

MARCO CLERICUZIO, FRANCESCO DOVANA, LEHO TEDERSOO, ELIA AMBROSIO

DUE NUOVE SEGNALAZIONI DI *CORTINARIUS FLAVOaurantians* (CALOCHROI)
DALLA BASSA TOSCANA**Riassunto**

Cortinarius flavoaurantians, originariamente descritto dalla Liguria, è stato trovato anche in due siti della Maremma Toscana, nei comuni di Roccalbegna e Semproniano (Italia). Le caratteristiche morfologiche macro- e microscopiche dei due ritrovamenti sono molto simili a quelle della raccolta tipo. L'identità della specie, per una delle due raccolte, è stata confermata dall'analisi delle sequenze ITS. Con il presente contributo *C. flavoaurantians* è noto per sei stazioni in Italia (due in Liguria, una in Emilia-Romagna, una nelle Marche, e due in Toscana), una in Spagna, ed una nella Repubblica Ceca.

Abstract

Two new collections of the recently described *Cortinarius flavoaurantians* are reported from Southern Tuscany (Italy). The morphologic traits of the two findings are well coincident with those of the type collection. For one of them, the ITS sequences could be obtained, and fully confirmed the taxonomic assignment. To date this species has been recorded from six different sites in Italy, one in Spain, and one in the Czech Republic.

Key words: *Cortinariaceae*, *Cortinarius*, *Calochroi*, *C. flavoaurantians*.

Nel 2012 noi (MC, Alfredo Vizzini, Fabrizio Boccardo ed Enrico Ercole) (VIZZINI ET AL., 2012), abbiamo descritto un nuovo cortinario della sez. *Calochroi*: *Cortinarius flavoaurantians* Boccardo, Cleric. & Vizzini, a partire da raccolte effettuate nella Liguria di Levante, in provincia di Genova. Per quanto appartenente ad un gruppo difficilissimo quale i *Calochroi*, per il quale spesso non è possibile un'identificazione sicura senza l'ausilio della biologia molecolare, *C. flavoaurantians* possiede dei caratteri macro-morfologici piuttosto originali, che lo rendono identificabile con ragionevole sicurezza anche senza l'ausilio della genetica. In particolare, la reazione alle basi forti sulla cuticola del cappello è molto indicativa: fatta su esemplari freschi al momento della raccolta, è di un color arancione o arancio-bruno, reazione decisamente insolita nella sezione. Col tempo o con esemplari non più freschi la reazione tende ad un rosso-brunastro assai più banale. Anche altri caratteri macroscopici sembrano costanti, come il cappello di un colore giallo paglierino o giallo limone, senza altri colori (eccetto per delle sfiammature o delle fibrille arancio rossastro, che si notano con l'età del carpoforo), né si hanno colori olivastri o bruni; per quanto riguarda le tonalità viola, solo le lamelle giovani sono di un azzurro-viola tenero, ma né il gambo, né il cappello presentano tali colori. In questo *C. flavoaurantians* si pone molto vicino a *C. calochrous* (Pers.) Gray ss., il quale si caratterizza per colori assai più vivaci, per il giallo cromo sul cappello e per il viola persistente nelle lamelle. Inoltre ha una reazione al KOH debole, bruno-rossastra e soprattutto è simbiote specifico del faggio. La nostra specie sembra invece esclusiva delle querce, in particolare di quelle termofile caducifoglie, *Quercus pubescens* Willd. e *Q. cerris* L. in primis. Anche la cortina giallo-limone intenso della nostra specie sembra un buon carattere diagnostico (in *C. calochrous* è da biancastra ad appena giallina).

Le spore delle due specie sono piuttosto simili sia per dimensioni che per forma, solo appena un po' più grandi in *C. flavoaurantians* (lunghe fino a 10,5-11 µm), che non in *calochrous* (dove sono lunghe fino a 10 µm). È evidente, però, che questo dato, da solo, non può essere considerato come un carattere discriminante. Gli altri caratteri microscopici, come ad esempio le ife cuticolari (ixocute con strato sotto-giacente di ife parallele e pigmento essenzialmente extra-cellulare), sono molto omogenee, non solo tra le due specie, ma in tutta la sez. *Calochroi*.

Materiali e metodi

Analisi morfometriche

I basidiomi sono stati fotografati utilizzando una fotocamera Nikon D610, munita di un obiettivo AF Micro Nikkor 60 mm. Le foto microscopiche sono state ottenute per mezzo di una telecamera IS300 montata su di un microscopio Leitz Wetzlar. L'analisi microscopica è stata condotta su campioni essiccati, dopo reidratazione con NH₃ al 5% o KOH al 3%.

Analisi Molecolare:

L'estrazione del DNA per l'analisi genetica è stata effettuata presso l'Istituto di Ecologia e Scienze della Terra dell'Università di Tartu in Estonia, utilizzando il metodo *proteinasi K* e primers universali (ITS5 e ITS4) (WHITE ET AL. 1990), al fine di amplificare tutta la regione ITS (Internal Transcribed Spacer). Effettuata l'estrazione del DNA dai basidiomi, si è proceduto all'analisi PCR (reazione a catena della polimerasi - Polymerase Chain Reaction), per amplificare il DNA estratto e utilizzando il protocollo *Solis BioDyne, Tartu, Estonia*. I prodotti della PCR sono stati sequenziati seguendo il protocollo *Macrogen Inc. (Amsterdam, The Netherlands)* e la sequenza ottenuta, utilizzata poi per confermare l'identificazione morfologica, è stata analizzata con il programma Sequencher 5.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA).

Per l'analisi filogenetica si sono utilizzate delle sequenze scelte sulla base dell'analisi BLAST e dei precedenti studi condotti su *Cortinarius* sect. *Calochroi* (FRØSLEV ET AL., 2007, ORTEGA ET AL., 2008, GARNICA ET AL., 2009, LIIMATAINEN ET AL., 2014). Tre specie appartenenti al genere *Cortinarius* sect. *Elegantiores*, *C. elegantior* (AY174850), *C. eufulmineus* (EF014257), *C. majusculus* (EU655682), sono state utilizzate come *outgroup*. L'allineamento è stato condotto con MAFFT (KATO ET AL., 2002) utilizzando l'opzione *L-INS-i* e l'analisi di Maximum Likelihood è stata condotta con il software RAxML 8.2.7 (STAMATAKIS, 2006) utilizzando il modello GTR+Gamma+I sulla base dei risultati ottenuti in Modeltest 3.7 (POSADA & CRANDALL, 1998) e 1000 repliche di bootstrap per la validazione statistica dei nodi dell'albero. Solo i valori di supporto dei nodi (bootstrap-MLB) maggiori o uguali a 70 sono indicati nell'albero. La percentuale di identità è stata calcolata con Geneious v. R 8.1.2 (<http://www.geneious.com>, KEARSE ET AL. 2012). La sequenza ottenuta è stata depositata in GenBank.

Risultati

Dal sequenziamento del campione MC001 di *C. flavoaurantians* è stata ottenuta una sequenza di 946 pb che è stata introdotta in un dataset costituito da 73 sequenze ottenute da GenBank. Tutte le sequenze di *C. flavoaurantians* mostrano una percentuale di identità del 99,9% e si posizionano nello stesso clado ben supportato a livello statistico (MLB=100%), confermando l'identificazione morfologica del campione analizzato. Tra le otto sequenze che formano il clado/*flavoaurantians* (evidenziato in fig. 1 nella finestra in alto) non si osservano differenze maggiori a 2 pb, valore inferiore alle 6pb considerato il limite di variazione intraspecifico secondo GARNICA ET AL. (2009) all'interno della sez. *Calochroi*. Sebbene tre campioni, provenienti dall'Emilia Romagna, dalla Repubblica Ceca e dalla Spagna (rispettivamente DQ663467, DQ663466 e DQ663465) che si posizionano nel medesimo clado (depositati come *Cortinarius* sp.), pur in assenza di un riscontro morfologico preciso, è verosimile che appartengano alla stessa specie. L'analisi filogenetica condotta non è in grado di risolvere le relazioni tra *C. flavoaurantians* e le altre specie appartenenti alla sect. *Calochroi* in modo chiaro. Sebbene l'analisi Baiesiana condotta in VIZZINI ET AL. (2012) supportasse l'affinità tra *C. flavoaurantians*, *C. calochrous*, *C. roseobulbosus* e *C. sublilacinopes*, l'analisi di Maximum Likelihood condotta, peraltro in accordo con la medesima analisi riportata dallo studio precedentemente citato, indica una possibile affinità tra queste specie ma il valore di MLB=41% non supporta l'ipotesi da un punto di vista statistico.

Cortinarius flavoaurantians Boccardo, Clericuzio & Vizzini, *Mycologia* 104 (6): 1504 (2012)

Descrizione delle raccolte maremmane:

Taglia specie piuttosto piccola.

Cappello fino a 4-5,5 cm di diametro, fortemente convesso all'inizio, poi più piano-convesso. Cuticola viscosa, liscia. Colore giallo paglierino, giallo limone, piuttosto uniforme, qui e lì con qualche sfumatura di colore arancio bruno, mentre con l'età si notano delle fibrille color arancio più evidenti. Il cappello può anche presentare delle leggere maculature scure al centro, ma poco significative.

Lamelle sinuate, adnate o leggermente smarginate, fitte. Color viola lilacino chiaro, presto sbiadente a grigio-violaceo, poi rapidamente brunastre per le spore.

Gambo 3-5 × 0,7-1,1 cm, biancastro, giallo chiaro verso la sommità, poi tendente al giallo bruno con l'età e la manipolazione. Nessuna traccia di blu-viola osservata sul gambo. Bulbo marcato, piatto, rivestito dal velo generale bianco. Cortina giallo limone.

Carne biancastra, nel giovane con toni azzurro-blu ai margini; inodore e insapore.

Reazioni macrochimiche KOH 10%: Color giallo arancio, nel fresco piuttosto intenso e netto; talvolta (esemplari più vecchi) più debole, solo arancio chiaro, ossidantesi a rosso-bruno dopo alcune decine di minuti. Reazione nulla o assai debole su carne e bulbo.

Spore 9-11 × 5,5-6,5 μm, media 9,9 × 5,8 μm, Q = 1,5-2,0, media = 1,71, amigdaliformi, a sommità sovente stirata, talvolta leggermente acuta. Ornamentazione costituita da verruche grossolane ma non molto alte, ≤ 1 μm di altezza.

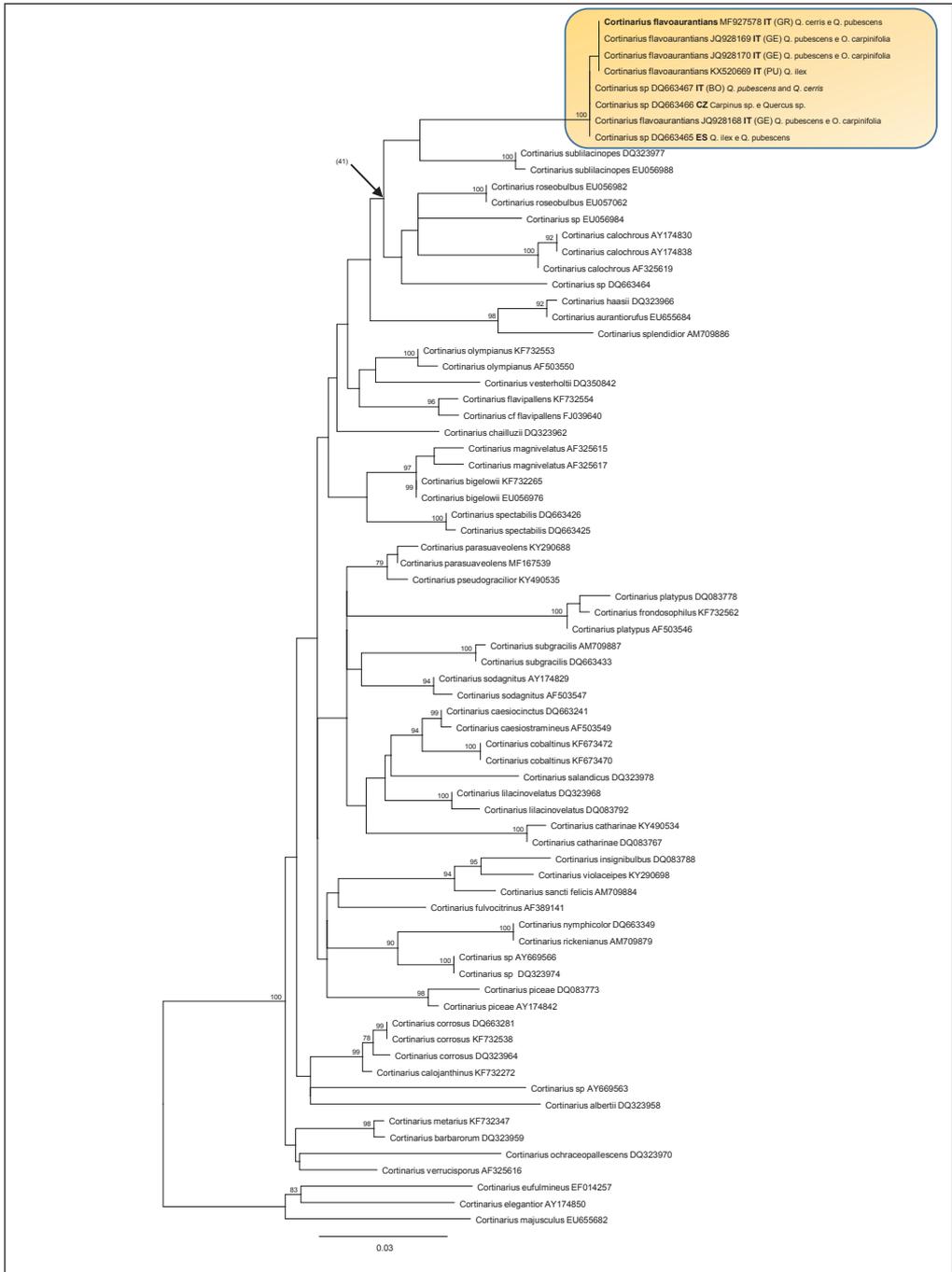
Raccolte effettuate: 1ª raccolta: Semproniano (GR), loc. Rocchette di Fazio, alt. 380 m s.l.m., sotto *Q. cerris* e *Q. pubescens*, su terreno fortemente calcareo, 25/10/2015. Questa è la raccolta di cui abbiamo potuto fare l'indagine genetica (depositata presso erbario personale MC20151025); 2ª raccolta: Roccalbegna (GR), Bosco Rocconi, alt. 350 m s.l.m., sotto *Q. cerris*, su terreno calcareo, 20/10/2016. Questi sono gli esemplari raffigurati nella foto (depositata presso erbario personale MC20161020).

I due siti, pur essendo in due comuni differenti, in realtà distano tra di loro non più di 5 km in linea d'aria, giacendo sulle sponde opposte del fiume Albegna. La valle dell'Albegna presenta dei notevoli calcari travertinosi, peraltro poco comuni in Toscana, molto più diffusi, invece, nel Lazio centro-meridionale. Le ampie foreste di querce che ricoprono i versanti, in parte protette nella riserva naturale provinciale "Bosco Rocconi", e quindi con tratti di bosco maturo, rappresentano un vero eden per gli studiosi del genere *Cortinarius*, con molte decine di specie ritrovate e molte raccolte ancora da identificare.

Considerando l'analisi molecolare della regione ITS la specie che presenta la maggiore percentuale di identità (circa il 94%) è *C. sublilacinopes* Bidaud, Moëgne-Loccoz & Reumaux anche se l'analisi filogenetica condotta non supporta a livello statistico questo risultato, non risolvendo le relazioni all'interno della sezione. Dal punto di vista morfologico, però, la confusione tra i due taxa è improbabile. *C. sublilacinopes* ha anch'esso un cappello di un giallo quasi puro (ma con macule scure piuttosto marcate), ma è molto più grande e carnoso, arrivando il cappello fino a 8-9 cm di diametro. La reazione alle basi sulla cuticola è rosso sangue intenso, rosso-violetta (ma senza toni rosa) sulla *bulbipellis*. Le spore di *C. sublilacinopes* sono appena più grandi di quelle di *C. flavoaurantians*, arrivando a toccare gli 11,5-12,0 μm. È interessante notare che nel sito di Rocchette di Fazio, le due specie crescevano a poca distanza l'una dall'altra.

C. flavoaurantians è stato recentemente ritrovato anche nelle Marche, in provincia di Pesaro, sempre sotto querce caducifoglie (SCHMIDT-STOHN G. ET AL., 2016). Gli autori riportano, per la loro raccolta, spore appena un po' più piccole, in media 9,4 × 5,4 μm (invece che 9,9 × 5,8 μm), valori che senz'altro rientrano nella variabilità intra-specifica. La forma, il quoziente sporale e l'ornamentazione sono sovrapponibili a quelle delle nostre raccolte.

Con le due raccolte qui riportate, il numero di stazioni di crescita di *C. flavoaurantians* sale a sei per l'Italia, due in Liguria (prov. di Genova), una in Emilia-Romagna (prov. di Bologna,



Albero ottenuto con l'analisi Maximum Likelihood dall'allineamento delle sequenze ITS (ITS1-5.8s-ITS2) di specie appartenenti al genere *Cortinarius* sez. *Calochroi*. A livello dei nodi sono indicati i valori di MLB $\geq 70\%$. La nuova sequenza ottenuta in questo lavoro è in grassetto.



Figura 1. Esemplari di *C. flavoaurantians* (raccolta di Roccalbegna, 20/10/2016). Si noti la reazione al KOH color arancione, sul cappello dell'esemplare più giovane in primo piano; solo bruno arancio, poco vivace, sull'esemplare più maturo in secondo piano.
Foto di Marco Clericuzio

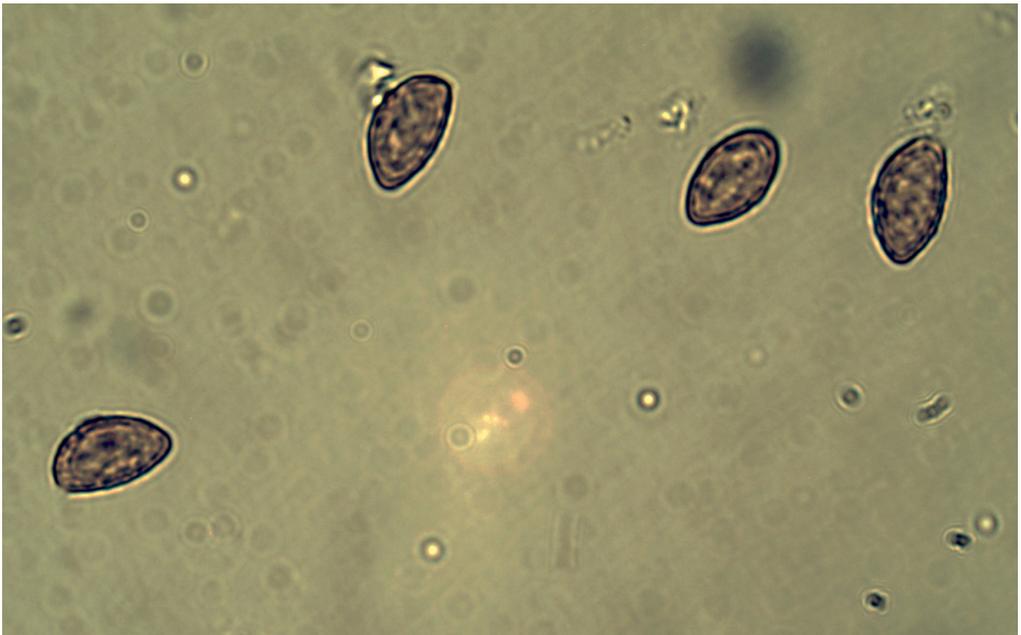


Figura 2. Foto microscopica delle spore dalla stessa raccolta.

Foto di Marco Clericuzio

CONSIGLIO, 2004, come *C. paraplatypus* Reumaux), una nelle Marche (in prov. di Pesaro, SCHMIDT-STOHN G. *ET AL.*, 2016), due in Toscana (prov. di Grosseto). Al di fuori dell'Italia la specie è stata ritrovata nella Repubblica Ceca, in Ungheria ed in Spagna (FRØSLEV *ET AL.*, 2007, raccolte non determinate, riportate come *Cortinarius* sp. 7). È assai probabile che *C. flavoaurantians* faccia parte di quella flora micologica piuttosto strettamente legata all'ordine fitosociologico *Quercetalia pubescentis*, che si trova in Europa (centro)-meridionale: Spagna, Francia sud-occidentale, Italia, mentre nei Balcani si spinge più a nord, per l'appunto fino alla repubblica Ceca.

Indirizzi degli Autori

Marco Clericuzio,
Università del Piemonte Orientale, Dipart. DISIT,
Via T. Michel 11, 15121 Alessandria.
E-mail: marco.clericuzio@uniupo.it

Francesco Dovana
Università di Torino
Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi,
Viale P.A. Mattioli 25, I-10125
E-mail: francescodovana@libero.it

Leho Tedersoo
Natural History Museum, University of Tartu,
14A Ravila, 51005 Tartu, Estonia.
E-mail: leho.tedersoo@ut.ee

Elia Ambrosio
Via Calamandrei 2, 53035 Monteriggioni, Siena.
E-mail: elly1006@hotmail.it

Bibliografia

- CONSIGLIO G., BIDAUD A., ANTONINI D., ANTONINI M. & LA ROCCA S. – 2004: *Il Genere Cortinarius in Italia. Parte terza. Alcune specie interessanti della sezione Calochroi*. Bollettino dell'Associazione Micologica ed Ecologica Romana 61: 3–43.
- FRØSLEV T.G., JEPPESEN T.S., LÆSSØE T. & KJØLLER R. – 2007: *Molecular phylogenetics and delimitation of species in Cortinarius section Calochroi (Basidiomycota, Agaricales) in Europe*. Molecular Phylogenetics and Evolution 44: 217–227.
- GARNICA S., WEISS M., OERTEL B., AMMIRATI J. & OBERWINKLER F. – 2009: *Phylogenetic relationships in Cortinarius, sect. Calochroi, inferred from nuclear DNA sequences*. BMC Evol. Biol. 11: 213–221.
- KATO H., MISAWA K., KUMA K. & MIYATA T. – 2002: *MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform*. Nucleic Acids Res. 30: 3059–3066.
- KEARSE M., MOIR R., WILSON A., CHEUNG M., STURROCK S., BUXTON S., COOPER A., MARKOWITZ S., DURAN C., THIERER T., ASHTON B., MEINTJES P. & DRUMMOND A. – 2012: *Bioinformatics*, 28: 1647–1649.
- LIIMATAINEN K., NISKANEN T., DIMA B., KYTÖVUORI I., AMMIRATI J.F. & FRØSLEV T.G. – 2014: *The largest type study of Agaricales species to date: bringing identification and nomenclature of Phlegmacium (Cortinarius) into the DNA era*. Persoonia 33: 98–140.
- ORTEGA A., SUÁREZ-SANTIAGO V.N. & REYES J.D. – 2008: *Morphological and ITS identification of Cortinarius species (section Calochroi) collected in Mediterranean Quercus woodlands*. Fungal Divers 29: 73–88.
- POSADA D. & CRANDALL K. – 1998: *MODELTEST: Testing the model of DNA substitution*. Bioinformatics, 14: 817–818.
- SCHMIDT-STOHN G., SAAR G., BRANDRUD T.E. & DIMA B. – 2016: *Interessante Phlegmacium-Funde um Urbino*. Journ. des J.E.C. 18: 77–96.
- STAMATAKIS A. – 2006: *RAxML-VI-HPC: maximum likelihoodbased phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models*. Bioinformatics 22: 2688–2690.
- VIZZINI A., CLERICUZIO M., BOCCARDO F. & ERCOLE E. – 2012: *A new Cortinarius of section Calochroi (Basidiomycota, Agaricomycetes) from Mediterranean Quercus woodlands (Italy)*. Mycologia, 104: 1502–1509.
- WHITE T.J., BRUNS T., LEE S. & TAYLOR J. – 1990: *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. PCR protocols: a guide to methods and application 18: 315–322.