

M. BALLERO (*), A. ARIU (*), F. SPONGA (**), M. LODDO (*), M.C. LOI (*)

LA COMPONENTE ENDOFITICA ISOLATA DA SPECIE VEGETALI AUTOCTONE DELLA SARDEGNA

Riassunto - In questo lavoro gli Autori riportano i risultati scaturiti da una indagine sulla diversità e frequenza di colonizzazione di funghi endofiti in alcune piante autoctone della Sardegna (*Euphorbia dendroides*, *Euphorbia spinosa*, *Pistacia terebinthus*, *Rhamnus alaternus*, *Salix arrigonii*). Sono stati raccolti 1.350 campioni da cui è stato possibile isolare 238 colonie fungine di endofiti appartenenti a colonie fungine quali: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Coelomyces* ed un rilevante numero di *Mycelia sterilia*.

Parole chiave - Endofiti, Sardegna.

Abstract - *The endophytic fungi isolated in autochthonous plants of Sardinia.* In this work the Authors report the results of a study on the diversity and colonisation frequency of endophytic fungi in a few autochthonous plants of Sardinia (*Euphorbia dendroides*, *Euphorbia spinosa*, *Pistacia terebinthus*, *Rhamnus alaternus*, *Salix arrigonii*). Out of 1350 collected samples, 238 fungus colonies of endophytes, mainly: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Coelomyces* and a significant number of *Mycelia sterilia* were isolated.

Key word - Endophytic fungi, Sardinia.

INTRODUZIONE

Lo studio degli endofiti che colonizzano gli organi aerei di piante sane ha suscitato in questi ultimi anni notevole interesse. In tal senso sono state condotte varie ricerche nel tentativo di chiarire il ruolo ecologico, fisiologico e la funzione di questa particolare categoria di funghi nei tessuti vegetali (Petrini, 1991).

È oramai acquisito che esiste una spiccata specificità nel rapporto pianta ospite- fungo correlata ad un effetto limitante imputabile alle sostanze fenoliche e terpeniche presenti nei tessuti vegetali (Loi *et al.*, 2000).

Per individuare la diversità e la frequenza di colonizzazione di funghi endofiti in diverse piante autoctone della Sardegna si è intrapreso da alcuni anni un protocollo di ricerca tra il Dipartimento di Scienze Botaniche di Cagliari e la Biosearch Italia (Ballero *et al.*, 1999; Loi *et al.*, l.c.).

In questo contributo sono state prese in considerazione cinque specie autoctone: *Euphorbia dendroides* L. (*Euphorbiaceae*), *Euphorbia spinosa* L. (*Euphorbiaceae*), *Pistacia terebinthus* L. (*Anacardiaceae*), *Rhamnus alaternus* L. (*Rhamnaceae*), *Salix arrigonii* Brullo (*Salicaceae*) con l'intento di individuare la componente endofitica presente nelle loro diverse parti aeree.

MATERIALI E METODI

I campioni sono stati raccolti all'interno del Giardino Botanico «Linasia», ubicato nei pressi della città di Iglesias (Sardegna sud-occidentale) in località Case Marganai, a 700 m s.l.m. La vegetazione del sito rientra nell'orizzonte mesofilo della macchia a *Quercus ilex* proposto da Arrigoni (1968). La macchia è tuttora conservata in uno stato più che soddisfacente grazie alle opere di tutela e ripristino che da anni l'Azienda Foreste Demaniali della R.A.S. attua nel rispetto delle originali formazioni.

Il materiale è stato prelevato nell'arco di un anno sempre dalla stessa pianta, in maniera che tutti gli stadi vegetativi fossero rappresentati. Le foglie, i giovani rametti ed il ritidoma sono stati prelevati a diverse altezze dal suolo da individui che non mostravano sintomi di malattia.

I campioni sono stati sterilizzati con bagno in ipoclorito di sodio al 5%, per cinque minuti, seguito da un lavaggio in acqua distillata per dieci minuti ed uno successivo con alcool etilico al 70% per cinque minuti.

Dalle foglie, dopo aver eliminato la parte apicale e il picciolo, sono stati prelevati frammenti di 1 cm x 1 cm nella parte centrale del lembo in corrispondenza della nervatura principale e lungo i margini; dai rametti, privati della corteccia, sono stati preparati piccoli cilindretti di circa 0,5 cm di diametro e di 0,8 cm di lunghezza; per il ritidoma si è provveduto all'eliminazione degli strati più esterni di sughero nei quali erano presenti epifiti (licheni). Il materiale così preparato è stato trasferito in capsule Petri, sul terreno agarizzato.

Abbiamo utilizzato tre tipi di terreno: MEA (estratto di malto, peptone, glucosio ed agar), MA (estratto di malto ed agar) e TS (bactosoyton, glucosio, acetato di sodio, benzoato di sodio ed agar) a ciascuno dei quali abbiamo aggiunto 200 mg/l di cloramfenicolo dopo il passaggio in autoclave.

Le capsule sono state poste a temperatura costante di 24°C e controllate giornalmente per due-quattro settimane. Parte delle colonie fungine sviluppate è stata trasferita in tubi di coltura contenenti 1 ml di nutrient-glicerolo (estratto di carne, peptone e glicerolo) e quindi conservate ad una temperatura di -20°C pronte per la loro determinazione.

Per l'inquadramento tassonomico abbiamo impiegato terreni specifici capaci di indurre sporificazione nelle colture rimaste sterili (potato-dextrose, cornmeal) così

(*) Dipartimento di Scienze Botaniche dell'Università di Cagliari, viale S. Ignazio 13, I 09123 Cagliari.

(**) Biosearch Italia, via R. Lepetit 34, I 21040 Gerenzano (Va).

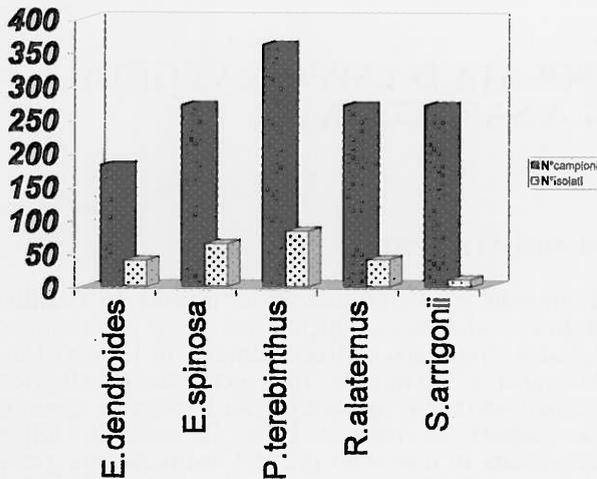


Fig. 1 - Numero di campioni e numero di isolati nelle rispettive piante

da permettere la loro determinazione allo stereomicroscopio.

Non abbiamo potuto assegnare alle rispettive categorie tassonomiche gli isolati sterili; alcuni di questi sono stati raggruppati in base a similitudini nell'aspetto culturale per presenza di pigmenti e di essudati. Nel complesso sono stati indicati nel corso del lavoro come *Mycelia sterilia*, assumendo che rappresentino specie tassonomicamente diverse. Le caratteristiche culturali sono state determinate secondo il metodo di Domsch *et al.* (1980). I funghi isolati sono stati determinati, quando possibile, fino al livello di genere e/o di specie adottando la nomenclatura proposta da Ainsworth *et al.* (1973).

RISULTATI

I campionamenti hanno permesso di raccogliere 1.350 campioni tra foglie, giovani rametti e ritidoma da cui sono state isolate 238 colonie di endofiti, che corrispondono ad una resa (rapporto fra isolati e campioni) del 17,6% valore inferiore a quanto riscontrato in analoghi lavori precedenti (Ballero *et al.* l.c.; Loi *et al.*, l.c.).

Nella Figura 1, dove sono rappresentati il numero dei campioni e il numero degli isolati nelle rispettive piante, notiamo che *Euphorbia spinosa* ha manifestato la resa superiore (23,7%), seguita da *Pistacia terebinthus* (23,1%) e da *Euphorbia dendroides* (21,6%). Valori inferiori sono stati riscontrati in *Rhamnus alaternus* (15,2%) e *Salix arrigonii* (4,1%). Appare significativo quest'ultimo valore spiegabile con l'alto contenuto di glicosidi fenolici presenti nei suoi tessuti (Evans, 1989).

Nella Tabella 1 sono stati riuniti i taxa fungini isolati dalle singole piante. Si può notare che da *Euphorbia dendroides* sono state isolate cinque colonie: *Alternaria zinniae* Ellis, *Alternaria tenuissima* (Kunze ex Pers.) Wiltshire, *Cladosporium aecidiicola* Thum., *Coelomycetes* 1 e due *Mycelia sterilia*. In *Euphorbia spinosa* sono stati isolati soltanto *Alternaria zinniae* Ellis e tre colonie sterili.

Il maggior numero di generi isolati in *Euphorbia dendroides* rispetto ad *Euphorbia spinosa*, può essere giustificato con la diversa ecologia delle due specie. La prima vegeta infatti in ambienti caldo-umidi a differenza della seconda che è esclusiva di ambienti freddi del sistema orofilo mediterraneo.

Pistacia terebinthus ospita dieci colonie: *Alternaria zinniae* Ellis, *Alternaria tenuissima* (Kunze ex Pers.) Wiltshire, *Verticillium cinerescens* Wollenw., un asco-

Tab. 1 - Elenco dei taxa fungini isolati nelle singole piante.

| Endofiti | Piante | | | | |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|------------------------|
| | <i>Euphorbia dendroides</i> | <i>Euphorbia spinosa</i> | <i>Pistacia terebinthus</i> | <i>Rhamnus alaternus</i> | <i>Salix arrigonii</i> |
| <i>Alternaria zinniae</i> | Presente | Presente | Presente | | |
| <i>Alternaria tenuissima</i> | Presente | | Presente | Presente | |
| <i>Aureobasidium sp.</i> | | | | | Presente |
| <i>Ascomycetes bitunicato</i> | | | Presente | | |
| <i>Cladosporium aecidiicola</i> | Presente | | | | |
| <i>Cladosporium cladosporoides</i> | | | | Presente | Presente |
| <i>Coelomycetes 1</i> | Presente | | | Presente | |
| <i>Coelomycetes 2</i> | | | | Presente | |
| <i>Coelomycetes 3</i> | | | | Presente | |
| <i>Coelomycetes 4</i> | | | | Presente | |
| <i>Gliomastix murorum</i> | | | | | Presente |
| <i>Guignardia sp.</i> | | | | Presente | |
| <i>Phoma anethi</i> | | | | Presente | |
| <i>Phomopsis sp.</i> | | | | Presente | |
| <i>Sterile 1</i> | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente |
| <i>Sterile 2</i> | Presente | Presente | Presente | Presente | Presente |
| <i>Sterile 3</i> | | Presente | Presente | Presente | |
| <i>Sterile 4</i> | | | Presente | | |
| <i>Sterile 5</i> | | | Presente | | |
| <i>Verticillium cinerescens</i> | | | Presente | | |
| <i>Blastomycetes (yeast-like)</i> | | | Presente | | |

Isolati

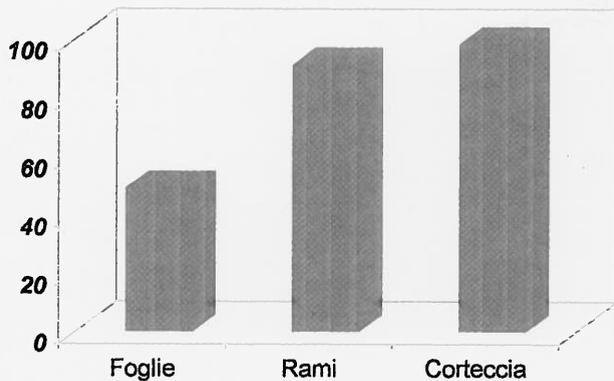


Fig. 2 - Distribuzione complessiva delle colonie endofitiche nelle parti anatomiche delle piante.

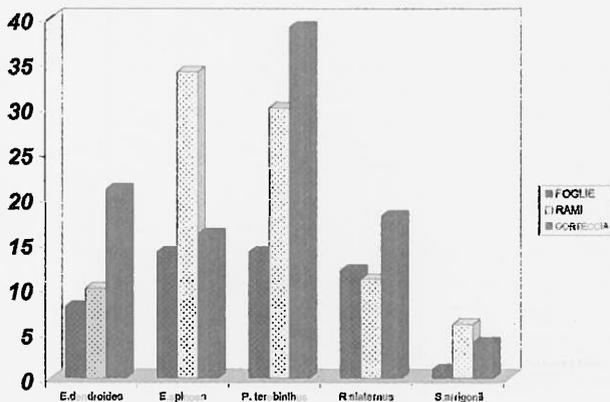


Fig. 3 - Distribuzione delle colonie nelle parti anatomiche delle singole piante

micete bitunicato, un blastomicete (*yeast-like*) e diversi *Mycelia sterilia*. Il maggior numero di colonie è stato isolato in *Rhamnus alaternus* (12): *Alternaria tenuissima* (Kunze ex Pers.) Wiltshire, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries, *Phomopsis*, *Phoma anethi* (Pers. ex Fr.) Sacc., *Guignardia*, *Coelomycetes* 1, 2, 3, 4 e tre colonie di *Mycelia sterilia*.

Salix arrigonii ospita cinque colonie: *Aureobasidium* sp., *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries, *Gliomastix murorum* (Corda) Hughes e due colonie di *Mycelia sterilia* ritrovate esclusivamente nel ritidoma. Dal lato sistematico si segnalano in particolare alcuni ritrovamenti originali come quello di *Alternaria zinniae* in *Euphorbia dendroides*, *Euphorbia spinosa* e *Pistacia terebinthus*, specie vegetali appartenenti a famiglie diverse dalle *Asteraceae* che secondo Ellis (1971, 1976) erano le uniche ad ospitare questa specie, per altro in territori assai dissimili dalla Sardegna.

Cladosporium aecidiicola viceversa conferma la sua

preferenza per le *Euphorbiaceae* mentre *Phoma anethi* viene indicato da Ellis (l.c.) come ospite delle *Umbelliferae* e, anch'esso, segnalato finora per località abbastanza eterogenee. *Verticillium cinerescens* [= *Phialophora cinerescens* (Wollenw.) Beyma] era stato finora indicato come parassita di specie vegetali erbacee, mentre da noi è stato ritrovato su *Pistacia terebinthus* col ruolo di endofita.

Il ritrovamento di *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium aecidiicola* ed *Alternaria tenuissima* conferma la loro ampia valenza ecologica ed estesa distribuzione corologica, sebbene non fossero sino ad ora stati segnalati il primo su *Rhamnus alaternus* e *Salix arrigonii*, il secondo su *Euphorbia dendroides*, il terzo su *Euphorbia dendroides*, *Pistacia terebinthus* e *Rhamnus alaternus*.

Non possiamo proporre ulteriori osservazioni di carattere sistematico riferibili ai generi vista la loro ampia possibilità di ritrovamenti su piante ospiti diverse.

Dall'analisi della Figura 2, che rappresenta la distribuzione complessiva delle colonie endofitiche nelle parti anatomiche delle piante, si constata una distribuzione preferenziale per il ritidoma e i giovani rami nei quali abbiamo isolato, rispettivamente, 98 e 91 colonie; le foglie per contro hanno manifestato il più basso numero di isolamenti, soltanto 49.

Nella Figura 3 è illustrata la distribuzione delle colonie nelle parti anatomiche delle singole piante. In *Pistacia terebinthus* sono state isolate 39 colonie nel ritidoma, 30 nei rami e solo 14 nelle foglie; in *Euphorbia dendroides* si riscontrano 21 colonie nel ritidoma, 10 colonie nei rami e 8 nelle foglie; in *Rhamnus alaternus* si registrano 18 colonie nel ritidoma, 11 nei rami e 12 nelle foglie.

Sia in *Euphorbia spinosa* che in *Salix arrigonii* si constata una netta preferenza per i rami, rispettivamente con 34 e 6 colonie, rispetto alle 16 e alle 4 colonie del ritidoma e alle 14 colonie e all'unica colonia isolata dalle foglie.

BIBLIOGRAFIA

- AINSWORTH G.C., SPARROW F.K., SUSSMAN A.S., 1973. The fungi. An Advanced Treatise, Academic, New York, Vol. 4 and 5.
- ARRIGONI P.V., 1968. Fitoclimatologia della Sardegna. Webbia, 23: 1-100.
- BALLERO M., SPONGA F., ARIU A., LODDO M., 1999. Distribuzione ed aspetti ecologici di funghi endofiti presenti in specie sclerofilliche mediterranee. Mic. Ital. XXXVIII (3): 5-11.
- DOMSCH K. H. GAMES T., ANDERSON T., 1980. Compendion of soil fungi. Academic Press, Vol. 1.
- ELLIS M.B., 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- ELLIS M.B., 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- EVANS C.W., 1989. Pharmacognosy: 386. Baillière Tindall, London.
- LOI C.M., BALLERO M., LODDO M., SPONGA F., ARIU A., 2000. Variazioni della presenza endofitica in specie vegetali della Sardegna. Mic. Ital., XXXIX (3) 15-20.
- PETRINI O., 1991. Fungal endofytes of tree leaves. In J.H. ANDREW & HIRANO S.S. ed. 1991. Mycrobial Ecology of Leaves ED: 179-197, Springer - Verlag, New York.

