghi del compost e del vermicompost
A. MONTEMARTINI CORTE, M. ZOTTI e M. DE FERRARI. Funghi di interni implicati in processi di degradazione
M. ZOTTI, G. BARABINO e A. PERSI. Funghi saprotrofi e patologia dermatologica: onicomicosi da *Aspergillus*

Fungal diversity - relevance, estimates, needed data, projects

W. GAMS

ABSTRACT - Fungal diversity usually exceeds that of green plants and many *taxa* are still to be discovered. A few major publications give a very good survey of the situation, particularly the symposium "Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict?" organized by G.M. Mueller & J.P. Schmit at IMC7 in Oslo this summer.

Certain macrofungi and lichenized fungi are very good indicators of environmental quality. Among the macrofungi, mycorrhizal species are more sensitive to adverse effects than are the saprotrophic wood and litter decomposers. Endangered species have been listed in many national red lists. Not only endangered plant species, but also fungi can serve as arguments for the protection of a biotope.

What are high numbers of species? The completeness and coverage of lists rely very much on the capacities of the observer. The inventory of microscopical fungi particularly depends on the method used. The number of species observed in relation to the amount of work done follows a saturation curve, the steepness of which is strongly affected by the method used. Inventories of soil fungi mostly comprise only culturable species, while the endomycorrhizal *Glomerales* are the most important group of non-culturable soil fungi, and the equally abundant *Basidiomycetes* are mainly assessed by observing above-ground fruiting-bodies. The completeness and value of species lists are variable. National checklists serve the more limited purpose of nomenclatural standardization. A more or less standardized fungal nomenclature is an important component of databanks. The CABI-CBS FUNINDEX is a very valuable basis that is accessible on-line and is supposed to cover all published fungal names. Annotated databanks covering all names of particular fungal groups are the most valuable tool in stabilizing fungal nomenclature. The German GLOPP project is an interesting initiative that combines basic scientific organismic research and biodiversity informatics on plant-pathogenic fungi.

How many fungi do exist? Numbers of all kinds of fungi occurring in a particular area are always higher than those of the green plant species. But it cannot be extrapolated from this observation that the proportion plants / fungi would hold on a world scale as suggested by Hawksworth, because the distribution of fungal species is much less regionally constrained than that of green plants. Hawksworth's estimate of some 1,500,000 extant fungal species seems exaggerated. Endophytes in symptomless green plants appeared to be highly diverse and possibly account for numerous still unknown taxa. But also the diversity of this ecological group within the extraordinary diversity of tropical plants is much lower than expected. In no case does the present knowledge seem to encompass less than 25-30% of the extant taxa. An All Taxa Biological Inventory (ATBI) in America is an interesting exercise to show how many fungal species could really be found in a limited area. It seems that the taxa that are most relevant (ecologically, physiologically) have already been described.

Progress in taxonomic knowledge is dramatic thanks to molecular phylogenetic methods. A phylogeny-supported classification is supposed to be robust and to stand the test of time. Numerous cryptic species have been resolved in recent years. The new, NSF-sponsored project AFTOL (Assembling the Fungal Tree of Life) is a fascinating collaborative initiative that will serve to close many gaps in the presently available phylogenetic data, so that an almost ideal classification may soon be reality. Nevertheless, morphological knowledge and understanding of the fungal structures remains crucial and great care must be taken to prevent that taxonomists themselves become an endangered *taxon*.

Key words: biodiversity, checklists

Because of environmental concerns about effects of pollution and global change, everybody now speaks of biodiversity (SOLBRIG *et al.*, 1992). The broad public has become aware of environmental deterioration and threats to all living organisms and their diversity. Biodiversity obviously is of great relevance, also politically. In the general discussions, the diversity of *Fungi* (and other microorganisms) is usually not addressed in an adequate proportion, although they are an essential part of the ecosystems. The bio-

diversity of fungi also is related to the sustainability of agriculture (HAWKSWORTH, 1991b). But those who provide the necessary data and observations, the expert taxonomists and ecologists, are not commensurately promoted and see little recognition of their disciplines.

In a seminal paper, HAWKSWORTH (1991a), estimated the extant fungi to comprise some 1.5 million species, contrasting strongly with the estimate of approximately 80,000 known species (*DICTIONARY*

2001). Thus, at present, only about 5% of the total diversity of species would be known. Hawksworth arrived at this estimate from an extrapolation of the much better known numbers of green plants, which in all parts of the world are lower than those of the fungi by a factor of appr. 6.

A year later, WINTERHOFF (1992) edited a volume *Fungi in Vegetation Science*, in which some authors, mainly Dutch, summarized the role of macromycetes in the vegetation. In this volume I reviewed methods for assessing the diversity of soil fungi.

A symposium, "Where are the missing fungi?", was held in the Asian Mycological Congress in Hong Kong in 2000; the resulting volume was edited by HYDE (2001).

At IMC7 in Oslo this summer, a symposium was organized by Greg Mueller: "Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict?" in which authors tried to estimate numbers of known and expected fungal species in different biotopes and areas. I was invited to speak about the diversity of soil fungi.

In August this year, a book edited by SIVASITHAMPARAM *et al.* (2002): *Microorganisms in Plant Conservation and biodiversity* appeared, in which I was invited to deal with the preservation of microbial diversity *ex situ*, while most other authors were concerned with microorganisms in plant conservation (particularly pathogens, mycorrhiza and nitrogen fixation).

Dutch mycologists are very active in inventorying macromycetes and probably have progressed farthest in this kind of documentation (works by ARNOLDS, KUYPER, NAUTA and VELLINGA).

We have learned that many lichens and macrofungi are excellent indicators of environmental quality. Their numbers (numbers of species and individuals) strongly decline in polluted areas. Among the macrofungi, mycorrhizal species are much more sensitive to adverse effects than the saprotrophic wood and litter decomposers. A decline in mycorrhizal species is particularly indicative of adverse conditions for tree growth. The existence of some macromycete species (red list species) is threatened, at least locally. The populations involved can be saved by protecting the biotope (much more important than preventing mushroom picking) and, what is often much more important, by eliminating harmful emissions from traffic, power plants, and other industrial sources, and also by reducing the use of pesticides and mineral fertilizers. Plant pathogens and their antagonists are also variously affected by industrial emissions. Thus the comparison of species inventories in polluted and unpolluted habitats, or among different decades characterized by different degrees of pollution, provides very valuable information about these effects.

High numbers of fungi — a good environment?

What are high numbers? How many species live in a particular biotope? Such numbers very much depend on the capacities of the observer and the intensity of

work. For macromycetes regularly repeated, accurate assessments over several years are required to get a reasonably complete picture of the occurrence of fruiting-bodies, but molecular data have informed us recently that many more species can be involved in ectomycorrhiza formation than the number of species we observe fruiting above the ground.

In studies of microscopical fungi, the method used strongly determines the outcome. For example, when isolating fungi from a soil, we usually isolate richly sporulating and more or less fast-growing *taxa*, and particularly *Basidiomycetes* are underrepresented. We obtain a saturation (rarefaction) curve that continues to increase for a very long time. Its shape depends on the method used and the amount of work invested. Even after 20,000 or more isolates are identified, complete saturation is never achieved.

What is the value of a list of species? As indicated in the preceding paragraph, the completeness of species lists is quite variable. It is often difficult to get lists of fungi that have been observed in a particular biotope published in a journal, especially when these lists originate from a single observation event. But the recording in itself, especially when repeated over the years, is of tremendous value. This is a question of databanking. In countries like England and the Netherlands (ARNOLDS *et al.*, 1995), much progress has been achieved in this direction, and distribution maps of particular species can be generated at any moment when required (NAUTA, VELLINGA, 1995). International harmonization of the acquisition and storage of these data is of great importance to simplify the procedures and to render the work efficient. (Partial or complete) *national checklists* have a somewhat different scope. They simply serve as documentation of everything that has ever been observed, along with the current correct nomenclature for these *taxa*. Checklists have been or are being produced in several countries, such as England, the Netherlands, Germany, and Italy. In the Netherlands, a critical approach has been adopted (ARNOLDS *et al.*, 1995), giving for each *taxon* an assessment of the nomenclature (incl. synonymies), an interpretation of the application of the name, differential morphological criteria, details of biotopes and distribution. This voluminous work is arbitrarily confined to macromycetes (*Asco-* and *Basidiomycetes* with fruitbodies of at least 1 mm size). In Germany a much less critical list of all fungi has been compiled but it has never been made public. An interesting project has, however, been undertaken for various groups of phytopathogenic fungi, for which all possible aspects, including nomenclature, morphology, and pathogenicity, have been recorded, and documentation is given of relevant specimens and literature. This information is compiled in ACCESS structures in the GLOPP project (2000-2003) by HAGEDORN, BRAUN, TRIEBEL and others (Global Information System for the Biodiversity of Plant Pathogenic Fungi). This initiative combines basic scientific organismic research and biodiversity infor-

matics on plant-pathogenic fungi; so far downy and powdery mildews, smuts and rusts have been covered. It will contain application components like Diversity descriptions (DeltaAccess version 1.7), Diversity References, Diversity collection, Diversity taxonomy and Diversity identify, together with support modules like Diversity users, Div. gazetteer, Div. resources, Div. exsiccata. Questions can be answered like: "Find all parasites that belong to imperfect fungi, have been found on *Rhododendron* in Germany, and have oblong, aseptate spores, 4-10 µm large". The national restriction of such enterprises would entail a great deal of overlap between countries, but the international harmonization of efforts will greatly facilitate the work.

A stable *fungal nomenclature* is desirable for comparable inventories, but it is often not achieved; nomenclators (lists of recognized names and their synonyms) are important components of databanks. An indispensable tool is the CABI-CBS databank FUNINDEX, in which all names ever introduced are listed, or rather are supposed to be listed, with protologue citations and synonyms. To really achieve this objective, much further work is required, but an initial version is accessible on-line, free of charge. Complete lists of names for particular fungal groups are gradually developing. Good examples are those for species of *Penicillium* and *Aspergillus* and their synonyms (PITT *et al.*, 2000). Complete annotated databases, which give the status of each name, with typification and synonymy, will be the most valuable basis for stabilizing the nomenclature. In the case of *Penicillium* and *Aspergillus*, the relevant experts have shown a beautiful collaboration worldwide. One hopes that many more such databases will soon evolve. Stabilization of nomenclature is a strongly felt problem. The rules of the *International Code of Botanical Nomenclature* (typification, priority of little-known names) have often not been sufficiently adhered to so far, and many name changes would become necessary for strictly nomenclatural reasons (unless prevented by conservation). Other name changes due to real taxonomical progress (often thanks to molecular work) will be unavoidable in any case. To prevent name changes for nomenclatural reasons, establishing a rule that listed names in current use should be protected, at least for common species, was attempted. This approach has failed in international botanical debates and one of the reasons for this is the incompleteness of the lists of *taxa* involved. But complete databases, in which the status of each name is adequately evaluated, will undoubtedly have the desired stabilizing effect, whether the names are sanctioned by the *Code* or not, and will prevent the resurrection of old names that are associated with poor descriptions and are now of doubtful application. The resurrection of such names (at least when they are little-known) by neotypification is bad mycological practice.

Red lists of endangered macromycetes have been published in several countries. Different degrees of rarity and threat are indicated. Habitats where many

red-listed species occur can then be designated as worth protecting. You will hear more about this from other speakers this morning.

How many fungi do exist? Estimates of numbers of extant species

The 2001 edition of the *Dictionary* (KIRK *et al.*, 2001) gives an estimate of some 80,000 recognized named species, about 8,000 more than are recognized in the 1995 edition, but an annual increase of about 225 "good" species is estimated. As mentioned above, HAWKSWORTH (1991a) estimated 1.5 million extant species, taking the proportion *Fungi*: plants as 6:1, an estimate that seems to me (and others) to be too high. In other words, *fide* Hawksworth, at present around 5% of the extant species would be known.

How relevant is this debate to mycological research and the mycological characterization of biotopes? My heretical opinion is that this rather academic way of debating is of limited relevance, but the debates are nonetheless ongoing and therefore the problem they pose requires some consideration here. In the aforementioned Asian conference and the Oslo symposium, it became clear that all such estimates are highly speculative. Hawksworth and other authors still defend the (putatively conservative) estimate of 1.5 million species, while ROSSMAN (1994) predicted about 1 million.

Hawksworth's initial estimate was based on the obviously correct observation that the numbers of all kinds of fungi occurring in a particular area were always higher than those of the green plant species. An error in extrapolation occurred, however, in supposing that, on a worldwide scale, the distribution of green plants and that of fungi would be subjected to similar regional restrictions. Fungi generally have, however, much wider distributions than plants do, and they are often even cosmopolitan. It is true that continental barriers often limit distribution more strongly for macromycetes than for micromycetes. Nonetheless, it seems questionable that the discrepancy between fungal and plant numbers observed in local areas should hold on a world scale.

It is obvious that many fungal species are still unknown. Two major causes may account for this:

- a) increasing numbers of cryptic species are being recognized in molecular studies, and
- b) search in little-studied regions on little-studied substrata yields many new *taxa*.

In the Asian Fungal diversity symposium (HYDE, 2001), authors tried to discern biotopes and regions where the "missing fungi" might be found. HAWKSWORTH (1991a) collected arguments to support his estimate. Whatever the estimate should be, it is clear that studies in previously poorly studied countries and on unusual hosts are likely to yield many unknowns. Significant increases are expected in unusual ecological groups, such as bryophilic fungi or entomogenous *Laboulbeniales*. It is not surprising that on endemic plants on remote islands

such as Mauritius relatively many new species have been found, particularly on *Pandanus* (DULYMAMODE *et al.*, in HYDE, 2001); even on this island, among 200 *taxa* identified, only 38 truly new species were detected, i.e. less than 20% of the total number evaluated.

The distinction of **cryptic species** strongly increases the number of species to be distinguished. What is cryptic? Can they really not be distinguished morphologically? What is to be adopted, the biological species concept *s.l.* or OSU (the Operative Specific Unit of BRASIER, 1997)?

In view of accumulating knowledge on certain fungal groups, experts have given estimates of the percentages expected for new findings. For macromycetes totals of 53,000-65,000 or 85,000-110,000, depending on the plant / macrofungus ratio for temperate/boreal regions (either 2:1 for both or 2:1/5:1) (MUELLER, Oslo 2002). In Hawaii, among 643 known macromycete species, 99 are endemic and an expected 40% are still unknown (from DESJARDIN and HEMMES). In the *Corticaceae* worldwide, 64% of species are expected to be unknown (an average of 17.6% of the known species is endemic to different regions) (from LARSON and HJORTSTAM). In hypogeous fungi 75% are expected to be unknown (57% of the known ones being endemic species) (from TRAPPE).

An interesting approach is the **All Taxa Biological Inventory (ATBI)** undertaken mainly by American workers (ROSSMAN, 1994; ROSSMAN *et al.*, 1998). Initially it was planned to carry out the project in Costa Rica, but then it was transferred to the Smoky Mountains for political reasons. Numerous experts on different fungal groups collaborate in this kind of inventory, so that for a restricted area a potentially large number of species becomes known. Instructions how to carry out such inventories have been compiled by experts in a forthcoming book on methods of assessing fungal diversity (MUELLER *et al.*, eds.) to be published by Chicago University Press. As a preliminary result, ROSSMAN (1994) estimated 56,800 spp. for the USA and, based on the ATBI, for the tropical site in Costa Rica, 39,600 spp. in the area surveyed.

Diversities observed for different ecological groups

Host specificity is an important criterion for distinguishing *taxa*, but its importance has often been overestimated. A high degree of host specificity among fungal *taxa* would be a strong argument for the existence of large numbers of species, but very often the specificity is much lower than has been anticipated, and therefore numbers of *taxa* have often been overestimated. J.A. VON ARX was proud of having synonymized some 600 species with the single species *Colletotrichum gloeosporioides*, but it is now recognized that this number of synonyms was exaggerated and some additional valid species have been identified within this complex. Host specificity (ZHOU and HYDE, in HYDE, 2001) would speak of

host-exclusivity, because the relation not exactly proven), is observed in pathogens (particularly biotrophic ones), (ecto-) mycorrhizal fungi, endophytes, but not in saprobic species. "Host-recurrence", a concept introduced by these authors and defined as relatively frequent occurrence on a particular host, is the same as host preference!

Plant pathogens. Biotrophic pathogens show much higher host specificity than is shown by necrotrophic ones. But even so specificity does not usually go beyond the level of plant genus or family.

Mycorrhizal fungi. Compared with the ca. 150 species of mostly unspecific arbuscular endophytes, the thousands of ectomycorrhizal symbionts will allow a much higher level of host specificity. It is well-known that certain fungi are genus-specific, and some have even been shown to distinguish among subgenera of *Pinus*. Ectomycorrhizal fungi are among the most limited in their extension, and continental barriers very often limit their ranges efficiently. The numbers of species in this group do exceed those of green plants, at least in our latitudes, but not because of host specificity. Our understanding of these matters is adequate because the taxonomy of these fungi is relatively well studied.

Endophytes. The regular occurrence of endophytes in asymptomatic green plants is a relatively recent discovery, and a great diversity of such fungi could be expected, supposing that these endophytes were reasonably host-specific (PETRINI, 1996); specificity is particularly evident for the co-evolved *Epichloë*-related grass endophytes. But for woody plants, research by CANNON *et al.* (2002) in tropical countries has shown that the host specificity of endophytic fungi is much lower than anticipated and their diversity is even rather low. In the distinction between establishment specificity (latent infection, to be assessed with several indirect methods) and expression specificity (i.e., subsequent fruiting on the host surface, PETRINI, 1996), the amplitude of the latter is seen to be much narrower than that of the former and this may suggest that the latter has a relatively high degree of specificity.

Lichenized fungi. Among lichenized *taxa*, some 4,000 spp. are estimated to be missing (vs. 14,000 known); these new *taxa* may be found anywhere, but predominantly in primary tropical forests. In W. Europe, an increase in the number of known species is expected only through unravelling of cryptic species (SIPMAN and APTROOT in HYDE, 2001).

Saprotrophs. Saprobies are generally not host-specific, except for some groups on unusual substrata, such as palms or *Pandanus* (DULYMAMODE *et al.*, in HYDE, 2001). The highest diversity of freshwater fungi is found in subtropical streams. 150 new species were recently described from Hong Kong, mainly from moist habitats; this constituted a 4-fold increase in relation to what had previously been known (HYDE, 2001). This finding illustrates the impact of intensified research in such areas on diversity data.

Litter-decomposing *Ascomycetes* (including anamorphs) are obviously one of the major sources of

missing *taxa*. New *taxa* are frequently published, particularly from (sub-)tropical countries, an area that is expected in any event to yield most of the unknowns. But to our surprise, we recently learned that some newly described species from one side of the globe, near the equator, also occur at the antipodes (data from Cuba and Japan).

Biodiversity of soil-inhabiting fungi (excluding *Basidiomycetes* and zoosporic fungi) (GAMS, Oslo 2002). Soil fungi affect the wellbeing of plants, often as antagonists of pathogens, but also as producers of chemical products or as tools used in biotechnological applications (BILLS, 1995). Results of biodiversity studies are very much determined by the methods used and the amount of work invested (GAMS, 1992). Efficient, rapid techniques for isolation are desirable, but a single medium is usually not sufficient to obtain the major part of the diversity present. A major problem to ecologists is the distinction between active and dormant microorganisms in the soil. Some 25 years ago, K.H. Domsch and I compiled ecological data on some 400 common soil fungi for the *Compendium of soil fungi*, based on their supposedly rather cosmopolitan distribution. In my more recent estimate (GAMS in Oslo 2002), consideration was confined to culturable filamentous fungi living in soil layers (excluding the much more varied litter layer), with the exclusion of basidiomycete macromycetes, zoosporic fungi, and the approximately 150 species of endomycorrhizal *Glomerales* known worldwide. Some 200 species can commonly be isolated from a rich agricultural soil. Thus, published numbers and lists of species will need a critical assessment, and absolute figures that have been obtained by different observers in different areas are probably not comparable. Bills *et al.* (2003), in the most recent compilation, gave maxima of more than 200 species in a single soil, when some 20,000 isolates were obtained (highest numbers were reported for deserts of N. Arizona and S. Utah and in Northern Upland conifer-hardwood forests of Wisconsin). The same authors calculate a "theoretical minimum" of 1,400-1,800 culturable species occurring in 15 tropical vegetation types of Costa Rica (including litter fungi), after finding 183-450 species per vegetation type and assuming that 57.5% of the species would be unique to each plot when two adjacent vegetation types were compared. But they ignore the fact that with each additional plot examined this percentage will drastically decline.

The Centraalbureau voor Schimmelcultures in Utrecht (CBS, ANONYMOUS, 2001) preserves a great diversity of soil fungi. The CBS database presently contains 5,768 isolates originating from soil or roots, distributed over appr. 2,430 species. From these 2,430 species we subtract 131 species of zoosporic fungi and 89 macromycete basidiomycetes, thus obtaining 2,210 species. This number may account for about 70 % of the known species available in culture. Thus we expect some 3,150 spp. of described soil fungi. Adding another ca. 150 spp. of arbuscular

symbionts in the *Glomerales*, we arrive at 3,300 estimated species of soil fungi presently known. The annual increment in the numbers of described soil fungi has only slightly accelerated due to refined molecular differentiation (distinction of cryptic species). In the years 1991-1996, 114 (incl. 6 *Oomycetes*) new species records were entered in the CBS database for soil fungi. In the years 1997-2002, 108 new species (incl. 12 *Oomycetes*) were added, i.e., ca. 20 species per year.

Most soil fungi spread easily and are regarded as cosmopolitan. Even in tropical forests, many *taxa* are similar to those found in temperate latitudes and the numbers of species for a particular soil are normally not higher or even lower than those observed in temperate regions (PFENNING in HYDE, 1997; BETTUCCI, ROQUEBERT, 1995). Molecular studies tell us, however, that continental barriers exist determining a phylogeographical differentiation for slimy-spored species (*Fusarium*, *Trichoderma* etc.). Clearly defined species have narrower distributions than has hitherto been supposed.

In the genera *Fusarium* and *Trichoderma* taxonomic knowledge is rapidly increasing and the numbers of species have increased considerably. In *Fusarium* (the CBS database now contains 138 *taxa*), many new species have recently been described. In *Trichoderma/Hypocrea* a similar strong increase has been noticed; the present number of appr. 40 species is likely to triple with the intensive molecular research going on (SAMUELS *et al.*, 1998). In the even more ubiquitous genera *Penicillium* and *Aspergillus* (now ca. 300 and 200 spp. known, respectively), R.A. SAMSON and J.C. FRISVAD (pers. comm.) expect that at least 50% of the extant species have been described.

The phenomenon of cryptic species, i.e., morphologically little-differentiated and so far overlooked species discovered thanks to molecular work, is probably a major factor contributing to increased numbers of species in these genera.

Will **direct molecular inventories** drastically increase the numbers of soil fungi as they did with mycorrhizal fungi? DGGE and TGGE are elegant techniques to monitor the diversity in fungal DNA present in a soil. In none of the recent studies using these methods, however, have the above numbers of species been reached or exceeded. This may be due to the fact that the 18S sequences used so far do not sharply distinguish between closely related species. The method will become particularly relevant when the diversity of RNA is assessed, possibly with some quantification, to determine the proportion of fungi that are really active in a soil.

For any group of fungi, sampling in remote areas, particularly near the centres of the evolution of particular fungal groups, is promising for rapidly increasing the number of known species. The same promise applies to studies on unusual habitats for soil fungi, e.g., the nests of terrestrial animals.

In no case does the present knowledge seem to cover less than 25-30% of extant *taxa*, an estimate that

represents a considerably more hopeful picture than that sketched by HAWKSWORTH. Still, at the present rate of appr. 225 new *taxa* described per year (*Dictionary*) including about 100 lichenized fungi (SIPMAN and APTROOT in HYDE, 2001), about another 480 years may be necessary to describe the missing 60-70% of species (for lichens perhaps only 40?), if work continues at the present rate.

And what is the consequence if many species are not described? How relevant are the unknowns? The most discomfoting aspect is of course the rapid destruction of so far little explored tropical biotopes (HYDE, 1997), particularly rain forests, where many of the unknowns are likely to become extinct before they have ever been named. You can never tell a priori whether a new *taxon* will eventually turn out to be valuable to mankind. But on the other hand, it is likely that most of the common and really relevant *taxa* have already been named and described. Relevance to humans is a criterion that strongly affects the choice of research projects to be undertaken and herewith the chance that new *taxa* will be described. This criterion very often dictates intensified study of already rather well-known fungal groups or biotopes rather than a move to little explored niches that can be expected to be richest in taxonomic novelty.

Ongoing projects, scopes and needs

Biologists enjoy the beauty of high biodiversity in any group of organisms they encounter in a natural habitat. Lichens and macromycetes are particularly attractive to the naturally curious observer in that their diversity pleases the eye. To bring this curiosity to scientific fruition, local inventories, checklists, databanks and red data lists can be made as has been mentioned. Such work, continued over many years, is important in view of the observed decline in species diversity as a result of environmental deterioration and pollution. Strengthening it by combining it with the best databasing techniques is desirable. A particularly important aspect is that voucher material should be deposited in herbaria and, likewise, pure cultures in culture collections; these are indispensable sources of documentation (HAWKSWORTH and MOUND, in HAWKSWORTH, 1991b). Molecular work already profits from such material in view of rapid genetic changes that may occur in natural populations of pathogens. The importance of herbaria and culture collections as depositories of material and taxonomic research centres cannot be emphasized enough.

Protection of fungal diversity is achieved by biotope protection and also by enforced reduction of emissions, much more than by regulation and limitation of mushroom picking. In many cases, a remission or even a reversal of the decline in biodiversity may be noted to have arisen as a consequence of reduced emissions and renaturation (e.g., also litter removal). It is amazing how quickly fungal species that had long been absent can recover from decline, as if they

had found hidden niches where they could survive adverse conditions for decades. While a final extinction is often observed with plants or animals, a long environmental absence for fungi need not be taken as final, and survival of the threatened species is often possible, at least in separate areas.

In the first instance, the knowledge of *taxa* "relevant to mankind" is important: these relevant *taxa* include those with pathogenic roles, as well as antagonists of pathogens or insects, but also, simply, rare *taxa* that are indicative of valuable biotopes. Rarity of certain species may vary from one country to the other, but genera like *Ramaria* or *Hydnellum*, are generally indicators of interesting forest locations, while diverse species of *Hygrocybe* indicate valuable grasslands.

What exactly is needed to monitor the health of an environment and to preserve its health? Extended inventories of macromycetes and lichens are valuable to monitor deleterious environmental effects and for this reason deserve our full support. A high diversity of macromycetes in a biotope documents its biological value, demonstrating that it deserves protection. For such biotopes, a **management plan** will have to be developed based on inventories of fungi and an assessment of the impact of external factors on their occurrence. Then specific measures can be taken to maintain or increase this value, such as regulation of the groundwater table, allowing the free movement of dune-building sand, mowing or grazing the herbaceous vegetation, fertilizing or liming of soils, avoiding removal of debris and dead wood, but, on the other hand, allowing necessary interventions such as removal of the litter layer, weeding certain plants, and controlled burning (KUYPER, 1994).

A high diversity of microorganisms is likely to prevent the mass multiplication of pathogens, but the presence of specific antagonists is even more important and may possibly be artificially improved by biological control measures. A high diversity of species in a soil can be protected by regulating practices in forestry or agriculture, particularly by mandating a reduced application of fertilizers and pesticides. Under such conditions it is likely that a high antiphytopathogenic potential of such soils can develop. For arbuscular endophytes of the *Glomerales* a protective role has already been demonstrated and their importance to plant growth has only recently been fully appreciated (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1998).

Who is to do the work?

At present it is common that the numbers of available amateurs are higher than those of professionals, and these amateurs are often better qualified for field work than are the professionally trained biologists. A good taxonomic knowledge is indispensable and all those participating in this work must carefully watch developments in taxonomy. The progress in taxonomy is enormous thanks to molecular methods, but far too few experts are available to do the necessary

work. The beginning project AFTOL (Assembling the Fungal Tree of Life), sponsored by the National Science Foundation, is to be a fascinating collaborative initiative that will serve to close important gaps in the available molecular data, so that a robust, phylogeny-based system of the Fungi can be reconstructed. Information systems that are coming up at high speed will facilitate the identification work but cannot compensate for the increasing shortage of competent personnel.

Universities should develop much more activity in training mycologists using both morphological criteria (a life-long learning process!) and molecular methods. Molecular taxonomy has brought about extraordinary progress in the phylogenetic overview of the fungi, but morphological recognition of the individual *taxa*, often in accordance with a modernized concept, remains indispensable. Understanding morphology is the basis for understanding the function of a fungus. It is by no means of secondary importance now that molecular identification methods become available. It is no exaggeration to say that taxonomists are also becoming an endangered *taxon*. "If the biodiversity of this planet is to have a future, then it is essential that we significantly enhance our knowledge, in breadth as well as in depth, of the organisms around us" (HAWKSWORTH and MOUND in HAWKSWORTH, 1991b). Students should be alerted to this need and made aware of the beauty of fungal morphology.

REFERENCES

- ANON., 2001 - *List of Cultures: Fungi (filamentous fungi and yeasts), bacteria, plasmids, phages*. 35 ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures (Fungal Biodiversity Center). 687 pp.
- ARNOLDS E.J.M. (ed.), 1985 - *Veranderingen in de paddestoelenflora (mycoflora)*. Wetenschappelijke Mededelingen K.N.N.V., 167. 101 pp.
- ARNOLDS E.J.M., KUYPER TH.W., NOORDELOOS, M.E. (eds.), 1995 - *Overzicht van de paddestoelen in Nederland*. Nederlandse Mycologische Vereniging, Wijster. 872 pp.
- BETTUCCI L., ROQUEBERT M.-F., 1995 - *Microfungi from a tropical rain forest litter and soil*. Nova Hedwigia, 61: 111-118.
- BILLS G.F., 1995 - *Analyses of microfungial diversity from a user's perspective*. Can. J. Bot., 73 (Suppl. 1): S33-S41.
- BILLS G., CHRISTENSEN M., POWELL M.J., THORN G., 2003 - *Saprobic soil fungi*. In: MÜLLER G. et Al. (eds.), *Measuring and monitoring biological diversity: Standard methods for Fungi*. Chicago Univ. Press, Chicago.
- BRASIER C. M., 1997 - *Fungal species in practice: identifying species units in fungi*. In: CLARIDGE M.F. et Al. (eds.), *Species, the units of biodiversity*: 135-170. Chapman & Hall, London.
- CANNON P.F., SIMMONS, C.M., 2002 - *Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guayana*. Mycologia, 94: 210-220.
- DOMSCH K.H., GAMS W., ANDERSON T.-H., 1980 - *Compendium of soil fungi*. Academic Press, London (reprint Eching 1993), 859 + 405 pp (+ 23 pp. suppl).
- GAMS W., 1992 - *The analysis of communities of saprophytic microfungi with special reference to soil fungi*. In: WINTERHOFF W. (ed.), *Fungi in Vegetation Science*: 182-223. Dordrecht, Kluwer.
- HAWKSWORTH D.L., 1991a - *The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation*. Mycol. Res., 95: 641-655.
- , 1991b - *The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture*. CASAFA Report Series, 4. CAB International, Wallingford. 302 pp.
- HEIJDEN M. G. A. VAN DER, KLIRONOMOS J. N., URSIC M., MOUTOGLIS P., STREITWOLF-ENGEL R., BOLLER T., WIEMKEN A., SANDERS I. R., 1998 - *Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity*. Nature, 396: 69-72.
- HYDE K.D. (ed.), 1997 - *Biodiversity of tropical microfungi*. Hong Kong Univ. Press. 421 pp.
- , 2001 - "Where are the missing fungi?" Mycol. Res., 105 (12): 1422-1518.
- KIRK P. M., P. F. CANNON, J. C. DAVID, J. A. STALPERS (eds.), 2001 - *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi, 9th Edition*. CAB International, Wallingford, Oxon. 655 pp.
- KUYPER TH. W. (ed.), 1994 - *Paddestoelen en natuurbeheer*. Wetenschappelijke Mededelingen K.N.N.V., 212. 100 pp.
- MUELLER G.M., SCHMIT J.P. (eds.), 2002 - *Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict?* Symposium in IMC7, Oslo (to be published).
- NAUTA M.M., VELLINGA E.C. (eds.), 1995 - *Atlas van Nederlandse paddestoelen*. A.A. Balkema, Rotterdam. 352 pp.
- O'DONNELL K., CIGELNIK E., NIRENBERG H.I., 1998 - *Molecular systematics and phylogeography of the Gibberella fujikuroi species complex of Fusarium*. Mycologia, 90: 465-493.
- PETRINI O., 1996 - *Ecological and physiological aspects of host-specificity in endophytic fungi*. In: REDLIN S.C., CARRIS L.M. (eds.), *Endophytic fungi in grasses and woody plants*: 87-100. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- PITT J.I., SAMSON R.A., FRISVAD J.C., 2000 - *List of accepted species and their synonyms in the family Trichodomaceae*. In: SAMSON R.A., PITT J.I. (eds.), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*: 9-49. Harwood, Amsterdam.
- ROSSMAN A.Y., 1994 - *A strategy for an all-taxa inventory of fungal diversity*. In: PENG C.-I., CHEN C.H. (eds.), *Biodiversity and terrestrial ecosystems*. 169-194. Inst. Bot., Academia Sinica, Taipei.
- ROSSMAN A.Y., TULLOSS R.E., O'DELL T.E., THORN R.G., 1998 - *Protocols for an All Taxa Biodiversity Inventory of fungi in a Costa Rican conservation area*. Parkway Publishers, Boone, N.C. 195 pp.
- SAMUELS G.J., PETRINI O., KUHL S., LIECKFELDT E., KUBICEK, C.P., 1998 - *The Hypocrea schweinitzii complex and Trichoderma sect. Longibrachiatum*. Stud. Mycol., 41: 1-54.
- SIVASITHAMPARAM K., DIXON K.W., BARRETT R.L. (eds.), 2002 - *Microorganisms in Plant Conservation and biodiversity*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. 378 pp.
- SOLBRIG O.T., VAN EMDEN H.M., VAN OORDT, P.G.W.J. (eds.), 1992 - *Biodiversity and global change*. IUBS Monogr., 8: 224 pp. Paris.
- WINTERHOFF W. (ed.), 1992 - *Fungi in Vegetation Science*. Kluwer, Dordrecht. 258 pp.
- RIASSUNTO - *La diversità dei funghi - importanza, stime, dati mancanti, programmi* - La diversità dei funghi

supera quella delle piante verdi e molti taxa devono ancora essere scoperti. Alcune importanti pubblicazioni offrono un quadro molto esauriente della situazione, in particolare il simposio "Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict?", organizzato questa estate da G.M. Mueller & J.P. Schmitt in occasione dell' IMC7 di Oslo.

Alcuni macrofunghi e funghi lichenizzati sono eccellenti indicatori di qualità dell'ambiente. Tra i macrofunghi, le specie micorriziche sono più sensibili agli effetti avversi rispetto a quelle saprotrofe, attive nella decomposizione del legno e della lettiera. Le specie minacciate sono state elencate in molte red lists nazionali. Anche i funghi in pericolo di estinzione, come le piante verdi, possono servire come argomenti per la protezione di un biotopo.

Quale è il numero di specie? La completezza e il grado di copertura delle liste risente molto delle capacità dell'osservatore. L'inventario dei funghi microscopici dipende soprattutto dal metodo usato. Il numero di specie osservate, in relazione alla quantità di lavoro fatto, segue una curva di saturazione la cui pendenza è fortemente influenzata dal metodo usato. Gli inventari dei funghi del suolo, nella maggior parte dei casi, comprendono soltanto le specie coltivabili e le endomicorriziche *Glomerales* sono il gruppo più importante di funghi del suolo non coltivabili; d'altra parte i basidiomiceti, ugualmente importanti, sono valutati soprattutto sulla base dell'osservazione dei corpi fruttiferi epigei. La completezza e il valore delle liste è variabile. Le checklists nazionali servono al proposito più limitato della standardizzazione nomenclaturale. Una nomenclatura fungina più o meno standardizzata è un'importante componente delle banche-dati. CABI-CBS FUNINDEX è una base molto preziosa, accessibile on line, che probabilmente copre tutti i nomi di funghi pubblicati. Le banche-dati che coprono tutti i nomi di particolari gruppi fungini sono i più preziosi mezzi per ottenere la stabilizzazione della nomenclatura fungina. Il progetto tedesco GLOPP è un'interessante iniziativa che combina la

ricerca scientifica di base sugli organismi e l'informatizzazione della biodiversità dei funghi fitopatogeni.

Quante specie di funghi esistono veramente? Il numero di funghi di una determinata area è sempre maggiore di quello delle piante verdi. Tuttavia da questa osservazione non si può estrapolare che il rapporto piante/funghi possa essere valido anche su scala mondiale come sostenuto da Hawksworth, perché la distribuzione delle specie fungine è molto meno vincolata regionalmente rispetto a quella delle piante verdi; la stima di Hawksworth di 1.500.000 specie esistenti sembra esagerata. Gli endofiti di piante verdi prive di sintomi sembravano essere molto diversi e probabilmente comprendono numerosi taxa ancora sconosciuti. Ma anche la diversità di questo gruppo ecologico, in confronto alla straordinaria diversità delle piante tropicali, è molto più bassa del previsto. In nessun caso lo stato attuale delle conoscenze sembra comprendere meno del 25-30% dei taxa esistenti. Un inventario biologico di tutti i taxa (ATBI) in America è un interessante esercizio per dimostrare quante specie fungine potrebbero realmente essere trovate in un'area limitata. C'è da ritenere che i taxa che sono più rilevanti (ecologicamente e fisiologicamente) siano già stati descritti.

Il progresso nelle conoscenze tassonomiche è merito dei metodi molecolari filogenetici. Si ritiene che una classificazione filogenetica sia ben fondata e stabile nel tempo. Numerose specie criptiche sono state risolte negli anni recenti. Il nuovo progetto AFTOL (Assembling the Fungal Tree of Life), sponsorizzato dal NSF, è una interessante iniziativa in collaborazione che servirà a colmare molte lacune nei dati filogenetici attualmente disponibili, affinché una classificazione quasi ideale possa presto essere realtà. Cionondimeno la conoscenza della morfologia e la comprensione delle strutture fungine rimane cruciale e grande attenzione deve essere dedicata al fine di impedire che i tassonomi stessi diventino un taxon a rischio di estinzione.

AUTHOR

Walter Gams, Centraalbureau voor Schimmelcultures, P.O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, the Netherlands

La biodiversità fungina in Sicilia

G. VENTURELLA

ABSTRACT - *Fungal biodiversity in Sicily* – The assessment of fungal biodiversity in Sicily is still in progress. On the basis of literature and field data the author reports the number of fungi for each investigated ecosystem in the Sicilian territory. The author also takes into consideration the presence of rare species and the bioprospecting actions recently carried out on *Pleurotus* growing on Umbelliferous plants and *Daldinia concentrica* "species complex".

Key words: bioprospecting, fungal biodiversity, Sicily

INTRODUZIONE

Sin da tempo remoto il territorio siciliano ha offerto ai naturalisti "un campo vasto di osservazioni e scoperte" (RAFINESQUE SCHMALTZ, 1810) e le ricerche effettuate da vari studiosi italiani e stranieri hanno messo in evidenza un alto livello di diversità nell'ambito dei differenti ecosistemi che caratterizzano l'Isola.

Per alcuni naturalisti e botanici, che esplorarono la Sicilia tra la fine del 1600 e l'inizio del secolo XIX, i funghi rappresentarono un gruppo di organismi da osservare con interesse per la molteplicità di forme e colori. Brevi elenchi di funghi sono riportati in appendice alle monografie pubblicate da BOCCONE (1674), CUPANI (1696-1697) e BERNARDINO DA UCRIA (1789). A questi autori va comunque riconosciuto il merito di avere fornito, oltre alle prime sommarie descrizioni dei caratteri morfologici di alcune entità fungine, anche delle informazioni di carattere etnomicologico sui nomi dialettali e sugli usi medicinali in uso nelle varie contrade della Sicilia (BERNARDINO DA UCRIA, 1789).

I contributi più significativi alla conoscenza della biodiversità fungina in Sicilia, con particolare riferimento ai funghi macroscopici (*sensu* ARNOLDS, 1981), sono quelli pubblicati da Giuseppe Inzenga, agronomo e direttore dell'Istituto Agrario Castelnuovo di Palermo, e da Francesco Minà Palumbo, medico-naturalista di Castelbuono, comune della provincia di Palermo ricadente all'interno del Parco delle Madonie.

Giuseppe Inzenga nella seconda metà dell'800 pubblica due Centurie sui funghi siciliani (INZENGA, 1865-1869) nelle quali sono contenute duecento descrizioni di funghi macroscopici e 18 tavole a colori ed in bianco e nero in cui sono complessivamente

raffigurati 37 taxa (VENTURELLA, 1999).

Con il recente ritrovamento di tutti i disegni dei funghi che Inzenga non riuscì a pubblicare nelle Centurie per carenza di fondi, si rende oggi disponibile un patrimonio sommerso di informazioni dai più ritenuto inesistente o irrimediabilmente perduto (VENTURELLA, 2001).

Ai materiali di studio di Inzenga si è fatto riferimento per l'avvio degli studi sulla caratterizzazione tassonomica, ecologica e distributiva dei pleuroti delle ombrellifere e per ricerche di carattere applicativo su alcune varietà che fruttificano sui residui radicali di piante dei generi *Eryngium* L., *Ferula* Gaertner, *Elaeoselinum* Koch., *Cachrys* L. e *Thapsia* L. (ZERVAKIS, VENTURELLA, 2002).

Il ritrovamento dei materiali di studio e dei disegni inediti di Inzenga consente inoltre di attribuire con precisione il rango tassonomico a ciascuna specie descritta e di analizzare criticamente alcune segnalazioni floristiche effettuate da successivi Autori. Ad esempio, l'analisi dei materiali d'erbario di Inzenga mette in evidenza che *Lyophyllum littoralis* (Ballero e Contu) Contu, segnalato come nuovo ritrovamento per l'Italia da BALLERO, CONTU (1990), era stato già descritto da Inzenga (sub: *Agaricus*), intorno alla metà del 1800.

Un altro rilevante contributo alla conoscenza della biodiversità fungina della Sicilia, e delle Madonie in particolare, emerge dagli studi di Francesco Minà Palumbo. In attesa della pubblicazione dell'intera opera iconografica del Minà un'analisi dei materiali di studio del naturalista castelbuonese mette in evidenza la presenza di disegni relativi a 102 macromiceti raffigurati in 10 tavole (MAZZOLA, VENTURELLA, 1991).

Gli studi di Inzenga e di Minà Palumbo, insieme a quelli effettuati da SCALIA (1900, 1901, 1902) sui macromiceti ed i micromiceti della Sicilia orientale e dell'Etna, sono stati, sino al 1991, gli unici riferimenti per la valutazione della biodiversità fungina dell'Isola.

VALUTAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DELLA FLORA MICOLOGICA SICILIANA

Agli inizi degli anni '90 gli aderenti al Gruppo di Lavoro per la Micologia della Società Botanica Italiana, riprendendo un'idea progettuale di G. Govi, a quel tempo Presidente dell'Unione Micologica Italiana, e con riferimento ad altri progetti avviati in ambito regionale (BELLÙ, 1992), misero a punto uno specifico programma di ricerca finalizzato al censimento ed alla cartografia dei macromiceti in Italia (ONOFRI, 1994).

Alcune regioni, tra cui la Sicilia, avviarono in parallelo analoghi programmi di ricerca allo scopo di intensificare l'esplorazione micofloristica nel proprio ambito territoriale e di fornire un contributo alla conoscenza della distribuzione e dell'ecologia delle specie fungine (VENTURELLA, 1992).

Un primo resoconto quantitativo sulla biodiversità fungina della Sicilia venne fornito da VENTURELLA, MAZZOLA (1991) i quali individuavano nelle province di Catania, Palermo e Messina gli ambiti territoriali in cui era presente il maggior numero di taxa.

In particolare, sulla base dei dati riportati in 248 lavori scientifici pubblicati nel periodo 1814-1991 (VENTURELLA, 1991), la consistenza della micoflora della Sicilia risultava pari a 1564 taxa di cui circa la metà con basidiomi ed ascomi visibili ad occhio nudo (macrofunghi *sensu* Arnolds).

A partire dal 1991 la ricerca micologica in Sicilia è stata prevalentemente orientata verso la valutazione della diversità fungina nei differenti ecosistemi che caratterizzano il territorio isolano e ha trovato sostegno in progetti finanziati da Enti pubblici e in collaborazioni attivate con Istituti di ricerca operanti in campo nazionale ed all'estero.

Un importante passo in avanti verso una corretta valutazione della consistenza della micoflora siciliana, sebbene al momento limitato ai basidiomiceti, è stato compiuto con la partecipazione al progetto di ricerca su "Check-list dei funghi italiani" finanziato dal Ministero dell'Ambiente e coordinato da S. Onofri (Viterbo).

L'elaborazione dei dati raccolti sino ad oggi evidenzia per la Sicilia un numero di basidiomiceti macroscopici pari a 1.248. Si tratta di un numero ancora lontano dalla reale consistenza della micoflora siciliana che è stimabile, tenuto conto anche dei funghi microscopici, in 3.500-4.000 taxa.

Lo stato di avanzamento delle ricerche consente comunque di fornire una prima valutazione del numero di taxa presenti nei principali ecosistemi del territorio siciliano pur essendo tale valutazione fortemente condizionata dalla presenza in letteratura di dati riferiti alla Sicilia, difficilmente attribuibili con certezza all'uno o all'altro ecosistema o in alcuni casi

ad un preciso ambito territoriale. Ciò nonostante, dal grafico di Fig. 1, è possibile notare come i querceti esprimano il più alto livello di diversità specifica (891 taxa) seguiti dai boschi di faggio (498 taxa), dalle pinete (388 taxa) e dai castagneti (246 taxa).

Le ricerche effettuate in alcune Riserve e Parchi regionali hanno inoltre evidenziato la presenza sul territorio isolano di specie rare quali *Amanita separata* Contu e *A. tarda* (Trimbach) Contu (VENTURELLA, SAITTA, 2002) e di specie a rischio di estinzione quali *Pleurotus nebrodensis* (Inzenga) Quéf. Inoltre *Entoloma plebeoides* (Schulz.) Noordel., il cui areale era sino ad oggi limitato all'Europa centro-settentrionale, è stato recentemente raccolto nel Parco della Favorita all'interno della città di Palermo (VENTURELLA, 2002).

Infine l'elaborazione dei dati relativi alla biodiversità fungina in Sicilia consente una prima classificazione di alcuni territori quali Important Fungus Areas (IFA's) e l'identificazione di gruppi tassonomici che, opportunamente caratterizzati dal punto di vista genetico, possono essere utilizzati per ricerche di carattere applicativo.

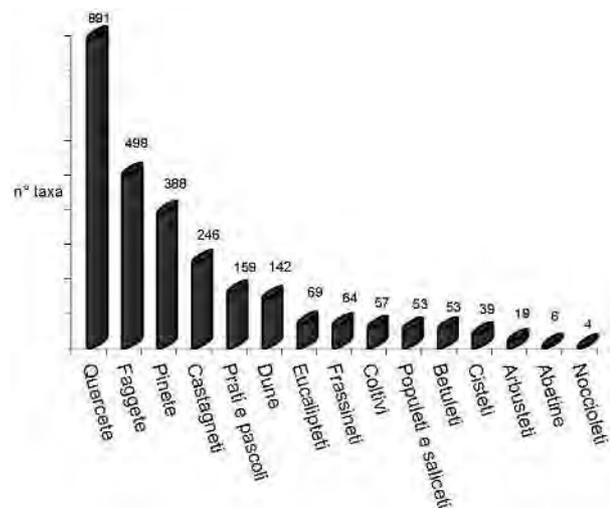


Fig. 1

Numero di funghi per ecosistema.

Number of fungi for each investigated ecosystem.

BIOPROSPECTING

Alle tradizionali attività di ricerca sulla distribuzione e sull'ecologia dei funghi si sono recentemente aggiunte azioni di bioprospecting rivolte alla coltivazione di nuove varietà di funghi eduli per il mercato ed all'isolamento di metaboliti secondari in alcune entità dei generi *Pleurotus* (Fr.) P. Kummer e *Daldinia* Ces. & De Not.

Un particolare interesse applicativo mostrano i pleuroti delle ombrellifere sui quali sono state effettuate ricerche finalizzate alla caratterizzazione del valore alimentare e del contenuto in metaboliti secondari. In particolare nei pleuroti delle ombrellifere sono

presenti quantità nutrizionalmente significative di riboflavina, niacina, cobalamina e biotina. Inoltre la vitamina B₁₂ è presente in quantità notevoli in *Pleurotus nebrodensis* per cui tale fungo può rappresentare una valida alternativa nelle diete di tipo vegetariano. Ulteriori analisi effettuate in collaborazione con il Dipartimento di Chimica Organica dell'Università di Pavia evidenziano nei pleuroti delle ombrellifere la presenza di steroli e derivati di acidi grassi quali ergosterolo, esteri etilici ed acidi grassi insaturi (VENTURELLA, FERRI, 2001).

Un secondo caso di studio è quello relativo a *Daldinia concentrica* (Bolton : Fr.) Ces. & De Not., ascomicete lignicolo presente in Sicilia su numerose latifoglie spontanee ed ornamentali, la cui variabilità risulta essere molto più ampia rispetto a quanto sinora riportato in letteratura. Le analisi molecolari e tassonomiche svolte in collaborazione con il Bayer Pharma Research Center di Wuppertal (Germania) evidenziano che gran parte delle raccolte di *D. concentrica*, di provenienza mediterranea, sono da attribuire ad una specie pantropicale *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb. : Fr.) Rehm (STADLER *et al.*, 2002).

Ringraziamenti – Lavoro effettuato con il contributo della Provincia Regionale di Palermo. Progetto SIM (Siti di interesse micologico e valorizzazione della biodiversità fungina).

LETTERATURA CITATA

- ARNOLDS E., 1981 – *Ecology and coenology of macrofungi in grasslands and moist heathlands in Drenthe, the Netherlands*. Bibl. Mycol., 1 (83). J. Cramer, Vaduz.
- BALLERO M., CONTU M., 1990 – *A new species of Calocybe (Agaricales, Lyophylleae) from littoral pine woods of Sardinia (Italy)*. Mycotaxon 39: 473-476.
- BELLÙ F., 1992 – *Mapping and cartography of macrofungi in Alto Adige*. Giorn. Bot. Ital., 126: 797-803.
- BERNARDINO DA UCRIA, 1789 – *Hortus Regius Panhormitanus*. Tipis Regis, Palermo. 498 pp.
- BOCCONE P. S., 1674 – *Icones et descriptiones rariorum plantarum Siciliae, Melitae, Galliae et Italiae*. Londra, Oxford. 96 pp., 52 tav.
- CUPANI F., 1696-1697 – *Horthus Catholicus etc. cum supplemento*. Neapoli 1696. *Idem supplementum alterum*. Panormi 1697.
- INZENGA G., 1865-1869 – *Funghi siciliani. Centurie I, II*. Tipografia Lao, Palermo.
- MAZZOLA P., VENTURELLA G., 1991 – *Il contributo di Francesco Minà Palumbo alle conoscenze micologiche siciliane*. Giorn. Bot. Ital., 125(3): 253.
- ONOFRI S., 1994 – *Il programma di censimento e cartografia delle specie fungine in Italia*. Micol. Ital., 2: 23-26.
- RAFINESQUE SCHMALTZ C. S., 1810 – *Caratteri di alcuni nuovi generi e nuove specie di animali e piante della Sicilia con varie osservazioni sopra i medesimi*. Tip. Sanfilippo, Palermo. 105 pp.
- SCALIA G., 1900 – *I funghi della Sicilia orientale e principalmente della regione etnea. I*. Atti Accad. Gioenia Sci. Nat. Catania, ser. 4, 13(20): 1-55.
- , 1901 – *I funghi della Sicilia orientale e principalmente della regione etnea. II*. Atti Accad. Gioenia Sci. Nat. Catania, ser. 4, 14(9): 1-42.
- , 1902 – *I funghi della Sicilia orientale e principalmente della regione etnea. III*. Atti Accad. Gioenia Sci. Nat. Catania, ser. 4, 15(13): 1-17.
- STADLER M., BAUMGARTNER M., VENTURELLA G., WOLLWEBER H., 2002 – *Morphological and ultrastructural characteristics of Daldinia species*. 7th Int. Mycol. Congr., Oslo (Norway). Book of abstracts: 232.
- VENTURELLA G., 1991 – *A check-list of Sicilian fungi*. Boccone, 2: 5-221.
- , 1992 – *Progetto per una banca dati sulla micoflora siciliana*. Quad. Bot. Ambientale Appl., 2 (1991): 107-110.
- , 1999 – *The contribution of Giuseppe Inzenga (1816-1887) to the Sicilian mycological knowledge*. In: ONOFRI *et al.*, *Proceedings of the Symposium "Italians in the History of Mycology"*: 89-95. Rome, 4-5 October 1995. Mycotaxon LTD.
- , 2001 – *L'iconografia micologica di Giuseppe Inzenga*. Ipe Archimede, Palermo.
- , 2002 – *First record of Entoloma plebeoides in Italy*. Mycotaxon, 84: 119-120.
- VENTURELLA G., FERRI F., 2001 – *Progetto FUNGIS. Progetto di sviluppo per la funghicoltura in Sicilia*. Programma Operativo Plurifondo 1994/99 – Misura 10.4 – Ricerca Applicata, indagini e sperimentazione di interesse regionale. Palermo, 118 pp. (con cd rom allegato).
- , MAZZOLA P., 1991 – *Present state of the mycological exploration in Sicily*. Bot. Chron., 10: 889-894.
- , SAITTA A., 2002 – *On the presence of rare Amanita species in Sicily*. Atti 97° Congresso S.B.I.: 187. Lecce, 24-27 settembre 2002.
- ZERVAKIS G., VENTURELLA G., 2002 – *Mushroom breeding and cultivation enhances ex situ conservation of Mediterranean Pleurotus taxa*. In: ENGELS J. M. M. *et al.*, (Eds.), *Managing Plant Genetic Diversity*: 351-358. CABI Publishing, UK.

RIASSUNTO – La valutazione della consistenza della micoflora sul territorio siciliano è ancora in fase di definizione. Sulla base dei dati riportati in letteratura e delle attività di censimento effettuate nell'ultimo decennio viene indicato un numero di funghi per ciascun ecosistema studiato. L'autore riporta in sintesi i risultati delle azioni di bioprospecting messe in atto in Sicilia sui pleuroti delle ombrellifere e sull'ascomicete lignicolo *Daldinia concentrica*.

AUTORE

Giuseppe Venturella, Dipartimento di Scienze Botaniche, Università di Palermo, Via Archirafi 38, 90123 Palermo

Contributo alla conoscenza dei funghi lignicoli della Sicilia

A. SAITTA, A. BERNICCHIA e G. VENTURELLA

ABSTRACT – *Contribution to the knowledge of lignicolous fungi from Sicily* – The authors report a list of 209 lignicolous fungi collected on different plants and substrata. Among the taxa recorded, 13 are rare and 6 are reported for the first time from Sicily.

Key words: biodiversity, lignicolous fungi, Sicily

INTRODUZIONE

La componente lignicola della flora micologica costituisce uno degli aspetti più interessanti ma anche meno conosciuti della biodiversità fungina in Sicilia. I funghi lignicoli, come è noto, esplicano la loro azione di colonizzazione su vari substrati e in differenti habitat. Tale azione è favorita dalle tecniche di gestione selvicolturale dei boschi, dai frequenti incendi che alterano la struttura e la fisionomia delle cenosi vegetali e dalla pressione antropica.

Tra i funghi lignicoli una componente interessante è rappresentata dai patogeni agenti di carie e dai saprofiti che fruttificano sulle numerose esotiche che, soprattutto all'interno dell'Orto Botanico, delle ville, dei giardini storici e delle alberature stradali della città di Palermo, contribuiscono a caratterizzare il verde ornamentale.

In Sicilia i dati sulla distribuzione e l'ecologia dei funghi lignicoli sono piuttosto frammentari ed i dati disponibili sono distribuiti in numerose pubblicazioni, spesso sotto forma di semplice elenco dei binomi scientifici e senza una precisa indicazione degli ospiti, dei substrati e dei periodi di fruttificazione.

Nell'ambito delle attività previste in differenti progetti di ricerca si è avviato uno specifico studio finalizzato al censimento dei funghi lignicoli del territorio siciliano allo scopo di incrementare le conoscenze sugli stessi e sul loro ruolo ecologico.

MATERIALI E METODI

Le raccolte sono state effettuate durante tutto l'anno in differenti ecosistemi agrari e forestali ricadenti nel territorio siciliano e su alcune esotiche che caratterizzano il verde ornamentale della città di Palermo.

Il materiale raccolto è stato identificato in laboratorio

attraverso l'uso delle seguenti chiavi analitiche: JÜLICH (1989), RYVARDEN, GILBERTSON (1993-1994), BREITENBACH, KRÄNZLIN (1986) e BERNICCHIA (1990) per le *Aphyllphorales*; MOSER (1980), BREITENBACH, KRÄNZLIN (1991, 1995), COURTECUISSÉ (1994) per le *Agaricales*, HJORTSTAM *et al.* (1987, 1988), ERIKSSON, RYVARDEN (1973, 1975, 1976), ERIKSSON *et al.* (1978, 1981, 1984) per le *Corticaceae*; DENNIS (1981), BREITENBACH, KRÄNZLIN (1981) per gli *Ascomycota*.

In alcuni casi, per la identificazione dei funghi lignicoli raccolti, sono stati utilizzati reagenti chimici quali il reattivo di Melzer ed il KOH.

I binomi scientifici delle piante su cui sono stati raccolti i funghi lignicoli, riportati in questo studio in Tab. 1, sono stati così codificati: *Fagus sylvatica* L. (Fs), *Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl. (Qp), *Quercus suber* L. (Qs), *Quercus pubescens* Willd s.l. (Qu), *Quercus congesta* Presl (Ql), *Quercus virgiliana* (Ten.) Ten. (Qv), *Quercus cerris* L. (Qc), *Quercus gussonei* (Borzi) Brullo (Qg), *Quercus ilex* L. (Qi), *Acer campestre* L. (Ac), *Fraxinus ornus* L. (Fo), *Castanea sativa* Miller (Cs), *Populus canescens* (Aiton) Sm. (Pc), *Populus alba* L. (Pa), *Pinus halepensis* Miller (Ph), *Pinus nigra* Arnold (Pn), *Pinus pinea* L. (Pp), *Olea europaea* L. var. *sativa* Hoffmg. et Link (Oe), *Salix alba* L. (Sa), *Salix pedicellata* Desf. (Sp), *Fraxinus angustifolia* Vahl (Fa), *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. (Ec), *Cistus salvifolius* L. (Ci), *Cistus creticus* L. (Cc), *Crataegus laciniata* Ucria (Cl), *Prunus domestica* L. (Pd), *Prunus dulcis* (Miller) D. A. Webb (Pu), *Pyrus amygdaliformis* Vill. (Py), *Morus alba* L. (Ma), *Platanus hybrida* Brot. (Pl), *Pistacia lentiscus* L. (Pe), *Phillyrea latifolia* L. (Pi), *Tamarix*

Taxa	Qc	Qg	Ql	Cl	Qp	Qu	Qs	Qv	Fa	Fo	Fs	Cs	Pa	Pc	Pd	Pu	Ph	Pn	Pp	Ec	Sa	Sp	Ac	Oe	Cl	Py	Ma	Cc	Ci	Pi	Pe	Pl	Ta	Lc	Ci	Sj	Rc	Fm	Ce	Pk											
<i>Xerula pudens</i> (Pers.) : Singer																																																			
<i>X. radicata</i> (Riethm : Fr.) Dörfler																																																			
<i>Xylaria hypoxylon</i> (L.: Fr.) Grev.																																																			
<i>X. longipes</i> Nitschke																																																			
<i>X. polymorpha</i> (Pers.: Fr.) Grev.																																																			

africana Poiret (Ta), *Laurus canariensis* Webb. & Berth. (Lc), *Casuarina torulosa* [Dryand in.] Ait. (Ct), *Sophora japonica* L. (Sj), *Ricinus communis* L. (Rc), *Ficus microcarpa* L. (Fm), *Ceratonia siliqua* L. (Ce) e *Parkinsonia aculeata* L. (Pk).

Gli exsiccata delle raccolte sono depositati presso l'Herbarium Mediterraneum di Palermo (PAL).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel corso di questo studio sono stati censiti 209 taxa di cui 181 Basidiomiceti e 28 Ascomiceti. Tra questi, 9 taxa si riferiscono a funghi lignicoli raccolti su piante esotiche utilizzate a scopo ornamentale, 204 taxa a funghi raccolti all'interno di popolamenti forestali, 6 a taxa raccolti su piante coltivate di interesse agrario.

Dall'analisi della Tab. 1 si può notare come il numero maggiore di funghi lignicoli è stato trovato su *Quercus ilex* (139) e su *Fagus sylvatica* (81).

Come si evince dalla Tab. 2, 99 taxa sono stati ritrovati su ceppaie, 73 su tronchi, 109 su rami, 16 su radici e/o residui legnosi interrati, 5 su strobili, 3 su cupole.

Le ricerche sinora effettuate in Sicilia evidenziano che mentre alcuni funghi lignicoli colonizzano più di un tipo di substrato altri sembrano mostrare una specificità verso un solo tipo di substrato. In particolare: *Creolophus cirrhatus*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma australe*, *G. lipsiense*, *G. resinaceum*, *Hericium erinaceum*, *Panellus stipticus*, *Perenniporia fraxinea*, *P. ochroleuca*, *Phaeolus schweinitzii*, *Phellinus ignarius*, *P. nigricans*, *P. punctatus*, *P. tuberculosus*, *Phlebia rufa*, *Polyporus badius*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Resupinatus applicatus*, *Serpula lacrimans*, *Spongipellis pachyodon*, *S. spumeus*, *Trichaptum biforme* fruttificano su tronchi caduti o su tronchi di piante ancora in piedi. I funghi lignicoli che si riscontrano soltanto sulle ceppaie sono: *Abortiporus biennis*, *Antrodia serialis*, *Armillaria ostoyae*, *Coprinus domesticus*, *Grifola frondosa*, *Gymnopilus junonius*, *Hymenochaete rubiginosa*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Lenzites betulinus*, *Lycoperdon piriforme*, *Meripilus giganteus*, *Mycena galericulata*, *M. inclinata*, *Oligoporus hibernicus*, *Pholiota aurivella*, *P. gommosa*, *P. lucifera*, *P. squarrosa*, *Pluteus cervinus*, *P. petasatus*, *P. romellii*, *P. umbrosus*, *Polyporus squamosus*, *Psathyrella piluliformis*, *Tricholomopsis rutilans* e *Volvariella caesiocincta*.

Tra le numerose entità che fruttificano sui rami caduti di varie conifere e latifoglie, 15 sono state raccolte anche su ceppaie e tronchi: *Auricularia auricula-judae*, *A. mesenterica*, *Bjerkandera adusta*, *Corioloopsis gallica*, *Crepidotus mollis*, *C. mollis* var. *calolepis*, *Daldinia concentrica*, *Gloeophyllum sepiarium*, *Oligoporus caesius*, *O. stipticus*, *Pulcherricum caeruleum*, *Skeletocutis nivea*, *Trametes versicolor*, *Tremella mesenterica*, *Xylaria hypoxylon*.

Nell'elenco riportato in Tab. 1 sono comprese anche alcune specie, rare per la Sicilia ma comuni in altre regioni d'Italia, quali *Armillaria lutea*, *Calocera viscosa*, *Creolophus cirrhatus*, *Hericium coralloides*, *Meripilus giganteus*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Ossicaulis*

TABELLA 2

Taxa censiti per tipo di substrato.

List of taxa reported for each type of substratum.

Taxa	Ceppaie	Tronchi	Rami	Radici e/o residui legnosi interrati	Strobili	Cupole
<i>Abortiporus biennis</i>	x	---	---	---	---	---
<i>Agrocybe aegerita</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Aleurodiscus disciformis</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Antrodia serialis</i>	x	---	---	---	---	---
<i>Armillaria lutea</i>	x	---	---	x	---	---
<i>A. mellea</i>	x	---	---	x	---	---
<i>A. ostoyae</i>	x	---	---	---	---	---
<i>A. tabescens</i>	x	---	---	x	---	---
<i>Auricularia auricula-judae</i>	x	x	x	---	---	---
<i>A. mesenterica</i>	x	x	x	---	---	---
<i>Auriscalpium vulgare</i>	---	---	---	---	x	---
<i>Bertia moriformis</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Bisporella citrina</i>	x	---	x	---	---	---
<i>Bjerkandera adusta</i>	x	x	x	---	---	---
<i>Bulgaria inquinans</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Byssomerulius corium</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Calocera cornea</i>	---	---	x	---	---	---
<i>C. viscosa</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Chondrostereum purpureum</i>	---	x	x	---	---	---
<i>Ciboria batschiana</i>	---	---	---	---	---	x
<i>Collybia fusipes</i>	x	---	---	x	---	---
<i>Coprinus disseminatus</i>	x	x	---	---	---	---
<i>C. domesticus</i>	x	---	---	---	---	---
<i>C. micaceus</i>	x	---	x	---	---	---
<i>C. radians</i>	x	---	x	---	---	---
<i>C. truncorum</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Coriolopsis gallica</i>	x	x	x	---	---	---
<i>Creolophus cirrhatus</i>	---	x	---	---	---	---
<i>Crepidotus applantans</i>	---	---	x	---	---	---
<i>C. mollis</i>	x	x	x	---	---	---
<i>C. mollis</i> var. <i>calolepis</i>	x	x	x	---	---	---
<i>C. variabilis</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Crucibulum crucibuliforme</i>	---	---	x	---	x	---
<i>Cyatbus olla</i>	---	---	x	---	---	---
<i>C. striatus</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Cylindrobasidium laeve</i>	---	x	x	---	---	---
<i>Dacrymyces minor</i>	---	---	x	---	---	---
<i>D. stillatus</i>	---	---	x	---	---	---
<i>D. variisporus</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Daedalea quercina</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Daldinia concentrica</i>	x	x	x	---	---	---
<i>Diatrype disciformis</i>	---	---	x	---	---	---
<i>D. stigma</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Diatrypella quercina</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Dichomitus campestris</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Excidia glandulosa</i>	---	---	x	---	---	---
<i>E. truncata</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Fistulina hepatica</i>	x	x	---	x	---	---
<i>Flammulaster carpophilus</i>	---	---	---	---	---	x
<i>Flammulina velutipes</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Fomes fomentarius</i>	---	x	---	---	---	---
<i>Galerina marginata</i>	x	---	x	---	---	---
<i>Ganoderma australe</i>	---	x	---	---	---	---
<i>G. lipsiense</i>	---	x	---	---	---	---
<i>G. lucidum</i>	x	x	---	---	---	---
<i>G. resinaceum</i>	---	x	---	---	---	---
<i>Gloeocystidiellum luridum</i>	---	---	x	---	---	---
<i>G. porosum</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	---	x	x	---	---	---
<i>G. sepiarium</i>	x	x	x	---	---	---

Taxa	Ceppaie	Tronchi	Rami	Radici e/o residui legnosi interrati	Strobili	Cupole
<i>Gloeoporus dichrous</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Grifola frondosa</i>	x	---	---	---	---	---
<i>Gymnopilus hybridus</i>	x	---	x	---	---	---
<i>G. junonius</i>	x	---	---	---	---	---
<i>Hapalopilus rutilans</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Hericium coralloides</i>	x	x	---	---	---	---
<i>H. erinaceum</i>	---	x	---	---	---	---
<i>Hexagonia nitida</i>	---	x	x	---	---	---
<i>Hohenbuehelia mastrucata</i>	---	---	---	x	---	---
<i>H. petaloïdes</i>	---	---	---	x	---	---
<i>Hymenochaete rubiginosa</i>	x	---	---	---	---	---
<i>Hymenoscyphus calyculus</i>	---	---	x	---	---	---
<i>H. fructigenus</i>	---	---	---	---	---	x
<i>Hyphoderma praetermissum</i>	---	---	x	---	---	---
<i>H. setigerum</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Hyphodontia crustosa</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Hypholoma capnoides</i>	x	x	---	---	---	---
<i>H. fasciculare</i>	x	x	---	---	---	---
<i>H. sublateritium</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Hypoxyton cohaerens</i>	x	---	x	---	---	---
<i>H. fragiforme</i>	---	---	x	---	---	---
<i>H. mediterraneum</i>	---	---	x	---	---	---
<i>H. nummularium</i>	---	---	x	---	---	---
<i>H. rubiginosum</i>	---	---	x	---	---	---
<i>H. serpens</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Hysterium pulicare</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Inonotus dryadeus</i>	x	x	---	x	---	---
<i>I. hispidus</i>	x	x	---	---	---	---
<i>I. nodulosus</i>	---	x	x	---	---	---
<i>I. tamaricis</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Jungbuhnia nitida</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	x	---	---	---	---	---
<i>Lachnum bicolor</i>	---	---	x	---	---	---
<i>L. virgineum</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Laetiporus sulfureus</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Lentinellus cochleatus</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Lentinus tigrinus</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Lenzites betulinus</i>	x	---	---	---	---	---
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	x	---	---	---	---	---
<i>Lyophyllum ulmarium</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Macrotyphula fistulosa</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Marasmiellus candidus</i>	---	---	x	---	---	---
<i>M. ramealis</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Megacollybia platyphylla</i>	x	---	---	x	---	---
<i>Meripilus giganteus</i>	x	---	---	---	---	---
<i>Micromphale brassicolens</i>	---	---	x	---	---	---
<i>M. foetidum</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Mollisia cinerea</i>	---	---	x	---	---	---
<i>M. melaleuca</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Mycena arcangeliana</i>	x	---	x	---	---	---
<i>M. crocata</i>	---	---	x	---	---	---
<i>M. epipterygia</i>	---	---	x	---	---	---
<i>M. galericulata</i>	x	---	---	---	---	---
<i>M. haematopus</i>	x	---	x	---	---	---
<i>M. inclinata</i>	x	---	---	---	---	---
<i>M. polygramma</i>	---	---	x	---	---	---
<i>M. renatii</i>	x	---	x	---	---	---
<i>M. seynesii</i>	---	---	---	---	x	---
<i>M. viscosa</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Nectria cinnabarina</i>	---	---	x	---	---	---

(segue Tabella 2)

Taxa	Ceppaic	Tronchi	Rami	Radici e/o residui legnosi interrati	Strobili	Cupole
<i>Neobulgaria pura</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Oligoporus caesius</i>	x	x	x	---	---	---
<i>O. hibernicus</i>	x	---	---	---	---	---
<i>O. stipticus</i>	x	x	x	---	---	---
<i>Omphalotus olearius</i>	x	---	---	x	---	---
<i>Ossicaulis lignatilis</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Oudemansiella mucida</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Panellus stipticus</i>	---	x	---	---	---	---
<i>Paxillus atrotomentosus</i>	---	---	x	---	---	---
<i>P. panuoides</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Peniophora incarnata</i>	---	---	x	---	---	---
<i>P. lycii</i>	---	---	x	---	---	---
<i>P. meridionalis</i>	---	---	x	---	---	---
<i>P. quercina</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Perenniporia fraxinea</i>	---	x	---	---	---	---
<i>P. ochroleuca</i>	---	x	---	---	---	---
<i>Phaeolus schweinitzii</i>	---	x	---	---	---	---
<i>Phaeomarasmium erinaceus</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Phanerochaete gigantea</i>	---	---	x	---	---	---
<i>P. martelliana</i>	---	---	x	---	---	---
<i>P. ravenellii</i>	---	---	x	---	---	---
<i>P. tuberculata</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Pbellinus ignarius</i>	---	x	---	---	---	---
<i>P. nigricans</i>	---	x	---	---	---	---
<i>P. punctatus</i>	---	x	---	---	---	---
<i>P. torulosus</i>	x	x	---	---	---	---
<i>P. tuberosus</i>	---	x	---	---	---	---
<i>Phlebia rufa</i>	---	x	---	---	---	---
<i>Phlebiella vaga</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Pholiota aurivella</i>	x	---	---	---	---	---
<i>P. gommosa</i>	x	---	---	---	---	---
<i>P. lucifera</i>	x	---	---	---	---	---
<i>P. squarrosa</i>	x	---	---	---	---	---
<i>Pleurotus cornucopiae</i>	x	x	---	---	---	---
<i>P. dryinus</i>	x	x	---	---	---	---
<i>P. ostreatus</i>	x	x	---	x	---	---
<i>Pluteus cervinus</i>	x	---	---	---	---	---
<i>P. ephebeus</i>	---	---	x	---	---	---
<i>P. petasatus</i>	x	---	---	---	---	---
<i>P. romellii</i>	x	---	---	---	---	---
<i>P. umbrosus</i>	x	---	---	---	---	---
<i>Polyporus arcularius</i>	---	---	x	---	---	---
<i>P. badius</i>	---	x	---	---	---	---
<i>P. brumalis</i>	---	---	x	---	---	---
<i>P. ciliatus</i>	---	---	x	---	---	---
<i>P. melanopus</i>	---	---	---	x	---	---
<i>P. meridionalis</i>	---	---	x	x	---	---
<i>P. squamosus</i>	x	---	---	---	---	---
<i>P. varius</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Psathyrella cotonea</i>	x	---	---	---	---	---
<i>P. gracilis</i>	---	---	x	---	---	---
<i>P. piluliformis</i>	x	---	---	---	---	---
<i>Pulcherricium caeruleum</i>	x	x	x	---	---	---
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	---	x	---	---	---	---
<i>Radulomyces confluens</i>	---	---	x	---	---	---
<i>R. molaris</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Resupinatus applicatus</i>	---	x	---	---	---	---
<i>Rhodotus palmatus</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Rigidoporus ulmarinus</i>	x	---	x	---	---	---
<i>Sarcoscypha coccinea</i>	x	---	x	---	---	---

Taxa	Ceppaie	Tronchi	Rami	Radici e/o residui legnosi interrati	Strobili	Cupole
<i>Schizophyllum commune</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Schizopora paradoxa</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Scutellinia scutellata</i>	x	---	---	---	---	---
<i>Serpula lacrimans</i>	---	x	---	---	---	---
<i>Skeletocutis nivea</i>	x	x	x	---	---	---
<i>S. per candida</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Spongipellis pachyodon</i>	---	x	---	---	---	---
<i>S. spumeus</i>	---	x	---	---	---	---
<i>Steccherinum ochraceum</i>	x	---	x	---	---	---
<i>Stereum gausapatum</i>	x	---	x	---	---	---
<i>S. hirsutum</i>	x	---	x	---	---	---
<i>S. rugosum</i>	x	---	x	---	---	---
<i>Strobilurus stephanocistis</i>	---	---	---	---	x	---
<i>S. tenacellus</i>	---	---	---	---	x	---
<i>Trametes hirsuta</i>	---	---	x	---	---	---
<i>T. versicolor</i>	x	x	x	---	---	---
<i>Tremella foliacea</i>	x	---	x	---	---	---
<i>T. mesenterica</i>	x	x	x	---	---	---
<i>Trichaptum bifforme</i>	---	x	---	---	---	---
<i>T. fuscoviolaceum</i>	x	x	---	---	---	---
<i>Tricholomopsis rutilans</i>	x	---	---	---	---	---
<i>Volvarella bombycina</i>	x	x	---	---	---	---
<i>V. caesiocincta</i>	x	---	---	---	---	---
<i>Vuilleminia comedens</i>	---	---	x	---	---	---
<i>Xerula pudens</i>	---	---	---	x	---	---
<i>X. radicata</i>	x	---	---	x	---	---
<i>Xylaria hypoxylon</i>	x	x	x	---	---	---
<i>X. longipes</i>	x	---	x	---	---	---
<i>X. polymorpha</i>	x	---	---	x	---	---

lignatilis, *Pholiota lucifera*, *Pluteus ephebeus*, *Psathyrella cotonea*, *Rhodotus palmatus*, *Rigidoporus ulmarius* e *Volvariella caesiocincta*.

L'areale di *Peniophora meridionalis* e *Phanerochaete martelliana* risulta al momento limitato all'ambiente mediterraneo.

Infine *Cylindrobasidium laeve*, *Hyphoderma praetermissum*, *Hyphodontia crustosa*, *Perenniporia fraxinea*, *Phanerochaete tuberculata* e *Spongipellis spumeus*, ampiamente distribuite in Italia, vengono segnalate per la prima volta per il territorio siciliano.

Ringraziamenti - Lavoro pubblicato con il contributo della Provincia Regionale di Palermo (Progetto SIM, Siti di Interesse Micologico e Valorizzazione della Biodiversità Fungina).

LETTERATURA CITATA

- BERNICCHIA A., 1990 - *Polyporaceae s.l. in Italia*. Univ. Bologna.
- BREITENBACH J., KRÄNZLIN F., 1981 - *Champignons de Suisse. 1. Les Ascomycètes*. Ed. Mykologia, Lucerne.
- , 1986 - *Champignons de Suisse. 2. Champignons sans lames. Hétérobasidiomycètes, Aphyllò-phorales, Gastéromycètes*. Ed. Mykologia, Lucerne.
- , 1991 - *Champignons de Suisse. 3. Bolets et champignons à lames. 1^{ère} partie*. Strobilomycetaceae et Boletaceae, Paxillaceae, Gomphidiaceae, Hygrophoraceae, Tricholomataceae, Polypo-raceae (*lamellées*).

Ed. Mykologia, Lucerne.

- , 1995 - *Champignons de Suisse. 4. Champignons à lames. 2^{ème} partie*. Entolomataceae, Pluteaceae, Amanitaceae, Agaricaceae, Coprinaceae, Bolbitiaceae, Strophariaceae. Ed. Mykologia, Lucerne.
- COURTECUISSIE R., 1994 - *Les champignons de France*. Eclectis, Paris.
- DENNIS R.W.G., 1981 - *British Ascomycetes*. J. Cramer, Vaduz. 585 pp.
- ERIKSSON J., HJORTSTAM K., RYVARDEN L., 1978 - *The Corticiaceae of North Europe*. Vol. 5. Mycoaciella-Phanerochaete. Fungiflora, Oslo Norway.
- , 1981 - *The Corticiaceae of North Europe*. Vol. 6. Phlebia-Sarcodontia. Fungiflora, Oslo Norway.
- , 1984 - *The Corticiaceae of North Europe*. Vol. 7. Schizopora-Suillosporium. Fungiflora, Oslo Norway.
- ERIKSSON J., RYVARDEN L., 1973 - *The Corticiaceae of North Europe*. Vol. 2. Aleurodiscus-Confertobasidium. Fungiflora, Oslo Norway.
- , 1975 - *The Corticiaceae of North Europe*. Vol. 3. Coronicium-Hyphoderma. Fungiflora, Oslo Norway.
- , 1976 - *The Corticiaceae of North Europe*. Vol. 4. Hyphodermella-Mycoacia. Fungiflora, Oslo Norway.
- HJORTSTAM K., LARSSON K. H., RYVARDEN L., 1987 - *The Corticiaceae of North Europe. Introduction and keys*. Vol. 1. Fungiflora, Oslo Norway.
- , 1988 - *The Corticiaceae of North Europe*. Vol. 8. Phlebiella-Thanatophorus- Ypsilonidium. Fungiflora, Oslo Norway.
- JÜLICH W., 1989 - *Guida alla determinazione dei funghi*,

2. Saturnia, Trento.

MOSER M., 1980 – *Guida alla determinazione dei funghi*,
1. Saturnia, Trento.

RYVARDEN L., GILBERTSON R. L., 1993-1994 – *European
Polypores. I-II*. Fungiflora, Oslo. 743 pp.

RIASSUNTO – Gli Autori riportano un elenco di 209
funghi lignicoli raccolti su differenti piante e substrati. Tra
le specie censite 13 risultano rare e 6 vengono segnalate
per la prima volta in Sicilia.

AUTORI

*Alessandro Saitta, Giuseppe Venturella, Dipartimento di Scienze Botaniche, Via Archirafi 38, I-90123 Palermo, email
gvent@unipa.it*

*Annarosa Bernicchia, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Ambientali, Via Filippo Re, 8, I-40126 Bologna, email aber-
nicc@agrsci.unibo.it*

Conservazione della biodiversità fungina nell'area mediterranea: l'esperienza senese

C. PERINI, E. SALERNI e A. LAGANÀ

ABSTRACT - *Conservation of fungal diversity in the Mediterranean area: the experience of Siena* - The concept of biodiversity has recently acquired widespread credibility and the importance of studies of the natural heritage with a view to its conservation have been emphasized. The ecological importance of macrofungi has led to their recent inclusion, with the same status as plants and animals, in many projects. Progress in conservation depends on information and understanding of the natural world; this is particularly true in mycology and the contribute of the staff of the University of Siena for the safeguard of fungi is here reported.

Key words: conservation, diversity, ecology, knowledge, macromycetes

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni il concetto di biodiversità ha assunto sempre maggiore importanza, come testimoniato anche dal riconoscimento politico internazionale attribuitogli con la "Convention on Biological Diversity" a Rio de Janeiro nel 1992, cui hanno aderito numerosi Paesi.

La biodiversità è di fondamentale importanza quale elemento di base per la sopravvivenza e il corretto funzionamento degli ecosistemi e, di conseguenza, della vita sulla terra. Le trasformazioni a cui oggi è sottoposto il nostro pianeta non sono più dovute alle sole "normali" forze della natura, come è avvenuto per milioni di anni, ma anche ad una sempre maggiore azione antropica, la quale provoca, inevitabilmente, cambiamenti imponenti. Tutte le diverse componenti di un ecosistema giocano un ruolo importante nel mantenere il delicato equilibrio ecologico e tra queste anche i funghi, come più volte ricordato, risultano indispensabili.

I progressi nel campo della conservazione sono strettamente correlati all'evolversi delle conoscenze; ciò vale particolarmente per il Regno *Fungi* che, rispetto a quello *Plantae* e *Animalia* in particolare, può considerarsi poco esplorato, soprattutto nell'area mediterranea.

Sin dal passato vari naturalisti senesi si sono interessati allo studio della flora micologica. Fra questi si ricorda il contributo rivolto principalmente al mondo dei micromiceti patogeni di Attilio Tassi (1820-1905) e in particolare di Flaminio Tassi

(1851-1917) e Arturo Nannizzi (1877-1961), che in una serie di lavori pubblicati tra il 1896 e il 1905 ("Micologia della Provincia Senese") elencano con indicazione delle località 1770 specie fungine, fra cui anche 309 macromiceti. Le raccolte di Tassi e Nannizzi sono oggi conservate nella "*Mycotheca Universalis*", sezione dell'*Herbarium Universitatis Senensis*. L'importanza del lavoro svolto da questi studiosi è dimostrata anche dal fatto che due generi sono stati loro dedicati, "*Nannizzia*" e "*Flaminia*". Per quanto riguarda i macromiceti è il medico Francesco Valenti Serini (1795-1872) che dedicò gran parte della sua vita alla micologia. Fin dal 1838 iniziò a realizzare una serie di tavolette in terracotta con i corpi

fruttiferi dei macromiceti in altorilievo e riprodusse, sempre in terracotta, numerosissimi funghi a tutto rilievo, collezione conservata tutt'oggi all'Accademia dei Fisiocritici. A lui va riconosciuto il merito di aver compreso che solamente conoscendo la morfologia dei funghi in tutti gli stadi del loro sviluppo si possono prevenire gli avvelenamenti.

Dagli inizi degli anni '70 si è registrato un rinnovato interesse allo studio della micologia a Siena; più precisamente l'interesse è stato rivolto ai macromiceti, studiati sia da un punto di vista floristico che in senso più ecologico come comunità fungine. In questa sede viene riportato un breve excursus dell'esperienza senese in campo micologico nell'ultimo trentennio.

DISCUSSIONE

Indagini qualitative: tassonomia, flora, check-list e mappatura

Alla base di qualsiasi indagine e ricerca vi è senza dubbio una buona conoscenza tassonomica e nomenclaturale, indispensabile per la creazione di un linguaggio comune a tutta la comunità scientifica. In questo contesto si possono inserire le indagini micologiche volte alla descrizione di specie nuove: *Antrodia macrospora* Bernicchia & De Dominicis (BERNICCHIA, 1991), *Lindtneria hydnoidea* Bernicchia & Ryvarden (BERNICCHIA, RYVARDEN, 1998), *Mycena cupressina* Antonin & Maas Geest. (ANTONIN, MAAS GEESTERANUS, 1998), *Mycenella variispora* Robich (ROBICH, 1998), *Rhodocollybia giselae* Neville & Antonin (ANTONIN, NEVILLE, 1998) e *Vararia maremmana* Bernicchia (BERNICCHIA, 1992).

Indispensabile ai fini conservazionistici è anche la conoscenza della presenza/assenza e della distribuzione sul territorio delle varie specie. Il risultato finale di indagini micofloristiche mirate è dato dalla compilazione di liste di specie dalle quali si possono evidenziare quelle rare, limitate esclusivamente ad alcuni ambienti, e/o dare nuovi contributi per delimitare l'areale di distribuzione. Nuove e interessanti segnalazioni per la penisola Italiana sono legate agli studi senesi: per esempio *Geastrum pseudolimbatum* Hollós and *G. saccatum* (Fr.) Fischer (CALONGE *et al.*, 1991), *Ramariopsis pulchella* (Boud.) Corner (RICCI, PERINI, 2001).

Numerose sono le aree indagate sia nel territorio senese che in altre province toscane in cui è stato censito un gran numero di specie fungine (Tab. 1), dato questo che ha evidenziato come nel nostro territorio esista una flora micologica ricca e diversificata.

TABELLA 1

Sintesi delle indagini micofloristiche effettuate presso il Dipartimento di Scienze Ambientali "G. Sarfatti".

Synthesis of mycofloristic studies carried out at the Departement of Environmental Sciences "G. Sarfatti".

Bibliografia	Province indagate	N° Sp.
ANTONINI <i>et al.</i> , 1999	Pistoia	346
BARLUZZI, BIANCIARDI, 1970	Siena	160
BARLUZZI <i>et al.</i> , 1978	Siena	130
BARLUZZI <i>et al.</i> , 1980	Siena e Grosseto	108
BARLUZZI <i>et al.</i> , 1983	Arezzo, Siena, Grosseto	241
BARLUZZI <i>et al.</i> , 1996	Grosseto	204
BARLUZZI <i>et al.</i> , 1997	Siena, Pisa, Grosseto	593
LAGANÀ, SALERNI, 1999	Siena e Pisa	46
LAGANÀ <i>et al.</i> , 1999a	Pisa	265
PERINI <i>et al.</i> , 1999	Siena	235
PERINI <i>et al.</i> , 2002	Pistoia	70
SALERNI, Laganà, 2000	Siena	71
SALERNI <i>et al.</i> , 1998	Siena	389
SALERNI <i>et al.</i> , 2000b	Arezzo	153

Le osservazioni sono state rivolte sia agli ambienti naturali maggiormente diffusi che a quelli più peculiari. In questo senso si inserisce l'indagine fatta nelle aree umide (PERINI *et al.*, 2002) dell'Appennino Pistoiese che ha portato all'identificazione di 70 specie fungine, delle quali oltre 1/3 sono risultate nuove segnalazioni per la Toscana e il 50% sono elencate come più o meno minacciate nelle Red-List europee. Tale dato conferma, anche da un punto di vista micologico, la peculiarità di questo habitat. Nell'area toscana infatti le sfagnete montane sono di limitate dimensioni e ristrette geograficamente, e risultano fra gli ambienti da proteggere all'interno del progetto comunitario "Natura 2000" che implementa la direttiva Habitat 92/43.

Comunque anche nelle aree tipicamente mediterranee si ritrovano specie che necessitano di piani gestionali atti alla conservazione e alla salvaguardia. A questo proposito ricordiamo come nella Riserva del WWF di Burano, creata più di trent'anni or sono, si possano trovare specie (quali ad esempio *Gyrophragmium dunalii*, *Hydropus mediterraneus*, *Leucoagaricus menieri*, *Macrolepiota phaeodisca*, *Psathyrella ammophila*) tipicamente legate alle dune sabbiose e che probabilmente sarebbero scomparse in assenza della riserva stessa (BARLUZZI *et al.*, 1996). Ad esempio *P. ammophila* è descritta da MONTI *et al.* (2001) "... il rappresentante degli *Agaricales* più comune e ricorrente sui litorali sabbiosi del Mar Mediterraneo ...", ma visto che è stato sottolineato lo stretto rapporto con l'*Ammophiletaea* (COURTE-CUISE, 1984), vegetazione pioniera minacciata (ROMAO, 1996), è da ritenersi un'entità vulnerabile e da proteggere al pari dell'ambiente in cui vive (LAGANÀ, PERINI, 2002).

Per l'individuazione di habitat peculiari e specie rare e/o minacciate risultano indispensabili anche network di censimento e mappatura delle specie presenti nell'intero territorio: è in questo senso che l'Università di Siena in collaborazione con l'AGMT (Associazione Gruppi Micologici Toscani) ha attivato con l'ARSIA (Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione nel settore Agricolo-forestale) un progetto di censimento e mappatura. Risultato di questa prima indagine (1996-1998) sono oltre 10.000 record che sono andati a far parte di un data base contenente informazioni ecologiche e corologiche di 1191 specie fungine appartenenti a 247 generi (TOFACCHI, MANNINI eds., 1999).

Indagini quantitative: Micocenologia e monitoraggio

Di grande importanza per l'identificazione di habitat di particolare interesse micologico e per la loro eventuale salvaguardia è, altresì, la conoscenza ecologica. Le indagini micocenologiche sono quelle che, attualmente, risultano essere le più valide per determinare la composizione qualitativa e quantitativa di una comunità fungina in un determinato habitat o fitocenosi nonché per chiarire le esigenze ecologiche dei singoli taxa. A partire dalla fine degli anni '70 ricerche di questo tipo, innovative allora per l'Italia e possibili grazie alle esperienze nel campo fitosociologico

presenti presso l'Istituto di Botanica dell'Università Siena, sono state condotte in varie tipologie vegetazionali della Toscana: abetine, castagneti, lande a cal-luna, querceti sempreverdi e decidui (BARLUZZI *et al.*, 1986, 1987, 1992; DE DOMINICIS, BARLUZZI, 1983; LAGANÀ *et al.*, 1999b; PERINI *et al.*, 1989, 1995; SALERNI *et al.*, 2000a, 2001). Sulla base dei dati raccolti con metodologie standardizzate è stato possibile disegnare un quadro abbastanza completo delle micocenosi presenti nelle varie fitocenosi dalla costa tirrenica attraverso il sistema collinare fino all'Appennino, disegnare particolari andamenti come il ruolo e la composizione dei diversi gruppi trofici o il periodo di fruttificazione (BARLUZZI *et al.*, 1991; DE DOMINICIS *et al.*, 1992; LAGANÀ *et al.*, 2002b; LOPPI *et al.*, 1989; PERINI *et al.*, 1993, 1996; SALERNI *et al.*, 2002).

Di particolare interesse è risultato il Network europeo (1994-1996), che ha visto la collaborazione dell'Italia, della Polonia e della Repubblica Ceca; tale indagine fra l'altro ha evidenziato che anche da un punto di vista micologico l'ex Repubblica Cecoslovacca copre una posizione di transizione e l'Italia presenta una maggiore diversità specifica (PERINI *et al.*, 2000).

La valutazione dei cambiamenti che possono intervenire a carico della compagine fungina nel corso degli anni è un altro tipo di indagine utile ai fini conservazionistici. La regione Toscana è stata una delle prime Amministrazioni Italiane (1995) a occuparsi del monitoraggio del patrimonio forestale attraverso la creazione del progetto MON.I.TO., un programma di MONitoraggio Intensivo delle foreste TOscane. La sua struttura operativa è frutto della cooperazione tra ricercatori, amministratori ed esperti di settore e il programma è designato secondo livelli crescenti di intensità di monitoraggio. Il livello III, ovvero quello con il maggior numero di indicatori considerati, è stato applicato alle leccete, situate presso Colognole e a Cala Violina, dove è incluso anche il monitoraggio delle comunità fungine a livello di macromiceti. Lo studio delle cenosi fungine è finalizzato alla descrizione delle micocenosi presenti e al monitoraggio dei cambiamenti nel corso degli anni basandosi su specie campione, metodologia applicabile ampiamente una volta valutate caso per caso le specie campione (LAGANÀ *et al.*, 1996; SALERNI *et al.*, 1999). I dati relativi all'area di Poggio Carpineta a Cala Violina (Provincia di Grosseto), oggetto d'indagine da un punto di vista micocenologico già negli anni 1981-84 (PERINI *et al.*, 1989), sono stati successivamente raffrontati con quelli relativi al progetto MON.I.TO. (PERINI *et al.*, 1996). Su un totale di 100 specie fungine in 2000 m² degli anni ottanta e 85 specie rilevate durante il programma MON.I.TO., solamente 36 sono a comune fra i due archi d'anni d'osservazione, mentre 49 si aggiungono come "nuove": sembrerebbe che i funghi simbiotici stiano diminuendo, al contrario dei saprotrofi. Tali cambiamenti potrebbero essere dovuti al cambiamento di gestione forestale; infatti la lecceta di Cala Violina negli anni ottanta era un ceduo invecchiato mentre

oggi si presenta come un avviamento ad alto fusto con copertura arborea e principalmente quella arbustiva ridotta e conseguente maggior penetrazione di luce nel sottobosco (PERINI *et al.*, 1996).

Sempre in un contesto di monitoraggio ambientale si inserisce anche il dottorato di ricerca istituito nel 1997 dal Dipartimento di Scienze Ambientali di Siena mirato a "controllare", dopo 10-20 anni dalle iniziali indagini micocenologiche, alcuni ecosistemi forestali studiati precedentemente. Mediante un studio integrato delle comunità fungine e dei parametri ecologici e stazionali delle diverse aree permanenti indagate, si è cercato di aggiornare il quadro relativo alle conoscenze sulle specie fungine presenti, di segnalare eventuali specie differenziali preferenti o esclusive, rare, scomparse o notevolmente diminuite o comparse ex-novo, di individuare specie indicatrici, di fornire delle probabili spiegazioni ai cambiamenti intervenuti nel corso degli anni (LAGANÀ *et al.*, 2000a, b; 2002a). Si riporta come esempio il caso dei castagneti cedui di età differente l'una dall'altra ed ubicati ad altitudini diverse. I valori della micorrizal ratio, considerata da numerosi autori come indice di stato di salute del bosco, indicano che tutte le stazioni studiate sono in buone condizioni di salute. La percentuale di specie micorriziche però ha subito nell'arco degli ultimi 10 anni alcune variazioni, risultate significative dall'analisi statistica (Pearson's χ^2): se per le st. 1 e 3 essa ha subito un incremento, nella st. 2 il calo di simbiotici è stato ingente. Pur non trascurando la notevole influenza dei parametri climatici, che nel periodo di studio sono stati tutt'altro che favorevoli alla fruttificazione del micelio fungino, è possibile dare una spiegazione: la st. 2, dove è stato registrato il calo di micorrizici, è la più vecchia. In accordo con DIGHTON, MASON (1985) e MASON *et al.* (1987) è stato possibile concludere che l'invecchiamento del bosco e, per conseguenza, la gestione forestale, è uno dei principali parametri che influisce sulla comunità fungina, in particolare sulle specie simbiotici (LAGANÀ *et al.*, 2002).

CONCLUSIONI

Gli studi da intraprendere al fine di raccogliere le informazioni necessarie per la salvaguardia del patrimonio micologico sono dunque numerosi: partendo da una buona base tassonomica e nomenclaturale possono essere riassunti in indagini micofloristiche, cenologiche e di monitoraggio. I dati qualitativi e quantitativi ottenuti dalla serie di indagini esposte in questa sede e portate avanti in numerose comunità vegetali con metodologie standardizzate per svariati anni e monitorati nel tempo, danno un quadro abbastanza completo del "dove e perché" delle specie fungine. Tali dati risultano essere un utile strumento per la compilazione di Red-List le quali sono alla base di qualsiasi progetto di gestione e conservazione del patrimonio ambientale.

Alcuni Paesi del Centro-nord Europa, disponendo di una grande quantità di dati per lunghi periodi d'anni, hanno elaborato liste rosse regionali e/o naziona-

li; altri hanno stilato liste più o meno complete, a seconda dei vari livelli di conoscenze. Una Red-List europea preliminare è stata pubblicata da ING (1993), ma per il suo completamento sono necessari altri dati soprattutto relativi ai Paesi mediterranei. Queste lacune, accompagnate dalla oggettiva difficoltà ad operare in campo micologico, costituiscono i motivi principali del perché fino ad oggi i funghi non siano stati considerati nei vari progetti comunitari di salvaguardia ambientale. A tal proposito di particolare rilievo è il lavoro che ha condotto e sta conducendo l'European Council for the Conservation of Fungi (ECCF), nel quale da anni anche l'Università di Siena è rappresentata; dal continuo network di questo organismo emergono le priorità in campo micologico-conservazionistico in cui i vari Paesi membri si impegnano ad operare. Nel 2001, in base alle liste rosse ufficiali, ha elaborato un elenco di 33 specie fungine da proporre per l'inserimento nell'Appendice 1 della Convenzione di Berna (Convention on the conservation of European wild-life and natural habitats). Grazie all'impegno di questo gruppo è stato possibile includere anche i micologi nelle organizzazioni nate al fine di salvaguardare la biodiversità a vari livelli: per esempio nella World Conservation Union (IUCN) ad oggi esiste la "Species Survival Commission of Fungi". È auspicabile che, in una visione planetaria della conservazione, e in alcuni casi della restaurazione, del patrimonio fungino, i vari organismi (ECCF, IUCN, Planta Europa) collaborino e cooperino coinvolgendo anche quelli mediterranei come l'Organization for the Phyto-Taxonomic Investigation of the Mediterranean Area (OPTIMA) e la Società Botanica Italiana (S.B.I.).

LETTERATURA CITATA

- ANTONIN V., MAAS GEESTERANUS, 1998 - *Mycena cuprescens*, a new species of section *Supinae* from Italy. *Persoonia*, 16 (4): 545-547.
- ANTONIN V., NEVILLE P., 1998 - *Rhodocollybia giselae*, a new species from the Mediterranean region in Europe. *Czech Mycol.*, 50 (3): 181.
- ANTONINI D., ANTONINI M., LAGANÀ A., SALERNI E., 1999 - *Mycoflora of the beech woods of the northern Apennine (Toscana - Italy)*. *Doc. Myc.*, XXIX(115): 69-78.
- BARLUZZI C., BELLÙ F., COMANDINI O., PADOVAN F., PERINI C., 1996 - *Studi micofloristici nella riserva naturale del Lago di Burano (GR). 1. Elenco micofloristico*. *AMB-Pagine di micologia*, 6: 62-73.
- BARLUZZI C., BIANCIARDI V., 1970 - *Macromiceti raccolti nella Provincia di Siena*. *Inform. Bot. Ital.*, 2(1): 21-41.
- BARLUZZI C., DE DOMINICIS V., MARCHETTI P., 1980 - *Macromiceti nuovi per il Senese e il Grossetano*. *Inform. Bot. Ital.*, 12: 61-70.
- BARLUZZI C., DE DOMINICIS V., MARCHETTI P., PERINI C., 1983 - *Macromiceti nuovi per le provincie di Arezzo, Siena e Grosseto*. *Mic. Ital.*, 12(1): 37-54.
- BARLUZZI C., GOVI G., LAGANÀ A., PERINI C., SALERNI E. (EDS.), 1997 - *Atti delle 4^e giornate della Confederazione Europea di Micologia Mediterranea CEMMae*. Poggibonsi, 4 - 9 Novembre 1996.
- BARLUZZI C., MARIANI M., APPELLA R., 1978 - *Macromiceti nuovi per il senese*. *Inform. Bot. Ital.*, 10(2): 229-238.
- BARLUZZI C., PERINI C., CHIARUCCI A., LOPPI S., DE DOMINICIS V., 1991 - *Relazioni fra micocenosi e fitocenosi. I. I saprotrofi lignicoli e di lettiera*. *Inform. Bot. Ital.*, 23 (2-3): 163-167.
- BARLUZZI C., PERINI C., DE DOMINICIS V., 1986 - *Ricerche geobotaniche in Val di Merse (Toscana meridionale). II. Micocenologia delle lande a calluna*. *Mic. Ital.*, 2: 39-48.
- BARLUZZI C., PERINI C., DE DOMINICIS V., 1992 - *Coenological research on macrofungi in chestnut coppices of Tuscany*. *Phytocoenologia*, 20(4): 449-465.
- BARLUZZI C., PERINI C., DE DOMINICIS V., BARKMAN J.J., 1987 - *Studi micocenologici in castagneti della Toscana centro-meridionale*. *Not. Fitosoc.*, 23: 189-196.
- BERNICCHIA A., 1991 - *Polyporaceae s.l. in Italia*. *Ist. Pat. Veg. Univ. Bologna*.
- , 1992 - *Some new or rare Basidiomycetes (Aphyllophorales) from Italy*. *Mycotaxon*, XLIII: 317-326.
- BERNICCHIA A., RYVARDEN L., 1998 - *A new species of Lindtneria from Italy*. *Mycol. Res.*, 102(4): 502-504.
- CALONGE F. D., DE DOMINICIS V., BARLUZZI C., PERINI C., 1991 - *Geastrum pseudolimbatum Hollòs and G. saccatum (Fr.) Fischer (Gasteromycetes) in Italy*. *Bol. Soc. Mic. Madrid*, 15: 177-181.
- COURTECUISSÉ R., 1984 - *Transect mycologiques dunaires sur la cote d'Opale (France). 1^{ère} partie: Le groupements heliophiles et arbustifs de la xerosère*. *Doc. Mycol.*, 15(57-58): 1-115.
- DE DOMINICIS V., BARLUZZI C., 1983 - *Coenological research on macrofungi in evergreen oak woods in the hills near Siena (Italy)*. *Vegetatio*, 54: 177-187.
- DE DOMINICIS V., BARLUZZI C., PERINI C., CHIARUCCI A., LOPPI S., 1992 - *Modifications of mycocoenoses and phytocoenoses due to degradation of chestnut coppices in central Italy*. *Mycol. Helv.*, 5: 175-194.
- DIGHTON J., MASON P.A., 1985 - *Mycorrhizal dynamics during forest tree development*. In: D. MOORE et al. (eds.), *Developmental Biology of Higher Fungi*: 117-139. Cambridge University Press, Cambridge.
- ING, B., 1993 - *Towards a Red List of endangered European macrofungi*. In: D.N. PEGLER et al. (eds): *Fungi in Europe: Investigation, Recording and Conservation*: 231-237. Royal Botanic Gardens, Kew.
- LAGANÀ A., ANGIOLINI C., LOPPI S., PERINI C., BARLUZZI C., DE DOMINICIS V., 2002b - *Periodicity, fluctuations and successions of macrofungi in fir forests (Abies alba Miller) in Tuscany, Italy*. *For. Ecol. Manag.*, 169: 187-202.
- LAGANÀ A., PERINI C., 2002 - *Psathyrella ammophila (Durieu & Lév.) P.D. Orton: specie comune o entità da proteggere?* *Mic. Ital.*, XXXI (2): 28-34.
- LAGANÀ A., SALERNI E., 1999 - *Corticoid and steroid basidiomycetes of deciduous oak woods in central-southern Tuscany (Italy)*. *Mic. Veg. Medit.*, XIV(1): 84-88.
- LAGANÀ A., SALERNI E., BARLUZZI C., DE DOMINICIS V., PERINI C., 1999a - *Contribution to the knowledge of the Tatti Forests (Tuscany - Italy): mycofloristic investigations*. *Mycol. Helv.*, 10(2): 51-79.
- LAGANÀ A., SALERNI E., BARLUZZI C., PERINI C., DE DOMINICIS V., 1999b - *Mycocoenological studies in Mediterranean forest ecosystems: basophilous deciduous oak woods of central-southern Tuscany (Italy)*. *Czech Mycol.*, 52(1): 1-16.
- , 2000a - *Indagini preliminari sullo stato di salute di boschi a Quercus ilex L. della Toscana centro-meridio-*

- nale (Italia). *Mic. Ital.*, 2: 17-28.
- , 2000b - *Mycocoenology and biomonitoring in Abies alba Miller woods of central-southern Tuscany (Italy)*. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 69(4): 293-298.
- , 2002 - *Macromycetes as long-term indicators of forest health and management in central Italy*. *Cryptog. Mycol.*, 23 (1): 39-50.
- LAGANÀ A., SALERNI E., PERINI C., 1996 - *Mycocoenological monitoring*. In: BARTOLOZZI L. et Al. (eds.), *Programm MONITO. Concepts, Structure and 1995 Results*: 63-65. Regione Toscana/Giunta Regionale Publisher, Firenze.
- LOPPI S., BARLUZZI C., PERINI C., DE DOMINICIS V., 1989 - *Considerazioni preliminari sull'ecologia di cenosi fungine in ambiente mediterraneo e submediterraneo*. *Mic. Veg. Medit.*, 4: 33-42.
- MASON P. A., LAST F. T., WILSON J., DEACON J. W., FLEMING L. W., FOX F. M., 1987 - *Fruiting and succession of ectomycorrhizal fungi*. In: PEGG G.F., AYERS P.G. (eds.), *Fungal infections of plants*: 253-268. Cambridge University Press, Cambridge.
- MONTI G., GORRERI L., MARCHETTI M., FRANCHI P., 2001 - *Funghi di ambienti dunali. Indagine negli ecosistemi dunali del Parco Naturale Migliarino San Rossore Massaciuccoli*. Univ. Pisa, Ente Parco Regionale Migliarino San Rossore Massaciuccoli.
- PERINI C., BARLUZZI C., COMANDINI O., DE DOMINICIS V., 1995 - *Mycocoenological research in fir woods in Tuscany (Italy)*. *Doc. Mycol.*, 25 (98-100): 317-336.
- PERINI C., BARLUZZI C., DE DOMINICIS V., 1989 - *Mycocoenological research in evergreen oak woods in the hills adjacent the Maremma coastline (NW of Grosseto, Italy)*. *Phytocoenologia*, 17(3): 289-306.
- , 1993 - *Fungal communities in mediterranean and sub-mediterranean woodlands*. In: D.N. PEGLER (eds), *Fungi of Europe: Investigation, Recording and Conservation*: 77-92. Royal Botanic Gardens, Kew.
- , 1996 - *Seasonal fruit body production of macrofungi in Mediterranean vegetation*. *Bocconea*, 5(1): 359-373.
- PERINI C., BONINI I., ROMAGNOLI P., ANTONINI D., ANTONINI M., 2002 - *Macrofungi and bryophytes of montane mires (Tuscany, Italy): organisms worthy of conservation*. *Feddes Repert.*, 113: 152-160.
- PERINI C., LAGANÀ A., SALERNI E., BARLUZZI C., 1996 (2000) - *Monitoring of macrofungi in evergreen oak woods of Tuscany: the permanent plot of Poggio Carpina*. *Proc. Workshop, Bivona (Agrigento), Italy - 22.05.1998*. *Quad. Bot. Ambientale Appl.*, 7: 155-159.
- PERINI C., LAGANÀ A., SALERNI E., BARLUZZI C., DE DOMINICIS V., 1999 - *Mycofloristic investigations in the geothermal area of Travale-Radicondoli (Tuscany, central Italy)*. *Webbia*, 54(1): 149-173.
- PERINI C., SALERNI E., LAGANÀ A., BARLUZZI C., DE DOMINICIS V. (coll. LAWRYNOWICZ M., FELLNER R.), 2000 - *Monitoraggio di macromiceti in querceti europei: primi risultati di un progetto pilota*. In: Centro Studi Micologici (ed.), *Micologia 2000*: 415-421.
- RICCI G., PERINI C., 2001 - *Ritrovamenti interessanti: Ramariopsis pulchella (Boud.) Corner*. *RdM*, 2: 135-142.
- ROBICH G., 1998 - *Mycenella variispora, a new Mycenella from Italy*. *Mycotaxon*, LXVII: 129-137.
- ROMAO C., 1996 - *Interpretation manual of European Union Habitats*. Version EUR 15.
- SALERNI E., LAGANÀ A., 2000 - *Conservazione e restaurazione della flora fungina delle abetine del Monte Amiata: primi risultati*. *Mic. Ital.*, 3: 41-49.
- SALERNI E., LAGANÀ A., BARLUZZI C., DE DOMINICIS V., PERINI C., 1998 - *Mycofloristic studies in deciduous oak-woods of the province of Siena (Tuscany, Italy)*. *Fl. Medit.*, 8: 92-133.
- SALERNI E., LAGANÀ A., BARLUZZI C., PERINI C., DE DOMINICIS V., 2000a - *Fungal communities of acidophilous Quercus cerris woods: comparison with mycocoenoses of other forest ecosystems of central-southern Tuscany (Italy)*. *Doc. Myc.*, XXIX(116): 53-70.
- SALERNI E., LAGANÀ A., DE DOMINICIS V., 2001 - *Mycocoenological studies in deciduous oak woods of central-southern Tuscany (Italy)*. *Cryptog. Mycol.*, 22(1): 35-55.
- SALERNI E., LAGANÀ A., PERINI C., DE DOMINICIS V., 1999 - *MONITO: Intensive monitoring of forests in Toscana*. *Mic. Ital.*, 3: 20-30.
- SALERNI E., LAGANÀ A., PERINI C., LOPPI S., DE DOMINICIS V., 2002 - *Effects of temperature and rainfall on fruiting of macrofungi in oak forests of the Mediterranean area*. *Israel J. Plant Sci.*, 50: 189-198.
- SALERNI E., PERINI C., LAGANÀ A., MAZZESCHI A., DE DOMINICIS V., 2000b - *La biodiversità macromicetica delle Riserve Naturali di "Ponte a Buriano e Penna", Valle dell'Inferno e Bandella" e Sasso di Simone" (AR): primi risultati*. *Atti Accad. Fisiocritici Siena, ser. XV, tomo XIX*: 23-34.
- TOFACCHI L., MANNINI M. (eds.), 1999 - *I funghi in Toscana. Mappatura e censimento dei macromiceti epigei*. Bandecchi & Vivaldi, Pontedera (FI).

RIASSUNTO - Di fronte alle allarmanti perdite registrate a carico della biodiversità a vari livelli, studi mirati alla conservazione del patrimonio biologico hanno, in questi ultimi anni, assunto una notevole importanza. Un breve excursus storico precede la descrizione dettagliata delle ricerche iniziate a Siena negli anni '70. In particolare le indagini micocenologiche, che delineano in dettaglio, sia qualitativamente che quantitativamente, la componente micologica di una comunità vegetale, si sono dimostrate di fondamentale importanza come base per ulteriori applicazioni. Partendo da un quadro abbastanza completo delle compagini fungine presenti in determinati ambienti attraverso monitoraggi prolungati è possibile seguire, nel tempo, lo stato di una/alcune specie o dell'intera comunità e costituire protocolli di lavoro per progetti di conservazione del patrimonio fungino. I dati derivanti dall'insieme di queste ricerche inoltre rappresentano la base per la compilazione di liste rosse, strumento utile per la pianificazione ambientale in genere.

AUTORI

Claudia Perini, Elena Salerni, Angela Laganà, Dipartimento di Scienze Ambientali "G. Sarfatti", Università di Siena, Via P. A. Mattioli 4, 53100 Siena, Italia, E-mail: perini@unisi.it

Check-list dei basidiomiceti della Regione Lombardia

E. SAVINO, C. BURATTI, E. SALERNI e C. PERINI

ABSTRACT – *Check-list of macroscopic Basidiomycetes in Lombardy (Italy)* - It is underlined the importance to know the presence and distribution of macromycetes, a first step to point out threatened fungi, to be included in an Italian red-list. Preliminary data referred to macrofungal check-list of Lombardy, one of the major Italian Region, are presented and a few threatened species are discussed.

Key words: check-list, Italy, Lombardia, macrofungi

INTRODUZIONE

Il problema di censire, o meglio mappare, i macroomiceti fu sollevato dalla comunità scientifica già negli anni '60 (LANGE, 1974). Conoscere la distribuzione di questi organismi è una premessa necessaria per stabilire se sul territorio esaminato ci sono specie rare o minacciate, che quindi andrebbero incluse nelle "liste rosse" degli organismi di cui tutelare la conservazione della biodiversità.

La check-list relativa ai basidiomiceti presenti in Lombardia è stata realizzata nell'ambito di progetti nazionali ("Check-list delle specie fungine italiane" – Ministero dell'Ambiente, Servizio Conservazione della Natura e Università della Tuscia; "Una rete integrata di banche dati sulla biodiversità delle crittogame in Italia" – COFIN 2000) che prevedevano l'inserimento omogeneo delle informazioni raccolte in specifici database.

L'idea di stendere una check-list dei macroomiceti che risultano fruttificare sul suolo italiano risale ai primi anni '80 (AIELLO *et al.*, 1980), ma solo negli ultimi anni si è riusciti a concretizzare i progetti iniziali (BELLU', ROSSI, 1994; ONOFRI, 1994; PADOVAN, 1994; LO BUE, 1994, 1997; LAGANA' *et al.*, 1996; MONTI, ANSALDI, 1996). In questo, l'Italia si è trovata in ritardo rispetto ad altri paesi europei, ma si può avanzare la conclusione che principalmente con il network degli ultimi anni è stato recuperato molto. La Lombardia è una delle regioni italiane più estese, con una superficie di 23857 km², e al suo interno si articola in zone morfologicamente differenziate: montagna (Alpi, Prealpi e Appennini), collina, alta pianura asciutta e bassa pianura irrigua, oltre a fiumi e laghi. Il clima è tipicamente continentale, con sensibili variazioni se si passa dalla montagna alla pianu-

ra; inoltre le grandi conche lacustri mitigano le condizioni climatiche dei territori circostanti.

Tutti questi fattori si riflettono anche sulla biodiversità fungina.

RACCOLTA DATI

Nonostante non sia mai stato effettuato un lavoro di censimento specifico, esteso a tutto il territorio lombardo, è stato possibile reperire parecchi dati in quanto nelle diverse aree operano da tempo numerosi micologi, per la maggior parte "amatori", che hanno raggiunto un notevole livello di conoscenza e di competenza nel settore. La presente lista è stata compilata sulla base dei dati riportati in letteratura e su comunicazioni personali di Gruppi Micologici che hanno collaborato a questo progetto.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le informazioni rinvenute sono cospicue, ma vanno lette con attenzione consultando la bibliografia e tenendo conto delle esperienze personali, perché a volte risultano da indagini puntiformi: infatti sono state censite più di 2000 specie, di cui però circa il 40% è stata indicata una sola volta, ossia è segnalata fruttificare in una sola area del territorio lombardo.

Pur tenendo conto di ciò, è possibile, in base ai dati ad oggi disponibili, indicare alcune specie che vengono ritenute critiche dalla comunità scientifica internazionale (VENTURELLA *et al.*, 1997; BERN CONVENTION, 2001).

Vengono qui di seguito riportati alcuni esempi di specie critiche segnalate sul territorio lombardo.

- *Entoloma percandidum* Noordel.: questa specie

viene citata in varie liste rosse europee. In Lombardia è stata segnalata solo una volta in provincia di Varese, nel mese di luglio (AMB GRUPPO VA, 2000). La presenza di questa specie sul territorio italiano attualmente risulta essere decisamente sporadica, con una sola segnalazione, oltre a quella lombarda, relativa alla Toscana, in un ambiente particolare come è quello delle sfagnete (PERINI *et al.*, 2002).

- *Flammulina fenae* Bas: questo fungo è un saprotrofo lignicolo di alberi decidui (BAS, 1995), su suoli ricchi. È stato trovato a Vigevano (PV) su detriti legnosi interrati, durante la stagione invernale (GAGGIANESE *et al.*, 2002). Questa sembra essere l'unica segnalazione per il suolo italiano. Non è una specie inclusa in red-list, ma è considerata rara in alcuni paesi europei, come per es. l'Olanda, ed è più frequente in altri come per es. Danimarca, Germania, Francia, Cecoslovacchia e Ungheria.

- *Galerina paludosa* (Fr.) Kühner: questo fungo è in generale descritto come specie legata ad ambienti paludosi (STRIDVALL, STRIDVALL, 1989) o strettamente sfagnicola (MOREAU, 1995). In Italia è stata rinvenuta in Lombardia, in provincia di Varese (AMB GRUPPO VA, 2000), in Liguria (ZOTTI, ORSINO, 2000), in Toscana (PERINI *et al.*, 2002) e in Trentino-Alto Adige (LONATI, 1998). Tali segnalazioni confermano, anche per il nostro paese, la predilezione di questo taxon per questo peculiare habitat. Per quanto riguarda il trofismo di questa specie ancora sussistono perplessità; come riportano vari autori la strategia di sopravvivenza da saprotrofa a parassita è dubbia (ARNOLDS *et al.*, 1995). Secondo una serie di analisi effettuate da Redhead (ARNOLDS, 1992) il micelio di *Galerina paludosa*, *in vitro*, forma austori nelle cellule vive di rizoidi di sfagno senza un visibile danno alla pianta; l'autore Redhead chiama questa associazione un parassitismo bilanciato.

- *Hygrocybe calyptriformis* (Berk. & Broome) Fayod: questa specie è stata inclusa nella categoria IUCN "Critically Endangered (CR)" (ANTONINI, ANTONINI, 2001). Non solo è inclusa tra le specie inglesi da proteggere (DUCKWORTH *et al.*, 2002) ma, nel Regno Unito, è diventata anche il simbolo per la conservazione dei funghi, essendo designata come specie prioritaria nella politica del mantenimento e salvaguardia delle waxcap-grasslands.

Si tratta di un fungo saprotrofo, facile da determinare, che cresce nelle praterie, sia di pianura che di montagna. In Italia viene segnalata in poche aree ristrette: due località in Toscana, una in prossimità di Belluno e una in Lombardia, presso il comune Brallo di Pregola, nell'Oltrepò pavese (CANDUSSO, 1997).

- *Hygrophorus purpurascens* (Alb. & Schwein. : Fr.) Fr.: risulta essere una specie simbiote di *Picea alba* estremamente rara, inclusa in numerose red-list (Austria, Finlandia, Germania, Svezia, Svizzera, ecc.) oltre che a essere dichiarata ufficialmente scomparsa in Olanda. In Italia viene segnalata solo in Lombardia, nel Parco dello Stelvio (MERALDI, 1999), e in Trentino Alto Adige (Marco Floriani, liste personali).

- *Russula camarophylla* Romagnesi: specie rarissima,

rinvenuta più volte nella Pineta di Clusone (BG), che è un bosco misto con pino silvestre, abete rosso e qualche latifolia (SARNARI, 1998). L'unica altra segnalazione in Italia è relativa al Trentino Alto Adige (Marco Floriani, liste personali).

CONCLUSIONI

Il risultato ottenuto non può essere considerato esaustivo, ma già da questo primo lavoro sono emersi dati interessanti relativi a specie che andrebbero tutelate, in quanto rare o minacciate.

LETTERATURA CITATA

- AIELLO N., BATTIATO A., PICCIONE V., SIGNORELLO P., ACCORSI C.A., GOVI G., 1980 - *Proposta di Banca Dati su computer per macromiceti*. Mic. Ital., 3: 3-10.
- A.M.B. GRUPPO DI VARESE, 2000 - *Censimento dei funghi della Provincia di Varese*. Nicolini (ed.), Gavirate (VA). 156 pp.
- ANTONINI D., ANTONINI M, 2001 - *Programmi e strategie per la conservazione dei funghi*. Riv. Micol., 3: 253-271.
- ARNOLDS, E., 1992 - *Macrofungus communities outside forests*. In: WINTERHOFF W. (ed.), *Fungi in vegetation science*. Kluwer Academic Publishers.
- ARNOLDS E., KUYPER TH.W., NOORDELOOS E.M. (eds.), 1995 - *Overzicht van de paddestoelen in Nederland*. Wijster, Nederlandse Mycologische Vereniging. 872 pp.
- BAS C., 1995 - *Tribus Pseudohiatulaceae (Sing.) Sing., Agaricales mod. Taxon*. In: *Flora Agaricina Neerlandica*, vol. 3: 171-172.
- BELLU' F., ROSSI C., 1994 - *Le prime 25 specie del mappaggio cartografico italiano*. Pag. Micol., 2: 19-46.
- BERN CONVENTION - Appendice I: The official document is labelled T-PVS(2001) 34 .
- CANDUSSO M., 1997 - *Hygrophorus s.l.*. In: *Funghi Europei*. Libreria Basso (ed.), Albenga (SV). 784 pp.
- DUCKWORTH J.C., EVANS S.E., FLEMING L.V., 2002 - *Funghi within the UK Biodiversity Action Plan*. IMC7, Oslo, 11-17 August 2002. 387 pp.
- GAGGIANESE E., NOBILI G., PARRETTINI G., PRIM A., 2002 - *Funghi*. In: *Atlante della biodiversità nel Parco Ticino*. Vol. 1. Consorzio Lombardo Parco del Ticino, Pontevecchio di Magenta (MI). 406 pp.
- LAGANA' A., SALERNI E., PERINI C., BARLUZZI C., DE DOMINICIS V., 1996 - *Studi preliminari di comunità fungine in querceti decidui su terreno calcareo (Toscana centro-meridionale)*. Mic. Ital., 1: 13-22.
- LANGE L., 1974 - *The Distribution of Macromycetes in Europe*. Dansk Bot. Archiv., 30 (1): 1-105.
- LO BUE G., 1994 - *Mappatura dei funghi: confronto fra banche dati europee*. Mic. Ital., 2: 51-62.
- , 1997 - *Recording and mapping of fungi in Italy*. Bocccone, 5: 389-394.
- LONATI G., 1998 - *Funghi rari o poco conosciuti: Galerina heterocystis (Atk.) Sm. & Sing. - Galerina moelleri Bas - Galerina tibiicystis (Atk.) Kühn. - Galerina paludosa (Fr.) Kühn*. Boll. AMER 43, anno XIV: 3-12.
- MERALDI P., 1999 - *I funghi del Parco Nazionale dello Stelvio*. Parco Naz. Dello Stelvio (ed.), Sondrio. 56 pp.
- MONTI G., ANSALDI M., 1996 - *Cartographie de quelques macromycetes de la province de Pisa*. Fl. Medit., 6: 43-56.
- MOREAU J., 1995 - *Premières bases pour le recensement des Champignons supérieurs de l'Arrêté de biotope des Saisies*. Ricerca scientifica inedita per l'Office National des

Forêts d'Albertville.

ONOFRI S., 1994 - *Il programma di censimento e cartografia delle specie fungine*. Mic. Ital., 2: 23-26.

PADOVAN F., 1994 - *Mappatura dei macromiceti in Italia (problemi cartografici)*. Riv. Micol., 1: 59-69.

PERINI C., BONINI I., ROMAGNOLI P., ANTONINI D., ANTONINI M., 2002 - *Macrofungi and bryophytes of montane mires (Tuscany, Italy): organisms worthy of conservation*. Feddes Repert., 113 (1-2): 152-160.

SARNARI M., 1998 - *Monografia illustrata del genere Russula in Europa. Tomo Primo*. A.M.B., Trento. 799 pp.

STRIDVALL L., STRIDVALL A., 1989 - *Svampar i vitmossa. Jordstjärnan*, 10 (1): 39-67.

VENTURELLA G., PERINI C., BARLUZZI C., PACIONI G., BERNICCHIA A., PADOVAN F., QUADRACCIA L., ONOFRI S., 1997 - *Towards a Red Data List of fungi for Italy*. Bocconea, 5: 867-872.

ZOTTI M., ORSINO F., 2000 - *The check-list of Ligurian macrofungi*. Fl. Medit., 11: 115-294.

RIASSUNTO - La check-list relativa ai basidiomiceti pre-

sentì in Lombardia è stata realizzata nell'ambito di progetti nazionali che prevedevano l'inserimento omogeneo delle informazioni raccolte in specifici database. La Lombardia è una delle regioni italiane più estese, al suo interno si articola in zone morfologicamente differenziate: montagna, collina, pianura, fiumi e laghi. Il clima è tipicamente continentale, con sensibili variazioni se si passa dalla montagna alla pianura; inoltre le grandi conche lacustri mitigano le condizioni climatiche dei territori circostanti. Tutti questi fattori si riflettono anche sulla biodiversità fungina. Nonostante non sia mai stato effettuato un lavoro specifico di censimento esteso a tutto il territorio lombardo, è stato possibile reperire parecchi dati in quanto nelle diverse aree operano da tempo numerosi micologi. La presente lista è stata compilata sulla base dei dati riportati in letteratura e su comunicazioni personali di Gruppi Micologici che hanno collaborato a questo progetto. Il risultato ottenuto non può essere considerato esaustivo, ma già da questo primo lavoro sono emersi dati interessanti relativi a specie che andrebbero tutelate, in quanto rare o minacciate.

AUTORI

Elena Savino, Chiara Buratti, Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri - sez. Micologia, Università di Pavia, Via S. Epifanio 14, 27100 Pavia, esavino@et.unipv.it

Claudia Perini, Elena Salerni, Dipartimento di Scienze Ambientali "G. Sarfatti", Università di Siena, Via P.A. Mattioli 4, 53100 Siena, perini@unisi.it

La Check-list dei basidiomiceti del Piemonte e della Valle d'Aosta: passato e futuro

A. VIZZINI, V. FILIPELLO MARCHISIO e C.A.M.P.A.L.

ABSTRACT - *The Basidiomycetes Check-list of Piedmont and Valle d'Aosta: past and future*- Preliminary data referred to macroscopic *Basidiomycetes* check-list of Piedmont and Valle d'Aosta are presented and a few exotic, rare or threatened species are proposed and discussed.

Key words: *Basidiomycetes*, check-list, Italy, macromycetes, Piedmont and Valle d'Aosta

INTRODUZIONE

I funghi che formano sporofori o stromi di dimensioni superiori a 1 mm e quindi facilmente individuabili ad occhio nudo (ARNOLDS, 1981), vengono colloquialmente definiti macromiceti. Essi appartengono prevalentemente ai *Basidiomycetes* e in minor misura agli *Ascomycetes*. I macromiceti svolgono funzioni fondamentali nell'ambito degli ecosistemi, come saprotrofi decompositori o simbionti ectomicorrizici, costituiscono una risorsa trofica non trascurabile per insetti, micro e macromammiferi (uomo compreso) e possono essere utilizzati come validi bioindicatori di salute ambientale e di impatto antropico (ARNOLDS, 1992). Negli ultimi anni poi alcuni macrobasidiomiceti hanno trovato applicazione in numerosi processi biotecnologici (OSIEWACZ, 2002). Avere quindi un quadro preciso della presenza e distribuzione delle specie è fondamentale per mettere in atto iniziative per la protezione e conservazione della biodiversità e può fornire informazioni utili per un check up dello stato di salute di aree naturali. L'esigenza di produrre check-list e di mappare tali funghi fu sentita fin dagli anni '30 (KREISEL, 1962, 1971, 1973; LANGE, 1974), ma fu solo nel 1960, in occasione del secondo Congresso Europeo di Micologia a Praga, che furono gettate le basi e fornite le linee guida per un progetto di studio della distribuzione dei macromiceti europei (ROMAGNESI, 1961; LANGE, 1974).

Piuttosto in ritardo rispetto agli altri paesi europei, la micologia italiana ha recepito solo all'inizio degli anni '80 tali istanze, con un primo tentativo di proposta per una banca dati nazionale computerizzata (AIELLO *et al.*, 1980) e successivamente producendo

alcuni dati preliminari (BELLÙ, ROSSI, 1994; ONOFRI, 1994; PADOVAN, 1994; LO BUE, 1994, 1997; MONTI, ANSALDI, 1996; VENTURELLA *et al.*, 1997).

Lo studio dei *Basidiomycetes* (*Hymenomycetes*) del Piemonte e della Valle D'Aosta si colloca nell'ambito delle attività del Gruppo di Lavoro per la Micologia della Società Botanica Italiana ed è parte del programma di check-list delle specie fungine italiane finanziato dal Ministero dell'Ambiente e coordinato dal Prof. S. Onofri (Università della Tuscia, Viterbo). Questa iniziativa costituisce un primo passo verso la stesura di una red-list.

RACCOLTA DATI

Per la produzione della check-list, il coordinatore d'area V. Filipellico Marchisio, il referente regionale A. Vizzini, con il supporto informatico di F. Cerruti, hanno operato in collaborazione con 8 associazioni micologiche locali aderenti al C.A.M.P.A.L. (Coordinamento delle Associazioni Micologiche Piemontesi, Aostane e Liguri), 7 piemontesi e 1 aostana; il loro contributo, vista la scarsità di informazioni su base bibliografica, è stato essenziale per la realizzazione del progetto.

NATURA DEI DATI

Per quanto riguarda il Piemonte, le fonti di riferimento dei dati sono state:

- Pubblicazioni ufficiali (fonti bibliografiche), quali riviste nazionali ed internazionali, monografie, tesi di laurea;

- Liste di raccolta, personali, di gruppi micologici, di mostre micologiche, di convegni, di escursioni, di ispettorati micologici;
- Comunicazioni orali.

La Valle D'Aosta è un'area micologicamente quasi inesplorata, con un solo gruppo micologico operante da pochi anni sul territorio. Gli unici dati provengono dalle informazioni contenute in due tesi di laurea, "Ruolo dello Scoiattolo rosso (*Sciurus vulgaris* L.) nella dispersione delle spore fungine e nel mantenimento dell'ecosistema forestale" (123 specie, FALCHERO, 2002) e "Ricerche micocologiche sugli ectosimbionti del pino uncinato nel Parco Naturale Mont Avic" (100 specie, PERETTI, 1999) e da liste di specie esposte durante la mostra micologica annuale di Aosta. Data l'esiguità delle segnalazioni per la Valle d'Aosta, le riflessioni e considerazioni che seguiranno, riguarderanno essenzialmente il Piemonte.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La maggior parte delle segnalazioni (79%) provengono dalle liste di varia natura e dalle comunicazioni orali, in minima parte dalle pubblicazioni (21%). Le informazioni che accompagnano i dati di raccolta sono risultate estremamente eterogenee, dalla semplice menzione del ritrovamento, alle precise indicazioni di substrato e di *habitat*, spesso corredate da valide osservazioni. Per un certo numero di casi, sono disponibili anche materiale di erbario e supporto iconografico (diapositive). Il 58% delle segnalazioni riportano indicazioni precise sulla località del ritrovamento e di queste, il 52% proviene dalla provincia di Cuneo ed il 35% da quella di Torino.

Raccogliendo e vagliando questa mole di informazioni, si è giunti a redigere un inventario costituito, per la Valle D'Aosta, da 412 ritrovamenti, riconducibili a 236 specie e 243 entità, intendendo come entità l'insieme delle specie, sottospecie, varietà e forme; per il Piemonte di 4576 ritrovamenti pari a 1379 specie e 1441 entità.

Le *Agaricales s.l.* (comprendenti anche *Boletales* e *Russulales*) costituiscono la stragrande maggioranza delle specie segnalate per Piemonte e Valle D'Aosta (rispettivamente 1063 e 192).

Le *Aphylophorales*, i "fragmobasidiomiceti" e i "gasteromiceti" vengono poco citati, non in quanto *taxa* rari o con particolari esigenze nutrizionali, climatico-edafiche, ma perché a volte di difficile individuazione in campo (basidiomi inconspicui, evanescenti, lichenicoli, micoparassiti a localizzazione intrainveniente) e spesso di difficile classificazione anche per gli esperti e quindi trascurati. Richiedono letteratura specialistica, grande esperienza e manualità, perizia nella preparazione delle sezioni, nell'allestimento dei preparati e nelle osservazioni microscopiche. Nell'ambito dei gasteromiceti ipogei (*Hymenogastreales*) poi, si hanno segnalazioni per 10 specie appartenenti a 4 generi, ben poca cosa rispetto alle 94 specie e 24 generi considerati presenti in Europa (MONTECCHI, SARASINI, 2000); in questo caso, alle difficoltà di determinazione si aggiunge la particola-

re tipologia di crescita dei basidiomi, che rende difficile la loro ricerca se non con l'ausilio di cani o perché portati in superficie dallo scavo di mammiferi selvatici.

Quattordici specie risultano essere esotiche; otto di queste sono saprotrofe e sono state importate con terricci, concimi, barkcips per pacciamatura, legname, balle di cotone. *Agrocybe farinacea* Hongo (*Bolbitiaceae*), specie psicotropa allucinogena originaria del Giappone, *Gymnopus luxurians* Peck (*Marasmiaceae*), appariscente specie nordamericana, sono state introdotte con i barkcips. *Clathrus archeri* (Berk.) Dring, *Lysurus cruciatus* (Lepr. & Mont.) Lloyd (*Clathraceae*) sono state importate con legname, balle di cotone, concimi e in seguito si sono diffuse mediante veicolazione entomocora (ditteri e coleotteri) delle spore. Le specie nitrofile *Leucoprinus flavus* (Beeli) Heinem. (Congo), *Leucoagaricus rubrotinctus* (Peck) Singer (NordAmerica) (*Agaricaceae*, *Leucocoprineae*) e *Conocybe intrusa* (Peck) Singer (*Bolbitiaceae*) (NordAmerica), importate con terricci e concimi, sono state trovate in vasi da fiori e serre. Le specie esotiche fitoparassite ed ectomicorriziche si sono diffuse con l'introduzione di essenze arboree alloctone. *Lentinus tephroleucus* Mont. (*Polyporaceae*), agente di carie bianca, è stato rinvenuto su pianta di *Philodendron* sp. (Sud America) e *Gymnopilus aculeatus* (Bres. E Roum.) Singer (*Strophariaceae*) su *Cocos nucifera* L. in vaso.

Callistosporium olivascens (Boud.) Bon (*Tricholomataceae*), probabilmente insediatosi insieme a *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti (Atlante, Marocco), conifera ornamentale molto usata in parchi e giardini, si è in seguito diffuso anche sotto *C. libani* A. Rich. (Medioriente), *C. deodora* (D. Don.) G. Don. (Himalaya) e *C. brevifolia* (Hook.f.) Henry (Cipro). *Suillus placidus* (Bonord.) Singer (*Boletaceae*), comparso con le piantagioni della specie nordamericana *Pinus strobus* L., si è fatto più frequente anche sotto *P. cembra* L. e *P. wallichiana* Jackson (himalayano). *Rhizopogon villosulus* Zeller (*Rhizopogonaceae*), ipogeo nordamericano, è stato segnalato nel Parco urbano del Valentino (Torino) sotto *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco.

Interessante la presenza in due stazioni diverse (1979, Gravelona Toce, Novara e 1992, Torino) e in due uniche raccolte della specie micoparassita (a ospite ancora non identificato) nordamericana *Squamamanita umbonata* (Sumst.) Bas. Tali segnalazioni (GALLI, 1982; VIZZINI, 1997), sono le uniche anche per l'Italia e l'Europa.

Alcune specie della nostra check-list sono contraddistinte da rari ritrovamenti; abbiamo quindi operato una scelta, selezionando, fra tutte le specie con poche segnalazioni, quelle che meritano di più di essere considerate rare, in quanto dotate di basidiomi appariscenti che non possono sfuggire all'attenzione dei raccoglitori (Tab. 1); alcune di queste, inoltre, sono legate ad ambienti minacciati. In grassetto quelle già inserite nella red-list Europea della Convenzione di Berna (2001).

Chalciporus amarellus (Quél.) Bat. (*Boletaceae*) e

TABELLA 1

Specie piemontesi con poche segnalazioni. In grassetto le specie presenti anche nella red-list europea. Piedmont rarely collected species. Species also reported in the European red-list are in bold.

<i>Amanita lepiotooides</i> Barla	<i>Haasiella splendidissima</i> Kotl. & Pouzar
<i>Bankera fuligineoalba</i> (J.C.Schmidt: Fr.) Pouzar	<i>Hericium erinaceus</i> (Bull.: Fr.) Pers.
<i>Boletopsis grisea</i> (Peck) Bondartsev & Singer	<i>Hygrocybe spadicea</i> (Scop.) P.Karst
<i>Calocybe constricta</i> (Fr.: Fr.) Kühner	<i>Leucopaxillus macrocephalus</i> (Schulzer) Bohus
<i>Cantharellus melanoxerus</i> Desm.	<i>Leucopaxillus rhodoleucus</i> (Romell) Kühner
<i>Chalciporus amarellus</i> (Quél.) Bat.	<i>Leucopaxillus tricolor</i> (Pers.) Kühner
<i>Coprinopsis strossmayeri</i> Schulzer	<i>Lyophyllum favrei</i> R.Haller Aar. & R.Haller Suhr
<i>Crepidotus roseornatus</i> Pöder & E. Ferrari	<i>Mycena rapiolens</i> J. Favre
<i>Cyphellostereum laeve</i> (Fr.: Fr.) D.A. Reid	<i>Mycenastrum corium</i> (Guers.) Desv.
<i>Entoloma bloxamii</i> (Berk. & Broome) Sacc.	<i>Myriostoma coliforme</i> (With.: Pers.) Corda
<i>Entoloma nitidum</i> Quél.	<i>Porpoloma metapodium</i> (Fr.: Fr.) Singer
<i>Faerberia carbonaria</i> (Alb. & Schwein.: Fr.) Pouzar	<i>Pulveroboletus lignicola</i> (Kallenb.) Pilát
<i>Floccularia luteovirens</i> (Alb. & Schwein.: Fr.) Pouzar	<i>Squamanita schreieri</i> Imbach
<i>Fomitopsis officinalis</i> (Vill.: Fr.) Bondartsev & Singer	<i>Suillus flavidus</i> (Fr.: Fr.) Presl
<i>Gomphus clavatus</i> (Pers.: Fr.) Gray	<i>Suillus sibiricus</i> (Singer) Singer

Suillus flavidus (Fr.:Fr.) Presl. (*Boletaceae*), specie legate a pinete montane a basso impatto antropico, potrebbero essere proposte ad integrazione della red-list Europea (ECCF, KOUNE, 2001).

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

L'analisi critica del lavoro fino a qui svolto mette in evidenza che, per alcune aree del Piemonte e per quasi tutto il territorio della Valle D'Aosta, le informazioni scarseggiano o sono completamente assenti, e che alcuni gruppi sistematici particolarmente complessi sono sicuramente sottostimati, probabilmente anche a causa della mancanza di micologi specialisti. L'impegno dei prossimi anni prevedrà l'estensione mirata delle indagini alle aree micologicamente poco esplorate, l'approfondimento su tutto il territorio dei gruppi meno studiati (*Aphyllophorales* corticioidi e poliporoidi, fragmobasidiomiceti, gasteromiceti ipogei, *Cortinariaceae*, *Coprinaceae*, *Bolbitiaceae*, *Crepidotaceae*) e, in aree più delimitate, l'attuazione di lavori di mappatura.

Una convenzione *ad hoc* con la Regione Piemonte, Assessorato per l'Ambiente e ai Parchi Nazionali, recentemente stipulato, ed un altro con il Parco nazionale del Gran Paradiso in via di perfezionamento, saranno di sostegno a queste iniziative.

Parallelamente ai lavori di check-list e di mappatura, che porteranno alla formazione di banche dati, alla stesura di red-list locali e alla attuazione di iniziative per la salvaguardia degli ambienti da proteggere (conservazione *in situ*), verranno portati avanti metodi per la caratterizzazione e conservazione di tale biodiversità (conservazione *ex situ*), predisponendo banche di colture miceliari e genomiche.

LETTERATURA CITATA

- AIELLO N., BATTIATO A., PICCIONE V., SIGNORELLO P., ACCORSI C.A., GOVI G., 1980 - *Proposta di Banca Dati su computer per macromiceti*. Mic. Ital., 3: 3-10.
- ARNOLDS E., 1981 - *Ecology and coenology of macrofungi in grasslands and moist heathlands in Drenthe, The Netherlands. Part 1*. Bibliotheca Micologica, 83.
- Cramer, Vaduz.
- , 1992 - *The role of macrofungi in environmental conservation*. Giorn. Bot. Ital., 126: 779-795.
- BELLÙ F., ROSSI C., 1994 - *Le prime 25 specie del mappaggio cartografico italiano*. Pag. Micol., 2: 19-46.
- EUROPEAN COUNCIL FOR THE CONSERVATION OF FUNGI (ECCF), KOUNE J.P., 2001 - *Datasheets of threatened mushrooms of Europe, candidates for listing in Appendix I of the Convention of Berna*. Strasbourg.
- FALCHERO C., 2002 - *Ruolo dello scoiattolo rosso (Sciurus vulgaris L.) nella dispersione delle spore fungine e nel mantenimento dell'ecosistema forestale*. Tesi Laurea, Univ. Torino, Corso Laurea Sci. Nat.
- GALLI M., 1982 - *Nuovo Trattato di Micologia*. Mazzotta Editore, Milano.
- KREISEL H., 1962 - *Die Kartierung von Grosspilze in Europa*. Mykol. Mitteilungsbl., 6: 53-62.
- , 1971 - *Bibliographie der Verbreitungskarten von Pilzen 1. Hymeno- und Gasteromyceten 1930-1969*. Feddes Repert., 82: 589-616.
- , 1973 - *Bibliographie der Verbreitungskarten von Pilzen 2. Hemi- und Phragmobasidiomyceten 1917-1919*. Feddes Repert., 83: 741-755.
- LANGÉ L., 1974 - *The Distribution of Macromycetes in Europe*. Dansk Bot. Arkiv, 30(1): 1-105.
- LO BUE G., 1994 - *Mappatura dei funghi: confronto fra banche dati europee*. Mic. Ital., 2: 51-62.
- , 1997 - *Recording and mapping of fungi in Italy*. Bocccone, 5: 389-394.
- MONTECCHI A., SARASINI M., 2000 - *Funghi Ipogei D'Europa*. AMB Centro Studi Micologici, Vicenza. 714 pp.
- MONTI G., ANSALDI M., 1996 - *Cartographie de quelques macromycetes de la province de Pisa*. Fl. Medit., 6: 43-56.
- ONOFRI S., 1994 - *Il programma di censimento e cartografia delle specie fungine*. Mic. Ital., 2: 23-26.
- OSIEWACZ H.D. (ed.), 2002 - *The Mycota*. Vol. X. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- PADOVAN F., 1994 - *Mappatura dei macromiceti in Italia (problemi cartografici)*. Riv. Micol., 1: 59-69.
- PERETTI, F., 1999 - *Pinus uncinata Miller : studio dei funghi ectosimbionti in bosco da seme (Mont Avic) e valutazione della loro influenza sulla crescita di plantule in vitro*. Tesi Laurea, Univ. Torino, Corso Laurea Sci. Forestali e Ambientali.

- ROMAGNESI H., 1961 - *Appel du "Committee for mapping of Macromycetes in Europe" aux mycologues et groupements mycologiques Français*. Bull. Soc. Myc. France, 77: 289-298.
- VENTURELLA G., PERINI C., BARLUZZI C., PACIONI G., BERNICCHIA A., PADOVAN E., QUADRACCIA L., ONOFRI S., 1997 - *Towards a Red Data List of fungi for Italy*. Bocconea, 5: 867-872.
- VIZZINI A. 1997 - *I macromiceti del Parco del Valentino: censimento ed indagini tassonomico-ecologiche*. Tesi Laurea, Univ. Torino, Corso Laurea Sci. Biol.

RIASSUNTO - Lo studio dei macrobasidiomiceti del Piemonte e Valle d'Aosta si inserisce nel progetto nazionale di check-list e mappatura dei macromiceti. Per il

Piemonte si è arrivati ad un inventario di 4576 ritrovamenti riconducibili a 1379 specie e per la Valle d'Aosta di 412 ritrovamenti e 236 specie. Viene discussa la presenza delle specie importate (esotiche) e fornito un elenco delle specie con poche segnalazioni e da considerarsi rare. Due boletaceae, *Chalciporus amarellus* e *Suillus flavidus* vengono proposte per l'inserimento nell'elenco della red-list europea. Si ritiene necessario, per il futuro, incrementare le analisi nelle aree risultate micologicamente poco indagate, approfondire lo studio dei gruppi tassonomici più difficili, portare avanti parallelamente iniziative di mapping. Fine ultimo sarà la stesura di una red-list regionale e promuovere attività per conservazione della biodiversità micomicetica *in situ* e *ex situ*.

AUTORI

Alfredo Vizzini, Valeria Filipello Marchisio*, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Torino, Viale Mattioli 25, 10125 Torino
C.A.M.P.A.L. (Coordinamento delle Associazioni Micologiche Piemontesi, Aostane e Liguri), Piazza Boprelli 6, 12012 Boves (Cuneo)
*Corresponding Author

La Banca Dati Micologica Nazionale: strumento base per le strategie di gestione, monitoraggio e conservazione ambientale

C. RIPA, L. ZUCCONI e S. ONOFRI

ABSTRACT - *The national Micological Data Bank: basic tool for environmental management, monitoring and conservation* - Computerized information on fungal species listed in the Check-list of Italian fungi (*Basidiomycetes*) is illustrated, summarized, integrated and discussed. Collection data of each species, implemented with ecological data, will constitute the National Mycological Data Bank.

Key words: *Basidiomycetes*, check-list fungi, Italy, mycological data bank

INTRODUZIONE

La necessità di conservare un elevato livello di biodiversità è oggi un principio generalmente accettato. L'ambiente è tanto meno a rischio nei confronti di fattori di disturbo quanto più è diversificato, mentre gli ambienti semplificati sono vulnerabili e rischiano il collasso qualora intervengano cambiamenti che direttamente mettano in crisi le poche entità genetiche presenti. L'obiettivo generale delle politiche ambientali non può che identificarsi con la realizzazione di uno sviluppo che, per essere realmente sostenibile, deve consentire il mantenimento di un elevato livello di biodiversità complessiva. Il primo indispensabile strumento per la protezione e la conservazione della natura è la conoscenza. Occorre individuare cosa proteggere e dove. Conservare concretamente la biodiversità significa fare scelte, adottare norme, orientare piani e programmi, realizzare interventi, ma sempre sulla base di informazioni scientifiche.

Secondo la "Convenzione relativa alla conservazione della vita selvatica e dell'ambiente naturale in Europa" (Convenzione di Berna del 1979), le delibere del Consiglio Europeo per la "Conservazione dei funghi" (1991), la Direttiva 92/43/CEE del Consiglio Europeo e le decisioni del "Congresso dei Micologi Europei" di Kew (U.K.) del 1995, per conservare i funghi ed i loro biotopi si devono promuovere interventi di protezione in aree naturali d'interesse particolare. La maggior parte delle Nazioni europee ha finanziato programmi per conoscere la ricchezza micofloristica e soprattutto i taxa rari, minacciati ed importanti biogeograficamente (VENTURELLA *et al.*, 1997). Lo studio ed il confron-

to di questi dati deve anche portare alla compilazione di Liste Rosse nazionali ed europee delle specie fungine da tutelare, così che sia possibile individuare gli ambienti che è necessario proteggere per difendere le specie minacciate in essi presenti. La salvaguardia delle specie dipende, infatti, da quella dell'ambiente che le ospita (KOUNE, 1999).

La recente realizzazione su supporto informatico della Check-list dei funghi italiani (*Basidiomycetes*), progetto che sta evolvendo nella Banca Dati Micologica Nazionale con l'aggiunta dei dati ecologici delle specie censite, rappresenta un importante traguardo nella conoscenza della biodiversità fungina in Italia; essa costituisce parte del substrato conoscitivo che, integrato con dati di rilevamento pubblicati o comunque esistenti, consente di gettare le basi per un accurato controllo dell'ambiente. Questo lavoro di integrazione dei dati di rilevamento è sicuramente molto gravoso e molto lungo poiché l'operazione va fatta su decine di migliaia di segnalazioni, e questo spiega perché fino ad ora lavori simili siano stati fatti a livello locale o al massimo regionale (VENTURELLA, 1991; BELLÙ, 1992; PERINI *et al.*, 1999; VENTURELLA *et al.*, 2000, 2001).

MICODIVERSITÀ IN ITALIA

La situazione attuale della micodiversità in Italia è parzialmente fotografata dalla Check-list dei *Basidiomycetes*, realizzata grazie ad una Convenzione tra l'Università della Tuscia e il Ministero dell'Ambiente, che risulta costituita oggi di 4.239 entità, le quali rappresentano il 21% circa del numero totale di specie (20.391) ad oggi conosciute al mondo per

questa classe del phylum *Basidiomycota* (KIRK *et al.*, 2001). E' questa una percentuale elevata, sicuramente destinata ad aumentare, in considerazione dell'ampiezza del territorio attualmente ancora inesplorato. Ancora più elevata è la percentuale dei generi segnalati in Italia, che ammontano a 443, corrispondente al 43% del totale dei generi (1.037) ad oggi inclusi nella classe *Basidiomycetes*.

La distribuzione dei Basidiomycetes nelle varie regioni italiane è mostrata dal grafico in Fig. 1.

L'analisi della distribuzione delle specie sul territorio nazionale ha messo in evidenza alcune specie che risultano distribuite uniformemente in tutta Italia, come ad esempio *Boletus edulis* Bull. : Fr., ed altre, notoriamente comuni ed ubiquitarie, che mancano invece solo in 1, 2 o 3 regioni, come ad esempio: *Agaricus arvensis* Schaeff. : Fr., presente in tutta Italia tranne in Molise ed Umbria, *A. campester* L. : Fr. segnalato in tutte le regioni tranne in Molise e Valle d'Aosta, *Amanita caesarea* (Scop. : Fr.) Pers. assente solo in Molise e Puglia, *B. aereus* Bull. : Fr. presente ovunque tranne in Molise e Valle d'Aosta, *Suillus bovinus* Bull. : Fr. distribuito in tutta Italia tranne in Basilicata, Molise e Valle d'Aosta e *S. granulatus* (L. : Fr.) Roussel assente solo in Molise. La mancanza di registrazioni riscontrata in poche regioni non è dovuta tanto alla reale assenza delle specie, quanto piuttosto alla carenza di segnalazioni, e non a caso queste regioni sono proprio quelle che risultano meno indagate a livello nazionale.

FUNGHI ENDEMICI, ESOTICI E RARI

Le informazioni contenute nella Check-list dei funghi italiani riguardano anche dati di ecologia delle specie e delle loro condizioni di endemicità, esoticità e rarità nel nostro paese. Sulla base di questi dati preliminari, risultano così segnalate 55 specie con possibili caratteristiche di endemicità, nel senso più largo del termine, cioè a livello locale, regionale, nazionale o biogeografico (Tab. 1), 11 specie ed una varietà esotiche (Tab. 2), mentre 87 potrebbero essere le specie rare, minacciate e/o a rischio d'estinzione (Tab. 3). Tutte le notizie sull'endemicità, l'esoticità e la rarità delle specie suddette sono state ricavate dai lavori bibliografici e dalle valutazioni personali dei revisori della Check-list, i quali hanno anche indicato la criticità tassonomica di 406 specie. In ogni modo, queste informazioni, basandosi su dati che spesso sono incompleti o preliminari, dovranno essere verificate caso per caso.

Delle specie endemiche rinvenute in Italia, la maggior parte (56,4%) è stata segnalata nella fascia alpina, più frequentemente in regioni quali il Veneto e il Trentino-Alto Adige; in Veneto ne sono state segnalate 23 (il 42% delle 55 registrate in tutta Italia), 10 delle quali esclusivamente in questa regione, mentre in Trentino-Alto Adige ne sono state segnalate 21 (il 38%), di cui 5 presenti unicamente in questa regione. La maggiore distribuzione degli endemismi in queste regioni è anche riconducibile ad una maggiore frequenza, tra le specie endemiche, di quelle con areale di distribuzione alpino. Analizzando le osser-

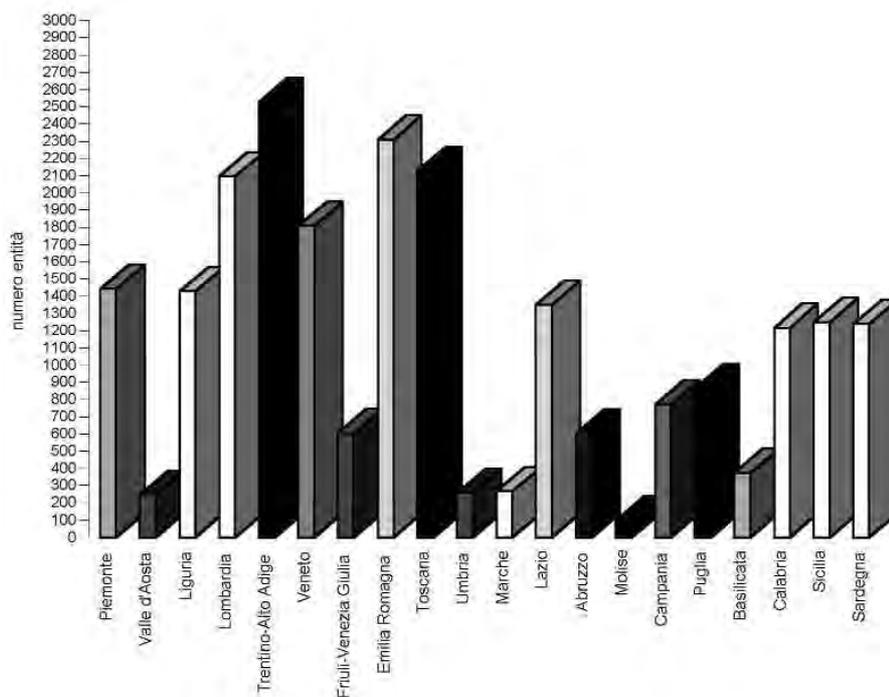


Fig. 1

Numero di *Basidiomycetes* per ogni regione.
Number of *Basidiomycetes* for each region.

TABELLA 1

Le 55 specie con possibili caratteristiche di endemicità della classe Basidiomycetes.
The 55 possibly endemic species of Italian Basidiomycetes

<i>Albatrellus syringae</i> (Parmasto) Pouzar	<i>Fomitopsis labyrinthica</i> Bernicchia & Ryvarden
<i>Aleurodiscus ilexicola</i> Bernicchia & Ryvarden	<i>Hebeloma ammophyllum</i> Bohus
<i>Alnicola sphagnetii</i> (P.D. Orton) Romagn.	<i>H. bruchetii</i> Bon
<i>Amaurodon viridis</i> (Alb. & Schwein. : Fr.) J. Schröt.	<i>H. cistophilum</i> Maire
<i>Amphinema diadema</i> K.H. Larss. & Hjortstam	<i>H. kuehneri</i> Bruchet
<i>Antrodia alpina</i> (Litsch.) Gilb. & Ryvarden	<i>H. marinatum</i> (J. Favre) Bruchet
<i>A. macrospora</i> Bernicchia & De Dominicis	<i>Hyphoderma orphanellum</i> (Bourdote & Galzin) Donk
<i>Ceriporia sulphuricolor</i> Bernicchia & Niemelä	<i>Inocybe arenicola</i> (R. Heim) Bon
<i>Cortinarius anthracinus</i> (Fr.) Fr.	<i>I. coelestium</i> Kuyper
<i>C. aurilicis</i> Chevassut & Trescol	<i>I. egenula</i> J. Favre
<i>C. cavipes</i> J. Favre	<i>I. geraniadora</i> J. Favre
<i>C. emunctus</i> Fr.	<i>I. glabrescens</i> Velen.
<i>C. favrei</i> M.M. Moser	<i>I. guttulifera</i> Kühner
<i>C. gentilis</i> (Fr.) Fr.	<i>I. heimii</i> Bon
<i>C. helvelloides</i> (Fr.) Fr.	<i>I. leptophylla</i> G.F. Atk.
<i>C. ionochlorus</i> Maire	<i>I. leucoloma</i> Kühner
<i>C. ionophyllus</i> M.M. Moser	<i>I. monochroa</i> J. Favre
<i>C. ionosmus</i> M.M. Moser, Nespiak & Schwöbel	<i>I. napipes</i> J.E. Lange
<i>C. pholideus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	<i>I. ochroalba</i> Bruyl.
<i>C. porphyropus</i> (Alb. & Schwein.) Fr.	<i>I. oreina</i> J. Favre
<i>C. subtorvus</i> Lamoure	<i>I. pseudohiulca</i> Kühner
<i>Dendrothele incrustans</i> (P.A. Lemke) P.A. Lemke	<i>I. salicis</i> Kühner
<i>D. nivosa</i> (Höhn. & Litsch.) P.A. Lemke	<i>I. taxocystis</i> (J. Favre) Singer
<i>Dentipellis fragilis</i> (Pers. : Fr.) Donk	<i>I. tetragonospora</i> Kühner
<i>Duportella malençonii</i> (Boidin & Lanq.) Hjortstam	<i>I. umbrinodisca</i> Kühner
<i>Echinodontium ryvardenii</i> Bernicchia & Piga	<i>Piloporia sajanensis</i> (Parmasto) Niemelä
<i>Entoloma ritae</i> Noordel. & Wölfel	<i>Russula citrinochlora</i> Singer
<i>Filobasidiella lutea</i> P. Roberts	

TABELLA 2

Le 12 entità esotiche della classe Basidiomycetes.
The 12 exotic entities of the Italian Basidiomycetes.

<i>Boletus caucasicus</i> (Singer) Singer
<i>B. dryophilus</i> Thiers
<i>B. frostii</i> J.L. Russell
<i>B. mamorensis</i> Redeuilh
<i>B. speciosus</i> Frost
<i>Conocybe intrusa</i> (Peck) Singer
<i>Cortinarius albocinctus</i> M.M. Moser
<i>C. herculeus</i> Malençon
<i>Entoloma vezzenaense</i> Noordel. & Hauskn.
<i>Favolaschia calocera</i> R. Heim
<i>Suillus amabilis</i> (Peck) Singer
<i>Tricholoma tridentinum</i> Singer var. <i>cedretorum</i> Bon

vazioni riportate dai revisori per quanto riguarda le 55 probabili specie endemiche, si è potuto constatare come esse siano legate principalmente a due grandi regioni fitoclimatiche, quella mediterranea (31%) e quella alpina (56,4%). Di quelle presenti nell'area mediterranea 8 risultano esclusive della Sardegna, mentre le altre sono segnalate in due o più regioni, spesso non confinanti; riteniamo probabile che queste specie presentino un areale di distribuzione continuo che potrà essere verificato soltanto con l'aggiunta di nuove segnalazioni nella banca dati. Soltanto poche sono le specie legate a un determinato substrato: è il caso di *Dendrothele nivosa* (Höhn. &

Litsch.) P.A. Lemke, associata a *Juniperus oxycedrus* L., *Hebeloma cistophilum* Maire, legato al cisto, *Aleurodiscus ilexicola* Bernicchia & Ryvarden, associata ad *Ilex aquifolium* L. e *Amaurodon viridis* (Alb. & Schwein. : Fr.) J. Schröt., legato a *Rosmarinus officinalis* L. Delle specie legate alla fascia alpina, *Cortinarius favrei* M.M. Moser e *Russula citrinochlora* Singer sono indicate come caratteristiche dell'areale artico-alpino, mentre le altre presentano una distribuzione legata alla vegetazione delle diverse fasce altitudinali. Anche per alcune delle specie alpine viene indicata l'esclusività del substrato, come *Alnicola sphagnetii* (P.D. Orton) Romagn., legata alle sfagnete, *Cortinarius porphyroporus* (Alb. & Schwein.) Fr., associato alle betulle, *Inocybe guttulifera* Kühner, legata ai salici nani e *I. ochroalba* Bruyl., associata alle peccete. Le 9 specie endemiche: *Alnicola sphagnetii* (P.D. Orton) Romagn., *Amphinema diadema* K.H. Larss. & Hjortstam, *Cortinarius gentilis* (Fr.) Fr., *C. ionosmus* M.M. Moser, Nespiak & Schwöbel, *C. porphyropus* (Alb. & Schwein.) Fr., *Dentipellis fragilis* (Pers. : Fr.) Donk, *Inocybe geraniadora* J. Favre, *I. glabrescens* Velen. e *I. leptophylla* G.F. Atk. sono state segnalate anche come specie minacciate (Tab. 3).

Conoscere il numero e la distribuzione delle specie endemiche presenti in Italia è molto importante ed il loro insieme rappresenta uno degli elementi più caratteristici della micoflora italiana; la loro presenza e la loro consistenza forniscono un valore naturalisti-

TABELLA 3

Le 87 specie e varietà con possibili caratteristiche di rarità, almeno in alcune zone d'Italia. Alcune di queste specie devono essere considerate minacciate e/o a rischio d'estinzione in Italia.

The 87 species and varieties possibly rare, at least in some Italian areas. Some of these species must be considered threatened and/or at risk of extinction in Italy.

<i>Aleurodiscus botryosus</i> Burt	<i>C. pluvius</i> (Fr. : Fr.) Fr.
<i>A. cerussatus</i> (Bres.) Höhn. & Litsch.	<i>C. porphyropus</i> (Alb. & Schwein.) Fr.
<i>A. dextrinoideocerussatus</i> G. Moreno, M.N. Blanco & Manjon	<i>C. praestans</i> (Cordier) Gillet
<i>Alnicola sphagnetii</i> (P.D. Orton) Romagn.	<i>C. psammocephalus</i> (Bull.) Fr.
<i>A. tantilla</i> (J. Favre) Romagn.	<i>C. pulchripes</i> J. Favre
<i>Amphinema diadema</i> K.H. Larss. & Hjortstam	<i>C. pygmaeus</i> (Velen.) M.M. Moser
<i>Amyloathelia amylacea</i> (Bourdot & Galzin) Hjortstam & Ryvarde	<i>C. scaurotraganoideus</i> Rob. Henry
<i>Amylocorticium subincarnatum</i> (Peck) Pouzar	<i>C. subporphyropus</i> Pilát
<i>A. subsulphureum</i> (P. Karst.) Pouzar	<i>C. terpsichores</i> Melot var. <i>calosporus</i> Melot
<i>Antrodia radiculosa</i> (Peck) Gilb. & Ryvarde	<i>C. uliginosus</i> Berk.
<i>Botryobasidium botryoideum</i> (Overh.) Parmasto	<i>Cristinia gallica</i> (Pilát) Jülich
<i>B. candicans</i> J. Erikss.	<i>C. rhenana</i> Grosse-Brauckm.
<i>B. conspersum</i> J. Erikss.	<i>Crustoderma dryinum</i> (Berk. & M.A. Curtis) Parmasto
<i>Brevicellicium exile</i> (H.S. Jacks.) K.H. Larss. & Hjortstam	<i>Crustomyces expallens</i> (Bres.) Hjortstam
<i>Bulbillomyces farinosus</i> (Bres.) Jülich	<i>C. subabruptum</i> (Bourdot & Galzin) Jülich
<i>Ceraceomyces borealis</i> (Romell) J. Erikss. & Ryvarde	<i>Cyphellostereum laeve</i> (Fr. : Fr.) D.A. Reid
<i>C. sulphurinus</i> (P. Karst.) J. Erikss. & Ryvarde	<i>Cystostereum murrainii</i> (Berk. & M.A. Curtis) Pouzar
<i>Cerinomyces crustulinus</i> (Bourdot & Galzin) Martin	<i>Dentipellis fragilis</i> (Pers. : Fr.) Donk
<i>Ceriporia excelsa</i> (S. Lundell) Parmasto	<i>Erythricium hypnophilum</i> (P. Karst.) J. Erikss. & Hjortstam
<i>Ceriporiopsis pannocincta</i> (Romell) Gilb. & Ryvarde	<i>Fibricium rude</i> (P. Karst.) Jülich
<i>Clavulicium delectabile</i> (H.S. Jacks.) Hjortstam	<i>F. subceraceum</i> (Hallenb.) Bernicchia
<i>C. macounii</i> (Burt) J. Erikss. & Boidin	<i>Fomitopsis cajanderi</i> (P. Karst.) Kotl. & Pouzar
<i>Cortinarius aurantiomarginatus</i> Jul. Schäff.	<i>Gloecystidiellum karstenii</i> (Bourdot & Galzin) Donk
<i>C. badiovinaceus</i> M.M. Moser	<i>Hebeloma funariophilum</i> M.M. Moser
<i>C. bibulus</i> Quéf.	<i>H. pyrophilum</i> G. Moreno & M.M. Moser
<i>C. caesiocinctus</i> Kühner	<i>Hyphoderma litschaueri</i> (Burt) J. Erikss. & Å. Strid
<i>C. calopus</i> P. Karst.	<i>Hypochnicium polonense</i> (Bres.) Å. Strid
<i>C. canabarda</i> M.M. Moser	<i>Inocybe albomarginata</i> Velen.
<i>C. colus</i> Fr.	<i>I. albovelutipes</i> Stangl
<i>C. croceoconus</i> Fr.	<i>I. amblyspora</i> Kühner
<i>C. fuscoperonatus</i> Kühner	<i>I. fusciscentipes</i> Kühner
<i>C. gentilis</i> (Fr.) Fr.	<i>I. geranioidora</i> J. Favre
<i>C. helobius</i> Romagn.	<i>I. glabrescens</i> Velen.
<i>C. hillieri</i> Rob. Henry	<i>I. huijsmannii</i> Kuyper
<i>C. ionosmus</i> M.M. Moser, Nespiak & Schwöbel	<i>I. leptophylla</i> G.F. Atk.
<i>C. latobalteatus</i> (Schaeff. apud M.M. Moser) M.M. Moser	<i>I. oreina</i> J. Favre
<i>C. leochrous</i> Schaeff.	<i>I. piceae</i> Stangl & Schwöbel
<i>C. magicus</i> Eichhirm	<i>I. tricolor</i> Kühner
<i>C. orellanoides</i> Rob. Henry	<i>Inonotus dryophilus</i> (Berk.) Murrill
<i>C. papulosus</i> Fr.	<i>Mucronella flava</i> Corner
<i>C. paracephalixus</i> Bohus	<i>Oxyporus corticola</i> (Fr. : Fr.) Ryvarde
<i>C. parvannulatus</i> Kühner	<i>Phanerochaete aff. avellanea</i> (Bres.) J. Erikss. & Ryvarde
<i>C. patibilis</i> Brandud & Melot	<i>Phlebia chrysocreas</i> (Berk. & M.A. Curtis) Burds.
	<i>Pleurotus nebrodensis</i> (Inzenga) Quéf.

co aggiuntivo alle aree dove queste specie sono segnalate, contribuendo anche al mantenimento di alti valori di biodiversità.

Il controllo del database ha evidenziato che in Italia sarebbero presenti 12 specie esotiche (Tab. 2), la metà delle quali originaria del continente americano, che risultano ripartite quasi uniformemente nelle varie regioni. Le uniche regioni dove non sono stati segnalati esotismi sono la Valle d'Aosta, il Molise e l'Umbria, che però sono le regioni meno indagate. Le specie esotiche sono solitamente importate involontariamente con i terricci o associate a piante esotiche coltivate in Italia, come per esempio *Cedrus*, originario dell'Africa del nord, *Nothofagus*, originario della

Nuova Zelanda e *Pseudotsuga*, conifera originaria dell'America, molto usata nei parchi per i suoi pregi ornamentali.

Per quanto riguarda le 87 specie rare, minacciate e/o a rischio d'estinzione (Tab. 3), il maggior numero di segnalazioni è stato registrato nelle regioni della zona alpina, prealpina, padana e submediterranea umida. Per il Trentino-Alto Adige e l'Emilia Romagna sono state segnalate, in entrambe le regioni, 29 specie minacciate (il 34% delle 86 registrate in Italia); nel Veneto sono presenti 21 specie (il 24%), quelle rilevate in Lombardia sono 18 (il 21%) ed in Toscana ne sono state registrate 15 (il 17%).

Dall'integrazione e dal controllo di dati attualmente

esistenti e da acquisire, come anche dal confronto con una lista di 23 specie minacciate pubblicata da VENTURELLA *et al.* (1997), potrà scaturire una Lista Rossa delle specie fungine italiane e degli habitat che le comprendono. Attualmente negli allegati della citata Convenzione di Berna sono presenti solo riferimenti generici ai funghi. Recentemente però è stata avanzata, da parte dell'European Council for Conservation of Fungi (ECCF, KOUNE, 2001), la proposta di includere nell'Allegato I della Convenzione di Berna un elenco di 33 specie di macrofunghi minacciati a livello europeo; tale proposta, seppur presentata recentemente al Consiglio d'Europa ed accolta con parere favorevole dalle delegazioni svizzera, svedese ed ungherese, deve seguire l'iter burocratico previsto prima di essere considerata accettata. La selezione delle specie proposte è stata fatta sulla base di molte Liste Rosse europee, nazionali e regionali.

Nella Check-list italiana si trovano 22 dei 30 Basidiomiceti citati nella lista proposta dall'ECCF per l'inclusione nell'Appendice I della Convenzione di Berna (Tab. 4).

Le 22 specie suddette, riconosciute come a rischio a livello europeo dall'ECCF, non vengono indicate come tali in Italia dai revisori finali, poiché vengono

segnalate frequentemente e in molte regioni. Questa situazione, una volta approvata l'inclusione della lista dell'ECCF all'Allegato I della Convenzione di Berna, e dopo aver verificato la reale presenza delle specie suddette nelle nostre regioni, renderebbe l'Italia un sito di conservazione privilegiato, soprattutto per le entità che risultano minacciate nel resto d'Europa, costringendo le autorità nazionali competenti ad attuare politiche di tutela degli ambienti.

Nella Banca Dati Micologica Nazionale sono state immesse anche informazioni sulla distribuzione di alcune specie nelle seguenti cinque fasce fitoclimatiche associate ad una componente vegetale principale, e codificate con i seguenti numeri:

1 - fascia eu-mediterranea (foreste sempreverdi a *Quercus ilex*);

2 - fascia sub-mediterranea (foreste decidue a *Quercus-Carpinus*);

3 - fascia montana (foreste di *Fagus*);

4 - fascia alpina-oroboreale (boschi di *Picea abies*, *Larix* e *Pinus cembra*);

5 - fascia al di sopra del limite dei boschi.

Le specie per le quali è stato immesso tale dato ad oggi rappresentano ancora una piccola parte sul totale delle entità, ma come si può vedere dal grafico in Fig. 2, la maggior parte delle specie per le quali è pre-

TABELLA 4

Le 33 specie proposte dall'ECCF per l'Allegato I (Convenzione Habitat); •: specie presenti nella Check-list italiana. The 33 species proposed by ECCF for Annex I (Habitat Convention); •: species presented in Italian Check-list.

• <i>Amanita friabilis</i> (P.Karst) Bas	Micorrizico con <i>Alnus glutinosa</i> , <i>A. incana</i> e <i>A. crispa</i> .
• <i>Amylocystis lapponica</i> (Romell) Bondartsev & Singer	Saprotrofo su legno morto di <i>Picea</i> nelle foreste vergini di conifere.
• <i>Antrodia albobrunnea</i> (Romell) Ryvarden	Su vecchi legni di <i>Pinus</i> in foreste, su suoli oligotrofici.
• <i>Armillaria ectypa</i> (Fr.) Emel	Saprotrofo, in luoghi paludosi, tra <i>Sphagnum</i> .
• <i>Boletopsis grisea</i> (Peck) Bondartsev & Singer	Micorrizico con <i>Pinus sylvestris</i> o con <i>Ericaceae</i> in suoli acidi.
• <i>Boletus dupainii</i> Boud.	Micorrizico con <i>Castanea</i> , <i>Fagus</i> e <i>Quercus</i> .
• <i>Bovista paludosa</i> Lév.	Saprotrofo tra muschi in paludi calcaree.
• <i>Cantharellus melanoxeros</i> Desm.	Micorrizico con <i>Fagus</i> e <i>Quercus</i> in foreste decidue.
• <i>Cortinarius ionochlorus</i> Maire	Micorrizico con <i>Quercus ilex</i> su suolo calcareo e con <i>Fagus</i> .
• <i>Entoloma bloxamii</i> (Berk. & Broome) Sacc.	Saprotrofo, in vecchie praterie incolte, su terreno calcareo.
• <i>Geoglossum atropurpureum</i> Batsch : Fr.	Saprotrofo, in brughiera, su suoli da acidi a neutri. Talvolta ritrovato in foreste.
• <i>Gomphus clavatus</i> (Pers. : Fr.) Gray	Micorrizico con <i>Abies</i> e <i>Picea</i> , e con <i>Fagus</i> in foreste decidue. In montagna e zone subalpine.
• <i>Hapalopilus croceus</i> (Pers. : Fr.) Donk	Parassita su alberi decidui, saprotrofo su tronchi morti di <i>Quercus</i> , <i>Castanea</i> e <i>Robinia</i> .
• <i>Haploporus odoratus</i> (Sommerf. : Fr.) Bondartsev & Singer	Su <i>Salix caprea</i> , in vecchie foreste miste, depressioni umide o lungo piccoli ruscelli.
• <i>Hericium erinaceum</i> (Bull. : Fr.) Pers.	Parassita su tronchi e rami di alberi decidui, <i>Quercus</i> e <i>Fagus</i> .
• <i>Hohenbuehelia culmicola</i> M.Bon	Saprotrofo sulla base di culmi di <i>Ammophila</i> , in dune costiere.
• <i>Hygrocybe calyptriformis</i> (Berk. & Broome) Fayod	In vecchie praterie incolte, dalla zona costiera alla zona alpina.
• <i>Hygrophorus purpurascens</i> (Alb. & Schw. : Fr.) Fr.	Micorrizico con <i>Picea alba</i> in foreste di conifere.
• <i>Laricifomes officinalis</i> (Vill. : Fr.) Kotl. & Pouzar	Parassita su vecchi alberi di <i>Larix decidua</i> .
• <i>Leucopaxillus compactus</i> (Fr.) Neuhoff	Saprotrofo in boschi decidui, su terreno calcareo.
• <i>Lyophyllum favrei</i> R.Haller Aar. & R.Haller Suhr	Saprotrofo in foreste decidue, spesso su <i>Fagus sylvatica</i> , in foreste alluvionali.
• <i>Myriostoma coliforme</i> (With. : Pers.) Corda	Specie termofila saprotrofa, in foreste miste, giardini, praterie.
• <i>Phylloporus pelletieri</i> (Lév.) Quél.	Micorrizico con <i>Quercus</i> , <i>Fagus</i> , <i>Carpinus</i> , <i>Castanea</i> , o con <i>Picea</i> , <i>Abies</i> e <i>Pinus</i> .
• <i>Podoscypha multizonata</i> (Berk. & Broome) Pat.	Saprotrofo e parassita su radici di <i>Quercus</i> , in foreste decidue o nei parchi.
• <i>Pycnoporellus alboluteus</i> (Ellis & Everhart) Kotl. & Pouzar	Saprotrofo su vecchi tronchi in foreste di conifere.
• <i>Sarcodon fuligineoviolaceus</i> (Klachbr. : Fr.) Pat.	Micorrizico con <i>Abies</i> , <i>Picea</i> , <i>Pinus</i> , in foreste di conifere, su terreno calcareo.
• <i>Sarcosoma globosum</i> (Schmidel : Fr.) Casp.	Probabilmente saprotrofo, in vecchie foreste.
• <i>Sarcosphaera coronaria</i> (Jacq.) Boud.	Saprotrofo o anche micorrizico con conifere, su suolo acido o calcareo.
• <i>Skeletocutis odora</i> (Sacc.) Ginns	Saprotrofo su tronchi di conifere, <i>Picea</i> e <i>Populus tremula</i> .
• <i>Suillus sibiricus</i> Singer ssp. <i>helveticus</i> Singer	Micorrizico con <i>Pinus cembra</i> nelle Alpi e con <i>Pinus peuce</i> in Macedonia.
• <i>Torrendia pulchella</i> Bres.	Micorrizico con <i>Quercus suber</i> , in prati, macchie e garighe.
• <i>Tricholoma colossus</i> (Fr.) Quél.	Micorrizico simbionte di <i>Pinus</i> , su suoli acidi molto oligotrofici.
• <i>Tulostoma niveum</i> Kers	Solitario o gregario, tra densi ciuffi d'erba o su massi e scogliere.

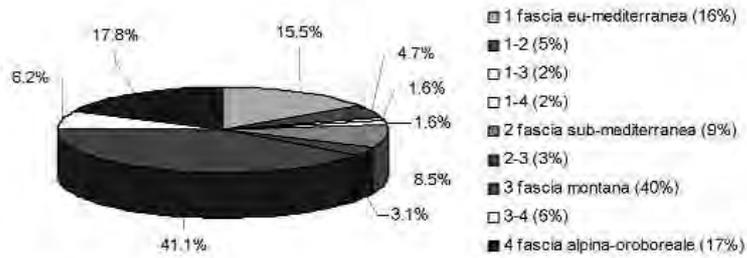


Fig. 2

Distribuzione dei *Basidiomycetes* nelle cinque fasce fitoclimatiche.
Distribution of *Basidiomycetes* in five phytoclimatic belts.

sente il dato, è legata esclusivamente alla fascia montana del faggio e, in minor misura, alle fasce alpina-oroboreale ed eu-mediterranea.

Le informazioni memorizzate nella Banca Dati riguardanti l'ecologia della specie comprendono anche indicazioni sul substrato di crescita naturale e sul trofismo tipico di ogni entità. Come è possibile vedere nelle Figg. 3 e 4, la percentuale maggiore dei ritrovamenti di *Basidiomycetes* avviene su suolo s.l. (48%) e su legno s.l. (20%) (Fig. 3), le specie italiane sono soprattutto micorriziche (71%) e, in buona percentuale, saprotrofe (28%) (Fig. 4).

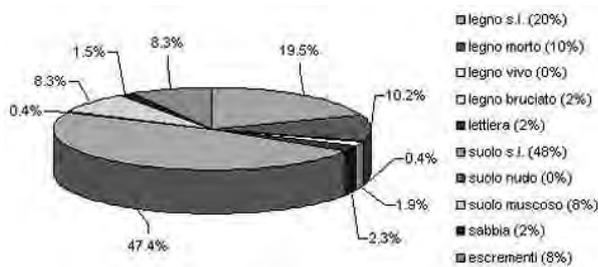


Fig. 3

Rappresentazione percentuale dei *Basidiomycetes* italiani nei substrati naturali.

Percentage of distribution of Italian *Basidiomycetes* in natural substrata.

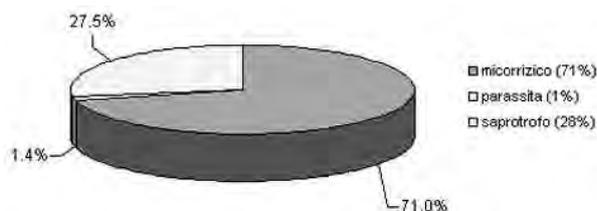


Fig. 4

Rappresentazione percentuale della modalità di nutrizione dei *Basidiomycetes* italiani.

Percentage of distribution of Italian *Basidiomycetes* among forms of nutrition.

CONCLUSIONI

Diversi traguardi sono stati raggiunti con la realizzazione della Check-list dei funghi italiani (*Basidiomycetes*), ed in primo luogo sono state riunite in modo organico e coerente molte delle informazioni micofloristiche attualmente disponibili per il territorio italiano. I risultati ottenuti finora ci hanno mostrato come ad un'elevata eterogeneità territoriale corrisponda generalmente un'elevata ricchezza in specie.

L'acquisizione, l'organizzazione e l'accesso all'informazione scientifica costituiscono passi indispensabili per qualsiasi politica di conservazione. In questo momento la Check-list dei funghi italiani (*Basidiomycetes*) si sta evolvendo nella Banca Dati Micologica Nazionale con l'aggiunta ad ogni specie fungina di dati ecologici quali: habitat, substrato, fascia fitoclimatica ed altri. Soprattutto il dato di presenza/assenza di una specie in un determinato ambito fitoclimatico ci permetterà di realizzare dei modelli cartografici di idoneità ambientale per quella specie. Questi modelli permetteranno di integrare e sintetizzare le relazioni specie-ambiente e rappresenteranno un valido strumento di supporto alle indagini conoscitive ed ai progetti di conservazione e gestione del territorio.

Il censimento dovrebbe evolvere anche verso un progetto che si propone di realizzare mappe di distribuzione delle singole specie, avvalendosi dei dati sulle località di raccolta e grazie all'uso di programmi di georeferenziazione applicabili alla Banca Dati. Il disporre di liste aggiornate delle specie fungine italiane e di mappe della loro distribuzione potrebbe costituire un valido riferimento per studi di bioindicazione. E' stato infatti proposto l'uso dei dati sulle comunità naturali di funghi per il biomonitoraggio della contaminazione ambientale, ad esempio da metalli pesanti (ONOFRI, ZUCCONI, 1999). Questi dati potrebbero poi costituire un valido riferimento per lo studio ed il monitoraggio degli effetti dei cambiamenti climatici, come è stato proposto da VAN HERK *et al.* (2002) per i licheni.

Lo studio approfondito delle liste di specie endemiche, esotiche e rare, ed il controllo sul campo con un monitoraggio sistematico nel tempo dovranno portare alla realizzazione della ormai indispensabile Lista

Rossa dei funghi italiani, una lista che comunque non deve essere destinata soltanto a un pubblico di esperti, ma a una cerchia più ampia di interessati, soprattutto amministratori del territorio, per i quali la conservazione e la cura degli ambienti naturali è un compito di primaria importanza. Per attuare ciò è fondamentale quindi, oltre a raccogliere quanti più dati possibile, anche ufficializzare e rendere pubblici i risultati.

LETTERATURA CITATA

- BELLÙ F., 1992 - *Mapping and cartography of macrofungi in Alto Adige*. Giorn. Bot. Ital., 126: 707-803.
- EUROPEAN COUNCIL FOR THE CONSERVATION OF FUNGI (ECCF), KOUNE J.P., 2001 - *Datasheets of threatened mushrooms of Europe, candidates for listing in Appendix I of the Convention*. Strasbourg.
- HERK C.M. VAN, APTROOT A., VAN DOBBEN H.F., 2002 - *Long-term monitoring in the Netherlands suggests that lichens respond to global warming*. Lichenologist, 34: 141-154.
- KIRK P.M., CANNON P.F., DAVID J.C., STALPERS J.A., 2001 - *Dictionary of the Fungi*. CAB International, Wallingford.
- KOUNE J.P., 1999 - *Étude sur les champignons menacés en Europe*. Strasbourg.
- ONOFRI S., ZUCCONI L., 1999 - *Funghi e metalli pesanti, bioindicazione, bioaccumulo e biorisanamento*. In: PICCINI C., SALVATI S. (eds.), *Atti workshop: Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale*. Roma, 26-27 novembre 1998.
- PERINI C., NARDUCCI R., BARLUZZI C., LAGANÀ A., SALERNI E., 1999 - *I funghi in Toscana. Allegato 1. Elenco delle specie censite in Toscana*. In: TOFACCHI L., MANNINI M., AGMT, A.R.S.I.A. (eds.), *I funghi in Toscana. Mappatura e censimento dei macromiceti epigei*: 73-98. Bandecchi e Vivaldi, Pontedera (FI).
- VENTURELLA G., 1991 - *A checklist of Sicilian fungi*. *Bocccone*, 2: 5-221.
- VENTURELLA G., PERINI C., BARLUZZI C., PACIONI G., BERNICCHIA A., PADOVAN F., QUADRACCIA L., ONOFRI S., 1997 - *Towards a Red List of fungi for Italy*. *Bocccone*, 5: 867-872.
- VENTURELLA G., SAITTA A., LA ROCCA S., 2000 - *A checklist of the mycological flora of Madonie Park (North Sicily)*. Mycotaxon Ltd., NY.
- VENTURELLA G., SAITTA A., LA ROCCA S., ONOFRI S., 2001 - *The mycological flora of the Ficuzza Wood-Rocca Busambra territory (North Sicily, Italy)*. Mycotaxon Ltd., NY.

RIASSUNTO - Vengono qui riassunte le informazioni, riguardanti i funghi censiti nella Check-list dei *Basidiomycetes* italiani, raccolte, informatizzate ed attualmente in corso di integrazione con i dati ecologici delle specie nella Banca Dati Micologica Nazionale.

AUTORI

Caterina Ripa, Laura Zucconi, Silvano Onofri, Dipartimento di Scienze Ambientali, Università della Tuscia, Largo dell'Università snc, 01100 Viterbo, Italy

Una federazione di collezioni di colture microbiche per promuovere l'attività dei centri per risorse microbiologiche italiane

A.E. VAUGHAN, P. BUZZINI e A. MARTINI

ABSTRACT - *A federation of microbial culture collections for promoting the activities of Italian biological resource centers* - As the benefits of biotechnology became evidence, many governments recognized the necessity of accommodating the special needs of this emerging field. This is particularly important since recent advances have introduced many scientists and engineers to the handling of microorganisms, often for the first time raising questions concerning manipulation of cultures, the source of strains with particular properties, preservation and identification methods, or requirements for the deposition of strains for patent purposes. The establishment of specific biological resource centers (BRCs) and the improvement of sample preservation techniques have evolved in response to these needs, and it is through the support of culture collections that it will be possible to maintain the characteristics of these perishable fruits of research. Italy is the only European country without centralized coordination of its microbial culture collections. This is a national emergency greatly jeopardizing the survival of these precious BRCs which altogether conserve nearly every known type of microorganism. In addition, innumerable national and international scientific projects depend upon these institutions for assistance as repositories of authentic microbial strains, as well as for information regarding microbial biology, taxonomy, maintenance, biodiversity and biotechnological applications. In spite of this inestimable richness already present in Italy, no national organization has ever seen fit to support a coordinated and synergistic management of these repositories of genetic biodiversity fundamental for biotechnological applications.

Key words: biological resource centers, biotechnology, microbial culture collections

INTRODUZIONE

Sia la ricerca che lo sviluppo in biotecnologia richiedono biodiversità proveniente da materiale biologico (batteri, linee cellulari, funghi, sonde, ecc.) affidabile e di alta qualità. Normalmente questo viene raccolto, mantenuto, verificato e quindi reso disponibile da centri specializzati [collezioni microbiche o centri di risorse biologiche (BRCs)]. L'esistenza di collezioni di colture non è nuova, ma il riconoscimento della loro fondamentale importanza per la ricerca di base e la biotecnologia è arrivato più tardi, quando divenne evidente la rilevanza della biodiversità microbica nella società moderna. (1976; 1988; 1996b; BOTTAZZI *et al.*, 1995).

Le banche di microrganismi hanno compiti (deposito, mantenimento, distribuzione, accertamento dell'autenticità e della integrità delle colture, ecc.) che richiedono personale altamente specializzato, in grado di conservare e sfruttare al massimo la complessità del mondo microbico. In particolare, è errato assimilare le collezioni a musei in quanto i BRCs per definizione conservano "reperti" rappresentati da organismi viventi (KIRSOP, 1984). Conseguentemen-

te il personale deputato alla conservazione delle colture microbiche deve conoscere a fondo le caratteristiche biologiche degli organismi specifici, la loro potenziale variabilità e le metodologie atte ad assicurarne autenticità, rappresentatività e stabilità nel tempo. Le grandi banche microbiche, capaci di mantenere tutti i diversi tipi di microrganismi, sono numericamente scarse nel mondo, perché richiedono uno staff di esperti particolarmente numeroso e conseguentemente costi estremamente elevati. L'associazione tra collezioni specialistiche piccole e medie permette di ovviare a tali inconvenienti a patto che venga assicurata una stretta sinergia operativa con notevoli risparmi attraverso la centralizzazione delle funzioni organizzative ed amministrative. In risposta a queste esigenze particolari, sono state formate varie organizzazioni nazionali ed internazionali con lo scopo di coordinare il lavoro dei depositari della biodiversità genetica.

ORGANIZZAZIONI INTERNAZIONALI

A livello internazionale, il WFCC (World Federation

of Culture Collections) (<http://www.wfcc.org/>) coordina collezioni nel mondo attraverso l'organizzazione di comitati attivi in campi pertinenti la biotecnologia: informazione, istruzione, conservazione, e brevetti dei microrganismi. (1994; SLY, 1996). In Europa la European Culture Collection Organization (ECCO) (<http://www.eccosite.org/>) promuove la collaborazione ed integrazione tra collezioni Europee. L'affiliazione a queste organizzazioni è limitata alle sole collezioni di servizio che sono in grado di fornire assistenza alla comunità scientifica mediante distribuzione di colture, scambio di informazioni, competenze in tassonomia e procedure per la corretta preservazione di microrganismi.

Nel 1987 il Mercato Comune Europeo ha sostenuto un'iniziativa mirante alla creazione di una rete informatica sui ceppi microbici conservati in collezioni europee. Questo programma, denominato MINE (Microbial Information Network Europe) (AGUILAR, 1991; DENIS *et al.*, 1994; HAWKSWORTH, SCHIPPER, 1989), ammetteva solo collezioni di servizio, in grado cioè di garantire continuità e dati di qualità fornendo servizi efficaci per la conservazione e la classificazione di ceppi, la pubblicazione di un catalogo, ricerca e servizi vari per conto terzi. Dall'inventario di questo progetto è emerso che l'insieme dei BRC's in Europa conserva un numero elevato di colture microbiche di tutti i tipi conosciuti, e che molte collezioni sono caratterizzate da una lunga tradizione di servizio alla comunità scientifica e all'industria.

ORGANIZZAZIONI NAZIONALI

La maggior parte dei paesi sviluppati possiede e finanzia consorzi di collezioni microbiche a livello nazionale. Le informazioni sui contenuti delle collezioni sono quindi intercambiabili e più facilmente disponibili alla comunità scientifica. La coordinazione è facilitata, il valore intrinseco delle singole collezioni aumenta, la conservazione di biodiversità microbica utile per la biotecnologia è assicurata e le metodologie e i servizi sono resi più efficienti attraverso attività congiunte. Il Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) del Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences (<http://www.cbs.knaw.nl/>) è il consorzio di collezioni più conosciuto in Europa, che mantiene una collezione di funghi, lieviti e batteri conosciuta in tutto il mondo. È un centro di eccellenza che offre consulenze su problemi pertinenti la microbiologia d'interesse scientifico, sanitario ed industriale (1996a). In Belgio, il Belgian Federal Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs finanzia una federazione di quattro collezioni che conservano oltre 50.000 ceppi autentici di batteri, funghi e lieviti (1998; ROBERT *et al.*, 1997).

Simili consorzi con supporto a livello nazionale sono attivi in Francia (<http://www.pasteur.fr/>), Germania (<http://www.dsmz.de/>), Grecia (1993), Spagna, (<http://www.uv.es/cect/>), Svezia (<http://www.ccug.gu.se/>) e nel Regno Unito (<http://www.ukncc.co.uk/>). Nella

maggior parte dei casi, le singole collezioni erano già attive prima della confluenza nel consorzio, essendo state formate indipendentemente da scienziati bisognosi di tutelare i "frutti" della loro ricerca, mentre i consorzi sono nati quando è risultato evidente che le ricchezze microbiche delle collezioni individuali non erano organizzate in maniera adeguata per gli alti costi di mantenimento di personale ed attrezzature altamente specializzate e per l'impossibilità di autofinanziamento attraverso la sola vendita di colture o expertise. Inoltre, la mancanza di un'organizzazione centralizzata (in grado di aumentare notevolmente il valore intrinseco dei singoli gruppi) fa sì che la comunità scientifica non venga servita in maniera adeguata perché mancano iniziative collettive come un database comune, scambi di metodi ed altri servizi unificati.

DIFFUSIONE DI INFORMAZIONI

Collezioni con sufficiente supporto finanziario hanno per tradizione "pubblicizzato" le loro "merci" attraverso la pubblicazione di cataloghi cartacei. Tuttavia, molti "clienti" che desiderano ordinare colture attraverso questi mezzi devono affrontare diversi problemi. I cataloghi sono spesso difficili da localizzare; a volte non definiscono in maniera adeguata la vera natura dei prodotti e raramente vengono collegati insieme più cataloghi per consentire un'indagine a largo raggio. Inoltre, il cliente che deve interrogare un numero di centri deve anche affrontare problemi di geografia e lingua. Infine, tali approcci risultano inadeguati alla luce delle moderne tecniche di recupero dell'informazione attraverso infrastrutture di rete che permettono, con tempi e costi contenuti, la gestione di dati ipermediali, in cui a campi testuali possono essere integrate informazioni multimediali (immagini, sequenze genomiche) (CONALLEN, 2000). Le attuali tecnologie informatiche permettono una gestione centralizzata di diverse collezioni, con la fornitura, tramite un portale Web, di servizi che non si limitano alla sola memorizzazione e ricerca delle informazioni. Le nuove funzionalità comprendono, ad esempio: (a) l'inserimento assistito dei dati tramite programmi evoluti di verifica del rispetto di vincoli prestabiliti; (b) motori di ricerca delle informazioni (locali o reperibili in siti collegati) e supporto ad interrogazioni multi-dimensionali, in grado di fornire, a richiesta, classificazioni dinamiche dei dati; (c) un supporto cooperativo alle attività di ricerca che permetta l'inserimento di nuovi campioni non ancora esattamente classificati con la gestione delle procedure di certificazione; (d) la diffusione immediata e capillare delle informazioni con la possibilità di creare cataloghi elettronici e di gestire scenari di commercio elettronico dei campioni a disposizione.

In risposta a questi bisogni, il progetto Europeo CABRI (Common Access to Biological Resources and Information) (<http://www.cabri.org/>) era finalizzato alla preparazione di un sito web in cui i catalo-

ghi delle collezioni partner potessero essere interrogati in modo integrato ed in comune. Al momento, il servizio CABRI permette la ricerca su 28 collezioni che sono curate da 8 dei più noti Centri Europei di Ricerca Biologica e comprende più di 86000 ceppi e linee cellulari.

PROPOSTA PER LA FORMAZIONE DI UNA FEDERAZIONE ITALIANA DI COLLEZIONI DI COLTURE MICROBICHE (FICCM)

L'Italia è l'unico paese europeo privo di una coordinazione centralizzata per collezioni di microrganismi. Questa è un'emergenza nazionale che mette in grave pericolo la sopravvivenza di diversi depositi preziosi che insieme conservano quasi tutti i tipi di microrganismi e che per tradizione prestano assistenza a numerosi progetti scientifici come fornitori di colture microbiche autentiche e come indispensabili fonti di informazione sulla biologia, tassonomia, mantenimento e biodiversità microbica. Queste inestimabili ricchezze microbiche sono già presenti in Italia, ma la mancanza di una gestione coordinata e di un supporto finanziario specifico costringe le poche collezioni funzionanti a lavorare senza le basi tecniche ed organizzative essenziali per essere vere collezioni di servizio. Il risultato è una perdita vergognosa per le comunità scientifiche e biotecnologiche italiane.

Un'organizzazione centrale potrebbe risolvere molti problemi per quelle collezioni che sono già in grado di ottenere lo status di BRC a livello internazionale garantendo quell'alta efficienza indispensabile alle comunità scientifiche, industriali, agricole e biotecnologiche italiane. Si potrebbe ottenere l'integrazione attraverso la creazione di una Federazione Italiana di Collezioni di Colture Microbiche (FICCM) che lavorasse per la implementazione di servizi collettivi comuni delle BRCs italiane e la disseminazione di informazioni attraverso un comune FICCM database (anche in linea con gli standards di CABRI), catalogo e sito Internet. È importante sottolineare, tuttavia, che il valore di un database microbico è direttamente proporzionale alla ricerca precedentemente dedicata alle colture che lo compongono.

È stato recentemente proposto un progetto che inizialmente comprenderà alcune collezioni "storiche" italiane che hanno una lunga tradizione di servizio alla comunità scientifica.

LETTERATURA CITATA

- 1976 - *The Role of culture collections in the era of molecular biology*. American Society of Microbiology. Washington, D.C.
- 1988 - *Living Resources for Biotechnology: Yeasts*. Cambridge University Press, Cambridge.
- 1993 - *Greek Coordinated Collections of Microorganisms (GCCM). Catalogue of Cultures*, 2 edn. Greek Coordinated Collections of Microorganisms (GCCM). Athens.
- 1994 - WFCC Publication: *The Biodiversity of Microorganisms and the Role of Microbial Resource Centres*.
- 1996a - CBS-Centraalbureau voor Schimmelcultures-List of

- Cultures*, 34 edn. CBS-Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn. The Netherlands.
- 1996b - *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. Academic Press, San Diego.
- 1998 - *LGM-BCCM Catalogue 1998*, 1 edn. Universiteit Gent, Laboratorium voor Microbiologie. Gent, Belgium.
- AGUILAR A., 1991 - *New scientific challenges for microbial culture collections*. World J. Microbiol. Biotechnol., 7: 289-291.
- BIAVATI B., MATTARELLI P., 2000 - *The family Bifidobacteriaceae*. In: DWORKIN M. S. et al. (Eds.), *The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for Microbiological Community*. Springer-Verlag, New York.
- BOTTAZZI V., FEDERICI F., LOCCI R., MANACHINI P.L., MARTINI A., MATERASSI R., PORCEDDU E., RAMBELLI A., TURTURA G.C., VAUGHAN-MARTINI A., ZAMORANI A., 1995- *Proposals for a national collection of microbial cultures in Italy*. CNR-RAISA. Sottoprogetto 4, Monografia N. 4.
- CONALLEN J., 2000 - *Building Web Applications with UML*. Addison Wesley, New York.
- DENIS C., GARDAN L., MENORET Y., NGUYEN H.V., ROQUEBERT M.F., TAILLIEZ P., 1994 - *MINE, un filon pour les chercheurs*. Biofutur, Oct.: 31-36.
- HAWKSWORTH D.L., SCHIPPER M.A.A., 1989 - *Criteria for consideration in the accreditation of culture collections participating in MINE, the Microbial Information Network Europe*. MIRCEN J., 5: 277-281.
- KIRSOP B.E., 1984 - *Maintenance of yeasts*. In: KIRSOP B.E., SNELL J.J.S. (Eds.), *Maintenance of Microorganisms*: 109-130. Academic Press, London.
- ROBERT V., EVRARD P., HENNEBERT G.L., 1997 - *BCCMTM/Allev 2.00 an automated system for the identification of yeasts*. Mycotaxon, LXIV: 455-463.
- SLY L.I., 1996 - *WFCC: aims and achievements revisited*. In: SAMSON R.A. et al. (Eds.), *Culture Collections to Improve the Quality of Life*: 3-16. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn (The Netherlands).

RIASSUNTO – Poiché i benefici apportati dalle biotecnologie appaiono sempre più evidenti, molti governi hanno ormai riconosciuto la necessità di assicurare una speciale attenzione a questo importante argomento. Ciò appare particolarmente rilevante in quanto recenti sviluppi hanno focalizzato il problema della manipolazione delle colture, dell'origine di ceppi in grado di esprimere particolari proprietà, dei metodi di conservazione ed identificazione, nonché della richiesta di deposito per scopi brevettuali. La creazione di "specific biological resource centers (BRCs)" ed il miglioramento delle tecniche di conservazione si sono evolute secondo queste necessità e ciò è dovuto al supporto fornito dalla collezioni di colture che permettono il mantenimento delle caratteristiche di questi importanti frutti della ricerca. L'Italia è il solo paese europeo mancante di un sistema di coordinamento centralizzato delle sue collezioni di colture microbiche. Questa appare come una emergenza nazionale in grado di mettere in serio pericolo la stessa sopravvivenza di queste preziose BRCs, le quali conservano attualmente quasi tutti i tipi di microrganismi conosciuti. Inoltre, innumerevoli progetti di ricerca nazionali ed internazionali dipendono ormai da questo tipo di istituzioni per l'assistenza e per il deposito dei ceppi microbici, così come per le informazioni riguardanti la loro biologia, tassonomia, mantenimento, biodiversità ed applicazioni biotecnologiche.

Nonostante questa inestimabile ricchezza biologica già conservata in Italia, nessuna Organizzazione o Istituzione nazionale ha sentito il bisogno di supportare una gestione

coordinata e sinergica di questi depositi di biodiversità genetica fondamentali per le applicazioni biotecnologiche.

AUTORI

Ann Vaughan, Pietro Buzzini, Alessandro Martini, Dipartimento di Biologia Vegetale e Biotecnologie Agroambientali, Sez. di Microbiologia Applicata e Collezione dei Lieviti Industriali DBVPG, Università di Perugia, Borgo XX Giugno, 06121 Perugia, website: <http://www.agr.unipg.it/dbvpg/>

Conservazione *ex situ* della biodiversità dei basidiomiceti: problemi metodologici

G.C. VARESE, S. VOYRON, A. VIZZINI, A. INGARAMO e V. FILIPELLO MARCHISIO

ABSTRACT - *Ex-situ conservation of Basidiomycetes biodiversity: methodological problems* - The long-term preservation of valuable fungal cultures can be achieved in several ways. The objectives of this study were to compare the efficiency of three fungal conservation methods, (under mineral oil, distilled water and by lyophilisation) on 60 isolates of *Basidiomycetes* belonging to 35 species. After 18 months the 99% of the isolates under mineral oil, the 52% under distilled water and the 35% lyophilized held their stability. However morphological and some physiological features proved to be constant only after preservation under mineral oil or by lyophilization.

Key words: *Basidiomycetes*, culture collections, lyophilisation, preservation of fungal cultures

INTRODUZIONE

I basidiomiceti svolgono ruoli fondamentali in molti ecosistemi, come simbionti ectomicorrizici di numerose specie arboree, come decompositori, soprattutto di sostanze altamente recalcitranti quali la lignina, come parassiti di molte specie erbacee ed arboree; costituiscono fonte di cibo per vertebrati ed invertebrati e possono essere ottimi indicatori dello stato di salute dell'ambiente (ALEXOPULOS *et al.*, 1996). Essi, inoltre, hanno recentemente trovato largo impiego in numerose applicazioni biotecnologiche, industriali ed ambientali (OSIEWACZ, 2002).

La conservazione *ex-situ* dei loro miceli assicura il mantenimento a lungo termine della vitalità e delle caratteristiche morfologiche e fisiologiche degli isolati (SMITH D., ONIONS, 1994; SMITH D., 1998). Essa comporta la necessità di affrontare alcuni problemi: il reperimento in natura (alcune specie sono ipogee, altre, pur essendo epigee, in condizioni sfavorevoli non fruttificano per anni), l'identificazione, l'isolamento e infine la coltivazione in coltura pura dei miceli, particolarmente difficile per numerose specie, presumibilmente a causa della scarsa conoscenza delle loro esigenze nutrizionali. Il mantenimento degli isolati attraverso il continuo trasferimento di porzioni di micelio da un terreno nutrizionale esaurito ad una fresco (subcolture), oltre a richiedere un'ingente mole di lavoro da parte di personale specializzato, non garantisce il mantenimento a lungo termine delle caratteristiche morfologiche e fisiologiche ed è suscettibile di contaminazione da parte di propaguli aerodiffusi e acari (SMITH D., ONIONS,

1994; CROAN *et al.*, 1999). La conservazione sotto olio minerale o in acqua sterile, riducendo la quantità di ossigeno disponibile per il fungo, ne rallenta la respirazione e quindi la crescita, consentendo di dilatare nel tempo i trapianti e di arginare così gli svantaggi ad essi connessi (SMITH D., ONIONS, 1994). Sebbene alcuni funghi possano mantenersi vitali per molti anni in queste condizioni, la comparsa di alterazioni morfologiche e fisiologiche è direttamente proporzionale alla durata del periodo di conservazione (SMITH D., ONIONS, 1983, 1994; SHARMA, SMITH D., 1999). Rispetto alle subcolture classiche, la conservazione sotto olio minerale o in acqua sterile è relativamente economica e impedisce l'eventuale contaminazione da acari (SMITH D., ONIONS, 1994). Una valida alternativa alle subcolture è rappresentata dalla criopreservazione in azoto liquido. Questa metodica presenta però costi di gestione particolarmente elevati (per il continuo consumo di azoto liquido), comporta rischi per la salute e richiede personale altamente qualificato, tutti problemi che solamente le grandi collezioni internazionali possono permettersi di affrontare (SMITH D., ONIONS, 1994; CROAN *et al.*, 1999).

La liofilizzazione, una delle migliori tecniche di conservazione a lungo termine, è generalmente poco indicata per la conservazione di basidiomiceti che, nella maggior parte dei casi, non differenziano in coltura forme di resistenza quali basidiospore, conidi, clamidospore; le ife vegetative non sopravvivono ai normali protocolli di liofilizzazione (ANTHEU-NISSE,

1973; SMITH D., ONIONS, 1994; TAN *et al.*, 1994; RYBNIKAR, 1995). Recentemente, però, CROAN (2000) ha messo a punto un protocollo di liofilizzazione, per basidiomiceti lignicoli tropicali che in coltura non differenziano strutture di resistenza. L'innovazione di questo protocollo consiste nella sperimentazione di nuovi lioprotettori e di nuovi metodi per favorirne l'assorbimento fin dalle prime fasi di crescita su substrato liquido o solido.

Scopo di questo lavoro è stato sperimentare la possibilità di isolare e conservare basidiomiceti appartenenti a differenti gruppi sistematici. In particolare si è cercato di individuare la strategia di conservazione più appropriata, compatibilmente alle risorse umane ed economiche della *Mycotheca Universitatis Taurinensis* (MUT), sperimentando, per ora su un numero limitato di isolati, tre differenti tecniche di conservazione, in olio minerale, in acqua sterile e mediante liofilizzazione secondo il protocollo di CROAN (2000).

MATERIALI E METODI

I basidiomiceti sono stati raccolti nell'anno 2000 nel bosco dell'Alevè, area protetta localizzata sul versante meridionale del Monviso, nelle Alpi Cozie (CN). L'isolamento è stato condotto a partire da basidiomi in buone condizioni, non intaccati da larve o in stato avanzato di marcescenza. In ambiente sterile sono stati prelevati frammenti di circa 1,5 mm³ dalla porzione compresa fra stipite e pileo, ritenuta come la più indicata per l'isolamento (HEINONEN-TANSKI, HOLOPAINEN, 1991). Per basidiomi di dimensioni molto ridotte si è proceduto al taglio di frammenti di circa 1,5 mm³ e alla loro sterilizzazione, per immersione, in H₂O₂ 30% per 1 min, seguita da numerosi lavaggi in H₂O sterile.

Da ogni basidioma sono stati prelevati più frammenti che sono stati disposti in 8 capsule Petri da 5 cm di diametro contenenti due diversi terreni nutritivi: Agar malto (MEA) e Agar Hagem (HGA). A entrambi i terreni sono stati aggiunti antibiotici (streptomina 0.015 g l⁻¹; cloramfenicolo 0.05 g l⁻¹) e, nella metà delle piastre impiegate per l'isolamento, è stato addizionato anche il benomyl (0.004 g l⁻¹), fungicida sistemico ad ampio spettro. Tutti i miceli sviluppati dagli inoculi sono stati controllati macro- e microscopicamente. I miceli che in coltura non presentavano unioni a fibbia sono stati sottoposti al test colorimetrico con blu di diazonio (DBB), che permette di discriminare i miceli basidiomicetoidi da quelli ascomicetoidi (SUMMERBELL, 1985).

Di ogni micelio in coltura, immediatamente dopo l'isolamento, sono state valutate le caratteristiche morfologiche e fisiologiche. In particolare è stata misurata la crescita radiale a 24°C dopo 7 e 15 giorni su MEA e su terreni contenenti acido gallico (GAA) o tannico (TAA); inoltre sono stati presi in considerazione la tessitura del micelio nelle aree centrali e marginali della colonia, nonché il colore e l'odore della stessa. Le caratteristiche microscopiche sono state valutate mediante osservazioni al micro-

scopio ottico, di almeno 8 preparati per ogni isolato, provenienti da diverse zone della colonia (micelio aereo e micelio sommerso dalla periferia e dal centro della colonia). In particolare sono stati valutati: diametro, colore, andamento e caratteristiche delle ife, frequenza dei setti, presenza/assenza e forma delle unioni a fibbia, presenza di strutture particolari (vescicole, clamidospore, artroconidi, cristalli). Le caratteristiche fisiologiche sono state saggiate considerando la produzione di polifenolossidasi (laccasi e tirosinasi), perossidasi, fosfatasi ed esterasi, attraverso test enzimatici semiquantitativi (DAVIDSON *et al.*, 1938; STALPERS, 1978)

Su 60 isolati riconducibili a 35 specie di basidiomiceti sono state sperimentate:

- la conservazione in olio minerale e in acqua e secondo i protocolli di SMITH D., ONIONS (1994), alla temperatura di 4°C;
- la liofilizzazione secondo il protocollo di CROAN (2000) e mantenendo i liofilizzati a temperatura ambiente in luogo asciutto.

Dopo 18 mesi è stata valutata la vitalità e la stabilità degli isolati sottoposti alle differenti tecniche di conservazione, confrontando le caratteristiche morfologiche e fisiologiche con quelle descritte immediatamente dopo l'isolamento in coltura pura.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dei 154 campioni ritenuti idonei all'isolamento è stato possibile isolare in coltura pura il micelio di 86 basidiomi, riconducibili a 47 specie, pari al 56% dei campioni raccolti. La presenza del fungicida benomyl ha incrementato il successo di isolamento, anche se la concentrazione impiegata è risultata letale per taluni funghi quali *Lentinus lepidus*, *Agaricus sylvicola* e *Collybia maculata*, che, invece, si sono sviluppati sulle piastre prive di fungicida. Questo dato contrasta con quanto affermato da MALOY (1974) secondo cui il benomyl produce effetti inibitori nei confronti degli imenomiceti soltanto a concentrazioni uguali o superiori a 0.005 g l⁻¹.

Tutti i funghi sono risultati positivi alla colorazione con DBB.

Un certo numero di isolati appartenenti a differenti gruppi trofici non è sopravvissuto ai primi trapianti in coltura, per cui la percentuale finale di isolamento in coltura pura è risultata del 40% (60 isolati riconducibili a 35 specie). La difficoltà nell'ottenere subcolture può essere imputabile alle ancora scarse conoscenze circa le esigenze nutrizionali di molti esponenti di questo gruppo di funghi (SMITH D., ONIONS, 1994; CROAN, 1999). Da quanto presentato emerge quindi che la percentuale di isolamento in coltura pura può essere ulteriormente migliorata, attraverso uno studio più approfondito delle esigenze nutrizionale dei basidiomiceti e un utilizzo più mirato del benomyl o di altri fungicidi. Di seguito sono indicati gli isolati ottenuti in coltura pura con i relativi numeri di deposito assegnati dalla MUT: *Phaeolus schweinitzii* (Fr. : Fr.) Pat. (2943, 2944, 2945), *Trametes hirsuta* (Wulfen : Fr.) Pilát (2974);

Laetiporus sulphureus (Bull. : Fr.) Murrill (2962); *Lentinus lepideus* (Fr. : Fr.)Fr. (2965); *Agaricus essettei* Bon (2505); *Agaricus arvensis* Schaeff. : Fr. (2975); *Agaricus silvicola* Schaeff. : Fr. (2973); *Macrolepiota procera* (Scop. : Fr.) Singer (2466; 2503; 2946; 2947; 2948); *Amanita echinocephala* (Vittad.) Quéf. (2970); *Amanita muscaria* (L.) Lam. (2467); *Agrocybe pediatas* (Fr. : Fr.) Fayond (2967); *Agrocybe praecox* (Pers. : Fr.) Fayond (2968); *Stropharia semiglobata* (Batsch : Fr.) Quéf. (2468; 2952; 2953; 3068; 3069); *Pholiota lenta* (Pers. : Fr.) Singer (2972); *Paneolus fimiputris* (Bull. : Fr.) Quéf. (2502; 2951); *Clitocybe gibba* (Pers. : Fr.) P. Kumm. (2959); *Clitocybe nebularis* (Batsch : Fr.) P. Kumm. (2506); *Clitocybe ditopa* (Fr. : Fr.) Gillet (2966); *Collybia dryophila* (Bull. : Fr.) P. Kumm. (2465); *Collybia acervata* (Fr.) P. Kumm. (2504); *Collybia butyracea* (Bull. : Fr.) P. Kumm. var. *asema* (Fr. : Fr.) Quéf. (2509; 2649; 2955; 2956; 2961); *Collybia erythropus* (Pers. : Fr.) P. Kumm. (2648); *Collybia maculata* (Alb. & Schwein. : Fr.) P. Kumm. (2964); *Marasmius oreades* (Bolton : Fr.) Fr. (2969); *Leucopaxillus amarus* (Alb. & Schwein. : Fr.) Kühner (2507; 2508; 2960); *Leucopaxillus paradoxus* (Costantin & Dufour) Boursier (3070); *Mycena galericulata* (Scop. : Fr.) Gray (2730); *Ripartites tricholoma* (Alb. & Schwein. : Fr.) P. Karst. (2963); *Lepista nuda* (Bull. : Fr.) Cooke (2971; 3067); *Calocybe gambosa* (Fr. : Fr.) Singer (2954); *Suillus sibiricus* (Singer) Singer (2647); *Suillus grevillei* (Klotzsch : Fr.) Singer (2650; 2957; 3064); *Lycoperdon perlatum* Pers. : Pers. (2651; 2652; 2958; 3065; 3066); *Bovista plumbea* Pers. : Pers. (2949; 2950); *Crucibulum crucibuliforme* (Scop.) V.S. White (2469).

Per quanto riguarda la valutazione delle differenti tecniche di conservazione, quella in olio minerale ha fornito la maggior percentuale di rivitalizzazione: tutti i funghi, con la sola eccezione di *Amanita echinocephala* (2970), sono rimasti vitali dopo 18 mesi. Le caratteristiche morfologiche macro- e microscopiche degli isolati si sono mantenute costanti per la maggioranza degli isolati. Inoltre i miceli non hanno manifestato variazioni nella velocità di crescita quando inoculati su MEA, GAA e su TAA. Le caratteristiche enzimatiche sono rimaste inalterate per la maggior parte degli isolati (81,5%) e le maggiori variazioni sono state osservate a carico dell'attività esterasica e fosfatase.

Il confronto con la letteratura ci pone di fronte a molti dati riferiti a zigomiceti, ascomiceti e funghi mitosporici (SMITH D., ONIONS, 1994; SHARMA, SMITH D., 1999), mentre scarsi sono quelli riferiti ai basidiomiceti (KOBAYASHI, 1984; JOHNSON, MARTIN, 1992). La percentuale di rivitalizzazione da noi ottenuta (99%) è paragonabile o superiore a quella ottenuta da differenti autori per i diversi gruppi sistematici (KOBAYASHI, 1984; JOHNSON, MARTIN 1992; SMITH D., ONIONS, 1994; SHARMA, SMITH D., 1999). Tuttavia la ripresa della crescita, così come la comparsa di variazioni morfologiche e fisiologiche sembrano essere direttamente proporzionali alla durata del periodo di conservazione (SMITH D.,

ONIONS, 1983, 1994; SHARMA, SMITH D., 1999). Sarà quindi necessario trovare conferma dei risultati ottenuti prolungando i tempi di permanenza degli isolati in olio minerale.

La conservazione in acqua sterile ha permesso la rivitalizzazione di una percentuale minore di isolati (52%) e ha indotto pesanti modificazioni delle attività enzimatiche e delle velocità di crescita. I dati di letteratura a questo riguardo sono contrastanti e presentano situazioni diverse. Per ascomiceti e funghi mitosporici la percentuale di rivitalizzazione è del 100% (JOHNSON, MARTIN, 1992; SMITH D., ONIONS, 1994), per basidiomiceti micorrizici del 94%, dopo 20 mesi di conservazione (SMITH J.E. *et al.*, 1994) e scende al 26% per basidiomiceti lignicoli dopo 10 anni (JOHNSON, MARTIN, 1992). Secondo alcuni autori (JOHNSON, MARTIN, 1992; SMITH J.E. *et al.*, 1994) sono critici nell'applicazione di questa tecnica alcuni passaggi metodologici come il tipo di terreno utilizzato per ottenere gli inoculi, la dimensione stessa degli inoculi e il volume di acqua necessario per ricoprirli. RICHTER, BRUHN (1989), invece, ritengono che la sopravvivenza sia soprattutto influenzata dalle temperature e suggeriscono di sperimentare la conservazione di uno stesso isolato a temperature comprese tra i 4 e i 18°C. Gli autori citati, tuttavia, non hanno preso in considerazione le variazioni fisiologiche che, secondo noi, hanno un peso importante nel giudizio sulla validità e sull'applicabilità della tecnica.

La conservazione attraverso liofilizzazione, applicando il protocollo di CROAN (2000), ha mantenuto vitale solamente il 35% degli isolati. Il risultato, tuttavia, è da ritenersi incoraggiante considerando che il 67% delle colture rivitalizzate era costituito soltanto di micelio e non presentava perciò propaguli riproduttivi, clamidospore o altre strutture di resistenza ritenute indispensabili per il successo della liofilizzazione secondo le metodiche classiche (SMITH D., ONIONS, 1994; TAN *et al.*, 1994; RYBNIKAR, 1995). Inoltre tutti gli isolati rivitalizzati hanno mantenuto pressoché invariate sia le caratteristiche morfologiche, sia le velocità di crescita e la maggior parte delle caratteristiche fisiologiche (alcune variazioni sono state riscontrate per l'attività fosfatase). CROAN (2000) ottiene percentuali di rivitalizzazione molto più alte delle nostre (97%). Le diverse caratteristiche dei miceli dei basidiomiceti (lignicoli tropicali) e l'impiego di un liofilizzatore tecnicamente molto più avanzato del nostro potrebbero spiegare le differenze nei risultati. In particolare la possibilità di poter regolare la velocità di raffreddamento delle ampolle sembra essere fondamentale per il successo della conservazione. È noto infatti che la velocità di raffreddamento ideale varia sensibilmente da specie a specie (SMITH D., ONIONS, 1994; TAN *et al.*, 1994). Il nostro liofilizzatore non lo permette. Per questo riteniamo che maggiori successi possano essere ottenuti con l'acquisto di un liofilizzatore più moderno e adeguando il protocollo di CROAN (2000) alle esigenze specifiche di ogni isolato. In questo modo questa tecnica di conservazione potrebbe essere estesa anche ai

miceli sterili di altri gruppi sistematici

La caratterizzazione morfofisiologica di tutti gli isolati impiegati in questo studio ha messo in evidenza la possibilità di impiegare alcuni dei test considerati come marcatori tassonomici. In particolare il test di Bavendamm e i drop tests, relativi alla produzione di laccasi, perossidasi e tirosinasi, in precedenza esclusivamente applicati agli *Aphyllphoromycetidae*, sembrano rappresentare un valido mezzo diagnostico anche per gli *Agaricomycetidae*.

LETTERATURA CITATA

- ALEXOPOULOS C.J., MINS C.W., BLACKWELL M., 1996 – *Introductory Mycology*: 488-507. John Wiley & Sons (ed.). New York.
- ANTHEUNISSE J., 1973 - *Viability of liophized microorganisms after storage*. Antonie van Leuwenhoek, 39: 243-248.
- CROAN S.C., 2000 – *Lyophilization of hypha-forming tropical wood-inhabiting basidiomycetes*. Mycologia, 91 (5): 810-817.
- CROAN S.C., BURDSALL H.H., RENTMEESTER R.M., 1999 – *Preservation of tropical wood-inhabiting basidiomycetes*. Mycologia, 91 (5): 908-916.
- DAVIDSON R.W., CAMPBELL W.A., BLAISDELL D.J., 1938 – *Differentiation of wood-decaying fungi by their reaction on gallic or tannic acid medium*. J. Agric. Res., 57: 638-695.
- HEINONEN-TANSKI H., HOLOPAINEN T., 1991 – *Maintenance of ectomycorrhizal fungi*. In: *Methods in Microbiology*: 413-422. Academic Press Limited.
- JOHNSON G.C., MARTIN A.K., 1992 – *Survival of wood-inhabiting fungi stored for ten years in water and under oil*. Can. J. Microbiol., 38: 861-864.
- KOBAYASHI T., 1984 – *Maintaining cultures of Basidiomycetes by mineral oil method*. I. Bull. For.-For. Product Res. Inst., 325: 141-147.
- MALOY O.C., 1974 – *Benomyl-malt agar for the purification of cultures of wood decay fungi*. Plant Dis. Rep., 58 (10): 902-904.
- OSIEWACZ H.D. (ed.), 2002 – *The Mycota*. Vol. X. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- RICHTER D.L., BRUHN J.N., 1989 – *Revival of saprophytic and mycorrhizal basidiomycetes cultures from cold storage in sterile water*. Can. J. Microbiol., 35: 1055-1060.
- RYBNIKAR, 1995 – *Long-term maintenance of lyophilized fungal cultures of the genera Epydermophyton, Microsporium, Paecilomyces and Trichophyton*. Mycoses, 38: 145-147.
- SHARMA B., SMITH D., 1999 – *Recovering of fungi after storage for over a quarter of a century*. World J. Microbiol. Biotechnol., 15: 517-519.
- SMITH D., 1998 – *The use of cryopreservation in the ex-situ conservation of fungi*. Cryo-Letters, 19: 79-90.
- SMITH D., ONIONS A.H.S., 1983 – *A comparison of some preservation techniques for fungi*. Trans. British Mycol. Soc., 81: 535-540.
- , 1994 – *The preservation and maintenance of living fungi*. 2nd ed. IMI Technical Handbooks 1. CAB International, Wallingford.
- SMITH J.E., MCKAY D., MOLINA R., 1994 – *Survival of mycorrhizal fungal isolates stored in distilled water at two temperatures and retrieved on solid and liquid nutrient media*. Can. J. Microbiol., 40: 736-742.
- STALPERS J.A. 1978, - *Identification of wood-inhabiting Aphyllphorales in pure culture*. Stud. Mycol., 16: 1-248.
- SUMMERBELL R.C., 1985 – *The staining of filamentous fungi with Diazonium Blue B*. Mycologia, 77: 587-593.
- TAN C.S., VLUG I.J.A., STALPERS J.A. INGEN C.W. VAN., 1994 – *Microscopical observation on the influence of the cooling rate during freeze-drying of spores*. Mycologia, 86: 281-289.

RIASSUNTO - Su un numero ristretto di isolati (60 isolati riconducibili a 35 specie) di Basidiomiceti della MUT è stato intrapreso uno studio volto a individuare la migliore strategia di conservazione a lungo termine. Sono state sperimentate tre tecniche di conservazione: la conservazione in olio minerale e in acqua sterile e la liofilizzazione. La conservazione in olio minerale ha mantenuto la vitalità del 99% degli isolati; il 35% degli isolati è sopravvissuto al processo di liofilizzazione. In entrambi i casi si sono mantenute pressoché inalterate le caratteristiche morfologiche e fisiologiche. La conservazione in acqua ha mantenuto vitale il 52% degli isolati che, però, hanno mostrato un elevato grado di variazione. I test enzimatici, in particolare quelli per le laccasi, per le tirosinasi e per le perossidasi, si sono dimostrati utili anche a fini diagnostici e tassonomici.

AUTORI

G.C. Varese, S. Voyron, A. Vizzini, A. Ingaramo, V. Filipello Marchisio*, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Torino, Viale Mattioli 25, 10125 Torino, Italy

*Corresponding Author

L'aerosol fungino negli impianti di compostaggio: rischio per la salute e per l'ambiente

G.C. VARESE, V. PRIGIONE, A. ANASTASI, L. CASIERI, S. VOYRON e V. FILIPELLO MARCHISIO

ABSTRACT - *Fungal aerosol in composting plants: an health and environmental risk* - This work reports on the airborne fungi collected from two municipal composting plants in Italy. The samples were collected at critical stages in the composting process and also upwind and downwind from the plants using a single-stage volumetric sieve, culturable fungus sampler. Complete qualitative and quantitative evaluations of the airborne mycoflora were made in one plant only. In the other plant, the total load (CFU/m³ of air) and the qualitative and quantitative airborne composition of *Aspergilli* (recognized as markers of environmental pollution) were evaluated. In most samples, the total load was well above the upper limit of the instrument (>43.800 CFU/m³). In the upwind samples, populations were many times lower than those inside the plants. *Aspergillus* spp. accounted for nearly 100% of the total load at some samples. *A. fumigatus* was found in most sites, often with a high load. These findings underscore the need for monitoring populations of and for legislative standards for airborne fungi that pose a health threat to compost plant workers or to individuals living in the neighborhood of such plants.

Key words: bioaerosol, compost, funghi, rischio biologico

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni il processo di compostaggio è diventato parte integrante della moderna gestione dei rifiuti. La produzione di compost permette infatti di ridurre drasticamente la mole di rifiuti da smaltire in discarica e al contempo permette di ottenere prodotti utili da utilizzare in svariati settori: in agricoltura come fertilizzante, ammendante e nella soppressione dei patogeni vegetali, nel controllo dell'erosione dei suoli e nel biorisanamento di ambienti contaminati. Il processo di compostaggio presenta quindi numerosi vantaggi ecologici ed economici, ma, quando attuato su scala industriale, pone seri rischi per la salute dell'uomo e per l'ambiente, attraverso la generazione di contaminanti biologici aerodiffusi quali batteri e, soprattutto, funghi (MILLNER *et al.*, 1994; BEFFA *et al.*, 1998).

L'inalazione di elevate concentrazioni di bioaerosol fungino può causare manifestazioni cliniche acute e croniche di natura allergica e tossica per la presenza di micotossine e di composti organici volatili (MVOC), e, occasionalmente, infezioni, principalmente a carico dell'apparato respiratorio (LACEY, DUTKIESWICZ, 1994; DUTKIESWICZ, 1997; FISHER *et al.*, 1998, 2000). I soggetti a rischio sono soprattutto i lavoratori impegnati nelle pratiche agricole, nelle industrie alimentari o di lavorazione del legno e negli

impianti di compostaggio (LUNDHOLM, RYLANDER, 1980; MALMROS, 1990; FILIPELLO MARCHISIO *et al.*, 1999; BÜNGER *et al.*, 2000). Almeno due casi di malattie respiratorie acute associate alla lavorazione del compost sono già stati segnalati (WEBER *et al.*, 1997; BROWN *et al.*, 1995). Ma c'è da ritenere che molti casi passino sotto silenzio per le scomode conseguenze legali del problema.

Il rischio per la salute derivante dalla liberazione di propaguli fungini durante il processo di compostaggio è, perciò, un problema molto attuale e riguarda sia gli operatori, sia la popolazione residente nelle aree limitrofe agli impianti. Tuttavia esso è ancora sottovalutato. Nella maggior parte degli studi finalizzati alla determinazione del rischio biologico è stata presa in considerazione esclusivamente la carica totale di batteri e funghi (MARCHAND *et al.*, 1995; LAVOIE, ALIE, 1997; FOLMSBEE, STREVEY, 1999), ma questi dati, seppur utili, non sono sufficienti per una corretta valutazione del rischio che dovrebbe basarsi su un'analisi il più possibile esaustiva della composizione quanti- e qualitativa dei contaminanti aerodiffusi (SUMMERBELL *et al.*, 1994; FILIPELLO MARCHISIO *et al.*, 1999; FISCHER *et al.*, 1998, 1999, 2000). Fino ad oggi, l'attenzione è stata rivolta quasi unicamente verso *Aspergillus fumigatus*, ma, oltre a

questa specie, molte altre possono essere implicate in micosi, allergosi e micotossicosi. Per una corretta valutazione dei rischi igienico-sanitari è essenziale, quindi, una completa caratterizzazione della micoflora del bioaerosol.

La legislazione italiana non fornisce indicazioni per questo tipo di rischio. In altri paesi, invece, in relazione al crescente impiego del compostaggio per la riduzione dei rifiuti solidi ed al crescente numero di casi clinici ad esso associabili, sono state elaborate linee guida per la salvaguardia della salute pubblica. Poiché ogni impianto possiede caratteristiche proprie di natura tecnica e collegate al tipo di materiale che viene raccolto, abbiamo studiato i funghi aerodiffusi in due impianti di compostaggio dell'Italia nord-occidentale. Ci auguriamo che il nostro contributo possa sensibilizzare al problema le Autorità competenti.

MATERIALI E METODI

Nel primo impianto (CF1) il processo di compostaggio tratta la frazione organica del rifiuto solido urbano (ORSU), a cui vengono addizionati residui vegetali di origini differenti. La raccolta dei campioni è avvenuta nella primavera del 2000 in otto siti interni (ricezione rifiuti / camera manovra gruista, ricezione rifiuti / vagliatura, camera di biossidazione / macchina rivoltatrice, camera controllo tunnel compostaggio, camera di biossidazione / nastro trasportatore, rivoltamento compost in maturazione, aria pre-biofiltro, aria post-biofiltro) e in due controlli esterni, sopravento e sottovento.

Nel secondo impianto (CF2), il processo di compostaggio tratta separatamente rifiuti solidi urbani su una linea (CF2/1) e ORSU più carta e scarti vegetali su un'altra linea (CF2/2). I campioni sono stati raccolti nell'estate del 2001 in quattro siti della linea CF2/1 (camera di biossidazione durante il rivoltamento, vagliatura del compost in maturazione, separazione rifiuti non biodegradati, aria post-biofiltro), in due siti della linea CF2/2 (ricezione rifiuti/vagliatura, rivoltamento compost in maturazione) e nei 2 controlli esterni, sopravento e sottovento. Per il cam-

pionamento è stato impiegato un campionatore volumetrico a impatto su terreno di coltura (SAS super 180, Pool Bioanalyse Italiana), con piastre Petri da 84 mm. In ogni sito è stato aspirato un volume di aria di 2400 litri e sono stati impiegati i seguenti terreni colturali: potato-dextrose agar (PDA, 10 ripetizioni e 60 litri d'aria per ripetizione) e Dichloran rose bengal chloramphenicol agar (DRBC, 10 piastre, 60 litri d'aria per piastra) per la determinazione della carica totale (incubate a 24°C); PDA addizionato di cicloesimide (CX-5 piastre, 120 litri d'aria per piastra) per l'isolamento selettivo di *Aspergillus fumigatus* (incubate a 37°C); *A. flavus/A. parasiticus* agar (AFPA, 5 piastre, 120 litri d'aria per piastra) per l'isolamento selettivo di *A. flavus*, *A. parasiticus* e specie correlate (incubate a 30°C). La carica fungina è stata espressa come unità formanti colonia (CFU) per m³ di aria. Alla carica totale è stato applicato il fattore di conversione di Andersen (ANDERSEN, 1958). E' stato inoltre calcolato il rapporto in/out fra la carica totale dei siti ed i relativi siti sopravento.

Per l'impianto CF1 è stata determinata la completa composizione qualitativa e quantitativa della micoflora aerodiffusa, mentre per l'impianto CF2 sono state valutate la carica totale, la percentuale di lieviti e la composizione qualitativa e quantitativa del solo genere *Aspergillus*. L'attenzione è stata focalizzata su questo genere perché molte specie ad esso ascrivibili sono causa di micosi e tossicosi e vengono pertanto utilizzate come markers di inquinamento ambientale.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nell'impianto CF1 la carica fungina totale è risultata generalmente elevata e in 3 siti (D,F,G) superiore al limite strumentale del campionatore (4.4 10⁴ CFU/m³) (Tab. 1). Nell'impianto CF2 le cariche fungine totali all'interno e sottovento dell'impianto erano sempre più elevate del limite strumentale del campionatore e nettamente superiori rispetto al sito di controllo sopravento (Tab. 2). I valori di carica riportati per il microaerosol all'interno dei due impianti studiati sono paragonabili a quelli segnalati

TABELLA 1

Carica fungina totale, percentuale di lieviti, percentuale di *Aspergillus spp.* e rapporto in/out nei diversi siti dell'impianto CF1. Total fungal load, percentage of yeast, percentage of *Aspergillus spp.* and in/out ratio in each sites of the plant CF1.

Siti	Carica totale (CFU/m ³)	% Lieviti	% <i>Aspergilli</i>	rapporto in/out
Sopravento (A)	4.1·10 ²	0.8	0.0	-
Ricezione rifiuti / camera manovra gruista (B)	3.6·10 ⁴	0.7	10.9	86.7
Ricezione rifiuti / vagliatura (C)	4.6·10 ³	23.2	16.2	11.1
Camera di biossidazione / macchina rivoltatrice (D)	>4.4·10 ⁴	0.8	7.4	>106.8
Camera controllo tunnel compostaggio (E)	2.7·10 ³	1.6	0.8	6.5
Camera di biossidazione / nastro trasportatore (F)	>4.4·10 ⁴	0.0	55.6	>106.8
Rivoltamento compost in maturazione (G)	>4.4·10 ⁴	0.0	3.9	>106.8
Aria pre-biofiltro (H)	3.8·10 ³	1.9	5.2	9.2
Aria post-biofiltro (I)	2.5·10 ⁴	0.0	18.9	61.1
Sottovento (L)	3.3·10 ³	1.9	0.0	7.9

TABELLA 2

Carica fungina totale, percentuale di lieviti, percentuale di *Aspergillus* spp. e rapporto in/out nei diversi siti dell'impianto CF2. Total fungal load, percentage of yeast, percentage of *Aspergillus* spp. and in/out ratio in each sites of the plant CF2.

Siti	Carica totale (CFU/m ³)	% Lieviti	% Aspergilli	rapporto in/out
Sopravento (Q)	1.2·10 ³	9.0	8.8	-
Camera di bioossidazione durante il rivoltamento CF3/1 (R)	> 4.4·10 ⁴	0.0	~100	>33.7
Vagliatura del compost in maturazione CF3/1 (S)	> 4.4·10 ⁴	0.0	~100	>33.7
Separazione rifiuti non biodegradati CF3/1 (T)	> 4.4·10 ⁴	0.0	~100	>33.7
Aria post-biofiltro CF3/1 (U)	> 4.4·10 ⁴	0.5	11.5	>33.7
Ricezione rifiuti / vagliatura CF3/2 (V)	> 4.4·10 ⁴	0.0	23.7	>33.7
Rivoltamento compost in maturazione CF3/2 (W)	> 4.4·10 ⁴	0.4	17.7	>33.7
Sottovento (X)	> 4.4·10 ⁴	1.2	7.1	>33.7

da altri autori in lavori analoghi (LACEY, CROOK, 1988; FISHER *et al.*, 1998; FOLMSBEE, STREVETT, 1999). I lieviti rappresentavano una piccola percentuale della carica totale in tutti i siti di entrambi gli impianti con l'unica eccezione dell'area di ricezione dei rifiuti dell'impianto CF1 (Tabb. 1 e 2). Per quanto è a nostra conoscenza questo gruppo di funghi non viene considerato durante la valutazione del rischio biologico. Tuttavia la valutazione della carica di questo gruppo di funghi e l'identificazione delle loro specie non dovrebbe essere trascurata dal momento che alcune specie di lieviti sono patogene per l'uomo e per gli animali (RICHARDSON, WARNOCK, 1997).

Sebbene questi dati assoluti possano essere estremamente utili, il loro impiego nella valutazione del rischio è ostacolato dall'assenza di valori soglia di riferimento. Abbiamo perciò calcolato il rapporto in/out (sito interno/controllo esterno sopravento), un parametro spesso impiegato nella valutazione dell'inquinamento dell'aria indoor. In condizioni normali la composizione delle due micoflore dovrebbe essere simile e il rapporto in/out deve essere inferiore a 1. Fonti di contaminazione comportano maggiori concentrazioni e una differente composizione del bioaerosol (REYNOLDS *et al.*, 1990; MACHER *et al.*, 1991; FILIPPELLO MARCHISIO *et al.*, 1999; FOLMSBEE, STREVETT, 1999).

Nei differenti siti dell'impianto CF1 il rapporto in/out variava tra 6.5 e >106.8; nei siti dell'impianto CF2 era sempre maggiore di 33.7; nei due siti sottovento il rapporto in/out rispetto al controllo sopravento era sempre molto maggiore di 1.

Anche da un punto di vista qualitativo il microaerosol dei siti all'interno dell'impianto CF1 differiva da quello del controllo sopravento, dominato dai funghi del genere *Cladosporium*.

Nel complesso la biodiversità dei funghi filamentosi riscontrata nell'impianto CF1 è stata notevole: sono state identificate 80 entità fungine riconducibili a 40 generi e a differenti miceli sterili, inclusi alcuni basidiomiceti. La micoflora era composta soprattutto da funghi mitosporici (62 specie, soprattutto appartenenti ai generi *Penicillium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis* e *Cladosporium*), seguiti da Zigomiceti (11 specie),

miceli sterili (4 morfotipi) e Ascomiceti (3 specie). La maggior parte delle specie sono risultate legate in modo preferenziale ad una o più fasi della lavorazione del compost. Solo un numero limitato di funghi (*Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis* spp.) erano presenti, seppur con concentrazioni molto differenti, nel bioaerosol di tutti o quasi i siti dell'impianto. In particolare il bioaerosol nei siti F e G era principalmente composto da specie appartenenti all'ordine Mucorales (*Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor* e *Circinella* spp.), il sito D si contraddistingueva per l'elevata frequenza di *Scopulariopsis* spp. e *Aspergillus versicolor*. I siti E, H all'interno dell'impianto nonché il sito L (controllo sottovento) erano caratterizzati da una frequenza elevata di *Cladosporium* spp. I siti B e C presentavano una micoflora simile, con *Penicillium echinulatum*, *Trichosporon* sp. e *A. fumigatus* tra le specie più abbondanti. Il sito I era caratterizzato da una frequenza elevata di *Emericella nidulans*, *Cladosporium* spp., *Trichurus spiralis* e *Aphanocladium album*, queste ultime due specie quasi o completamente assenti in tutti gli altri siti dell'impianto. Un discorso a parte meritano gli Aspergilli, data la loro implicazione in numerose patologie e il loro impiego quali markers di inquinamento ambientale (FISCHER *et al.* 1999, 2000). La percentuale di Aspergilli nell'impianto CF1 variava tra 0.8 e 55.6; la loro presenza non è stata rilevata nei due siti esterni all'impianto (Tab. 1). La percentuale di Aspergilli in tutti i siti dell'impianto CF2 e sottovento è risultata maggiore rispetto al controllo sopravento. In particolare nei siti R, S, e T essi rappresentavano pressoché la totalità dei funghi aerodiffusi (Tab. 2). Questi stessi siti erano caratterizzati da una minore biodiversità rispetto agli altri e da una distinta prevalenza di *A. flavus* var. *flavus* nei siti R e S e di *E. nidulans* nel sito T. Gli altri siti mostravano una maggiore biodiversità con una prevalenza di *E. nidulans* nei siti U e W, di *A. awamori* nel sito V, di *A. fumigatus* nel controllo sopravento e di *A. flavus* var. *flavus* nel controllo sottovento. Nel complesso sono state isolate 10 e 15 specie, rispettivamente in CF1 e in CF2. Alcune specie di questo genere come *A. alliaceus* nell'impianto CF1 e *A. oryzae*, *A. phoenicis* e *A. sidowii* nell'impianto CF2 risultavano legate in modo preferenziale

ad un sito; solo un numero limitato di specie (*A. awamori*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *E. nidulans*) erano presenti, seppur con concentrazioni molto differenti, nel bioaerosol di tutti o quasi i siti degli impianti.

In entrambi gli impianti il passaggio dell'aria attraverso i biofiltri comportava l'incremento di specie potenzialmente pericolose come ad esempio *A. fumigatus*, la comparsa di specie non riscontrate negli altri siti degli impianti come *Trichurus spiralis* nell'impianto CF1 e *A. oryzae*, *A. phoenicis* e *A. sydowi* nell'impianto CF2 e anche un aumento della carica fungina totale. I biofiltri sono normalmente costituiti da cippato di legno e compost maturo e vengono impiegati per deodorizzare l'aria proveniente dalla camera di biossidazione. I dati presentati indicano che i biofiltri rappresentano un punto critico nella gestione degli impianti di compostaggio, perché essi possono contribuire notevolmente all'emissione di microrganismi nell'area circostante, come già dimostrato anche da KAMPFER e collaboratori (2002).

La composizione quantitativa e qualitativa del microaerosol varia durante il processo di compostaggio. La camera di biossidazione e il rivoltamento del compost in maturazione sono i siti dove si verifica la maggiore dispersione di propaguli e quindi risultano le aree più a rischio per i lavoratori degli impianti come già dimostrato da altri autori (FISCHER *et al.* 1998; FOLMSBEE, STREVETT, 1999).

I dati ottenuti dimostrano anche che i propaguli fungini generatisi durante il processo di compostaggio possono diffondere facilmente nell'aria, esterna, secondo la direzione prevalente del vento, rappresentando un pericolo per le popolazioni che vivono nelle aree limitrofe agli impianti stessi. L'attenzione deve essere focalizzata non solo sul rischio rappresentato dalla presenza di *Aspergillus fumigatus* e altre specie correlate, ma anche su funghi appartenenti all'ordine *Mucorales* e al genere *Scopulariopsis* presenti con cariche particolarmente elevate in alcuni siti dell'impianto CF1. Questi funghi infatti possono essere implicati in differenti patologie umane (SMITH, 1989; KWON-CHUNG, BENNET, 1992; FILIPELLO MARCHISIO *et al.*, 2000; FILIPELLO MARCHISIO, FUSCONI, 2001).

La necessità di un severo controllo del bioaerosol fungino negli impianti di compostaggio è, inoltre, sottolineata dalla segnalazione sempre più frequente di casi di malattie professionali, principalmente a carico dell'apparato respiratorio, tra gli operatori del settore (LUNDHOLM, RYLANDER, 1980; POULSEN *et al.*, 1995; BROWN *et al.*, 1997; BÜNGER *et al.*, 2000). Attualmente in Italia, come nella maggior parte degli altri paesi non esistono valori soglia per la presenza di funghi, micotossine e MVOC nell'aria. Questo vuoto legislativo è almeno in parte giustificabile dalla mancanza di sufficienti dati epidemiologici che consentano di ricavare un chiaro nesso causa-effetto tra presenza di funghi nel bioaerosol e insorgenza di manifestazioni cliniche.

In mancanza di vincoli legislativi, la prima linea di difesa nei confronti dell'esposizione ai funghi aereo-

diffusi, oltre ad un assiduo uso dei dispositivi di protezione individuale da parte degli operatori, rimane il mantenimento di condizioni che prevengano la contaminazione biologica, il che presuppone anche una corretta progettazione degli impianti.

LETTERATURA CITATA

- ANDERSEN A.A., 1958 - *New samples for the collection, sizing and enumeration of viable airborne particles*. J. Bacteriol., 76: 471-484.
- BEFFA T., STAIB F., LOTT FISCHER J., LYON P.F., GUMOWSKI P., MARFENINA O.E., DUNOYER-GEINDRE S., GEORGEN F., ROCH-SUSUKI R., GALLAZ L., LATGE J.P., 1998 - *Mycological control and surveillance of biological waste and compost*. Med. Mycol., 36: 137-145.
- BROWN J.E., MASOOD D., COUSER J.I., PATTERSON R., 1995 - *Hypersensitivity pneumonitis from residential composting - residential composters lung*. Ann. Allergy Asthma Immunol., 74(1): 45-47.
- BROWN K.W., THOMAS J.C., WHITNEY F., 1997 - *Fate of volatile organic compounds and pesticides in composted municipal solid waste*. Compost Sci. Util., 5(4): 6-14.
- BÜNGER J., ANTLAUF-LAMMERS, SCHULZ T.G., WESTPHAL G.A., MÜLLER M.M., RUHNAU P., HALLIER E., 2000 - *Health complaints and immunological markers of exposure to bioaerosols among biowaste collectors and compost workers*. Occup. Environm. Med., 57: 458-464.
- DUTKIESWICZ J., 1997 - *Bacteria and fungi in organic dust as potential health hazard*. Ann. Agric. Environm. Med., 4: 11-16.
- FILIPELLO MARCHISIO V., FUSCONI A., 2001 - *Morphological evidence for keratinolytic activity of Scopulariopsis spp. isolates from nail lesions and the air*. Med. Mycol., 39: 287-294.
- FILIPELLO MARCHISIO V., FUSCONI A., QUERIO F.L., 2000 - *Scopulariopsis brevicaulis: a keratinophilic or a keratinolytic fungus?* Mycoses, 43: 281-292.
- FILIPELLO MARCHISIO V., SULOTTO F., BOTTA G.C., CHIESA A., AIRAUDI D., ANASTASI A., 1999 - *Aerobiological analysis in a salami factory: a possible case of extrinsic allergic alveolitis by Penicillium camembertii*. Med. Mycol., 37: 285-289.
- FISCHER G., MÜLLER T., SCHWALBE R., OSTROWSKI R., DOTT W., 2000 - *Exposure to airborne fungi, MVOC and mycotoxins in biowaste-handling facilities*. Int. J. Hygiene Environm. Health, 203: 97-104.
- FISCHER G., SCHWALBE R., MÖLLER M., OSTROWSKI R., DOTT W., 1999 - *Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility*. Chemosphere, 38: 795-810.
- FISCHER G., SCHWALBE R., OSTROWSKI R., DOTT W., 1998 - *Airborne fungi and their secondary metabolites in working places in a compost facility*. Mycoses, 41: 383-388.
- FOLMSBEE, M., STREVETT K.A., 1999 - *Bioaerosol concentration at an outdoor composting center*. J. Air Waste Manag. Assoc., 49: 554-561.
- KAMPFER P., JUREIT C., ALBRECHT A., NEEF A. 2002. *Inmission of microorganisms from composting facilities*. In: INSAM H. *et al.* (Eds.), *Microbiology of Composting*: 571-584. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- KWON-CHUNG K.J., BENNET J.E., 1992 - *Medical Mycology*. Lea & Febiger. Malvern, Pennsylvania.
- LACEY J., CROOK B., 1988 - *Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational allergens*. Am. Occup. Hygiene, 32: 515-533.

- LACEY J., DUTKIESWICZ J., 1994 - *Bioaerosols and occupational lung disease*. J. Aerosol Sci., 25: 1371-140.
- LAVOIE J., ALIE R., 1997 - *Determining the characteristics to be considered from a worker health and safety standpoint in household waste sorting and composting plants*. Ann. Agric. Environm. Med., 4: 123-128.
- LUNDHOLM M., RYLANDER R., 1980 - *Occupational symptoms among compost workers*. J. Occup. Med., 22: 256-257.
- MACHER J.M., HUANG F.Y., FLORES M., 1991 - *A two-year study of microbiological indoor air quality in a new apartment*. Arch. Environm. Health, 46: 25-29.
- MALMROS P., 1990 - *Problems with the working environment in solid wastetreatment*. The National Labour Inspection of Denmark.
- MARCHAND G., LAVOIE J., LAZURE L., 1995 - *Evaluation of bioaerosols in a municipal solid-waste recycling and composting plant*. J. Air Waste Manag., 45: 778-781.
- MILLNER P.D., OLENCHOCK S.A., EPSTEIN E., RYLANDER R., HAINES J., WALKER J., OOI B.L., HORNE E., MARITATO M., 1994 - *Bioaerosols associated with composting facilities*. Compost Sci. Util., 2: 6-57.
- POULSEN O.M., BREUM N.O., EBBEHOJ N., HANSEN A.M., IVENS U.I., VANLEVLIEVED D., MALMROS P., MATTHIASSEN L., NIELSEN B.H., NIELSEN E.M., SCHIBYE B., SKOV T., STENBAEK E.I., WILKINS C.K., 1995 - *Collection of domestic waste - review of occupational health problem and their possible causes*. Sci. total Environm., 170: 1-19.
- REYNOLDS S., STREIFEL A.J., CHANG J.C.S., 1990 - *Elevated airborne concentration of fungi in residential and office environments*. Am. Ind. Hygiene Assoc., 51: 601-604.
- RICHARDSON M.D., WARNOCK D.W., 1997 - *Fungal Infection. Diagnosis and Management*. Second edition. Blackwell Science.
- SMITH J.M.B., 1989 - *Opportunistic Mycoses of Man and other Animals*. CAB International. BPC Wheatons Ltd. Exeter, UK.
- SUMMERBELL R.C., STAIB F., AHEARN D.G., ANDO M., AJELLO L., CROW S.A., FUNG D., GREGOR T., NOBLE J., PRICE D.L., SIMMONS R.B., TARLO S.M., WOYCHUK W., 1994 - *Household Hyphomycetes and other indoor fungi*. J. Med. Veter. Mycol., 32: 277-286.
- WEBER S., KULLMAN G., PETSONK E., JONES W.G., OLENCHOCK S., SORENSON W., PARKER J., MARCELO-BACUI R., FRAZER D., CASTRANOVA V., 1997 - *Organic dust exposures from compost handling: case presentation and respiratory exposure assessment*. Am. J. Ind. Med., 24: 365-374.

RIASSUNTO - Il micco aerosol di due impianti di compostaggio in Italia è stato studiato impiegando un campionatore volumetrico a singolo "stadio". I campioni sono stati raccolti all'interno dell'impianto, durante diverse fasi del processo di compostaggio, e all'esterno dell'impianto, sopravento e sottovento. In un impianto è stata effettuata una completa valutazione quali-quantitativa della micoflora aerodiffusa, nell'altro è stata valutata la carica totale (CFU/m³ di aria) e la composizione quali-quantitativa del genere *Aspergillus*, impiegato quale indicatore di inquinamento ambientale. Nella maggior parte dei campioni la carica totale era nettamente al di sopra del limite massimo strumentale (>43.800 CFU/m³). Nei campioni sopravento la carica totale era notevolmente più bassa in confronto ai campioni all'interno degli impianti. Gli aspergilli rappresentavano in alcuni siti la quasi totalità della carica fungina. *A. fumigatus* è stato trovato nella maggior parte dei campioni, spesso con una carica elevata. I risultati ottenuti sottolineano la necessità di monitorare la micoflora aerodiffusa, al fine di definire degli standard legislativi che regolino la presenza nell'aria di organismi dannosi per la salute dei lavoratori e delle popolazioni che vivono nelle zone limitrofe agli impianti.

AUTORI

G.C. Varese, V. Prigione, A. Anastasi, L. Casieri, S. Voyron, V. Filipello Marchisio*, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Torino, Viale Mattioli 25, 10125 Torino, Italy
*Corresponding Author

Aerospore fungine in ambienti ospedalieri

A.M. PICCO e M. RODOLFI

ABSTRACT - *Airborne fungi in hospital environments* - The presence of microbial pollutants, in indoor environments, may elicit the deterioration of indoor air quality. Studies focusing on the exposure to fungal spores have permitted the elucidation of the biomedical consequences of their inhalation. Moulds produce allergens, irritants and, in some cases, potentially toxic substances such as mycotoxins. Consequently, an aeromycological study in different hospital environments located in Pavia (Italy) were carried out and the fungal concentration and species richness were determined. Results showed significant differences according to the carried on activity and to the number of patient/staff present. A total of 39 fungal species, some of them potentially pathogenic, was identified.

Key words: airborne fungi, hospital environment, indoor air quality

INTRODUZIONE

I contaminanti atmosferici di origine biologica possono essere causa di modificazioni della qualità dell'aria negli ambienti confinati. Essi sono rappresentati da microrganismi vivi (virus, batteri, miceti), microrganismi morti, frammenti cellulari, endo/esotossine, allergeni e composti organici volatili (WHO, 1983, 1999).

I funghi, in particolare, benché dominanti in natura per caratteristiche di vita saprofitiche e biodegradative, possono essere in alcuni casi responsabili di patologie infettive nell'uomo (CARETTA, 1992). L'esposizione negli ambienti di lavoro, di ricovero e di svago ad aerospore fungine e a ceppi potenzialmente tossinogeni è stata ormai più volte messa in relazione a varie sindromi cliniche e manifestazioni allergiche (LACEY, DUTKIEWICZ, 1994; ROLANDI *et al.*, 1998; RODOLFI *et al.*, 2001; SISTI *et al.*, 2000; REINER *et al.*, 2001). Come ovvia conseguenza, si afferma la necessità, oltre che di riferire lo stato micologico dell'aria al tipo di locale, di persone che lo frequentano e di attività che vi si svolgono, anche di determinare, a breve e in modo ufficiale, dei limiti di accettabilità dell'aria indoor (NF, 1987). A tal proposito, l'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH, 1989) ritiene che le informazioni disponibili sulla concentrazione ambientale di agenti biologici, compresi quelli fungini, non consentano di stabilire relazioni dose-risposta scientificamente accettabili; tuttavia, la valutazione della diffusione dei micromiceti coltivabili rappresenta un approccio valido e di pratica realizzazione per la valutazione della contaminazione micologica dell'aria

indoor. Sebbene l'assenza di micromiceti vivi o il rilievo di unità in numero limitato non siano dati sufficienti ad escludere la presenza di loro frammenti, tossine o allergeni, il monitoraggio aeromicologico di specifiche tipologie ambientali, quali quelle ospedaliere, è utile strumento per la segnalazione di eccessive contaminazioni fungine o di specie potenzialmente patogene e la formulazione di un giudizio di salubrità dell'indoor in questione.

In questo lavoro si riportano i risultati di un monitoraggio aeromicologico quantitativo e qualitativo effettuato in una delle principali strutture sanitarie di Pavia. La contaminazione aeromicologica, valutata in 7 differenti tipologie ambientali, è stata ponderata al fine di consentire una maggiore tutela della salute dei pazienti e del personale biomedico della struttura in questione. Si intende, inoltre, dare un contributo al raggiungimento di un numero statisticamente significativo di dati relativi al rischio micologico a trasmissione aerea in ambiente ospedaliero.

MATERIALI E METODI

La clinica indagata, situata in Pavia, è di recentissima costruzione e l'attività che vi si svolge è prevalentemente di tipo riabilitativo. In tutto l'edificio sono presenti impianti di trattamento aria che provvedono al riscaldamento nella stagione invernale ed al raffreddamento in quella estiva. Il numero di ricambi d'aria è impostato in funzione dell'attività svolta nei diversi locali; quelli in cui si attuano attività "a rischio" sono serviti da apposito impianto.

I campionamenti dell'aria sono stati effettuati per un periodo di tre mesi, dagli inizi di novembre 2000 fino alla fine di gennaio 2001.

PUNTI DI PRELIEVO

I differenti ambienti ospedalieri sono stati sottoposti a monitoraggio in condizioni di normale attività lavorativa; essi sono stati, per comodità di studio, suddivisi in 7 tipologie, ciascuna monitorata in 9-11 locali, per un totale di 70 punti di prelievo dell'aria. Si riportano le tipologie oggetto di indagine: uffici, zone comuni, degenze, ambulatori di diagnostica, day hospital, laboratori e ambienti critici (ossia locali in cui le attività svolte esigono condizioni di bassa contaminazione biologica).

Nel corso di ogni giornata di campionamento, è stata effettuata una serie analoga di prelievi d'aria all'esterno con significato di controllo.

In ciascuno dei locali indagati e all'esterno sono stati misurati i valori di temperatura ed umidità relativa dell'aria.

TECNICHE DI CAMPIONAMENTO

L'indagine aeromicrobologica quantitativa è stata effettuata utilizzando un campionatore microbiologico SAS Super 100 (pbi), posizionato a circa 1,5 m dal suolo ed impostato sulla misura di 200 l di aria. Il flusso d'aria laminare è stato convogliato sulla superficie di piastre Contact Plate contenenti terreno Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid); ogni campionamento è stato effettuato in doppio. Al termine del periodo di incubazione (4-6 giorni a 20°C), le colonie visibili ad occhio nudo sono state conteggiate e la carica micetica, espressa come CFU/m³ d'aria, è la media delle due determinazioni.

L'indagine aeromicrobologica qualitativa è stata effettuata mediante sedimentazione gravitazionale delle aerospore fungine, esponendo piastre Petri contenenti Potato Dextrose Agar (Oxoid), a circa 1,5 m dal suolo per un tempo di 15 minuti. In seguito all'esposizione, le piastre sono state mantenute a temperatura ambiente, esaminate dopo 6-10-14 giorni ed è stata effettuata la caratterizzazione specifica delle colonie isolate. Ogni campionamento è stato effettuato in doppio e i risultati sono stati espressi in termini di CFU/154 cm².

RISULTATI

In Tab. 1 sono riportati i valori di CFU/m³ riscontrati nell'aria delle tipologie ambientali monitorate, in unione ai rispettivi dati di temperatura, umidità relativa dell'aria e carica micetica esterna. Le cariche fungine valutate con l'uso del campionatore attivo hanno mostrato oscillazioni ricollegabili alle differenti attività di reparto ed al numero di degenze/impiegati presenti: negli uffici la carica micetica variava da 3 a 53 CFU/m³ d'aria; nelle zone comuni da 0 a 173 CFU/m³ (con valori maggiori in atrio ed in cucina); nelle degenze da 9 a 73 CFU/m³; negli ambulatori di diagnostica da 0 a 50 CFU/m³; nei day hospital da 5 a 78 CFU/m³; nei laboratori da 3

a 40 CFU/m³; negli ambienti critici da 0 a 78 CFU/m³ (con valore maggiore in terapia intensiva Pneumologia). Dal confronto tra le cariche micetiche medie delle 7 tipologie ambientali si evince che quella maggiore è stata riscontrata nella tipologia zone comuni (52 CFU/m³) seguita dalla carica micetica media nella tipologia degenze (36,5 CFU/m³). Al contrario, la carica micetica media minore è stata ritrovata nella tipologia laboratori (12,9 CFU/m³). Le più elevate cariche micetiche sono state riscontrate nei seguenti locali di prelievo: atrio (tipologia zone comuni) con 173 CFU/m³; cucina (tipologia zone comuni) con 123 CFU/m³; terapia intensiva pneumologia (tipologia ambienti critici) con 78 CFU/m³; oncologia 2° piano (tipologia day hospital) con 78 CFU/m³; camera 2 letti allergologia (tipologia degenze) con 73 CFU/m³. Si sottolineano, infine, gli ambienti con carica micetica nulla: radioterapia (tipologia ambulatori di diagnostica); terapia intensiva oncologica (tipologia ambienti critici); preparazioni parenterali (tipologia ambienti critici).

L'analisi aeromicrobologica qualitativa ha permesso l'isolamento di 39 specie fungine e di 20, 21, 24, 17, 25, 20 e 17 *taxa* fungini rispettivamente nelle tipologie uffici, zone comuni, degenze, ambulatori di diagnostica, day hospital, laboratori e ambienti critici. In Fig. 1, si evidenzia come i valori di ricchezza in specie ottenuti per sedimentazione delle aerospore su piastra ed i valori di carica micetica non siano risultati correlabili; ad esempio, ai valori di maggiore ricchezza specifica trovati nelle tipologie day hospital e degenze non sono corrisposti altrettanti valori di maggiore carica micetica nelle stesse tipologie ambientali.

Fra tutti i *taxa* isolati, si ritiene opportuno segnalare, in particolare, le seguenti specie fungine potenzialmente patogene:

- *Arthrimum phaeospermum* isolata dall'aria dell'ufficio TAC (1 CFU/154cm²);
- *Alternaria alternata* isolata dalle tipologie zone comuni (1 CFU/154cm² sia in atrio che corridoio centrale zona radiologia), degenze (3 CFU/154cm² in camera 2 letti di Medicina del Lavoro), day hospital (2 CFU/154cm² in Oncologia), laboratori (1 CFU/154cm² in laboratorio RIA e 1 CFU/154cm² in laboratorio Immunologia e Allergologia), ambienti critici (1 CFU/154cm² sia in Terapia Intensiva Pneumologia che in Terapia del Dolore);
- *Aspergillus candidus* isolata dalla tipologia degenze (6 CFU/154cm² in camera 2 letti di Medicina del Lavoro);
- *Aspergillus flavus* isolata dalle tipologie degenze (1 CFU/154cm² in Nefrologia), ambulatori (1 CFU/154cm² in ambulatorio di Ecografia), laboratori (1 CFU/154cm² in Cardiologia Molecolare), ambienti critici (1 CFU/154cm² in Broncoscopia);
- *Aspergillus fumigatus* isolata dalle tipologie uffici (1 CFU/154cm² sia in ufficio radiologia che in ufficio TAC), degenze (1 CFU/154cm² in Nefrologia);

TABELLA 1

Valori di carica fungina, temperatura ed umidità riscontrati nelle diverse tipologie ospedaliere.
 Values of total spore counts, temperature and RH detected in the different hospital environments.

TIPOLOGIA	PUNTO DI PRELIEVO	CFU/m ³	TEMPERATURA (°C)	UMIDITA' (%)	CFU/m ³ ESTERNO
Uffici	Ufficio piano terra	13	23,5	73	563
	Ufficio personale piano terra	53	22,8	66	603
	Accettazione	15	23,6	65	338
	Ufficio diagnostiche piano seminterrato	23	22,2	60	85
	Ufficio radiologia	10	22,8	62	165
	Ufficio TAC	30	24,2	60	225
	Ufficio terapia occupazionale	3	24,2	58	373
	Ufficio direzione Scientifica 1° piano	10	23,6	57	173
	Ufficio Medicina Nucleare	8	23,8	56	85
Ufficio Endoscopia piano terra	10	23,7	64	123	
Zone comuni	Atrio	173	23,4	58	563
	Corridoio centrale - zona radiologia	38	22,4	59	603
	Zona attesa ambulatorio prelievi	45	23,2	61	338
	Corridoio degenza Oncologia	58	23,8	59	85
	Zona attesa day hospital oncologico	23	23,5	60	165
	Zona attesa corridoio fisiopat. resp./ cardiologia	18	22,8	66	225
	Palestra terapia occupazionale	10	23,6	59	373
	Zona ristoro fronte mensa	50	23,5	59	173
	Palestra RRF	13	23,6	54	85
	Biblioteca	21	23,0	62	123
	Cucina	123	20,0	58	123
Degenze	Camera 2 letti Allergologia	73	23,5	59	563
	Camera 2 letti Medicina Generale	53	23,2	61	603
	Camera 2 letti RRF	40	22,8	57	338
	Camera 2 letti Oncologia	58	24,5	60	85
	Camera 2 letti Pneumologia	9	22,7	61	165
	Camera 2 letti Medicina del lavoro	50	23,7	58	225
	Camera 2 letti Cardiologia	28	24,3	61	373
	Camera riabilitazione oncologica	28	23,6	65	173
	Camera Cardiologia (3° piano)	13	23,6	55	85
	Camera Nefrologia	13	23,5	61	123
Ambulatori	Radioterapia	0	24,1	60	563
	Ambulatorio prelievi	43	23,4	59	603
	Ambulatorio Medicina nucleare	10	22,2	62	338
	Ambulatorio MOC	50	23,7	64	85
	Ambulatorio RX	8	23,6	60	165
	Fisiopatologia respiratoria	15	22,5	59	225
	Ambulatorio Oculistica	15	24,0	60	373
	Ambulatorio di Ecografia	5	23,9	56	173
	ECG	5	24,0	54	85
Day hospital	Oncologia 2° piano	78	24,2	59	563
	Oncologia piano terra	13	23,6	60	603
	Dialisi 8 letti	50	24,6	55	338
	Dialisi 4 letti	8	24,0	60	85
	Terapia del dolore	18	24,1	56	165
	Allergologia	5	23,8	61	225
	Cardiologia	25	23,1	62	373
	Nefrologia	55	23,4	65	173
	Medicina Generale	10	22,7	63	85
	Gastroenterologia	5	22,0	64	123
	Laboratorio analisi chimico-cliniche (sangue)	13	23,3	55	563
	Laboratorio analisi chimico-cliniche (urine)	40	22,4	58	603
	RIA	5	23,4	62	338

(segue Tabella 1)

Laboratori	Laboratorio Medicina nucleare	10	22,2	62	85
	Laboratorio Immunologia e Allergologia	23	19,6	80	165
	Laboratorio Oncologia ed Ematologia	5	20,2	72	225
	Laboratorio Immunologia e Oncologia	10	21,3	60	373
	Laboratorio Anatomia Patologica	5	23,7	56	173
	Laboratorio Cardiologia Molecolare	15	23,5	55	85
	Laboratorio ELISA	3	23,6	62	123
Ambienti critici	Terapia Intensiva Oncologia	0	22,2	58	563
	Terapia intensiva Pneumologia	78	24,6	60	603
	Nefrologia Sala Fistole	5	23,2	56	338
	Piede diabetico	13	23,8	62	85
	Terapia del dolore	3	24,1	56	165
	Terapia intensiva Cardiologia	30	24,8	56	225
	Gastroscopia	13	23,8	61	373
	Preparazioni parentali	0	20,2	58	173
	Broncoscopia	13	23,0	64	85
	Nutrizione Parenterale	5	24,2	61	123

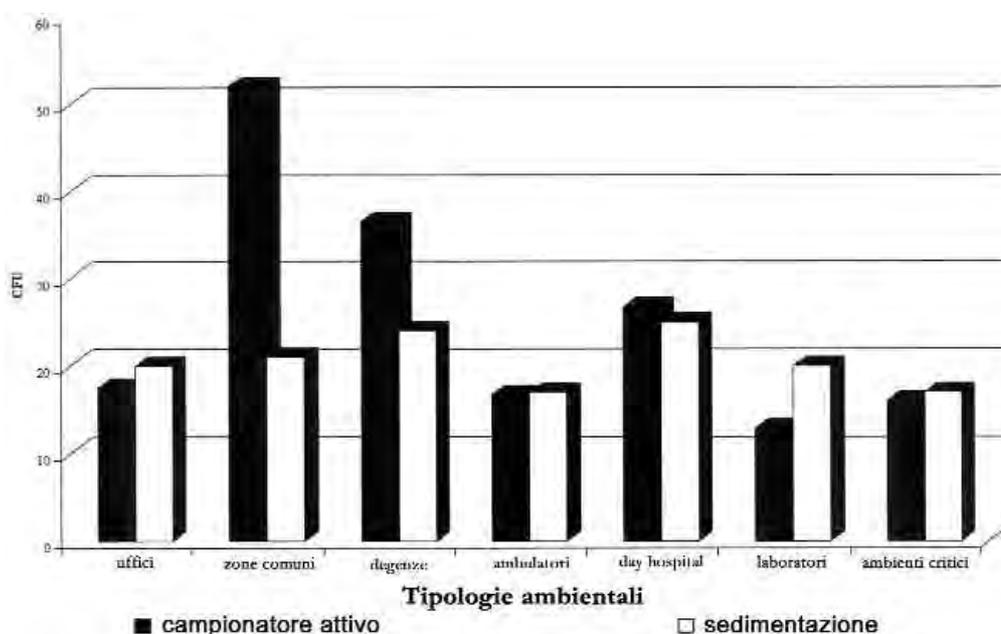


Fig. 1

Cariche fungine medie nelle diverse tipologie ospedaliere.

Values of medium spore counts in the different hospital environments.

- *Aspergillus niger* isolata dalle tipologie zone comuni (1 CFU/154cm² in corridoio centrale zona Radiologia e in palestra RRF), degenze (1 CFU/154cm² in camera 2 letti RRF), laboratori (1 CFU/154cm² in Cardiologia Molecolare);
- *Aspergillus versicolor* isolata dalle tipologie uffici (2 CFU/154cm² in ufficio personale piano terra), zone comuni (5 CFU/154cm² in zona attesa fisiopat. resp/cardiologia), degenze (2 CFU/154cm² in camera 2 letti RRF e 1 CFU/154cm² in Cardiologia), ambulatori (5 CFU/154cm² in ambulatorio prelievi), day hospital (1 CFU/154cm² in Oncologia piano terra, 1 CFU/154cm² in Terapia del Dolore e 1 CFU/154cm² in Nefrologia);
- *Aureobasidium pullulans* isolata dalle tipologie uffici (2 CFU/154cm² in ufficio personale piano terra), zone comuni (1 CFU/154cm² in zona attesa day hospital oncologico e in palestra terapia occupazionale), ambulatori (1 CFU/154cm² in ambulatorio prelievi e in ambulatorio MOC), laboratori (2 CFU/154cm² in laboratorio urine), ambienti critici (1 CFU/154cm² in terapia intensiva Pneumologia);

- *Fusarium oxysporum* isolata dalle tipologie zone comuni (1 CFU/154cm² in corridoio centrale zona Radiologia e in zona attesa day hospital oncologico), day hospital (1 CFU/154cm² in Cardiologia), laboratori (1 CFU/154cm² in laboratorio Immunologia e Allergologia e in Cardiologia Molecolare);
- *Geotrichum candidum* isolata dalla tipologia degenze (1 CFU/154cm² in camera 2 letti Pneumologia);
- *Penicillium expansum* isolata dalle tipologie uffici (1 CFU/154cm² in ufficio Direzione Scientifica);
- *Rhizopus stolonifer* isolata dalle tipologie uffici (1 CFU/154cm² in ufficio Direzione Scientifica e in Medicina Nucleare), zone comuni (2 CFU/154cm² in zona attesa ambulatorio prelievi, in corridoio fisiopat.resp/cardiologia e in biblioteca), degenze (1 CFU/154cm² in camera 2 letti Medicina del Lavoro), ambulatori (2 CFU/154cm² in ambulatorio Rx, in Fisiopatologia Respiratoria e in Ecografia), day hospital (1 CFU/154cm² in Allergologia e in Cardiologia), laboratori (2 CFU/154cm² in Oncologia ed Ematologia), ambienti critici (1 CFU/154cm² in Terapia intensiva Cardiologia e in Gastrosocopia);
- *Scopulariopsis brumptii* isolata dalle tipologie uffici (1 CFU/154cm² in ufficio radiologia), ambulatori (1 CFU/154cm² in ambulatorio Rx);
- *Trichoderma viride* isolata dalle tipologie day hospital (2 CFU/154cm² in Terapia del Dolore), ambienti critici (1 CFU/154cm² in Piede Diabetico);
- *Tricophyton rubrum* isolata dalla tipologia day hospital (1 CFU/154cm² in Dialisi 4 letti).

La suddetta interpretazione della potenziale patogenicità di alcune specie isolate si basa su dati disponibili in letteratura (DE HOOG, GUARRO, 1995).

I risultati mettono in evidenza percentuali minori di specie potenzialmente patogene negli uffici (27%), nelle zone comuni e nelle degenze (29%) e percentuali maggiori negli ambulatori di diagnostica (42%), nei laboratori (40%), negli ambienti critici (38%) e nei day hospital (36%). Anche in questo caso, dalla comparazione tra carica micetica e percentuale fungina potenzialmente patogena risulta essere evidente la mancanza di una proporzionalità diretta: ai valori di maggiore carica micetica delle tipologie zone comuni e degenze non corrispondono altrettanti valori di maggiore percentuale fungina potenzialmente patogena.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La contaminazione microbica dell'aria nell'indoor ospedaliero, specialmente in quegli ambienti ad "alto rischio" per la particolare vulnerabilità dei degenti (come le sale operatorie, le unità di terapia intensiva e le unità per pazienti immunocompromessi), può rivelarsi una causa frequente di morbosità e mortalità (BODEY, 1988; SCHAAL, 1991). Dai dati riportati

dal National Nosocomial Infectious Surveillance (NNIS) System dei Center for Disease Control and Prevention (CDC), riguardanti la decade 1980-1990, emerge che in questo periodo vi fu un costante incremento delle infezioni fungine nosocomiali con valori che raggiunsero i 3,8 casi su 1000 pazienti dimessi (BECK-SAUGUE *et al.*, 1993). In merito al genere *Aspergillus*, considerato come la seconda causa di infezioni nosocomiali di origine micetica dopo il genere *Candida*, il NNIS riferisce che esso provoca l'1,3% di tutte le infezioni contratte in ambito ospedaliero, dove i principali fattori di rischio sono rappresentati da ventilazione naturale o da sistemi di condizionamento dell'aria non adeguati per la modalità di filtrazione, la frequenza dei ricambi o la pressione nelle stanze (TABLAU *et al.*, 1994).

Nel quadro di queste crescenti problematiche e delle conseguenti attuali norme relative si colloca il presente studio aeromicologico.

L'analisi puramente quantitativa dei risultati, nell'ambito dei quali emerge una componente fungina dell'aria monitorata variabile tra 0 e 173 CFU/m³ d'aria, ha evidenziato, in generale, valori di contaminazione micologica piuttosto bassi e fortemente oscillanti all'interno dei diversi punti di campionamento. I più elevati valori riscontrati sono spiegabili con la notevole circolazione di persone e con la presenza nelle zone comuni e negli uffici di substrati, quali stoffe e moquettes, adatti alla crescita ed alla colonizzazione dei micromiceti. I bassi valori evidenziati nei laboratori e negli ambienti critici sarebbero motivabili con la presenza di cappe e di sistemi di compartimentazione dei ricambi d'aria. Tuttavia, è di grande importanza segnalare come negli ambienti con minori cariche micetiche si avessero valori maggiori di ricchezza specifica e come le maggiori percentuali di *taxa* potenzialmente patogeni fossero concentrate nelle tipologie ambientali con minore numero di specie rilevate e con basse cariche micetiche: day hospital, degenze, zone comuni e uffici hanno, infatti, mostrato le percentuali di specie potenzialmente patogene più basse (36%, 29%, 29%, 27%), mentre laboratori, ambulatori di diagnostica ed ambienti critici le più alte (40%, 42%, 38%). Dunque, proprio dove si hanno bassi CFU/m³ d'aria sono alte le percentuali di *taxa* potenzialmente patogeni che potrebbero mettere rischio la salute dei pazienti. È interessante sottolineare che proprio nelle tre tipologie ambientali laboratori, ambulatori di diagnostica e ambienti critici sono stati registrati i valori più bassi di umidità relativa dell'aria (62% e 59%); tali valori, indispensabili per l'ottimale svolgimento delle attività cliniche-terapeutiche, diagnostiche e di sperimentazione, inibiscono la maggior parte delle specie fungine non xerotolleranti a favore di quei pochi ma efficienti competitori in grado di adattarsi all'alto stress idrico. Specie appartenenti ai generi *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* e *Cladosporium*, isolate nel corso del monitoraggio, devono la loro xerotolleranza alla capacità di accumulare a partire dall'ambiente circostante oppure di sintetizzare composti quali glicerolo o altri alcool poli-idrici inerti che hanno la funzione di

abbassare il potenziale interno dell'acqua fino al di sotto del valore al quale si trova l'ambiente circostante. Questo meccanismo adattativo impedisce alle cellule fungine di disperdere una quota eccessiva d'acqua, garantendo loro la sopravvivenza (ADLER *et al.*, 1982). Come ultimo commento ai risultati ottenuti, si ritiene di dover segnalare, in quanto potenzialmente pericolose, la presenza di: *Alternaria alternata*, aerodiffusa nella clinica con il 14% di frequenza e ben nota in quanto specie produttrice di allergeni (MCNEEL, KREUTZER, 1996); *Geotrichum candidum*, la cui frequenza, sebbene molto bassa, nella camera di pneumologia delle degenze potrebbe provocare infezioni polmonari o bronchiali (DE HOOG, GUARRO, 1995); *Aspergillus versicolor*, specie ritrovata in più tipologie ospedaliere, in particolare con frequenza del 4% negli uffici, agente di differenti micosi umane (RIPPON, 1988); *Aspergillus fumigatus* ed *A. flavus*, specie agenti di aspergillosi bronchiali allergiche (JOHNSON, 1987), entrambi isolati in una camera nefrologica con la bassa frequenza dell'1% e, nel caso di *A. flavus*, nel locale adibito a nutrizione parenterale.

Il monitoraggio aeromicologico è riuscito nell'intento di ponderare il rischio di contaminazione fungina relativamente alle attività che si svolgono nelle diverse tipologie ospedaliere ed in base allo stato di salute degli individui che le frequentano. Non si è potuto, tuttavia, riferire l'entità della contaminazione e del rischio a limiti numerici ben definiti, non essendo questi stati ancora definiti a livello legislativo. Si ritiene importante sottolineare, in conclusione, come i giudizi di salubrità dell'indoor debbano essere ponderati con una certa flessibilità ed i valori soglia proposti sulla base di situazioni differenti da ambiente ad ambiente.

Ringraziamenti – Il lavoro è stato supportato da FAR - Università di Pavia

LETTERATURA CITATA

- ACGIH, 1989 - *Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment*. ACGIH, Cincinnati, OHIO.
- ADLER L., PEDERSEN A., THUNBALD-JOHANSSON I., 1982 - *Polyol accumulation by two filamentous fungi grown at different concentrations of NaCl*. *Physiologia Plantarum*, 56: 139-142.
- BECK-SAUGUE C.M., JARVIS W.R., NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM, 1993 - *Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States*. *Avian Dis.*, 36: 1081-1085.
- BODEY, G.P., 1988 - *The emergence of fungi as major hospital pathogens*. *J. Hosp. Infect.*, 11: 411-426.

AUTORI

Anna Maria Picco*, Marinella Rodolfi, Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri, Sezione di Micologia, Università di Pavia, Via san Epifanio 14, 27100 Pavia (*apicco@et.unipv.it)

- CARETTA G., 1992 - *Epidemiology of allergic disease: the fungi*. *Aerobiologia*, 8: 439-445.
- DE HOOG G.S., GUARRO J., 1995 - *Atlas of Clinical Fungi*. CBS, The Netherlands.
- JOHNSON B.R., 1987 - *Pulmonary aspergillosis*. *Semin. Respir. Med.*, 9: 187-199.
- LACEY J., DUTKIEWICZ J., 1994 - *Bioaerosols and occupational lung disease*. *J. Aerosol Sci.*, 25: 1371-1404.
- MCNEEL S.V., KREUTZER R.A., 1996 - *Fungi and Indoor Air Quality*. *Health, Environm. Digest*, 10 (2): 9-12.
- NF S., 1987 - *Procedures de reception et de contrôle des salles d'operation*. *Qualité de l'air*, 90-351.
- REINER J., PEINTNER U., PÖDER R., 2001 - *Biodiversity and concentration of airborne fungi in a hospital environment*. *Mycopathologia*, 149: 87-97.
- RIPPON J.W., 1988 - *Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic Actinomycetes*. 3rd Ed. Saunders, Philadelphia.
- RODOLFI M., PICCO AM., GRISOLI P., DACARRO C., 2001 - *Micromiceti aerodispersi in un'area adibita a compostaggio*. *Micol. Ital.*, 3: 117-121.
- ROLANDI L., LODOLA L., GUGLIELMINETTI M., CARETTA G., AMARETTI G., 1998 - *Evaluation of airborne particulate and fungi in critical hospital care units*. *Int. Congr. Toxicology, Paris, Abstr.*: 226.
- SCHAAL K.P., 1991 - *Medical and microbiological problems arising from airborne infection in hospitals*. *J. Hosp. Infect.*, 18: 451-459.
- SISTI M., SCHIAVANO G.F., SALVAGGIO L., ALBANO A., BRANDI G., 2000 - *Indagine sull'inquinamento micetico dell'aria nell'indoor ospedaliero*. *Igiene Moderna*, 113: 147-160.
- TABLAU O.C., ANDERSEN L.J., ARDEN N.H., BREIMAN R.F., BUTLER J.C., MCNEIL M.M., 1994 - *The hospital infection control practices advisory committee in guideline for prevention of nosocomial pneumonia*. *Infect. Cont. Hosp. Epidemiol.*, 15: 587-627.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1983 - *Indoor air pollutants: exposure and health effects*. Copenhagen. WHO Regional Office for Europe. Report WHO meeting. EURO reports and studies, 78.
- , 1999 - *Guidelines for air quality*. WHO, Geneva.

RIASSUNTO - I contaminanti atmosferici di origine biologica possono essere causa di modificazioni della qualità dell'aria negli ambienti confinati; l'esposizione ad aerospore fungine, in particolare, è stata più volte messa in relazione a disturbi della salute nell'uomo. E' noto, inoltre, che i funghi aerodispersi possono, in determinate condizioni metaboliche, produrre allergeni e sostanze potenzialmente tossiche quali le micotossine. Nel quadro di questa crescente problematica, è stata svolta un'indagine aeromicologica quantitativa e qualitativa in una delle principali strutture sanitarie di Pavia (Italia). I risultati quantitativi hanno evidenziato oscillazioni ricollegabili alle differenti attività di reparto ed al numero di degenti/impiegati presenti; il monitoraggio qualitativo ha permesso l'identificazione di 39 specie fungine, alcune delle quali potenzialmente patogene.

La citofluorimetria a flusso può risolvere i problemi di misura dell'aerosol fungino?

V. PRIGIONE, G. LINGUA e V. FILIPELLO MARCHISIO

ABSTRACT - *Could flow cytometry solve limitations in the enumeration of fungal aerosol?* - Current limitations in the methodology for enumeration of airborne fungal propagules compromise the precision and accuracy of bioaerosol exposure assessment. Flow cytometry (FCM) is a tool with great potential for use in environmental microbiology because of the quantity and quality of data it provides in a timely fashion. In this study, FCM was used to count fungal propagules in field samples. To verify the accuracy and the precision of this technique, fungal propagules counts made by flow cytometry were compared with counts by direct observation using epifluorescence microscopy. Field samples were stained with propidium iodide after microwave irradiation, to discriminate the biological particles, while forward angle light scattering was used for identifying and counting fungal propagules population. A close agreement was found between FCM and epifluorescence microscopy counts.

Key words: bioaerosol, flow cytometry, fungal propagules, funghi

INTRODUZIONE

La maggior parte dei funghi terrestri produce propaguli (conidi e spore), che vengono rilasciati nell'ambiente aereo, dove si comportano come unità riproduttive specializzate nella dispersione spaziale e nella sopravvivenza della specie. I propaguli dei funghi, infatti, rappresentano una frazione molto importante del bioaerosol: in una città come Londra essi possono superare il 96% del particolato biologico della frazione PM₁₀ (MACKAY, 1998).

La presenza e la concentrazione dei propaguli fungini nell'aria di ambienti esterni e confinati può provocare numerosi effetti, indiretti e diretti, sulla vita dell'uomo, dai danni economici ai rischi per la salute. I danni economici derivano principalmente dall'attività dei fitopatogeni e dei saprotrofi. I rischi per la salute si collegano alla presenza nell'aria di specie patogene ed opportuniste, nonché alla possibilità di reazioni tossiche o allergiche, causate dai propaguli *in toto* o da alcune loro componenti.

Il monitoraggio dei funghi aerodiffusi è perciò indispensabile per risolvere problemi di tipo diagnostico, terapeutico ed epidemiologico, per le valutazioni di igiene ambientale e per programmare strategie di prevenzione e di lotta. Per valutare l'esposizione al microaerosol, tradizionalmente ci si avvale di metodi colturali o microscopici. Nei metodi colturali il materiale aerodiffuso, raccolto su un terreno di coltura agarizzato, viene lasciato in incubazione a tem-

perature appropriate per permettere a tutte le cellule vitali e coltivabili di germinare e di dare origine a colonie. Terminato il periodo di incubazione, è possibile contare le unità formanti colonia (CFU) e risalire alle cellule vitali per unità di volume di aria campionata (MADELIN, MADELIN, 1995). Tale metodo, però, sottostima in partenza il numero dei propaguli fungini aerodiffusi; esso, infatti, è influenzato dalla selettività dei diversi terreni nutritizi, dal rischio di deposizioni multiple per ogni sito d'impatto e dai fenomeni di fungistasi e, soprattutto, prende in considerazione solo i conidi vitali e germinabili (FILIPPELLO MARCHISIO *et al.*, 1989).

Con i metodi microscopici le particelle aerodiffuse, raccolte su un vetrino o su un filtro, possono essere osservate con vari tipi di microscopi, ottici, a fluorescenza, elettronici a scansione (MADELIN, MADELIN, 1995). Essi sono gli unici attualmente disponibili per la valutazione dell'aerosol fungino totale, inclusi i propaguli non vitali o non in grado di sviluppare colonie. L'aerosol fungino totale è un parametro estremamente importante poiché la vitalità non è un requisito necessario per lo sviluppo di malattie non infettive: allergeni e tossine, infatti, possono essere presenti anche nelle cellule morte (SORENSEN, LEWIS, 1996). Anche i metodi microscopici presentano dei limiti: richiedono molto tempo e lavoro di equipe; consentono di analizzare soltanto un volume

ridotto per ogni campione, oppure pochi campioni che possono non rappresentare a sufficienza la situazione reale; rendono difficile l'individuazione di propaguli di dimensioni molto ridotte o presenti sotto forma di aggregati e la discriminazione tra generi che producono propaguli riproduttivi molto simili, per forma e dimensione, come nel caso delle specie di *Penicillium* e *Aspergillus*.

Da quanto appena esposto deriva la necessità di sperimentare nuove tecniche che affianchino ed eventualmente sostituiscano le metodiche tradizionali.

La citofluorimetria a flusso (FCM) è una tecnica estremamente versatile che permette di contare, analizzare singolarmente ed eventualmente separare (mediante "cell sorting") migliaia di cellule in pochi secondi e, già da alcuni anni, è stata utilizzata in studi di carattere ecologico, in particolare, sul planc-ton microbico procariotico ed eucariotico (DELEO, BAVEYE, 1996; GASOL *et al.*, 1999; DUBELAAR, JONKER, 2000; VELDHUIS, KRAAY, 2000).

L'impiego della FCM per l'analisi del bioaerosol è, attualmente, agli inizi ed è stato sperimentato soltanto per analisi batteriche. In tale ambito, comunque, il confronto con metodologie tradizionali ha permesso di evidenziare le enormi potenzialità della FCM che, inoltre, se accompagnata da tecniche di biologia molecolare come l'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) (LANGE *et al.*, 1997) o di immunomarcatura, può permettere la ricerca e l'accurata valutazione quantitativa di specie patogene ad alto rischio per la salute dell'uomo e degli animali.

Per quanto riguarda il monitoraggio della microflora aerodiffusa in letteratura non esistono, a nostra conoscenza, riferimenti all'impiego della citofluorimetria a flusso per l'analisi di campioni ambientali. L'unico caso, di recentissima pubblicazione, si riferisce alla ricerca degli sporangi del fungo fitopatogeno *Phytophthora infestans* in campioni simulati di bioaerosol (DAY *et al.*, 2002).

Nell'applicazione della FCM allo studio dell'aerosol fungino, il principale problema è legato alla difficoltà di colorare con i fluorocromi i propaguli di moltissimi funghi (MUILENBERG, BURGE, 1994; BURGE, 1995; DAY *et al.*, 2002). Spore e conidi, infatti, sono caratterizzati da pareti cellulari molto spesse e resistenti che proteggono il protoplasto dagli insulti fisici, chimici e biologici dell'ambiente troposferico ma, nel contempo, impediscono o mascherano la colorazione.

Lo scopo di questo studio è stato sperimentare l'applicabilità della citofluorimetria a flusso, in luce dispersa e fluorescente, alla valutazione quantitativa dell'aerosol fungino di campioni ambientali a diversa tipologia, confrontando la sensibilità di questa tecnica con quella di una tecnica di analisi tradizionale.

MATERIALI E METODI

Il campionamento dell'aria è stato effettuato in due siti con caratteristiche ambientali estremamente differenti: sito A, all'interno della camera di bioossidazione di un impianto di compostaggio; sito B, in un'area cittadina, ricca di vegetazione (*arboretum*

dell'Orto Botanico di Torino). Prove preliminari condotte in entrambi i siti, impiegando un campionatore SAS (Surface Air Sampler), indicavano la presenza, nel sito A, di una carica fungina molto superiore alle medie outdoor e ai valori ottenuti nel sito B. Per tale motivo il campionamento è stato condotto su volumi d'aria diversi.

Per la raccolta del campione è stato impiegato un campionatore volumetrico tipo "impinger", costituito da un gorgogliatore in vetro, collegato ad una pompa a vuoto (TCR Tecora, modello "Charlie").

Come liquido di raccolta sono stati impiegati 12 ml di soluzione di Ringer (Oxoid) diluita un quarto e modificata con l'aggiunta di 0.01% Antifoam A (Sigma) e 0.02% Tween 80 (Sigma) per facilitare la sospensione dei propaguli idrofobici e diminuire la loro aggregazione.

L'aria è stata campionata ad altezza uomo, alla velocità di 10 l al minuto. Nel sito A è stato raccolto un campione corrispondente a 600 l d'aria, nel sito B quattro campioni (B1-B4), ognuno dei quali corrispondente a 3600 l d'aria.

Prima della colorazione, i campioni raccolti sono stati irraggiati con microonde, metodo che consente di colorare con i fluorocromi i propaguli fungini altrimenti refrattari (PRIGIONE, FILIPPELLO MARCHISIO, 2002). È stato impiegato un forno a microonde Panasonic NN-K257-W, irraggiando 1 ml di campione alla potenza di 440W e frequenza di 2450 MHz, per 30 secondi.

I campioni sono stati colorati con ioduro di propidio (Sigma) alla concentrazione finale di 100 mg ml⁻¹ e analizzati dopo 2 ore di incubazione a temperatura ambiente.

Il numero di propaguli fungini presenti nei campioni è stato valutato parallelamente mediante analisi diretta in epifluorescenza (microscopio Nikon ECLIPSE E 400) con l'ausilio di un emocitometro (camera di Bürker) e mediante analisi con citofluorimetro a flusso (modello Partec PAS, equipaggiato con un laser ad argon da 20 mW); in questo caso come standard esterno sono state impiegate microsfeere di polietilene "full spectrum" con un diametro di 4.2 µm (Polyscience), paragonabile a quello del materiale preso in esame.

Inoltre è stata eseguita una preanalisi, in fluorescenza e in luce dispersa, di sospensioni pure e miste di conidi di *Penicillium brevicompactum* e *Cladosporium cladosporioides* per impostare lo strumento in modo da identificare la regione di background da quella dell'aerosol fungino. Queste due specie fungine sono state scelte come riferimento sia perché dominanti nell'ambiente aereo (FILIPPELLO MARCHISIO *et al.*, 1997), sia perché le caratteristiche dei loro conidi (dimensioni e forma) possono ben rappresentare la variabilità morfologica e dimensionale delle più comuni specie fungine aerodiffuse.

Per entrambi i metodi di analisi abbiamo eseguito 5 ripetizioni, ognuna delle quali corrispondente a 200 ml di sospensione, nel caso del citofluorimetro a flusso, e a 0.192 ml, nel caso dell'analisi in epifluorescenza. La significatività delle differenze tra le letture

eseguite con il citofluorimetro e la camera di Bürker è stata calcolata mediante il test non parametrico di Mann-Whitney (programma STAT VIEW II per Macintosh).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le principali difficoltà che l'analisi citofluorimetrica di campioni ambientali comporta sono i) la possibilità che il particolato di fondo mascheri i propaguli fungini presenti nel campione e ii) la necessità di individuare le coordinate che identificano l'area in cui ricade la popolazione fungina per separarla da altri organismi e componenti biologiche che, inevitabilmente, si trovano in un campione naturale, in particolare pollini e batteri.

Lo ioduro di propidio è un fluorocromo intercalante che si lega agli acidi nucleici con una buona specificità (HOUGLAND, 1996); per tale motivo, nonché per l'intensa fluorescenza che conferisce ai propaguli fungini, dopo trattamento con microonde (PRIGIONE, FILIPPELLO MARCHISIO, 2002), si è rivelato utile per distinguere la componente biologica dal particolato inorganico che è stato così escluso dall'acquisizione di ulteriori dati.

La pre-analisi di sospensioni pure di conidi di *Penicillium brevicompactum* e *Cladosporium cladosporioides* ci ha permesso di individuare in un diagramma a nuvole di punti, ottenuto combinando il forward scatter, parametro di luce dispersa correlato alle dimensioni delle particelle (DAVEY, KELL, 1996), con l'intensità di fluorescenza nel rosso, la regione in cui

era presumibile fosse compresa la popolazione fungina dei campioni ambientali; perciò soltanto le particelle che ricadevano in questa regione sono state considerate propaguli fungini e conteggiate (Fig. 1).

I risultati delle letture eseguite con il citofluorimetro a flusso e in microscopia ad epifluorescenza dei 5 campioni ambientali sono mostrati in Tab. 1, in cui sono riportate le medie delle 5 ripetizioni, le deviazioni standard e i coefficienti di variazione percentuale. Confrontando i risultati ottenuti con i due metodi di analisi, le differenze sono risultate, in ogni caso, non significative. I coefficienti di variazione relativi all'analisi citofluorimetrica sono risultati, in media, più bassi rispetto a quelli ottenuti in epifluorescenza. Inoltre, tenendo conto che con il citofluorimetro a flusso ogni lettura viene effettuata su un volume di campione che è oltre 1000 volte maggiore rispetto a quello impiegato nella camera di Bürker (200 ml vs. 0.192 ml) le letture devono essere considerate più rappresentative.

In base alla velocità di aspirazione del campionatore, alla durata del campionamento e alla concentrazione di propaguli per ml di sospensione, è stata quindi calcolata la concentrazione di propaguli per m³ d'aria (Tab. 2). I risultati ottenuti indicano che le analisi citofluorimetriche, impostate nel modo descritto, possono essere considerate affidabili nelle valutazioni quantitative dell'aerosol fungino, con il vantaggio della rapidità, che offre, tra l'altro, anche la possibilità di un esame ambientale più accurato per il maggiore numero di campioni analizzabili. La tecnica

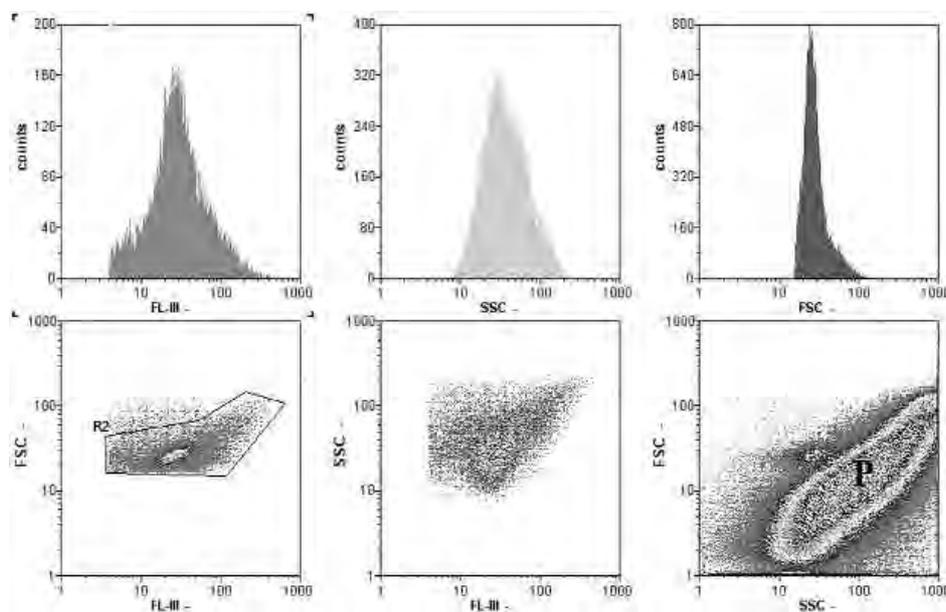


Fig. 1

FCM: istogrammi di frequenza e diagrammi a nuvole di punti ottenuti nell'analisi del campione ambientale B1 trattato con microonde e colorato con ioduro di propidio. Counts, numero di particelle; FL III, fluorescenza nel rosso; FSC, forward scatter; SSC, side scatter; R2, area selezionata per il conteggio; P, particolato di fondo.

FCM: histograms and dot plot obtained by flow cytometric analysis of B1 sample after microwave irradiation and propidium iodide staining. Counts, number of particles; FLIII, red fluorescence; FSC, forward scatter; SSC, side scatter; R2, region gated for counting; P, background.

TABELLA 1

Analisi quantitativa di campioni ambientali: letture con il citofluorimetro a flusso con il microscopio ad epifluorescenza. Quantitative analysis of field samples by flow cytometry and epifluorescence microscopy.

Campione	Citofluorimetria a flusso			Microscopia ad epifluorescenza		
	N° medio di propaguli fungini ml ⁻¹	Dev. St.	CV (%)	N° medio di propaguli fungini ml ⁻¹	Dev. St.	CV (%)
A	2.65 x 10 ⁴	0.81 x 10 ⁴	30.57	3.85 x 10 ⁴	0.73 x 10 ⁴	18.96
B1	4.49 x 10 ⁴	1.71 x 10 ⁴	30.08	5.60 x 10 ⁴	1.72 x 10 ⁴	30.71
B2	1.14 x 10 ⁴	0.45 x 10 ⁴	39.47	1.04 x 10 ⁴	0.64 x 10 ⁴	61.53
B3	1.56 x 10 ⁴	0.38 x 10 ⁴	24.36	1.35 x 10 ⁴	0.59 x 10 ⁴	43.70
B4	1.41 x 10 ⁴	0.14 x 10 ⁴	9.93	1.67 x 10 ⁴	1.19 x 10 ⁴	71.26

TABELLA 2

Concentrazioni di propaguli fungini per m⁻³ di aria ottenute con il citofluorimetro a flusso e con il microscopio ad epifluorescenza. Total fungal load (propagules m⁻³ of air) by flow cytometry and epifluorescence microscopy.

Campione	Citofluorimetria a flusso		Microscopia ad epifluorescenza	
	N° medio di propaguli fungini m ⁻³	Dev. St.	N° medio di propaguli fungini m ⁻³	Dev. St.
A	5.30 x 10 ⁵	1.62 x 10 ⁵	7.70 x 10 ⁵	1.46 x 10 ⁵
B1	1.50 x 10 ⁵	0.57 x 10 ⁵	1.87 x 10 ⁵	0.57 x 10 ⁵
B2	3.80 x 10 ⁴	1.50 x 10 ⁴	3.46 x 10 ⁴	2.13 x 10 ⁴
B3	5.20 x 10 ⁴	1.27 x 10 ⁴	4.50 x 10 ⁴	1.97 x 10 ⁴
B4	4.70 x 10 ⁴	0.47 x 10 ⁴	5.57 x 10 ⁴	3.97 x 10 ⁴

dovrà ancora essere sperimentata in situazioni differenti di contaminazione e un interessante sviluppo potrà essere la messa a punto di un metodo per la ricerca e la valutazione quantitativa di specie critiche con metodi immunologici e/o molecolari.

LETTERATURA CITATA

- BURGE H.A., 1995 - *Bioaerosols in the residential environment*. In: *Bioaerosols Handbook*. Lewis Publishers, London.
- DAVEY H.M., KELL D.B., 1996 - *Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses*. *Microbiol. Rev.*, 60(4): 641-696.
- DAY J.P., D.B. KELL, G.W. GRIFFITH, 2002 - *Differentiation of Phytophthora infestans sporangia from other airborne biological particles by flow cytometry*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 37-45.
- DELEO P.C., BAVEYE P., 1996 - *Enumeration and biomass estimation of bacteria in aquifer microcosm studies by flow cytometry*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4580-4586.
- DUBELAAR G.B.J., JONKER J.J., 2000 - *Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton*. *Scientia Marina*, 64(2): 135-156.
- FILIPPELO MARCHISIO V., AIRAUDI D., BARCHI C., 1997 - *One-year monitoring of the airborne fungal community in a suburb of Turin (Italy) and assessment of its functional relations with the environment*. *Mycol. Res.*, 101(7): 821-828.
- FILIPPELO MARCHISIO V., CARAMIELLO R., MARIUZZA L., 1989 - *Outdoor airborne fungi: sampling strategies*. *Aerobiologia*, 5: 145-153.
- GASOL J.M., ZWEIFEL U.L., PETERS F., FUHRMAN J.A., HAGSTROM A., 1999 - *Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 4475-4483.
- HOUGLAND R. P., 1996 - *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. Molecular Probes.
- LANGE J.L., THORNE P.S., LYNCH N., 1997 - *Application of flow cytometry and fluorescent in situ hybridization for assessment of exposures to airborne bacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(4): 1557-1563.
- MADLIN T.M., MADLIN M.F., 1995 - *Biological analysis of fungi and associated moulds*. In: *Bioaerosol Handbook*. Lewis Publishers, London.
- MACKAY A., 1998 - *Temporal trends of fungal spores in central London, and their functional relationships with environmental factors*. Jackson Environm. Inst. Working Paper, 2: 1-32.
- MUILENBERG M.L., BURGE H.A. 1994. *Filter cassette sampling for bacterial and fungal aerosols*. In: *Air quality monographs*, vol. 2: *Health implications of fungi in indoor environments*. Elsevier.
- PRIGIONE V., FILIPPELO MARCHISIO V., 2002 - *Microwave irradiation: a tool to improve the staining with fluoroch-*

- romes of *Aspergillus fumigatus* conidia. Proc. 7th Int. Mycol. Congr. Oslo, 11-17 August 2002.
- SORENSEN W.G., LEWIS D.M., 1996 - *Organic dust toxic syndrome*. In: HOWARD D.H., MILLER J.D. (eds.), *The Mycota*, vol. VI. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- VELDHUIS M.J.W., KRAAY G.W., 2000 - *Application of flow cytometry in marine phytoplankton research: current applications and future perspectives*. *Scientia Marina*, 64(2): 121-134.

RIASSUNTO - In questo studio è stata valutata la possibilità di impiegare la citofluorimetria a flusso per l'analisi quantitativa dell'aerosol fungino. I campioni di aerosol sono stati raccolti mediante un campionatore volumetrico

tipo impinger in due siti con caratteristiche ambientali estremamente differenti: all'interno della camera di fermentazione di un impianto di compostaggio e in un'area cittadina ricca di vegetazione. Confrontando i valori ottenuti con il citofluorimetro e con il microscopio a fluorescenza, le differenze si sono rivelate non significative (test non-parametrico di Mann-Whitney) per entrambi i siti. Con il citofluorimetro, inoltre, ogni analisi viene effettuata su un volume di campione mille volte maggiore rispetto al microscopio a fluorescenza, con il conseguente risultato di ottenere dati più rappresentativi. La citofluorimetria a flusso, pertanto, può essere considerata una tecnica affidabile e rapida anche per la valutazione della carica fungina atmosferica, rischio biologico di interesse emergente.

AUTORI

Valeria Prigione, Valeria Filipello Marchisio, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Torino, Viale Mattioli 25, 10125 Torino
Guido Lingua, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Avanzate, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", C.so Borsalino 54, 15100 Alessandria

Valutazione della componente microfungina secondo un gradiente di biodiversità lichenica

A.M. PICCO, M. BRUSONI, G. DEL FRATE, M. GUGLIELMINETTI, E. SAVINO, S. TOSI e G. CARETTA

ABSTRACT - *Microfungi evaluation according to a gradient of Lichen Biodiversity* - In order to evaluate new air quality bio-markers, qualitative and quantitative analysis of corticolous, lichenicolous and airborne fungi, were carried on in an area nearby Pavia (Italy). The sampling area was chosen according to a gradient of Lichen Biodiversity (LB) index. The airborne fungal spores quantitative data reflects the gradient of environmental quality. The floristic richness of the corticolous and lichenicolous fungal community seems to be more sensitive, if compared to LB, as it could indicate fungicide polluted areas.

Key words: airborne fungi, bio-markers, corticolous fungi, environmental air quality, lichenicolous fungi

INTRODUZIONE

Da indagini effettuate sia dalla Environmental Protection Agency (EPA) che dalla National Research Council (NRC) Commission on Life Sciences, è emerso che il numero di markers biologici finora utilizzati per individuare i vari inquinanti atmosferici non è ancora sufficiente per risolvere questo complesso problema, anche se l'uso combinato di questi indicatori può facilitare la valutazione del meccanismo di stress dovuto ai contaminanti aerei (NRC, 1989). In questo campo risultano particolarmente efficaci ed attendibili i licheni (NIMIS, CASTELLO, 1990; NIMIS, 1994, 1999). Tuttavia, non sono ancora stati riscontrati marcatori specifici per ogni specifico inquinante. Indicatori biologici, come ad esempio le piante, possono rispondere in modo simile all'azione di diversi inquinanti. Il problema è ulteriormente aggravato in quanto altri stress possono produrre sintomi nelle piante che "mimano" i danni causati dall'inquinamento atmosferico; infatti, vi è una forte somiglianza tra le lesioni provocate dagli inquinanti atmosferici e quelle dovute agli agenti climatici o ad altri fitopatogeni, come virus, funghi e batteri. In aggiunta a ciò, le piante differiscono, sia tra specie e specie, sia nell'ambito della stessa specie, per quanto riguarda la loro capacità genetica di assorbire, assimilare e, di conseguenza, rispondere ad un inquinante atmosferico. Le piante, infatti, manifestando una diversa sensibilità agli inquinanti atmosferici, si comportano, come markers biologici in modo diverso, a seconda della loro potenzialità genetica. Occorre, quindi, individuare

un numero maggiore di bioindicatori con diverse caratteristiche di organizzazione biologica appartenenti, quindi, anche a regni diversi, al fine di limitare il problema legato a risposte individuali. In quest'ottica è stata svolta la presente ricerca, inserita nel programma di ricerca scientifica di rilevante interesse nazionale dal titolo "Crittogame come biomonitori", cofinanziato nel 1988 dal Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica.

Nel presente lavoro sono riportati i risultati relativi alla componente fungina presente in aree dell'Oltrepò Pavese, scelte lungo un gradiente di inquinamento atmosferico, valutato mediante l'indice di Biodiversità Lichenica (BL). In particolare:

- 1) identificazione della componente fungina su cortecce lichenizzate/non lichenizzate;
- 2) studio, sotto il profilo qualitativo e quantitativo, di funghi mesofili, epifiti ed endofiti, isolabili da esemplari di *Phaeophyscia orbicularis* presenti sulle stesse piante. *Phaeophyscia orbicularis* è una specie molto variabile e ha una vastissima distribuzione nelle regioni temperate dell'emisfero Nord (THOMSON, 1963). In Italia è senza dubbio una delle più comuni specie di *Phaeophyscia*, soprattutto al di sotto della fascia montana. Secondo WIRTH (1980) *P. orbicularis* sarebbe uno dei licheni fogliosi più tossitolleranti. Possiede infatti una tolleranza di tipo medio all'inquinamento dei fluoruri (LE BLANC *et al.*, 1972) e dell'anidride solforosa (HAWKSWORTH, ROSE, 1970) che le permette di spingersi fino in

prossimità dei centri urbani.

3) valutazione delle aerospore fungine.

Obiettivo principale è stato quello di comparare il comportamento dei funghi con quello dei licheni, nell'ottica della ricerca di nuovi bioindicatori ambientali.

MATERIALI E METODI

Le postazioni di campionamento, scelte lungo un gradiente di inquinamento atmosferico, valutato mediante l'indice di BL (BRUSONI *et al.*, 1997), sono situate in provincia di Pavia, lungo la "via Emilia", tra Redavalle e Broni, e vengono qui di seguito elencate: Cigognola (A) (BL > 25), Redavalle (B) (BL = 14), Broni (C) (BL = 10), cementificio di Broni (D) (BL = 0). Le fonti di inquinanti atmosferici, in queste aree di studio, sono rappresentate da particolato emesso da un cementificio (postazione D), dal traffico autoveicolare (A,B,C,D) e dagli anticrittogamici utilizzati nel corso delle pratiche agricole (A). I campionamenti sono stati effettuati stagionalmente da marzo 1999 a gennaio 2000.

A causa delle differenti tecniche utilizzate, i materiali e metodi verranno ora riportati separatamente ed in modo specifico per ogni punto precedentemente elencato.

1: isolamenti da cortecce lichenizzate e non

Non essendo presenti, nelle quattro postazioni, le stesse essenze arboree, sono state scelte piante che avessero la scorza con le medesime caratteristiche di acidità e che ospitassero il lichene *Phaeophyscia orbicularis* (Neck.) Moberg e precisamente: *Salix alba* L. nelle postazioni A e B, *Robinia pseudacacia* L. nella postazione C e *Populus nigra* L. nella postazione D. Campioni di corteccia sono stati prelevati sterilmente a circa 1.5 m dal suolo.

In particolare:

- nelle postazioni A, B, C sono state prelevate campioni di corteccia lichenizzata e non lichenizzata;
- per la postazione D, dove l'indice di BL è uguale a 0, sono state prelevate invece solo campioni di corteccia prive di lichene.

I campioni, sono stati sottoposti al seguente trattamento: asportazione del lichene dalla corteccia e preparazione dei campioni di corteccia in segmenti di circa 1.5x1.5 cm, trattamento di leggera sterilizzazione superficiale (immersione in NaClO per 3 minuti, due lavaggi successivi in acqua distillata sterile); deposizione su capsule Petri contenenti AW (Agar Acqua). Tali piastre sono state mantenute alla temperatura di 20°C per 45 giorni ed osservate regolarmente. A ciascun frammento di campione è stato attribuito, sulla base di una valutazione visiva, per ogni specifico *taxon*, il valore di abbondanza in una scala da 0 a 9, dove 0 = assenza del fungo e 9 = massima presenza (secondo la tecnica descritta da OCCHIPINTI AMBROGI, 1991, modificata).

2: isolamenti da *P. orbicularis*

Il materiale lichenico è stato prelevato sterilmente

dalle cortecce per mezzo di un bisturi ed in laboratorio è stato ulteriormente separato dall'eventuale presenza di frammenti di corteccia, muschio ed altri organismi, sotto lo stereomicroscopio. Per l'isolamento dei funghi epifiti il materiale è stato sottoposto ad una serie di lavaggi in acqua, seguiti dall'asciugatura in stufa a 30°C, per 4 ore, secondo la metodica proposta da DICKINSON (1971). Per l'isolamento dei funghi endofiti il lichene è stato trattato secondo la tecnica di BILLIS, POLISHOOK (1991). I frammenti lichenici sono quindi stati posti in capsule Petri contenenti diversi terreni colturali e la crescita fungina è stata controllata periodicamente allo stereomicroscopio; ciascuna colonia sviluppata è stata isolata in provetta e successivamente ne è stata determinata la specie.

3: aerospore

Questo tipo di indagine ha previsto il campionamento qualitativo e quantitativo delle aerospore fungine.

L'analisi qualitativa è stata effettuata con l'esposizione, per ogni postazione, di tre piastre (160 mm Ø) contenenti terreno colturale (PDA addizionato del 5% di cloramfenicolo), per 5 minuti. Tali piastre sono state mantenute a 20°C per un mese e osservate regolarmente per l'isolamento e l'identificazione dei funghi.

L'analisi quantitativa è stata effettuata con l'impiego del Burkard Personal Volumetric Air Sampler, campionatore portatile che aspira un flusso di aria di 10 l/min. convogliandolo su di un vetrino siliconato. Questo strumento è stato utilizzato in ogni postazione per 15 minuti e i vetrini sono stati montati, successivamente, in gelatina contenente lattofucsina acida. Le spore fungine impattatesi sul vetrino sono state identificate e conteggiate tramite osservazione al microscopio ottico (400x) e poi espresse come concentrazione per m³ d'aria.

Analisi statistica

I dati relativi ai punti 1 e 3 sono stati sottoposti ad analisi multivariata usando il programma SYN-TAX 5.0 (PODANI, 1993) allo scopo di verificare una discontinuità nei dati che evidenzino possibili gruppi di *taxa* fungini che meglio di altri assumano un valore indicatore nei confronti di situazioni ambientali disturbate. Sia le postazioni che i *taxa* sono stati sottoposti a cluster analysis (ORLOCI, 1978). Le postazioni sono state poi sottoposte ad ordinamento secondo l'Analisi delle Componenti Principali (PCA).

Per i dati quantitativi relativi al punto 2 è stato calcolato per ciascuna postazione un indice di diversità, per l'esattezza l'indice di ricchezza in specie (ATLAS, BARTHA, 1993) secondo la formula: $d = S - 1 / \log N$ (dove S = numero di specie; N = numero di individui).

RISULTATI E DISCUSSIONE

1: isolamenti da cortecce lichenizzate e non

Sulle cortecce campionate sono stati identificati 114

diversi *taxa* fungini; in particolare, 89 *taxa* su *Salix alba*, 60 su *S. alba* in A; 66 su *S. alba* (in B), 49 su *Robinia pseudacacia* (in C), 36 su *Populus nigra* (in D). Dominanti sono risultati: *Acremonium* spp., *Alternaria alternata*, *Alternaria* sp., *Epicoccum nigrum*, *Fusarium* spp., *Gliocladium* spp., *Mortierella hjalina*, *Phoma* spp., *Sporidesmium hormiscioides*, *Verticillium* spp.

Si tratta di *taxa* caratteristici della parte esterna della scorza, con particolare polarità nei confronti delle parti legnose delle piante arboree (ELLIS, 1976; HENNEBERT, 1963; HUGHES, 1951; KENDRICK, 1961; SIMPSON, 1993).

Si evidenzia la presenza di *Morrisographium ulmi* (MORRIS, 1966; ILLMAN, WHITE, 1985), fungo segnalato in Italia una sola volta su *Ulmus minor* con comportamento sia epifitico che endofitico (PIONTELLI *et al.*, 1999).

L'abbondanza dei *taxa* fungini osservati (Fig. 1) risulta essere diversa nelle 4 postazioni, anche in relazione al tipo di campione (corteccia lichenizzata e corteccia non lichenizzata).

Dall'analisi della Fig. 2, è possibile, inoltre, notare

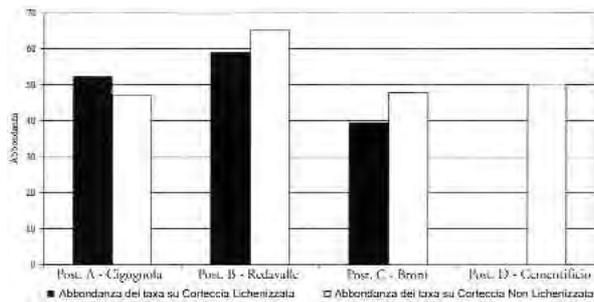


Fig. 1
Abbondanza annuale dei *taxa* fungini su corteccia lichenizzata e non lichenizzata nelle quattro postazioni
Annual abundance of the fungal community on lichenized and not-lichenized bark in the four locations.

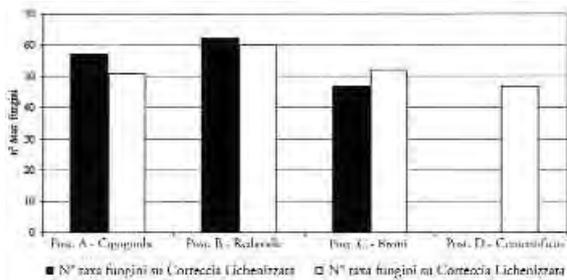


Fig. 2
Ricchezza floristica di *taxa* fungini su corteccia lichenizzata e non lichenizzata nelle quattro postazioni.
Floristic richness of the fungal community on lichenized and not-lichenized bark in the four locations.

che si assiste ad un aumento del numero dei *taxa* nella postazione B, rispetto alla postazione A; ciò potrebbe essere presumibilmente legato alla presenza, in A (postazione completamente circondata da vigneti), dell'inquinamento da anticrittogamici (principalmente rame, zolfo e derivati dell'acido carbammico). Si può quindi presupporre che il lichene risulti meno sensibile alla presenza di questi inquinanti rispetto ad altri potenziali bioindicatori, quali i funghi.

I risultati ottenuti vengono confermati dall'analisi multivariata (cluster analysis ed ordinamento delle postazioni e dei *taxa* fungini) cui sono stati sottoposti i dati (programma SYN-TAX 5.0). La classificazione gerarchica delle postazioni ha consentito di individuare due cluster principali: il primo raggruppa le postazioni di Cigognola e Redavalle, mentre il secondo comprende le postazioni di Broni e del cementificio. L'ordinamento reciproco delle postazioni, mediante PCA (Fig. 3), evidenzia lungo la prima componente un gradiente di ricchezza floristica crescente da sinistra a destra, a cui potrebbe essere associata una variazione della qualità ambientale. Secondo tale interpretazione, a Broni ed al cementificio corrisponderebbe una qualità ambientale scarsa, dovuta all'elevato disturbo antropico, mentre la postazione di Redavalle risulterebbe caratterizzata da maggiore naturalità; Cigognola costituisce una situazione intermedia tra Broni e Redavalle.

2: isolamento da *P. orbicularis*

L'analisi dei funghi associati a esemplari di *P. orbicularis* nei 4 campionamenti delle 3 stazioni ha portato all'identificazione di 35 *taxa*. Quindici sono state le specie isolate contemporaneamente sia come epifite che endofite, ciò fa supporre che queste possano inizialmente colonizzare, più o meno estesamente, la superficie del lichene e, successivamente, penetrare

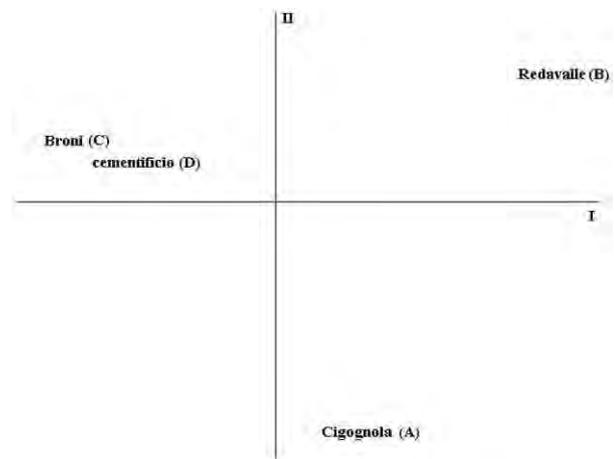


Fig.3
Diagramma di dispersione delle postazioni (micromiceti corticicoli).
Scattergram of the sampling areas (corticicolous microfungi).

all'interno del tallo utilizzandone alcune sostanze come substrato di crescita.

I risultati ottenuti dallo studio dei funghi epifiti ed endofiti sono stati valutati sia quantitativamente sia qualitativamente.

In Tab. 1 sono riportati gli indici di ricchezza in specie per entrambi i gruppi fungini, nonché i valori di BL.

TABELLA 1

Indici di ricchezza in specie per i funghi lichenici epifiti ed endofiti rispetto ai valori di BL.
Species richness index according to LB for epiphytic and endophytic lichenicolous microfungi.

	d / epifiti	d / endofiti	BL
Postazione A	11.5	4.6	> 25
Postazione B	10.8	8	14
Postazione C	9.1	6	10

Per quanto riguarda i funghi epifiti gli indici di ricchezza in specie sono sovrapponibili ai valori di BL; diminuiscono, infatti, all'aumentare dei livelli d'inquinamento. In base a questo indice, anche i funghi epifiti associati ai licheni sembrano essere dei bioindicatori di qualità dell'aria.

I funghi endofiti, a differenza degli epifiti, non presentano valori di ricchezza in specie paralleli ai valori di BL; non è quindi possibile mettere in relazione lo sviluppo delle specie endofite con i livelli d'inquinamento (molto probabilmente perché gli endofiti, vivendo all'interno del lichene, si trovano in un microhabitat protetto).

Risultati e conclusioni differenti si ottengono invece facendo considerazioni qualitative.

Se viene infatti valutata semplicemente la ricchezza floristica, ovvero il numero di specie trovate, prescindendo dal numero di individui (Fig. 4), si nota che i funghi epifiti hanno un andamento analogo a quello descritto per i funghi della corteccia. Infatti, la postazione B presenta una ricchezza floristica maggiore rispetto alla postazione A, interessata dai trattamenti anticrittogamici. Questi prodotti chimici potrebbero essere stati la causa della mancanza di sviluppo di alcune specie a loro più sensibili, che viceversa non sembrerebbero avere conseguenze dirette sul lichene. Per quanto riguarda invece la postazione C il numero di specie registrate risulta essere uguale a quello della postazione A. In questo caso la diminuzione della ricchezza floristica sembrerebbe dovuta all'inquinamento cittadino di Broni.

3: aerospore

Con il metodo qualitativo sono stati identificati 31 generi e 54 specie. Le specie più frequentemente osservate appartengono a spore comunemente aerodisperse (*Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum nigrum*

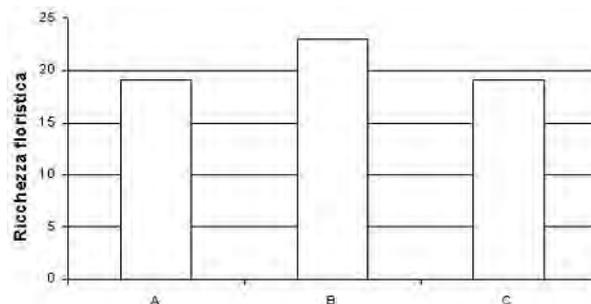


Fig. 4

Ricchezza floristica dei funghi lichenici epifiti nelle tre postazioni.

Floristic richness of lichenicolous epiphytic microfungi in the three locations.

e *Botrytis cinerea*). Si segnala l'isolamento di *Itersonilia perplexans*, specie patogena per il crisantemo, coltivato in questa zona. L'analisi statistica non ha rivelato alcuna correlazione fra il dato aeromicrologico qualitativo e le quattro postazioni.

Al contrario, la PCA dei dati quantitativi dei singoli taxa ha permesso di individuare, lungo la prima componente, un gradiente crescente da sinistra a destra a cui potrebbe essere associata la variazione della qualità ambientale, in accordo con il gradiente di BL (Fig.5).

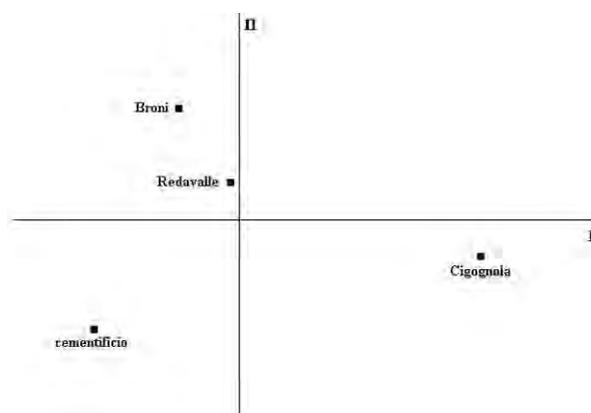


Fig. 5

Diagramma di dispersione delle postazioni (aerospore fungine).

Scattergram of the sampling areas (fungal airspores).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

La valutazione della ricchezza floristica degli epifiti fungini sul lichene e dei micromiceti corticicoli sembrerebbe individuare i suddetti funghi quali bioindicatori, oltre che delle sostanze inquinanti solitamente valutate per mezzo dei licheni, anche il diverso tipo d'inquinamento dovuto agli anticrittogamici, che i licheni non sembrerebbero rilevare.

Sarebbe auspicabile, quindi, sovrapporre il compor-

tamento di più bioindicatori per avere dei parametri più realistici che permettano di valutare la qualità dell'aria con metodi biologici.

LETTERATURA CITATA

- ATLAS R. M., BARTHA R., 1993 - *Microbial Ecology. Fundamentals and Application*, third Edition. Ed. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Redwood City, CA. 563 pp.
- BILLIS G. F., POLISHOOK D.J., 1991 - *Microfungi from Carpinus caroliniana*. *Can. J. Bot.*, 68: 1477-1482.
- BRUSONI, M., GARAVANI, M., VALCUVIA PASSADORE, M., 1997. *Licheni e inquinamento atmosferico: indagini preliminari condotte in una zona dell'Oltrepò pavese (Pavia, Lombardia)*. *Arch. Geobot.*, 3 (1): 95-106.
- DICKINSON C.H., 1971 - *Cultural studies of leaf saprophytes. Ecology of Leaf Surface Micro-organisms*: 129-137. PREECE T.F., DICKINSON C.H. (Eds.), Academic Press, London.
- ELLIS, M. B., 1976 - *More Dematiaceus Hyphomycetes*. *Comm. Mycol. Inst.*. Kew, Surrey, England. 507 pp.
- HAWKSWORTH, D. L., ROSE, L., 1970 - *Qualitative scale for estimating sulphur dioxide air pollution in England and Wales using epiphytic lichens*. *Nature*, 227: 145-148.
- HENNEBERT, G. L., 1963 - *Un hyphomycete nouveau, Arachnophora fagicola Gen. Nov. Spec. Nov.* *Can. J. Bot.*, 41: 1165-1169.
- HUGHES, S. J., 1951 - *Studies on micro-fungi. III*. *Mycol. Pap.*, 36: 1-43.
- ILLMAN, W. I., WHITE, G. P., 1985 - *The dark synnematosus hyphomycete genus Morrisographium: Described species transferred from Sphaeronaema, Cornularia, Phragmographium and Arthrobotryum*. *Can. J. Bot.*, 63: 423-428.
- KENDRICK, W. B., 1961 - *Hyphomycetes of conifer leaf litter, Thysanophora Gen. Nov.* *Can. J. Bot.*, 39: 817-832.
- LE BLANC, F., RAO, D. N., COMEAU, G., 1972 - *Indices of atmospheric purity and fluoride pollution pattern in Arvida, Quebec*. *Can. J. Bot.*, 63: 423-428.
- MORRIS E.F., 1966 - *Studies on the synnematosus Fungi Imperfecti. I*. *Mycopath. Mycol. Appl.*, 28: 97-101.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, COMMITTEE ON BIOLOGIC MARKERS OF AIR-POLLUTION DAMAGE IN TREES, 1989 - *Biologic Markers of Air-Pollution Stress and Damage in Forests*. National Academy Press. 380

pp.

- NIMIS, P. L., 1994 - *Tecniche di biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico basate sull'utilizzo di licheni come bioindicatori e bioaccumulatori*. In: GASPARO D., ZAPPA L. (Ed.), *Organismi come bioindicatori ambientali*: 97-110. Ecothema, Trieste.
- , 1999 - *Linee guida per la bioindicazione degli effetti dell'inquinamento tramite la biodiversità dei licheni epifiti*. *Atti Workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale"*. Roma, 26-27 novembre 1998, Anpa, 2: 267-277.
- NIMIS, P. L., CASTELLO, M., 1990 - *L'uso dei licheni nel biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico*. *Biol. ambientale*, 2: 5-25.
- NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL), 1989 - *Biologic Markers in Pulmonary Toxicology*. National Academy Press, Washington, D.C.
- OCCHIPINTI AMBROGI, A. 1991 - *The spread of Tricellaria inopinata into the lagoon of Venice: an ecological hypothesis*. In: BIGEY F.P. (Ed.), *Bryozoaires actuels et fossiles: Bryozoa living and fossil*. *Bull. Soc. Sci. Nat. Quest Fr. Mèm. H.S.*, 1: 299-308.
- ORLOCI L., 1978 - *Multivariate analysis in vegetation research*. 2nd edition. Junk, Den Haag.
- PIONTELLI, E., PICCO, A. M., RODOLFI, M., 1999 - *Algunos Hyphomycetes dematiaceos epifitos del norte de Italia*. *Bol. Micol.*, 14 (1-2): 101-108.
- PODANI J., 1993 - *Syn-tax - pc. Computer program for data analysis*. In: *Ecology and systematics*. Scienza Publishing, Budapest.
- SIMPSON, J. A., 1993 - *Thysanophora in Australia*. *Victorian Naturalist (South Yarra)*, 110 (2): 70-72.
- THOMSON, J. W., 1963 - *The lichen genus Physcia in North America*. *Beih. Nova Hedwigia*, 7: 1-172.
- WIRTH, V., 1980 - *Flechtenflora*. Ulmer, Stuttgart. 552 pp.
- RIASSUNTO - Nell'ottica della ricerca di nuovi bioindicatori della qualità dell'aria, è stata effettuata una ricerca in provincia di Pavia sui micromiceti corticicoli, lichenicoli e sulle spore aerodisperse. L'area di campionamento è stata scelta sulle basi di un gradiente di biodiversità lichenica. I dati relativi alle spore fungine aerodisperse sono sovrapponibili al gradiente di qualità ambientale. La ricchezza floristica dei funghi corticicoli e lichenicoli sembra essere maggiormente sensibile quando confrontata con l'indice di BL, poiché permette di rilevare l'inquinamento da fungicidi.

AUTORI

Anna Maria Picco, Maura Brusoni, Giuseppe Del Frate, Maria Guglielminetti, Elena Savino, Solveig Tosi, Giuseppe Caretta, Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli ambienti terrestri, Sezione di Micologia, Università di Pavia, Via S. Epifanio 14, 27100 Pavia, apicco@et.unipv.it

The necessity to exploit multifaceted approaches for resolving the systematics in *Basidiomycotina*: case studies on edible mushrooms

G.I. ZERVAKIS

ABSTRACT - Systematics is an area of fundamental importance to biological science and forms the basis of information exchange. Morphology of the fruit-body is the traditional basis for classification in macrofungi, but macroscopic features alone are usually inadequate to support taxonomic conclusions, while microscopy and physiology provide more reliable characters. Mating compatibility studies, based on the biological species concept, are widely used among higher fungi and offer valuable data on speciation processes. Molecular techniques such as isozyme electrophoresis, restriction and fragment analysis, and DNA/RNA sequencing provided powerful tools for understanding species concepts, systematics and phylogenies in *Basidiomycotina*. The genus *Pleurotus* (*Agaricales*) comprises edible mushroom species with high commercial value, which is due to their exploitation in the food industry, medicine and bioremediation sectors. The *Pleurotus* systematics have been addressed with a multitude of approaches and the elucidation of the relationships among some infra-generic *taxa* is still pending. However, the amount of available data has permitted the elaboration of stringent taxonomic schemes which include the most widespread species, i.e. *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. djamor*, and *P. cystidiosus* as well as *P. eryngii*, *P. dryinus*, *P. calyptratus*, and *P. cornucopiae*. For those species, the integration of analyses of several different types of characters has proved to be very useful, especially when morphological, compatibility and molecular data were associated. Since the selected characters exhibit variation appropriate to the question posed (provided that they have a clear and independent genetic basis, and that they are analyzed in the appropriate way), it is possible to obtain a comprehensive view of the evolution, and consequently an accurate estimation of the "true" systematics for various mushroom *taxa*.

Key words: classification characters, macrofungi, molecular systematics, phylogeny, *Pleurotus*, speciation, taxonomy

Floristic, geographical and ecological studies are impossible without through taxonomic and nomenclatural basis. On the other hand, geographical and ecological studies may provide valuable information on taxonomy. There is continued need for both classical revisions of many critical groups of fungi and for advanced research on the genetic basis of our species concepts.

Taxonomy is useful for developing systems of classification, making expert identifications, describing nomenclaturally significant *taxa*, and for preparing monographic and floristic studies. This scientific domain is based on the use of characters, which can be defined as features that when used to evaluate a set, vary in such a way that subsets can be distinguished within the set (KOHN, 1992). Experimental data yield two basic categories of characters: i. discrete characters: "independent variables whose possible values are collections of mutually exclusive character states" (SWOFFORD, OLSEN, 1990), e.g. spore colour, DNA hybridization pattern in RFLP's; ii. relative characters: variables developed by determining similarities or distances in pairwise or group com-

parisons, e.g. affinities of each of several antigens for one antibody. Given that a feature varies within a grouping of fungi, the key to making use of the feature as a character is in determining at which rank it varies, in other words in determining the "resolution level" of the character.

In the past, the most commonly used characters were macro and microanatomy, ontogeny of teleomorphs and anamorphs, diagnostic reactions with chemical reagents, relationships to the host or substrate, etc. The need to search for new characters is mainly related to simple (=inadequate) morphology (e.g. several microfungi, notably *Ascomycetes*), lack of sexual state in some fungi (e.g. *Fungi Imperfecti*), interdependence of many characters (e.g. ascospore size and ascus width), the effect of environment on characters (e.g. many larger *Basidiomycetes*).

Especially as regards the taxonomy of larger *Basidiomycotina*, it has been largely depended on morphology, i.e. macroscopic characters (pileus size, shape, texture, form, colour, surface features, margin, thickness, etc.; lamellae size, density, thickness, decurrent, colour, anastomoses, etc.; stipe size,

shape, thickness, relative position, surface features, colour, etc.; flesh texture, colour, odour, taste, etc.), microscopy (basidiospores, basidia, cystidia, trama structure, subhymenium, stipe context, pileipellis, etc.), mycelial colonies (texture, size, colour, margin, form, presence/absence pigments, presence/absence of nematode trapping structures, presence/absence of asexual fructifications, presence/absence of clamp connections, etc.). In addition, physiological and ecological features have been valuable in enhancing discrimination of closely related *taxa*, e.g. reactions with chemical reagents – histochemistry, enzyme and pigment production, mycelium growth rates, or host/substrate, habit and habitat, relationships with other biotic and abiotic factors, occurrence and distribution, etc. (ELLIS, ELLIS, 1988; ZERVAKIS, BALIS, 1996).

However, in many cases serious controversies were observed due to inaccurate original assignments, to the plasticity and the consequent overlapping of many morphological features caused by environmental factors, and to the lack of sufficient and sound morphological and physiological characters. Hence, numerous other approaches (e.g. mating compatibility, isozymes, DNA analysis, etc.) were adopted in order to elucidate the perplexed state of systematics within many mushroom groups.

In all organisms, the ability of individuals within a species to mate and produce viable propagules is the character that defines the biological species. Hence, the results of matings between homokaryotic isolates can be valuable for the elucidation of genetic and taxonomic relationships through the application of the biological species concept (DOBZHANSKY, 1970). This approach has been applied to various groups of *Basidiomycotina* for species delimitation, for establishing systematic relationships among different *taxa* and for drawing more accurate conclusions about speciation processes (BOIDIN, 1986; PETERSEN, 1995; ZERVAKIS, BALIS, 1995), although its generalized use in fungi has proved to be problematic in certain cases (BRASIER, 1987). The importance of adopting such a concept is obvious, as the ability of individuals to interbreed provides information on the type of reproductive system and the structure of mating factors, reveals the degree of gene flow between populations and the existence of genetic and/or sterility barriers.

Thus, studies on mating behaviour, apart from contributing to phylogeny, are valuable for confirming the validity of existing morphologically based *taxa* and for identifying reliable anatomical taxonomic characters. On the other hand, although the use of incompatibility criteria has provided valuable data, their full exploitation is yet to be accomplished, as it requires a detailed knowledge of the geographical distribution and a thorough understanding of the speciation mechanisms in this particular fungal group. In addition, the few cases of incomplete inter-compatibility demonstrate close affinities and are best interpreted as representing *taxa* in the process of speciation. Vegetative incompatibility and intersteril-

ity are additional sources of characters at intraspecific and specific levels respectively.

Characters based on proteins/enzymes may be developed using electrophoresis, immunological techniques, or direct amino acid sequencing. Isozyme analysis is a relatively economical and efficient technique for screening large number of isolates. It can yield characters which are generally accepted to be of independent genetic origin. When enough loci are available (at which variation is observed at the appropriate resolution level), the technique is useful in resolving at population, intraspecific, and species levels in systematic studies.

Molecular characters may or may not be independent from each other and are under selection pressures that are as yet poorly understood. However, unless specific functional genes are the objects of study, molecular characters are likely to be independent from "historical" phenotypic characters and the selective pressures driving divergence in these characters. DNA can be extracted from any living or properly dried specimen, can be stored easily, while PCR of DNA can be applied from small amounts of tissue from herbarium specimens. Essentially all methods of analysis screen for nucleotide substitutions, and insertion, deletion, or rearrangement of groups of nucleotides.

The analysis of restriction fragment length polymorphisms of DNA (RFLP's) has been applied effectively in systematic studies of fungi at specific, intraspecific and populations levels, through the use of cloned plasmid probe that produces RFLP's at a resolution level appropriate to the research problem (IRAÇABAL *et al.*, 1995; SMITH, ANDERSON, 1989; VILGALYS, GONZALEZ, 1990). Similarly, the polymerase chain reaction (PCR) technique has been very useful at any level of resolution provided that the region of DNA which has been selected for amplification (defined by the choice of the oligonucleotide primers) is neither too variable nor too highly conserved (BRYAN *et al.*, 1999; PAAVANEN-HUHTALA *et al.*, 1999; ZERVAKIS *et al.*, 2001). Both size polymorphisms and restriction analysis of the amplification products are approaches suitable for screening larger samples and provide an idea of the extent of sequence variability within the sample and whether to proceed with sequencing.

DNA sequencing is a powerful and of great potential method which has relatively recently applied for the elucidation of fungal phylogeny and systematics. However, DNA sequencing presents two points that need careful consideration before proceeding further: i. it is expensive and provides detailed information of high resolution which may be difficult to analyse (particularly where alignments are highly subjective); ii. the oligonucleotide sequences which are used in amplifying template DNA from a wide variety of fungi should be carefully selected in order to obtain the desired resolution level of sequence divergence. Especially, as regards the ribosomal RNA gene cluster much work on the systematics and evolution of fungi has concentrated on this cluster, because of the

presence of conserved and variable regions, its ubiquity and the multicopy nature of the gene cluster making it suitable for PCR amplification. Hence, 18S rDNA (ssu) is very conserved and it is used for "deep phylogenies", ITS1 and ITS2 accumulate mutations much faster and they are used to compare species within a genus (BRUNS *et al.*, 1991; ZARE *et al.*, 1999; KARAPAPA, TYPAS, 2001), while 5.8S, 28S (lsu) and 5S accumulate mutations at an intermediate level and they are used for assessing family and order relationships (especially the lsu's 3' end) (BUNYARD *et al.*, 1995; MAVRIDOU *et al.*, 2000). In addition, identification based on the fungal mitochondrial genome (mtDNA) has been also proved to be a valuable tool (DOOLITTLE *et al.*, 1996; HIBBETT, DONOGHUE, 1995; INGMAN *et al.*, 2000). Several mitochondrial genes like the small or large rRNA subunits (rns and rnl genes respectively), the cytochrome oxidase c subunits 1 and 2 (cox1 and cox2 genes respectively), the apocytochrome b (cob gene), and most recently NADHs (e.g. nad1 gene) have served as tools for the molecular typing and identification of different fungi, and at the same time provided valuable information on their phylogenetic relationships (BELLOCH *et al.*, 2000; BRUNS, PALMER, 1989; KRETZER, BRUNS, 1999; PAQUIN *et al.*, 1997). Similarly, degenerated primers based on highly conserved regions (inter-membrane and intra-membrane conserved sequences) and their nearest variable regions have been used (KOUVELIS *et al.*, 1999; TYPAS, 2000). Last, but not least, identification based on specific genes coding for interesting functions have been invariably used as labelling molecules for the study of RFLPs; for example, protease, chitinase or xylanase genes have been extensively used genes in RFLP studies in fungi (ABEL-BIRKHOFF, WALTON, 1996; LEAL *et al.*, 1997; ST LEGER, 2001). An indicative case where a multi-task taxonomic approach was required to solve the perplexed relationships among species was the mushroom genus *Pleurotus* ("oyster-mushroom"). Since an essential prerequisite for mushroom breeding and cultivation is the use of properly identified biological material, numerous studies were conducted in the past to elucidate taxonomy within the genus by employing morphological, physiological and compatibility criteria (EGER *et al.*, 1979; HILBER, 1982; BRESINSKY *et al.*, 1987), without arriving at a common conclusion as regards the taxonomy of related *taxa*, e.g. *P. columbinus*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* and *P. sapidus*. Controversies were attributed to inaccurate original assignments, to the plasticity and the consequent overlapping of many morphological features caused by environmental factors, and to the lack of sufficient and sound physiological characters. On the other hand, although the use of incompatibility criteria usually provides valuable data, their full exploitation is yet to be accomplished, as it requires a detailed knowledge of the geographical distribution and a thorough understanding of the speciation mechanisms in this particular fungal group. *Pleurotus taxa* were recently studied by modern bio-

chemical (ZERVAKIS, LABARÈRE, 1992; ZERVAKIS *et al.*, 1994) and molecular (VILGALYS, SUN, 1994; IRAÇABAL *et al.*, 1995; VILGALYS *et al.*, 1996) approaches, which conferred further in understanding *Pleurotus* phylogenetics and systematics in co-evaluation with traditional taxonomic criteria including morphology and mating tests (PETERSEN, HUGHES, 1993; PETERSEN, 1995; VILGALYS *et al.*, 1996; ZERVAKIS, BALIS, 1995).

Of interest is the outcome of the studies performed on two distinct groups of *Pleurotus* fungi:

The *Pleurotus eryngii* species-complex includes populations of choice edible mushrooms, growing in the greater Mediterranean area in close association with different genera of *Apiaceae* plants. Their distinct host-specialization served as the principal criterion for the discrimination of several *taxa*, which presented a relative uniformity in morphological characters and partial to complete mating intercompatibility (HILBER, 1982; ZERVAKIS, BALIS, 1996). However, the genetic relationships among the various *P. eryngii* ecotypes remained ambiguous, and the taxonomic status of the individual host-specific populations remained for a long time an issue of debate. Recently, an integrated taxonomic approach based on the use of morphological, physiological, ecogeographical, biochemical and molecular methodologies (VENTURELLA *et al.*, 2000, 2002; ZERVAKIS *et al.*, 2001; ZERVAKIS, VENTURELLA, 1998) resolved much of the perplexed situation within this very interesting (from both the ecological and economical point of view) fungal group. Results confirmed classification of *Pleurotus* strains into five clusters in accordance to their host-specificity (host-plants: *Eryngium* spp., *Ferula communis*, *Cachrys ferulacea*, *Thapsia garganica* and *Elaeoselinum asclepium* subsp. *asclepium*). *Pleurotus* isolates growing on *C. ferulacea* formed a distinct group presenting increased genetic distances with all other populations. The latter were positioned within a larger group (*P. eryngii sensu stricto*), that was further subdivided into four minor groups corresponding to the other hosts presenting high intrapopulation coherence of all those ecotypes. In addition, the evaluation of the principal ecological and morphological characters provided further evidence for discriminating between *Pleurotus* strains growing on *C. ferulacea* and the rest of the host-associated populations. The former represents a distinct species, *P. nebrodensis*; whereas all other ecotypes represent *taxa* at the varietal level: *P. eryngii* var. *eryngii*, *P. eryngii* var. *ferulae*, *P. eryngii* var. *thapsiae* and *P. eryngii* var. *elaeoselini*. All Mediterranean *Pleurotus* populations growing on Umbellifers seem to have recently diverged through a sympatric speciation process (i.e. speciation without geographical isolation: establishment of isolation within a community of potentially interbreeding individuals which are morphologically similar/identical), that is based on both intrinsic reproductive barriers and extrinsic ecogeographical factors.

On the other hand, the phylogeny based on ITS rDNA sequencing of synnematoïd *Pleurotus taxa*

with a world-wide origin shows that the *P. cystidiosus* species-complex is paraphyletic (ZERVAKIS *et al.*, unpublished data). This group is divided into at least three lineages representative of an allopatric mode of evolution: New World (incl. Mexico), Europe/Africa, and Asia/Pacific; the two latter seem to have diverged more recently. The resulting cladogram illustrating lineages resolved by molecular phylogenetic analysis is generally in congruence with the outcome of incompatibility tests among the strains examined as well as with geographic distribution (ZERVAKIS *et al.*, 1998). Phylogeographic analysis and evaluation of mating (high compatibility percentages within these groups in conjunction with the low intercontinental successful matings) and morphology (minute differences, generally restricted to limited variation of pileus color and cystidia anatomy) data suggest that speciation in this fungal group is associated with isolation of populations in geographically confined areas (i.e. allopatric or eco-geographical speciation: components of a wide-ranging, panmictic population become separated by some ecological or physical barriers and, having then diverged genetically, ultimately become incapable of breeding with the parental population).

In conclusion, since nowadays a variety of morphological, physiological, ecological, compatibility, biochemical and molecular criteria is available, handling of multiple taxonomic characters and their final synthesis depends on the research area and the problem. The characters examined should exhibit variation appropriate to the question posed, possess a clear and independent genetic basis, and the data should be collected and analysed in such a way that it is possible to compare and combine phylogenetic hypotheses derived from them (MORITZ, HILLIS, 1990). If the problem of systematics is the object of study, then integration of the analyses of several different types of characters is strongly recommended (KOHN, 1992). Furthermore, it is not axiomatic that molecular-phylogenetic and taxonomic systems will be congruent or that they should be; the relationship between molecular characters and other types of characters (particularly morphological characters) can produce an interesting dialectic (DOYLE, 1992). The molecular data may enhance our understanding of evolution of morphological characters. On the other hand, if the molecular data contradict a suite of well established morphological characters, the molecular data should be questioned by testing alternative interpretations and reevaluating the validity of data.

Acknowledgements - The author wishes to thank the Gruppo di Lavoro Micologia (Società Botanica Italiana), and especially Prof. V. Filipello Marchisio (Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Biologia Vegetale), for their kind invitation to present this lecture and their generous hospitality on the occasion of the Symposium entitled "La ricerca micologica nella Società Botanica Italiana, anno 2002 - stato attuale e prospettive future" (Turin, 15-16 November 2002).

REFERENCES

- ABEL-BIRKHOFF P., WALTON J.D., 1996 - *Cloning, disruption and expression of two endo- β -1,4-xylanase genes, XYL2 and XYL3 from Cochliobolus carbonum*. Appl. Environ. Microbiol., 62: 4129-4135.
- BELLOCH C., QUEROL A., GARCIA M.D., BARRIO E., 2000 - *Phylogeny of the genus Kluyveromyces inferred from the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene*. Internat. Syst. Evol. Microbiol., 50: 405-416.
- BOIDIN J., 1986 - *Intercompatibility and the species concept in the saprobic Basidiomycotina*. Mycotaxon, 26: 319-336.
- BRASIER C.M., 1987 - *The dynamics of fungal speciation*. In: RYNER A.D.M. *et al.* (Eds.), *Evolutionary biology of the fungi*: 231-238. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- BRESINSKY A., FISCHER M., MEIXNER B., PAULUS W., 1987 - *Speciation in Pleurotus*. Mycologia, 79: 234-245.
- BRUNS T.D., PALMER, J.D. 1989 - *Evolution of mushroom mitochondrial DNA: Suillus and related genera*. J. Molec. Evol., 28: 349-362.
- BRUNS T.D., WHITE T.J., TAYLOR, J.W., 1991 - *Fungal molecular systematics*. Annu. Rev. Ecol. Syst., 22: 525-564.
- BRYAN G. T., LABOURDETTE E., MELTON R. E., NICHOLSON P., DANIELS M. J., OSBOURN A. E., 1999 - *DNA polymorphism and host range in the take-all fungus, Gaeumannomyces graminis*. Mycol. Res., 103: 319-327.
- BUNYARD B.A., NICHOLSON M.S., ROYSE D.J., 1995 - *Phylogenetic resolution of Morchella, Verpa and Disciotis [Pezizales: Morchellaceae] based on restriction enzyme analysis of the 28S ribosomal RNA gene*. Exp. Mycol., 19: 223-233.
- DOBZHANSKY T., 1970 - *Genetics of the evolutionary process*. Columbia University Press, New York.
- DOOLITTLE R.F., FEING D-F., TSANG S., CHO G., LITTLE, E., 1996 - *Determining times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock*. Science, 271: 470-477.
- DOYLE J.J., 1992 - *Gene trees and species trees: molecular systematics as one-character taxonomy*. Syst. Bot., 17: 144-163.
- EGER G., LI S.F., LEAL-LARA H., 1979 - *Contribution to the discussion on the species concept in the Pleurotus ostreatus complex*. Mycologia, 71: 577-588.
- ELLIS M.B., ELLIS, J.P., 1988 - *Microfungi on Miscellaneous Substrates: An Identification Handbook*. Timber Press.
- HIBBETT D.S., DONOGHUE M.J., 1995 - *Progress toward a phylogenetic classification of the Polyporaceae through parsimony analysis of mitochondrial ribosomal DNA sequences*. Can. J. Bot., 73 (Suppl. 1): S853-S861.
- HILBER O., 1982 - *Die Gattung Pleurotus (Fr.) Kummer unter besonderer Berücksichtigung des Pleurotus eryngii-Formenkomplexes*. Bibl. Mycol., 87. J. Cramer. Vaduz.
- INGMAN M., KAESSMANN H., PAABO S., GYLLENSTEN, U., 2000 - *Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans*. Nature, 408: 708-713.
- IRAÇABAL B., ZERVAKIS G., LABARÈRE J., 1995 - *Molecular systematics of the genus Pleurotus: analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA*. Microbiology, 141: 1479-1490.
- KARAPAPA V., TYPAS M.A., 2001 - *Characterization of a group-I intron in the nuclear SSU-rRNA gene of Verticillium longisporum*. Curr. Microbiol., 42: 217-224.

- KOHN L.M., 1992 - *Developing new characters for fungal systematics: An experimental approach for determining the rank of resolution*. Mycologia, 84: 139-153.
- KOUVELIS V.N., ZARE R.N., BRIDGE P.D., TYPAS M.A., 1999 - *Differentiation of mitochondrial sub-groups in the Verticillium lecanii species complex*. Lett. Appl. Microbiol., 28: 263-268.
- KRETZER A.M., BRUNS T.D., 1999 - *Use of atp6 in fungal phylogenetics: An extreme example from Boletales*. Mol. Phylog. Evol., 13: 483-492.
- LEAL S.C.M., BERTIOLI D.J., BUTT T.M., CARDER J.H., BURROWS P., PEBERDY, J.F., 1997 - *Amplification and restriction endonuclease digestion of the PrI gene for the detection and characterization of Metarhizium strains*. Mycol. Res., 101: 257-265.
- MAVRIDOU A., CANNONE J., TYPAS M.A., 2000 - *Identification of five group-I introns at three different positions within the 28S rDNA gene of the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae var. anisopliae*. Fungal Genet. Biol., 31: 79-90.
- MORITZ C., HILLIS D.M., 1990 - *Molecular systematics: context and controversies*. In: HILLIS D. M., MORITZ C. (Eds.), *Molecular systematics*: 1-10. Sinauer Associates, Massachusetts.
- PAAVANEN-HUHTALA S., HYVÖNEN J., BULAT S. M., YLI-MATTILA T., 1999 - *RAPD-PCR, isozyme, rDNA RFLP and rDNA sequence analyses in identification of Finnish Fusarium oxysporum isolates*. Mycol. Res., 102: 625-634.
- PAQUIN B., LAFOREST M.-J., FORGET L., ROEWER I., WANG Z., 1997. *The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression*. Curr. Genet., 31: 380-395.
- PETERSEN R.H., 1995 - *There's more to a mushroom than meets the eye: Mating studies in the Agaricales*. Mycologia, 87: 1-17.
- PETERSEN R.H., HUGHES K.W., 1993 - *Intercontinental interbreeding collections of Pleurotus pulmonarius, with notes on other species*. Sydowia, 45: 139-152.
- SMITH M. L., ANDERSON J. B., 1989 - *Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNAs of Armillaria: identification of North American biological species*. Mycol. Res., 93: 247-256.
- ST LEGER R.J., 2001 - *Development and testing of genetically improved mycoinsecticides*. In: VURRO M. et al. (Eds.), *Enhancing biocontrol agents and handling risks. Series I: Life and Behaviour Sciences*, Vol. 339: 229-239. IOS Press.
- SWOFFORD D.L., OLSEN G.J., 1990 - *Phylogeny reconstruction*. In: HILLIS D. M., MORITZ C. (Eds.), *Molecular systematics*: 411-501. Sinauer Associates, Massachusetts.
- TAYLOR J.W., 1986. *Fungal evolutionary biology and mitochondrial DNA*. Exp. Mycol., 10: 259-269.
- TYPAS M.A., 2000 - *Molecular characterization of Verticillium species*. In: TJAMOS E.C. et al. (Eds.), *Advances in Verticillium research and disease management*: 32-40. The American Phytopathological Society Press.
- VENTURELLA G., ZERVAKIS G., LA ROCCA S., 2000 - *Pleurotus eryngii var. elaeoselini var. nov. from Sicily*. Mycotaxon, 76: 419-427.
- VENTURELLA G., ZERVAKIS G., SAITTA A., 2002 - *Pleurotus eryngii var. thapsiae var. nov. from Sicily*. Mycotaxon, 81: 69-74.
- VILGALYS R., GONZALEZ D., 1990 - *Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism in Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 80: 151-158.
- VILGALYS R., MONCALVO J.-M., LIU S.-R., VOLOVCEK M., 1996 - *Recent advances in molecular systematics of the genus Pleurotus*. In: ROYSE D. J. (Ed.), *Mushroom Biology and Mushroom Products*: 91-102. PennState University Press, Pennsylvania.
- VILGALYS R., SUN B. L., 1994 - *Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom Pleurotus revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences*. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 91: 4599-4603.
- ZARE R.N., KOUVELIS V.N., TYPAS M.A., BRIDGE P.D., 1999 - *Presence of a 20bp insertion/deletion in the ITS1 region of Verticillium lecanii*. Lett. Appl. Microbiol., 28: 258-262.
- ZERVAKIS G., 1998 - *Mating competence and biological species within the subgenus Coremiopleurotus*. Mycologia, 90: 1063-1074.
- ZERVAKIS G., BALIS C., 1995 - *Incompatibility alleles and mating behaviour between and within Pleurotus species*. In: ELLIOTT T. (Ed.), *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Vol. 14: 53-62. A. Balkema, Rotterdam.
- , 1996 - *A pluralistic approach on the study of Pleurotus species, with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa*. Mycol. Res., 100: 717-731.
- ZERVAKIS G., LABARÈRE J., 1992 - *Taxonomic relationships within the fungal genus Pleurotus as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns*. J. Gen. Microbiol., 138: 635-645.
- ZERVAKIS G., SOURDIS J., BALIS C., 1994 - *Genetic variability and systematics of eleven Pleurotus species based on isozyme analysis*. Mycol. Res., 98: 329-341.
- ZERVAKIS G., VENTURELLA G., 1998 - *Towards the elucidation of the systematics of the Pleurotus taxa growing in Umbellifers*. In: Proc. Sixth Int. Mycol. Congr.: 7. Jerusalem.
- ZERVAKIS G., VENTURELLA G., PAPADOPOULOU K., 2001 - *Genetic polymorphism and taxonomic relationships of the Pleurotus eryngii species-complex as resolved through the analysis of random amplified DNA patterns, isozyme profiles and ecomorphological characters*. Microbiology, 147: 3183-3194.

RIASSUNTO - *La necessità di un approccio multidisciplinare per la soluzione di problemi nella sistematica dei basidiomiceti: casi di studio su funghi eduli* - La sistematica è un'area di fondamentale importanza nelle scienze biologiche e rappresenta la base per lo scambio di informazioni. La morfologia del corpo fruttifero è la base tradizionale per la classificazione dei macromiceti, ma i caratteri macroscopici da soli sono generalmente inadeguati per sostenere conclusioni di tipo tassonomico, mentre la microscopia e la fisiologia forniscono caratteri più significativi. Gli studi di compatibilità, basati sul concetto biologico di specie, sono ampiamente usati nel caso dei funghi superiori ed offrono dati utili su processi di speciazione. Le tecniche molecolari come l'elettroforesi e le sequenze DNA/RNA aiutano nella comprensione del concetto di specie, nella sistematica e nella filogenesi dei Basidiomiceti. Il genere *Pleurotus* (*Agaricales*) include specie eduli di alto valore commerciale ed utilizzate nell'industria alimentare, in campo medico e nella biorimediazione. La sistematica del genere *Pleurotus* è stata studiata da vari punti di vista e gli auspici chiarimenti nelle relazioni tra alcuni taxa infragenerici sono ancora in via di definizione. Comunque, la quantità di dati al momento disponibile ha permesso l'elaborazione di rigorosi schemi tassonomici che includono le specie più diffuse quali *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. djamor*, *P. cystidiosus*, *P. eryngii*, *P. dryinus*, *P.*

calyptratus e *P. cornucopiae*. Per tali specie l'integrazione delle analisi di differenti tipi di caratteri è risultata estremamente utile specialmente quando si sono associati i dati morfologici e di compatibilità con quelli molecolari.

L'utilizzazione dei caratteri selezionati consente di avere un quadro completo sulla evoluzione di vari *taxa* fungini e conseguentemente un'interpretazione corretta della sistematica di tali funghi.

AUTHOR

Georgios I. Zervakis, National Research Foundation, Institute of Kalamata, Lakonikis 85, 24100 Kalamata, Greece (zervakis@kal.forthnet.gr)

Un approccio multidisciplinare allo studio della tassonomia del genere *Lactarius* in Europa

O. COMANDINI

ABSTRACT - *Multidisciplinary approach to the study of the genus Lactarius in Europe* - *Lactarius* is one of the larger genera of ectomycorrhizal *Basidiomycota*, with about 400 species recognized worldwide. We have started a study aimed at extending our knowledge of the distribution, phylogeny, and ectomycorrhizal biology of *Lactarius* species occurring in selected ecosystems using a multidisciplinary approach, considering and integrating morphological and molecular data obtained from both carpophores and the correspondent ectomycorrhizae.

Key words: ectomycorrhizae, ITS sequences, *Lactarius*, taxonomy

INTRODUZIONE

Il genere *Lactarius* è rappresentato da oltre 400 specie, 120 circa delle quali presenti in Europa (HEILMAN-CLAUSEN *et al.*, 1998; BASSO, 1999). Tuttavia, vista la carenza di dati relativi a numerosi ambienti tropicali, ed il grande numero di nuove specie che si stanno rinvenendo in tali aree, è molto verosimile che la reale consistenza numerica e la distribuzione globale delle specie di lattari sia ben superiore a quella attualmente conosciuta. Tutti i lattari noti sono riportati in associazione, più o meno specifica, con alberi e arbusti appartenenti a molti generi diversi, e il loro importante ruolo come colonizzatori "late-stage" è generalmente riconosciuto (HUTCHISON, 1999).

Nonostante la lunga tradizione e le buone conoscenze del genere, basate sulla tassonomia classica, soprattutto in Europa e Nord America, numerose lacune sono ancora presenti e riscontrabili dal confronto tra i vari sistemi di classificazione, specialmente intorno a gruppi di taxa particolarmente affini. Recentemente tuttavia, si è manifestato, da parte di studiosi di varie nazionalità, un nuovo interesse per lo studio del genere *Lactarius*, interesse che si sta concretizzando in una serie di ricerche integrate su vari aspetti della biologia e sulla filogenesi naturale di questo importante gruppo di macromiceti (EBERHARDT *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 2001; PETER *et al.*, 2001; EBERHARDT, 2002; MILLER, BUYCK, 2002).

In questo contesto, abbiamo condotto negli ultimi anni delle ricerche, tuttora in corso, con l'obiettivo di contribuire alla conoscenza sulla distribuzione, ecologia, filogenesi, e diversità micorrizica di alcune spe-

cie appartenenti al genere *Lactarius* in Europa, associate a determinate specie arboree o arbustive di particolare valenza ecologica (COMANDINI *et al.* 1998, 2001; EBERHARDT *et al.*, 2000). Partendo da una determinata essenza vegetale, le varie specie di lattari ad essa associate vengono caratterizzate sia da un punto di vista morfologico che molecolare, così come i diversi tipi ectomicorrizici da queste formate. I dati morfologici e molecolari dei carpofori e delle micorrize così ottenuti vengono quindi confrontati con gli stessi dati, presenti in letteratura o acquisiti da noi stessi, riguardanti taxa affini.

Questo approccio, possibile grazie alla collaborazione di studiosi con specializzazioni diverse, permette di acquisire allo stesso tempo informazioni riguardanti la specificità e l'ecologia della simbiosi fungo-pianta e dati utili ad una filogenesi, sia su base morfologica che su base molecolare, che contiamo contribuirà in tempi brevi a meglio delineare un'affidabile tassonomia per il genere *Lactarius* in Europa.

MATERIALI E METODI

Raccolta e caratterizzazione dei carpofori

I carpofori dei lattari studiati sono stati raccolti in località italiane ed europee caratterizzate da varie tipologie vegetazionali. Per ogni raccolta sono stati riportati il maggior numero di dati stazionali ed ecologici disponibili. Le specie raccolte sono state fotografate e sono stati altresì osservati, prima di procedere all'essiccazione, il maggior numero di caratteri macroscopici (colore e dimensioni dei carpofori, colore del lattice ed eventuale viraggio, consistenza e

sapore della carne e del lattice, etc.). Ogni campione è stato catalogato e conservato come materiale d'erbario.

Raccolta e caratterizzazione delle ectomicorrize

I campioni di terra sono stati raccolti direttamente sotto i corpi fruttiferi. In laboratorio sono state attentamente separate le micorrize sicuramente appartenenti al genere *Lactarius*, dopo di che si è proceduto al loro studio. I metodi per la caratterizzazione delle ectomicorrize ed il glossario dei termini usati sono quelli proposti da AGERER (1991). Lo studio dei caratteri microscopici è stato effettuato utilizzando sia le normali tecniche di microscopia ottica che quelle più informative di microscopia confocale. I caratteri diagnostici, utili per una dettagliata descrizione dei tipi micorrizici, sono stati disegnati e fotografati. L'attribuzione di ciascun tipo micorrizico alla corrispondente specie di lattario è stata possibile grazie alla presenza di particolari caratteristiche morfologiche e anatomiche, come il colore del lattice e particolari reazioni chimiche osservabili sia nei carpofori che nelle micorrize, e anche grazie alla costante presenza di determinati tipi micorrizici nei campionamenti effettuati al di sotto di carpofori di specie note. Tuttavia, la verifica di tale identità è stata possibile solo grazie alle analisi molecolari, in particolare al sequenziamento di specifiche regioni del DNA. I tipi micorrizici caratterizzati sono conservati in glutaraldeide al 4% in frigorifero a 4°C come materiale d'erbario (AQUI). Per ciascun campione sono stati altresì presi alcuni apici micorrizati, e conservati in etanolo al 50% per le successive analisi molecolari.

Analisi molecolari

Le analisi sono state effettuate sia su carpofori essiccati che su micorrize conservate in etanolo. I metodi per l'estrazione, la preparazione e l'amplificazione di specifiche regioni di DNA ribosomiale (prevalentemente ITS) sono quelli proposti da GARDES, BRUNS (1993). Per maggiori informazioni sui primers utilizzati, le procedure di sequenziamento, i metodi per la comparazione dati e le analisi filogenetiche, si rimanda ad EBERHARDT *et al.*, 2000, e le referenze lì riportate. Le sequenze specifiche ottenute da ciascuna specie sono state depositate in GenBank.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La ricerca esposta in queste pagine si prefigge due obiettivi paralleli: individuare e caratterizzare i lattari simbiotici di specifiche essenze vegetali, studiando in particolare i taxa appartenenti a determinate divisioni subgeneriche (sezioni e sottosezioni) per confermare o meno la validità della loro attuale collocazione sistematica all'interno del genere *Lactarius*, basandosi non solo su dati morfologici ma anche molecolari; allo stesso tempo, effettuare uno studio dettagliato delle micorrize formate da tali specie, mirando all'individuazione di caratteri peculiari necessari per delineare una sistematica parallela utilizzabile come estensione o integrazione a quella classica.

Le essenze vegetali per adesso considerate nell'ambito di questa ricerca sono state l'abete bianco (*Abies alba* Mill.) e alcune specie di cisto (*Cistus* spp.). L'abete bianco è una specie forestale di grande importanza ecologica ed ambientale, ampiamente diffusa in Europa. La valenza ectomicorrizica di quest'essenza è stata da noi investigata per alcuni anni (COMANDINI, 1997; COMANDINI *et al.*, 1998, 2001; EBERHARDT *et al.*, 2000). Per quanto riguarda i lattari associati all'abete bianco, sono stati studiati e analizzati *L. subsericatus* (Kühner & Romagn.) ex Bon, *L. intermedius* (Krombh.) Berk. & Broom e *L. salmonicolor* Heim & Leclair. Per ognuna delle tre specie sono stati studiati i carpofori da un punto di vista morfologico, caratterizzate le relative ectomicorrize, e si è inoltre sequenziata, per ogni specie, la regione ITS del loro DNA ribosomiale. Tali sequenze sono state poi comparate con quelle di altre specie strettamente correlate (EBERHARDT *et al.*, 2000). Ugual lavoro di comparazione è stato effettuato tra i tipi micorrizici studiati e quelli riportati in letteratura per specie appartenenti alle stesse sezioni. La totalità di specie considerate in questo lavoro sono riportate in Tab. 1.

Sinteticamente, i risultati ottenuti possono essere così schematizzati:

- Le due specie *L. subsericatus* e *L. fulvissimus* Romagn., oggetto di numerose discussioni circa la loro validità, tanto da essere considerati, da alcuni autori, la stessa specie (KÜNER, ROMAGNESI, 1954) mostrano, anche da un punto di vista molecolare, una situazione ambigua, che non ha permesso di risolvere definitivamente i dubbi circa la reale esistenza ed indipendenza dei due taxa. La descrizione delle ectomicorrize di *L. fulvissimus* non è disponibile per cui sarà sicuramente uno dei prossimi obiettivi caratterizzare tali tipi micorrizici per osservare eventuali differenze.
- La validità delle diverse morfospesie appartenenti alla sezione *Dapetes* è confermata anche dall'analisi molecolare. La similitudine tra le sequenze di specie come *L. deterrimus* Gröger, *L. salmonicolor*, ed *L. semisanguifluus* Heim & Leclair, associate ad essenze appartenenti a generi diversi, è maggiore rispetto a quelle di specie associate al genere *Pinus* (*L. deliciosus* (L.:Fr.) Gray, *L. quieticolor* Romagn., *L. semisanguifluus*). I caratteri delle micorrize dei *Dapetes* sono piuttosto uniformi e caratteristici.
- *L. scrobiculatus* (Scop.:Fr.) Fr. e *L. intermedius* la cui validità come specie distinte è stata a lungo dibattuta, sono, da un punto di vista molecolare, due specie separate. Le loro micorrize, sebbene molto simili, sono facilmente distinguibili.

La ricerca relativa ai cisti è ancora in fase iniziale. Tali arbusti, estremamente comuni e quindi molto importanti da un punto di vista ecologico nelle regioni aride e semi-aride dell'area mediterranea, sono stati raramente oggetto di studio per quanto riguarda la loro valenza ectomicorrizica (GIOVANNETTI, FONTANA, 1982). Per quanto riguar-

TABELLA 1

Lattari studiati e loro posizione sistematica. In tabella si riporta anche il tipo di materiale utilizzato sia per le analisi che per i confronti tra le specie.

Lactarius species considered and their systematics. Used material both for DNA analysis and morphological comparison among species is also reported.

SPECIE	SOTTOGENERE	SEZIONE	SIMBIONTE	MATERIALE STUDIATO
<i>L. subsericatus</i>	<i>Russularia</i>	<i>Russularia</i>	<i>Picea abies</i> , <i>A. alba</i> , <i>Fagus sylvatica</i>	CARP* + MIC**
<i>L. fulvissimus</i>	<i>Russularia</i>	<i>Russularia</i>	latifoglie	CARP
<i>L. salmonicolor</i>	<i>Piperites</i>	<i>Dapetes</i>	<i>A. alba</i>	CARP + MIC
<i>L. deterrimus</i>	<i>Piperites</i>	<i>Dapetes</i>	<i>P. abies</i>	CARP + MIC
<i>L. quieticolor</i>	<i>Piperites</i>	<i>Dapetes</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	CARP
<i>L. semisanguifluus</i>	<i>Piperites</i>	<i>Dapetes</i>	<i>P. sylvestris</i>	CARP
<i>L. deliciosus</i>	<i>Piperites</i>	<i>Dapetes</i>	<i>Pinus</i> spp.	CARP + MIC
<i>L. intermedius</i>	<i>Piperites</i>	<i>Zonarii</i>	<i>A. alba</i>	CARP + MIC
<i>L. scrobiculatus</i>	<i>Piperites</i>	<i>Zonarii</i>	<i>P. abies</i>	CARP + MIC

* CARP = carpofori; **MIC = micorrize

da più specificatamente la simbiosi tra cisti e lattari, in letteratura vengono riportati come simbionti obbligati di queste specie solamente *L. cyanopus* Basso, *L. cistophilus* Bon & Trinbach e *L. tesquorum* Malençon (BASSO, 1999). La nostra attenzione si è per ora focalizzata su *L. tesquorum*, del quale si sono caratterizzate le micorrize e si è sequenziato la regione ITS del DNA ribosomiale. Tali sequenze sono state utilizzate per effettuare un'analisi filogenetica di tutte le 7 specie europee di lattari classificate, assieme a *L. tesquorum* nel sottogenere *Piperites*, sezione *Piperites*: *L. mairei* Malençon, *L. torminosus* (Schaeff.: Fr.) Pers., *L. torminosulus* Knudsen & Borgen, *L. pubescens* Fr., *L. scoticus* Berk. & Broome e *L. spinosulus* Qué. (COMANDINI *et al.*, in prep.). Dai dati molecolari ottenuti risulta che la sezione *Piperites* può considerarsi monofiletica se si esclude *L. spinosulus*, specie la cui posizione sistematica è incerta, per la presenza di caratteri morfologici molto simili a quelli di *L. lilacinus* (Lasch.:Fr.) Fr., specie appartenente alla sezione *Colorati*. Per quanto riguarda la caratterizzazione micorrizica, la sola altra specie di *Lactarius* appartenente alla sezione *Piperites* studiata da questo punto di vista è *L. pubescens* Fr., in associazione con *Betula pendula* Roth e *Populus tremuloides* Michx. (GODBOUT, FORTIN, 1985; INGLEBY *et al.*, 1990). Dalla comparazione dei due morfotipi, risulta evidente una forte somiglianza, sia per i caratteri morfologici quali colore e superficie della micorriza, sia per quanto riguarda i più informativi caratteri anatomici, quali le strutture della micoclena a livello superficiale, intermedio e più interno. Da un'ulteriore comparazione effettuata tra le micorrize di *L. tesquorum* (su *Cistus*) e quelle di *L. intermedius* e *L. scrobiculatus* (rispettivamente su *Abies* e *Picea*), specie classificate da alcuni autori nella sottosezione *Scrobiculati* della sezione *Piperites* (BASSO, 1999),

risulta che i caratteri anatomico-morfologici tra i due gruppi di specie mostrano differenze piuttosto accentuate. Ciò può forse essere considerata una sorta di conferma della classificazione infragenerica proposta da HEILMANN-CLAUSEN *et al.* (1998), che pone i taxa *Piperites* e *Scrobiculati* in sezioni diverse, all'interno del sottogenere *Piperites*, contro lo schema di BASSO (1999) che posiziona invece i due gruppi insieme nella sezione *Piperites*.

Un'ulteriore indagine, per adesso effettuata solamente da un punto di vista morfo-anatomico dei tipi micorrizici, ha riguardato la sezione *Zonarii*, sottosezione *Zonarii*, alla quale appartengono tra le altre specie *L. evosmus* Kühner & Romagn., *L. zonarius* (Bull.) Fr., *L. porninsis* Rolland e *L. controversus* Pers.:Fr. Tra queste, sono già state caratterizzate le micorrize di *L. controversus* in associazione con *Populus alba* L. (JAKUCS, MAJOROS, 2001) e le micorrize di *L. porninsis* in associazione con *Larix decidua* Miller (TREU, 1990). L'aspetto più peculiare delle micorrize di *L. controversus* è la presenza di cristalli, forse di ossalato di calcio, sulla superficie del mantello. Cristalli probabilmente di uguale natura, ma con forme lievemente diverse, sono stati recentemente osservati anche sulle micorrize di *L. evosmus* in associazione con *Populus* sp., e *L. zonarius* in associazione con *Fagus sylvatica* (COMANDINI, dati non pubblicati). Si potrebbe considerare questo carattere una peculiarità che accomuna i lattari di questa sezione. Non sono ancora conosciuti i motivi della presenza di questi cristalli sulla micoclena delle micorrize, specialmente se si pensa che tali cristalli non sono presenti in nessuna parte dei corrispondenti carpofori. Un discorso a parte merita *L. porninsis*. Questa specie infatti, comunemente inclusa nella sezione *Zonarii* per la presenza di lattice bianco e peculiari caratteri microscopici, si discosta dagli altri membri

di questa sezione per il colore giallo-arancio vivo del cappello, il sapore mite e la sua associazione con *Larix* (*Pinaceae*), mentre la quasi totalità delle altre specie sono associate ad angiosperme. Sorprendentemente, sulla base di dati molecolari, tale specie sembrerebbe invece appartenere alla sezione *Deliciosi* (sinonimo di sezione *Dapetes*) (NUYTINCK, VERBEKEN, 2002). Da un sommario confronto tra le micorrize di *L. porninsis* con quelle degli altri *Zonarii* e quelle dei *Dapetes/Deliciosi*, risulta una maggiore similitudine con questi ultimi, similitudine che confermerebbe i dati molecolari (COMANDINI, dati non pubblicati).

Cristalli simili a quelli descritti poco sopra sono stati trovati anche sulla micoclena delle micorrize formate da *L. intermedius* su *Abies* (EBERHARDT *et al.*, 2000). La reale natura di questi cristalli è per ora sconosciuta, così come lo sono i motivi della loro presenza solo su micorrize formate da alcune specie del genere *Lactarius*. La formazione dei cristalli non sembra essere una caratteristica di un determinata pianta ospite, visto che tra i lattari associati ad *Abies alba*, solo *L. intermedius* li possiede. I cristalli sono forse dovuti a particolari caratteristiche edafiche? Perché tali cristalli si ritrovano nelle micorrize e non nei relativi carpofori? La distribuzione sistematica delle specie formanti cristalli coincide con alcune delle divisioni infrageneriche (ad esempio, la sezione *Zonarii*)? Se sì, perché in specie molto affini quali *L. intermedius* e *L. scrobiculatus* si trovano i cristalli solamente nelle micorrize formate dalla prima specie? Tali quesiti saranno oggetto di futuri studi ed approfondimenti da parte del nostro gruppo di ricerca.

CONCLUSIONE

A prescindere dai singoli risultati raggiunti, valutabili appieno solo da coloro interessati particolarmente al gruppo fungino trattato, riteniamo che l'importanza ed il significato generale di questa ricerca risiedano nel suo approccio multidisciplinare, che coinvolge specialisti per ogni settore considerato. La determinazione iniziale delle specie, punto di partenza fondamentale per l'ottenimento di risultati validi e comparabili, è stato affidato sin dall'inizio a ricercatori che da anni si occupano della sistematica e tassonomia del genere *Lactarius* a livello mondiale, fornendo una base di partenza certa sull'identità delle specie mano a mano considerate. Il coinvolgimento di biologi molecolari specializzati nello studio dei *Lactarius*, e quindi capaci di cogliere le problematiche inerenti alle notevoli variabilità inter- ed intra-specifiche, molto diffuse anche in micologia, ha permesso un'analisi critica ed efficace dei dati ottenuti. Lo studio delle caratteristiche morfo-anatomiche delle micorrize formate dalle varie specie di lattari, effettuato secondo le metodiche più moderne ed esaustive, ha fornito un inaspettato notevole contributo ed integrazione ai metodi classici di tassonomia e sistematica. Le evidenze sperimentali sin qui acquisite fungono dunque decisamente da sprone per l'uso dell'approccio multidisciplinare descritto per contribuire a chiarire gli aspetti ecologici e tassonomici del

genere *Lactarius* e, possibilmente, di altri importanti generi di macromiceti ectomicorrizici.

LETTERATURA CITATA

- AGERER R., 1991 - *Characterization of ectomycorrhiza*. In: NORRIS J.R. *et al.* (eds.), *Techniques for the study of mycorrhiza*. Methods Microbiol., 23: 25-73.
- BASSO M.T., 1999 - *Lactarius Pers. Fungi Europaei 7*. Alassio, Italy: Mykoflora. 845 pp.
- COMANDINI O., 1997 - *Ectomicorrize in abetine naturali ed artificiali del Gran Sasso*. Tesi Dottorato Sci. Ambientali: Ambiente e Uomo in Appennino, IX ciclo.
- COMANDINI O., LEONARDI M., RINALDI A.C., PACIONI G., VERBEKEN A., NUYTINCK J. - *Morpho-anatomical and molecular characterization of Lactarius tesquorum ectomycorrhizae on Cistus sp., and molecular phylogeny of related European Lactarius taxa* (in prep.).
- COMANDINI O., PACIONI G., RINALDI A.C., 1998 - *Fungi in ectomycorrhizal associations of silver fir (Abies alba Miller) in Central Italy*. Mycorrhiza, 7: 323-328.
- , 2001 - *An assessment of below-ground ectomycorrhizal diversity of Abies alba Miller in central Italy*. Plant Biosyst., 135 (3): 337-350.
- EBERHARDT U., 2002 - *Molecular kinship analyses of the agaricoid Russulaceae: correspondence with mycorrhizal anatomy and sporocarp features in the genus Russula*. Mycol. Prog., 1: 201-223.
- EBERHARDT U., OBERWINKLER F., VERBEKEN A., PACIONI G., RINALDI A.C., COMANDINI O., 2000 - *Lactarius ectomycorrhizae on Abies alba: morphological description, molecular characterization, and taxonomic remarks*. Mycologia, 92: 860-873.
- GARDES M., BRUNS T.D., 1993 - *ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts*. Mol. Ecol., 2: 113-118.
- GIOVANNETTI G., FONTANA A., 1982 - *Mycorrhizal synthesis between Cistaceae and Tuberaceae*. New Phytol., 92: 533-537.
- GODBOUT C., FORTIN J.A., 1985 - *Synthesised ectomycorrhizas of aspen: fungal genus level of structural characterisation*. Can. J. Bot., 63: 252-262.
- HEILMANN-CLAUSEN J., VERBEKEN A., VESTERHOLT J., - 1998. *The genus Lactarius*. vol. 2. *Fungi of Northern Europe*. Svampetryk: Danish Mycological Society. 287 pp.
- HUTCHISON L.J., 1999 - *Lactarius*. In: CAIRNEY J.W.G., CHAMBERS S.M. (eds.), *Ectomycorrhizal fungi: key genera in profile*. 269-285. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- INGLEBY K., MASON P.A., LAST F.T., FLEMING L.V., 1990 - *Identification of ectomycorrhizas*. London, UK: Institute of Terrestrial Ecology Research, Publ. 5, HMSO. 112 pp.
- JAKUCS E., MAJOROS E., 2001 - *Lactarius controversus Pers. + Populus alba L.* In: AGERER R. *et al.* (eds.), *Descriptions of ectomycorrhizae 5*: 55-59.
- KÜHNER R., ROMAGNESI H., 1954 - *Compléments à la "flore analytique" II. Espèce nouvelles ou critiques de Lactarius*. Bull. Trimest. Soc. Mycol. Fr., 69: 361-388.
- MILLER S.L., BUYCK B., 2002 - *Molecular phylogeny of the genus Russula in Europe with a comparison of modern infrageneric classifications*. Mycol. Res., 106: 259-276.
- MILLER S.L., MCLEAN T.M., WALKER J.F., BUYCK B., 2001 - *A molecular phylogeny of the Russulales including agaricoid, gasteroid and pleurotoid taxa*.

- Mycologia, 93: 344-354.
- NUYTINCK J., VERBEKEN A., 2002 - *Morphological and molecular study of Lactarius section Deliciosi in Europe*. Proc. 7th Int. Mycol. Congr. Oslo, 11-17 August 2002: 223.
- PETER M., BUCHLER U., AYER F., EGLI S., 2001 - *Ectomycorrhizas and molecular phylogeny of the hypogeous russuloid fungus Arcangeliella borziana*. Mycol. Res., 105: 1231-1238.
- TREU R., 1990 - *Charakterisierung und Identifizierung von Ektomykorrhizen aus dem Nationalpark Berchtesgarden*.

Bibl. Mycol., 134: 1-196

RIASSUNTO - Si sono condotti, negli ultimi anni, alcune ricerche con l'obiettivo di contribuire alla conoscenza sulla distribuzione, ecologia, filogenesi e diversità micorrizica di alcune specie di *Lactarius* europei associati a determinate specie arboree o arbustive di particolare valenza ecologica. Per tali ricerche si è adottato un approccio multidisciplinare integrando dati morfologici e molecolari ottenuti sia dai carpofori che dalle micorrize da essi formate.

AUTORE

Ornella Comandini, Dipartimento di Scienze Ambientali, Università dell'Aquila, Via Vetoio, Loc. Coppito I-67100, L'Aquila, Italy, e-mail: comandin@univaq.it

Caratterizzazione biologica e molecolare di microfunghi isolati da comunità criptoendolitiche in Antartide

L. SELBMANN, S. DE HOOG, A. MAZZAGLIA e S. ONOFRI

ABSTRACT - *Biological and molecular characterization of microfungi isolated from Antarctic cryptoendolithic communities* - The taxonomic position of some meristematic black fungi isolated from Antarctic cryptoendolithic communities was studied sequencing the SSU and ITS fragments. Biological characterization was carried out studying temperature and cultural preferences. Morphological analysis was performed with both light and scanning microscope. Studies of molecular taxonomy indicated that all microfungi are in two different groups in the *Dothideales*.

Key words: Antarctica, black meristematic fungi, cryptoendolithic communities, molecular taxonomy

INTRODUZIONE

Il Deserto di Ross in Antartide (McMurdo Dry Valleys) è l'ambiente deglaciato più freddo ed arido del pianeta e le superfici del suolo e delle rocce raramente sono colonizzate da forme di vita visibile.

In questa area, per lungo tempo considerata sterile ad esclusione di poche ristrette zone, è stata scoperta una forma di vita microbica che colonizza la porosità delle rocce arenarie (FRIEDMANN, 1982). Questi organismi, che vivono al limite estremo del loro potenziale biologico, rappresentano una delle forme di vita più estreme ad oggi conosciute. In uno spessore di circa 10 mm al di sotto della superficie della roccia, questi microrganismi formano delle vere e proprie comunità dette "comunità criptoendolitiche". Tra queste la più diffusa è la "comunità dominata dai licheni", recentemente descritta anche in rocce di tipo vulcanico (ONOFRI, FRIEDMANN, 1998). Molti microfunghi facenti parte di queste comunità, sono stati isolati da campioni raccolti in circa 20 anni di spedizioni antartiche. Molti di essi somigliano morfologicamente ai gruppi dei funghi meristemati neri e dei lieviti neri (STERFLINGER *et al.*, 1999). Pochi dati sono disponibili su questi isolati e nessuno di essi, eccetto *Friedmanniomyces endolithicus* Onofri, descritto come nuovo genere e nuova specie (ONOFRI *et al.*, 1999), è stato ad oggi identificato. Questi organismi, vissuti in isolamento genetico per milioni di anni, sono estremamente interessanti da studiare al fine di chiarire la loro posizione tassonomica nel Regno dei Funghi. La classificazione

dei funghi meristemati neri risulta però estremamente difficoltosa su sole basi morfologiche, in quanto questi organismi risultano essere tra loro omogenei e poco differenziati: quindi si è resa necessaria un'indagine di tipo molecolare.

MATERIALI E METODI

Ceppi analizzati

I ceppi analizzati, conservati nella "Culture Collection of Fungi from Extreme Environments" (CCFEE, Viterbo), sono elencati in Tab. 1. Le colture sono state conservate su MEA (Malt extract 20 g/l e agar 15 g/l) a 5°C e rinnovate ogni 8-12 mesi.

Caratteristiche culturali

La crescita delle colonie è stata osservata su Potato Dextrose Agar (PDA, Oxoid); Malt Extract Agar (MEA, Biokar Diagnostics-Beauvais-France), Oat Meal Agar (OA) e Czapek dox (CZA, Oxoid) su piastre Petri. L'incubazione è stata effettuata a 10°C per i ceppi *Friedmanniomyces* sp. CCFEE 5001 e *Friedmanniomyces endolithicus* 5208 ed a 20°C per i ceppi di fungo nero non identificato CCFEE 453, 456, 514, 515 e 5187. Tutti i microfunghi sono stati incubati per almeno 1 mese.

Preferenze termiche

I microfunghi sono stati inoculati su MEA in piastre Petri e sono stati incubati a 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30°C per circa 60 gg.

TABELLA 1

Elenco dei ceppi testati, relativa numerazione CCFEE e provenienza dei campioni antarctici dai quali sono stati isolati.
List of the strains tested with CCFEE numbers and the sites of Antarctic samples collection.

Ceppi	CCFEE	Sito
<i>Friedmanniomyces</i> sp.	5001	Timber Peak
<i>Friedmanniomyces endolithicus</i>	5208	Widowmaker Pass-Olson Nunatak
Fungo nero non identificato	453	Linnaeus Terrace
Fungo nero non identificato	456	Dry Valleys
Fungo nero non identificato	514	Linnaeus Terrace
Fungo nero non identificato	515	Linnaeus Terrace
Fungo nero non identificato	5187	Battleship Promontory

Morfologia

Tutti gli isolati analizzati, in base alle loro caratteristiche morfologiche, sono stati divisi in due gruppi: nel primo sono stati inclusi i due ceppi CCFEE 5001 e CCFEE 5208 che presentavano le caratteristiche già descritte per *Friedmanniomyces* Onofri, nel secondo sono stati inclusi i ceppi CCFEE 453, 456, 514, 515 e 5187 (funghi neri non identificati) con caratteristiche morfologiche tra loro omogenee e ben distinte dall'altro gruppo. Studi morfologici approfonditi sono stati condotti sui due ceppi CCFEE 5208 e CCFEE 453 rappresentativi per ciascun gruppo. La morfologia dei microfunghi è stata osservata attraverso la preparazione di microcolture su MEA, i vetrini sono stati montati in lattofenolo ed osservati al microscopio ottico. Per le osservazioni al SEM i campioni sono stati preparati secondo le procedure utilizzate da ONOFRI *et al.* (1980).

Biologia molecolare

Le colture sono state fatte crescere in tubi a becco di clarino contenenti MEA per il tempo necessario ad un buono sviluppo. Circa 100-150 mg di biomassa sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA. L'estrazione è stata effettuata utilizzando il kit di estrazione NucleoSpin® Plant, Genenco. L'amplificazione è stata effettuata utilizzando il kit puRe Taq™Ready-To-Go™PCR Beads Amersham Pharmacia Biotech, aggiungendo alle beads 23 µl di H₂O distillata sterile, 1 µl di ciascun primer (5 picomoli) ed 1 µl di DNA stampo alla opportuna concentrazione (circa 10 ng). Per l'amplificazione del DNA ribosomiale 18S, 5.8S e delle regioni ITS sono stati utilizzati i seguenti primers (WHITE *et al.*, 1990):

- NS1 (5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3')
- NS2 (5'-GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC-3')
- NS3 (5'-GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC-3')
- NS4 (5'-CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG-3')
- NS5 (5'-AACTTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3')
- NS8 (5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3')
- ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')
- ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')

In alcuni casi per l'amplificazione delle regioni ITS sono stati utilizzati primers con particolare specifici-

tà per gli ascomiceti (LARENA *et al.*, 1999):

- ITS5 (5'-GCA TAT CAA TAA GCC GGAGGA-3')
- ITS4A (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3')

I cicli di amplificazione sono stati così programmati: una iniziale denaturazione a 95°C per 3' seguita da 35 cicli consistenti a loro volta in una denaturazione a 95°C per 30", ancoraggio dei primers (annealing) a 55°C per 30" ed una estensione a 72°C per 32" ed un ciclo finale di estensione a 72°C per 5'.

Le reazioni di sequenziamento sono state effettuate con il metodo dei dideossinucleotidi tramite un sequenziatore ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer Perkin-Elmer. L'analisi e la correzione delle sequenze è stata effettuata utilizzando il programma CHROMAS.

Confronto delle sequenze

La ricerca in EMBL (European Molecular Biology Laboratory) è stata effettuata utilizzando il programma FASTA 3 per verificare i più alti gradi di omologia.

RISULTATI

Caratteristiche culturali

Tutti i microfunghi analizzati presentavano una crescita piuttosto lenta, in particolare i due ceppi appartenenti al genere *Friedmanniomyces* presentavano uno sviluppo appena percettibile dopo 1 mese di incubazione. Tutti i ceppi fungini erano in grado di accrescersi ugualmente su PDA, MEA e OA, mentre lo sviluppo su CZA era piuttosto stentato in tutti i casi (Figg. 1, 2).

Preferenze termiche

I ceppi CCFEE 453, 456, 514, 515 e 5187, erano in grado di crescere in un range di temperature compreso tra 0 e 25 °C anche se lo sviluppo a 0 e 25°C avveniva in modo molto stentato. La temperatura ottimale di crescita è stata registrata tra i 15 ed i 20°C. Il range di temperature entro il quale *Friedmanniomyces* sp. CCFEE 5001 e *F. endolithicus* CCFEE 5208 hanno mostrato crescita è, invece, più ristretto e compreso tra i 5 ed i 15°C con un optimum a 10°C.

Morfologia

All'osservazione macroscopica tutti i ceppi mostrava-

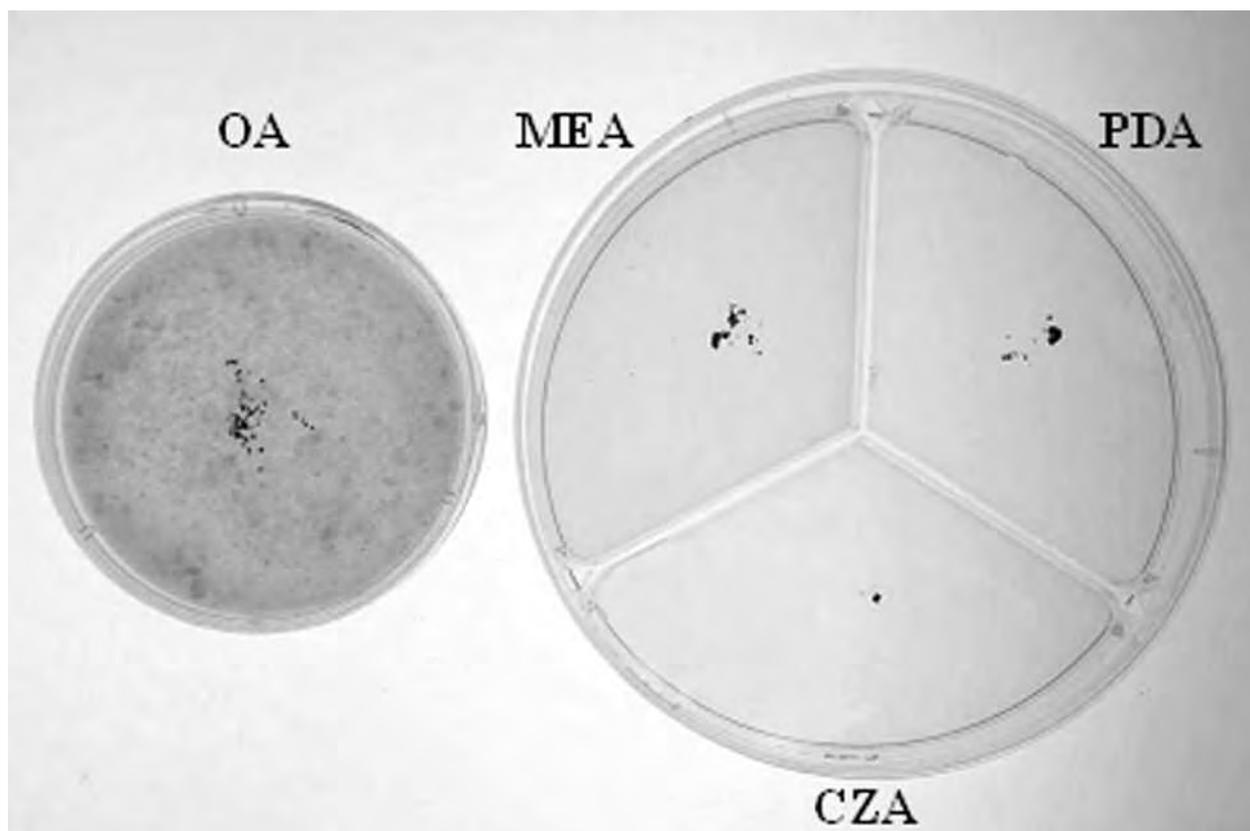


Fig. 1

Friedmanniomyces endolithicus CCFEE 5208 coltivato su terreni differenti alla temperatura di 10 °C dopo 30 gg di incubazione. PDA: Potato Dextrose Agar; CZA: Czapek Dox Agar; MEA: Malt Extract Agar; OA: Oat Meal Agar.

Friedmanniomyces endolithicus CCFEE 5208 cultured on different media at 10 °C after 30 d of incubation. PDA: Potato Dextrose Agar; CZA: Czapek Dox Agar; MEA: Malt Extract Agar; OA: Oat Meal Agar.

no colonie scure, cerebriformi con crescita tridimensionale e margini piuttosto irregolari (Figg. 1, 2).

CCFEE 5208: sia al microscopio ottico che al SEM questo microfungo presentava tutte le caratteristiche principali descritte per la specie *F. endolithicus* (ONOFRI *et al.*, 1999) ovvero un accrescimento sia filamentoso che meristemoide (Fig. 3a), produzione di conidi multicellulari (Figg. 3e, f), bicellulari ed unicellulari (Fig. 3b) capacità di sviluppo enteroblastico (Fig. 3f) e secessione dei conidi di tipo schizolitico (Fig. 3c, d).

CCFEE 453: sia al microscopio ottico che al SEM questo microfungo presentava un'organizzazione prevalentemente lievitiiforme (Fig. 4a, b) con cellule a parete molto ispessita (Fig. 4c), rugosa e con uno sviluppo di tipo enteroblastico (4a, b). Entrambi i ceppi mostravano una cospicua produzione di sostanze polimeriche extracellulari (Figg. 3c, f; 4a, b).

Studio molecolare

Gli studi di tassonomia molecolare hanno indicato che i ceppi CCFEE 5001 e CCFEE 5208, appartenenti morfologicamente al genere *Friedmanniomyces* (ONOFRI *et al.*, 1999), presentano una pari ed alta omologia (99,062%) con il fungo lichenicolo

Hobsonia santessonii nell'ordine delle *Dothideales*. I ceppi CCFEE 453, 456, 514, 515 e 5187, morfologicamente identici, si situano sempre all'interno delle *Dothideales*.

DISCUSSIONE

In questo lavoro sono stati analizzati alcuni funghi neri meristemati isolati da campioni di roccia raccolti nella Terra Vittoria in Antartide. Tra i microfunghi saggati, i ceppi *Friedmanniomyces* sp. CCFEE 5001 e *Friedmanniomyces endolithicus* 5208 hanno mostrato una velocità di crescita molto minore rispetto all'altro gruppo morfologicamente distinto. Tenendo conto delle temperature ottimali di accrescimento, è comunque possibile affermare che tutti i ceppi saggati sono da considerarsi psicrofili. I due ceppi di *Friedmanniomyces*, infatti, avendo un optimum di crescita compreso tra 10 e 15°C rientrano perfettamente nei limiti indicati da MORITA (1975) per gli organismi procarioti. Secondo tale definizione, psicrofilo è un organismo che presenta un optimum di crescita alla temperatura di 15°C o inferiore e che è in grado di crescere in un range compreso tra 0 e 20°C. L'estrema lentezza di accrescimento

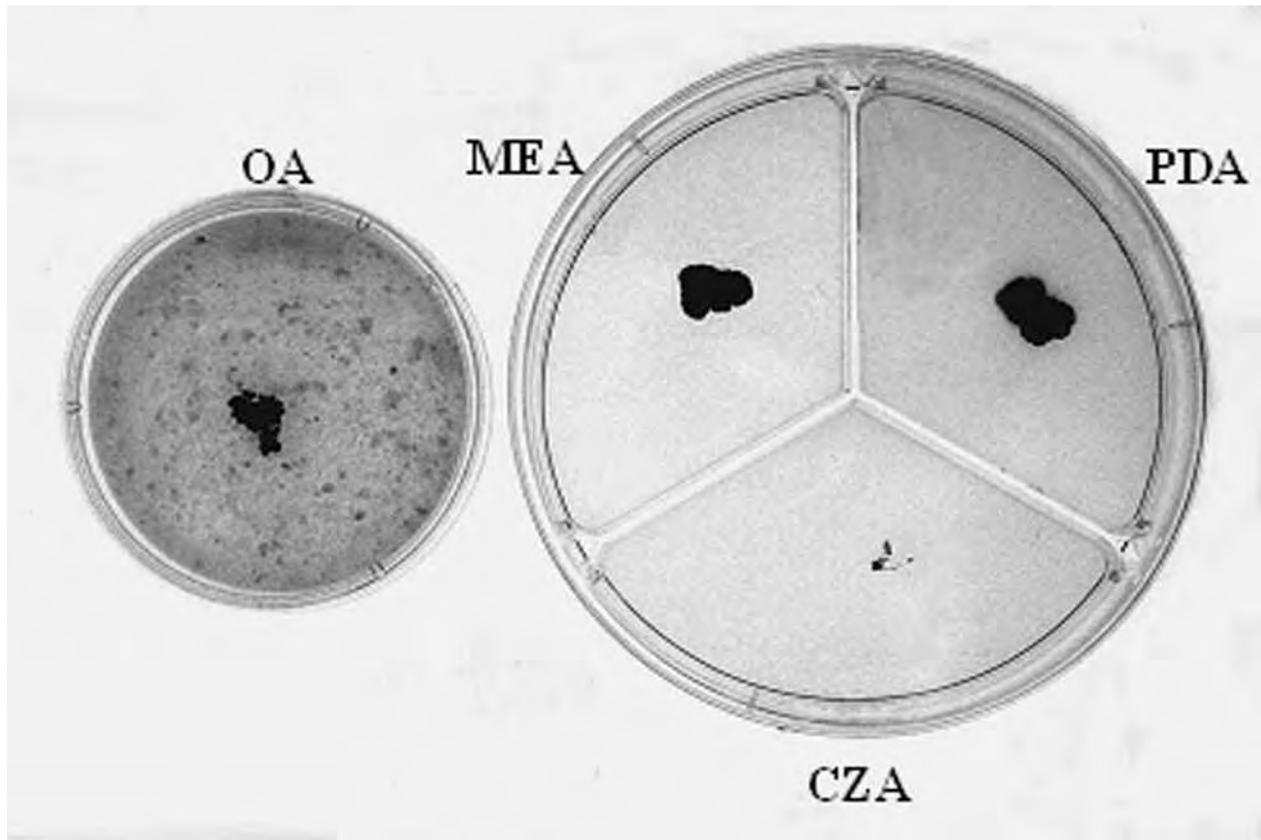


Fig. 2

Fungo nero non identificato CCFEE 453 coltivato su terreni differenti alla temperatura di 20 °C dopo 30 gg di incubazione. PDA: Potato Dextrose Agar; CZA: Czapek Dox Agar; MEA: Malt Extract Agar; OA: Oat Meal Agar
 Undetermined black fungus CCFEE 453 cultured on different media at 20 °C after 30 d of incubation. PDA: Potato Dextrose Agar; CZA: Czapek Dox Agar; MEA: Malt Extract Agar; OA: Oat Meal Agar.

mostrata da questi due organismi potrebbe essere il motivo per il quale non è stata registrata crescita a 0 °C dopo 60 gg di incubazione. È possibile, infatti, che essi siano ancora in grado di svilupparsi ma la crescita non sia ancora percettibile. Il comportamento a diverse temperature dei ceppi di fungo nero non identificato CCFEE 453, 456, 514, 515 e 5187, rientra, invece, nella definizione di psicrofilo data per i lieviti da VAN UDEN (1984) e VISHNIAC (1987) ed estesa a tutti gli organismi eucarioti da NIENOW e FRIEDMANN (1993). Per tali organismi la temperatura limite alla quale possono ancora accrescersi, infatti, è di 25°C. Le preferenze termiche registrate per questi microfunghi contrastano con quanto finora osservato per altri microfunghi antartici che sono spesso mesofili psicrotolleranti (ZUCCONI *et al.*, 1996; ONOFRI, 1999). Questo comportamento può essere facilmente spiegato se si considera che questi organismi colonizzano microhabitat in cui le temperature minime e, soprattutto, massime sono inferiori a quelle presenti in altre zone deglacciate costiere. L'accrescimento meristemoide è già stato interpretato come adattamento a condizioni ambientali stressanti (STERFLINGER *et al.*, 1999), ed essendo una

caratteristica tipica di questi funghi può essere facilmente messa in correlazione alla sopravvivenza in condizioni ambientali tanto sfavorevoli sia per quel che riguarda le temperature sia la disponibilità d'acqua.

Sia dalle foto al microscopio ottico che al SEM è stato possibile osservare che tutti i ceppi mostravano una cospicua produzione di sostanze polimeriche extracellulari; produzioni simili, costituite da polisaccaridi, sono state osservate in altri funghi delle rocce ed interpretate come protezione dai danni da disseccamento (URZI *et al.*, 1991; URZI, REALINI, 1998). Anche in questo caso, considerando l'ambiente colonizzato da questi organismi, tali molecole potrebbero avere un coinvolgimento diretto nella protezione contro il disseccamento e di resistenza ai continui processi di congelamento e scongelamento cui questi microfunghi si trovano sottoposti (SELBMANN *et al.*, 2002).

Tutti i ceppi analizzati si situano nell'ordine *Dothideales*. Ben diversa è la situazione per altri funghi meristemati neri che colonizzano le rocce di ambienti diversi, i quali, appartenendo almeno a tre diversi ordini negli Ascomyceti, precisamente

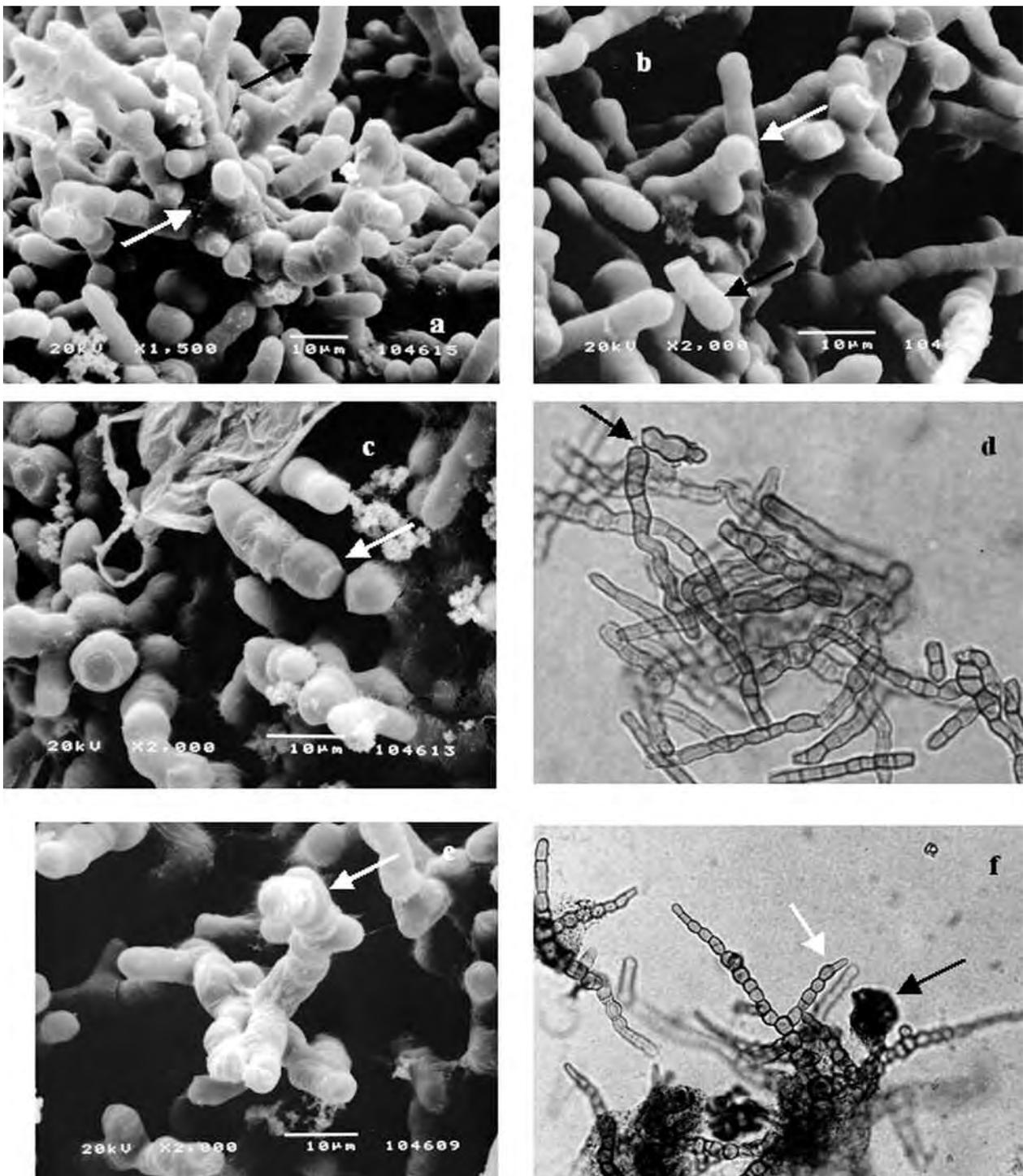


Fig. 3

Friedmanniomyces endolithicus. CCFEE 5208; a (SEM): accrescimento meristemoido (freccia bianca) ed ifale (freccia nera); b (SEM): conidio bicellulare (freccia nera) e monocellulare (freccia bianca); c (SEM) e d: secessione schizolitica; e (SEM): conidio multicellulare in fase iniziale di formazione; f: conidio multicellulare (freccia nera) ed allungamento enteroblastico (freccia bianca).

Friedmanniomyces endolithicus. CCFEE 5208; a (SEM): meristematic (white arrow) and hyphal growth (black arrow); b (SEM): 2-celled conidium (black arrow) and 1 celled conidium (white arrow); c (SEM) and d: schizolitic secession (arrows); e (SEM): multicellular conidium at the first stage of growth; f: multicellular conidium (black arrow) and enteroblastic elongation (white arrow).

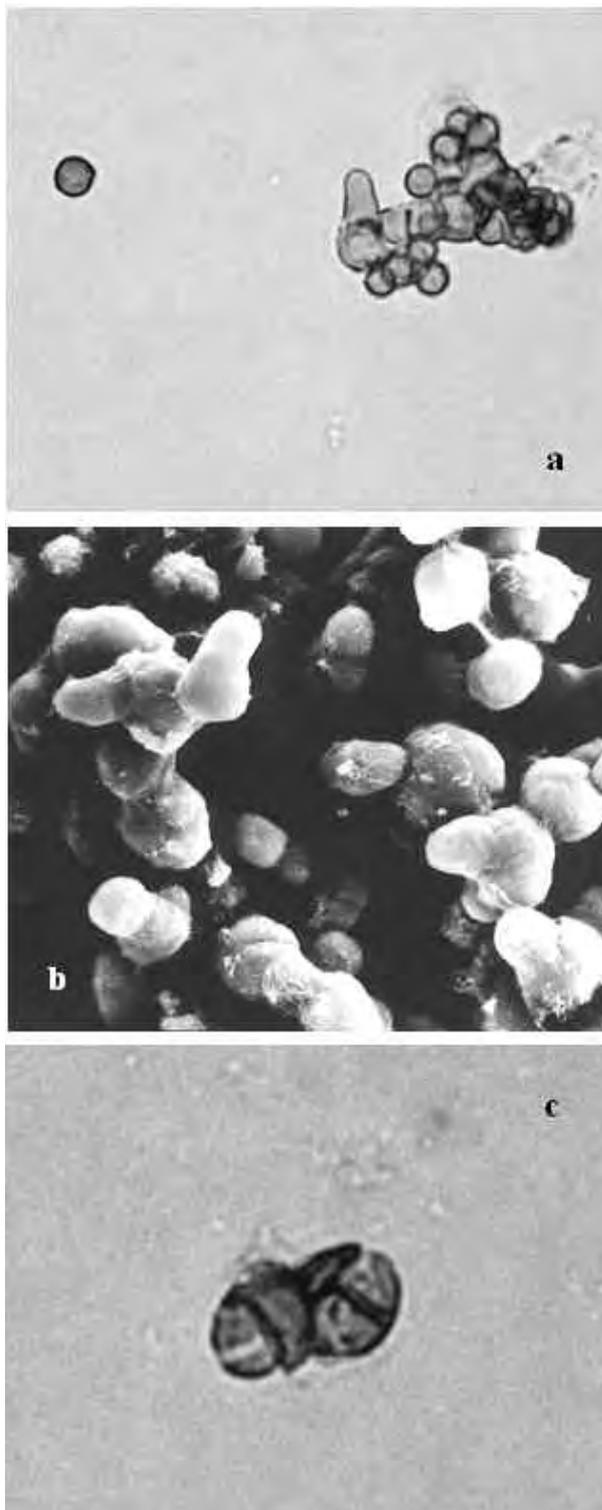


Fig. 4

Fungo nero non identificato CCFEE 453; a, b (SEM): crescita lievito-simile e germinazione di tipo enteroblastico; c: propaguli con parete esterna ispessita. Undetermined black fungus CCFEE 453; a, b (SEM): yeast-like and enteroblastic germination; c: thick-walled cells.

Dothideales, *Chaetotiriales* e *Pleosporales*, (STERFLINGER *et al.*, 1999; STERFLINGER, 2000; STERFLINGER, PRILLINGER, 2001), hanno invece, un'origine polifiletica. Ovviamente tale osservazione dovrà trovare conferma in ulteriori studi molecolari su altri isolati da queste comunità antartiche.

LETTERATURA CITATA

- DE RIJK P., DE WACHTER R., 1993 - *DCSE, an interactive tool for sequence alignment and secondary structure research*. *Comput. Appl. Biosci.*, 9: 735-740.
- FRIEDMANN E.I., 1982 - *Endolithic microorganisms in the Antarctic cold desert*. *Science*, 215: 1045-1053.
- LARENA I., SALAZAR O., GONZÁLEZ V., JULIÁN M.C., RUBIO V., 1999 - *Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes*. *J. Biotechnol.*, 75: 187-194.
- MORITA R.Y., 1975 - *Psychrophilic bacteria*. *Bacteriol. Rev.*, 39: 144-167.
- NIENOW J.A., FRIEDMANN, E.I., 1993 - *Terrestrial lithophytic (rock) communities*. In: FRIEDMANN E.I. (ed.), *Antarctic microbiology*: 343-412. Wiley-Liss, New York.
- ONOFRI S., 1999 - *Antarctic microfungi*. In: SECKBACH J. (ed.), *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments*: 323-336. Kluwer Academic Publishers.
- ONOFRI S., CASTAGNOLA M., ROSSI ESPAGNET S., 1980 - *L'impiego della microscopia elettronica a scansione in micologia*. *Micol. Ital.*, 1: 29-32.
- ONOFRI S., FRIEDMANN E.I., 1998 - *Cryptoendolithic microorganisms in sandstone and pegmatite in the northern Victoria Land*. In: TAMBURRINI M., D'AVINO R. (eds.), *Newsletters of the Italian Biological research in Antarctica*, 2: 45-51. Camerino University Press, Camerino.
- ONOFRI S., PAGANO S., ZUCCONI L., TOSI S., 1999 - *Friedmanniomyces endolithicus* (Fungi, Hyphomycetes), *anam.-gen. and sp. nov., from continental Antarctica*. *Nova Hedwigia*, 68: 175-181.
- SELBMANN L., ONOFRI S., FENICE M., FEDERICI F., PETRUCCIOLI M., 2002 - *Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus Phoma herbarum CCFEE 5080*. *Res. Microbiol.*, 153: 585-592.
- STERFLINGER K., 2000 - *Fungi as geologic agents*. *Geomicrobiol. J.*, 17: 97-124.
- STERFLINGER K., DE HOOG G.S., HAASE G., 1999 - *Phylogeny and ecology of meristematic Ascomycetes*. *Stud. Mycol.*, 43: 5-22.
- STERFLINGER K., PRILLINGER H., 2001 - *Molecular taxonomy and biodiversity of rock fungal communities in an urban environment (Vienna, Austria)*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 80: 275-286.
- URZI C., LISI S., CRISEO G., PERNICE A., 1991 - *Adhesion to and degradation of marble by Micrococcus strain isolated from it*. *Geomicrobiol. J.*, 9: 81-90.
- URZI C., REALINI M., 1998 - *Colour changes of Noto's calcareous sandstone as related to its colonisation by microorganisms*. *Int. Biodet. Biodegr.*, 42: 45-54.
- VAN UDEN N., 1984 - *Temperature profiles of yeasts*. *Adv. Microb. Physiol.*, 25: 195-251.
- VISHNIAC H.S., 1987 - *Psychrophily and systematics of yeast-like fungi*. In: DE HOOG G.S. *et al.* (eds.), *The expanding Realm of yeast-like fungi*, *Stud. Mycol.*, 30: 389-402. Elsevier, Amsterdam.

- WHITE T.J., BRUNS T., LEE S.B., TAYLOR J.W., 1990 - *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics*. In: INNIS M.A. et Al. (eds.), *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*: 315-322. Academic Press, San Diego, USA.
- ZUCCONI L., PAGANO S., FENICE M., SELBMANN L., TOSI S. ONOFRI S., 1996 - *Growth temperature preferences of fungal strains from Victoria Land, Antarctica*. *Polar Biol.*, 16: 53-61.

RIASSUNTO - La posizione tassonomica di alcuni funghi meristemati neri isolati da comunità criptoendolitiche in Antartide è stata studiata attraverso il sequenziamento dei frammenti SSU ed ITS di rDNA. La caratterizzazione biologica ha previsto studi di preferenze termiche e culturali. La caratterizzazione morfologica è stata effettuata con osservazioni al microscopio ottico ed al SEM. Gli studi di tassonomia molecolare hanno consentito di collocare questi microfunghi in due gruppi ben separati nell'ordine delle *Dothideales*.

AUTORI

Laura Selbmann, Silvano Onofri, Dipartimento di Scienze Ambientali Università della Tuscia, Largo dell'Università, 01100 Viterbo (I)
Sybrén de Hoog, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Uppsalalaan 83584 CT, Utrecht (The Netherlands)
Angelo Mazzaglia, Dipartimento di Protezione delle Piante, Università della Tuscia, Via San Camillo de Lellis, 01100 Viterbo (I)

Funghi meristemati isolati da monumenti medievali

S. FLORIO, F. DE LEO, G. DAMIANI, E. SAVINO e C. URZÌ

ABSTRACT - *Meristematic fungi isolated from medieval monuments* - Italy is full of historical monuments left to their natural corrosion. They can be an ideal substrate for fungi, in particular for dematiaceous meristematic ones that seem to be involved in the biodeterioration of lithic artifacts.

Key words: fungi, Italy, monuments, Valle d'Aosta

INTRODUZIONE

Nell'ambito del fenomeno del degrado delle opere d'arte, problema che nel nostro paese assume proporzioni rilevanti per la vastità del patrimonio artistico, da alcuni anni viene posto l'accento sul cosiddetto biodeterioramento. I beni culturali costituiscono un numero ampio di substrati su cui sono presenti un elevato numero di specie microbiche. Queste infatti, presenti in ogni *habitat* anche il più estremo, sono in grado di colonizzare tutti i tipi di manufatti sia organici quali pelli, pergamene, legni, carte, tessili, che inorganici quali pietre, ceramiche, vetri, malte e metalli. L'azione dei microrganismi sul manufatto può comportare sia danni di natura strutturale, sia danni di natura estetica (CIFERRI *et al.*, 2000).

Da tempo è riconosciuto che tra gli agenti primari del biodeterioramento dei manufatti lapidei assieme ai microrganismi autotrofi associati alla formazione di incrostazioni, chiazze, esfoliazioni e polverizzazioni, vi sono gli organismi eterotrofi, quali i funghi, considerati nel passato agenti di importanza del tutto secondaria. Le azioni chimico-meccaniche esercitate da questi organismi comportano variazioni tessiture con formazione di reticolati di discontinuità (pori, fratture ecc.) che possono essere sede di un ulteriore impianto di biodeteriogeni (URZÌ *et al.*, 2000). I funghi che colonizzano la roccia (rock inhabiting fungi) possono ricondursi in due principali gruppi ecologici: i comuni funghi epifiti e del suolo, e i funghi meristemati che formano microcolonie nere sulle superfici e nelle porosità del materiale lapideo. Si ricorda che con il termine meristematico si definisce uno specifico *pattern* di crescita, presente soprattutto quando gli organismi si sviluppano in condi-

zioni di stress e in ambienti estremi. La crescita meristematica, che può anche rappresentare l'unica modalità di crescita, è caratterizzata dalla produzione di gonfie cellule isodiametriche con una spessa parete in cui la melanina è comunemente depositata. Dal punto di vista metabolico, gli organismi rimangono attivi per lunghi periodi di tempo anche in condizioni di scarsità di nutrienti. Anche alcuni funghi, appartenenti agli *Ascomycota* e riconducibili almeno agli ordini delle *Chaetothyriales*, *Dothideales* e *Pleosporales* (STERFLINGER, PRILLINGER, 2001), sono caratterizzati da questo tipo di crescita.

Recentemente, sebbene fosse già nota la loro capacità colonizzatrice di pietre e rocce (STALEY *et al.*, 1982), tali funghi sono stati evidenziati e isolati su monumenti di interesse artistico e l'attenzione degli studiosi si è rivolta principalmente a questi piuttosto che ai demaziacei in generale. Poiché nei funghi meristemati non è stata, per ora, rilevata nessuna produzione di acidi, documentata ampiamente invece per alcuni ifomiceti colonizzatori di materiale lapideo, si ritiene che la penetrazione nella roccia sia per lo più imputabile ad una azione meccanica piuttosto che ad un'azione chimica. La conseguenza della loro crescita e proliferazione è comunque il danneggiamento del materiale soprattutto dal punto di vista estetico (STERFLINGER, PRILLINGER, 2001).

Per le difficoltà di isolamento e di identificazione la presenza dei funghi meristemati su materiali lapidei è stata finora sicuramente sottostimata (URZÌ *et al.*, 2000); da non trascurare inoltre che tutti i materiali nerastri presenti su manufatti lapidei sono stati interpretati, nel passato, come polveri atmosferiche o sporcizia (WOLLENZIEN *et al.*, 1995).

I dati bibliografici sui meristemati isolati da materiale lapideo sono sostanzialmente riconducibili a isolamenti effettuati da rocce nel deserto dell'Arizona (STALEY *et al.*, 1982), in Antartide (NIENOW, FRIEDMANN, 1993; ASCASO *et al.*, 2002), in Sud Africa (BÜDEL *et al.*, 2000) in Israele (GORBUSHINA *et al.*, 2002) e da monumenti del nord Europa (STERFLINGER, PRILLINGER, 2001), della Crimea (Ucraina) e dell'area Mediterranea (STERFLINGER, GORBUSHINA, 1997; WOLLENZIEN *et al.*, 1997; DE LEO *et al.*, 1999).

MATERIALI E METODI

Sono state campionate 11 pietre ripartite in tre diversi monumenti medioevali, non restaurati di recente, situati in Valle d'Aosta, area definita a clima semi-continentale (PIERVITTORI, MAFFEI, 2001). Le sedi campionate sono situate in zone con basso inquinamento atmosferico, come testimoniato dagli indici di biodiversità lichenica (VALCUVIA M., comunicazione personale).

I ceppi fungini sono stati isolati utilizzando la metodica della diluizione in piastre e degli aghi sterili seminati in capsule Petri contenenti adatti terreni di crescita (DRBC e MEA 2%) (WOLLENZIEN *et al.*, 1995). Le piastre sono state incubate a 20°C e osservate periodicamente ad intervalli di 7 giorni fino a 2 mesi. I funghi filamentosi e i lieviti neri isolati sono stati identificati utilizzando di volta in volta le chiavi analitiche più accreditate (ELLIS, 1971, 1976; DOMSH *et al.*, 1980; GAMS, 1971; DE HOOG, HERMANIDES-NIJHOF, 1977). Lo studio dei funghi che presentavano esclusivamente la crescita meristemica è stato effettuato sia mediante tecniche classiche che di tipo molecolare. A tale scopo sono stati utilizzati diversi terreni agarizzati (PDA, OA, MEA 2%, CZ) per la caratterizzazione macroscopica delle colonie, e la coltura su vetrino per quella microscopica delle strutture di riproduzione. Per ogni ceppo meristemico isolato sono state allestite più colture su vetrino in parallelo e ciascuna è stata montata, con lattofenolo, ad intervalli regolari a partire dai sette giorni fino a sessanta; l'osservazione è avvenuta al microscopio ottico.

Per l'estrazione del DNA i funghi sono stati inoculati in terreno liquido (Malt Extract 2%) e filtrati su carta WHATMAN n°4, mediante pompa a vuoto. Dal materiale ottenuto si è proceduto all'estrazione del DNA (Dneasy Plant Mini Kit- Quiagen Hilden, Germany) previa rottura meccanica del materiale fungino con l'utilizzo di un pestello in seguito a congelamento con azoto liquido. Si è proceduto poi all'amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) del DNA che codifica per la regione ribosomiale 18S e digestione con un *pattern* di 5 enzimi (DE LEO *et al.*, 1999). Dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio, i *pattern* elettroforetici ottenuti sono stati confrontati con quelli di funghi meristemati presenti nella banca dati del Dipt. di Scienze Microb. Gen e Mol. di Messina (Italy).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Complessivamente sono state isolate 17 specie fungine appartenenti a 14 generi, 5 diversi morfotipi con crescita meristemica, lieviti bianchi, miceli con unione a fibbia e miceli sterili (FLORIO *et al.*, 2002). Tra le specie filamentose si segnalano *Alternaria alternata*, *Aspergillus* spp., *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium* spp., *Ulocladium consortiale*, funghi a distribuzione ubiquitaria, per lo più saprotrofi di piante e materiale vegetale, ma che vengono comunemente reperiti anche da materiali lapidei. Tra i funghi isolati, inoltre, è stata riscontrata l'occasionale presenza di *Exophiala* sp. più volte segnalata su materiali lapidei (SAIZ-JIMENEZ, 1995; WOLLENZIEN *et al.*, 1995; URZÌ *et al.*, 2000; STERFLINGER, PRILLINGER, 2001). Anche questo *taxon*, pleomorfo e caratterizzato da conidiogenesi anellidica, è un normale costituente della microflora saprotrofa di piante e materiale vegetale, ed è stato studiato principalmente in quanto implicato in patologie umane quali la cromomicosi (DOMSCH *et al.*, 1980; DE HOOG *et al.*, 2000).

I funghi meristemati isolati rappresentano il 25% degli isolamenti totali. In base alle caratteristiche morfologiche (macro e microscopiche) i ceppi sono stati suddivisi in 5 diversi gruppi. L'aspetto morfologico più frequente è rappresentato da un micelio "toruloso" con la presenza di caratteristiche cellule ingrossate con setti longitudinali e trasversi intercalari nel micelio più vecchio o libere (Fig. 1).

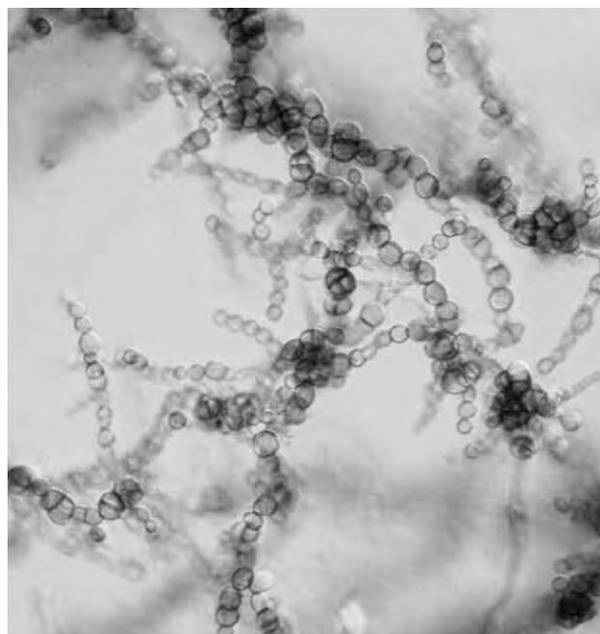


Fig. 1

Crescita meristemica del morfotipo isolato più frequentemente (400x).

Meristematic growth of morphotype more frequently isolated (400x).

In generale l'identificazione dei funghi meristemati risulta particolarmente difficoltosa e lontana dagli approcci sperimentali classici. A causa della loro particolare modalità di crescita, infatti, non è possibile basarsi solo sulle loro caratteristiche morfologiche; inoltre l'utilizzo di chiavi diagnostiche basate su profili biochimici e fisiologici risulta difficoltoso a causa dell'estrema versatilità metabolica e dell'esigua quantità di biomassa prodotta da questi funghi (URZÌ *et al.*, 2000). Da qualche anno, perciò, l'identificazione dei funghi meristemati prevede anche l'utilizzo di tecniche molecolari come la RFLP (*Restriction Length Fragment Polimorfism*) o il sequenziamento di rDNA e *interspacers*. A questo scopo si amplificano i frammenti del DNA ribosomale che codifica per la subunità 18S, piuttosto conservata, e le regioni ITS (*Internal Transcribed Spacer*), generalmente ipervariabili. Numerosi sono i dati bibliografici a disposizione, ma alla relativa facilità della tecnica si affianca spesso una certa difficoltà nella standardizzazione del protocollo in tutte le sue fasi. L'amplificazione, per esempio, della regione ITS dei generi *Coniosporium* e *Sarcinomyces*, con l'utilizzo dei medesimi primer, prevede temperature di *annealing* differenti a seconda del genere investigato (DE LEO *et al.*, 1999; WOLLENZIEN *et al.*, 1997). Ai dati bibliografici, fondamentali per il confronto dei *pattern* di restrizione o della intera sequenza, si deve perciò affiancare un notevole lavoro sperimentale, determinato dalla natura polifiletica dei funghi meristemati, necessario per la messa a punto, di volta in volta, del protocollo più appropriato.

Nel nostro caso la subunità 18S dei ceppi meristemati appartenenti ai 5 morfotipi, amplificata e digerita con gli enzimi di restrizione, ha messo in evidenza per il momento una buona correlazione tra morfotipo e analisi molecolare. Ulteriori indagini sono in corso per determinare l'esatta posizione tassonomica dei ceppi studiati.

CONCLUSIONI

Le specie fungine isolate sono riconducibili ai due gruppi ecologici che si rilevano su roccia oltre a specie non caratteristiche di tale materiale che sono da ritenersi isolamenti casuali e perciò determinati dalla presenza sulla pietra di spore o propagali.

Notevole importanza assume l'isolamento di funghi neri a crescita meristemata nella regione campionata, in quanto risulterebbe la prima segnalazione in tale area. Questo potrebbe confermare l'ipotesi che i funghi meristemati abbiano una distribuzione più ampia di quanto finora riportato in letteratura.

Ringraziamenti - Si ringrazia per il contributo la Professoressa Valcuvia Passadore del Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri dell'Università di Pavia.

LETTERATURA CITATA

ASCASO C., RIOS DE LOS A., WIERZCHOS J., 2002 - *Fungi*

ans lichen: microbial ecology in Antarctic rock desert. IMC7, The 7th Int. Mycol. Congr. Oslo, 11-17 August 2002.

BÜDEL B., BECKER U., FOLLMANN G., STERFLINGER K., 2000 - *Algae, Fungi, and Lichens on Inselbergs*. Ecol. Stud., 146: 68-90.

CIFERRI O., TIANO P., MASTROMEI G., 2000 - *Of microbes and art. The Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Culturale Heritage*. Ed. Plenum, New York.

DE LEO F., URZÌ C., HOOG G. S. DE., 1999 - *Two Coniosporium species from rock surfaces*. Stud. Mycol., 43: 70-79.

DOMSCH K.H., GAMS W., ANDERSON T.H., 1980 - *Compendium of soil fungi*. Ed. Brace Academic Press, London.

ELLIS M.B., 1971 - *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycol. Inst. Kew, Surrey, England.

—, 1976 - *More dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycol. Inst. Kew, Surrey, England.

FLORIO S., SAVINO E., BRUSONI M., CARULLI I., VACCARI A., VALCUVIA M., 2002 - *Saxicolous lichens and rock-inhabiting fungi on different medieval monuments in Aosta Valley (Italy)*. IMC7, The 7th Int. Mycol. Congr. Oslo, 11-17 August 2002.

GAMS W., 1971 - *Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

GORBUSHINA A.A., VOLKMAN M., DORNIEDEN T., RUTTERS H., RULLKOTTER J., 2002 - *Black fungal colonies as units of survival: hyphal mycosporines synthesized by rock dwelling fungi*. IMC7, The 7th Int. Mycol. Congr. Oslo, 11-17 August 2002.

HOOG, G. S. DE, GUARRO J., GENÈ J., FIGUERAS M.J., 2000 - *Atlas of clinical fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht, The Netherlands; Universitat Rovira i Virgili Reus, Spain.

HOOG, G. S. DE, HERMANIDES-NIJHOF E. J., 1977 - *The black yeasts and allied Hyphomycetes*. Stud. Mycol., 15.

NIENOW J. A., FRIEDMANN E. I., 1993 - *Terrestrial lithophytic (rock) communities*. In: FRIEDMANN E.I (Ed.), *Antarctic Microbiology*: 343- 412. Wiley-Liss, New York.

PIERVITTORI R., MAFFEI S., 2001 - *The importance of indicator species in the biomonitoring of atmospheric pollution. A case study in the city of Aosta, NW Italy*. Cryptogamie, Mycol., 22(4): 297-310.

SAIZ-JIMENEZ C., 1995 - *Deposition of anthropogenic compounds on monuments and their effect on airborne microorganisms*. Aerobiologia, 11: 161-175.

STALEY J.T., PALMER F. ADAMS J.B., 1982 - *Microcolonial fungi: common inhabitants on desert rock?* Science, 215: 1093-1095.

STERFLINGER K., GORBUSHINA A.A., 1997 - *Morphological and molecular characterization of a rock fungi and decaying dematiaceous fungus isolated from monuments of Delos (Cyclades, Greece) and Chersonesus (Crimea, Ukraine)*. System. Appl. Microbiol., 20: 329-335.

STERFLINGER K., PRILLINGER H., 2001 - *Molecular taxonomy and biodiversity of rock fungal communities in an urban environment (Vienna, Austria)*. Antonie van Leeuwenhoek, 80: 275-286.

URZÌ C., DE LEO F., HOOG G. S. DE, STERFLINGER K., 2000 - *Recent advances in the molecular biology and ecophysiology of meristematic stone-inhabiting fungi*. In: *Of microbes and art. The Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Culturale Heritage*. 3-19. Ed. Plenum, New York.

- WOLLENZIEN U., HOOG, G. S. DE, KRUMBEIN E. W., UIJTHOF J.M.J., 1997 - *Sarcinomyces petricola, a new microcolonial fungus from marble in the Mediterranean basin*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71: 281-288.
- WOLLENZIEN U., HOOG G. S. DE, KRUMBEIN E. W., URZÌ C., 1995 - *On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks*. *Sci. Total Environm.*, 167: 287-294.

RIASSUNTO - L'Italia è ricca di monumenti storici lasciati alla loro naturale corrosione. Questi possono rappresentare un substrato ideale per i funghi, in particolare per i demaziacei con crescita meristemica, che sembrano coinvolti nei fenomeni di biodeterioramento dei materiali litici.

AUTORI

Sofia Florio, Elena Savino, Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri, Università di Pavia, Via S. Epifanio 14, 27100 Pavia, esavino@et.unipv.it
Giuseppe Damiani, Istituto di Genetica Molecolare, Evolutionary Genetics, Via Abbiategrasso 207, 27100 Pavia, damiani@igm.cnr.it
Filomena De Leo, Clara Urzì, Dipartimento di Scienze Microbiologiche, Genetiche e Molecolari, Salita Sperone 31, 98166 Messina, Clara.Urzì@unime.it

Caratterizzazione di miceli sterili demaziacei e moniliacei associati a piante a diverso status micorrizico in ambiente mediterraneo

M. GIRLANDA, S. GHIGNONE, R. BERGERO, S. PEROTTO e A.M. LUPPI

ABSTRACT - *Characterization of dark and white sterile mycelia associated with plants with different mycorrhizal status in Mediterranean ecosystems* - Sterile mycelia associated with the roots of neighboring, healthy individuals of pairs of hosts with different mycorrhizal status in two areas in Liguria were investigated. ITS sequence analyses have revealed in both cases novel spectra of taxa, distinct from those so far recognized in related hosts in other habitats. The consistent association with the host plants in nature and mycorrhizal abilities revealed in resynthesis trials in axenic conditions outline different kinds of interactions among the hosts, possibly leading to facilitation of secondary successions and dynamics of Mediterranean vegetation.

Key words: *Erica arborea*, mycorrhizae, *Pinus halepensis*, *Quercus ilex*, *Rosmarinus officinalis*, rDNA

INTRODUZIONE

E' ormai dimostrato che il basso grado di specificità delle associazioni tra piante e simbionti fungini ectomicorrizici o endomicorrizici arbuscolari consente l'instaurarsi, negli ambienti naturali, di complesse interazioni interpianta mediate dal reticolo miceliare di uno o più endofiti fungini colleganti le radici di individui vegetali appartenenti alla stessa o a diversa specie. Alleviando la competizione tra piante e promuovendo la biodiversità vegetale, tali interazioni possono avere importanti ripercussioni sulla struttura delle fitocenosi e sui fenomeni di successione (MILLER, ALLEN, 1992; SIMARD *et al.*, 1997). Tuttavia, se l'esistenza di queste interazioni è ormai accertata tra ospiti con uno stesso tipo di simbiosi micorrizica, meno conosciute rimangono eventuali interazioni tra piante a diverso tipo di micotrofia, spesso mediate da endofiti poco caratterizzati quali i miceli sterili, non identificabili per via convenzionale. Questi rappresentano un aggregato eterogeneo di taxa dei quali il numero, l'identità e di conseguenza la specificità d'ospite rimangono largamente sconosciuti; ad oggi, infatti, ne sono stati identificati pochi, in indagini pressoché esclusivamente riferite ad habitat alpini e subalpini della zona temperata dell'emisfero boreale o ad ambienti artici (JUMPPONEN, TRAPPE, 1998; SCHADT *et al.*, 2001; PEROTTO *et al.*, 2002).

In questa prospettiva, da diversi anni le nostre ricerche sono indirizzate alla caratterizzazione della componente endofitica sterile con significato vuoi di

simbionti micorrizici accreditati (come la gran parte dei funghi ericoidi), vuoi di simbionti di tipo meno convenzionale [quali i meno conosciuti DSM, "dark sterile mycelia", in grado di coesistere nelle radici con i simbionti "ufficiali" ecto- o endomicorrizici e di incrementare la nutrizione minerale e la crescita dell'ospite (SHIVANNA *et al.*, 1994; FERNANDO, CURRAH, 1996; JUMPPONEN *et al.*, 1998)]. Quale contesto ideale per lo studio di queste tematiche sono stati scelti gli ambienti mediterranei, caratterizzati da elevata diversità e co-dominanza di specie vegetali ed associati tipi micorrizici [prevalentemente essenze sempreverdi e sclerofilliche con ectomicorrize, endomicorrize arbuscolari, ericoidi, arbutoidi (ALLEN, 1991)]. Recentemente le indagini sono state incentrate in due aree dell'entroterra ligure: una gariga a Varigotti (SV) ed una lecceta (con aree ceduate e quindi ricomparsa delle specie pioniere) a Borgo Verezzi (SV). In entrambi gli ambienti ospiti ectomicorrizici (rispettivamente *Pinus halepensis* Mill. e *Quercus ilex* L.) sono co-dominanti con ospiti endomicorrizici (rispettivamente *Rosmarinus officinalis* L., con micorrize arbuscolari, ed *Erica arborea* L., con micorrize ericoidi). La caratterizzazione dei miceli sterili endofitici nelle due coppie di ospiti ha previsto l'adozione di uno stesso protocollo sperimentale, attraverso: i) isolamento, dopo sterilizzazione, dalle radici micorriziche di individui adiacenti, sani, delle coppie di ospiti di ciascuna stazione; ii) assegnazione a distinti morfotipi sulla base delle caratteristiche

macro- e microscopiche; iii) verifica della validità dei morfotipi attraverso analisi ITS-RFLP; iv) sequenziamento di regioni dell'rDNA (regione ITS completa -ITS1-5.8S-ITS2- e 18S parziale) di rappresentanti dei diversi morfotipi, impiego delle sequenze per ricerche BLAST in banca dati e ricostruzioni filogenetiche con metodi diversi (Neighbor-Joining e Maximum Likelihood) su datasets comprendenti sequenze allineabili di funghi ad identità nota. Le ricerche condotte a Borgio Verezzi hanno inoltre previsto il reinocolo degli isolati nei diversi ospiti e l'accertamento tramite RAPD del grado di variabilità genetica di alcuni morfotipi.

La gariga di Varigotti: DSM endofiti in Pinus halepensis e Rosmarinus officinalis

Le indagini sono state concentrate sui morfotipi ottenuti da entrambi gli ospiti nel corso di tutti i campionamenti, effettuati su un arco di oltre undici anni (GIRLANDA *et al.*, 2002).

Le ricerche BLAST per le sequenze ITS dei diversi morfotipi hanno permesso di escludere l'identificazione con i pochi *taxa* ad oggi associati ai DSM, inclusa *Phialocephala fortinii* C.J.K. Wang & H.E. Wilcox, che è invece dominante negli habitat finora indagati. In alcuni casi (Morfotipi 3a, 3b, 3c, 3d) l'identità con le sequenze in GenBank è risultata essere estremamente ridotta (55.8-83.0%), essenzialmente limitata alla regione (più conservata) del 5.8S: ciò indica in tali funghi o *taxa* privi di "parenti stretti" in GenBank, oppure *taxa* nuovi. Attraverso i dati del 18S, inseriti in datasets rappresentativi delle principali sottoclassi di *Ascomycetes*, tali DSM sono risultati essere affiliati a *Dothideomycetidae* (Morfotipi 3a, 3b, 3c, sister-group del complesso *Pleosporales-Patellariales*) o *Chaetothyriomycetidae* (Morfotipo 3d). Nel caso del Morfotipo 1 l'omologia in banca dati è risultata essere relativa all'intera regione ITS, spaziatori inclusi, con valori d'identità pari al 90-94% con sequenze di specie diverse di *Diaporthe/Phomopsis* (*Valsaceae*, *Diaporthales*, *Sordariomycetidae*, *Ascomycetes*). In realtà non identificabile con nessuna di queste specie, quando inserito in un dataset più ampio il Morfotipo 1 appare in effetti costituire un gruppo a se stante non ancora sequenziato. Valori di identità del 98.8-99.4% sono invece stati riscontrati per il Morfotipo 2, con una sequenza riferita a *Rhizopycnis vagum* D.F. Farr (Fig. 1); tale identificazione *in silico* è stata confortata dal confronto a posteriori della morfologia delle strutture somatiche. *Rhizopycnis vagum* è un celomicete descritto nel 1998 come nuovo genere e nuova specie (FARR *et al.*, 1998), ad oggi noto esclusivamente come agente patogeno responsabile del "collasso delle cucurbitacee" o "vine decline", sindrome originariamente descritta per colture nel Nord- e Centro-America (MERTELY *et al.*, 1991; MILLER *et al.*, 1996; BRUTON, MILLER 1997a,b,c; GWINNE *et al.*, 1997; AEGERTER *et al.*, 2000; ARMENGOL *et al.*, 2000; MONTUSCHI, 2001). Del tutto inatteso è quindi risultato il suo ritrovamento come endofita in ospiti sani così

"distanti", quali essenze arboree ed arbustive, non cucurbitacee, spontanee. Tale risultato solleva interessanti interrogativi circa la plasticità biologica e genetica di *Rhizopycnis vagum*. Indagini molecolari in corso (polimorfismi RAPD, microsatelliti, filogenesi multilocus) e saggi di fitopatogenicità sono volti appunto a definirne struttura di popolazione e confini specifici.

Questi risultati hanno dunque consentito di identificare nei morfotipi sterili della gariga di Varigotti, sia pure con gradi diversi di risoluzione sistematica, uno spettro originale di *taxa*, del tutto distinti da quelli finora associati ai DSM. Il mancato ritrovamento di *Phialocephala fortinii*, dominante in habitat alpini, subalpini ed artici, ed il ritrovamento invece di un'entità, quale *Rhizopycnis vagum*, già ottenuta, sia pure come patogeno, da regioni a clima caldo-arido o semiarido, suggerisce un'influenza dell'habitat sulla distribuzione degli endofiti DSM.

La lecceta di Borgio Verezzi: miceli sterili demaziacei e moniliacei endofiti in Quercus ilex e Erica arborea

Anche in questo caso lo spettro di *taxa* isolati dai due ospiti è risultato essere del tutto originale (BERGERO *et al.*, 2000, 2002). Quando utilizzate come queries per ricerche BLAST, nessuna delle sequenze dei morfotipi ericoidi (quelli cioè che in prove di re-inocolo hanno mostrato capacità micorriziche in *Erica arborea*) ha infatti presentato identità significative con sequenze di *Hymenoscyphus ericae* o *Oidiodendron* spp., i principali *taxa* ericoidi di identità nota, né con sequenze degli endofiti micorrizici sterili ottenuti dagli ospiti ericoidi finora indagati (HAMBLETON, CURRAH, 1997; PEROTTO *et al.*, 2002; SHARPLES *et al.*, 2000). In diversi casi tali morfotipi hanno invece presentato maggiori affinità con isolati sterili da *Epacridaceae*, oppure (Morfotipo Sd3) con un morfotipo ottenuto da *P. halepensis* e *R. officinalis* nelle ricerche a Varigotti (Morfotipo 3c), o, ancora, con un morfotipo sterile risultato ectomicorrizico in *Kobresia myosuroides* (*Cyperaceae*). In nessun caso tuttavia i valori di identità sono risultati molto elevati, indicando di nuovo *taxa* non ancora sequenziati, o *taxa* nuovi, ancorchè probabilmente riferibili a *Leotiomycetidae* o *Dothideomycetidae* (*Ascomycetes*).

La conspecificità degli isolati entro i morfotipi comuni ai due ospiti (Sd2 e Sd9) è stata confermata tramite analisi delle regioni ITS. Capacità micorrizica in *E. arborea* da parte di tali morfotipi, con produzione dei tipici gomitolini, è stata dimostrata non solo per gli isolati ottenuti da *E. arborea* ma anche per quelli ottenuti da *Q. ilex*. Tipiche micorrizze ericoidi sono anche state ottenute utilizzando come inoculo apici ectomicorrizici di *Q. ilex* raccolti in campo. L'analisi RAPD ha inoltre dimostrato, nel caso del Morfotipo Sd9, la presenza di uno stesso individuo genetico (genet) in associazione ai due fitobionti. Prove di ri-sintesi in *Q. ilex* hanno portato ad escludere, per gli isolati di Sd2 e Sd9, un comportamento da tipici simbionti ectomicorrizici in questa pianta, comportamento che non è tuttavia da

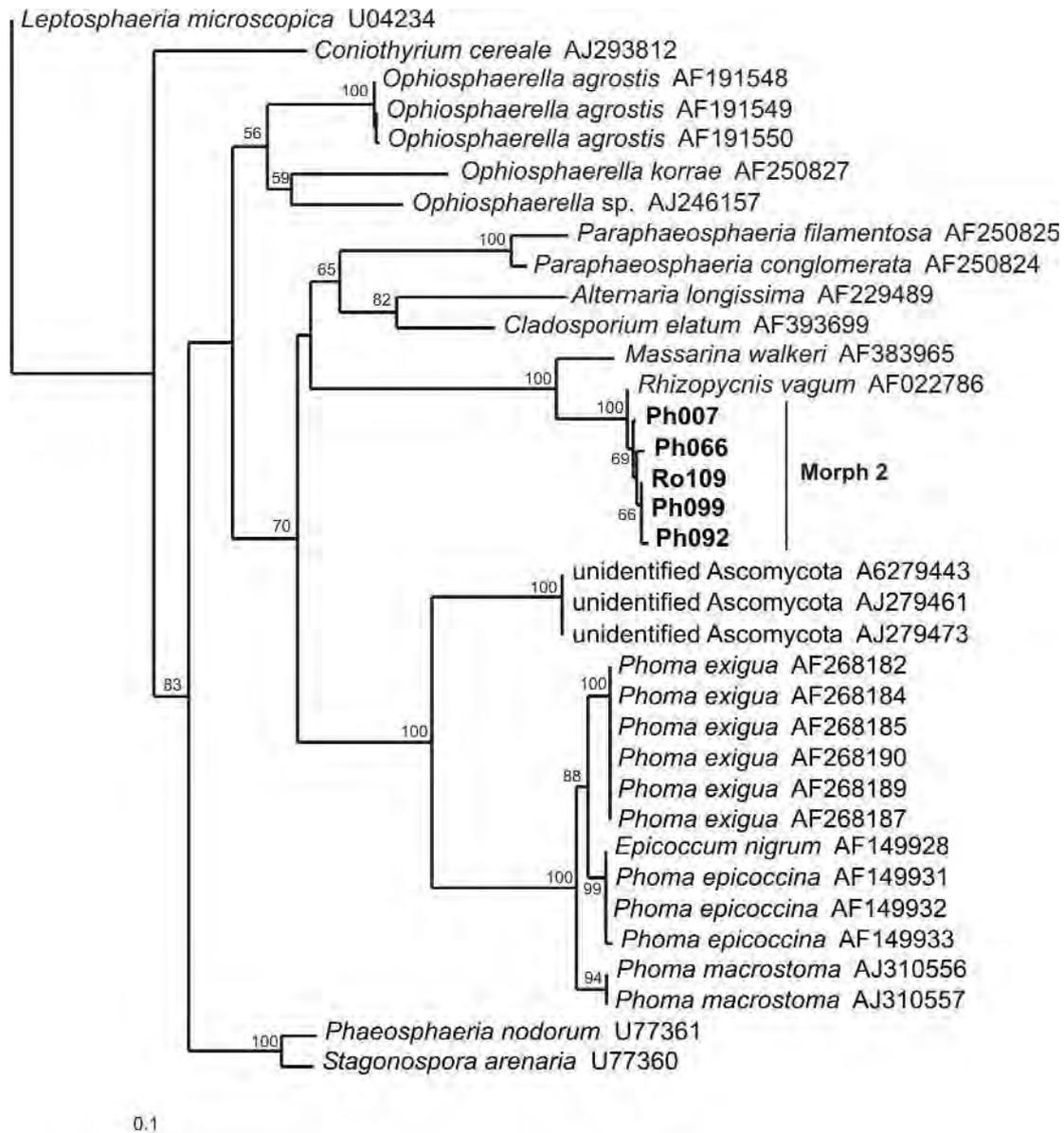


Fig. 1

Albero neighbor-joining ottenuto dall'allineamento delle sequenze ITS (ITS1-5.8S-ITS2) degli isolati del Morfotipo 2 con sequenze allineabili di *taxa* anamorfici e teleomorfici rinvenute tramite ricerche BLAST. Il modello Kimura-2-parameter era usato per le misure di distanza. Sono indicati i valori di bootstrap superiori al 50% (1000 repliche). L'albero è stato radicato automaticamente. Scala, n. cambiamenti nucleotidici/sito (modificato da GIRLANDA *et al.*, 2002).

Neighbor-joining tree obtained from the ITS (ITS1-5.8S-ITS2) sequence alignment of Morphotipo 2 isolates with alignable sequences of anamorphic and teleomorphic *taxa* retrieved by BLAST searches. The Kimura-2-parameter model was used for pairwise distance measurement. Bootstrap values above 50% are indicated (1000 replicates). Root was located automatically. Bar, no. nucleotide changes/site (from GIRLANDA *et al.*, 2002, modified).

escludere in ospiti diversi, come potrebbe suggerire la loro notevole identità di sequenza con un micelio ectomicorrizico in *Kobresia myosuroides*.

Mediante isolamento da piante trappola, risintesi micorrizica e confronti morfologici e molecolari si è dimostrato che suoli della lecceta matura, dove *E. arborea* era assente da almeno 10 anni, mantengono non solo un elevato potenziale di inoculo micorrizico, ma anche un'alta diversità di endofiti ericoidi.

Questi risultati dimostrano che funghi micorrizici ericoidi possono associarsi, in natura, con radici ectomicorriziche, e sopravvivere a lungo nel suolo in assenza dell'ospite ericoide, probabilmente facilitando la ricolonizzazione di *E. arborea* in seguito ad eventi di disturbo (fuoco, interventi di ceduzione...) comuni negli ambienti mediterranei; le ectomicorrizze di *Q. ilex* fungerebbero così da serbatoio d'inoculo micorrizico per *E. arborea*, assicurandone

la micorrizzazione *ex-novo* in stand puri di lecceta. Infine, se all'identità genetica del micelio associato ai due ospiti (come dimostrato nel caso di Sd9) si accompagnasse integrità fisica dello stesso, questa duplice associazione potrebbe anche rappresentare la base per scambi nutrizionali mediati dal simbionte comune.

CONCLUSIONI

L'impiego dei dati di sequenza per l'identificazione specifica di miceli sterili trova il suo principale limite nell'affidabilità e soprattutto rappresentatività delle banche dati GenBank-EMBL, dove allo stato attuale sono rappresentati meno del 50% delle famiglie e circa il 74% degli ordini di *Ascomycetes* riconosciuti nell'ultima edizione del Dictionary of the Fungi (KIRK *et al.*, 2001). Questo stato di cose riduce, nella maggior parte dei casi, il grado di risoluzione raggiungibile nelle identificazioni. Tale approccio, applicato alla componente fungina endofitica associata in Liguria a coppie di ospiti a diverso status micorrizico, ha tuttavia consentito il riconoscimento di spettri inediti di *taxa*, del tutto distinti da quelli ad oggi individuati in ospiti affini in altri ambienti. Il ritrovamento di uno stesso fungo (Morfortipo Sd3 / 3c) quale endofita in ospiti diversi in fitocenosi distinte (lecceta di Borgio Verezzi, gariga di Varigotti) suggerisce l'esistenza di una precisa selezione della componente endofitica radicale. Tale componente è risultata essere associata in modo costante ad entrambi i membri di ciascuna coppia, configurando varie possibilità d'interazione tra gli ospiti stessi, che possono portare alla facilitazione delle successioni secondarie e del dinamismo della vegetazione mediterranea. L'inatteso ritrovamento di entità, quali *Rhizopycnis vagum*, patosistiche in ospiti sistematicamente ed ecologicamente non correlati, ha aperto nuove prospettive di ricerca circa i fattori in grado di determinare, in condizioni naturali, un comportamento da endofita asintomatico piuttosto che da patogeno.

LETTERATURA CITATA

- AEGERTER B.J., GORDON T.R., DAVIS R.M., 2000 - Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California. *Plant Dis.*, 84: 224-230.
- ALLEN M.F., 1991 - *The ecology of mycorrhizae*. Cambridge University Press, Cambridge.
- ARMENGOL J., PELLICER I., VICENT A., BRUTON B.D., GARCÍA-JIMÉNEZ J., 2000 - *Rhizopycnis vagum* DF Farr, un nuevo Coelomycete asociado a raíces de planta de melón con síntomas de colapso en España. *Plagas* (1° Trimestre), 26: 103-112.
- BERGERO R., GIRLANDA M., BELLO F., LUPPI A.M., PEROTTO S., 2002 - Soil persistence and biodiversity of ericoid mycorrhizal fungi in the absence of the host plant in a Mediterranean ecosystem. *Mycorrhiza*, 13: 69-75.
- BERGERO R., PEROTTO S., GIRLANDA M., VIDANO G., LUPPI A.M., 2000 - Ericoid mycorrhizal fungi are common root associates of a Mediterranean ectomycorrhizal plant (*Quercus ilex*). *Mol. Ecol.*, 9: 1639-1649.
- BRUTON B.D., MILLER M.E., 1997a - Occurrence of vine decline diseases of muskmelon in Guatemala. *Plant Dis.*, 81: 694.
- , 1997b - Occurrence of vine decline diseases of melons in Honduras. *Plant Dis.*, 81: 696.
- , 1997c - The impact of vine declines on muskmelon production in Central America. *Phytopathology*, 88: S120.
- FARR D.F., MILLER M.E., BRUTON B.D., 1998 - *Rhizopycnis vagum* gen. et sp. nov., a new coelomycetous fungus from roots of melons and sugarcane. *Mycologia*, 90: 290-296.
- FERNANDO A.A., CURRAH R.S., 1996 - A comparative study of the effects of the root endophytes *Leptodontidium orchidicola* and *Phialocephala fortinii* (Fungi Imperfecti) on the growth of some subalpine plants in culture. *Can. J. Bot.*, 74: 1071-1078.
- GIRLANDA M., GHIGNONE S., LUPPI A.M., 2002 - Diversity of sterile root-associated fungi of two Mediterranean plants. *New Phytol.*, 155 (3): 481-498.
- GWINNE B.J., DAVIS R.M., GORDON T.R., 1997 - Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon vine decline in California. *Phytopathology*, 87: S37.
- HAMBLETON S., CURRAH R.S., 1997 - Fungal endophytes from the roots of alpine and boreal Ericaceae. *Can. J. Bot.*, 75: 1570-1581.
- JUMPPONEN A., MATTSON K.G., TRAPPE J.M., 1998 - Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii*: interactions with soil nitrogen and organic matter. *Mycorrhiza*, 7: 261-265.
- JUMPPONEN A., TRAPPE J.M., 1998 - Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytol.*, 140: 295-310.
- KIRK P.M., CANNON P.F., DAVID J.C., STALPERS J.A., 2001 - *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. Ninth Edition*. CAB International, Wallingford.
- MERTELEY J.C., MARTYN R.D., MILLER M.E., BRUTON B.D., 1991 - Role of *Monosporascus cannonballus* and other fungi in a root rot/vine decline of muskmelon. *Plant Dis.*, 75: 1133-1137.
- MILLER S.L., ALLEN E.B., 1992 - *Mycorrhizae, nutrient translocation, and interactions between plants*. In: ALLEN M.F. (ed.), *Mycorrhizal functioning. An integrative plant-fungal process*: 301-332. Chapman & Hall, New York, London.
- MILLER M.E., BRUTON B.D., FARR D.F., 1996 - Association of a *Stagonospora*-like fungus on roots of melons exhibiting vine decline symptoms. *Phytopathology*, 86: S3.
- MONTUSCHI C., 2001 - Collasso delle cucurbitacee: una malattia da indagare. *Agricoltura*, 30: 31-33.
- PEROTTO S., GIRLANDA M., MARTINO E., 2002 - Ericoid mycorrhizal fungi: some new perspectives on old acquaintances. *Pl. Soil*, 244 (1-2): 41-53.
- SCHADT C.W., MULLEN R.B., SCHMIDT S.K., 2001 - Isolation and phylogenetic identification of a dark-septate fungus associated with the alpine plant *Ranunculus adoneus*. *New Phytol.*, 150 (3): 747-755.
- SHARPLES J.M., CHAMBERS S.M., MEHARG A.A., CAIRNEY J.W.G., 2000 - Genetic diversity of root-associated fungal endophytes from *Calluna vulgaris* at contrasting field sites. *New Phytol.*, 148 (1): 153-162.
- SHIVANNA M.B., MEERA M.S., HYAKUMACHI M., 1994 - Sterile fungi from zoysiagrass rhizosphere as plant growth promoters in spring wheat. *Can. J. Microbiol.*, 40: 637-644.
- SIMARD S.W., PERRY D.A., JONES M.D., MYROLD D.D., DURRAL D.M., MOLINA R., 1997 - Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field.

Nature, 388: 579-582.

RIASSUNTO - Sono stati caratterizzati i miceli sterili associati alle radici di individui adiacenti, sani, di coppie di ospiti con diverso *status* micorrizico in due aree dell'entroterra ligure. L'analisi delle regioni ITS ha rivelato in entrambi i casi spettri inediti di *taxa*, del tutto distinti da

quelli ad oggi individuati in piante affini in altri ambienti. L'associazione costante con i diversi ospiti in natura e le capacità micorriziche dimostrate in prove di re-sintesi in condizioni axeniche configurano possibilità diverse d'interazione tra gli ospiti stessi, che possono portare alla facilitazione delle successioni secondarie e del dinamismo della vegetazione mediterranea.

AUTORI

*Mariangela Girlanda**, Stefano Ghignone, Roberta Bergero, Silvia Perotto, Anna Maria Luppi, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Torino, Viale P.A. Mattioli 25, 10125 Torino; Istituto per la Protezione delle Piante del CNR, Sezione di Torino, Viale P.A. Mattioli 25, 10125 Torino

* Autore per la corrispondenza

Variabilità in *Tuber uncinatum*: un'analisi molecolare

A. MELLO, A. CANTISANI, A. VIZZINI e P. BONFANTE

ABSTRACT – *Variability in Tuber uncinatum: a molecular analysis* – The genetic variability of the ectomycorrhizal fungus *Tuber uncinatum* Chatin and its relatedness to another morphologically-similar truffle, *T. aestivum* Vittad., were investigated. ITS and microsatellite analyses separate *T. aestivum* and *T. uncinatum* samples according to their spore reticulum. The lower mitochondrial rDNA subunit was not able to differentiate morphologically-related and -unrelated truffles. The genetic variability of *T. uncinatum* was high, comparing that of *T. melanosporum*.

Key words: genetic variability, ITS, microsatellites, mitochondrial DNA, *Tuber uncinatum*/*Tuber aestivum*

INTRODUZIONE

I tartufi sono funghi simbiotici, appartenenti al genere *Tuber*, che formano micorrizze con le radici di piante quali pioppo, quercia, tiglio, carpino, nocciuolo ed arbusti di cisto. Da questa interazione vengono prodotti ascomi ipogei eduli, comunemente chiamati tartufi, di elevato pregio a causa del loro aroma e gusto. Negli ultimi anni i tartufi sono stati oggetto di numerosi studi molecolari. Alcuni hanno fornito strumenti utili all'identificazione di specie molto simili, dal punto di vista morfologico, quali *T. borchii* e *T. maculatum* (AMICUCCI *et al.*, 1998; MELLO *et al.*, 2000), *T. melanosporum*, *T. brumale* e *T. indicum* (RUBINI *et al.*, 1998; PAOLOCCI *et al.*, 2000). Altri hanno permesso il riconoscimento della specie fungina al livello di micorrizza (STOCCHI, 1999; RUBINI *et al.*, 2001; MELLO *et al.*, 2001). Altri ancora si sono focalizzati sulla diversità genetica intraspecifica (BERTAULT *et al.*, 1998, 2001) perché considerata l'elemento chiave per la comprensione della dinamica delle popolazioni fungine.

Lo scopo del nostro lavoro è l'analisi del polimorfismo della specie *T. uncinatum* Chatin, le cui caratteristiche morfologiche sono molto simili a quelle di *T. aestivum* Vittad.

Per questo studio abbiamo considerato sia marcatori dominanti, quali le sequenze microsatelliti utilizzate come primer in PCR (Polymerase Chain Reaction), che marcatori codominanti, quali il DNA ribosomale nucleare e mitocondriale.

MATERIALI E METODI

Tutti gli ascomi analizzati sono stati morfologica-

mente caratterizzati come *T. uncinatum* o *T. aestivum* in base alle dimensioni del reticolo delle loro spore. Quando le trabecole degli alveoli sporali erano $> 4 \mu\text{m}$ i campioni sono stati classificati come *T. uncinatum*, quando erano $< 2 \mu\text{m}$ come *T. aestivum*, quando questo carattere era intermedio i campioni sono stati classificati come "aestivum group". Sono stati analizzati 30 ascomi di cui: 20 di *T. uncinatum*, la maggior parte proveniente da una tartufaia della Lombardia (Menconico, PV), 5 di *T. aestivum*, provenienti dall'Italia e dalla Francia, 5 appartenenti all'"aestivum group", provenienti dall'Italia e dalla Spagna. Il DNA estratto da tutti i campioni è stato utilizzato in esperimenti di PCR per le analisi dei microsatelliti, dell'ITS del DNA ribosomale e della subunità minore del DNA ribosomale mitocondriale. Per i dettagli tecnici si rimanda a MELLO *et al.*, (2002).

DISCUSSIONE

Le sequenze microsatelliti sono sequenze ripetute nel genoma e fonti di notevole variabilità genetica pertanto molto utili allo studio del polimorfismo. In questo studio sono state utilizzate come marcatori dominanti, che considerano cioè molti geni contemporaneamente, e danno pertanto un'idea globale del polimorfismo di *T. uncinatum*.

L'amplificazione con le sequenze microsatelliti (GTG)₅, (GAC)₅, (AAG)₈, (AAC)₈, usate come primer, del DNA di 30 campioni ha rivelato dei profili con consistente polimorfismo: le bande condivise erano circa il 50%. L'analisi di distanza fatta su una

matrice binaria, elaborata su un gruppo di dodici campioni, ha permesso il disegno di un dendrogramma in cui i campioni di *T. aestivum* si raggruppavano, separatamente da quelli di *T. uncinatum* (Fig. 1). Dati i limiti di una tecnica basata sulla dominanza dei caratteri abbiamo proseguito con l'analisi di un singolo locus, la regione ITS del DNA ribosomale che può dare informazioni più precise.

Il DNA di 30 ascomi di *T. uncinatum* e *T. aestivum*, amplificato con i primers ITS1/ITS4, ha prodotto una banda di circa 700 pb. Per comprendere se i due taxa potevano essere differenziati, abbiamo sequenziato la regione ITS di 15 ascomi di *T. uncinatum* e *T. aestivum* e costruito un albero genico in cui abbiamo considerato anche le sequenze di altre specie di *Tuber* (Fig. 2). *T. aestivum* e *T. uncinatum* formavano due gruppi, in accordo con i risultati ottenuti dall'analisi dei microsatelliti. La variabilità intraspecifica del *T. uncinatum*, risultante dalle posizioni non conservate nell'allineamento con il programma Clustal W di 12 sequenze, è risultata essere elevata (6%) se confrontata con quella della specie *T. melanosporum* (2%).

Parallelamente abbiamo voluto considerare un altro locus, noto per la sua capacità di discriminare a livello inter ed intraspecifico: il DNA ribosomale mitocondriale.

Il DNA estratto dai campioni di *T. aestivum* e *T. uncinatum* è stato amplificato con i primers NMS1/NMS2, disegnati su 25 sequenze mitocondriali di Ascomiceti (Li *et al.*, 1994), che hanno differenziato varie specie di *Verticillium* e *Fusarium*. L'amplificazione ha dato una banda di 575 pb in tutti i campioni ed una seconda banda di 620 pb in soli 3 campioni di *T. uncinatum*. Entrambe le bande sono state sequenziate da alcuni campioni di *T. uncinatum* e *T. aestivum*: la sequenza relativa alla banda addizionale ha rivelato un'alta similarità con quella del 16S rDNA del gruppo *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*; la sequenza relativa al frammento comune di *T. aestivum* ha rivelato una similarità del 99.20% con quella ottenuta da *T. uncinatum*. Inoltre la digestione con l'enzima *MseI* della banda comune ha rivelato un profilo omogeneo per tutti i campioni, indipendentemente dalla loro classificazione morfologica. Questi risultati suggeriscono che i primer NMS1/NMS2 non discriminano specie di tartufo molto simili morfologicamente. In un ulteriore esperimento gli stessi primer sono stati utilizzati per amplificare il DNA estratto da micelio di *T. borchii*, un tartufo morfologicamente molto diverso da *T. aestivum* e *T. uncinatum*. La sequenza del prodotto amplificato ha rilevato il 99.45% di similarità con quelle di *T. aestivum* e *T. uncinatum*.

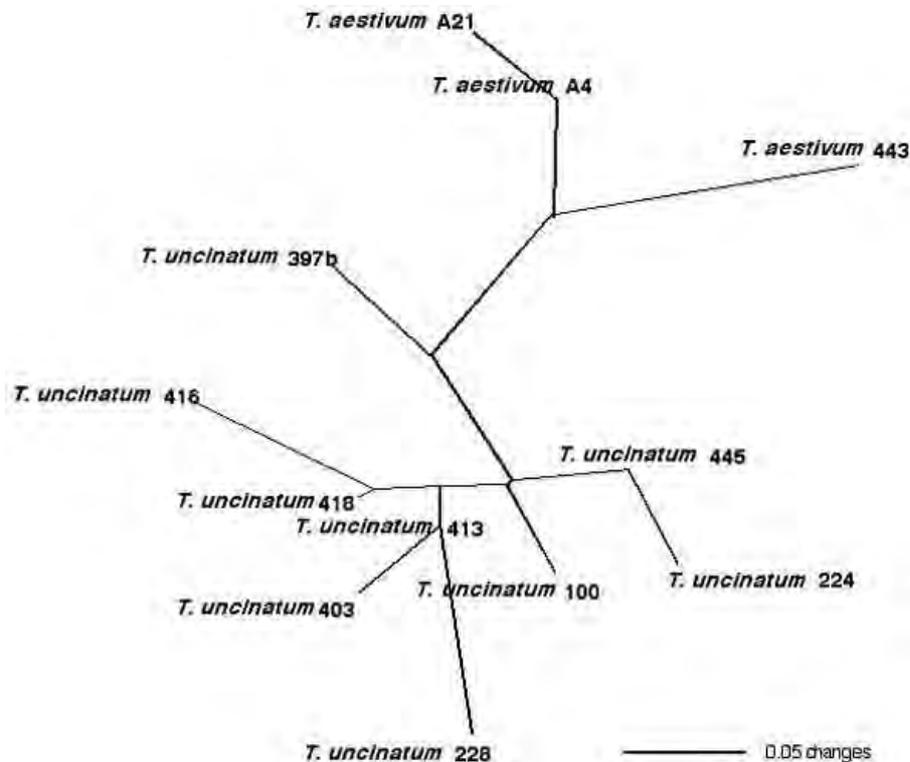


Fig. 1

Albero Neighbour-joining ottenuto dall'analisi dei microsatelliti su dodici campioni di *T. uncinatum* e *T. aestivum*. Neighbour-joining tree obtained from microsatellite analysis on twelve samples of *T. uncinatum* and *T. aestivum*.

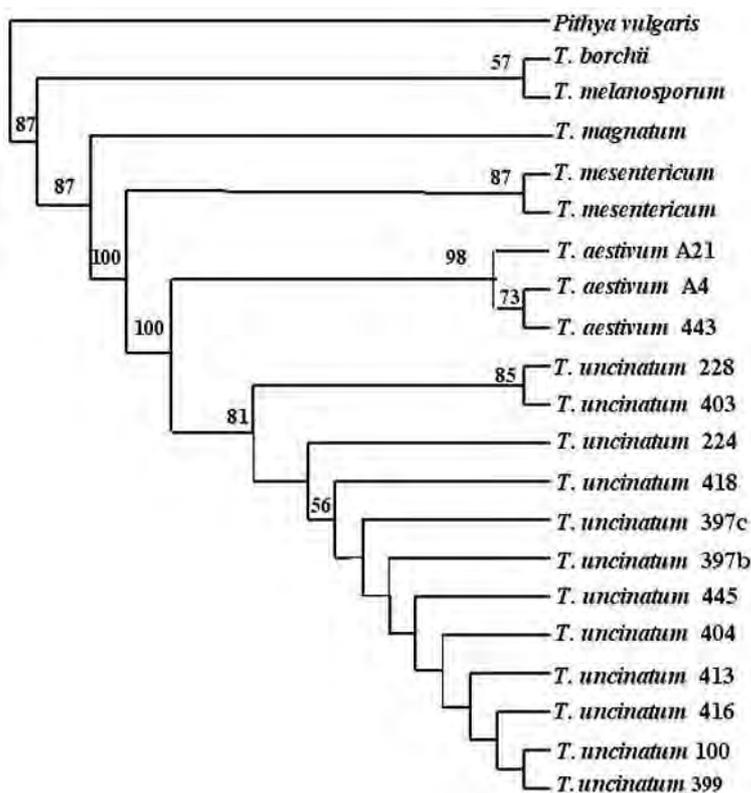


Fig. 2

Albero Neighbour-joining ottenuto dall'allineamento dello spaziatore interno trascritto (ITS). La sequenza di *Pithya vulgaris* è inserita come outgroup.

Neighbour-joining tree obtained from the alignment of the internal transcribed spacer (ITS) region. The sequence of *Pithya vulgaris* is added as outgroup.

Quindi i primer NMS1/NMS2 non sono un buono strumento per discriminare il genere *Tuber*, dato che non distinguono nemmeno specie morfologicamente diverse di tartufo.

In conclusione è stato possibile separare dal punto di vista molecolare *T. aestivum* da *T. uncinatum* in accordo con le caratteristiche morfologiche delle loro spore e valutare il livello di polimorfismo in *T. uncinatum*.

LETTERATURA CITATA

- AMICUCCI A., ZAMBONELLI A., GIOMARO G., POTENZA L., STOCCHI V., 1998 - Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *Tuber* by species-specific ITS primers. *Mol. Ecol.*, 7: 273-277.
- BERTAULT G., RAYMOND M., BERTHOMIEU A., CALLOTS G., FERNANDEZ D., 1998 - Trifling variation in truffles. *Nature*, 394: 734.
- BERTAULT G., ROUSSET F., FERNANDEZ D., BERTHOMIEU A., HOCHBERG M.E., CALLOTS G., RAYMOND M., 2001 - Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. *Heredity*, 86: 451-458.
- LI K-N., ROUSE D.I., GERMAN T.L., 1994 - PCR primers that allow intergeneric differentiation of Ascomycetes and their application to *Verticillium* spp. *Appl Environm. Microbiol.*, 60: 4324-4331
- MELLO A., CANTISANI A., VIZZINI A., BONFANTE P., 2002

- Genetic variability of *Tuber uncinatum* and its relatedness to other black truffles. *Environm. Microbiol.*, 4(10): 584-94.

MELLO A., FONTANA A., MEOTTO F., BONFANTE P., 2001 - Molecular and morphological characterization of *Tuber magnatum mycorrhizas* in a long-term survey. *Microbiol. Res.*, 156: 1-6.

MELLO A., VIZZINI A., LONGATO S., ROLLO F., BONFANTE P., TRAPPE J.M., 2000 - *Tuber borchii* versus *T. maculatum*: neotype studies and DNA analyses. *Mycologia*, 92: 326-33.

PAOLOCCI F., RUBINI A., RICCIONI C., GRANETTI B., ARCIONI S., 2000 - Cloning and characterisation of two repeated sequences in the symbiotic fungus *Tuber melanosporum* Vitt. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 34: 139-146.

RUBINI A., PAOLOCCI F., GRANETTI B., ARCIONI S., 1998 - Single step molecular characterisation of morphologically similar black truffle species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 164: 7-12.

—, 2001 - Morphological characterisation of molecular-typed *Tuber magnatum* ectomycorrhizae. *Mycorrhiza*, 11: 179-185.

STOCCHI V., 1999 - *Metodi Molecolari per l'Identificazione delle Diverse Specie di Tartufo*. Univ. Urbino. 110 pp.

RIASSUNTO - In questo lavoro abbiamo analizzato la variabilità genetica di *T. uncinatum* Chatin e le relazioni di questa specie con *T. aestivum* Vittad., dalle caratteristiche morfologiche molto simili. Per questo studio abbiamo

considerato sia marcatori dominanti, che considerano molti geni contemporaneamente, quali le sequenze microsatelliti utilizzate come primer in PCR, che marcatori codominanti, quali il DNA ribosomale nucleare e mitocondriale. L'albero genico basato sulle sequenze ITS ed il dendrogramma ottenuto dall'analisi dei microsatelliti

separano, in accordo con l'analisi morfologica degli alveoli sporali, i campioni di *T. aestivum* da quelli di *T. uncinatum*. Inoltre i campioni di *T. uncinatum* mostrano un elevato polimorfismo rispetto a quelli di *T. melanosporum*, una specie tra le più studiate in *Tuber*.

AUTORI

Antonietta Mello, Anna Maria Cantisani, Paola Bonfante, Istituto per la Protezione delle Piante del CNR, Sezione di Torino, Viale Mattioli 25, 10125 Torino

Alfredo Vizzini, Paola Bonfante, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Torino, Viale Mattioli 25, 10125 Torino

Funghi predatori di nematodi in Antartide Continentale

S. TOSI, G. DEL FRATE, G. CARETTA e G. VIDARI

ABSTRACT – *Nematode-trapping fungi from Continental Antarctica* – Floristic and ecophysiological data on predaceous fungi isolated in Continental Antarctica are reported. Thirty strains of *Arthrobotrys* sp. and one of *Nematoctonus* sp. were isolated mainly from moss samples collected in Victoria Land. *Nematoctonus* sp. is the first record of this genus for Antarctica. The antarctic strain of *Arthrobotrys tortor* is resulted to be the most active nematode-trapper compared with other european strains of *Arthrobotrys*, producing adhesive nets within 5 hours after adding nematodes. In this strain the production of adhesive nets is recorded also in absence of nematodes. During the *Arthrobotrys tortor* predatory activity the production of linoleic acid, nematicidal compound, increases ten times in comparison with the controls.

Key words: Antarctica, *Arthrobotrys*, linoleic acid, nematode-trapping fungi, *Nematoctonus*

INTRODUZIONE

I funghi predatori di nematodi sono organismi dal fascino indiscusso, capaci di attaccare nematodi vivi e di consumarli in poche ore. I diversi tipi di organi di cattura e le implicazioni ecologiche ed evolutive della loro peculiare nematofagia, sono oggetto di studio di molti micologi.

Tra i funghi antagonisti di nematodi, si possono individuare diversi gruppi: funghi predatori, endoparassiti, parassiti di uova e cisti di nematodi, nonché funghi nematotossici in grado di produrre metaboliti tossici. In ognuno di questi gruppi si ritrovano specie appartenenti a ordini e famiglie tassonomicamente molto lontane tra loro. Il gruppo costituito dai funghi predatori è forse il più interessante per le sue peculiari modalità di predazione. Esso è rappresentato principalmente da specie dei generi anamorfi *Arthrobotrys*, *Dactylella* e *Monacrosporium* che hanno il loro teleomorfo nell'ascomicete *Orbilina* e da specie del genere *Nematoctonus* con teleomorfo nel basidiomicete *Hohenbuehlia*. Essi sono capaci di sviluppare lungo le loro ife, veri e propri organi di cattura di diverse forme e complessità a seconda della specie considerata, quali bottoni adesivi, colonne adesive, reti adesive, anelli costrittivi e non costrittivi, circondati da sostanza adesiva. Questi funghi possono vivere come saprotrofi nel terreno ma la presenza di nematodi stimola la formazione di trappole per la cattura, immobilizzazione e invasione.

Funghi predatori di nematodi sono stati trovati anche in Antartide. GRAY, LEWIS SMITH (1984) hanno riportato per l'Antartide marittimo 17 specie di funghi nematofagi appartenenti a diversi generi,

comprensivi anche di specie strettamente endoparassite. In Antartide Continentale da campioni di suolo dalla Terra Vittoria è stato isolato un ceppo del genere *Arthrobotrys*, predatore di collemboli e descritto da ONOFRI, TOSI (1992) come specie nuova *A. ferox*. Da materiale antartico vario (piume di pinguino, terreno, muschio) venne pure isolata *A. tortor* Jarowaja (CARETTA *et al.*, 1994), una specie che si è rivelata spiccatamente nematofaga. Indagini parallele eseguite sull'ecofisiologia di queste 2 specie hanno portato a risultati indicativi sull'adattabilità di questo gruppo fungino. Ambedue le specie sono capaci di vivere saprotroficamente, ma come predatori di piccoli animali presentano organi specifici per attività biotrofa. Ambedue le specie hanno un optimum di temperatura tra i 20 e i 25°C con un range che va da 5 a 28°C (CARETTA *et al.*, 1994; ZUCCONI *et al.*, 1996). Lo screening enzimatico (CARETTA *et al.*, 1996; FENICE *et al.*, 1997) è relativamente basso rispetto a ceppi di altre specie isolate in Antartide, indicando quindi una limitata versatilità nutrizionale. Per quanto riguarda *A. ferox*, indagini sugli effetti degli UV su questo fungo (ARCANGELI *et al.*, 1997; ARCANGELI, CANNISTRARO, 2000; ARCANGELI *et al.*, 2000; ZUCCONI *et al.*, 2002) hanno mostrato una maggiore resistenza di questo fungo alla radiazione UV-B grazie alla presenza di sostanze fotoprotettive (pigmenti tipo carotenoidi) quantificabile con una più alta percentuale di germinabilità e un diverso spettro di emissione fluorescente rispetto a specie simili ma provenienti da medie latitudini (*A. oligospora*). In coltura *A. tortor* si sviluppa rapidamente e rigogliosa-

mente su muschio (CARETTA *et al.*, 1995) dove la presenza di nematodi induce la formazione di reti tridimensionali tipiche, ricche di anelli e di ife fascicolate. Risultati di prove in vitro effettuate con ceppi antartici di diverse specie nei confronti degli antimicotici più noti hanno evidenziato la sensibilità ai composti azolici ed imidazolici, ai polieni nistatina ed amfotericina B (CARETTA *et al.*, 1996). *Arthrobotrys tortor* è risultato resistente alla 5-fluorocitosina, griseofulvina, terconazolo e fluconazolo. Su questo ceppo sono state portate avanti indagini biochimiche che hanno dato risultati di rilievo sulla produzione della collagenasi (TOSI *et al.*, 2001). Il ceppo antartico di *A. tortor* infatti presenta una produzione di questo enzima tre volte superiore rispetto al ceppo europeo ed a specie simili. Tale produzione, inoltre, è risultata costitutiva.

In questa nota riportiamo risultati ottenuti sui funghi predatori di nematodi dell'Antartide continentale, ottenuti in ricerche che hanno contemplato: analisi floristica, tipologia delle trappole prodotte, tempi e condizioni trofiche per la produzione delle trappole, individuazione di sostanze nematocide coinvolte nel processo di predazione.

MATERIALI E METODI

Coltura di nematodi

Per le analisi qui di seguito riportate è stata utilizzata una coltura di nematodi della specie *Caenorhabditis elegans* fatta crescere su NGM (TOSI *et al.*, 2002) con *Escherichia coli* 0P50, forniti dal Caenorhabditis Genetic Center dell'Università del Minnesota. I nematodi sono stati aggiunti alle colture fungine come sospensione in acqua distillata sterile in ragione di 100 individui/ml.

Indagine floristica

L'indagine floristica sulla presenza di funghi predatori di nematodi in Antartide Continentale è stata effettuata su 43 campioni di muschio e materiale ornitogenico raccolti in un periodo che va dal 1987 al 1999 in un'area della Terra Vittoria estesa dal 74° al 76°S e dal 162° al 165°E. Ogni campione è stato sminuzzato e distribuito in piastre Petri contenenti Agar acqua e mantenuto a temperatura ambiente (20°). Dopo 3-4 giorni ad ogni piastra è stata aggiunta una sospensione di nematodi come esca, secondo quanto suggerito da BARRON (1977). Le piastre sono state controllate ogni settimana per 1 mese. I ceppi isolati sono stati trasferiti su Corn Meal Agar e mantenuti a 5 °C.

Tipologia delle trappole prodotte

La produzione e il tipo di trappole prodotte dai ceppi fungini è stata valutata in coltura su Corn Meal Agar (CMA, DIFCO) e in presenza di nematodi. La produzione di trappole è stata controllata settimanalmente allo stereoscopio ed al microscopio in preparati su vetrino allestiti con lattofenolo-fucsina acida 1%, lattofenolo e lattofenolo-cotton blue.

Tempi e condizioni trofiche per la produzione delle trappole

Tempi e condizioni trofiche per la produzione delle trappole sono state comparativamente valutate in ceppi antartici di *Arthrobotrys*, incluso *A. tortor* e in ceppi europei (*A. conoides*, *A. tortor*, isolato in Polonia e *A. oligospora*) in presenza ed in assenza di nematodi, su AA e CMA, a temperatura ambiente (20°C). La produzione di trappole è stata controllata al binoculare ed al microscopio ogni 5 ore per le prime 15 ore poi ogni 8 ore fino a tre giorni ed ogni 24 ore fino a 15 giorni.

Produzione di sostanze nematocide

In particolare questa ricerca è stata effettuata solo su *A. tortor* isolato in Antartide. Colture fungine di questa specie sono state allestite su membrana semipermeabile posta in piastre Petri contenenti PDA con e senza nematodi e mantenute a temperatura ambiente. Dopo 2 settimane ogni coltura fungina è stata raccolta con una spatola sterile quindi liofilizzata. Il liofilizzato è stato sospeso in acetato di etile con aggiunta di solfato di magnesio anidro, quindi filtrato. 4.1 g di liofilizzato hanno dato 145 mg di estratto totale con una resa del 3.5 %. L'estratto è stato separato per cromatografia su una colonna di gel di silice ed è stata così isolata la frazione di acidi grassi liberi. Per mettere in evidenza la presenza di acido linoleico, sostanza nematocida già evidenziata in altri funghi predatori (STADLER *et al.*, 1993), è stata effettuata una metilazione degli acidi grassi per permetterne una migliore separazione mediante gas-cromatografia seguita da un'analisi allo spettrometro di massa. L'identificazione del metil estere dell'acido linoleico è avvenuta per confronto dei tempi di ritenzione e dello spettro di massa con un campione autentico.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Indagini floristiche

Dai campioni di materiale muscicolo ed ornitogenico esaminati sono stati isolati 30 ceppi di funghi predatori di nematodi. Essi sono stati isolati da 12 dei 43 campioni analizzati e per l'80% da muschio. Uno di questi ceppi è stato identificato come specie del genere *Nematocionus*; presentava ife con connessioni a fibbia e trappole per i nematodi con tipica forma a clessidra. Esso rappresenta la prima segnalazione di questo genere in Antartide sia marittimo che continentale. Gli altri ceppi erano rappresentanti di specie del genere *Arthrobotrys* con trappole tipiche a rete tridimensionale adesiva sulla base della nuova definizione proposta da SCHOLLER *et al.* (1999). Lievi differenze nell'ambito dei ceppi riguardavano il colore della colonia che variava dal bianco rosato all'arancione intenso e zonazioni della colonia, costanti nel tempo. I conidi, 1 settati, dalla forma ovoidale ad ellissoidale presentavano dimensioni con range ristretti in alcuni ceppi e molto ampi in altri. Dalla forma del conidioforo e dei conidi i ceppi rientrano per certi aspetti in *Arthrobotrys superba* per altri in quella di *A. tortor*. Alcuni ceppi presentavano fusio-

ne dei conidi e dei conidi alle ife, fenomeno già osservato da HAY (1995) su *A. conoides* ed *A. cladodes*. Grazie all'uso di una tecnica selettiva è stato possibile isolare un alto numero di ceppi che fino ad ora erano comparsi sporadicamente in letteratura nel panorama degli isolamenti fungini antartici. Dai risultati ottenuti si deduce che i funghi predatori di nematodi sono ampiamente distribuiti in Antartide e rappresentati principalmente dal genere *Arthrobotrys*. La presenza di *Nematoctonus* in questo continente è molto interessante nell'ambito del problema relativo al mondo della biodiversità dei funghi predatori di nematodi.

Tipologia delle trappole prodotte

Tutti i ceppi di funghi predatori isolati in Antartide, compresa *Arthrobotrys ferox*, hanno prodotto trappole a rete tridimensionale adesiva, eccetto *Nematoctonus* sp. Nella revisione del genere *Arthrobotrys* pubblicata da SCHOLLER *et al.* (1999). *Arthrobotrys ferox*, è stata inclusa in *Dactylellina* per la produzione di bottoni adesivi. Il ceppo in questione, sulla base delle nostre ricerche, è capace di produrre anche tipiche trappole a rete tridimensionale adesive, quando coltivato in presenza di nematodi. La sua eventuale posizione nel dendrogramma di HAGEDORN, SCHOLLER (1999) merita forse una conferma da un'analisi biomolecolare del ceppo.

Tempi e condizioni trofiche per la produzione delle trappole

I risultati hanno messo in evidenza che la formazione di trappole a reti tridimensionali adesive avviene entro le prime 5 ore dall'inoculo di nematodi in piastra solo per il ceppo antartico di *Arthrobotrys tortor*. Il ceppo europeo polacco della stessa specie, produce le trappole dopo 10 hr dall'inoculo dei nematodi. Altre specie, di varia provenienze non antartiche, sono in grado di formare reti solo dopo intervalli compresi tra le 15-40 ore dall'aggiunta dei nematodi. Questi risultati mettono in evidenza come il ceppo antartico di *A. tortor* rispetto ad altri ceppi antartici ed europei risulta particolarmente attivo contro i nematodi. Va inoltre segnalato che *A. tortor* è la sola specie in grado di produrre trappole anche in assenza di nematodi, preferibilmente su terreni poveri come AA o CMA, caratteristica questa di aggressività distintiva nel panorama del comportamento dei funghi predatori che di norma producono trappole solo se in presenza di nematodi.

Produzione di sostanze nematocide

L'analisi condotta sui metaboliti secondari del ceppo antartico *Arthrobotrys tortor* ha messo in evidenza una produzione di acido linoleico sia nei trattati con nematodi che nei controlli senza nematodi. L'aggiunta di nematodi non ha messo in evidenza la comparsa di metaboliti secondari diversi, ma diversa produzione in termini di quantità relative. Si verifica, infatti, nel trattato un aumento dell'ergosterolo e degli acidi grassi, compreso l'acido linoleico, pari a 10 volte il controllo. L'acido linoleico è un composto

nematocida prodotto dai funghi predatori di nematodi e potrebbe essere quindi coinvolto nel processo di predazione anche del ceppo antartico di *A. tortor*.

CONCLUSIONI

Nell'ambito del genere *Arthrobotrys*, il gruppo dei funghi antartici predatori di nematodi presenta un elevato potenziale biologico di indagine. La spiccata attività predatoria evidenziabile dai dati ottenuti negli studi sulle caratteristiche biochimiche ed ecologiche, rende ragione di un gruppo altamente specializzato a vivere in un ambiente estremo come l'Antartide. Indagini tassonomiche, biochimiche e biomolecolari verranno da noi eseguite sui numerosi ceppi recentemente isolati; indagini queste che sono fondamentali anche per le importanti prospettive applicative nell'ambito della lotta biologica verso gli organismi patogeni.

Ringraziamenti – Il lavoro è stato svolto nell'ambito del Programma Nazionale di Ricerche in Antartide. Si ringrazia il il Caenorhabditis Genetics Center per aver fornito i nematodi, la Dr.ssa Barbara Surace per aver osservato con costanza la formazione delle trappole nei funghi studiati.

LETTERATURA CITATA

- ARCANGELI C., CANNISTRARO S., 2000 – *In situ Raman microspectroscopic identification and localization of carotenoids: approach to monitoring of Uv-B irradiation stress on Antarctic fungus*. *Biospectroscopy*, 57: 179-189.
- ARCANGELI C., YU W., CANNISTRARO S., GRATTON E., 2000 – *Two-photon autofluorescence microscopy and spectroscopy of Antarctic fungus: new approach for studying effects of Uv-B irradiation*. *Biospectroscopy*, 57: 218-225.
- ARCANGELI C., ZUCCONI L., ONOFRI S., CANNISTRARO S., 1997 - *Fluorescence study on whole Antarctic fungal spores under enhanced Uv irradiation*. *J. Photochem. Photobiol. Biol.*, 39: 258-264.
- BARRON G.L., 1977 – *The Nematode-destroying Fungi*. *Topics in Mycobiology No 1*. Can. Biol. Publ. Ltd. Guelph, Ontario, Canada. 140 pp.
- CARETTA G., DEL FRATE G., GUGLIELMINETTI M., PICCO A., 1996 – *Morphological and physiological considerations on some Antarctic fungi*. *Proc. third meeting on Antarctic Biology*: 287-291. Santa Margherita Ligure, Decem. 13-14 1996. Camerino University Press.
- CARETTA G., DEL FRATE G., MANGIAROTTI A.M., 1994 – *A record of Arthrobotrys tortor Jarowaja and Engyodontium album (Limber) de Hoog from Antarctica*. *Bol. Micol.*, 9: 9-13.
- CARETTA G., DEL FRATE G., TOSI S., 1995 – *Nematophagous activity on moss as cultural substratum of Arthrobotrys tortor Jarowaja isolated in Antarctica*. *Bol. Micol.*, 10 (1-2): 37-41.
- FENICE M., SELBMANN L., ZUCCONI L., ONOFRI S., 1997 – *Production of extracellular enzymes by Antarctic fungal strains*. *Polar Biol.*, 17: 275-280.
- GRAY N.F., LEWIS SMITH R.I., 1984 – *The distribution of nematophagous fungi in the maritime Antarctic*. *Mycopathologia*, 85: 81-92.
- HAGEDORN G., SCHOLLER M., 1999. *A reevaluation of predatory orbiliaceous fungi. I. Phylogenetic analysis using rDNA sequence data*. *Sydowia*, 51: 27-48.

- HAY F.S., 1995 – *Unusual germination of spores of Arthrobotrys conoides and A. cladodes*. Mycol. Res., 99: 981-982.
- ONOFRI S., TOSI S., 1992 – *Arthrobotrys ferox sp. nov., a springtail-capturing hyphomycete from Continental Antarctica*. Mycotaxon, 44 (2): 445-451.
- SCHOLLER M., HAGEDORN G., RUBNER A., 1999 – *A reevaluation of predatory orbiliaceous fungi. II. A new generic concept*. Sydowia, 51: 89-113.
- STADLER M., ANKE H., STERNER O., 1993 – *Linoleic acid – The nematocidal principle of several nematophagous fungi and its production in trap-forming submerged cultures*. Arch. Microbiol., 160: 401-405
- TOSI S., ANNOVAZZI L., TOSI I., IADAROLA P., CARETTA G., 2001 – *Collagenase production in an Antarctic strain of Arthrobotrys tortor Jarowaja*. Mycopathologia, 153: 157-162.
- TOSI S., CASADO B., GERDOL R., CARETTA G., 2002 – *Fungi isolated from Antarctic mosses*. Polar Biol., 25: 262-268
- ZUCCONI L., PAGANO S., FENICE M., SELBMANN L., TOSI S., ONOFRI S., 1996 – *Growth temperature preferences of fungal strains from Victoria Land, Antarctica*. Polar Biol., 16: 53-61.
- ZUCCONI L., RIPA C., SELBMANN L., ONOFRI S., 2002 – *Effects of UV on the spores of the fungal species Arthrobotrys oligospora and A. ferox*. Polar Biol., 25: 500-505.

RIASSUNTO – Vengono riportati dati floristici ed ecofisiologici sui funghi predatori di nematodi dell'Antartide Continentale. Trenta nuovi ceppi di *Arthrobotrys* ed un ceppo di *Nematoctonus* sono stati isolati da campioni prevalentemente di muschio, provenienti dalla Terra Vittoria. Il ceppo di *Nematoctonus* rappresenta la prima segnalazione di questo genere per l'Antartide. Il ceppo antartico di *Arthrobotrys tortor* è risultato il più attivo nella predazione producendo le trappole adesive in meno di 5 ore dall'aggiunta di nematodi. In questo ceppo la produzione di trappole avviene anche in assenza di nematodi. Durante la predazione, nel ceppo antartico di *Arthrobotrys tortor*, la produzione di acido linoleico, sostanza nematocida, incrementa di un fattore 10 rispetto ai controlli.

AUTORI

Solveig Tosi, Giuseppe Del Frate, Giuseppe Caretta, Sezione di Micologia, Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri, Università di Pavia, Via S. Epifanio 14, 27100 Pavia, e-mail: stosi@et.unipv.it
Giovanni Vidari, Dipartimento di Chimica Organica, Università di Pavia, Via Taramelli 10, 27100 Pavia

La biodiversità dei lieviti isolati da ambienti tropicali: una fonte potenziale di molecole di interesse biotecnologico

P. BUZZINI, A. E. VAUGHAN, B. TURCHETTI e A. MARTINI

ABSTRACT - *The biodiversity of yeasts isolated from tropical environments: a potential source of biotechnologically interesting molecules* - Although the current literature underlined the potential represented by the microbial biodiversity of unexplored (often extreme) environments, only a few studies have been carried out on the metabolic properties possessed by yeasts isolated from natural ecosystems of tropical origin. In the present paper, the results of the isolation of yeasts from natural habitats of Brazilian rain forests and the screening of their ability to produce different kinds of industrially relevant molecules (killer proteins, extracellular enzymes, volatile organic compounds) are presented.

Key words: ambienti tropicali, composti volatili, enzimi extracellulari, lieviti, proteine killer

INTRODUZIONE

Nel corso degli ultimi decenni gli sforzi rivolti allo studio ed alla selezione di lieviti per uso industriale sono stati prevalentemente condotti, salvo alcune eccezioni, secondo uno schema di successivo reimpianto dei ceppi selezionati in tecnologie di tipo tradizionale, legate soprattutto all'industria alimentare (starters per la produzione di vino, birra, pane, ecc.). Recenti studi hanno tuttavia dimostrato che questo gruppo di microrganismi possiede vaste ed interessanti potenzialità metaboliche che potrebbero essere utilmente impiegate in rilevanti applicazioni biotecnologiche (DEMAIN *et al.*, 1998).

Nonostante i grandi progressi compiuti negli ultimi anni negli studi di genetica e fisiologia microbica, la crescente utilizzazione di microrganismi selezionati per la produzione di composti di interesse industriale continua a stimolare un notevole interesse nei riguardi della esplorazione della biodiversità microbica (BULL *et al.*, 1992). In questo senso, nuove ed interessanti opportunità potrebbero essere messe in evidenza da programmi di screening orientati verso la ricerca di ceppi produttori di ben definiti gruppi di molecole di interesse commerciale (CHEETHAM, 1987; STEELE, STOWERS, 1991; BULL *et al.*, 1992; COLWELL, 1997). Sebbene la letteratura recente sottolinei l'enorme potenziale rappresentato dallo studio della biodiversità microbica presente in ambienti inesplorati, spesso estremi, o comunque poco antropizzati, solo pochi studi sono stati finora condotti relativamente alle proprietà metaboliche possedute da lieviti isolati da ecosistemi naturali di origine tro-

pica.

Nel presente studio sono riportati i risultati di una esplorazione di carattere pluriennale relativa alla produzione, da parte di lieviti isolati da habitats naturali caratteristici di foreste pluviali brasiliane, di molecole di vario tipo (proteine killer, enzimi extracellulari, composti volatili) utilizzabili dall'industria chimica, alimentare e farmaceutica

PRODUZIONE DI PROTEINE KILLER

Vengono comunemente denominati "killer" quei lieviti che producono specifiche tossine (micocine) in grado di uccidere altri ceppi (chiamati "sensibili") appartenenti alla stessa o ad altra specie. Allo stesso modo, i lieviti che non producono micocine e non sono sensibili a quelle prodotte da altri ceppi vengono denominati "neutri" (GOLUBEV, 1998). A partire dalla prima scoperta del fenomeno killer, avvenuta circa 40 anni or sono in ceppi appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae* (BEVAN, MAKOVER, 1963), la presenza di questo carattere è stata osservata in oltre 90 specie di lieviti ascomiceti e basidiomiceti (ROSINI, 1983, 1985; YOUNG, 1987; GOLUBEV, 1998; BUZZINI, MARTINI, 2000a).

In tutte le micocine finora studiate è stata evidenziata una struttura proteica o glicoproteica, con pesi molecolari generalmente compresi tra 5.000-10.000 e 100.000 Da o superiori (YOUNG, 1987; GOLUBEV, 1998). Per quanto riguarda la loro modalità di azione, due sono i meccanismi finora ipotizzati (YOUNG, 1987; GOLUBEV, 1998):

- formazione di pori attraverso la membrana cellulare con successiva perdita di ioni K⁺, molecole di ATP e conseguente riduzione del potenziale elettrochimico transmembrana;
- arresto del ciclo di sviluppo cellulare a livello della fase G1.

Studi condotti su ceppi appartenenti a differenti specie hanno messo in evidenza che il carattere killer può essere espressione di geni localizzati sia su cromosomi che su plasmidi (YOUNG, 1987; GOLUBEV, 1998).

Tra i differenti parametri in grado di influenzare l'espressione delle differenti proteine killer, i più importanti sono pH e temperatura. Anche una differente azione osmotica, sotto forma di concentrazioni crescenti di glicerolo o di NaCl, sembra esercitare una moderata influenza (LEHMANN *et al.*, 1987; YOUNG, 1987; GOLUBEV, 1998).

Sebbene l'espressione di questo carattere da parte dei lieviti killer sia universalmente vista come un vantaggio di tipo selettivo nei confronti di ceppi sensibili (YOUNG, 1987; GOLUBEV, 1998), la capacità di produrre micocine è ancora lontana da essere considerata un carattere diffuso in natura. Esistono tuttavia evidenze scientifiche che hanno messo in evidenza una elevata frequenza di ceppi killer tra isolati di origine ambientale. Studi compiuti su ceppi di origine tropicale (ambienti forestali umidi di Brasile ed Argentina) hanno evidenziato una incidenza di ceppi killer decisamente superiore a quanto precedentemente rilevato in precedenti esplorazioni (BUZZINI, MARTINI, 2000a). Parallelamente a questo, l'espressione del carattere killer in ceppi appartenenti ad un considerevole numero di specie mai precedentemente viste prima come produttrici di tossine killer sembra confermare che questo fenomeno sia molto più diffuso negli ecosistemi naturali di quanto precedentemente supposto (BUZZINI, MARTINI, 2000a).

Il biocontrollo di processi fermentativi nei confronti di contaminanti di origine ambientale (ROSINI, CANTINI, 1987; PALPACELLI *et al.*, 1991; ALFENORE *et al.*, 2000) così come l'uso di pannelli di ceppi killer per la caratterizzazione intraspecifica di lieviti di interesse industriale o clinico (MORACE *et al.*, 1983; POLONELLI *et al.*, 1983; VAUGHAN-MARTINI *et al.*, 1988; VAUGHAN-MARTINI, ROSINI, 1989; BUZZINI, MARTINI, 2000b, c) sono state proposte quali possibili applicazioni del fenomeno killer.

La scoperta di proteine killer attive contro lieviti patogeni causanti micosi sistemiche ha inoltre suggerito il loro impiego come agenti di tipo antimicotico (POLONELLI *et al.*, 1986; HODGSON *et al.*, 1995). Tuttavia, le micocine finora studiate hanno manifestato, con sole alcune eccezioni (MATTEWS *et al.*, 1998), una perdita pressoché totale di attività al di sopra di una soglia di temperatura pari a 25-30°C. I dati riportati in letteratura, ottenuti saggiando tossine killer, molto spesso inattive a 37°C, contro un piccolo numero di lieviti patogeni, scelti talvolta secondo criteri del tutto empirici (LEHMANN *et al.*, 1987; YAMAMOTO *et al.*, 1988; HODGSON *et al.*, 1995), presentano pertanto una utilità estremamente limitata.

L'isolamento di lieviti di origine tropicale ha portato alla selezione di ceppi in grado di esprimere il carattere killer contro lieviti patogeni anche a temperature intorno a 37-40 °C (BUZZINI, MARTINI, 2001). I risultati di un recente screening condotto su larga scala utilizzando tossine killer attive a 37°C su ceppi di lievito patogeni è riportato in Tab. 1 e 2.

La disponibilità di tossine killer attive a 37°C o a temperature superiori potrebbe quindi aprire nuove prospettive per il loro sfruttamento commerciale come agenti di tipo antimicotico. Attualmente sono in corso studi di purificazione e caratterizzazione di alcune tossine prodotte da questi ceppi.

TABELLA 1

Attività killer a 37°C di lieviti isolati da ambienti tropicali.

Killer activity at 37°C of yeasts isolated from tropical environments.

specie	ceppi	ceppi killer								
		F17	G7A	Di29	P41	C33	C85	Di8	Di28	3649
		numero ceppi uccisi								
<i>Candida albicans</i>	72			36		15	13	30	36	24
<i>Candida glabrata</i>	38			24	38	8	15	18	25	22
<i>Candida parapsilosis</i>	20	1	1	14	20	6	9	12	15	13
<i>Candida tropicalis</i>	13	12	13	13		13	13	13	13	13
<i>Candida zeylanoides</i>	18	9	10	16	13	8	11	15	16	15
<i>Cryptococcus laurentii</i>	25			1	2			1	1	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	41	10	5	12	39	10	12	11	14	14
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	53	1	1	50	52	42	47	48	50	48
<i>Pichia guilliermondii</i>	26	7	8	20	21	15	15	19	20	16
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15			13	15	6	5	13	13	9
<i>Trichosporon spp.</i>	19			1	9	1	1	1	1	1

TABELLA 2

Gradiente di attività killer a differenti temperature di lieviti isolati da ambienti tropicali.
Killer activity of yeasts isolated from tropical environments at different temperatures.

specie	ceppo killer	specie	ceppo sensibile	attività massima (mm ²)*	temperatura (°C)				
					20	25	30	37	40
					% della attività massima**				
<i>C. maltosa</i>	F17	<i>C. tropicalis</i>	DBVPG 3223	124.5	85 ^b	100 ^a	87 ^b	69 ^c	0
<i>C. maltosa</i>	G7A	<i>C. tropicalis</i>	DBVPG 3223	129.9	100 ^a	66 ^b	61 ^b	56 ^b	0
<i>Deb. hansenii</i>	P41	<i>C. glabrata</i>	DBVPG 6518	188.5	100 ^a	85 ^b	79 ^b	65 ^c	40 ^d
<i>Deb. hansenii</i>	P41	<i>I. orientalis</i>	DBVPG 6782	311.3	100 ^a	84 ^b	85 ^b	74 ^c	43 ^d
<i>Deb. hansenii</i>	P41	<i>K. marxianus</i>	DBVPG 6023	180.8	100 ^a	95 ^a	86 ^b	68 ^c	51 ^d
<i>Deb. hansenii</i>	P41	<i>S. cerevisiae</i>	DBVPG 1850	229.8	100 ^a	94 ^a	71 ^b	46 ^c	0
<i>Deb. hansenii</i>	Di29	<i>K. marxianus</i>	DBVPG 6023	109.2	92 ^a	100 ^a	38 ^b	12 ^c	0
<i>P. anomala</i>	Di28	<i>C. albicans</i>	DBVPG 3210	221.2	100 ^a	99 ^a	96 ^a	64 ^b	0
<i>P. anomala</i>	C33	<i>C. albicans</i>	DBVPG 3210	196.2	100 ^a	95 ^a	66 ^b	36 ^c	0
<i>P. anomala</i>	C85	<i>C. albicans</i>	DBVPG 3210	175.1	94 ^a	100 ^a	67 ^b	23 ^c	0
<i>P. anomala</i>	DBVPG 3649	<i>K. marxianus</i>	DBVPG 6023	166.6	100 ^a	89 ^b	48 ^c	33 ^d	0
<i>P. anomala</i>	Di8	<i>S. cerevisiae</i>	DBVPG 1850	124.5	100 ^a	93 ^a	30 ^b	19 ^c	0

*area di inibizione misurata con ADWB; **differenti lettere indicano differenze significative (P < 0.01)

PRODUZIONE DI ENZIMI EXTRACELLULARI

Il potenziale rappresentato dall'uso di lieviti food-grade come fonti di enzimi di rilevante interesse commerciale ha stimolato nel corso degli ultimi anni un gran numero di studi sulla presenza di enzimi extracellulari nei lieviti (BILINSKI, STEWARD, 1990; BURDEN, EVELEIGHT, 1990; DE MOT, 1990; RATLEDGE, TAN, 1990). Tuttavia, nuove ed interessanti opportunità potrebbero essere rivelate da programmi sistematici di screening per la selezione di ceppi possedenti attività enzimatiche di interesse industriale ben definite. Infatti, se si escludono gli studi condotti su ceppi di interesse enologico (ROSI *et al.*, 1994; STRAUSS *et al.*, 2001), solo un ridotto numero di lieviti sono stati finora saggiati (BURDEN, EVELEIGHT, 1990).

Recenti investigazioni hanno messo in evidenza il potenziale rappresentato da lieviti di origine ambientale, in particolare di quelli isolati da ambienti tropicali (BUZZINI, MARTINI, 2002).

In particolare, i dati riportati in Tab. 3 dimostrano che la presenza di attività enzimatiche extracellulari rappresenta un carattere estremamente diffuso tra i lieviti ascomiceti e basidiomiceti.

PRODUZIONE DI COMPOSTI VOLATILI

La domanda di composti volatili (VOCs), alcoli ed esteri in particolare, ha presentato in anni recenti un trend in continua crescita principalmente a causa del loro impiego come ingredienti nell'industria alimentare, farmaceutica e cosmetica. Recenti dati (1994)

stimano infatti il giro d'affari del mercato dei VOCs intorno ai 10 miliardi di \$ (CHEETHAM, 1997).

Sebbene la sintesi per via chimica rappresenti ancora, per molti di essi, la tecnologia di produzione economicamente più conveniente, in anni recenti è stato evidenziato un notevole incremento nel consumo di prodotti "biologici", utilizzando cioè solo ingredienti di origine naturale (CHEETHAM, 1997). Tuttavia, poiché i VOCs di origine vegetale (es. estratti da frutti) presentano sia una marcata variabilità in funzione delle differenti provenienze nonché problemi legati a produzioni di tipo stagionale (LOMASCOLO *et al.*, 1999; HARI KRISHNA, KARANTH, 2002), è stata esplorata la possibilità di utilizzare differenti gruppi di microrganismi food-grade per la produzione di composti volatili di interesse industriale. Di conseguenza, nel corso degli anni passati, molte industrie hanno condotto screening su larga scala utilizzando differenti gruppi di microrganismi per la selezione di ceppi produttori di VOCs (CHEETHAM, 1997).

Recenti ricerche hanno messo in evidenza il potenziale rappresentato da lieviti di origine ambientale (BUZZINI *et al.*, 2003). Studi condotti su lieviti di origine tropicale hanno rivelato una apprezzabile capacità biosintetica in termini di produzione di alcoli superiori (amilico ed isoamilico), aldeidi (2-metil-2-esenale e 2-isopropil-5-metil-2-esenale) ed esteri (etil isobutirrato, isobutil acetato, isoamil acetato, 2-metilbutil acetato, etil isovalerato, isoamil propionato, fenilmetil acetato) (Tab. 4). Le percentuali di ceppi produttori di particolari classi di VOCs

TABELLA 3

*Attività enzimatiche extracellulari di lieviti isolati da ambienti tropicali.**Extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from tropical environments.*

genere	specie	ceppi	% di ceppi positivi					
			SDA	EsA	LipA	PrA	PectA	ChA
<i>Candida</i>	6	49	0	30.6	69.4	4.1	2.0	0
<i>Debaryomyces</i>	2	25	0	16.0	84.0	0	0	0
<i>Geotrichum</i>	1	10	10	0	50	10	0	0
<i>Hanseniaspora</i>	2	8	12.5	0	50.0	0	0	0
<i>Pichia</i>	9	90	5.5	7.8	58.9	4.4	2.2	0
<i>Saccharomyces</i>	1	4	0	0	25.0	0	0	0
<i>Torulaspota</i>	1	5	0	20.0	20.0	0	0	0
<i>Zygosaccharomyces</i>	1	3	0	33.3	0	0	0	0
<i>Cryptococcus</i>	4	66	12.1	90.9	21.2	9.1	0	15.1
<i>Pseudozyma</i>	2	54	1.8	77.8	0	75.9	53.7	0
<i>Rhodotorula</i>	4	36	8.3	69.4	19.4	2.8	0	0

è risultata, nelle condizioni sperimentali considerate, estremamente elevata (Tab. 4) (BUZZINI *et al.*, 2003).

CONSIDERAZIONI FINALI E PROSPETTIVE FUTURE

Come sottolineato da vari autori (CHEETHAM, 1987; STEELE, STOWER, 1991; BULL *et al.*, 1992), i metaboliti primari e secondari di origine microbica hanno rappresentato e tuttora rappresentano una sorgente di nuovi prodotti chimici di rilevante interesse in campo alimentare, chimico e farmaceutico. La produzione di antibiotici rappresenta in tal senso il caso più eclatante, con oltre 10.000 nuovi composti scoperti nel corso degli ultimi 50 anni (BULL *et al.*, 1992; PORTER, FOX, 1993). Più di recente, screening sono stati condotti su differenti gruppi microbici per la messa in evidenza di varie classi di molecole ad attività antimicotica, antivirale ed antitumorale (CHEETHAM, 1987; BULL *et al.*, 1992). I funghi (lieviti e muffe) sono anche risultati particolarmente utili nella produzione di composti ad attività auxinica così come nella produzione di composti di tipo insetticida (CHEETHAM, 1987; BULL *et al.*, 1992).

Le applicazioni biotecnologiche hanno avuto nel corso degli ultimi anni sviluppi, talvolta spettacolari, legati principalmente all'uso di tecnologie di ricombinazione del DNA. Tutto ciò ha indubbiamente prodotto grandi opportunità di tipo economico legate alla commercializzazione di nuove molecole prodotte da organismi modificati.

Tuttavia, questo tipo di approccio potrebbe talvolta rivelarsi poco appropriato per alcuni tipi di processi a causa di: i) problemi legati alla utilizzazione ed alla immissione nell'ambiente di microrganismi geneticamente modificati; ii) problemi legati alla crescente domanda, da parte di una società sempre più attenta verso questo tipo di problematiche, di composti di origine naturale, prodotti cioè da microrganismi naturalmente presenti in natura e che non abbiano

subito alcun tipo di modificazione del proprio corredo genetico.

In tal senso, come hanno recentemente sottolineato alcuni ricercatori (BULL *et al.*, 1992), sebbene i progressi delle conoscenze legate alla genetica ed alla fisiologia microbica possano aver avuto un notevole impatto sulla produzione di nuovi composti, i programmi di screening e selezione di microrganismi in grado di produrre nuove molecole continuano quindi a rappresentare un aspetto basilare della biotecnologia. Il punto di partenza di ogni tipo di sviluppo biotecnologico è pertanto rappresentato dalla ricerca e dalla scoperta di fenomeni biologici di potenziale sfruttamento commerciale e la effettiva pianificazione ed ottimizzazione dei programmi di screening rappresenta pertanto un punto cruciale nella procedura di scoperta di bioprocessi di rilevante interesse e può essere organizzata secondo una sequenza caratterizzata dalle seguenti fasi (CHEETHAM, 1987; BULL *et al.*, 1992):

- scelta di appropriati sorgenti di biodiversità microbica;
- screening per la ricerca di ceppi possedenti la proprietà desiderata;
- selezione dei ceppi produttori tra quelli oggetto di screening;
- sviluppo del processo tramite utilizzazione del ceppo/i selezionati.

Per quanto riguarda la scelta di appropriati sorgenti di biodiversità microbica, essa in genere deriva dall'isolamento di nuovi ceppi da matrici di origine ambientale. Tuttavia, allo scopo di focalizzare il lavoro di isolamento da ecosistemi naturali caratterizzati da un potenziale di biodiversità microbica e di diversità metabolica intatto, è necessario scegliere con cura la matrice dalla quale isolare i microrganismi. In tal senso, sempre nuovo interesse viene rivolto verso l'investigazione della biodiversità microbica di

TABELLA 4

VOCs prodotti da lieviti isolati da ambienti tropicali.
 VOCs produced by yeasts isolated from tropical environments.

genere	% ceppi positivi										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Candida</i>	100	100	0	10.0	5.0	20.0	75.0	15.0	0	5.0	5.0
<i>Debaryomyces</i>	100	100	0	0	0	0	87.5	0	12.5	0	0
<i>Geotrichum</i>	80.0	80.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hanseniaspora</i>	100	100	0	0	0	50.0	100	50.0	0	0	0
<i>Issatchenkia</i>	100	100	0	0	0	100	100	100	0	0	66.6
<i>Pichia</i>	92.4	96.2	1.9	1.9	0	20.7	67.9	18.9	0	26.4	16.9
<i>Torulasporea</i>	100	100	0	0	0	0	50.0	0	0	0	0

1 = alcol isoamilico; 2 = alcol amilico; 3 = 2-metil-2-esenale; 4 = 2-isopropil-5-metil-2-esenale; 5 = etil isobutirrat; 6 = isobutil acetato; 7 = isoamil acetato; 8 = 2-metilbutil acetato; 9 = etil isovalerato; 10 = isoamil propionato; 11 = fenilmetil acetato

ambienti non-convenzionali, spesso estremi, comunque poco antropizzati. In altre parole, come sottolineato da STEELE, STOWER (1991), invece di procedere all'arricchimento ed all'isolamento di microrganismi da campioni anonimi di suolo e/o acqua, i ricercatori dovrebbero rivolgere il loro interesse verso ambienti nei quali si presume che siano avvenuti processi di arricchimento di tipo naturale o che si presume racchiudano, in quanto poco o talvolta affatto inesplorati, una peculiare biodiversità microbica. L'isolamento di nuovi microrganismi da questo tipo di ambienti è infatti considerato da alcuni autori "imperativo" per incrementare le chances di trovare nuove ed interessanti attività metaboliche (BULL *et al.*, 1992).

Per quanto concerne gli screening, un aspetto fondamentale per la riuscita di questi è rappresentato dalla scelta dei criteri di selezione per la ricerca di composti di interesse commerciale prodotti da microrganismi. La presenza di risultati deludenti o la difformità di risultati ottenuti tra screening differenti è stata talvolta imputata alla utilizzazione di metodologie empiriche, poco standardizzate e talvolta obsolete (STEELE, STOWER, 1991; BULL *et al.*, 1992). In tal senso, la disponibilità di sistemi automatizzati di "bioassay", talvolta in collegamento con sistemi di rilevazione tipo CG-MS o HPLC-MS e la recente introduzione di nuovi approcci metodologici di "target-directed screening" e di disegni sperimentali innovativi hanno notevolmente incrementato il potenziale relativo alla scoperta di nuove e particolari tipi di molecole (MONAGHAN, KROUPAL, 1989; BULL *et al.*, 1992). Inoltre, il coinvolgimento di gruppi di ricerca caratterizzati da differenti competenze scientifiche, potrebbe facilitare l'organizzazione di una "filiera di screening", rappresentata dalle seguenti fasi (BULL *et al.*, 1992):

- isolamento dei microrganismi da ambienti non-convenzionali ed estremi;
- screening dei ceppi isolati per la produzione di ben definiti gruppi di molecole;

- identificazione, coltivazione dei ceppi selezionati e loro inserimento all'interno di collezioni microbiche di servizio;
- sistemi di analisi e identificazione e caratterizzazione chimica dei composti prodotti.

Per quanto riguarda il ruolo delle collezioni microbiche quali "gene bank" della biodiversità e diversità metabolica dei microrganismi isolati e selezionati nel corso delle fasi sopra descritte, negli ultimi anni molte sono state le raccomandazioni fatte dai grandi organismi internazionali di ricerca nei riguardi della esplorazione e conservazione della biodiversità microbica. La U.S. National Science Board ha stilato il seguente decalogo in proposito (BULL *et al.*, 1992):

- a) produzione di un completo inventario globale della biodiversità (inventario di tutte le specie microbiche conosciute);
- b) censimento di specifici e rappresentativi ecosistemi naturali meritevoli di conservazione;
- c) sviluppo di metodologie standard per il campionamento, coltivazione e criopreservazione di microrganismi isolati da comunità microbiche di origine naturale;
- d) incremento degli sforzi per la classificazione dei microrganismi isolati;
- e) incremento della quota di microrganismi conservati nelle collezioni di servizio locali ed internazionali e sviluppo di database accessibili online;
- f) promozione di programmi internazionali per lo scambio e la valorizzazione della biodiversità isolata e conservata tramite programmi di screening su larga scala.

LETTERATURA CITATA

- ALFENORE S., DELLA M.L., STRHEHAIANO P., 2000 - *Environmental parameters affecting the K2 killer toxin production and its activity*. Proc. 10th Int. Symp. Yeasts: 219-220. Papendal, Arnhem, The Netherlands, 27/8-1/9 2000.
- BEVAN E.A., MAKOVER M., 1963 - *The physiological basis of the killer character in yeasts*. Proc. 11th Int. Congr. Genet., 1: 202-203.

- BILINSKI C.A., STEWARD G.G., 1990 – *Yeast proteases and brewing*. In: VERACHTERT H., DE MOT R. (eds.), *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*: 147-162. Marcel Dekker, Inc. New York.
- BULL A.T., GOODFELLOW M., SLATER J.H., 1992 – *Biodiversity as a source of innovation in biotechnology*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 46: 219-252.
- BURDEN D.W., EVELEIGHT D.E., 1990 – *Yeasts. Diverse substrates and products*. In: VERACHTERT H., DE MOT R. (eds.), *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*: 199-227. Marcel Dekker, Inc. New York.
- BUZZINI P., MARTINI A., 2000a – *Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from the Brazilian rain forest*. *Can. J. Microbiol.*, 46: 607-611.
- , 2000b – *Utilisation of differential killer toxin sensitivity patterns for fingerprinting and clustering yeast strains belonging to different genera*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 23: 450-457.
- , 2000c – *Differential growth inhibition as a tool to increase the discriminating power of killer toxin sensitivity in fingerprinting of yeasts*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 193: 31-36.
- , 2001 – *Large-scale screening of selected Candida maltosa, Debaryomyces hansenii and Pichia anomala killer toxins activity against pathogenic yeasts*. *Med. Mycol.*, 39: 479-482.
- , 2002 – *Extracellular enzymatic activity profiles of yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments*. *J. Appl. Microbiol.*, 93: 1020-1025.
- BUZZINI P., MARTINI A., CAPPELLI F., PAGNONI U.M., DAVOLI P., 2003 – *A study on volatile organic compounds (VOCs) produced by tropical ascomycetous yeasts*. A. van Leeuwenhoek (in press).
- CHEETHAM P.S.J., 1987 – *Screening for novel biocatalysts*. *Enzyme Microb. Technol.*, 9: 94-213.
- , 1997 – *Combining the technical push and the business pull for natural flavours*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 55: 1-49.
- COLWELL R.R., 1997 – *Microbial diversity: the importance of exploration and conservation*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 18: 302-307.
- DEMAIN A.L., PHAFF H.J., KURTZMAN C.P., 1998 – *Agricultural and industrial significance of yeasts*. In: KURTZMAN C.P., FELL J.W. (eds.), *The yeasts. A Taxonomic Study*: 13-19. Elsevier Science Publisher B. V. Amsterdam.
- DE MOT R., 1990 – *Conversion of starch by yeasts*. In: VERACHTERT H., DE MOT R. (eds.), *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*: 163-222. Marcel Dekker, Inc. New York.
- GOLUBEV W., 1998 – *Mycocins (killer toxins)*. In: KURTZMAN C.P., FELL J.W. (eds.), *The yeasts. A Taxonomic Study*: 55-62. Elsevier Science Publisher B. V. Amsterdam.
- HARI KRISHNA S., KARANTH N.G., 2002 – *Response surface modeling of lipase-catalysed isoamyl propionate synthesis*. *Food. Chem. Technol.*, 67: 32-36.
- HODGSON V.J., BUTTON D., WALKER G.M., 1995 – *Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast Williopsis mrakii*. *Microbiology*, 141: 2003-2012.
- LEHMANN P.F., LEMON M.B., FERENCAK W.J., 1987 – *Antifungal compounds (killer factors) produced by Kluyveromyces species and their detection on an improved medium containing glycerol*. *Mycologia*, 79: 790-794.
- LOMASCOLO A., STENTELAIRE C., ASTHER M., LESAGE-MEESSEN L., 1999 – *Basidiomycetes as a new biotechnological tools to generate aromatic flavours for the food industry*. *Trend Biotechnol.*, 17: 282-289.
- MATTEWS H.L., CONTI S., WITEK-JANUSEK L., POLONELLI L., 1998 – *Effect of Pichia anomala killer toxin on Candida albicans*. *Med. Mycol.*, 36: 199-204.
- MONAGHAN R.L., KOUPAL L.R., 1989 – *Use of the Plackett & Burman technique in a discovery program for new natural products*. In: DEMAIN A.L. et Al. (eds.), *Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture*: 25-32. Elsevier Science Publisher B. V. Amsterdam.
- MORACE G., ARCHIBUSACCI C., SESTITO M., POLONELLI L., 1983 – *Strain differentiation of pathogenic yeasts by the killer system*. *Mycopathologia*, 84: 81-85.
- PALPACELLI V., CIANI M., ROSINI G., 1991 – *Activity of different killer yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 84: 75-78.
- POLONELLI L., ARCHIBUSACCI C., SESTITO M., MORACE G., 1983. *Killer system: a simple method for differentiating Candida albicans strains*. *J. Clin. Microbiol.*, 17: 774-780.
- POLONELLI L., LORENZINI R., DE BERNARDINIS F., MORACE G., 1986. *Potential therapeutic effect of yeast killer toxin*. *Mycopathologia*, 96: 103-107.
- PORTER N., FOX F.M., 1993 – *Diversity of microbial products. Discovery and applications*. *Pestic. Sci.*, 39: 161-168.
- RATLEDGE C., TAN K.H., 1990 – *Oils and fats. Production, degradation and utilisation by yeasts*. In: VERACHTERT H., DE MOT R. (eds.), *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*: 223-254. Marcel Dekker, Inc. New York.
- ROSI I., VINELLA M., DOMIZIO P., 1994 – *Characterisation of beta-glucanase activity in yeasts of oenological origin*. *J. Appl. Microbiol.*, 77: 519-527.
- ROSINI G., 1983 – *The occurrence of killer character in yeasts*. *Can. J. Microbiol.*, 29: 1462-1464.
- , 1985 – *Interaction between killer strains of Hansenula anomala var. anomala and Saccharomyces cerevisiae yeast species*. *Can. J. Microbiol.*, 31: 300-302.
- ROSINI G., CANTINI M., 1987 – *Killer character in Kluyveromyces yeasts: activity on Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 44: 81-84.
- STEELE D.B., STOWER M.D., 1991 – *Techniques for selection of industrially important microorganisms*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 45: 89-106.
- STRAUSS M.L.A., JOLLY N.P., LAMBRECHTS M.G., VAN RESEMBURG P., 2001 – *Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts*. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 182-190.
- VAUGHAN-MARTINI A., ROSINI G., 1989 – *Killer relationships within the yeast genus Kluyveromyces*. *Mycologia*, 81: 317-321.
- VAUGHAN-MARTINI A., ROSINI G., MARTINI A., 1988 – *Killer sensitivity patterns as a tool for the fingerprinting of strains within the yeast species Kluyveromyces lactis and K. marxianus*. *Biotechnol. Techniques*, 2: 293-296.
- YAMAMOTO T., UCHIDA K., HIRATANI T., 1988 – *In vitro activity of the killer toxin from Hansenula anomala against yeast and moulds*. *J. Antibiot.*, 41: 398-403.
- YOUNG T.W., 1987 – *Killer yeasts*. In: ROSE A.H., HARRISON J.S. (eds.), *The Yeasts*: 131-164. Academic Press. London.
- RIASSUNTO – Nonostante gran parte della letteratura recente abbia da tempo messo in luce l'enorme potenziale rappresentato dalla biodiversità microbica esistente in ambienti inesplorati, spesso estremi, relativamente pochi studi sono stati finora condotti nei riguardi delle proprietà metaboliche possedute da lieviti isolati da ecosistemi

naturali di origine tropicale. Nel presente lavoro sono riportati i risultati, ottenuti in alcuni anni di studio, relativi all'isolamento di lieviti da habitats naturali caratteristici di foreste pluviali brasiliane ed allo screening per la

produzione di molecole di vario tipo (proteine killer, enzimi extracellulari, composti volatili) utilizzabili dall'industria chimica, alimentare e farmaceutica.

AUTORI

Pietro Buzzini, Ann E. Vaughan, Benedetta Turchetti, Alessandro Martini, Dipartimento di Biologia Vegetale e Biotecnologie Agroambientali, Sezione di Microbiologia Applicata & Collezione dei Lieviti Industriali DBVPG, Facoltà di Agraria, Università di Perugia, Borgo XX Giugno 74, 06121 Perugia (Italy).

Caratterizzazione biologica dei funghi del compost e del vermicompost

A. ANASTASI, G.C. VARESE, S. SCANNERINI e V. FILIPELLO MARCHISIO

ABSTRACT - *Biological characterization of fungi from compost and vermicompost* - Composting is being increasingly applied for the disposal of wastes. The end product, the compost, has a high organic matter content and its biological activity can be readily exploited in agriculture and for revegetation and bioremediation. The ability of fungi to break down complex carbon sources makes them of vital importance in both the generation and application of compost. This paper illustrates the composition and functions of the mycoflora of both a compost (made solely thermophilically from plant debris) and a vermicompost (made mesophilically by the action of earthworms on plant and animal wastes). The soil dilution plate technique and different media and incubation temperatures were applied to isolate and identify fungal entities. Metabolic activities (amylase, cellulase, chitinase, ligninase, lipase, pectinase, phosphate solubilization and xylanase) of most species from both composts were evaluated with a semi-quantitative method on 14 substrates. There were substantial quali-quantitative differences in the species composition of the two composts. A total of 194 fungal entities were isolated: 52 from compost, 76 from vermicompost, 66 from both of them. This taxonomic diversity was reflected in the metabolic potential. Both mycofloras showed a good metabolic potential, but degradation activities were higher in compost.

Key words: compost application, compost hygiene, enzymatic activities, fungi, vermicompost

INTRODUZIONE

Il processo biologico del compostaggio riveste oggi un ruolo importante nelle strategie di recupero della frazione organica dei rifiuti. Esso permette di assolvere alla duplice esigenza di ridurre la mole dei rifiuti da smaltire in discarica e di convertire il rifiuto in una risorsa preziosa da impiegare in agricoltura e in numerosi settori ambientali (ALEXANDER, 1999).

I funghi, per la loro capacità di degradare anche sostanze organiche complesse e di sopravvivere in condizioni estreme, svolgono un ruolo di primo piano, sia nel processo di compostaggio, sia nelle applicazioni dei compost (SHEKAR SHARMA, JOHRI, 1992).

Nel processo tradizionale di compostaggio termofilo, i funghi sono principalmente attivi nella fase successiva al picco di temperatura (70-80°C), quando la temperatura scende al di sotto di 40-50°C, e sono responsabili della degradazione della maggior parte dei polimeri complessi (MILLER, 1996).

Un metodo alternativo a quello termofilo e sempre più impiegato per la produzione di compost, è il vermicompostaggio, un processo mesofilo basato sull'impiego di anellidi (dei generi *Eisenia* e *Lumbricus*) che interagiscono con la microflora e concorrono a stabilizzare la sostanza organica (BEFFA *et al.*, 1998). In conseguenza del diverso processo di compostag-

gio, e in particolare delle interazioni fungo-invertebrato, la micoflora dei vermicompost può presentare importanti differenze rispetto a quella dei compost tradizionali (BEFFA *et al.*, 1998).

Una migliore conoscenza della biodiversità fungina presente in diversi tipi di compost può essere di fondamentale importanza per indicare i migliori campi di applicazione. I funghi, infatti, possono intervenire nei processi di fertilizzazione del suolo, nei fenomeni di repressione di patologie vegetali, nello stimolare lo sviluppo di corpi fruttiferi dei funghi mangerecci coltivati, nei processi di degradazione di inquinanti per il biorisanamento di siti contaminati (STRAATSMAN, SAMSON, 1993; KASTNER, MAHRO, 1996).

D'altro canto, la presenza nei compost di funghi potenzialmente patogeni e produttori di micotossine, e la loro conseguente liberazione nell'ambiente atmosferico durante le fasi di lavorazione o spandimento e utilizzo dei compost, può comportare un rischio per la salute dei lavoratori degli impianti di compostaggio e per gli utilizzatori dei compost (BEFFA *et al.*, 1998). Da qui, la necessità di monitorare la composizione della micoflora, con particolare attenzione ai compost ottenuti tramite processi mesofili, quali il vermicompostaggio, a cui manca il ruolo igienizzante svolto dalle elevate temperature

(BEFFA *et al.*, 1998). In questo studio si prende in esame la biodiversità fungina presente in due diversi compost maturi:

- un compost, ottenuto attraverso un processo termofilo tradizionale a partire da scarti di origine esclusivamente vegetale, applicato principalmente come bioattivatore e deodorizzante nelle discariche;
- un vermicompost, ottenuto attraverso un processo mesofilo con l'impiego dell'anellide *Lumbricus rubellus* Hoffmeister, a partire da residui vegetali miscelati a diversi tipi di letame e impiegato principalmente in agricoltura.

Lo studio della biodiversità fungina presente nei due compost è stato affrontato a diversi livelli. Una prima fase di studio ha riguardato l'analisi floristica delle due micoflore, con particolare attenzione agli aspetti igienici relativi alla presenza di funghi potenzialmente patogeni per l'uomo, gli animali e le piante. Una seconda fase è consistita nello studio delle attività metaboliche delle due micoflore e della loro potenzialità degradativa nei confronti di numerosi substrati naturali e di sintesi.

MATERIALI E METODI

Dieci campioni per compost sono stati analizzati sospendendo 10 g di ogni campione in 90 ml di una soluzione allo 0.1% di pirofosfato di sodio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) per disperdere i colloidali organici e inorganici. Le diluizioni successive sono state effettuate in soluzione fisiologica (0,9% di NaCl). Un ml della diluizione finale (1:20000) è stato inoculato in capsule contenenti Potato Dextrose Agar (PDA - 5 ripetizioni), agar alla carbossi-metil cellulosa (CMC - 3 ripetizioni) per l'isolamento di funghi cellulolitici; PDA addizionato di cicloesimide (CX - 3 ripetizioni) per favorire l'isolamento dei funghi a più lenta crescita e di quelli di interesse medico (AIRAUDI, FILIPELLO MARCHISIO, 1996; FILIPELLO MARCHISIO *et al.*, 1996). Le capsule sono state incubate a tre temperature (24, 37, 45°C) per consentire la crescita di funghi mesofili e termotolleranti o termofili. Nel complesso, quindi, sono state eseguite 33 ripetizioni per campione. Per la micoflora totale e per le singole entità fungine, identificate con tecniche tradizionali, è stato calcolato il numero di unità formanti colonia (CFU) per grammo di peso secco di compost.

I miceli sterili sono stati classificati in base alla presenza di pigmenti e alla produzione di clamidospore, sclerozi e vescicole, e sono stati sottoposti alla colorazione con i sali di Blu di Diazonio (DBB) per discriminare tra ascomiceti e basidiomiceti (SUMMERBELL, 1985).

L'analisi funzionale è stata condotta su 122 isolati del compost e 142 del vermicompost, rappresentativi delle due micoflore, inoculandoli su 14 differenti substrati per valutare la produzione dei seguenti enzimi: amilasi (amido), endocellulasi (carbossi-metil cellulosa - CMC), esocellulasi (avicel), chitinasi (chitina), lipasi (tween 20, tween 40, tween 60, tween 80), ligninasi (Poly R-478), pectinasi (pectina di

Citrus), proteasi (latte scremato), xilanasi (xilano) e la capacità di solubilizzare i fosfati inorganici [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - TCP, e CaHPO_4 - DCP] (CALDWELL *et al.*, 1996; CHABOT *et al.*, 1993; EGGER, 1986, KELLEY, YAGHMAIE, 1988; SIERRA, 1956; PATERSON, BRIDGE, 1994). L'inoculo era un disco di micelio (del diametro di 0,5 cm) prelevato dal margine di colonie in attiva crescita e le temperature d'incubazione erano 24°C e 37°C. Per ogni substrato e per ogni temperatura d'incubazione sono state allestite 3 ripetizioni. La degradazione del substrato è stata valutata misurando la crescita radiale su avicel e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e il diametro dell'alone di chiarificazione sugli altri substrati. In funzione dell'attività degradativa, i funghi sono stati assegnati a 4 classi (da 0 a 3) corrispondenti rispettivamente ad un diametro di degradazione o di crescita radiale compreso tra 0 e 0.5 cm, tra 0.6 e 2.5 cm, tra 2.6 e 4 cm e tra 4.1 e 5.5 cm. Per ottenere una valutazione delle capacità funzionali dei funghi di un compost, è stata calcolata, per ogni substrato, una media dei valori di degradazione dei funghi saggiati. Il test non parametrico di Mann-Whitney per gruppi indipendenti è stato impiegato per valutare le differenze ($p \leq 0.05$) nelle attività metaboliche espresse dai funghi isolati dal compost e dal vermicompost e dai funghi di ogni compost alle due temperature (SYSTAT, 1992).

RISULTATI E DISCUSSIONE

In entrambi i compost è presente un'elevata carica fungina e una notevole ricchezza in specie. Nel compost è stata osservata una carica fungina (fino a $8.2 \cdot 10^5$ CFU/g di peso secco) circa doppia rispetto al vermicompost (fino a $4.0 \cdot 10^5$ CFU/g di peso secco). La minore densità fungina del vermicompost si accompagna ad una maggiore biodiversità. Sono state identificate nei due compost 194 entità fungine, di cui 52 isolate esclusivamente dal compost, 76 dal vermicompost e 66 comuni a entrambi. Perciò, il diverso processo di compostaggio e la diversa composizione dei materiali di partenza sembrano tradursi in importanti differenze quantitative e qualitative. La micoflora totale è composta da 117 funghi mitosporici, 45 funghi appartenenti al phylum *Ascomycota* (di cui 18 presenti solo in fase anamorfa), 15 funghi appartenenti al phylum *Zygomycota*, 14 morfotipi di miceli sterili e 3 morfotipi riconducibili al phylum *Basidiomycota*. La maggiore biodiversità fungina è stata osservata su PDA incubato a 24°C, dove è stato campionato il 90% delle entità fungine.

Circa il 50% della micoflora isolata da entrambi i compost è composta da funghi appartenenti ai generi *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Malbranchea*, *Penicillium*, *Pseudallescheria*, *Thermomyces*. È noto che molti di questi funghi, per le loro caratteristiche enzimatiche e di termotolleranza, svolgono un ruolo primario nel processo di compostaggio e nelle applicazioni dei compost (MILLER, 1996).

Nel vermicompost è presente un maggior numero di ascomiceti e basidiomiceti: gli anellidi attivi durante

il processo di vermicompostaggio potrebbero aver svolto un ruolo importante per la loro selezione. Secondo MOODY *et al.* (1992), infatti, questi funghi sarebbero favoriti dall'ingestione selettiva, da parte degli anellidi, di funghi a più rapida crescita. Inoltre, l'azione di stress durante il passaggio nel tratto digerente degli anellidi o l'instaurarsi di altre condizioni sfavorevoli potrebbero spiegare come solo dal vermicompost sia stato isolato il telomorfo di *Corynascus sepedonium* (C.W. Emmons) von Arx e *Pseudallescheria boydii* (Shear) McGinnis *et al.* benché presenti in entrambi i compost come anamorf.

Nel vermicompost è stata osservata anche una maggior presenza di miceli sterili demaziacei. Secondo l'interpretazione di STRIGANOVA *et al.* (1988), la presenza di composti melanino-simili nelle pareti ifali di questi funghi sarebbe un deterrente, in grado di scoraggiare la loro ingestione.

Gli zigomiceti, invece, sono risultati meno abbondanti e meno vari nel vermicompost in accordo con le osservazioni di BROWN (1995) e TIUNOV, SCHEU (2000).

In entrambi i compost è risultata elevata (> 10⁵ CFU/g) la carica di funghi di interesse medico, quali *Scedosporium* anamorfo di *Pseudallescheria boydii* e *Aspergillus fumigatus* Fresenius var. *fumigatus*, entrambi responsabili di numerose malattie dell'uomo e degli animali (DOMSCH *et al.*, 1980; RUCHEL, REICHARD, 1999), mentre soltanto nel vermicompost è stata ritrovata una carica più elevata e una maggiore ricchezza in specie di funghi cheratinofili e potenziali patogeni appartenenti ai generi *Aphanoascus*, *Chrysosporium*, *Scopulariopsis*, *Mycelio-*

phthora (DOMSCH *et al.*, 1980; FILIPELLO MARCHISIO, 2000).

Esiste, quindi, un reale rischio di sviluppo di funghi potenzialmente patogeni durante i diversi processi di compostaggio e di permanenza degli stessi nei prodotti finiti. Particolare attenzione va rivolta ai vermicompost, che essendo prodotti attraverso processi mesofili, possono presentare maggiori problemi di carattere igienico.

Un altro aspetto interessante è la presenza in entrambi i compost di basse concentrazioni di funghi potenzialmente fitopatogeni, quali *Alternaria alternata* (Fries:Fries) von Keissler, *Botrytis* anamorfo di *Botryotinia fuckeliana* (deBary) Whetzel (presente solo nel vermicompost), *Fusarium* spp. Questi dati, insieme all'assenza di fitotossicità, come dimostrato da Caccavo (2002), forniscono una buona indicazione per l'applicazione dei due prodotti in campo agrario.

La diversa composizione quali e quantitativa delle due micoflore si riflette in un diverso potenziale metabolico. I funghi isolati dal compost posseggono infatti valori più elevati di attività; tuttavia entrambe le micoflore presentano, nel complesso, buone capacità idrolasiche nei confronti di polimeri complessi di natura vegetale, quali pectina, xilani e cellulosa, quest'ultima degradata in particolare ad opera di endoglucanasi (Tab. 1). L'amido è, invece, risultato un substrato scarsamente degradato da entrambe le micoflore, con valori di attività più elevati a carico dei funghi del compost.

L'attività ligninasi, saggiata valutando la capacità dei funghi di decolorare il colorante polimerico

TABELLA 1

Valori di attività metaboliche a 24°C e 37°C del compost (C) e del vermicompost (VC) espressi come media dei valori di degradazione dei funghi saggiati.

Metabolic activities at 24°C and 37°C of compost (C) and vermicompost (VC) expressed as average of the degradation values obtained from fungi tested on different substrates.

Attività	Substrato	24°C		37°C	
		C	VC	C	VC
Amilasi	amido	1.3a	1.2b*	1.2a	1.0b*
Esocellulasi	avicel	1.5a*	1.3b*	1.3a*	0.8b*
Endocellulasi	CMC	2.0a	2.0a*	2.0a	1.1b*
Chitinasica	chitina	1.8a	1.5a	1.6a	1.1b
Ligninasica	Poly R-478	0.1a*	0.2a*	0.03a*	0.05a*
Lipasi	tween 20	2.0a*	1.7b	1.5a*	1.5a
	tween 40	2.3a*	1.7b*	1.9a*	1.4b*
	tween 60	2.1a*	1.5b	1.7a*	1.6a
	tween 80	1.1a	0.9a	0.8a	0.8a
Pectinasica	pectina di <i>Citrus</i>	2.3a*	2.2a*	1.9a*	1.9a*
Proteasica	latte scremato	2.6a*	2.3b*	2.2a*	2.0a*
Solubilizzazione fosfati	Ca ₃ (PO ₄) ₂	2.6a*	2.3b*	1.7a*	1.9a*
	CaHPO ₄	2.2a*	2.1a*	1.5a*	1.6a*
Xilanasica	xilano	1.9a	1.7a	1.7a	1.8a

Lettere diverse indicano differenze significative nell'attività media tra C e VC alla stessa temperatura e l'asterisco (*) indica differenze significative nell'attività media dello stesso compost a 24°C e 37°C.

antrachinonico Poly R-478, è stata espressa, anche se in forma intensa, da pochi funghi isolati da entrambi i compost, principalmente basidiomiceti. La capacità di decolorare questo polimero particolarmente recalcitrante è considerata predittiva, non solo di attività ligninolitica, ma, data la bassa specificità dei possibili enzimi coinvolti, anche della capacità di degradare numerosi inquinanti, come gli idrocarburi policiclici aromatici (ZHENG *et al.*, 1999). La selezione di ceppi fungini capaci di degradare estesamente il colorante Poly R-478 costituisce, quindi, il punto di partenza per una possibile indagine di applicabilità di questi organismi nei processi di biorisanamento ambientale.

L'attività lipasica è stata espressa in forma più intensa dai funghi del compost, in particolare nei confronti di tween 20, tween 40 e tween 60 a 24°C e solo nei confronti di tween 40 a 37°C. Il tween 80, invece, è un substrato poco degradato dai funghi di entrambi i compost (Tab. 1).

Anche la capacità di solubilizzare i fosfati inorganici è risultata elevata, con valori maggiori per i funghi del compost a 24°C nei confronti di $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; buona l'attività proteasica, anch'essa maggiormente espressa dai funghi del compost a 24°C; discreta l'attività chitinolitica dei funghi di entrambi i compost, con valori significativamente maggiori per i funghi del compost a 37°C (Tab. 1).

La capacità di solubilizzare i fosfati inorganici e di mineralizzare composti contenenti azoto da parte dei funghi isolati da entrambi i compost, può svolgere un ruolo importante nelle applicazioni in campo agrario per la fertilizzazione del suolo, la nutrizione delle piante e, nel caso degli enzimi chitinolitici, per il biocontrollo di patogeni vegetali (TIQUIA *et al.*, 2001; SZMIDT, 2002).

I risultati ottenuti dimostrano, quindi, la fondamentale importanza degli studi di questo tipo. Attualmente gli standard di qualità dei prodotti di compostaggio tengono conto soltanto di parassiti e batteri patogeni. Invece, non può essere trascurato il potenziale fitopatogeno e patogeno dei funghi, quest'ultimo risultato di una certa portata, così come non si può ignorare il potenziale metabolico delle intere micoflore in grado di fornire indispensabili indicazioni circa la migliore applicazione dei prodotti. Inoltre, l'isolamento di ceppi con spiccate attività degradative nei confronti di particolari substrati apre la strada verso mirati esperimenti di *bioremediation* e *bioaugmentation*.

LETTERATURA CITATA

AIRAUDI D., FILIPELLO MARCHISIO V., 1996 - *Fungal biodiversity in the air of Turin*. Mycopathologia, 136: 95-102.

ALEXANDER R., 1999 - *Compost markets grow with environmental applications*. Biocyc. Magaz., Marzo: 43-44.

BEFFA T., STAIB F., FISHER J.L., LYON P.F., GUMOWSKI P., MARFENINA O.E., DUNOYERGEINDRE S., GEORGEN F., ROCH-SUSUKI R., GALLAZ L., LATGÉ P., 1998 - *Mycological control and surveillance of biological waste and compost*. Med. Mycol., 36(1): 137-145.

BROWN G.G., 1995 - *How do earthworms affect microfloral*

and faunal community diversity? Plant, Soil, 170: 209-231.

CACCAVO D., 2002 - *Valutazione della fitotossicità di un ammendante compostato verde ed un ammendante compostato misto*. Tesi laurea. Dip. Biol. Veg. Univ. Torino.

CALDWELL B.A., TRAPPE J., JUPPONEN A., 1996 - *Physiological characters of dark-septate root endophytes*. Proc. First Int. Conf. Mycorrhizae, Berkeley.

CHABOT R., ANTOUN H., CESCAS M.P., 1993 - *Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par de microorganismes dissolvant le phosphore inorganique*. Can. J. Microbiol., 39: 941-947.

DOMSCH K.H., GAMS W., TRAUTE-HEIDI ANDERSON., 1980 - *Compendium of soil fungi*. Vol. 1. Academic Press (London) LTD.

EGGER K.N., 1986 - *Substrate hydrolysis patterns of post-fire ascomycetes (Pezizales)*. Mycologia, 78(5): 771-780.

FILIPELLO MARCHISIO V., 2000 - *Keratinophilic fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates*. Rev. Iberoamer. Micol.: 86-92.

FILIPELLO MARCHISIO V., PREVE L., TULLIO V., 1996 - *Fungi responsible of skin mycoses in Turin (Italy)*. Mycoses, 39(3-4): 141-150.

KASTNER M., MAHRO B., 1996 - *Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil affected by the organic matrix of compost*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 44: 668-675.

KELLEY J., YAGHMAIE P.A., 1988 - *Screening of fungal strains employed in the testing of plastic materials*. Int. Biodet., 24: 289-298.

MILLER F.C., 1996 - *Composting of Municipal Solid Waste and its Components*. In: PALMISANO, BARLAZ (Eds.), *Microbiology of Solid Waste*: 115-154. CRS Press.

MOODY S.A., PEARCE T.G., INESON P., DIGHTON J., ROBINSON C.H., FRANKLAND J.C., 1992 - *Dispersal of wheatstraw fungi by earthworms*. In: HAIMI J., PITKANEN P.L. (Eds.), *Soil organisms and Soil Health*. Program and Abstracts XI Int. Colloq. Soil Zoology. ISSS, Jyväskylä, Finlandia.

PATERSON R.R.M., BRIDGE P.D., 1994 - *Enzymatic activities on solid media. Ligninase activity*. In: PATERSON R.R.M., BRIDGE P.D. (Eds.), *Biochemical Techniques for Filamentous Fungi*: 23-24. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

RUCHEL R., REICHARD U., 1999 - *Pathogenesis and clinical presentation of aspergillosis*. In: BRAKHAGE A.A. *et al.* (Eds.), *Aspergillus fumigatus. Biology, Clinical Aspects and Molecular Approaches to Pathogenicity*. Contributions to Microbiology. Vol. 2. Karger, Basel, Switzerland.

SHEKHAR SHARMA H.S., JOHRI B.N., 1992 - *The role of thermophilic fungi in agriculture*. In: ARORA D.K. (Eds.), *Handbook of Applied Mycology. Fungal Biotechnology*. Vol. 4 Marcel Dekker, Inc.

SIERRA G., 1956 - *A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganism and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates*. Antonie van Leeuwenhoek, 23: 15-17.

STRAATSMAN G., SAMSON R.A., 1993 - *Taxonomy of Scytalidium thermophilum, an important thermophilic fungus in mushroom compost*. Mycol. Res., 97(3): 321-328.

STRIGANOVA B.R., MARFENINA O.E., PONOMARENKO V.A., 1988 - *Some aspects of the effect of earthworms on soil fungi*. Izvest. Akad. Nauk Ser. Biol., 5: 715-719.

SUMMERBELL R.C., 1985 - *The staining of filamentous fungi with diazonium blue B*. Mycologia, 77: 587-593.

SYSTAT SCS COMPUTER SOFTWARE, 1992 - *Version 5.2 for*

- the Apple Macintosh*. Evanston, Illinois. Systat Inc.
- SZMIDT R.A.K., 2002 - *Review of compost process-control for product function*. In: INSAM H. *et al.* (Eds.), *Microbiology of Composting*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.
- TIQUIA S.M., WAN J.H.C., TAM N.F.Y., 2001 - *Extracellular enzyme profiles during co-composting of poultry manure and yard trimmings*. *Process Biochem.*, 36: 813-820.
- TIUNOV A.V., SCHEU S., 2000 - *Microfungal communities in soil, litter and casts of Lumbricus terrestris L. (Lumbricidae): a laboratory experiment*. *Appl. Soil Ecol.*, 14: 17-26.
- ZHENG Z., LEVIN R.E., PINKHAM J.L., SHETTY K., 1999 - *Decolorization of polymeric dyes by a novel Penicillium isolate*. *Process Biochem.*, 34: 31-37.

RIASSUNTO - L'analisi floristica condotta sulla micoflora di un compost e un vermicompost ha messo in evidenza la presenza di un'elevata carica fungina accompagnata da una notevole ricchezza in specie (194 entità fungine). Il diverso processo di compostaggio e la diversa composizione delle materie prime impiegate per la produzione dei compost si traducono in importanti differenze nella composizione quali-quantitativa delle due micoflore e nel loro potenziale metabolico, saggiato a due temperature su 14 diversi substrati. La conoscenza degli aspetti floristici e funzionali delle comunità fungine presenti nei diversi tipi di compost è indispensabile, oltre che per definirne la qualità da un punto di vista igienico, per indicarne le possibili applicazioni in campo agricolo e ambientale.

AUTORI

Antonella Anastasi, Giovanna Cristina Varese, Silvano Scannerini, Valeria Filipello Marchisio*, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Torino, Viale Mattioli 25, 10125 Torino

*Corresponding Author

Funghi di interni implicati in processi di degradazione

A. MONTEMARTINI CORTE, M. ZOTTI e M. DE FERRARI

ABSTRACT – *Indoor fungi involved in biodeterioration* -The moulds studied were chiefly isolated from paper material in enclosed covered areas in Genoa. The town of Genoa is characterized by a relatively warm humid climate. The presence of fungi can be attributed to two factors: they are peculiar substratum suitable for the growth of fungi and the environment. The fungi should be introduced from the outside. Furthermore, the work reports the species of fungi found on paper and books for the first time. A list of pathogenic and rare fungi is also included.

Key words: environments parameters, microfungi and paper, pathogenic fungi

INTRODUZIONE

E' noto che i funghi crescono bene in presenza di notevole umidità e di temperatura (T) relativamente alta; tali condizioni possono verificarsi anche all'interno di edifici (MATTSON, 2002; GRAVESEN, 2002). Già nel 1980 KOVALIK (Varsavia) ha asserito che, per evitare la germinazione e, quindi, lo sviluppo di colonie fungine, la T e l'umidità relativa percentuale (U.R.%) dovrebbero essere mantenute rispettivamente tra i 16° ed i 20° C e tra il 40% ed il 65%.

Nel 1992 GALLO, dell'Istituto di Patologia del Libro ha abbassato, per i nostri climi normalmente più caldi, il limite dell'U.R.% intorno al 60%; mentre NYUKSHA (1994, St. Pietroburgo), consiglia valori di T tra i 18°C e $\pm 2^\circ\text{C}$, e di UR tra 55% e $\pm 5\%$.

Naturalmente, in ambienti ove manca una ventilazione adeguata, possono formarsi zone con aria stagnante, umida e, in prossimità di fonti di calore, più calda, ossia microclimi più favorevoli alla germinazione delle spore.

Genova ha un clima caldo umido (Fig. 1), che favorisce lo sviluppo di muffe soprattutto in microambienti poco aerati. Gli studi condotti a partire dal 1979 fino ad oggi ne sono una valida conferma (MONTEMARTINI CORTE, FOGGI LEPORE, 1984; MONTEMARTINI CORTE *et al.*, 2002).

In questo lavoro vengono riportati i risultati di studi condotti negli ultimi cinque anni a Genova in interni, nello specifico in due biblioteche pubbliche, in un magazzino di libri e in un archivio comunale. Inizialmente, sono descritti gli ambienti di studio e le metodologie impiegate per l'isolamento dei diversi ceppi fungini, sia da materiale cartaceo, che dalle pareti. Vengono poi elencate le specie isolate, con particolare riferimento a quelle segnalate per la prima

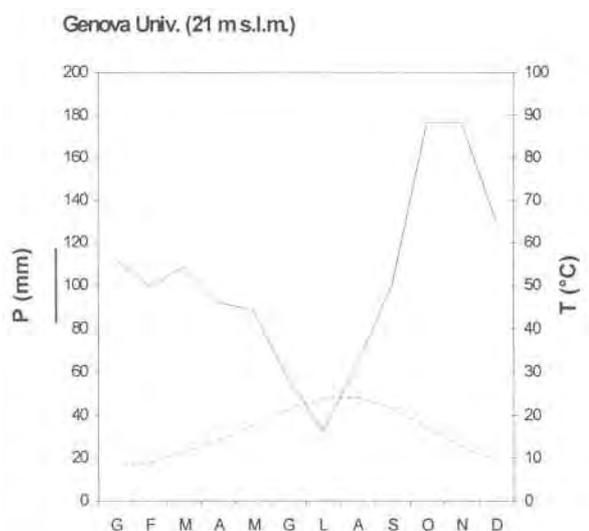


Fig. 1
Diagramma ombrotermico di Genova.
Ombrothermic diagram of Genoa.

volta su materiale cartaceo o rare, ed i risultati ottenuti sono messi a confronto con quelli del passato. Infine, sono riportate alcune considerazioni riguardanti i parametri ambientali che influenzano la crescita fungina in locali chiusi ed eventuali danni ai materiali e per l'uomo.

AMBIENTI STUDIATI E CLIMA

Nel 1998, a Genova, siamo stati chiamati ad interve-

nire a causa dell'improvvisa insorgenza di numerose muffe su libri di due biblioteche genovesi: la biblioteca comunale e quella della sezione botanica del Dip. Te. Ris.

Nel 1999 siamo stati incaricati di analizzare i funghi presenti in un magazzino di libri della biblioteca comunale e recentemente (estate 2002) abbiamo eseguito i medesimi controlli su materiale cartaceo e sui muri di un archivio del Comune di Genova.

La richiesta di intervento era motivata da un lato per fermare, o cercare di prevenire il deterioramento del materiale cartaceo, dall'altro per verificare la presenza di funghi potenzialmente dannosi per la salute umana.

Nella biblioteca comunale la rottura dell'impianto di condizionamento, nel caldissimo agosto del 1998, aveva creato le condizioni adatte allo sviluppo di colonie fungine. Il monitoraggio dei dati di T ed U.R.% (riattivato dal mese di settembre), ci ha permesso di comparare le T degli interni con quelle rilevate per la città dalla sezione geofisica del Dip. Te. Ris. Le T procedevano parallelamente con gli stessi valori: vi era solo una sfasatura di due giorni di quelle interne rispetto a quelle esterne. L'U.R.% negli interni poteva però, nei periodi più caldi, raggiungere valori molto elevati, intorno al 70% con picchi dell'80%!

Nella biblioteca della sezione botanica, l'intervento di un'impresa di pulizie, eseguito all'inizio di ottobre, aveva aumentato U.R.% lavando e non asciugando adeguatamente gli scaffali su cui erano stati riposti i libri.

Tra i diversi locali esaminati il magazzino di libri posto al pianterreno ed al primo piano in un palazzo di una zona molto edificata è l'unico a non essere vicino a spazi verdi.

I locali dell'archivio comunale sono, invece, in prossimità di un giardino pensile in una zona ben ventilata e soleggiata, dove però a causa di violenti temporali si erano verificati ripetuti allagamenti.

La frequenza di sviluppo fungino in interni è da correlare, a nostro avviso, alle condizioni climatiche di Genova. Dal diagramma ombrotermico in Fig. 1 si nota, oltre ad un'alta piovosità, un periodo arido molto modesto ridotto ai mesi estivi. Anche i valori termigrometrici trentennali mostrano come spesso sia la T che l'U.R.% superino i livelli di sicurezza; sono anche riportati i valori di T ed U.R.% degli anni 1978-1981 e quelli relativi agli anni recenti 1997-2002 nei quali si sono svolte le ricerche in oggetto.

In questi ultimi anni l'U.R.% è stata spesso abbondantemente al di sopra di quella registrata negli anni precedenti ed anche la T è stata un po' più alta.

MATERIALI E METODI

Negli ambienti esaminati sono stati fatti i prelievi dai muri, dai diversi materiali con i quali erano rilegati i libri (raramente dalle pagine interne), e dagli incartamenti di archivio. Due i diversi terreni di coltura usualmente impiegati: agar malto (al 2%) ed agar

carota; nel 2002 sono stati usati agar malto e CYA (PITT, 1979). L'uso di differenti terreni di coltura è opportuno per evitare di perdere alcune specie a causa delle diverse esigenze nutrizionali. Non sempre si riusciva ad isolare singole specie, spesso sono state necessarie diluizioni successive per avere colture pure. L'identificazione dei generi e delle specie, in base ai caratteri morfologici, è stata fatta basandosi su opere generali e su monografie specifiche (DOMSCH *et al.*, 1980; ELLIS, 1971).

RISULTATI E DISCUSSIONI

I risultati ottenuti dalle indagini condotte nelle biblioteche vengono illustrati nelle Tabb. 1,2. In queste ultime sono riportate le specie isolate, con l'indicazione (S) per quelle comprese fra i funghi del suolo, segue il numero delle colonie isolate per le singole specie (dato non molto indicativo perché si è cercato di isolare solo le alterazioni più evidenti), infine l'indicazione del materiale dal quale sono state prelevate e la correlazione fra le specie e gli scaffali dove erano collocati i singoli libri deteriorati. La sigla P, inoltre, sta ad indicare specie fungine (o generi che comprendono specie) implicate nella patologia umana, probabili agenti di micosi o manifestazioni allergiche, sia in presenza di fattori predisponenti che in soggetti sani. Nella Tab. 3 sono riportate le specie isolate dai libri provenienti da diversi Fondi (= raccolte) del magazzino esaminato. Nella Tab. 4 i funghi isolati nell'archivio comunale.

Per completare e confrontare questi risultati con quelli di altri studi sono riportate: la Tab. 5 (A e B) (da MONTEMARTINI CORTE *et al.*, 2002), che riguarda ricerche sul "foxing" (alterazione di materiale cartaceo con macchie rossastre, "fox"); e la Tab. 6 (rielaborata da MONTEMARTINI CORTE, FOGGI LEPORE, 1984), che riporta i dati di analisi condotte negli anni '80, sempre in interni, su muri e tubature.

I locali esaminati sono localizzati in zone a pochi chilometri di distanza gli uni dagli altri e risentono delle stesse condizioni climatiche.

Dall'osservazione delle Tabb. 1 e 2 si nota che le rilevazioni in tela (probabilmente con colla) sono le più attaccate dagli agenti fungini, quelle in pelle risultano mediamente alterate e poco o per nulla danneggiate quelle in pergamena, su cui sono state osservate solo piccole colonie. Ciò era prevedibile dato che la pelle per essere trasformata in pergamena è trattata con calce ed è noto che i funghi preferiscono substrati moderatamente acidi.

Sempre in Tab. 1 si può vedere la distribuzione sparsa delle diverse colonie fungine e come le stesse specie siano, invece, presenti su libri adiacenti, posti sugli stessi scaffali. Questo indica come l'infezione possa essersi propagata da un volume all'altro. Nella biblioteca di Botanica (Tab. 2) è stata osservata, sui libri collocati vicino all'entrata, una maggiore infezione, che diminuisce allontanandosi da questa, facendo supporre che le spore fungine possano essere state introdotte dai frequentatori della biblioteca. In quella della sezione botanica, infatti, su undici specie

TABELLA 3

Sono riportate le specie rinvenute nei due piani del magazzino ove era la stessa U.R.%; sono indicati i diversi Fondi (Raccolte).
The species founded in the two floors of the book warehouse have been reported; the different properties have been pointed out.

Magazzino - isolamento di campioni di muffe (10-set-1999)					
Primo piano U.R. 70%			Secondo piano U.R. 70%		
Fondo Morano			Fondo Brignole Sale		
Genere e specie	patogeni	del suolo	Genere e specie	patogeni	del suolo
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	[P]	[S]	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	[P]	[S]
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.		[S]	<i>Chrysosporium keratinophilum</i> (Frey) Carmichael	[P]	[S]
<i>Penicillium restrictum</i> Gilman and Abbot.		[S]	Fondo Bruschi		
<i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll.		[S]	<i>Ulocladium botrytis</i> Preuss		
<i>Phoma eupyrena</i> Sacc.		[S]	<i>Ulocladium consortiale</i> (Thum.) Simmons		[S]
Micelio sterile			<i>Periconia cambrensis</i> Mason and Ellis		
			Micelio sterile		
			Fondo Berio		
			<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	[P]	[S]
			<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	[P]	[S]
			<i>Chaetomium</i> sp.	[P]	[S]

TABELLA 4

Nei funghi rinvenuti nell'archivio comunale viene indicato se sono stati isolati da materiale cartaceo o dall'intonaco.
In species founded in municipal archives has been specified if they have been isolated from paper or from wall plaster.

Agenti fungini isolati in un archivio comunale di Genova ESTATE 2002				
Taxa rinvenuti	patogeni	del suolo	materiale cartaceo	intonaco muri
<i>Aspergillus puniceus</i> Kwon and Fennell		[S]	x	x
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze: Fries.	[P]	[S]	x	
<i>Cladosporium</i> sp.	[P]	[S]	x	
<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuill.	[P]		x	x
<i>Memnonella echinata</i> (Riv.) Galloway		[S]	x	
<i>Mucor</i> sp.	[P]	[S]	x	
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	[P]	[S]	x	
<i>Penicillium restrictum</i> Gilman and Abbott		[S]	x	x

isolate, dieci sono funghi del suolo; nella biblioteca comunale (Tab.1), vicina ad un cortiletto erboso, su sette specie isolate, sei sono funghi del suolo.

Queste osservazioni possono essere avvalorate da quelle fatte sul "foxing" delle carte topografiche (Tab. 5B); anche da queste carte sono state isolate tredici diverse specie delle quali dieci sono funghi del suolo, infatti queste carte erano conservate in un Museo comunale contiguo ad un chiostro all'interno del quale vi è un giardino coltivato.

Confrontando le Tab. 1 e 2 con la Tab. 3 si può notare, invece, che ci sono più specie del suolo nel Fondo Morano, che raccoglie libri di diverse origini, che negli altri Fondi.

Dalla Tab. 6 appare evidente come i funghi del suolo siano più frequenti nei prelievi fatti nell'Ex Istituto Botanico ed in quello di Anatomia comparata, ai tempi delle ricerche entrambi contigui all'Orto

Botanico. Questo avvalorata l'ipotesi che buona parte delle specie fungine, che si sviluppano in microambienti interni simili, vengano introdotte dall'ambiente esterno dai visitatori; la diversità ed il numero variabile di funghi dipenderebbe proprio dal tipo di ambiente esterno. Se le spore introdotte trovano, anche casualmente, le condizioni adatte si sviluppano e si diffondono, ma fortunatamente le colonie regrediscono e seccano se si riesce a far diminuire drasticamente l'umidità relativa.

Per quanto concerne i funghi considerati patogeni per l'uomo, si può osservare che nell'abitazione di Via Lanata (Tab. 6), dove gli abitanti hanno avuto disturbi respiratori e prolungate allergie agli occhi, sono stati isolati *Aspergillus niger*, *Cladosporium* e *Fusarium*; nell'archivio comunale (Tab. 5) sono presenti *Emericella nidulans* e *Cladosporium*.

La ridotta frequentazione dell'archivio comunale rende meno probabile l'introduzione di funghi da parte di visitatori e fa supporre che le specie fungine possano essere introdotte dalla circolazione dell'aria e favorite dalla presenza dei numerosi volatili presenti nel giardino limitrofo. Ciò potrebbe spiegare anche la presenza, sempre nell'archivio, di *A. puniceus*, specie rara per i nostri climi, probabilmente mai segnalata in Italia. Questa specie è stata descritta per la prima volta a Panama e successivamente in India (KLICH, PITT, 1988) Proprio nel suddetto giardino adiacente l'archivio, è presente una comunità di Psittacini di ceppo Afro-Asiatico (comunicazione verbale SPANÒ), ciò fa supporre che proprio questi animali possano essere stati veicolo di tale specie.

Infine, in Tab. 7 sono riassunte le entità fungine rinvenute per la prima volta su materiale cartaceo o legature di libri e non segnalate in letteratura da GALLO (1992) e da GALLO *et al.* (1998), da NYUKSHA (1994) e da ZYSKA (1997). Ciò comunque era abbastanza prevedibile, vista anche l'influenza che l'ambiente esterno, per le sue caratteristiche ecologiche e climatiche, ha sulla fluttuazione delle spore nell'aria (SERGEVA, 2002).

TABELLA 7

Specie isolate per la prima volta su carta e legature di libri e quindi non segnalate in letteratura.

List of the species isolated for the first time from paper and books.

Biblioteca Universitaria		Biblioteca Comunale	
<i>Aspergillus ustus</i>	[S]	<i>Eurotium pseudoglaucum</i>	
<i>Aspergillus proliferans</i>		<i>Penicillium janthinellum</i>	[S]
<i>Penicillium janthinellum</i>	[S]	<i>Acremonium strictum</i>	[S]
<i>Trichurus spiralis</i>	[S]		
<i>Penicillium waksmanii</i>	[S]		
<i>Chrysonilia sytrophila</i>	[S]		
Magazzino		Archivio comunale	
<i>Phoma eupyrena</i>	[S]	<i>Aspergillus puniceus</i>	[S]
<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	[S]		
<i>Ulocladium botrytis</i>	[S]		
<i>Periconia cambrensis</i>	[S]		
Museo (carte topografiche)		Stampe di diversa origine (campioni di prova)	
<i>Athrinium euphorbiae</i>	[S]	<i>Oidiodendron maius</i>	[S]
<i>Eurotium pseudoglaucum</i>		<i>Oidiodendron citrinum</i>	[S]
<i>Peziza ostracoderma</i>	[S]	<i>Fusicladium spp.</i>	[S]
<i>Canningamella elegans</i>	[S]		
<i>Ulocladium botrytis</i>	[S]		
<i>Phoma pomorum</i>	[S]		

Come già evidenziato, quindi, non dovrebbe stupire la grande varietà di funghi che possono svilupparsi in ambienti interni visto quali e quanti possono essere i fattori predisponenti (parametri ambientali, ecologia della specie, veicoli di infezione...).

CONCLUSIONI

Sono stati illustrati i risultati delle analisi condotte in alcune biblioteche, magazzini di libri e archivi genovesi, i cui Curatori avevano osservato la presenza di diverse colonie fungine.

Le colture in vitro hanno evidenziato la presenza di numerosi ceppi alcuni dei quali patogeni per l'uomo, altri specie rare come *A. puniceus*.

Sono stati presi in considerazione ed analizzati i parametri ambientali che influenzano direttamente la crescita fungina. Le diverse infezioni fungine sono verosimilmente da attribuirsi alla frequentazione elevata e alla presenza di giardini o aree verdi in prossimità dei locali analizzati.

Probabilmente il controllo dei parametri ambientali (T, UR%) potrebbe ridurre l'insorgenza delle numerose muffe.

Viceversa in presenza di colonie fungine patogene per l'uomo sarebbe opportuno un periodico monito-

raggio per stimare la carica sporale al fine di stabilire i possibili danni per l'uomo e fissare adeguate politiche di accesso.

LETTERATURA CITATA

- DOMSCH K. H., GAMS W., ANDERSON T. H., 1980 - *Compendium of soil fungi*. Vol. I: 859; II: 405.
- ELLIS M.B., 1971 - *Dematiaceous Hyphomycetes* - C.A.B., Comm. Mycol. Inst. Kew Surrey, England.
- GALLO F., 1992 - *Il biodeterioramento di libri e documenti*. Centro studi conservazione carta, Roma ICCROM. 128 pp.
- GALLO F., MAGGI O., PASQUARIELLO G., 1998 - *Funghi in Aerobiologia e Beni Culturali: metodologie e tecniche di misura*: 172-175. MANDRIOLI P., CANEVA G. (a cura di). Nardini Editore, Fiesole.
- GRAVESEN S., 2002 - *Mould in Building 1998-2002*. IMC7, Oslo (Norway) 2002. Book of abstracts: 70.
- KLICH M. A., PITT I. J., 1988 - *A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs*. CSIRO, North Ryde, Australia.
- KOVALIK R., 1980 - *Microbiodeterioration of Library Material, Part 2: Microbiodecomposition of Basic Organic Library Material*, chap. 4. Restaurator, 4: 135-219.
- MATTSON J., 2002 - *Building ecology: influence of distribution, detection and control of biodeterioration*. IMC7, Oslo (Norway) 2002. Book of abstracts: 70.
- MONTEMARTINI CORTE A., FERRONI A., SALVO V., 2002 - *Isolation of fungal species from test samples and maps damaged by foxing and correlation between these species and environment*. - Int. Biodet. Biodegr. 51: 167-173.
- MONTEMARTINI CORTE A., FOGGI LEPORE G., 1984 - *Funghi di interni in relazione a microambienti diversi*. Mic.Ital.: 35-45.
- NYUKSHA YU. P., 1994 - *Biodeterioration of paper and books*. Library Russian Academy Sciences, St. Peterburg. 233 pp.
- PITT J.I., 1979 - *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. Acad. Press, London.
- SERGEeva L. E., 2002 - *Micromycetes in book depositories* - IMC7, Oslo (Norway) 2002. Book abstracts: 176.
- ZYSKA B., 1997 - *Funghi isolated from library material: a review of the literature*. Int. Biodet. Biodegr., 40: 43 - 51.

RIASSUNTO - Sono state studiate le muffe isolate principalmente da materiale cartaceo conservato in interni di Genova, città caratterizzata da un clima caldo umido. Le specie trovate sono correlate sia al substrato di crescita sia agli ambienti esterni dai quali potrebbero essere state introdotte. Inoltre, sono segnalate le specie rinvenute per la prima volta su materiale cartaceo, quelle potenzialmente patogene per l'uomo e quelle rare.

AUTORI

Aurora Montemartini Corte, Mirca Zotti, Marco De Ferrari, Dipartimento per lo Studio del Territorio e delle sue Risorse (Dip.Te.Ris.) Università di Genova, Comparto Botanico, Corso Dogali 1 M, 16136 Genova, e-mail: aurora.montemartini@fastweb.net, milla@klaatu.com.dist.unige.it, marco.deferrari@libero.it

Funghi saprotrofi e patologia dermatologica: onicomicosi da *Aspergillus*

M. ZOTTI, G. BARABINO e A. PERSI

ABSTRACT – *Saprotrophic fungi and dermatologic pathology: Aspergillus onychomycosis* – According to medical mycology, the fungi isolated in dermatological pathogenesis can decompose keratin *in vivo* and they are defined as keratinophilic and keratinolytic. Although several fungi can metabolize keratin, they are rarely agent of onychomycosis. On the contrary, some skin diseases do not show keratinophilic fungi; their etio-pathogenic rule is unknown. The fungi belonging to the genus *Aspergillus* are neither regarded as keratinophilic nor keratinolytic, therefore, in most cases their presence in a skin lesion is considered to be due to contamination. This paper reports two cases of onychomycosis caused by two different *Aspergillus* species. The first isolated species is *A. flavus* and it only showed a saprotrophic behavior. The second kind was a new species of *Aspergillus* and it was proved that the new *Aspergillus* was the only cause of the lesion.

Key words: *Aspergillus*, *sp. nov.*, non-dermatophytic fungi, onychomycosis

INTRODUZIONE

La patologia ungueale dovuta a miceti filamentosi rappresenta una problematica molto diffusa e sicuramente in crescita. Il numero di pazienti affetti da onicomicosi raggiunge percentuali variabili dal 3 al 5% della popolazione totale, a seconda delle statistiche (ROBERTS, 1992; ELLIS *et al.*, 1997; PIERARD, 2001). Inoltre, si assiste ad un continuo aumento delle specie dei miceti a cui viene riconosciuta la capacità di aggredire direttamente la lamina ungueale (GREER, 1995).

Nelle nostre regioni i funghi filamentosi che con maggiore frequenza si riscontrano nelle infezioni localizzate alle unghie sono i dermatofiti, miceti appartenenti al gruppo di funghi capace di degradare la cheratina (i generi e le specie più comunemente isolati vengono indicati in Tab. 1). Questi microrganismi ricoprono un importante ruolo ecologico dal momento che la cheratina, proteina presente nella cute e negli annessi cutanei, è dotata di una elevata stabilità, dovuta alla particolare conformazione chimica. Occorre segnalare che per quanto riguarda i dermatofiti sembra possibile individuare un'evoluzione filogenetica propria, la cui finalità sembra essere il passaggio dal saprotrofismo al parassitismo (CHABASSE *et al.*, 1994).

Nei paesi a clima temperato i dermatofiti sono responsabili della maggior parte delle onicomicosi mentre nei paesi tropicali la stessa patologia è spesso provocata da miceti diversi. In questi ultimi anni anche nelle nostre regioni si è assistito ad un notevole incremento delle onicomicosi dovute ad agenti

fungini usualmente definiti saprotrofi, diffusi in diversi ambienti e spesso considerati comuni contaminanti di laboratorio (CHABASSE, 1994; GUPTA, ELEWSKI, 1996; GIANNI *et al.*, 2000). Tra i generi più riscontrati ricordiamo *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Acremonium*.

L'esperienza di seguito riportata si riferisce all'isolamento da patologie ungueali di due miceti appartenenti entrambi al genere *Aspergillus*. Verranno descritte le modalità di isolamento, di identificazione delle specie ed evidenziate le relative problematiche. Inoltre, verranno formulate ipotesi sulle probabili cause della diffusione di onicomicosi da funghi non-dermatofiti e prospettate alcune soluzioni per adeguare i procedimenti del laboratorio micologico alla nuova situazione epidemiologica.

MATERIALI E METODI

I prelievi sono stati effettuati presso il Laboratorio di Micologia Dermatologica (Dipartimento di Scienze della Salute - Sezione di Dermatologia Tropicale - Università degli Studi di Genova).

Il metodo adottato per i campioni patologici provenienti da casi di sospetta onicomicosi prevede che i frammenti ungueali, costituiti dalla cheratina alterata prelevata sul fronte di avanzamento della lesione, vengano suddivisi in due aliquote. Una viene utilizzata per effettuare le colture sia su terreno di Sabouraud modificato sia semplice che addizionato con cloramfenicolo (50mg/l) ed actidione (0,5mg/ml). Con la seconda aliquota vengono alle-

TABELLA 1

Elenco dei dermatofiti isolati nelle onicomicosi.

List of dermatophyte isolated in onychomycosis.

<i>Trychopyton</i> Malmsten 1845, Anamorfo; <i>Microsporium</i> Gruby 1843, Anamorfo; Teleomorfo <i>Arthroderma</i> , <i>Anthrodermataceae</i> , <i>Onigenales</i> , <i>Ascomycota</i>		
	unghie	
<i>Trichophyton interdigitale</i> Priestley 1917 (= <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>)	++++	antropofilo
<i>Trichophyton rubrum</i> Sabouraud 1911	++++	antropofilo
<i>Microsporium canis</i> Bodin 1902 <i>Arthroderma otae</i>	+	zoofilo
<i>Microsporium persicolor</i> (Sabouraud) Guiart et Grigorakis 1929	+	geofilo
<i>Trichophyton schoenleinii</i> (Lebert) Langeron et Milochevitch 1930	+	antropofilo
<i>Trichophyton soudanense</i> Joyeux 1912	+	antropofilo
<i>Trichophyton tonsurans</i> Malmsten 1845	+	antropofilo
<i>Trichophyton violaceum</i> Bodin 1902	+	antropofilo
Funghi mitosporici		
<i>Epidermophyton floccosum</i> (Harz) Langeron et Milochevitch 1930	+	antropofilo

stiti i vetrini da esaminare al microscopio. Come reagente per la chiarificazione del preparato si utilizza una soluzione di KOH al 30%, in considerazione dello spessore e della resistenza del materiale da esaminare.

L'osservazione al microscopio del preparato chiarificato consente di individuare eventuali strutture miceliali. Il risultato dell'osservazione microscopica viene integrato da quello colturale che, consentendo di individuare il micete responsabile dell'onicomicosi, permette di formulare una diagnosi micologica completa.

I tempi necessari allo sviluppo in vitro dei miceti richiedono che la coltura venga incubata a 25 °C per almeno tre settimane, con controlli intermedi, ogni sette giorni.

Il terreno di Sabouraud addizionato con cloramfenicolo ed actidione consente in genere la crescita dei soli dermatofiti, inibendo batteri e altri miceti.

Le regole generalmente accettate nei laboratori di micologia prevedono che, nell'eventualità in cui l'esame microscopico risulti positivo ed in coltura si siano sviluppate colonie di miceti non-dermatofiti, i prelievi vadano ripetuti altre due volte. Solo dopo aver isolato per almeno tre volte lo stesso ceppo fungino si può ritenere che lo stesso sia responsabile della patologia ungueale.

Nei nostri due casi, accertata la presenza di miceti appartenenti al genere *Aspergillus*, come già evidenziato spesso comune contaminante dei terreni di coltura, è stato ripetuto più volte il prelievo ungueale e quindi il successivo isolamento in coltura pura dell'agente patogeno.

L'identificazione della specie è stata effettuata secondo le metodologie classiche di micologia (RAPER, FENNELL, 1977; SAMSON, PITT, 1985; KLICH, PITT, 1988) basate sull'analisi dei caratteri morfologici dei ceppi fungini sviluppati a differenti temperature (18-25-37 °C) e su diversi terreni di coltura (Czapek

Agar (Cz), Czapek Yeast Extract Agar (CYA), Czapek Yeast Extract Agar con 20 % di saccarosio (CY20S), Malt Extract Agar (MEA); Sabouraud modificato (Sab): 15% agar, 10% glucosio, 5% neopeptone).

RISULTATI

Nei due casi di onicomicosi, oggetto del presente lavoro, sono stati isolati due ceppi di *Aspergillus*: *A. flavus* Link ed *A. persii* A.M. Corte et Zotti sp. *nv.* (ZOTTI, MONTEMARTINI, 2002).

A. flavus è una specie geofila, cosmopolita ma più comune in zone tropicali e subtropicali, è un importante contaminante di derrate alimentari descritto anche come patogeno per insetti ed animali.

A. persii, in base alle caratteristiche morfologiche e a studi condotti sui suoi metaboliti secondari è risultato essere una specie nuova ascrivibile alla sezione *Circumdati* (ZOTTI, MONTEMARTINI, 2002).

L'isolamento delle due specie è stato effettuato in accordo ai criteri normalmente accettati in micologia medica. Per entrambi i casi l'esame microscopico è risultato positivo rivelando la presenza di filamenti miceliali settati e ramificati. In particolare, nel caso in cui è stato isolato *A. flavus*, sono state osservate al microscopio anche evidenti teste aspergillari (Fig. 1).

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Le onicomicosi da non-dermatofiti sono frequenti nei paesi tropicali, ma attualmente si deve registrare un aumento di questi agenti patogeni anche nelle nostre regioni a clima temperato. I non-dermatofiti isolati più frequentemente dai casi di onicomicosi nelle nostre regioni sono: *Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium oxysporum*, *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria alternata*, *Curvularia* sp.

Tale fenomeno crea diversi problemi in particolare per quanto riguarda le procedure di laboratorio e la definizione del loro ruolo nel determinare la patolo-

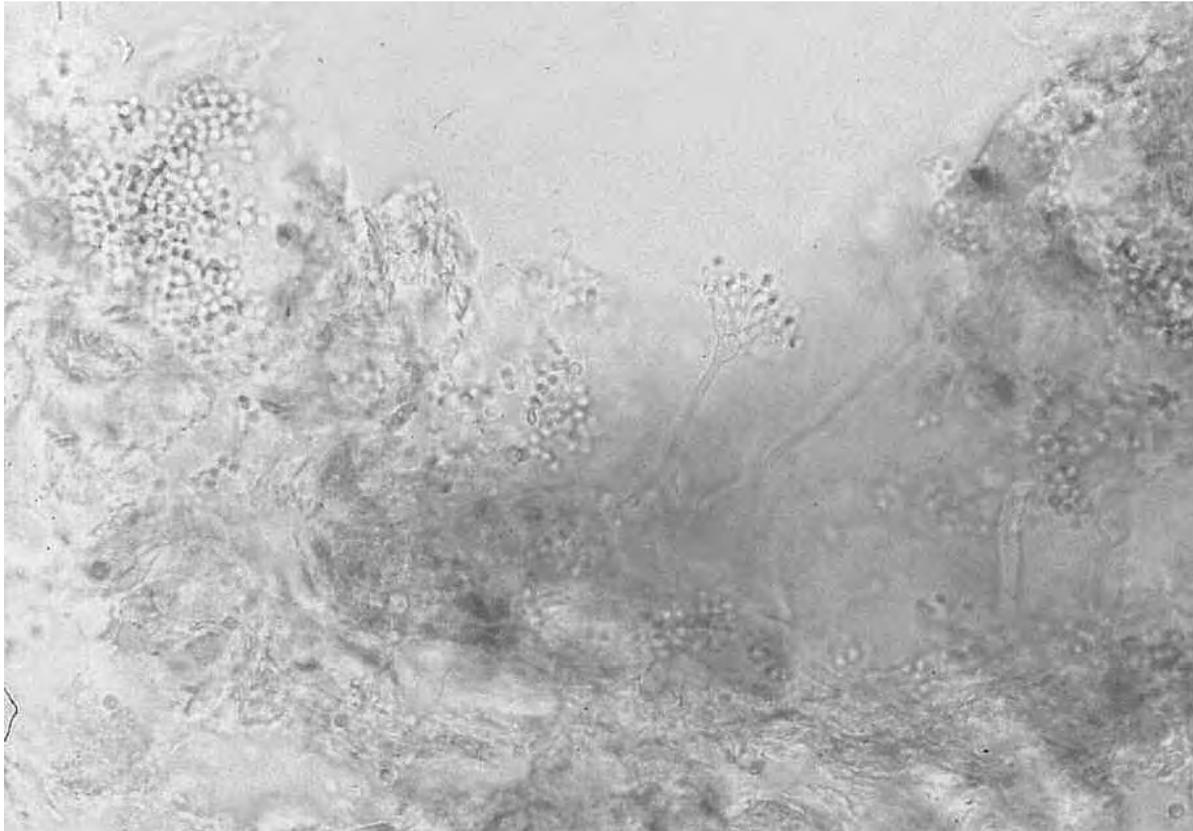


Fig. 1.

Teste aspergillari di *A. flavus* all'esame microscopico di un frammento ungueale.
Conidial heads of *A. flavus* present in the analyzed unguinal fragment.

gia ungueale. Naturalmente anche l'identificazione di questi miceti presenta non poche difficoltà, soprattutto per un classico laboratorio di micologia medica.

I criteri attualmente utilizzati suggeriscono di ritenere patogeno un micete non-dermatofita solo in presenza di un esame microscopico positivo e dopo averlo isolato dalla lesione almeno tre volte.

Ambedue i nostri casi rispondono a questi requisiti, ma nel caso in cui è stato isolato *A. flavus* la ripetizione dei prelievi ha consentito di appurare che il micete era proliferato nello spazio compreso tra la vecchia lamina ungueale in procinto di essere eliminata e la nuova in fase di crescita. Un danno traumatico della lamina aveva quindi creato le condizioni per uno sviluppo del micete che, senza invadere la cheratina dell'unghia, si era limitato a crescere utilizzando il materiale presente nello spazio tra le due lamine. L'eliminazione di tale materiale ha consentito di estinguere anche il micete senza dover ricorrere ad altri interventi terapeutici, confermando in questo caso il ruolo esclusivamente saprotrofo del ceppo di *A. flavus*.

Al contrario, nel caso dovuto ad *A. persii* il micete è stato isolato ripetutamente per un periodo di tempo superiore ai due anni, perché il fungo, che aveva

invaso profondamente la lamina ungueale, si è rivelato resistente agli antimicotici disponibili. La micosi infatti è recidivata per due volte ed è stata eradicata, infine, associando alla terapia antimicotica sistemica e locale, un trattamento con urea al 40% che provoca una onicolisi chimica.

Nel secondo caso si tratta quindi senza dubbio di una patologia ungueale dovuta ad un non-dermatofita; patologia che risulta in aumento a causa di fattori ancora non precisati. I motivi di tale fenomeno potrebbero risiedere, ad esempio, nel miglioramento qualitativo delle prestazioni dei laboratori di micologia o nell'aumento di soggetti con problemi immunologici. In realtà un controllo sui pazienti visti negli ultimi anni nel Laboratorio di Micologia Dermatologica (Dipartimento di Scienze della Salute - Sezione di Dermatologia Tropicale - Università degli Studi di Genova) ha permesso di confermare che i casi di soggetti con problemi immunologici sono estremamente rari. Invece un'indagine statistica condotta sui risultati degli esami micologici effettuati su sospetti casi di onicomicosi dal 1996 al I semestre 2002 ha permesso di rilevare che i casi di sospetta onicomicosi, in cui alla presenza di ife miceliali dell'esame microscopico corrisponde un esame colturale negativo su terreno selettivo per i dermatofiti, sono

in significativo aumento. Questo dato indurrebbe a ritenere che si stia verificando un reale ampliamento del numero di specie responsabili delle onicomicosi. Il numero crescente di isolamenti di non-dermatofiti, confermato anche da numerosi autori, potrebbe essere correlato alle variazioni climatiche (aumento di temperatura ed umidità) che, per quanto minime, consentirebbero a funghi abitualmente saprotrofi una maggiore diffusione, incrementando la possibilità di colonizzare nuovi ambienti e diventare patogeni.

Inoltre, come già ampiamente sottolineato, i criteri attuali consentono di sospettare una micosi dovuta a questi "nuovi" patogeni quando si ha una coltura negativa unita ad un esame microscopico positivo. Il primo dei nostri casi dimostra però che tali criteri possono in certi casi essere fuorvianti e non pienamente affidabili. In effetti i laboratori che si occupano di micosi dermatologiche adottano per i funghi filamentosi procedure ottimizzate per l'isolamento dei dermatofiti e la sola ripetizione dei test non sembra garantire una grande affidabilità nella attuale situazione epidemiologica, caratterizzata dall'indubbio aumento del potere patogeno di funghi diversi dai dermatofiti.

La situazione epidemiologica si presta ad alcune considerazioni di carattere ecologico: ad esempio, se davvero le mutate condizioni atmosferiche o altri fattori stanno facilitando la comparsa del potere patogeno emergente di miceti considerati saprotrofi dovremmo allora attenderci tra questi ultimi un certo numero di funghi privi di teleomorfo, in quanto la perdita di tale forma viene da molti autori correlata con una propensione a passare più facilmente al parassitismo.

L'identificazione di nuove specie potrebbe fornire dati utili a chiarire alcuni di questi interrogativi. Sicuramente, però, in micologia medica le tecniche di identificazione vanno migliorate per affrontare la nuova situazione. La letteratura riporta, ad esempio, numerosi casi di onicomicosi sostenute da ceppi appartenenti al genere *Aspergillus*: *A. versicolor* (TORRES-RODRIGUEZ *et al.*, 1998), *A. niger* (TOSTI, PIRACCINI, 1998; NG *et al.*, 1999), *A. nidulans* (NG *et al.*, 1999), *A. terreus* (GUPTA, ELEWSKI, 1996; GIANNI *et al.*, 2000). Nel caso di *A. terreus* le cui caratteristiche macromorfologiche, per quanto riguarda il colore della colonia, sono molto simili a quelle di *A. persii*, la possibilità che in qualche caso si sia verificato un errore di identificazione non appare del tutto improbabile.

La situazione epidemiologica richiede a nostro avviso un aggiustamento delle metodiche di laboratorio atto a fronteggiare la comparsa di nuovi patogeni e nel contempo ad evitare risultati falsamente positivi. In particolare, l'identificazione dei miceti potrebbe sicuramente giovare delle tecniche di biologia molecolare che porterebbero probabilmente alla scoperta di altre specie nel ruolo per ora inusuale di patogeni e forse, come nel nostro caso, alla scoperta di qualche specie nuova.

Ringraziamenti - Gli autori ringraziano Aurora Montemartini Corte per la preziosa consulenza e Maria Antonietta Stilo per la gentile collaborazione.

LETTERATURA CITATA

- CHABASSE D., 1994 - *Les nouveaux champignons opportunistes apparus en médecine. Revue générale.* J. Mycol. Méd., 4: 9-28.
- CHABASSE D., CONTET-AUDONNEAU N., 1994 - *Du saprophytisme au parasitisme épidémiologie des champignons kératinophiles isolés en France.* J. Mycol. Méd., 4: 80-89.
- GIANNI C., CERRI A., CROSTI C., 2000 - *Non-dermatophytic onychomycosis. An underestimated entity? A study of 51 cases.* Mycoses, 43: 29-33.
- GREER D.L., 1995 - *Evolving role of non-dermatophytes in onychomycosis.* Int. J. Dermatol., 34: 521-524.
- GUPTA A.K., ELEWSKI B.E., 1996 - *Non dermatophyte causes of onychomycosis and superficial mycoses.* Curr.Top. Med. Mycol., 7(1): 87-97.
- ELLIS D.H., MARLEY J.E., WATSON A.B., WILLIAMS T.G., 1997 - *Significance of non-dermatophyte moulds and yeast in onychomycosis.* Dermatology, 194 (1): 40-42.
- KLICH M. A., PITT I. J., 1988 - *A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs.* CSIRO, North Ryde, Australia.
- NG K.P., SAW T.L., MADASAMY M., SOO HOO T., 1999 - *Onychomycosis in Malaysia.* Mycopathologia, 147: 29-32.
- PIERARD G., 2001 - *Onychomycosis and other superficial fungal infections of the foot in the elderly: a pan-European survey.* Dermatology, 202 (3): 220-224.
- RAPER K.B., FENNELL D.I., 1977 - *The genus Aspergillus.* R.E. Krieger. Malabar, Florida.
- ROBERTS D.T., 1992 - *Prevalence of dermatophyte onychomycosis in the United Kingdom: results of an omnibus survey.* Br. J. Dermatol., 126 (39): 23-27.
- SAMSON R.A., PITT J.I., 1985 - *General Recommendations.* In *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematic.* Nato ASI, Series A., 102: 455-460. Plenum Press, New York.
- TOSTI A., PIRACCINI B.M., 1998 - *Proximal subungual onychomycosis due to Aspergillus niger: report of two cases.* Br. J. Dermatol., 139(1): 156-157.
- TORRES-RODRIGUEZ J.M., MADRENYS-BRUNET N., SIDDAT M., LOPEZ-JODRA O., JIMENEZ T., 1998. *Aspergillus versicolor as cause of Onychomycosis: report of 12 cases and susceptibility testing to antifungal drugs.* Exp. Clin. Mycol., 11: 25-31.
- ZOTTI M., MONTEMARTINI A., 2002 - *Aspergillus persii: a new species in section Circumdati.* Mycotaxon, 83 (3): 269-279.

RIASSUNTO - I miceti isolati nelle patologie dermatologiche sono in grado di aggredire la cheratina *in vivo* e vengono tradizionalmente definiti in micologia medica come cheratofili e cheratinolitici. In natura esistono numerosi funghi che non provocano usualmente lesioni sull'uomo pur essendo in grado di metabolizzare la cheratina presente nell'ambiente. Al contrario, da lesioni cutanee si isolano a volte funghi generalmente ritenuti incapaci di utilizzare la cheratina, ai quali è quindi difficile attribuire un ruolo eziopatogenetico. I miceti appartenenti al genere *Aspergillus* non sono compresi tra i funghi ritenuti cheratofili e cheratinolitici e quindi il loro isolamento da una lesione cutanea viene considerato nella maggior parte dei casi una contaminazione. Nel lavoro che presentiamo vengono descritti due casi riguardanti l'isolamento di due

ceppi diversi di *Aspergillus* da lesioni ungueali. Il primo ceppo isolato è un *A. flavus* il cui comportamento si è rivelato esclusivamente saprotrofo. Nel secondo caso invece

l'Aspergillus non solo si è dimostrato causa diretta e unica della lesione, ma è risultato essere una specie nuova.

AUTORI

Mirca Zotti, Dipartimento per lo Studio del Territorio e delle sue Risorse, Università di Genova, Comparto Botanico, Corso Dogali 1 M, 16136 Genova, e-mail: milla@klaatv.com.dist.unige.it

Gianfranco Barabino, U.O. Dermatologia Sociale, Azienda Ospedaliera Ospedale San Martino e Cliniche Universitarie Convenzionate, Largo Rosanna Benzi, 10, 16132 Genova

Agostino Persi, Dipartimento di Scienze della Salute, Sezione di Dermatologia Sociale, Università di Genova. Viale Benedetto XV 7, 16132 Genova, e-mail: agostino.persi@unige.it