

MANUEL ATZENI, ANTONIO GENNARI, STEFANO CORSANICI, LAURA NICOLETTI

SEGNALAZIONE DI *MICROGLOSSUM CLAVATUM* IN ITALIA**Riassunto**

Questo articolo contiene descrizioni ed immagini macroscopiche e microscopiche di *Microglossum clavatum*, una chiave di determinazione relativa ai *Microglossum* con colorazione verde ed una tavola che riassume forme e dimensioni delle principali strutture osservate al microscopio.

Abstract

This article contains macroscopic and microscopic images of the *Microglossum clavatum*, a determination key relative to the green-coloured *Microglossum* and a table summarizing the shapes and dimensions of the observed main microscopical structures.

Key words: *Microglossum clavatum*, Helotiales, Italy.

Introduzione

La specie oggetto di questo articolo è stata da noi trovata più volte nel Lazio, sempre nella stessa località.

Considerata la notevole somiglianza con altre specie di *Microglossum* di colore verde, la raccolta oggetto di questo articolo è stata inizialmente confusa con *Microglossum viride* (Pers.) Gillet (1879), con cui condivide forma e colore dell'ascoma, e il sospetto, che fosse una specie diversa, si è concretizzato durante le prime indagini microscopiche, perché i dati relativi alle singole strutture erano discordanti con la specie ipotizzata.

A questo punto, non trovando corrispondenza neppure con altre specie simili, abbiamo deciso di far sequenziare i campioni.

Abbiamo così scoperto trattarsi di *Microglossum clavatum* V. Kučera, Lizoň & Tomšovský (2017), un taxon di recente istituzione segnalato in Spagna, ma di cui non sono documentate immagini, né macroscopiche né microscopiche. Nel contesto dell'articolo "Taxonomic divergence of the green naked-stipe members of the genus *Microglossum* (Helotiales)" degli autori V. Kučera, P. Lizoň & M. Tomšovský, nel quale vengono presentate quattro specie nuove, tra le quali appunto *M. clavatum*, oltre a *M. truncatum*, V. Kučera et al., *M. pratense* V. Kučera et al. e *M. tenebrosus* V. Kučera et al., ne è infatti presente soltanto una breve descrizione.

Vista la perfetta corrispondenza, non solo a livello molecolare, ma anche morfologico e microscopico, della nuova specie con quella delle nostre raccolte e considerata la poca documentazione esistente, abbiamo ritenuto utile proporre lo studio da noi effettuato, allo scopo di aggiungere nuove informazioni sulla variabilità e sull'habitat di *M. clavatum* e allo stesso tempo di segnalare il ritrovamento italiano.

Materiali e metodi

Le descrizioni microscopiche sono state effettuate su esemplari freschi e d'erbario.

Le *exsiccata* sono state reidratate con acqua distillata, aggiungendo talvolta ammoniacca 4%.

Per colorare il preparato si è utilizzato il rosso Congo anionico o ammoniacale, mentre per testare l'amiloidia degli aschi il reattivo di Melzer oppure il lugol.

Per la misurazione delle varie strutture e l'elaborazione dei dati è stato scelto il programma *Piximètre*.

Per quanto riguarda la misurazione delle spore e degli aschi è stata usata l'abbreviazione Me per il valore medio e Qm per il rapporto medio tra lunghezza e larghezza.

Analisi molecolare

Il DNA totale è stato estratto da campioni essiccati utilizzando un protocollo modificato basato su MURRAY & THOMPSON (1980). Le reazioni PCR (MULLIS & FALOONA, 1987) hanno incluso 35 cicli con una temperatura di annealing di 54 °C. Per amplificare la regione dell'rDNA dell'ITS sono stati impiegati i primer ITS1F e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990; GARDES & BRUNS, 1993). I prodotti di PCR sono stati controllati con gel di agarosio all'1% e le reazioni positive sono state sequenziate con uno o entrambi i primer per PCR. I cromatogrammi sono stati controllati per la ricerca e correzione di errori di lettura putativi.

Analisi filogenetica

E' stato usato BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990) dal database pubblico Internazionale Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC, KARSCH-MIZRACHI *et al.* 2011) per selezionare le sequenze più strettamente correlate. Le sequenze provengono principalmente da ZHONG & PFISTER (2004), KUČERA *et al.* (2014a, 2014b, 2017), IGLESIAS & ARAUZO (unp.). Le sequenze sono state allineate con il software MEGA 5.0 (TAMURA *et al.* 2011) e la sua applicazione Clustal W, e, quindi, corrette manualmente. L'allineamento finale, che include 187/472, siti variabili/totali, è stato caricato in MrBayes 3.2.6 (RONQUIST *et al.* 2012), dove è stata eseguita un'analisi bayesiana (singola partizione, due analisi simultanee, quattro catene, temperatura impostata su 0,2, campionamento ogni 100 generazioni) fino a quando le frequenze medie di split tra le analisi simultanee sono scese al di sotto di 0,01 dopo 0,23 M di generazioni. Infine, in RAXML 8.2.12 (STAMATAKIS, 2014), è stata eseguita un'analisi per ottenere un albero con il punteggio migliore di verosimiglianza, utilizzando l'algoritmo di ricerca standard (stesse partizioni, modello GTRGAMMA, 2000 repliche di bootstrap). La soglia di significatività è stata impostata al di sopra di 0,95 per la probabilità a posteriori (PP) e al 70% per le proporzioni di bootstrap (BP).

Microglossum clavatum V. Kučera, Lizoň & Tomšovský (2017)

Descrizione originale

Ascocarps 15–31 (37) mm high, tongue-like, club-shaped or clavate, usually compressed, stipitate. Fertile part 10–19.9 (25) × 1–4 mm, clavate, truncate or lanceolate, slightly vertically grooved, glabrous, naked, dark green sometimes with brown tint. Fertile part takes more than 1/2 of the ascoma. Sterile part (4) 5–12 × (1) 2.5–3 mm, cylindrical or flatened, concolours with fertile part, transition zone delimited by form [14 dry ascomata examined]. Asci (71.5) 96.4–116.6 (130) × (6.4) 8–9.8 (11.1) μm, 8-spored, cylindric to clavate, apex rounded, narrowly tapered towards the base, biseriate above, uniseriate below, the pore blueing in Melzer's reagent. Ascospores (14) 15.6–19.7 (23) × 4–5 μm, Q value = 3–5.7 (av. = 3.8), elliptical to oblong, usually slightly curved or sigmoid, ends obtuse or tapering, hyaline or with several (up to 4) lipid bodies, real septa not mentioned. Paraphyses filiform, straight, branched in basal part, some of the paraphyses branched at middle part, the apical cells filiform (1–2 μm) or slightly clavate or capitate (up to 3 μm). Habitat:— according to the available collections, on calcareous soil under *Buxus* sp. tree.

Descrizione dei caratteri macroscopici (Figg. 1-5)

Ascoma alto 15-45 mm, con la porzione fertile (clavula), che rappresenta circa 1/3 della lunghezza, di forma cilindrica, clavata, a lingua, generalmente compressa, con un solco più o meno profondo, che può attraversare tutto l'ascoma oppure limitarsi alla sola clavula. Alla sezione si presenta fistoloso, soprattutto nella clavula.

Clavula 5-15 × 3-5 mm, di forma clavata e solitamente con una scanalatura verticale, glabra e opaca, di color verde scuro, ma con riflessi bluastri a maturità. La zona di transizione con lo stipe risulta ben differenziata.



Fig. 1. *Microglossum clavatum*

Foto di Antonio Gennari



Fig. 2. *M. clavatum*

Foto di Manuel Atzeni



Fig. 3. *M. clavatum*

Foto di Manuel Atzeni



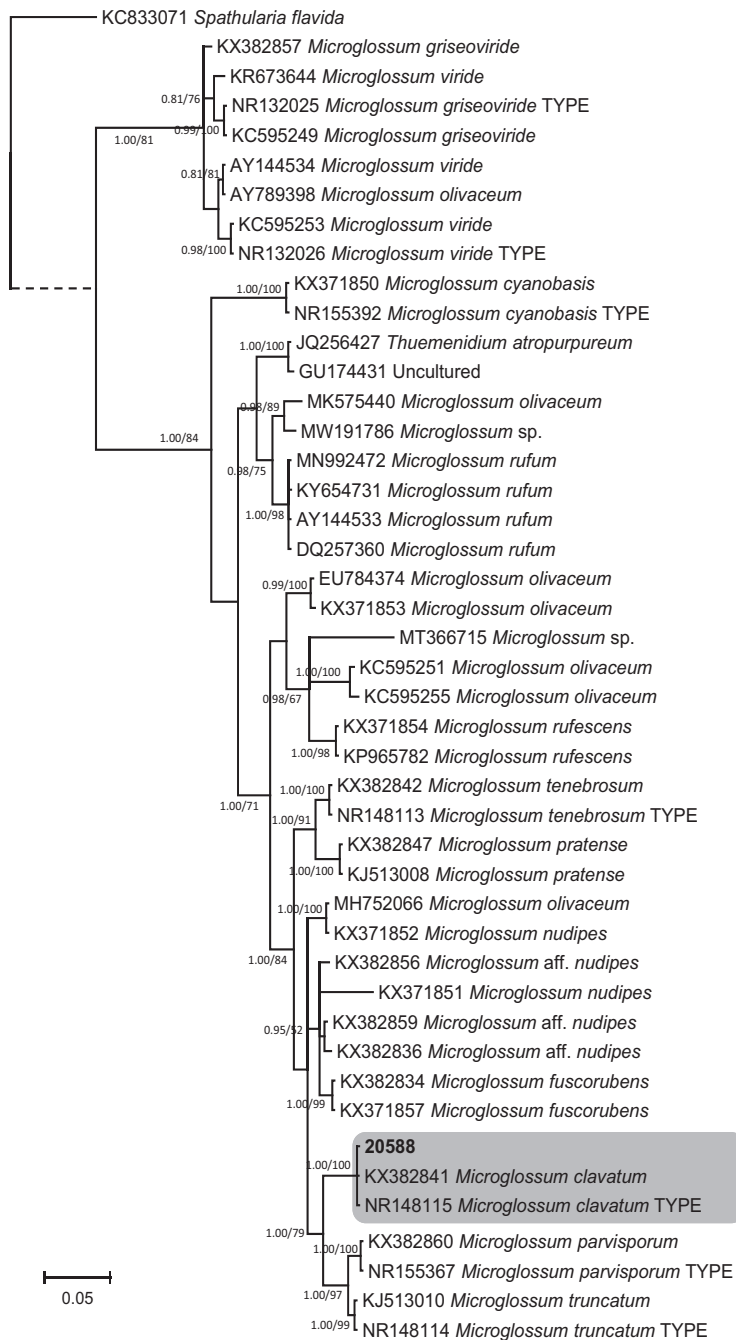
Fig. 4. *M. clavatum*

Foto di Stefano Corsanici



Fig. 5. *M. clavatum*

Foto di Laura Nicoletti



Albero filogenetico prodotto da P. Alvarado (Laboratorio Alvalab) secondo la procedura descritta nei Materiali e metodi. La sequenza 20588, evidenziata, si riferisce alla nostra raccolta.

Stipite 10-30 × 2-3 mm, glabro, cilindrico, talvolta appiattito, più o meno concolore alla clavula, ma sempre più brillante.

Carne uniformemente di color verde alla sezione, poi, con l'inizio della disidratazione, tende a decolorare verso toni biancastri nella parte interna dell'ascoma, in modo visibile già dopo poche ore dalla sezione, toni che mantiene nelle *exsiccata*; se reidratata ritorna verde. Odore non percepito, sapore mite.

Descrizione dei caratteri microscopici (Figg. 6-15; Tav. 1)

Ascospore (Figg. 6-7; Tav. 1. A) cilindriche, strettamente fusoidi, talvolta leggermente ricurve, ialine, lisce, (13,3) 14,7-18,6 (19,7) × (4) 4,2-5,1 (5,4) μm; Me = 16,4 × 4,7 μm; Q = (2,8) 3-4,1 (4,6); Qm = 3,6. Su materiale fresco sono state osservate fino a 4-6 guttule lipidiche, che spesso tendono a confluire in un'unica grande guttula; mentre, nel materiale essiccato, sono risultate raramente osservabili.

Aschi (Figg. 8-9; Tav. 1. B) con poro apicale amiloide, dimensioni (89,9) 90,5-107,4 (117,7) × (5,9) 6,9-9,3 (10) μm, Me = 100,7 × 7,9 μm, ottasporici, biseriatati all'apice, uniseriatati verso la base, clavati, inopercolati, con base aporinca, raramente pleurorinca.

Parafisi (Figg. 10-11; Tav. 1. C) filiformi, con apice leggermente dilatato, spesso con ramificazioni, anche plurime, nella parte basale e nella parte centrale, non osservate nella parte apicale. Provviste di setti poco evidenti.

Stroma (Figg. 12-14), sia nella clavula (escluso lo strato imeniale), che nello stipite, gli excipula ectale e medullare sono entrambi a textura prismatica formata da ife settate, cilindriche, parallele, con articoli lunghi fino a 80 μm e larghi fino a 12 μm.

Più o meno in tutto l'ascoma, è stata osservata sostanza granulare, cristallina, irregolare, di dimensioni variabili, con misure fino a 8-9 μm, di color verde brillante, sia nella parte imeniale, disposta come ad inglobare la parte apicale degli aschi e delle parafisi, sia sulle ife dello stroma, spesso addossata alla parete esterna quasi a simulare delle incrostazioni (Fig. 15).

Habitat in aree più o meno aperte di boscaglia con prevalenza di *Phyllirea angustifolia* L., *Quercus pubescens* Willd. e *Quercus ilex* L., su terreno muscicolo con presenza di *Cistus salvifolius* L.

Raccolte studiate Bosco di Macchia della Signora, Cerveteri (RM), il 20/12/2018, leg. M. Atzeni; il 18/02/2019, leg. M. Atzeni; il 14/12/2019, leg. M. Atzeni; il 30/12/2019, leg. M. Atzeni; il 19/01/2020, leg. A. Gennari; il 15/11/2020, leg. S. Corsanici; il 19/11/2020, leg. L. Nicoletti.

Osservazioni

Come accennato nell'introduzione, inizialmente ci siamo trovati in difficoltà nella determinazione della specie oggetto di studio.

Naturalmente abbiamo confrontato i dati in nostro possesso con quelli delle specie con colorazione verde dell'ascoma, a partire dal *M. viride*, proseguendo con *M. griseoviride* V. Kučera *et al.* (2014), con *M. nudipes* Boud. (1917), con *M. parvisporum* V. Kučera *et al.* (2014) e con *M. rickii* S. Imai (1942), nonostante fosse una specie extraeuropea. Era sfuggita però alla nostra attenzione la recente pubblicazione del 2017 di Kučera *et al.* "Taxonomic divergence of the green naked-stipe members of the genus *Microglossum* (Helotiales)".

Pertanto, come talvolta accade quando ci si trova di fronte a caratteri che apparentemente non corrispondono ad alcuna delle specie conosciute, ci siamo avvalsi dell'analisi molecolare che ha permesso di determinare la specie come *M. clavatum*.

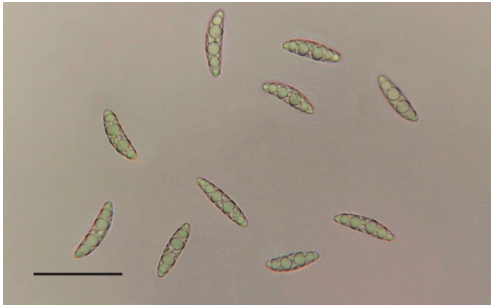


Fig. 6. *M. clavatum*. Spore. Barra 20 μ m.

Foto di Manuel Atzeni

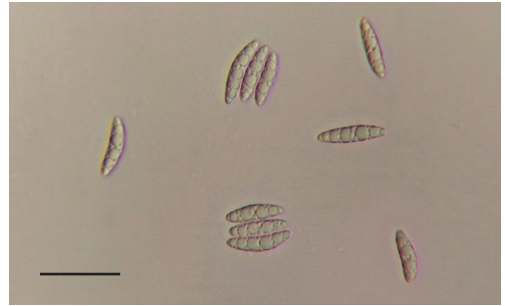


Fig. 7. *M. clavatum*. Spore. Barra 20 μ m.

Foto di Manuel Atzeni

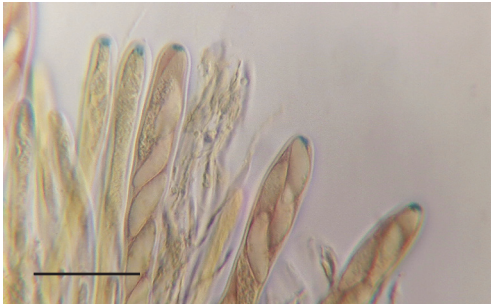


Fig. 8. *M. clavatum*. Amiloidia. Barra 20 μ m.

Foto di Manuel Atzeni

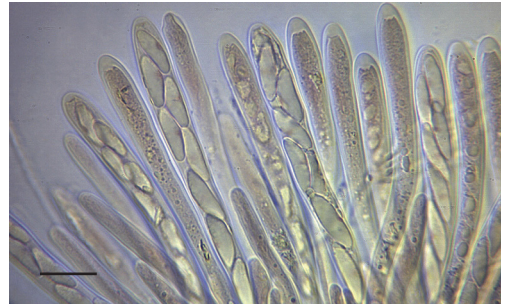


Fig. 9. *M. clavatum*. Aschi e spore. Barra 20 μ m.

Foto di Laura Nicoletti

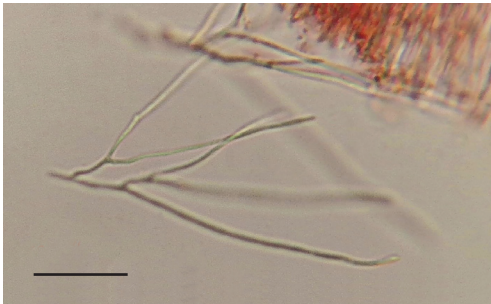


Fig. 10. *M. clavatum*. Parafisi. Barra 20 μ m.

Foto di Manuel Atzeni

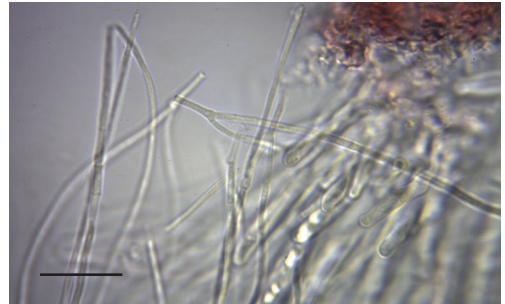


Fig. 11. *M. clavatum*. Parafisi. Barra 20 μ m.

Foto di Laura Nicoletti

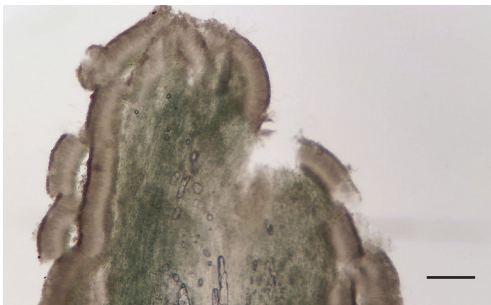


Fig. 12. *M. clavatum*. Sezione della clavula. Barra 200 μ m.

Foto di Manuel Atzeni

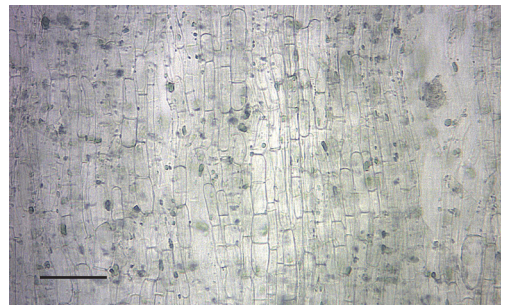


Fig. 13. *M. clavatum*. Stroma. Barra 50 μ m.

Foto di Laura Nicoletti

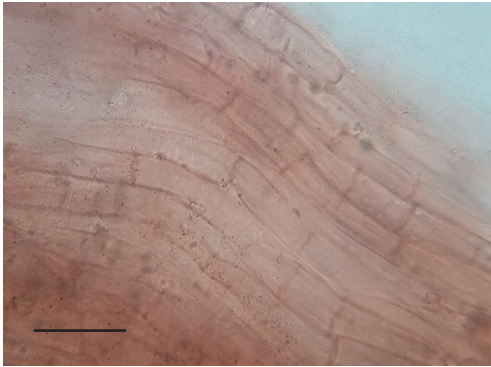


Fig. 14. *M. clavatum*. Stroma dello stipite. Barra 20 μm .

Foto di Stefano Corsanici

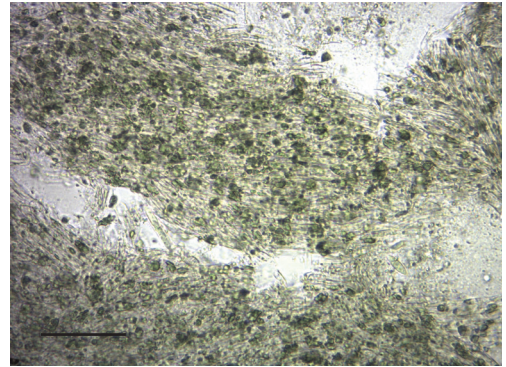
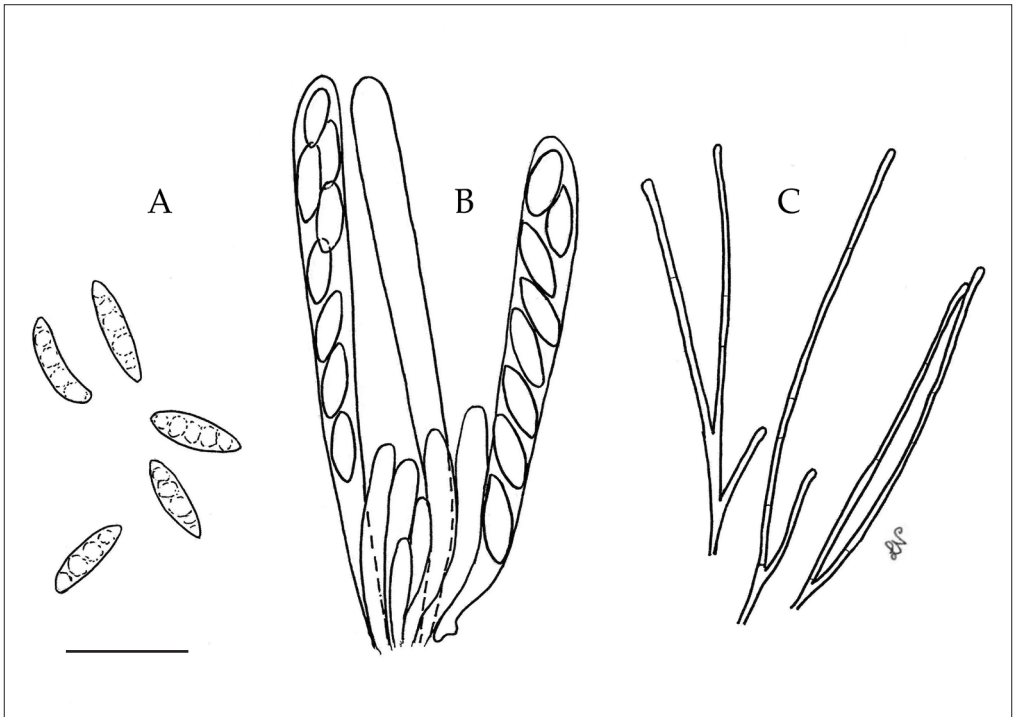


Fig. 15. *M. clavatum*. Struttura amorfa. Barra 50 μm .

Foto di Laura Nicoletti



Tav 1. *M. clavatum*. Barra 20 μm . A. Spore. B. Aschi. C. Parafisi. Barra = 20 μm .

Disegno di Laura Nicoletti

Una volta individuato l'articolo di KUČERA *et al.* abbiamo seguito la chiave di determinazione relativa alle specie di *Microglossum* di colore verde, presente nel lavoro.

Nel percorso per arrivare alla determinazione di *M. clavatum* abbiamo però rilevato alcune piccole differenze rispetto alle nostre raccolte.

Queste differenze ci hanno suggerito di presentare una chiave modificata rispetto a quella di questi autori, che riproponiamo semplificata e arricchita delle nuove osservazioni e considerazioni.

Il primo carattere particolarmente significativo da osservare nello studio di un *Microglossum* con ascoma di color verde è la presenza/assenza di squamosità nello stipite, in quanto definisce un primo netto bivio tra specie con stipite glabro, comprendenti anche *M. clavatum*, e quelle con stipite più o meno squamoso, come *M. viride*, *M. griseoviride* e *M. rickii*.

Per un passo successivo preferiamo trascurare il rapporto tra la lunghezza della clavula e quella dello stipite, in quanto le nuove osservazioni permettono di estendere il range dei valori, riportato nella chiave degli autori, e che, quindi, probabilmente, non è così dirimente.

Riteniamo invece di maggior rilievo la presenza/assenza nell'ascoma di tonalità rosa-oliva, che va a separare *M. rufescens* (Grelet) Bon (1970), con tonalità dominanti rosa-oliva, dalle specie con stipite nudo che ne sono prive.

A questo punto, diventa fondamentale la microscopia; infatti la lunghezza delle ascospore, quella degli aschi e, in particolare, la posizione delle ramificazioni sulle parafisi sono caratteri che permettono di condurre con certezza alla determinazione di *M. clavatum*.

CHIAVE DELLE SPECIE DI *MICROGLOSSUM* CON COLORAZIONE VERDE

1. Stipite squamuloso, ascoma verde, giallastro, grigio-verde; parafisi con apice provvisto di pigmento verde 2
- 1'. Stipite nudo, ascoma verde, verde rosato, verde oliva, blu-verde; parafisi con apice privo di pigmento verde 4
2. Aschi < 80 µm di lunghezza e ascoma < 1,5 cm di altezza, noto al momento solo in Brasile
..... *M. rickii*
- 2'. Aschi > 80 µm di lunghezza e ascoma fino a 8 cm di altezza 3
3. Ascoma giallo-verde, che cresce in luoghi umidi, spesso con piante epatiche *M. viride*
- 3'. Ascoma grigio-verde, che cresce su terreno boschivo *M. griseoviride*
4. Imenio con colore dominante rosa-oliva, stipite di colore marrone chiaro generalmente mescolato con altri colori *M. rufescens*
- 4'. Ascoma senza colori rosa e oliva 5
5. Ascospore ≤ 16 µm di lunghezza 6
- 5'. Ascospore > 16 µm di lunghezza 7
6. Ascoma bianco-verde, quando vecchio con toni violacei, aschi < 80 µm di lunghezza
..... *M. parvisporum*
- 6'. Ascoma verde scuro, quando vecchio verde scuro con tonalità viola scuro, aschi lunghi 80-95 µm *M. tenebrosum*
7. Aschi > 105 µm di lunghezza, habitat boschivo 8
- 7'. Aschi < 105 µm di lunghezza, habitat mesofilo di prati/pascoli 9
8. Parafisi ramificate alla base e nella parte centrale *M. clavatum*
- 8'. Parafisi ramificate nella parte basale e in quella apicale *M. nudipes*
9. Imenio concolore allo stipite *M. pratense*
- 9'. Imenio marrone-verde o marrone, stipite blu-verde *M. truncatum*

Ringraziamenti

Desideriamo ringraziare il caro amico Tomaso Lezzi per la revisione del manoscritto e per i preziosi consigli e P. Alvarado per la disponibilità nel gestire le indagini molecolari.

Indirizzi degli autori

MANUEL ATZENI

Via W. Churchill, 5, 00061 Anguillara Sabazia (RM).

E-mail: manuelatzenimyc@yahoo.com

STEFANO CORSANICI

Via Giuseppe Biadego, 6, 00135 Roma.

E-mail: poliporo@virgilio.it

ANTONIO GENNARI

Via Bonamici, 10, 52100 Arezzo.

E-mail: gennariant@gmail.com

LAURA NICOLETTI

Via A. Magliani, 6/C, 00148 Roma.

E-mail: nicolettilaura@tiscali.it

Bibliografia consultata

- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W. & LIPMAN DJ. – 1990: *Basic local alignment search tool*. Journal of Molecular Biology 215:403-410.
- BARAL H.-O., HAELEWATERS D. & PÄRTEL K.A. – 2015: *A new attempt to classify the families of the Helotiales*. Conference Paper.
- BOUDIER J.L.É. – 1917: *Dernières étincelles mycologiques*. Bulletin de la Société mycologique de France 33: 7–22.
- BREITENBACH J. & KRÄNZLIN F. – 1981: *Champignon de Suisse 1. Les Ascomycètes*. Ed. Mykologia.
- KARSCH-MIZRACHI I., NAKAMURA Y. & COCHRANE G. – 2011: *The International Nucleotide Sequence Database Collaboration*. On behalf of The International Nucleotide Sequence Database Collaboration, Nucleic Acids Research 39: D15-D18.
- HARRIES D. – 2018: *A study of the distribution of green and brown Microglossum species in Wales*. Pembrokeshire Fungus Recorder.
- GARDES M. & BRUNS T.D. – 1993: *ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts*. Molecular Ecology 2: 113-118.
- KUČERA V., TOMŠOVSKÝ M. & LIZOŇ P. – 2014b: *A new green earth-tongue Microglossum parvisporum sp. nov.* Sydowia 66 (2), 335-343.
- KUČERA V., LIZOŇ P. & TOMŠOVSKÝ M. – 2017: *Taxonomic divergence of the green naked-stipe members of the genus Microglossum (Helotiales)*. Mycologia 109 (1), 46-54.
- MOINGEON S. & MOINGEON J.M. – 2004: *Contributions à l'étude des Geoglossaceae à spores hyalines*. Miscellanea Mycologica 80–81: 25–35.
- MULLIS K. & FALOONA F.A. – 1987: *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods in Enzymology 155: 335-350.
- MURRAY M.G. & THOMPSON W.F. – 1980: *Rapid isolation of high molecular weight plant DNA*. Nucleic Acids Research 8 (19): 4321-4325.
- RONQUIST F., TESLENKO M., VAN DER MARK P., AYRES D.L., DARLING A., HÖHNA S., LARGET B., LIU L., SUCHARD M.A. & HUELSENBECK J.P. – 2012: *MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space*. Systematic Biology 61 (3): 539-542.
- STAMATAKIS A. – 2014: *RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies*. Bioinformatics 30(9): 1312-1313.
- TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A. & KUMAR S. – 2013: *MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0*. Molecular Biology and Evolution 30 (12): 2725-2729.
- WHITE T.J., BRUNS T.D., LEE S. & TAYLOR J.W. – 1990: *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: INNIS M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J., WHITE T.J. (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic, San Diego, 482 pp.
- ZHONG Z. & PFISTER D.H. – 2004: *Phylogenetic relationships among species of Leotia (Leotiales) based on ITS and RPB2 sequences*. Mycological Progress 3 (3): 237-246.