



ATTI
DELLA
SOCIETÀ TOSCANA
DI
SCIENZE NATURALI

MEMORIE • SERIE B • VOLUME CXXXI • ANNO 2024



Edizioni ETS

ATTI DELLA SOCIETÀ TOSCANA DI SCIENZE NATURALI

MEMORIE

Via Santa Maria, 53 - 56126 Pisa

Rivista di proprietà della Società Toscana di Scienze Naturali. Fondata nel 1875, la rivista pubblica Memorie e Note originali, recensioni, corrispondenze e notiziari nel campo delle Scienze Naturali. È inviata ai soci e depositata in biblioteche corrispondenti. Tutti i contenuti dei volumi a stampa (articoli originali, comunicazioni brevi, notizie e recensioni) è liberamente disponibile in rete, in conformità all'Open Access, sulle pagine <http://www.stsn.it/en/memorie-serie-a.html> (Serie A) e <http://www.stsn.it/en/memorie-serie-b.html> (Serie B). *Journal owned by Società Toscana di Scienze Naturali. Founded in 1875, the journal publishes original papers, short communications, news and book reviews on Natural Sciences. The Journal is sent to Società Toscana di Scienze Naturali members and deposited in selected libraries. All content of the printed version (original papers, short communications, news and book reviews) is freely available online in accordance with the Open Access at <http://www.stsn.it/en/memorie-serie-a.html> (Serie A) and <http://www.stsn.it/en/memorie-serie-b.html> (Serie B).*

Gli Atti sono pubblicati in due volumi (Serie A - Abiologica, ISSN 0365-7655; Serie B - Biologica, ISSN 0365-7450) all'anno nel mese di dicembre. Possono essere pubblicati ulteriori volumi, definiti Supplementi, su temi specifici.

Atti are published yearly in two Issues (Serie A - Abiological, ISSN 0365-7655; Serie B - Biological, ISSN 0365-7450) in December. Some monographic volumes may be published as Supplementi.

Le lingue usate dalla rivista sono l'inglese o l'italiano // *The languages of the journal are English or Italian.*

Comitato scientifico (*Editorial Board*)

Serie A: G. Bianucci (Pisa, Italia), R. Blanco Chao, (Santiago de Compostela, Spagna), L. Disperati (Siena, Italia), W. Finsinger, (Montpellier, Francia), C. Montomoli (Torino, Italia), A. Oros Sršen (Zagabria, Croazia), E. Pandeli (Firenze, Italia), S. Richiano (Puerto Madrin, Argentina), E. Starnini (Pisa, Italia).

Serie B: A. Aguilera (Valencia, Spain), N.E. Baldaccini (Pisa, Italy), E. Biondi (Ancona, Italy), B. Foggi (Firenze, Italy), E. Palagi (Pisa, Italy), G. Paradis (Ajaccio, France), L. Peruzzi (Pisa, Italy), M. Zuffi (Pisa, Italy).

Direttore scientifico (*Editor in Chief*): Paolo Roberto Federici

Comitato di redazione (*Editorial Office*)

Serie A: A. Chelli (*Segretario agli Atti / Editor*)

Serie B: G. Bedini (*Segretario agli Atti / Editor*), G. Astuti, A. Carta, M. D'Antraccoli, L. Peruzzi, F. Roma-Marzio

La corrispondenza deve essere inviata ai Segretari agli Atti (per la Serie A: A. Chelli, Dipartimento di Chimica, Scienze della Vita e della Sostenibilità Ambientale, Parco Area delle Scienze, 157/A - 43124 Parma, email: alessandro.chelli@unipr.it; per la Serie B: G. Bedini, Dipartimento di Biologia, via Derna, 1 - 56126 Pisa, e-mail: gianni.bedini@unipi.it).

The correspondence must be sent to Editors (for Serie A: A. Chelli, Dipartimento di Chimica, Scienze della Vita e della Sostenibilità Ambientale, Parco Area delle Scienze, 157/A - 43124 Parma, email: alessandro.chelli@unipr.it; for Serie B: G. Bedini, Dipartimento di Biologia, via Derna, 1 - 56126 Pisa, e-mail: gianni.bedini@unipi.it).

Per ulteriori informazioni / *For further information:* <http://www.stsn.it/>

Per informazioni editoriali / *For editorial information:* Edizioni ETS - <https://www.edizioniets.com/>

SOCIETÀ TOSCANA DI SCIENZE NATURALI

Fondata nel (*founded in*) 1874

Via Santa Maria, 53 - 56126 Pisa

Consiglio Direttivo (*Executive Committee*)
(2023-2024)

Presidente

P.R. Federici

Vice Presidenti

W. Landini, M. Pappalardo

Segretario generale

F. Rapetti

Segretari agli Atti (Editors)

A. Chelli (Serie A),

G. Bedini (Serie B)

Bibliotecario

M. Zuffi

Economo-Cassiere

R. Narducci

Autorizzazione n. 17/56 del 26 luglio 1956, Trib. di Pisa

Direttore responsabile (Editor in Chief): Paolo Roberto Federici

© Copyright 2023-2024 by Società Toscana di Scienze Naturali.

Per tutti gli articoli pubblicati (articoli originali, comunicazioni brevi, notizie e recensioni) gli autori trasferiscono i diritti d'autore e di pubblicazione alla rivista.

For all published articles (original papers, short communications, news and book reviews) the authors transfer copyright and publishing rights to the Journal.

Tutti gli articoli pubblicati sugli Atti (articoli originali, comunicazioni brevi, notizie e recensioni) sono rilasciati con licenza CC BY 4.0. Essi possono essere condivisi e adattati, a condizione che venga dato credito adeguato, e possono essere utilizzati anche per scopi commerciali.

All published articles in Atti (original papers, short communications, news and book reviews) are released under CCL BY 4.0. They can be shared and adapted, provided that adequate credit is given, for any purpose, even commercially.

Laura Gasperetti⁽¹⁾, Alice Giusti⁽²⁾, Enrica Ricci⁽¹⁾, Luciano Lami⁽³⁾,
Francesco Verdigi⁽⁴⁾, Roberto Narducci⁽³⁾, Andrea Armani⁽²⁾

SVILUPPO DI UN DATASET GENETICO PER L'IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI FUNGHI EPIGEI E LA GESTIONE DELLE INTOSSICAZIONI SUL TERRITORIO DELLA REGIONE TOSCANA

Abstract - L. GASPERETTI, A. GIUSTI, E. RICCI, L. LAMI, F. VERDIGI, R. NARDUCCI, A. ARMANI, *Building of a genetic dataset for the molecular identification of epigeal mushrooms and management of poisoning cases in Tuscany, Italy.*

An ITS gene dataset for the molecular identification of mushroom species was built and validated. The target species ($n = 242$) were selected among those involved in Tuscany poisoning cases, together with co-generic and morphologically similar species. The ITS sequences of each target species were retrieved from official databases and checked for quality and reliability by a systematic filtering process. Wild specimens of target species were also collected to produce reference ITS sequences. Overall, 7270 sequences were found in the official databases. After filtering, 1293 sequences (17.8%) were discarded, with a final retrieval of 5977 sequences from 224 target species. Ninety-seven ITS reference sequences were obtained from 76 collected mushroom specimens: 15 of them, obtained from 10 species with no sequences available after the filtering, were used to build the dataset, with a final taxonomic coverage of 96.7%. The other 82 sequences (66 species) were used for the dataset validation by BLAST analysis. In most of the cases ($n = 71$; 86.6%) they matched with identity values ≥ 97 -100% with the co-specific sequences in the dataset. The dataset was proved as especially able to identify the species involved in regional poisoning cases. As some of these species are also involved in poisonings at the national level, it can be used to support the National Health Service in the Italian territory.

Key words - macromycetes, sequencing, DNA, poisoning, Tuscany, Italy

Riassunto - L. GASPERETTI, A. GIUSTI, E. RICCI, L. LAMI, F. VERDIGI, R. NARDUCCI, A. ARMANI, *Sviluppo di un dataset genetico per l'identificazione molecolare di funghi epigei e la gestione delle intossicazioni sul territorio della Regione Toscana.*

In questo studio è stato costruito e validato un dataset genetico (gene ITS) per l'identificazione molecolare di specie fungine. Le specie target ($n = 242$) sono state selezionate tra quelle implicate nei casi di intossicazione riportati in Toscana, insieme alle co-generiche e a quelle morfologicamente simili. Per ciascuna specie target sono state raccolte le sequenze ITS da database genetici ufficiali e poi filtrate sistematicamente in base a qualità e attendibilità. Sono stati inoltre raccolti esemplari morfologicamente identificati a livello di specie per produrre sequenze ITS di riferimento. In totale, sono state inizialmente raccolte 7270 sequenze dai database genetici ufficiali. Dopo il filtraggio sistematico, sono state

scartate 1293 sequenze (17.1%), con un recupero finale di 5977 sequenze appartenenti a 224 specie target. Sono state ottenute 97 sequenze ITS di riferimento da 76 esemplari identificati: 15 di queste, relative a 10 specie per le quali non risultavano disponibili sequenze dopo il filtraggio sistematico, sono state utilizzate per costruire il dataset, con una copertura tassonomica finale di 96.7%. Le altre 82 sequenze, appartenenti a 66 specie, sono state impiegate per la validazione del dataset mediante analisi BLAST. Nella maggior parte dei casi ($n = 71$; 86.6%) le sequenze mostravano valori di identità ≥ 97 -100% con le sequenze co-specifiche nel dataset. Il dataset si è rivelato particolarmente efficace nell'identificare le specie coinvolte nei fenomeni di intossicazione in Toscana. Poiché alcune di queste sono anche le principali responsabili di intossicazioni a livello nazionale, il dataset, opportunamente integrato, potrebbe rappresentare un valido strumento per il Servizio Sanitario Nazionale.

Parole chiave - macromiceti, sequenziamento, DNA, intossicazioni, Toscana

INTRODUZIONE

Coerentemente con il diffondersi di nuove tendenze alimentari, l'apprezzamento dei consumatori per i funghi è aumentato, sia per le loro proprietà nutrizionali (Panjikaran & Mathew, 2013), sia perché rappresentano un'alternativa di ridotto impatto ambientale e costo di produzione rispetto agli alimenti di origine animale (Dhar & Shrivastava, 2012; Pandey *et al.*, 2018). È stato stimato che il mercato globale dei funghi coltivati si aggiri intorno ai 16.7 miliardi di dollari e si presume possa raggiungere i 20.4 miliardi di dollari nel 2025 (Market Research Report, 2020). L'Unione Europea (UE) assorbe gran parte del mercato, mentre, per quanto riguarda le produzioni, la Cina riveste il ruolo di leader, seguita da Italia, USA e Olanda (FAO-Stat, 2015; Misachi, 2017). Nel 2012, la produzione di funghi dell'UE ha rappresentato circa il 24% di quella mondiale, con l'Italia al primo posto tra i paesi pro-

⁽¹⁾ Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana M. Aleandri, UOT Toscana Nord, SS Abetone e Brennero 4, Pisa; laura.gasperetti@izslt.it, enrica.ricci@izslt.it

⁽²⁾ FishLab, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa, viale delle Piagge 2, 56124 Pisa; andrea.armani@unipi.it, alice.giusti183@outlook.it

⁽³⁾ A.G.M.T. Associazione Gruppi Micologici Toscani, via Turi 8, 56029 Santa Croce sull'Arno (PI); narducci1956@libero.it, Llami1943@gmail.com

⁽⁴⁾ ASL Toscana Nord Ovest - Dipartimento della Prevenzione - Ispettorato Micologico, via A. Cocchi 7/9, 56121 Pisa; francesco.verdigi@usl-nordovest.toscana.it

Questo studio è stato finanziato dal Ministero della Salute, codice IZS LT 04/18 RC.

Corresponding author: Alice Giusti (alice.giusti183@outlook.it)

duttori (FAOStat, 2015). L'interesse per i funghi è da connotarsi, oltre che in un contesto di tipo economico-produttivo, anche nella attività ludico-ricreativa di raccolta, soprattutto nei paesi dove questa tradizione gastronomica è più radicata, come l'Italia (Peintner *et al.*, 2013). In Italia, infatti, la tradizione di cercare e raccogliere funghi spontanei è particolarmente diffusa; vengono prevalentemente apprezzati i porcini (*Boletus edulis* s.l.), i cantarelli (*Cantharellus cibarius* s.l.) e l'ovulo (*Amanita caesarea* (Scop.) Pers.) che è uno dei funghi più costosi. Di interesse rilevante anche i prugnoli (*Calocybe gambosa* (Fr.) Donk), seppur soltanto in alcune regioni (Emilia-Romagna, Toscana), le morchelle (*Morchella* sp. pl.), i chiodini (*Armillaria mellea* s.l.) che sono consumati in grandi quantità soprattutto nel Nord Italia e il sanguinaccio (*Lactarius deliciosus* (L.) Gray e simili), ampiamente raccolti in Umbria, Toscana, Lazio, Campania e Calabria.

Il consumo di funghi non è privo di rischi. Infatti, essendo alcune specie selvatiche notoriamente tossiche, numerosi sono gli episodi di intossicazioni attribuibili per lo più ad erronee identificazioni a livello di raccolta. Queste sono dovute principalmente ad una scarsa formazione nel riconoscimento tassonomico da parte dei raccoglitori, così come dalla presenza di caratteristiche morfologiche molto simili, quindi difficilmente distinguibili, fra funghi edibili e tossici (Lima *et al.*, 2012). La tossicità è dovuta in genere alla presenza di micotossine che, a seconda della tipologia, possono causare diverse forme di avvelenamento con sindromi sia a breve (quando i primi sintomi sopraggiungono entro 5 ore dall'ingestione) che a lunga latenza (quando i primi sintomi sopraggiungono con un ritardo dall'ingestione che supera le 5 ore) (Della Maggiora, 2007). I sintomi quasi sempre presenti sono quelli gastro-intestinali (nausea, vomito, diarrea, dolori addominali), ma alcune specie possono provocare anche sonnolenza, agitazione, disorientamento, tremori oppure sudorazione abbondante, lacrimazione, difficoltà respiratoria e ipotensione (Jo *et al.*, 2014; White *et al.*, 2019). La specie tossica più nota è *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Link, responsabile della mortale sindrome falloidea (Della Maggiora, 2007). È inoltre opportuno porre l'attenzione sulle intossicazioni da specie commestibili, quale fenomeno costante accanto ai casi dovuti al consumo di specie tossiche (Sitta *et al.*, 2018). Secondo quanto riportato in letteratura, questo sarebbe attribuibile ad erronee condizioni di raccolta, trasporto, conservazione e/o cottura (Gawlikowski, 2015). Di fatto, le specie da considerare sicure sono quelle per le quali, in una data area, si rileva una bassa o subnulla casistica di intossicazioni a fronte di una notevole rilevanza del consumo alimentare (Sitta *et al.*, 2018). A livello italiano, dal 1° gennaio 1998 al 31 dicembre 2017 al Centro Antiveneni (CAV) Ospedale Niguarda Milano, sono pervenute 15.864 richieste di consulenza per intossicazione da funghi; di queste, 12.813 riguardavano casi

clinici, le restanti erano richieste di informazioni o richiami per *follow up* da parte dei medici (Assisi *et al.*, 2019). Nella maggior parte delle consulenze, il consumo a base di funghi coinvolge più commensali: pertanto, anche nel caso di una singola richiesta di consulenza (ad esempio una telefonata), l'evento da gestire può interessare più pazienti legati allo stesso focolaio. È peraltro verosimile che anche in questo caso, la casistica sia sottostimata laddove i dati relativi a questi eventi siano stati inseriti nella totalità delle generiche intossicazioni alimentari, cui si aggiungono i casi che non vengono diagnosticati correttamente, perché si risolvono in breve tempo, senza particolari interventi e senza ospedalizzazione (Della Maggiora, 2007). L'entità del problema resta quindi sommersa, dal momento che il numero delle richieste di consulenza non corrisponde al reale numero di pazienti intossicati (Assisi *et al.*, 2019). Si capisce quindi come le intossicazioni da funghi rappresentino un rilevante interesse epidemiologico nell'ambito delle intossicazioni alimentari e siano causa di costi sanitari diretti per la Sanità Pubblica (Gulino *et al.*, 2009; Schenk-Jaeger *et al.*, 2012). In virtù del fatto che nella maggior parte dei casi le intossicazioni sono dovute ad erronee identificazioni da parte di raccoglitori inesperti, è evidente che una corretta cultura micologica sia uno dei presupposti per una maggiore sicurezza del cittadino. Inoltre, viene consigliato di fare ispezionare tutto il proprio raccolto presso il servizio di consulenza costituito da Ispettorati micologici pubblici delle ASL, in cui micologi formati contribuiscono a identificare le specie fungine. Ad oggi, gli Ispettorati micologici in Italia sono in totale 331 e svolgono un servizio capillare sul territorio, finalizzato alla tutela della salute pubblica e specificatamente alla prevenzione delle intossicazioni da funghi. A questi enti si aggiungono strutture laboratoristiche in grado di portare l'indagine micologica a un livello maggiore di approfondimento (Golzio *et al.*, 2007; Tani *et al.*, 2020). In particolare, gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS), rappresentano un importante strumento operativo di cui dispone il Servizio Sanitario Nazionale (SSN) per assicurare il supporto di laboratorio e la diagnostica nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti. Nel caso dei funghi, gli IIZZSS possono essere chiamati in causa per l'identificazione di specie, laddove la mancanza delle caratteristiche morfologiche distintive non siano facilmente apprezzabili dal micologo. Si capisce quindi come, sia in presenza di campioni commerciali venduti a pezzi (es. misto di funghi secchi), ma soprattutto in presenza di residui di pasto o campioni clinici (vomito, residui gastrici, campioni fecali), gli enti coinvolti nei controlli ufficiali (es. IIZZSS) dovranno servirsi di tecniche d'identificazione alternative e più efficaci. Infatti, poiché l'identificazione rapida della specie coinvolta nell'intossicazione è di estrema importanza per un corretto e tempestivo trattamento del paziente, l'utilizzo di tecniche più risolutive è più che mai auspi-

cabile. A tal proposito, l'analisi del genotipo e più precisamente le tecniche basate sul sequenziamento del DNA, stanno diventando sempre più preziose per l'identificazione di specie fungine (Raja *et al.*, 2017a). In particolare, una regione del DNA nucleare di 600-800 paia di basi (pb), conosciuta come *Internal Transcribed Spacer* (ITS), si è rivelata particolarmente promettente grazie alla sua elevata variabilità interspecifica (Schoch *et al.*, 2012) ed è stata utilizzata come marker molecolare in molti studi tassonomici, ma anche per l'identificazione in prodotti commerciali (Raja *et al.*, 2017b; Zhang *et al.*, 2021). Una volta estratto il DNA totale e amplificata la regione d'interesse, questa viene sequenziata ed analizzata. Le tecniche post-sequenziamento più utilizzate, sono la metodica *Forensically Informative Nucleotide Sequencing* (FINS) (Bartlett & Davidson, 1992) e il DNA Barcoding (Hebert *et al.*, 2003), strettamente correlate tra loro, che prevedono l'applicazione di algoritmi e modelli bioinformatici per l'analisi e il calcolo delle distanze filogenetiche tra il campione ignoto e le sequenze di riferimento (Hellberg & Morrissey, 2011). Il principale database genetico contenente sequenze di riferimento è GenBank® (GB, 2020), una banca dati gestita dal National Center for Biotechnology statunitense (NCBI), che ad oggi contiene le sequenze nucleotidiche relative a 420.000 specie formalmente descritte (Sayers *et al.*, 2018). Il diffuso utilizzo della regione ITS per l'identificazione di specie fungine ha determinato un significativo aumento del numero di sequenze depositate (Begerow *et al.*, 2010). Al 2012 si contavano infatti, circa 172.000 sequenze ITS complete, che rappresentano oltre 2.500 generi e 15.500 specie (Schoch *et al.*, 2012). Un altro database genetico ampiamente utilizzato è Barcode of Life Data System (BOLD, 2020), che è parte integrante del progetto promosso dal Consortium for the Barcode of Life (CBOL). BOLD rappresenta una valida alternativa a GenBank®, dal momento che è stato dimostrato che circa il 20% di tutte le sequenze depositate in quest'ultimo database, provengono da esemplari erroneamente identificati e che la maggior parte fornisca insufficienti informazioni di tipo descrittivo, soprattutto per quanto riguarda l'aggiornamento delle annotazioni tassonomiche (Nilsson *et al.*, 2006). In tal senso, la maggior parte delle sequenze depositate in BOLD sono state invece ottenute dal sequenziamento di esemplari ufficialmente identificati e conservati in erbari e/o musei. Tuttavia, le sequenze disponibili per i funghi sono ad oggi circa 23.000 (BOLD, 2020), un numero nettamente inferiore rispetto a quelle depositate su GenBank®. Una metodica da proporre in sede di controllo ufficiale non può prescindere da un'opportuna analisi preliminare dei database ufficiali, al fine di selezionare sequenze di riferimento attendibili. Allo stesso tempo, la creazione di un dataset genetico di riferimento deve prevedere l'inclusione di sequenze riferibili anche a specie non ancora presen-

ti nei database genetici ufficiali. È opportuno sottolineare che, in virtù dell'elevato numero di specie fungine conosciute e dell'estrema biodiversità legata all'origine geografica, è utopistico pensare di riuscire a costruire un dataset genico universalmente valido; pertanto, sarebbe opportuno che venissero predisposti ed utilizzati dataset specifici per territorio di competenza. In particolare, laddove utilizzato a supporto della gestione dei casi di intossicazione, il dataset interno deve necessariamente contenere sequenze relative alle specie tossiche maggiormente coinvolte in suddetti episodi.

Quanto detto rappresenta l'obiettivo di un recente progetto di ricerca corrente dal titolo *Tecniche molecolari per l'identificazione di funghi epigei: studio di un modello integrato per la gestione efficace delle intossicazioni da funghi* che coinvolge l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana (UOT Toscana Nord), il Dipartimento della prevenzione della ASL Toscana Nord Ovest (Ispettorato Micologico), l'Associazione dei Gruppi Micologici Toscani (AGMT) ed il Dipartimento di Scienze Veterinarie (FishLab) dell'Università di Pisa. Il progetto è stato finalizzato alla costruzione e validazione di un dataset genetico interno (gene ITS) da utilizzare come strumento di interpretazione dei dati molecolari ottenuti dal sequenziamento e sviluppare un sistema analitico efficace per l'identificazione di specie fungine presenti sul territorio regionale. È stato dato particolare risalto alle specie fungine tossiche e a quelle morfologicamente simili presenti sul territorio, al fine di supportare il SSN nella gestione rapida ed efficace dei casi di intossicazione. Il dataset, eventualmente integrato con altre sequenze d'interesse, è stato anche pensato per essere utilizzato nella valutazione della veridicità delle informazioni riportate in etichetta (relativamente alla specie utilizzata) di prodotti a base di funghi presenti sul mercato. In questo articolo vengono riassunti i risultati del suddetto progetto, già pubblicati su riviste scientifiche internazionali (Giusti *et al.*, 2021a; Giusti *et al.*, 2021b).

MATERIALI E METODI

Selezione delle specie target del dataset

Le specie fungine selezionate come target del dataset sono quelle implicate nei casi di intossicazione che si sono verificati nel decennio 2010-2017 sul territorio della regione Toscana, riportate nella lista ufficiale del CAV Toscana (Tab. 1), oltre a quelle morfologicamente simili o comunque ampiamente presenti sul territorio. Laddove nella lista CAV venisse riportata l'entità a livello di genere (Tab. 1), sono state incluse tutte le specie ad esso appartenenti e presenti sul territorio. Una volta selezionate, le specie sono state categorizzate dall'AGMT sulla base della commestibilità in commestibili, sospette non commestibili, non commestibili, tossiche e mortali.

Tabella 1. Lista delle specie coinvolte nei casi di intossicazione in Toscana nel decennio 2010-2017, con relativo numero di casi e categoria di commestibilità determinata dall'AGMT (modificata da Giusti *et al.*, 2021b). Le nomenclature obsolete sono state sostituite con quelle valide secondo quanto riportato in Index Fungorum (IF, 2020). * Più di una specie con diverse categorie di commestibilità

| Numero di casi | Specie coinvolta | Categoria di commestibilità |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 153 | <i>Entoloma sinuatum</i> (Bull.) P. Kumm. | Tossica |
| 135 | <i>Omphalotus olearius</i> (DC.) Singer | Tossica |
| 22 | <i>Clitocybe nebularis</i> (Batsch) P. Kumm. | Tossica |
| 13 | <i>Russula</i> sp. pl. | * |
| 10 | <i>Rubroboletus satanas</i> (Lenz) Kuan Zhao & Zhu L. Yang | Tossica |
| 9 | <i>Agaricus xanthodermus</i> Genev. | Tossica |
| 9 | <i>Chlorophyllum venenatum</i> (Bon) Lange & Vellinga | Tossica |
| 7 | <i>Amanita phalloides</i> (Vaill. ex Fr.) Link | Mortale |
| 7 | <i>Chlorophyllum rhacodes</i> (Vittad.) Vellinga | Sospetta non commestibile |
| 7 | <i>Amanita muscaria</i> (L.) Lam. | Tossica |
| 6 | <i>Armillaria mellea</i> (Vahl) P. Kumm. | Commestibile |
| 5 | <i>Inocybe</i> sp. pl. | * |
| 4 | <i>Lepiota</i> sp. pl. | * |
| 3 | <i>Amanita pantherina</i> (DC.) Krombh. | Tossica |
| 3 | <i>Suillellus luridus</i> (Schaeff.) Murrill | Commestibile |
| 3 | <i>Clitocybe</i> sp. pl. | * |
| 3 | <i>Clitocybe rivulosa</i> (Pers.) P. Kumm. | Tossica |
| 3 | <i>Entoloma</i> sp. pl. | * |
| 3 | <i>Lepiota subincarnata</i> J.E. Lange | Mortale |
| 3 | <i>Macrolepiota</i> sp. pl. | * |
| 3 | <i>Candolleomyces candolleanus</i> (Fr.) D. Wächt. & A. Melzer | Tossica |
| 2 | <i>Amanita ovoidea</i> (Bull.) Link | Tossica |
| 2 | <i>Desarmillaria tabescens</i> (Scop.) R.A. Koch & Aime | Commestibile |
| 2 | <i>Lepiota cristata</i> (Bolton) P. Kumm. | Tossica |
| 2 | <i>Panaeolus</i> sp. pl. | * |
| 2 | <i>Ramaria</i> sp. pl. | * |
| 2 | <i>Tricholoma saponaceum</i> (Fr.) P. Kumm. | Tossica |
| 1 | <i>Agaricus</i> sp. pl. | * |
| 1 | <i>Agaricus moelleri</i> Wasser | Tossica |
| 1 | <i>Amanita</i> sp. pl. | * |
| 1 | <i>Amanita proxima</i> Dumée | Tossica |
| 1 | <i>Amanita verna</i> Bull. ex Lam. | Mortale |
| 1 | <i>Rubroboletus lupinus</i> (Fr.) Costanzo, Gelardi, Simonini & Vizzini | Tossica |
| 1 | <i>Rubroboletus pulchrotinctus</i> (Alessio) Kuan Zhao & Zhu L. Yang | Tossica |
| 1 | <i>Craterellus cornucopioides</i> (L.) Pers. | Commestibile |
| 1 | <i>Clitocybe rivulosa</i> (Pers.) P. Kumm. | Tossica |
| 1 | <i>Entoloma lividoalbum</i> (Kühner & Romagn.) Kubička | Sospetta non commestibile |
| 1 | <i>Entoloma sericatum</i> (Britzelm.) Sacc. | Sospetta non commestibile |
| 1 | <i>Hygrophoropsis aurantiaca</i> (Wulfen) Maire ex Martin-Sans | Sospetta non commestibile |
| 1 | <i>Hypholoma acutum</i> (Sacc.) E. Horak | Tossica |
| 1 | <i>Pseudosperma rimosum</i> (Bull.) Matheny & Esteve-Rav. | Tossica |
| 1 | <i>Lactarius evosmus</i> Kühner & Romagn. | Tossica |
| 1 | <i>Lepista nuda</i> (Bull.) Cooke | Commestibile |
| 1 | <i>Ramaria flavescens</i> (Schaeff.) R.H. Petersen | Commestibile |
| 1 | <i>Ramaria formosa</i> (Pers.) Quél. | Tossica |
| 1 | <i>Ramaria pallida</i> (Schaeff.) Ricken | Tossica |
| 1 | <i>Rhodocollybia</i> spp. | * |
| 1 | <i>Russula foetens</i> Pers. | Tossica |
| 1 | <i>Russula renidens</i> Ruots., Sarnari & Vauras | Non commestibile |
| 1 | <i>Russula torulosa</i> Bres. | Tossica |
| 1 | <i>Suillus collinitus</i> (Fr.) Kuntze | Commestibile |
| 1 | <i>Tricholoma equestre</i> (L.) P. Kumm. | Tossica |

Raccolta delle sequenze ITS dai database e filtraggio sistematico

Per ogni specie target del dataset, sono state raccolte tutte le sequenze ITS disponibili sui database GB (2020) e BOLD (2020), attraverso un processo di deduplicazione dei dati. Le sequenze raccolte sono state poi filtrate secondo stringenti criteri di qualità tecnico-formali. In particolare, sono state scartate le sequenze dichiarate nel database come “*unverified*”, quelle che riportavano le diciture “*aff.*” (= *affinis*) o “*cf.*” (*confer*), quelle incomplete (ITS-1 o ITS-2 parziali) o più corte di 550 pb (considerando che la lunghezza minima dell'intera regione ITS è di 600 pb (Gardes & Bruns, 1993)), quelle che presentavano un numero di basi degenerate superiore a 4 (N, B, D, H, V) o a 10 (R, Y, S, W, K, M), o che presentavano regioni omopolimeriche attribuibili ad errori tecnici di sequenziamento. Le sequenze mantenute sono state quindi sottoposte ad una analisi filogenetica con metodo Neighbor-joining su modello Kimura-2 parametri (Kimura, 1980) selezionato in quanto standard di riferimento dei database ufficiali GenBank® e BOLD. È stata tuttavia effettuata in parallelo un'analisi filogenetica con metodo Maximum Likelihood, più robusto, per assicurare la sovrapposibilità dei risultati. I cluster con valori di bootstrap $\geq 70\%$ sono stati considerati fortemente supportati (Hillis & Bull, 1993). Le sequenze che si posizionavano al di fuori dei rispettivi cluster specie o genere specifici con valori di bootstrap $\geq 70\%$ sono state quindi scartate. Per ciascuna specie target è stata poi valutata la variabilità intra-specifica sulle sequenze mantenute dopo il filtraggio sistematico utilizzando il software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

Produzione di sequenze ITS di riferimento da esemplari identificati

Gli esemplari delle specie fungine di interesse per la creazione del dataset sono stati raccolti dall'AGMT e identificati morfologicamente. Il campionamento è stato principalmente indirizzato a specie per cui non erano disponibili sequenze ITS dopo la fase di filtraggio sistematico e a specie maggiormente coinvolte in episodi di intossicazione a livello regionale. L'estrazione del DNA totale dagli esemplari raccolti è stata effettuata mediante metodica salting out proposta da Armani *et al.* (2012). Nel dettaglio, da ciascun esemplare è stata prelevata un'aliquota di circa 20 mg di tessuto, che è stata digerita con 10 μ l di Proteinasi-K (20 mg/ml) in una soluzione contenete 200 μ l di buffer di lisi (TRIS BASE 500 mM, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 2%) e 200 μ l di NaH_2PO_4 per 45 min. a 60°C su T-shaker. Il protocollo prevede quindi l'aggiunta di 0.5 volumi di acetato di sodio per modificare la solubilità delle proteine, farle precipitare e quindi

allontanarle dalla soluzione acquosa in cui è presente il DNA. Quest'ultimo è stato isolato per precipitazione aggiungendo 0.8 volumi di Isopropanolo. Sono stati quindi effettuati due lavaggi in ETOH (70% e 100%). Il DNA è stato quindi risospeso in H_2O e valutato quali-quantitativamente mediante lettura spettrofotometrica.

La regione ITS è stata amplificata con i primers ITS1 e ITS-4B progettati rispettivamente da Gardes & Bruns (1993) e da White *et al.* (1990), con programma di PCR riportato in Giusti *et al.* (2021b). I prodotti di PCR ottenuti sono stati sequenziati e le sequenze ottenute sono depositate in GB (2020).

Costruzione e validazione del dataset genetico

Il dataset genetico è stato costruito aggiungendo alle sequenze mantenute alla fine della fase di filtraggio sistematico le sequenze di riferimento ottenute da esemplari identificati. La versione finale del dataset genetico è stata caricata ed utilizzata sul software Geneious Prime 2020.0.4 (Kearse *et al.*, 2012). La capacità della regione ITS nel discriminare le specie target è stata valutata secondo quanto riportato dallo studio di Baddotti *et al.* (2017), nel quale tutte le specie appartenenti al Phylum *Basidiomycota* sono state categorizzate sulla base della probabilità di essere identificate mediante tale regione genica. Il dataset genetico è stato quindi validato mediante un'analisi BLAST delle sequenze ITS di riferimento non utilizzate per la fase di costruzione, e valori di identità di 97-100% sono stati utilizzati come valore soglia perché una specie fosse correttamente identificata, in accordo con quanto riportato da Raja *et al.* (2017b).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Selezione delle specie target del dataset

Per la costruzione del dataset sono state selezionate 242 specie target appartenenti a 59 generi, 23 famiglie, 7 ordini, 2 classi e 2 phyla (*Basidiomycota* e *Ascomycota*) (Tab. 2). Il Phylum *Basidiomycota* era fortemente più rappresentato, con 233 specie (96.3%). Delle 242 specie target, 98 (40.5%) sono state classificate come commestibili, 24 (9.9%) come sospette non commestibili, 32 (13.2%) come non commestibili, 74 (30.6%) come tossiche e 14 (5.8%) come mortali. Sulla base della valutazione dei casi di intossicazione verificatosi in Toscana nel decennio 2007-2017 sono state selezionate 109 delle 242 specie target. Da tenere presente che, tra queste, soltanto 41 venivano riportate a livello di specie, di cui 26 tossiche (63.4%), 7 commestibili (17%), 4 sospette non commestibili (9.7%), 3 mortali (7.3%) e 1 non commestibile (2.4%); poiché 11 organismi venivano invece riportati solo a

Tabella 2. Specie target del dataset.

| | | | | | |
|----|------------------------------------|-----|-------------------------------------|-----|----------------------------------|
| 1 | <i>Agaricus arvensis</i> | 82 | <i>Gymnopus fusipes</i> | 163 | <i>Psilocybe semilanceata</i> |
| 2 | <i>Auricularia auricula-judae</i> | 83 | <i>Gymnopus hariolorum</i> | 164 | <i>Ramaria aurea</i> |
| 3 | <i>Agaricus bitorquis</i> | 84 | <i>Gymnopus impudicus</i> | 165 | <i>Ramaria botrytis</i> |
| 4 | <i>Agaricus bresadolanus</i> | 85 | <i>Gymnopus ocior</i> | 166 | <i>Ramaria flava</i> |
| 5 | <i>Agaricus iodosmus</i> | 86 | <i>Gymnopus peronatus</i> | 167 | <i>Ramaria flavescens</i> |
| 6 | <i>Agaricus menieri</i> | 87 | <i>Gyromitra esculenta</i> | 168 | <i>Ramaria flavosalmonicolor</i> |
| 7 | <i>Agaricus moelleri</i> | 88 | <i>Gyromitra gigas</i> | 169 | <i>Ramaria formosa</i> |
| 8 | <i>Agaricus phaeolepidotus</i> | 89 | <i>Gyromitra infula</i> | 170 | <i>Ramaria pallida</i> |
| 9 | <i>Agaricus pseudoprattensis</i> | 90 | <i>Gyroporus castaneus</i> | 171 | <i>Ramaria sanguinea</i> |
| 10 | <i>Agaricus sylvicola</i> | 91 | <i>Gyroporus cyanescens</i> | 172 | <i>Ramaria intimoresea</i> |
| 11 | <i>Agaricus xanthodermus</i> | 92 | <i>Hebeloma laterinum</i> | 173 | <i>Rhizopogon luteolus</i> |
| 12 | <i>Agrocybe molesta</i> | 93 | <i>Hebeloma sinapizans</i> | 174 | <i>Rhizopogon roseolus</i> |
| 13 | <i>Agrocybe praecox</i> | 94 | <i>Hygrophoropsis aurantiaca</i> | 175 | <i>Rhodocollybia butyracea</i> |
| 14 | <i>Amanita ovoidea</i> | 95 | <i>Hypoholoma capnoides</i> | 176 | <i>Rhodocollybia prolixa</i> |
| 15 | <i>Amanita caesarea</i> | 96 | <i>Hypoholoma fasciculare</i> | 177 | <i>Rubroboletus lupinus</i> |
| 16 | <i>Amanita citrina</i> | 97 | <i>Hypoholoma lateritium</i> | 178 | <i>Rubroboletus rhodoxanthus</i> |
| 17 | <i>Amanita decipiens</i> | 98 | <i>Imperator luteocupreus</i> | 179 | <i>Rubroboletus satanas</i> |
| 18 | <i>Amanita echinocephala</i> | 99 | <i>Imperator rhodopurpureus</i> | 180 | <i>Russula caerulea</i> |
| 19 | <i>Amanita excelsa</i> | 100 | <i>Infundubulicybe geotropa</i> | 181 | <i>Russula chloroides</i> |
| 20 | <i>Amanita franchetii</i> | 101 | <i>Infundubulicybe gibba</i> | 182 | <i>Russula cyanoxantha</i> |
| 21 | <i>Amanita gemmata</i> | 102 | <i>Infundubulicybe mediterranea</i> | 183 | <i>Russula delica</i> |
| 22 | <i>Amanita muscaria</i> | 103 | <i>Inosperma bongardii</i> | 184 | <i>Russula foetens</i> |
| 23 | <i>Amanita ovoidea</i> | 10 | <i>Inosperma cookei</i> | 185 | <i>Russula grata</i> |
| 24 | <i>Amanita pantherina</i> | 105 | <i>Inocybe geophylla</i> | 186 | <i>Russula heterophylla</i> |
| 25 | <i>Amanita phalloides</i> | 106 | <i>Inosperma maculatum</i> | 187 | <i>Russula illota</i> |
| 26 | <i>Amanita proxima</i> | 107 | <i>Pseudosperma rimosum</i> | 188 | <i>Russula ionochlora</i> |
| 27 | <i>Amanita rubescens</i> | 108 | <i>Lactaria lacrymabunda</i> | 189 | <i>Russula maculata</i> |
| 28 | <i>Amanita strobiliformis</i> | 109 | <i>Lactarius blennius</i> | 190 | <i>Russula mustelina</i> |
| 29 | <i>Amanita verna</i> | 110 | <i>Lactarius chrysorrheus</i> | 191 | <i>Russula nobilis</i> |
| 30 | <i>Amanita verna</i> | 111 | <i>Lactarius controversus</i> | 192 | <i>Russula olivacea</i> |
| 31 | <i>Armillaria cepistipes</i> | 112 | <i>Lactarius decipiens</i> | 193 | <i>Russula parazurea</i> |
| 32 | <i>Armillaria gallica</i> | 113 | <i>Lactarius deliciosus</i> | 194 | <i>Russula persicina</i> |
| 33 | <i>Armillaria mellea</i> | 114 | <i>Lactarius mediterraneensis</i> | 195 | <i>Russula queletii</i> |
| 34 | <i>Boletus aereus</i> | 115 | <i>Lactarius pallidus</i> | 196 | <i>Russula sanguinea</i> |
| 35 | <i>Boletus edulis</i> | 116 | <i>Lactarius pyrogalus</i> | 197 | <i>Russula sardonina</i> |
| 36 | <i>Boletus pinophilus</i> | 117 | <i>Lactarius quieticolor</i> | 198 | <i>Russula subfoetens</i> |
| 37 | <i>Boletus reticulatus</i> | 118 | <i>Lactarius quietus</i> | 199 | <i>Russula torulosa</i> |
| 38 | <i>Butyriboletus fechtneri</i> | 119 | <i>Lactarius scrobiculatus</i> | 200 | <i>Russula turci</i> |
| 39 | <i>Boletus pseudoregius</i> | 120 | <i>Lactarius tesquorum</i> | 201 | <i>Russula vesca</i> |
| 40 | <i>Butyriboletus regius</i> | 121 | <i>Lactarius torminosus</i> | 202 | <i>Russula vinosobrunnea</i> |
| 41 | <i>Caloboletus calopus</i> | 122 | <i>Lactifluus vellereus</i> | 203 | <i>Russula virescens</i> |
| 42 | <i>Caloboletus radicans</i> | 123 | <i>Lactarius zonarius</i> | 204 | <i>Scleroderma citrinum</i> |
| 43 | <i>Calocybe gambosa</i> | 124 | <i>Lepiota brunneoincarnata</i> | 205 | <i>Scleroderma polyrhizum</i> |
| 44 | <i>Cantharellus alborufescens</i> | 125 | <i>Lepiota clypeolaria</i> | 206 | <i>Scleroderma verrucosum</i> |
| 45 | <i>Cantharellus amethysteus</i> | 126 | <i>Lepiota cristata</i> | 207 | <i>Suillellus comptus</i> |
| 46 | <i>Cantharellus pallens</i> | 127 | <i>Lepiota erminea</i> | 208 | <i>Suillellus luridus</i> |
| 47 | <i>Cantharellus cinereus</i> | 128 | <i>Lepiota helveola</i> | 209 | <i>Suillellus pulchrotinctus</i> |
| 48 | <i>Craterellus cornucopioides</i> | 129 | <i>Lepiota ignivolvata</i> | 210 | <i>Suillellus queletii</i> |
| 49 | <i>Cantharellus ferruginascens</i> | 130 | <i>Lepiota magnispora</i> | 211 | <i>Suillus bellinii</i> |

| | | | | | |
|----|-------------------------------------|-----|-------------------------------------------|-----|---------------------------------|
| 50 | <i>Cantbarellus ianthinoxanthus</i> | 131 | <i>Lepiota subincarnata</i> | 212 | <i>Suillus bovinus</i> |
| 51 | <i>Chlorophyllum brunneum</i> | 132 | <i>Lepista glaucocana</i> | 213 | <i>Suillus cavipes</i> |
| 52 | <i>Chlorophyllum rbacodes</i> | 133 | <i>Lepista irina</i> | 214 | <i>Suillus collinitus</i> |
| 53 | <i>Clitocybe rivulosa</i> | 134 | <i>Lepista nuda</i> | 215 | <i>Suillus granulatus</i> |
| 54 | <i>Clitocybe candicans</i> | 135 | <i>Lepista panaeolus</i> | 216 | <i>Suillus grevillei</i> |
| 55 | <i>Clitocybe dealbata</i> | 136 | <i>Lepista personata</i> | 217 | <i>Suillus luteus</i> |
| 56 | <i>Clitocybe nebularis</i> | 137 | <i>Lepista sordida</i> | 218 | <i>Suillus mediterraneensis</i> |
| 57 | <i>Singerocybe phaeophthalma</i> | 138 | <i>Leucoagaricus americanus</i> | 219 | <i>Suillus viscidus</i> |
| 58 | <i>Clitocybe phyllophila</i> | 139 | <i>Leucoagaricus leucothites</i> | 220 | <i>Tricholoma equestre</i> |
| 59 | <i>Clitopaxillus alexandri</i> | 140 | <i>Leucocoprinus cepistipes</i> | 221 | <i>Tricholoma gausapatum</i> |
| 60 | <i>Clitopilus cystidiatus</i> | 141 | <i>Leucocoprinus straminellus</i> | 222 | <i>Tricholoma sejunctum</i> |
| 61 | <i>Clitopilus prunulus</i> | 142 | <i>Leucopaxillus gentianeus</i> | 223 | <i>Tricholoma argyraceum</i> |
| 62 | <i>Cortinarius cedretorum</i> | 143 | <i>Leucopaxillus tricolor</i> | 224 | <i>Tricholoma atroscamosum</i> |
| 63 | <i>Cortinarius orellanus</i> | 144 | <i>Lyophyllum decastes</i> | 225 | <i>Tricholoma basirubens</i> |
| 64 | <i>Cortinarius purpurascens</i> | 145 | <i>Macrolepiota procera f. fuliginosa</i> | 226 | <i>Tricholoma bresadolanium</i> |
| 65 | <i>Cortinarius semisanguifluus</i> | 146 | <i>Macrolepiota procera</i> | 227 | <i>Tricholoma bufonium</i> |
| 66 | <i>Craterellus lutescens</i> | 147 | <i>Macrolepiota procera f. permixta</i> | 228 | <i>Tricholoma filamentosum</i> |
| 67 | <i>Craterellus tubaeformis</i> | 148 | <i>Macrolepiota procera</i> | 229 | <i>Tricholoma batschii</i> |
| 68 | <i>Cyclocybe cylindracea</i> | 149 | <i>Chlorophyllum venenatum</i> | 230 | <i>Tricholoma joachimii</i> |
| 69 | <i>Desarmillaria tabescens</i> | 150 | <i>Morchella elata</i> | 231 | <i>Tricholoma quercetorum</i> |
| 70 | <i>Entoloma clypeatum</i> | 151 | <i>Morchella esculenta</i> | 232 | <i>Tricholoma saponaceum</i> |
| 71 | <i>Entoloma lividoalbum</i> | 152 | <i>Morchella semilibera</i> | 233 | <i>Tricholoma scalpturatum</i> |
| 72 | <i>Entoloma rhodopolium</i> | 153 | <i>Neoboletus erythropus</i> | 234 | <i>Tricholoma sciodes</i> |
| 73 | <i>Entoloma sepium</i> | 154 | <i>Neoboletus luridiformis</i> | 235 | <i>Tricholoma sulphureum</i> |
| 74 | <i>Entoloma sinuatum</i> | 155 | <i>Omphalotus olearius</i> | 236 | <i>Tricholoma terreum</i> |
| 75 | <i>Galerina marginata</i> | 156 | <i>Panaeolus papilionaceus</i> | 237 | <i>Tricholoma triste</i> |
| 76 | <i>Galerina uncialis</i> | 157 | <i>Parasola conopilus</i> | 238 | <i>Tricholoma virgatum</i> |
| 77 | <i>Gymnopus aquosus</i> | 158 | <i>Paxillus involutus</i> | 239 | <i>Tylopilus felleus</i> |
| 78 | <i>Gymnopus brassicolens</i> | 159 | <i>Paxillus rubicundulus</i> | 240 | <i>Verpa bobemica</i> |
| 79 | <i>Collybiopsis confluens</i> | 160 | <i>Pholiota mutabilis</i> | 241 | <i>Verpa conica</i> |
| 80 | <i>Gymnopus dryophilus</i> | 161 | <i>Candolleomyces candolleanus</i> | 242 | <i>Verpa digitaliformis</i> |
| 81 | <i>Gymnopus erythropus</i> | 162 | <i>Pseudocraterellus undulatus</i> | | |

livello di genere (*Agaricus* sp. pl., *Amanita* sp. pl., *Clitocybe* sp. pl., *Entoloma* sp. pl., *Inocybe* sp. pl., *Lepiota* sp. pl., *Macrolepiota* sp. pl., *Panaeolus* sp. pl., *Ramaria* sp. pl., *Rhodocollybia* sp. pl., *Russula* sp. pl.), le restanti 68 delle 109 specie implicate nei casi di intossicazione sono state selezionate in quanto appartenenti a tali generi e presenti sul territorio. Tale aspetto evidenzia i limiti dell'identificazione fenotipica nella gestione dei casi clinici; gli esperti micologi chiamati a identificare le specie fungine a seguito di episodi di intossicazione si trovano infatti di fronte a matrici complesse, quali residui di pasto o campioni clinici (vomito e feci di soggetti intossicati), dove le caratteristiche morfologiche necessarie all'identificazione non sono osservabili.

Raccolta delle sequenze ITS dai database e filtraggio sistematico

Sono state inizialmente raccolte 7270 sequenze, di cui 6715 da GenBank e 555 da BOLD. A seguito del filtraggio sistematico sono state mantenute 5977 sequenze, mentre 1293 sequenze (17.8%) sono state scartate perché non conformi ai criteri di inclusione stabiliti. Mediante l'analisi filogenetica con metodo NJ è stato osservato che 205 di queste si posizionavano in cluster diversi da quelli delle sequenze co-specifiche o co-generiche con valori di bootstrap $\geq 70\%$. Risultati sovrapponibili sono stati osservati anche dall'analisi filogenetica con metodo Maximum Likelihood. È stato pertanto ipotizzato che tali sequenze provenissero da

esemplari erroneamente identificati. Date le dimensioni dell'albero filogenetico dovute all'elevato numero di sequenze, sono stati riportati solo alcuni (Fig. 1). La presenza di dati errati sui database ufficiali contribuisce a rendere più difficoltosa l'analisi e compromette inevitabilmente l'attendibilità dei risultati. La scarsa accuratezza dei database ufficiali era già stata evidenziata in studi precedenti: Nilsson *et al.* (2006) osservarono che circa il 20% delle sequenze depositate su GenBank erano non correttamente identificate a livello di specie, mentre Schoch *et al.* (2012) constatarono che almeno la metà delle sequenze ITS depositate sui database ufficiali non venivano annotate a livello di specie. Nonostante siano passati diversi anni, queste criticità persistono, e la percentuale di sequenze scartate in questo studio (17.8%) è pressoché sovrapponibile a quanto riportato in passato (Nilsson *et al.*, 2006). Per tale motivo, la costruzione di un dataset genetico quanto più robusto possibile risulta fondamentale per l'identificazione molecolare di specie. Al termine del filtraggio sistematico, il dataset genetico presentava una copertura tassonomica (numero di specie target

per cui erano disponibili sequenze ITS / numero di specie target) del 92.6%, con 224 su 242 specie target. Tra queste, 87 (38.8%) erano commestibili, 72 (32.1%) tossiche, 32 (14.3%) non commestibili, 21 (9.4%) sospette non commestibili e 12 (5.4%) mortali. La variabilità intra-specifica è stata calcolata su 5962 sequenze appartenenti a 209 delle 224 specie target del dataset, in quanto per le restanti 15 specie era presente solo una sequenza e pertanto non è stato possibile un confronto intra-specie. Questa è risultata essere 3.46% (± 6.31), in linea con quanto riportato in altri studi (Amend *et al.*, 2010; Hughes *et al.*, 2009; Nilsson *et al.*, 2008).

Produzione di sequenze ITS di riferimento da esemplari identificati

Sono stati raccolti 97 esemplari appartenenti a 76 specie target incluse nel Phylum *Basidiomycota*. Applicando i protocolli di estrazione del DNA totale all'amplificazione e sequenziamento della regione ITS descritti nei Materiali e Metodi, è stata ottenuta una sequenza di buona qualità da ciascun esemplare raccolto (97 se-

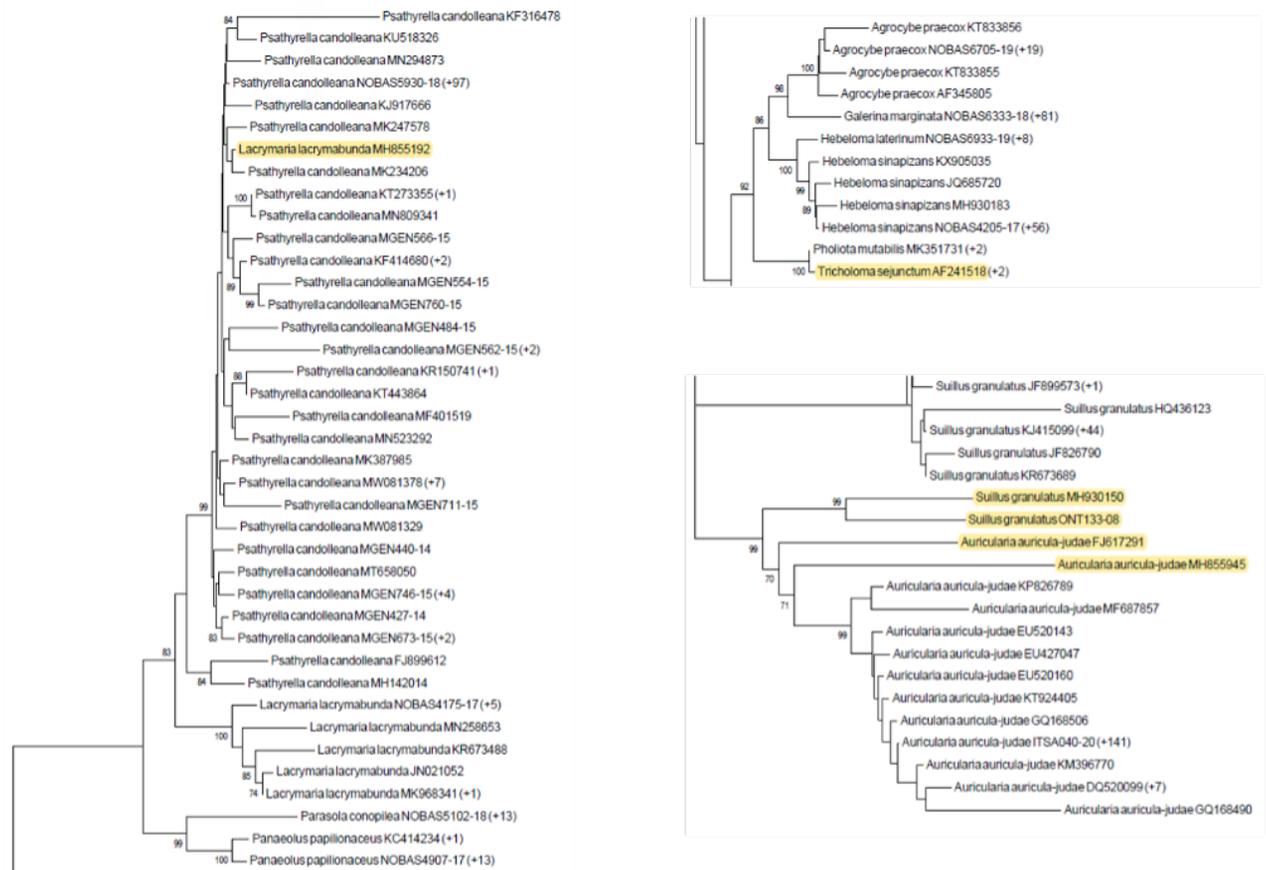


Figura 1. Immagine di tre sezioni dell'albero filogenetico ottenuto con metodo NJ modello Kimura 2 parametri. Le sequenze posizionate al di fuori dei rispettivi cluster specie o genere specifici con valori di bootstrap $\geq 70\%$, che sono quindi state scartate, sono evidenziate. Fonte: Giusti *et al.* (2021b).

quenze appartenenti a 76 specie). La lunghezza delle sequenze ottenute dagli esemplari di riferimento variava tra 591 a 772 pb, in linea con quanto riportato da Gardes & Bruns (1993). Tra queste, 31 (40.8%) corrispondevano a specie tossiche, 25 (32.9%) a specie commestibili, 11 (14.5%) a specie non commestibili, 5 (6.6%) a specie sospette tossiche e 4 (5.3%) a specie mortali. 15 dei 97 esemplari raccolti appartenevano a 10 specie target (*Amanita caesarea* (Scop.) Pers., *Cantharellus ferruginascens* P.D. Orton, *Cortinarius semisanguineus* (Fr.) Gillet, *Desarmillaria tabescens* (Scop.) R.A. Koch & Aime, *Chlorophyllum venenatum* (Bon) Lange & Vellinga, *Russula vinosobrunnea* (Bres.) Romagn., *Tricholoma basirubens* (Bon) A. Riva & Bon, *T. bresadolatum* Cléménçon, *T. gausapatum* (Fr.) Quéf., *T. zangii* Z.M. Cao, Y.J. Yao & Pegler) per le quali non erano disponibili sequenze in seguito alla fase di filtraggio sistematico. Inoltre, 29 delle 76 specie raccolte (38.2%) erano tra quelle implicate nei casi di intossicazione riportati in Toscana nel decennio in esame: *Entoloma sinuatum* (Bull.) P. Kumm., *Omphalotus olearius* (DC.) Singer, *Russula* sp. pl. (sono stati raccolti esemplari di *R. caerulea* Fr., *R. heterophylla* (Fr.) Fr., *R. nobilis* Velen., *R. persicina* Krombh., *R. queletii* Fr., *R. torulosa* Bres. e *R. vinosobrunnea* (Bres.) Romagn.), *Rubroboletus satanas* (Lenz) Kuan Zhao & Zhu L. Yang, *Agaricus xanthodermus* Genev., *Macrolepiota venenata* Bon, *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Link, *A. muscaria* (L.) Lam., *Inocybe* sp. pl. (sono stati raccolti esemplari di *I. geophylla* P. Kumm.), e *Lepiota* sp. pl. (sono stati raccolti esemplari di *L. brunneoincarnata* Chodat & C. Martín, *L. chypeolaria* (Bull.) P. Kumm. e *L. ignivolvata* Bousset & Joss. ex Joss.).

Costruzione e validazione del dataset genetico

Grazie all'aggiunta di 15 sequenze appartenenti a 10 specie per le quali non erano disponibili sequenze, è stata ottenuta una copertura tassonomica del dataset genetico di 96.7% (234 specie su 242). Questo contiene 93 (39.7%) specie commestibili, 74 (31.6%) tossiche, 32 (13.7%) non commestibili, 22 (9.4%) sospette tossiche e 13 (5.6%) mortali. Secondo i risultati dello studio di Badotti *et al.* (2017), la regione ITS è considerata un buon marker nell'identificazione di specie in 19 generi su 56 (32.7%) tra quelli inclusi nel Phylum *Basidiomycota* e target del nostro studio, mentre per 10 generi (17.8%) è stata valutata mediamente performante, infine per 2 generi (3.6%) ha dato scarsi risultati. I rimanenti 56 generi non sono invece stati valutati nello studio di Badotti *et al.* (2017). Da notare tuttavia che nei 19 generi in cui la regione ITS viene considerata come performante è inclusa gran parte delle specie target del dataset (n = 110; 47.2%). Inoltre, rientrano in questa categoria 75 delle 109 specie (68.8%) selezionate come target attraverso la valutazione dei casi di intossicazione regionale. Pertanto, nonostante alcu-

ni limiti, la regione ITS si è mostrata particolarmente adatta nell'identificazione di specie fungine finalizzata alla gestione delle intossicazioni a livello regionale. Tale osservazione è stata confermata nella fase di validazione del dataset mediante analisi BLAST, effettuata con le restanti 82 sequenze (97 sequenze totali - 15 utilizzate per la costruzione del dataset) ottenute da esemplari di riferimento appartenenti a 66 specie target. Nella maggior parte dei casi (n = 71; 86.6%) le sequenze di riferimento sono state correttamente identificate con valori di identità di 97-100%. In particolare, 55 delle 66 specie considerate (83.3%) sono state correttamente identificate, comprese tutte le specie mortali e quelle non edibili, quasi tutte le specie tossiche (28 su 29) e quelle sospette tossiche (3 su 4). Il dataset si è dimostrato particolarmente promettente nell'identificare le specie maggiormente implicate nei casi di intossicazione a livello regionale, quali le specie tossiche *Entoloma sinuatum* (Bull.) P. Kumm., *Omphalotus olearius* (DC.) Singer e *Clitocybe nebularis* (Batsch) P. Kumm., che da sole ricoprono oltre l'80% della casistica, e la specie commestibile *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm., anch'essa implicata in casi di intossicazione. Sebbene un'analisi dei dati provenienti dai rapporti di indagine micologica, effettuati da 13 Ispettorati Micologici ASL e dal Centro Micologico ARPAE Bologna, relativi alle specie fungine che sono causa di intossicazioni in Italia su periodi superiori a 10 anni, evidenzino alcune differenze per quanto riguarda le specie coinvolte in aree territoriali diverse, le intossicazioni da specie tossiche quali *Entoloma sinuatum* (Bull.) P. Kumm. e *Omphalotus olearius* (DC.) Singer sono praticamente riportate su tutto il territorio nazionale, mentre *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. è "in testa alla classifica" delle specie commestibili che causano intossicazioni (Sitta *et al.*, 2018).

Alla fine del processo di validazione, 95 sequenze prodotte in questo studio e appartenenti a 75 specie sono state depositate in GenBank (codici MZ005473-MZ005566).

CONCLUSIONI

Le intossicazioni da consumo di funghi in Italia, peraltro sottostimate riguardo al numero di casi, rappresentano di fatto un costo per la Sanità Pubblica. Vengono gestite attraverso la formazione ed il supporto dei cittadini nell'identificazione morfologica delle specie commestibili, compito svolto dagli Ispettorati micologici, i quali si occupano anche del riconoscimento delle specie ingerite in casi di intossicazione, condotta su residui di pasto o su campioni clinici. Nei casi in cui l'identificazione di specie su base morfologica sia ostacolata dalla mancanza di caratteristiche fenotipiche distintive nella matrice in esame,

i laboratori ufficiali possono contribuire attraverso l'utilizzo di metodiche molecolari basate sull'analisi del DNA. Il dataset genetico costruito e validato in questo studio rappresenta il primo step, essenziale, per lo sviluppo di una metodica molecolare efficace per l'identificazione di specie di funghi in diverse matrici. Dalla comparazione dei casi di intossicazione a livello regionale e nazionale (Assisi *et al.*, 2019; Sitta *et al.*, 2018) risulta un'analogia per quanto riguarda le specie responsabili di fenomeni avversi nell'uomo. Pertanto, il dataset sviluppato in questo studio sulla base della specie implicate in casi di intossicazione nella regione Toscana, opportunamente integrato con sequenze ottenute da specie consumate in altre regioni, rappresenterà un pool di dati attendibili cui attingere nelle analisi molecolari effettuate anche da altri laboratori ufficiali nazionali, fornendo quindi un valido strumento di supporto per i controlli su tutto il territorio nazionale. Allo stesso modo, il dataset potrà essere utilizzato per verificare l'identità di specie in prodotti commerciali a base di funghi venduti sul territorio, al fine di garantire la tracciabilità e tutelare i consumatori da eventuali frodi di settore.

BIBLIOGRAFIA

- AMEND A.S., SEIFERT K.A., SAMSON R., BRUNS T.D., 2010. *Indoor fungal composition is geographically patterned and more diverse in temperate zones than in the tropics*. Proceedings of the National Academy of Science 107: 13748-13753. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000454107>
- ARMANI A., CASTIGLIEGO L., TINACCI L., GANDINI G., GIANFALDONI D., GUIDI A.A., 2012. *Rapid PCR-RFLP method for the identification of Lophius species*. European Food Research and Technology 235: 253-263. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1754-3>
- ASSISI F., DAVANZO F., BISSOLI M., DIMASI V., FERRUZZI M., GEORGATOS J., REBUTTI I., TRAVAGLIA A., SEVERGNINI P., MILANESI G., MORO P.A., 2019. *Epidemiologia e clinica delle intossicazioni da funghi in Italia: valutazione retrospettiva di 20 anni (1998-2017) del Centro Antiveleeni di Milano*. Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità 2019 32 (4) Inserto BEN: 5-9.
- BADOTTI F., DE OLIVEIRA F.S., GARCIA C.F., VAZ A.B.M., FONSECA P.L.C., NAHUM L.A., OLIVEIRA G., GÓES-NETO A., 2017. Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). BMC Microbiology 17: 42. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0958-x>
- BARTLETT S.E., DAVIDSON W.S., 1992. *FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens*. Biotechniques 12 (3): 408-411.
- BEGEROW D., NILSSON H., UNTERSEHER M., MAIER W., 2010. *Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures*. Applied Microbiology and Biotechnology 87 (1): 99-108. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2585-4>
- DELLA MAGGIORA M., 2007. *Gli avvelenamenti da funghi*. Mico-Ponte 1: 24-40.
- GARDES M., BRUNS T.D., 1993. *ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts*. Molecular Ecology 2 (2): 113-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- GAWLIKOWSKI T., ROMEK M., SATORA L., 2015. *Edible mushroom-related poisoning: A study on circumstances of mushroom collection, transport, and storage*. Human & Experimental Toxicology, 34 (7): 718-724. <https://doi.org/10.1177/0960327114557901>
- GIUSTI A., RICCI E., GASPERETTI L., GALGANI M., POLIDORI L., VERDIGI F., NARDUCCI R., ARMANI A., 2021a. *Molecular identification of mushroom species in Italy: an ongoing project aimed at reinforcing the control measures of an increasingly appreciated sustainable food*. Sustainability 13 (1): 238. <https://doi.org/10.3390/su13010238>
- GIUSTI A., RICCI E., GASPERETTI L., GALGANI M., POLIDORI L., VERDIGI F., NARDUCCI R., ARMANI A., 2021b. *Building of an Internal Transcribed Spacer (ITS) Gene Dataset to support the Italian Health Service in mushroom identification*. Foods 10 (6): 1193. <https://doi.org/10.3390/foods10061193>
- GOLZIO F., BALMA M., DONINI M., SITTA N., 2007. *L'intervento del micologo nei casi di presunta intossicazione da funghi*. In: AA.VV. (II ediz.): *Parliamo di funghi II - Manuale per i corsi di formazione per il rilascio dell'attestato di Micologo*: 79-157. Giunta della Provincia Autonoma di Trento, Trento.
- GULINO M., BALMA M., MAGGI C., STECICH E., PRUNEDDU B., CIPRIOTTI R., MORABITO D., MESSORIOLI G., PANARISI P., BORSOTTI M., GRIGLIO B., BORGIA B., TANTI U., ALDRIGHETTI A., 2009. *I costi sanitari degli interventi di prevenzione dell'Ispettorato Micologico rispetto ai costi dei ricoveri per intossicazione da funghi*. Pagine di Micologia 32: 175-186.
- HEBERT P.D., CYWINSKA A., BALL S.L., DEWAARD J.R., 2003. *Biological identifications through DNA barcodes*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 270 (1512): 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- HELLBERG R.S.R., MORRISSEY M.T., 2011. *Advances in DNA-based techniques for the detection of seafood species substitution on the commercial market*. Journal of the Association for Laboratory Automation 16 (4): 308-321. <https://doi.org/10.1016%2Fj.jala.2010.07.004>
- HILLIS D.M., BULL J.J., 1993. *An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis*. Systematic biology 42 (2): 182-192. <https://doi.org/10.1093/sysbio/42.2.182>
- HUGHES K.W., PETERSEN R.H., LICKEY E.B., 2009. *Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species delimitation across basidiomycete fungi*. New Phytologist 182: 795-798. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02802.x>
- JO W.S., HOSSAIN M.A., PARK S.C., 2014. *Toxicological profiles of poisonous, edible, and medicinal mushrooms*. Mycobiology 42 (3): 215-222. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.3.215>
- KEARSE M., MOIR R., WILSON A., STONES-HAVAS S., CHEUNG M., STURROCK S., BUXTON S., COOPER A., MARKOWITZ S., DURAN C., 2012. *Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data*. Bioinformatics 28: 1647-1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- KIMURA M., 1980. *A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. Journal of molecular evolution 16 (2): 111-120.

- KUMAR S., STECHER G., TAMURA K., 2016. MEGA7: *Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets*. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- LIMA A.D., COSTA FORTES R., GARBI NOVAES M.R.C., PERCÁRIO S., 2012. *Poisonous mushrooms; a review of the most common intoxications*. *Nutricion Hospitalaria* 27 (2): 402-408
- NILSSON R.H., RYBERG M., KRISTIANSSON E., ABARENKOV K., LARSSON K.H., KÖLJALG U., 2006. *Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: A fungal perspective*. *PLoS one* 1 (1): e59. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000059>
- NILSSON R.H., KRISTIANSSON E., RYBERG M., HALLENBERG N., LARSSON K.H., 2008. *Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification*. *Evolutionary Bioinformatics* 4: S653. <https://doi.org/10.4137%2FEBO.S653>
- PANDEY V.V., KUMARI A., KUMAR M., SAXENA J., KAINTHOLA C., PANDEY A., 2018. *Mushroom cultivation: Substantial key to food security*. *Journal of Applied and Natural Science* 10 (4): 1325-1331. <https://doi.org/10.31018/jans.v10i4.1941>
- PANJIKKARAN S.T., MATHEW D., 2013. *An environmentally friendly and cost-effective technique for the commercial cultivation of oyster mushroom (Pleurotus florida (Mont.) Singer)*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93 (4): 973-976. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5827>
- PEINTNER U., SCHWARZ S., MEŠIĆ A., MOREAU P.A., MORENO G., SAVIUC P., 2013. *Mycophilic or mycophobic? Legislation and guidelines on wild mushroom commerce reveal different consumption behaviour in European countries*. *PLoS one* 8 (5): e63926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063926>
- RAJA H.A., MILLER A.N., PEARCE C.J., OBERLIES N.H., 2017a. *Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community*. *Journal of Natural Products* 80 (3): 756-770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- RAJA H.A., BAKER T.R., LITTLE J.G., OBERLIES N.H., 2017b. *DNA barcoding for identification of consumer-relevant mushrooms: A partial solution for product certification?* *Food Chemistry* 214: 383-392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.052>
- SAYERS E.W., CAVANAUGH M., CLARK K., OSTELL J., PRUITT K.D., KARSCH-MIZRACHI I., 2018. *GenBank*. *Nucleic acids research* 47: D94-D99. <https://doi.org/10.1093/nar/gky989>
- SCHENK-JAEGER K.M., RAUBER-LÜTHY C., BODMER M., KUPFER-SCHMIDT H., KULLAK-ÜBLICK G.A., CESCHI A., 2012. *Mushroom poisoning: A study on circumstances of exposure and patterns of toxicity*. *European Journal of Internal Medicine* 23: e85-e91. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2012.03.014>
- SCHOCH C.L., SEIFERT K.A., HUHNDORF S., ROBERT V., SPOUGE J.L., LEVESQUE C.A., CHEN W., MILLER A.N., 2012. *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (16): 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- SITTA N., ANGELINI C., BALMA M., BERMA C., BERTOCCHI C., SURIANO E., 2018. *I funghi che causano intossicazioni in Italia*. Atti VI convegno Micotossicologia, Perugia, 23-24 novembre 2018, pp. 23-80.
- TANI O., GOLZIO F., VERZOLLA M., CIPOLLONE R., DI PIAZZA P., INZANI D., FALASCONI M., GINANNESCHI L., VERDIGI F., AR-CANGELI A., IORI A., MALVA S., FERRARA V., MARRA E., MONACO G., MURGIA P., 2020. *Accreditamento degli Ispettorati Micologici: possibile miglioramento dei servizi*. Atti VI convegno di Micotossicologia, Perugia. *Pagine di Micologia* 42, 2020.
- WHITE T.J., BRUNS T., LEE S.J.W.T., TAYLOR J., 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. *PCR Protocol Guide Methods Application* 18: 315-322.
- WHITE J., WEINSTEIN S.A., DE HARO L., BÉDRY R., SCHAPER A., RUMACK B.H., ZILKER T., 2019. *Mushroom poisoning: A proposed new clinical classification*. *Toxicon* 157: 53-65. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.007>
- ZHANG Y., MO M., YANG L., MI F., CAO Y., LIU C., TANG X., WANG P., XU J., 2021. *Exploring the species diversity of edible mushrooms in Yunnan, Southwestern China, by DNA barcoding*. *Journal of Fungi* 7 (4): 310. <https://doi.org/10.3390/jof7040310>

SITOGRAFIA

- BOLD, 2020. *Barcode of Life Data System*. <https://www.boldsystems.org/>.
- DHAR B.L., SHRIVASTAVA N., 2012. *Mushrooms and Environmental Sustainability*. <https://www.researchgate.net/publication/325120361> [consultato il 26 ottobre 2021].
- FAOStat, 2015. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> [consultato il 26 ottobre 2021].
- GB, 2020. *GenBank database*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
- IF, 2020. *Index Fungorum database*. <http://www.indexfungorum.org/>.
- MARKET RESEARCH REPORT, 2020. *Mushroom Cultivation Market by Type (Button mushroom, Oyster mushroom, Shiitake mushroom, other types), By Phase, By Region (North America, Europe, Asia Pacific, South America, Rest of the World) - Global Forecast to 2025*. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/mushroom-cultivation-market-69443268.html> [consultato il 26 ottobre 2021].
- MISACHI J., 2017. *The World's Top Producers of Mushroom and Truffle*. <https://www.worldatlas.com/articles/the-world-s-top-producers-of-mushroom-and-truffle.html> [consultato il 26 ottobre 2021].

(ms. pres. 26 gennaio 2022; ult. bozze 15 dicembre 2024)

