

## Segnalazione per il territorio italiano di *Leucoagaricus rhodelephantinus*

(English version on page 15)

Vincenzo Migliozi<sup>1\*</sup>, Arianna Martolini<sup>2</sup>, Giuseppe Donato<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Viale G. Marconi 196, I- 00146 Roma - email vincenzomigliozi@alice.it

<sup>2</sup>Via Torres 21, I-57023 Cecina (LI) - email ari\_mar@hotmail.it

<sup>3</sup>Via Nomentana 861 R, I-00137 Roma – email gdonato01@libero.it

\*Corresponding author: vincenzomigliozi@alice.it

### Parole chiave:

*Agaricomycetidae*, *Lepiotaceae*  
*Leucoagaricus*, *L. rhodelephantinus*  
ITS sequences, Taxonomy, Italia

**Riassunto:** Gli autori, basandosi su due raccolte realizzate sul territorio nazionale in due distinte località, descrivono *Leucoagaricus rhodelephantinus* segnalando tale entità per la prima volta nel territorio italiano. Vengono altresì discussi i rapporti con altre specie della sezione *Leucoagaricus*. L'analisi filogenetica basata sul marcatore ITS mostra l'assoluta sovrapposibilità con il *typus* rinvenuto in Francia.

### INTRODUZIONE

Lo spunto per un approfondimento e conclusione dello studio di due differenti raccolte fino ad allora determinate in modo dubitativo è stato fornito dalla recente istituzione di *Leucoagaricus rhodelephantinus* rinvenuto e descritto per il territorio francese (Boisselet & Eyssartier, 2020). La conferma avuta dall'analisi filogenetica ha infine prodotto questa nostra sintesi che, oltretutto, consente di allargare l'areale di distribuzione della specie.

### MATERIALI E METODI

I basidiomi sono stati fotografati in habitat mediante fotocamera digitale Nikon modello Coolpix 4500. La descrizione macroscopica è stata formulata osservando esemplari freschi mentre l'analisi microscopica è stata eseguita sia su esemplari freschi sia su esemplari in essiccata. In quest'ultimo caso il materiale è stato preventivamente reidratato in acqua, trattato con Rosso Congo o reattivo di Melzer, lavato almeno altre due volte e poi osservato con reattivo o con colorante. Per la microscopia è stato utilizzato un microscopio biologico trinoculare AmScope modello T490B supportato da una videocamera elettronica digitale MC500. La struttura è dotata di ottiche apocromatiche 20x, 40x, 100x ed oculari 10x.

Tutte le immagini di V. Migliozi; il valore della barra nelle foto di microscopia è 5 µm per le spore, 20 µm per gli altri caratteri.

I risultati delle misurazioni della microscopia, effettuati su almeno 60 elementi per ciascuna tipologia di ciascuna raccolta, sono riportati nella forma "a due valori" che rappresentano l'intervallo osservato espresso con la formula "min-max" con, tra parentesi, i valori considerati fuori norma o eccezionali. Il materiale essiccato è depositato nell'erbario privato di uno degli autori (M.V.).

Il DNA totale è stato estratto dal Laboratorio Alvalab di Oviedo (Spagna) secondo la metodica standardizzata descritta in Murray & Thompson (1980). Per l'amplificazione mediante PCR (Mullis & Falaona 1987) sono stati utilizzati i primers ITS 1F e ITS4 per la regione ITS r-DNA (Garden & Bruns 1993, White et al. 1990), LROR e LRS per le regioni 28S dell'r-DNA (Gubeta et al. 1991). I prodotti della PCR sono stati evidenziati e controllati grazie ad elettroforesi in gel d'agarosio 1%. Infine sono stati controllati i cromatogrammi e sono stati corretti errori di lettura.

Le sequenze sono state esaminate visivamente ricercando errori di lettura con il software MEGA.

***Leucoagaricus rhodelephantinus*** Boisselet & Eyssart. Mycobank: MB836967  
*Bull. Soc. mycol. Fr.* **133** (3 – 4):265 (2020) [2017]

Posizione sistematica: regno *Fungi* R.T. Moore, divisione *Basidiomycota* R. T. Moore, sottodivisione *Agaricomycetidae* Parmasto, ordine *Agaricales* Underw., famiglia *Agaricaceae* Chevall, genere *Leucoagaricus* Locquin ex Singer, sezione *Leucoagaricus*.

Diagnosi originale in Boisselet & Eyssartier (2020):

*A Leucoagarico purpureolilacino differt statura multo minore, colore pilei eburneo incarnato et sporis ovoideis vel cylindraceis (4.6) 4.8-5.5-6.1 (6.7) x (2.9) 3.1-3.4-3.8 (4.1) µm. Holotypus: GE 19.050 in herbario PC, Genbank: MT984270*

Iconografia selezionata:

- Boisselet & Eyssartier (2020), Pl. I, Pl. II.
- La Chiusa (1999). Exsiccatum MCVE 21191 sub *Leucoagaricus tener*.
- La Chiusa (2013:259) sub *Leucoagaricus tener*, analoga alla precedente.

Bibliografia selezionata:

- Boisselet & Eyssartier (2020).
- La Chiusa (2013).

Habitat e raccolte studiate:

- M.V. BB28 (= M.V. 15.2893) del 10.10.2015 realizzata nell'Oasi Naturale di Palo laziale (Ladispoli, Roma) sotto *Quercus ilex* e macchia mediterranea su retroduna consolidata, legit V. Migliozi, GB OM971828.
- M.V. BB29 (= M.V. 11.2109) del 08.08.2011 realizzata nella Cerreta di Manziana (Manziana, Roma) sotto *Quercus cerris*, legit V. Migliozi, analisi molecolare fallita.



*Leucoagaricus rhodelephantinus* M.V. BB28 (= M.V. 15.2893)

#### Caratteri macroscopici

**Cappello** (15) 20 – 25 mm, inizialmente subemisferico poi, abbastanza rapidamente, da espanso a piano con un modesto ma evidente umbone al disco e con margine sottilmente striato. La cuticola è costituita da evidenti squamature poligonali, ben separate tra loro, di colore bruno o bruno-rosato che lasciano intravedere un sottostante fondo crema-biancastro. Nella zona discale le squamature sono fuse tra loro fino a dare luogo ad uno strato continuo, dotato di tonalità più cariche tendenti al brunastro. Nella raccolta della Cerreta di Manziana la colorazione pileica risulta essere molto sbiadita, tendente al crema ma le squamature sono sempre di analoga morfologia e sempre ben contrastate rispetto alla superficie di base di colore avorio. Solamente nel caso di primordi è possibile osservare al margine minuscoli lembi eccedenti di residuo anulare di colore crema-avorio.

**Lamelle** libere al gambo, bianche o bianco-avorio, mediamente fitte e poco ventricose; filo concolore.

**Gambo** 25 – 45 (60) × 3 – 5 mm, cilindrico con ingrossamento basale fino a 6 – 7 mm, fin quasi ad simulare un bulbo allungato, colorato in bianco, pieno. Slanciato e dotato alla base di una evidente feltrosità. Nella parte superiore presente un anello di colore bianco, estremamente fragile e facilmente caduco, talvolta appeso al margine pileico oppure di difficile percezione perché scomparso. In questi casi lascia sul gambo delle impercettibili vestigia fioccosi. Sulla faccia superiore dell'anello si può osservare una banda circolare di modestissime dimensioni diametrali e di colorazione crema. Per manipolazione la superficie del gambo assume una modesta colorazione avorio.

**Guttule** assenti da tutte le parti degli sporofori.

**Carne** priva di odore particolare, in genere biancastra. Reazione nulla al trattamento con soluzioni di  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

#### Caratteri microscopici

**Spore** (4.7)  $5.0 - 5.8$  (6.3) ×  $3.2 - 4.2$   $\mu\text{m}$ , in media  $5.2 \times 3.6$   $\mu\text{m}$ .  $Q = 1.46$ , da ovoidi a subovoidi allungate, raramente subcilindracee, sempre con apice ottuso, apicolo pronunciato, parete moderatamente spessa, ialine, destrinoidi, metacromatiche al Blu di Cresile, prive di poro germinativo.

**Basidi**  $16 - 22 \times 6 - 8$   $\mu\text{m}$ , tetrasporici, claviformi, con sterigmi lunghi  $3.0 - 3.5$   $\mu\text{m}$ .

**Subimenio** subcellulare con sottostanti ife allungate di dimensioni diametrali fino a  $12$  (15)  $\mu\text{m}$ .

**Pleurocistidi** non osservati.

*Cheilocistidi* (20) 25 – 40 (50) × (5) 6 – 10 (12) μm, nella maggior parte dei casi claviformi o cilindro-clavati, ventricosi, talvolta fusiformi, in diversi casi è stato osservato un rigonfiamento della parete estremamente localizzato, fino ad apparire come fini granulazioni inglobate nella parete e disperse sulla superficie esterna; abbastanza numerosi ma solo raramente aggregati in ciuffi consistenti, generalmente dispersi in modo continuo sul filo.

*Epicute* in trichoderma costituito da catene di elementi allungati. Gli elementi terminali sono in genere claviformi, altre volte sono ventricosi o difformi, misurano 40 – 100 (120) × 5 – 12 (18) μm, l'apice è sempre arrotondato, sono dotati di pigmentazione sia vacuolare sia di membrana. Gli elementi sottostanti, di analoghe dimensioni, sono dotati di pigmentazione incrostante. Esclusivamente nella zona del disco è presente una modesta sub-gelificazione della struttura, totalmente assente nella restante superficie pileica.

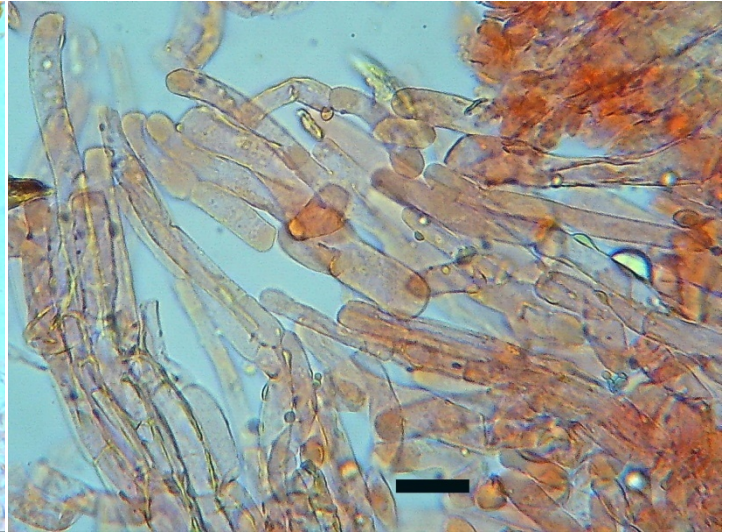
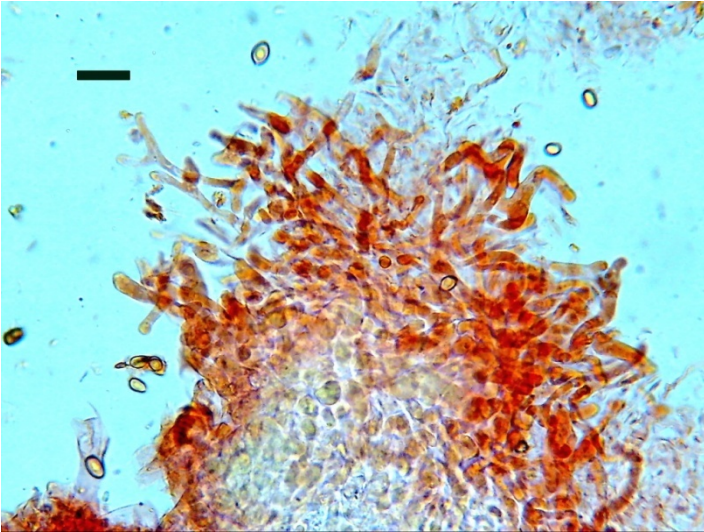
*Giunti a fibbia* assenti ovunque.



*Leucoagaricus rhodelephantinus* M.V. BB28 = M.V. 15.2893



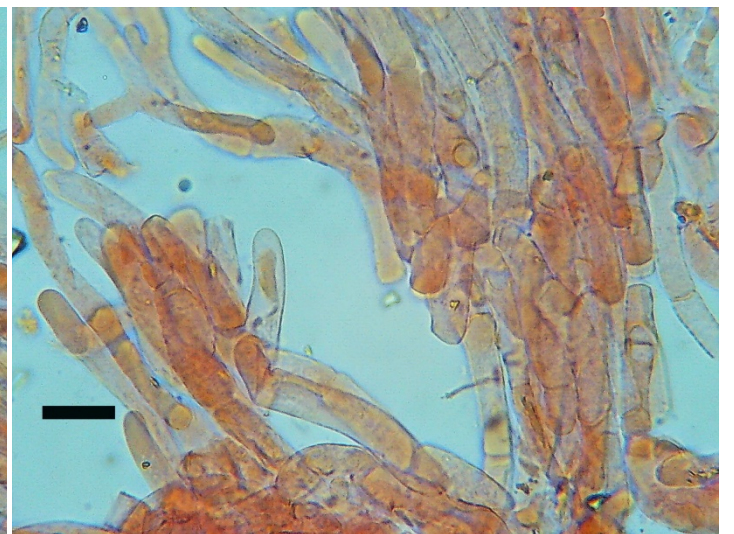
*Leucoagaricus rhodelephantinus* BB29 = M.V. 11.2109



Pileipellis al disco con elementi subgelificati / pileipellis at disk with sub gelatinised elements



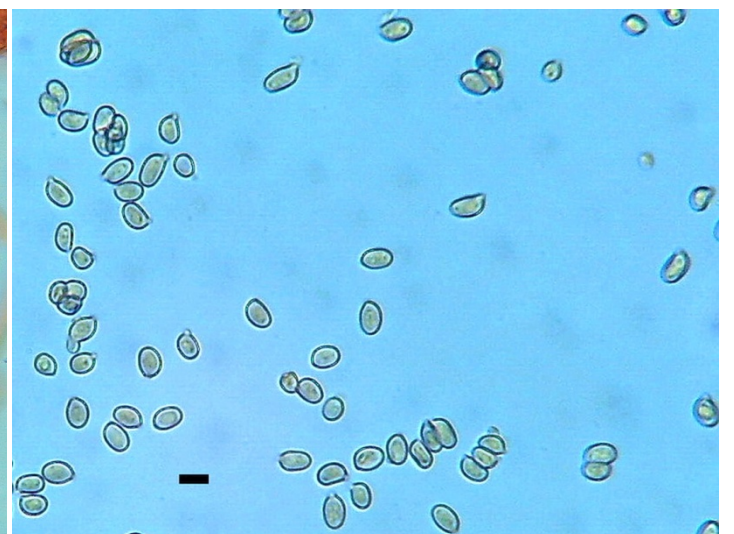
Trichoderma delle squame pileiche / trichoderm of pileal scales



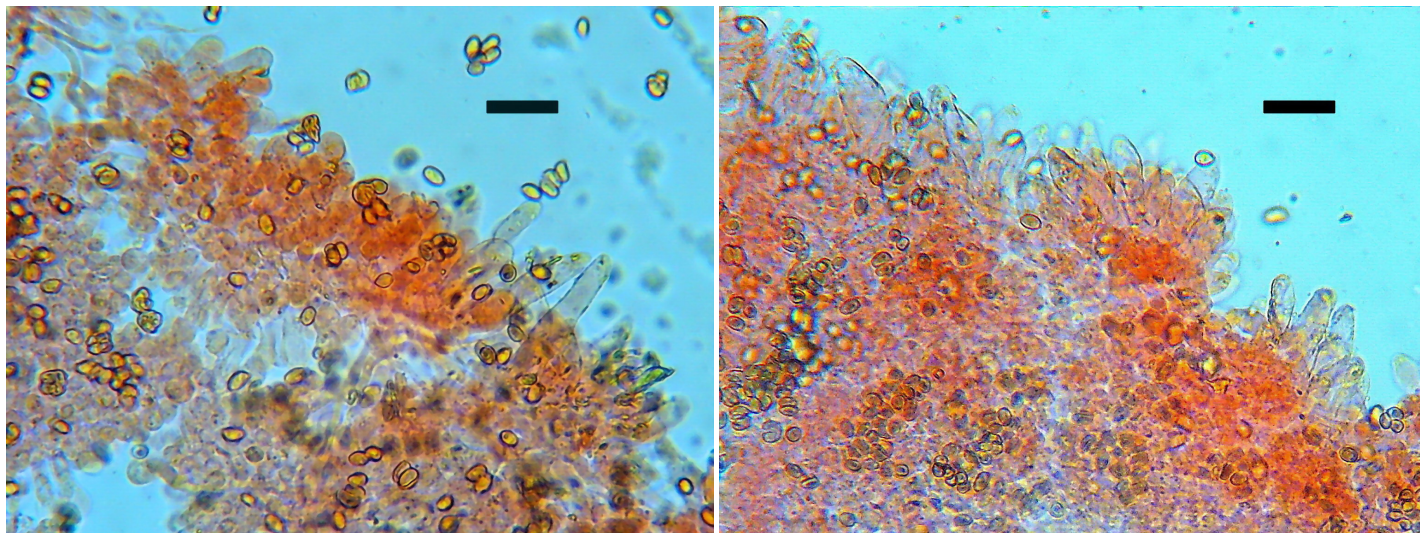
Pileipellis e subpellis / pileipellis and subpellis



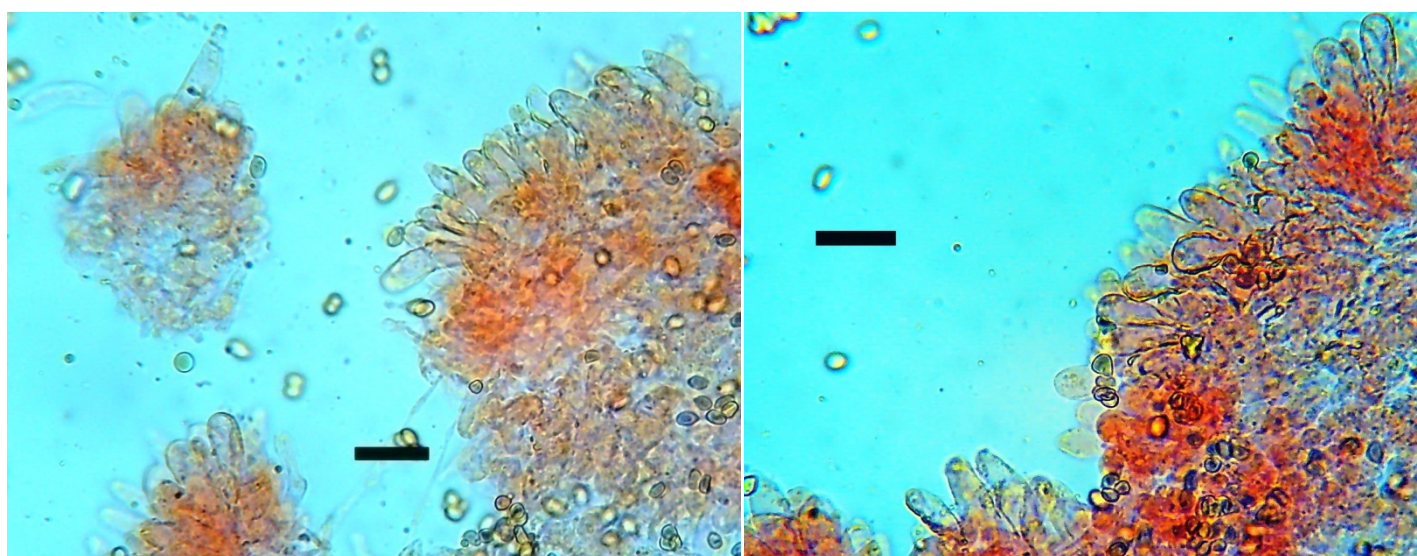
Pigmento incrostante in subcute / incrustant pigment in subcutis



Spore / spores



Filo lamellare con cheilocistidi / gill edge with cheilocystidia



Filo lamellare con cheilocistidi / gill edge with cheilocystidia

## COMMENTI

La sottosezione *Trichodermi* Bon & Migl., a cui appartiene *L. rhodelephantinus*, risulta essere costituita da numerose specie affini e non separabili tra di loro se non con difficoltà. Le specie europee interessate sono: *L. marriagei* (D.A. Reid) Bon, *L. ammovirescens* (Bon) Migl. & Coppola, *L. tener* (P.D. Orton) Bon, *L. brunneocingulatus* (P.D. Orton) Bon, *L. melanotrichus* var. *fuligineobrunneus* Bon & Boiffard, *L. melanotrichus* var. *septentrionalis* D.A. Reid, *L. gauguei* Bon & Boiffard ed infine *L. rhodelephantinus*. È merito di Boisselet & Eyssartier (2020) essere riusciti a separare la specie qui trattata da alcune interpretazioni errate di *L. tener* utilizzando le sequenze dell'ITS. Se, da una parte, risponde a verità quanto indicato da Hofstetter & al. (2019) e riportato da Boisselet & Eyssartier (2020) in merito alla validità scientifica dell'immissione di dati molecolari nelle banche dati di entità dimostrate poi erroneamente determinate, dall'altra possiamo aggiungere, e lo diciamo sommessamente, che in diversi casi risulta impossibile disporre delle sequenze di alcuni *typus* descritti in tempi pure recenti. Se si potesse disporre delle sequenze di specie istituite o ridescritte negli ultimi decenni si potrebbe, e non di poco, facilitare il compito per una corretta determinazione.

La difficoltà nel caso della sottosezione *Trichodermi* è stata accentuata da una serie di interpretazioni dubbie più o meno recenti nonché dalla possibile presenza di un certo numero di specie collettive di cui alcune già definite in passato (*L. marriagei* / *L. ionidicolor* Bellù & Lanzoni / *L. idea-fragum* Guinb., Boisselet & G. Dupuy), altre solo recentemente (*L. rhodelephantinus* / *L. tener*) ed altre, nel complesso *L. tener*, ancora da definire.

Premesso che non risulta possibile utilizzare la presenza di guttule sul cappello e sul gambo, rinvenibili quasi esclusivamente su esemplari freschi ed immaturi in condizioni meteo favorevoli, e premesso che molto spesso il materiale *typus* a disposizione non risulta essere sempre sequenziabile, non rimane che prestare la massima attenzione a quanto disponibile utilizzando le vecchie metodologie di indagine.

Nel presente caso il cappello di *L. rhodelephantinus* mostra, negli esemplari francesi e in quelli italiani, un habitus tipico, ma in miniatura, del cappello delle specie del genere *Macrolepiota* sottosezione *Microsquamatae* (Pazmany) Bellù & Lanzoni, cioè squame numerose e disperse a morfologia poligonale.

Questa particolarità consente di identificare già sul campo gli esemplari da attribuire a *L. rhodelephantinus*. Quanto detto risulta ben evidente sia per le raccolte francesi (Boisselet & Eyssartier, 2020) nell'immagine della tavola II ( in basso ) relativa alla raccolta

del 1.11.2014, sia nelle nostre immagini di corredo al presente lavoro così come in quella di La Chiusa (2013) in Funghi Agaricoidi. Per contro, l'immagine della raccolta GE 20.004 di P. Hériveau (riportata in Boisselet & Eyssartier, 2020), relativa al vero *L. tener*, evidenzia un esemplare a rivestimento pileico praticamente indissociato. La raccolta di Hériveau risulta essere conforme alla descrizione originale di Orton (1960) e assimilabile a quella di Vellinga (2004) la cui sequenza ITS, depositata in GenBank con voucher AY176444, è dotata di un'identità del 99% rispetto alla raccolta francese.

Per completezza di informazione riportiamo la percentuale di identità della nostra sequenza OM971828 (relativa alla raccolta M.V. BB28 = M.V. 15.2893) rispetto ai voucher presenti in GenBank interessati dal complesso *L. rhodelephantinus* / *L. tener*:

MT984270	collezione GE 19.050	99.86 % <i>L. rhodelephantinus</i>
GQ329043	collezione MCVE 751	99.00 % <i>L. rhodelephantinus</i> / <i>L. tener</i>
AY176444	collezione Vellinga 23.9.1998	85.78 % <i>L. tener</i>

Le nostre due raccolte, risultate ovviamente sovrapponibili tra loro per i caratteri macro e microscopici, possono entrambe a pieno titolo essere determinate come *L. rhodelephantinus*.

Non possiamo invece pronunciarsi in merito ad una vecchia raccolta riportata in Migliozzi & Coccia (1990) come *L. tener* "forma", caratterizzata da colorazione pileica bruno-vinosa al disco, da anello completamente bianco, priva di guttule e dotata di spore estremamente piccole,  $4.0 - 4.5 (5.0) \times 3.0 - 3.5 (4.0) \mu\text{m}$ . Il campione non risulta essere più sequenziabile.

In merito alle dimensioni sporiali possiamo notare come le spore di *L. rhodelephantinus* siano mediamente più piccole rispetto a quelle di *L. tener*, come evidenziato nella sottostante tabella 1.

Tabella 1 / Table 1	
<i>L. rhodelephantinus</i> (Boisselet & Eyssartier, 2020)	(4.6) 4.8 – 6.1 (6.7) × (2.9) 3.1 – 3.8 (4.1) $\mu\text{m}$
<i>L. rhodelephantinus</i> (sub <i>L. erioderma</i> , Eyssartier & Roux, 2017)	5.5 – 7.5 × 3.5 – 4.5
<i>L. rhodelephantinus</i> (sub <i>L. tener</i> , La Chiusa, 1999)	5.5 – 7.0 × 3.5 – 4.0 $\mu\text{m}$
<i>L. rhodelephantinus</i> (Migliozzi & al., 2022)	5.0 – 5.8 (6.3) × 3.2 – 4.2 $\mu\text{m}$
<i>L. tener</i> (Bizzi & Zecchin, 2001)	(5.0) 5.5 – 7.0 (7.5) × (3.5) 4.0 – 4.5 (5.0) $\mu\text{m}$
<i>L. tener</i> (Bon, 1976)	(5.0) 5.5 – 7.0 (7.5) × 3.0 – 4.0 (4.5) $\mu\text{m}$
<i>L. tener</i> (Bon, 1981)	(5.0) 5.5 – 7.5 (8.5) × (3.5) 4.0 – 4.5 (5.0) $\mu\text{m}$
<i>L. tener</i> (Bon, 1993)	(5.0) 5.5 – 7.5 (8.5) × (3.5) 4.0 – 4.5 (5.0) $\mu\text{m}$
<i>L. tener</i> (Candusso & Lanzoni, 1990)	6.0 – 7.5 (8.0) × 3.8 – 4.6 (5.0) $\mu\text{m}$
<i>L. tener</i> (Orton, 1960)	6.0 – 8.0 × 3.5 – 4.5 $\mu\text{m}$
<i>L. tener</i> (Ulje, 1984)	5.2 – 7.7 × 3.4 – 4.7 $\mu\text{m}$
<i>L. tener</i> (Vellinga, 2001)	6.5 – 8.0 × (3.5) 4.0 – 4.5 (5.0) $\mu\text{m}$
<i>L. tener</i> var. <i>brevisporus</i> (Kumari & Atri, 2013)	4.8 – 6.5 × 3.2 – 4.0 $\mu\text{m}$

Per differenziare *L. rhodelephantinus* dalle specie similiori possiamo commentare come segue.

*L. melanotrichus* var. *septentrionalis*, specie nordica, dotata anch'essa di guttule su tutto il carpoforo, si distingue nettamente per la colorazione pileica grigiastro o nerastra. *L. melanotrichus* var. *fuligineobrunneus* possiede colorazione pileica bruno-grigiastro, epicute costituita da catene di articoli corti con terminali di dimensioni ridotte,  $30 - 50 \times 8 - 12 \mu\text{m}$ . Queste due entità, al pari di numerose altre a cappello grigiastro non dovrebbero appartenere alla sottosezione *Trichodermi* quanto piuttosto alla sezione *Leucoagaricus* sottosezione *Melanotrichae* Bon, al pari di *L. atroalbus* P. Mohr & Dähncke e *L. atrofibrillosus* Singer.

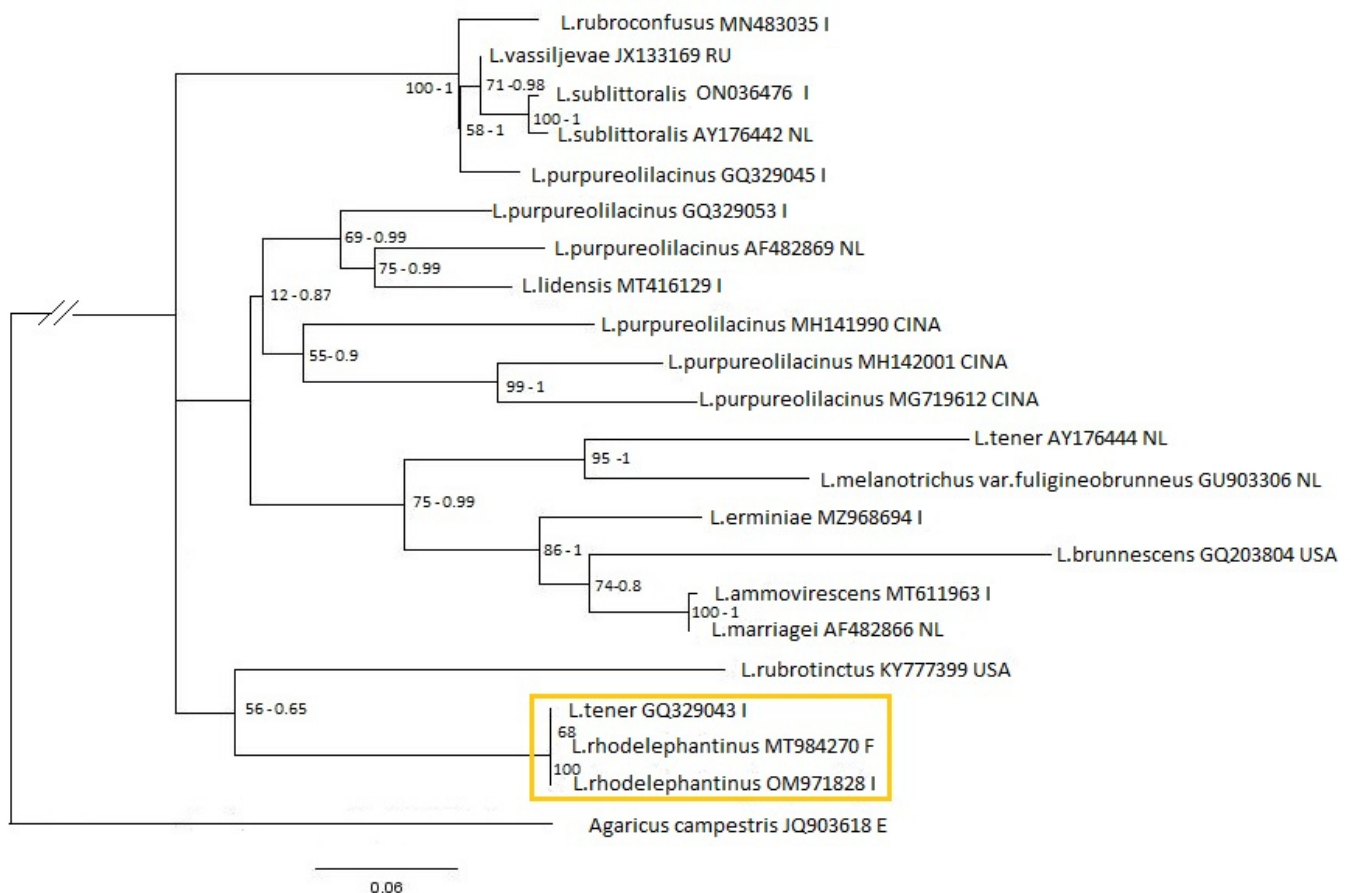
*L. gauguei* è differente per la colorazione pileica, per una morfologia sporale subamigdaliforme a sommità stirata e per la presenza nell'epicute di pileocistidi subimbeniformi.

Una specie invece davvero critica e che potrebbe porre serie difficoltà nella determinazione è *L. brunneocingulatus*. Si tratta di una specie estremamente rara, discussa da uno degli autori (M.V.) in una vecchia nota (Migliozzi & Perrone, 1991) e che meriterebbe di essere ulteriormente studiata. Come già fatto notare da Orton (1960), nella figura 427 raffigurante le "end-cells of scales on cap", le ife preterminali del trichoderma sono decisamente corte e fortemente incrostate. Questo carattere, già riportato in Migliozzi & Perrone (1991), è di fondamentale importanza per distinguere *L. brunneocingulatus* dal complesso *L. tener*. È inoltre allo studio una duplice raccolta realizzata nella Macchia della Signora nel comune di Cerveteri (RM) con caratteristiche macro e micro perfettamente sovrapponibili a quelle precedentemente da noi osservate (Migliozzi & Perrone, 1991); queste raccolte sono state pure sequenziate e le sequenze risultano distinte dalle specie trattate in questo lavoro.

Oltretutto nella nostra vecchia descrizione il cappello è al disco bruno, rosso-bruno o rosso arancione mentre l'anello presenta un bordo nettamente colorato in bruno rossastro. Per chiudere vogliamo altresì ricordare che l'elemento terminale del trichoderma del rivestimento pileico ha dimensioni massime pari a  $250 \times 20 \mu\text{m}$  nella diagnosi originale, fino a  $220 \times 14 (17) \mu\text{m}$  nella descrizione del 1991, fino a  $200 \times 16 (18)$  nel ritrovamento della Macchia della Signora. Altre specie, pur da noi incluse nell'albero filogenetico, devono essere escluse per il viraggio alla manipolazione o per la reazione alle soluzioni acquose ammoniacali. Analogamente devono essere escluse altre entità dotate di una marcata gelificazione nella zona discale, quali quelle appartenenti alla stirpe *Littoralis* ed alla sottosezione *Rubrotincti* (Singer) Bon.

In Figura 1 riportiamo il filogramma delle specie affini a *L. rhodelephantinus* nei caratteri macroscopici ed in quelli della microscopia nonché di quelle similari appartenenti alle sottosezioni *Trichoderma* e *Melanotrichae*. I dati completi delle sequenze inserite nell'albero filogenetico sono nella sottostante Tabella 2.

Tabella 2 / Table 2		
Species	Coll. ID/Origin	ITS
<i>L. ammovirescens</i> (Bon) Migl. & Coppola	MV Leuc 002 – 8381 (ALV24847)/IT	OM971827
<i>L. brunnescens</i> (Peck) Bon	R. Balsley (UC)/US	GQ203804
<i>L. erminiae</i> Consiglio, Setti & Vizzini	AMB18731/IT	MB841276
<i>L. lidensis</i> Migl. & P. Alvarado	MV241114.Le 006 type/IT	MT416129
<i>L. marriageae</i> (D.A. Reid) Bon	9-IX-1996, E.C. Vellinga 2005 (L)/NL	AF482866
<i>L. melanotrichus</i> var. <i>fuligineobrunneus</i> Bon & Boiffard	H.A. Huijser (herb. Huijser)/NL	GU903306
<i>L. purpureoililacinus</i> Huijsman	450526MF0069/CN	MG719612
<i>L. purpureoililacinus</i>	420526MF0052/CN	MH142001
<i>L. purpureoililacinus</i>	420526MF0037/CN	MH141990
<i>L. purpureoililacinus</i>	6-XI-1998, E.C. Vellinga 2291/NL	AF482869
<i>L. purpureoililacinus</i>	MCVE:754/IT	GQ329045
<i>L. purpureoililacinus</i>	MCVE:2261/IT	GQ329053
<i>L. rhodelephantinus</i> Boisselet & Eyssart.	GE 19.050 type/FR	MT984270
<i>L. rhodelephantinus</i>	M.V.15.2893 = MV BB28 (ALV28904)/IT	OM971828
<i>L. rubroconfusus</i> Migl. & Coccia	82002 type/IT	MN483035
<i>L. rubrotinctus</i> (Peck) Singer	TENN:064385/US	KY777399
<i>L. sublittoralis</i> Singer	19-IX-1998, E.C. Vellinga 2235 (L)/NL	AY176442
<i>L. sublittoralis</i>	MV 15.2403 = MV Leu 002 (ALV14268)/IT	ON036476
<i>L. tener</i> (P.D. Orton) Bon	23-IX-1998, E.C. Vellinga 2261 (L)/NL	AY176444
<i>L. tener</i>	MCVE:751/IT	GQ329043
<i>L. vassiljevae</i> E.F. Malysheva, Svetash. & Bulakh	LE10350 type/RU	JX133169



**Figura 1 / Figure 1.** Elaborazione tramite RaxML, metodo ML + rapid bootstrap, modello GTRGAMMA, repliche 1000. I valori di bootstrap sono indicati, rafforzati dai valori di probabilità a posteriori ottenuti con analisi bayesiana (0-1), distribuzione gamma, nst=6, generazioni 1 milione. *Agaricus campestris* è stato scelto come outgroup / Elaboration using RAXML, ML + rapid bootstrap method, GTRGAMMA model, 1000 bootstraps. Bootstrap values are reported, strengthened by the Bayesian posterior probability (0-1), gamma distribution, nst=6, 1 million generations. *Agaricus campestris* was selected as outgroup.

## RINGRAZIAMENTI

Desideriamo esprimere il nostro ringraziamento per la gradita collaborazione ed anche per l'aggiornamento della letteratura a Guillaume Eyssartier, Pierre Roux e Pablo Alvarado. Ringraziamo altresì Antonio Pizzuti Piccoli per l'accesso all'Oasi Naturale di Palo Laziale.

## BIBLIOGRAFIA citata o consultata / REFERENCES cited or consulted

- Boisselet P, Eyssartier G (2020). Un leucoagaric décrit du littoral morbihannais : *Leucoagaricus rhodelephantinus* sp. nov. *Bulletin de la Société Mycologique de France*. **133**(3):263 – 272.
- Bon M (1978). Taxons nouveaux. *Doc. Mycol.* **29**:33 – 38.
- Bon M (1981). Clé monographique des "Lépiotes" d'Europe. *Doc. Mycol.* **11**(43):1 – 77.
- Bon M (1993). Novitates 4. Famille *Lepiotaceae* Roze ex Overeen. *Doc. Mycol.* **88**:27 – 32.
- Bon M (1993). Flore mycologique d'Europe, 3. Les Lépiotes. *Lepiotaceae* Roze. *Doc. Mycol. Mémoire hors série no. 3*. L'Association d'Ecologie et Mycologie, Lille, 153 pp.
- Bizzi A, Zecchin G (2001). *Leucogarius tener*. *Soc. Veneziana di Micologia*. Scheda n. 730.
- Candusso M, Lanzoni G (1990). *Lepiota* s.l.. *Fungi Europaei*. Vol. 4. Ed. Candusso Edizioni.
- Cubeta MA, Echandi E, Abenerthy T, Vilgalys R (1991). Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of ribosomal RNA gene. *Phytopathology* **81**:1395 – 1400. doi: 10.1094/Phyto-81-1395.
- Eyssartier G, Roux P (2017). Le guide des champignons, France et Europe. Ed. Belin. Paris
- Gardes M, Bruns TD (1993). ITS primers with enhanced specificity for *Basidiomycetes*—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**:113 – 118.
- Hofstetter V, Buyck B, Eyssartier G, Schnee S, Gindro K (2019). The unbearable lightness of sequenced-based identification. *Fungal Diversity* **96**:243 – 284.
- Kumari B, Atri NS (2013). New additions of basidiomycetous fungi in Indian mycoflora. *Mycosphere* **4**(1):53 – 59. Doi: 10.5943/mycosphere/4/1/4.
- La Chiusa L (1999). *Leucoagaricus tener*. Società Veneziana di Micologia. Scheda n. 751.
- La Chiusa L (2013). *Funghi agaricoidi vol. 1. Agaricaceae*. ANDER Edizioni.
- Migliozzi V, Perrone L (1991). Sulle lepiotee – 6° contributo. Prima segnalazione in Europa continentale di *Leucoagaricus brunneocingulatus* (Orton) Bon. *Boll. Amer* **23**:3 – 6.
- Migliozzi V, Coccia M (1995). Funghi del Lazio II. 6 – 10. *Micologia Italiana* **1**:11 – 24.
- Mullis KB, Falaona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**:335 – 350. doi: 10.1016/0076-6879.
- Murray MG, Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**(19):4321 – 4325.
- Orton PD (1960). New check list of British Agarics and Boleti. Part III. Notes on genera and species in the list. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **43**(2): 159 – 439.
- Uljé CB (1984). Twee bijzondere parasolzwammen: *Leucoagaricus tener* en *Lepiota casimirii*. *Coolia* **27**(1):10 – 16.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, pp. 315-322.
- Vellinga EC (2001). *Leucoagaricus* Locq. ex Singer. In: Noordeloos ME, Kuyper TW, Vellinga EC (Eds.) *Flora Agaricina Neerlandica. Critical monographs on families of agarics and boleti occurring in the Netherlands*, vol 5. A.A. Balkema, Lisse, pp. 85 – 108.

## Report for the Italian territory of *Leucoagaricus rhodelephantinus*

**Key words:**

*Agaricomycetidae*, *Lepiotaceae*  
*Leucoagaricus*, *L. rhodelephantinus*  
ITS sequences, Taxonomy, Italy

**Abstract:** The authors, basing on two findings made in the Italian territory in two different localities, describe *Leucoagaricus rhodelephantinus* reporting this entity from Italy for the first time. Relations with other species of section *Leucoagaricus* are also discussed. Phylogenetic analysis based on the ITS marker evidences the absolute overlap with the type collected in France.

## INTRODUCTION

The starting point for a conclusive study of two different collections hitherto determined in a dubious way was provided by the recent publication of *Leucoagaricus rhodelephantinus* collected and described from the French territory (Boisselet & Eyssartier, 2020). The confirmation received from the phylogenetic analysis has finally produced our synthesis which, moreover, allows us to expand the known distribution area of the species.

## MATERIALS AND METHODS

The basidiomes were photographed in habitat using a Nikon Coolpix 4500 digital camera. The macroscopic description was obtained by observing fresh specimens while the microscopic analysis was performed on both fresh and dried specimens. In the latter case, the material was previously rehydrated in water, treated with Congo Red or Melzer's reagent, washed at least two more times and then observed with reagent or dye. An AmScope model T490B trinocular biological microscope supported by an MC500



digital electronic video camera and equipped with 20x, 40x, 100x apochromatic optics and 10x eyepieces was used for the microscopy.

All imagery are by V. Migliozi; the bar value in microscopy images is 5 µm for the spores and 20 µm for all other characters.

Microscopy measurements, carried out on at least 60 elements for each parameter of each collection, are reported in the "two-value" form which represents the observed interval expressed with the "min-max" formula, with out of the ordinary or exceptional values in brackets. The dried material is deposited in the private herbarium of one of the authors (M.V.).

Total DNA was extracted by the Alvalab Laboratory in Oviedo (Spain) according to the standardized method described in Murray & Thompson (1980). For amplification by PCR (Mullis et Falaona 1987) primers ITS 1F and ITS4 were used for the ITS r-DNA region (Garden & Bruns 1993, White et al. 1990), LROR and LRS for the 28S regions of r-DNA (Gubeta et al. 1991). PCR products were highlighted and controlled by electrophoresis in 1% agarose gel. Finally, the chromatograms were checked and read errors were corrected.

Sequences were manually inspected for read errors with the MEGA software.

## TAXONOMY

*Leucoagaricus rhodelephantinus* Boisselet & Eyssart.

*Bull. Soc. mycol. Fr.* **133** (3 – 4):265 (2020) [2017]

Mycobank: MB836967

Systematics: reign *Fungi* R.T. Moore, division *Basidiomycota* R. T. Moore, subdivision *Agaricomycetidae* Parmasto, order *Agaricales* Underw., family *Agaricaceae* Chevall, genus *Leucoagaricus* Locquin ex Singer, section *Leucoagaricus*.

Original diagnosis in Boisselet & Eyssartier (2020):

*A Leucoagarico purpureolilacino differt statura multo minore, colore pilei eburneo incarnato et sporis ovoideis vel cylindraceis (4.6) 4.8-5.5-6.1 (6.7) × (2.9) 3.1-3.4-3.8 (4.1) µm.*

Holotypus: GE 19.050 in herbario PC, Genbank: MT984270

Selected iconography:

- Boisselet & Eyssartier (2020), Pl. I, Pl. II.
- La Chiusa (1999). Exsiccatum MCVE 21191 sub *Leucoagaricus tener*.
- La Chiusa (2013:259) sub *Leucoagaricus tener*, similar to the previous one.

Selected literature:

- Boisselet & Eyssartier (2020).
- La Chiusa (2013).

Habitat and examined collections:

- M.V. BB28 (= M.V. 15.2893), 10.10.2015, Oasi Naturale di Palo laziale (Ladispoli, Roma) under *Quercus ilex* and Mediterranean scrub on consolidated backdune, legit V. Migliozi, GB OM971828.
- M.V. BB29 (= M.V. 11.2109), 08.08.2011, Cerreta di Manziana (Manziana's ash wood) (Manziana, Roma) under *Quercus cerris*, legit V. Migliozi, molecular analysis unsuccessful.

### Macroscopic characters

*Pileus* (15) 20 – 25 mm, subemispheric at start then fairly quickly expanded to applanate with a modest though evident umbo at centre; margin narrowly striate; cuticle composed of brown to pinkish brown evident polygonal scales well separated from each other and revealing an underlying whitish cream background in periphery, darker brownish and fused together in a continuous layer in the centre (in the Cerreta di Manziana's collection the pileus colour is very faded, tending to cream, while scales are always of similar morphology and always well contrasted with respect to the ivory-coloured background); only in young stages tiny, ivory cream annular remains are left exceeding the margin.

*Lamellae* free, white to ivory-white, moderately crowded and little ventricose; edge concolorous.

*Stipe* 25 – 45 (60) × 3 – 5 mm, slenderly cylindric with a basal enlargement up to 6 – 7 mm almost simulating an elongate bulb, white, stuffed, distinctly felty at base, turning to a weak ivory colour when handled. Annulus in the upper half white, with a cream circular band of very modest diametrical dimensions on the upper surface, extremely fragile and easily fugacious, sometimes appendiculate to the pileus margin or scarcely perceptible when already vanished and then imperceptible floccose vestigia are left on the stipe.

*Guttules* absent in all parts of the sporophores.

*Context* with no particular odour, generally whitish, not reacting to treatment with NH<sub>4</sub>OH solutions.

### Microscopic characters

*Spores* (4.7) 5.0 – 5.8 (6.3) × 3.2 – 4.2 µm, on average 5.2 × 3.6 µm. Q = 1.46, ovoid to elongate subovoid, rarely subcylindrical, apex always obtuse, apiculus pronounced, moderately thick-walled, hyaline, dextrinoid, metachromatic in Cresyl Blue; germ pore absent.

*Basidia* 16 – 22 × 6 – 8 µm, 4-spored, claviform; sterigmata 3.0 – 3.5 µm long.

*Subhymenium* subcellular with elongate underlying hyphae up to 12 (15) µm broad.

*Pleurocystidia* not observed.

*Cheilocystidia* (20) 25 – 40 (50) × (5) 6 – 10 (12) µm, mostly claviform to cylindrical-clavate, ventricose, sometimes fusiform, several with extremely localized swellings of the wall appearing as fine granulations included in the wall and scattered on its surface; quite numerous but rarely aggregated in consistent tufts, generally continuously dispersed along the edge.

*Pileipellis* a trichoderm of chained elongate elements with endcells generally claviform to sometimes ventricose or difform, 40 – 100 (120) × 5 – 12 (18) µm, always rounded at apex, with vacuolar and membranaceous pigment, modestly gelatinized exclusively in the disc, dry elsewhere. *Subpellis* of hyphae with similar dimension but with incrusting pigment.

*Clamp connections* absent everywhere.

## NOTES

Subsection *Trichodermi* Bon & Migl., to which *L. rhodelephantinus* belongs, is constituted of numerous similar species only separable from each other with difficulty. The European species included in it are: *L. marriagei* (D.A. Reid) Bon, *L. ammovirescens* (Bon) Migl. & Coppola, *L. tener* (P.D. Orton) Bon, *L. brunneocingulatus* (P.D. Orton) Bon, *L. melanotrichus* var. *fuligineobrunneus* Bon & Boiffard, *L. melanotrichus* var. *septentrionalis* D.A. Reid, *L. gauguei* Bon & Boiffard, and *L. rhodelephantinus*. It is thanks to Boisselet & Eyssartier (2020) to have managed to separate the species treated here from some erroneous interpretations of *L. tener* using the ITS sequences. If, on the one hand, it is true what indicated by Hofstetter & al. (2019) and reported by Boisselet & Eyssartier (2020) about the scientific validity of the entry of molecular data into databases of entities which later proved to be erroneously determined, on the other hand we can add, and we say it softly, that in several cases it is impossible to obtain sequences from some types described in recent times as well. If the sequences of species described or redescribed in recent decades could be available the task for a correct determination would be sensibly facilitate.

The difficulty in the case of subsection *Trichodermi* is emphasized by a series of more or less recent dubious interpretations as well as by the possible presence of a certain number of collective species, some of which already defined in the past (*L. marriagei* / *L. ionidicolor* Bellù & Lanzoni / *L. idea-fragum* Guinb., Boisselet & G. Dupuy), some only recently (*L. rhodelephantinus* / *L. tener*) and others, in the complex *L. tener*, still to be defined.

Given that it is not possible to use the presence of guttules on the cap and on the stem, as they are found almost exclusively on fresh and immature specimens in favorable weather conditions, and given that very often the type material available is not always sequenceable, all that remains is to lend the maximum attention to what is available using the old survey methods.

In the present case, the pileus of *L. rhodelephantinus* shows, in the French and Italian specimens, a typical habitus, but in miniature, of the pileus of the species of the genus *Macrolepiota* subsection *Microsquamatae* (Pazmany) Bellù & Lanzoni, i.e. numerous and dispersed polygonal scales.

This characteristic allows identifying already in the field the specimens to be attributed to *L. rhodelephantinus*. This is clearly evident both for the French collections (Boisselet & Eyssartier, 2020) in the image of table II (below) relating to the collection of 1.11.2014, and in our images as well as in that of La Chiusa (2013) in *Funghi Agaricoidi*. On the other hand, the image of the collection GE 20.004 by P. Hériveau (shown in Boisselet & Eyssartier, 2020), relating to the real *L. tener*, shows a specimen with a practically indissociable pileus covering. The collection by Hériveau is conform to the original description by Orton (1960) and similar to that by Vellinga (2004) whose ITS sequence, Genbank AY176444, has an identity of 99% with the French collection.

For complete information, we report the identity percentage of our sequence OM971828 (M.V. BB28 = M.V. 15.2893) compared to the vouchers present in GenBank affected by the *L. rhodelephantinus* / *L. tener* complex:

MT984270	collection GE 19.050	99.86 % <i>L. rhodelephantinus</i>
GQ329043	collection MCVE 751	99.00 % <i>L. rhodelephantinus</i> / <i>L. tener</i>
AY176444	collection Vellinga 23.9.1998	85.78 % <i>L. tener</i>

Our two collections, obviously overlapping with each other for macro and microscopic characters, can both fully be determined as *L. rhodelephantinus*.

We cannot, on the other hand, pronounce ourselves on an old collection reported in Migliozi & Coccia (1990) as *L. tener* "forma", characterized by vinous brown colour on the pileus disc, completely white annulus, absence of guttules and extremely small spores, 4.0 - 4.5 (5.0) × 3.0 - 3.5 (4.0) µm. The sample is no longer sequenceable.

Regarding the spore dimensions, we note that the spores of *L. rhodelephantinus* are on average smaller than those of *L. tener*, as shown in the table 1 below.

To differentiate *L. rhodelephantinus* from similar species we can comment as follows.

*L. melanotrichus* var. *septentrionalis*, a Nordic species, also endowed with guttules on the entire carpophore, is clearly distinguished by its greyish to blackish pileus. *L. melanotrichus* var. *fuligineobrunneus* has a gray-brown pileus, and a pileipellis consisting of chains of short articles with small terminals, 30 - 50 × 8 - 12 µm. These two entities, like many others with a grey pileus, should not belong to subsection *Trichodermi* but rather to *Leucoagaricus* subsection *Melanotrichae* Bon, like *L. atroalbus* P. Mohr & Dähncke and *L. atrofibrillosus* Singer.

*L. gauguei* differs in its pileus colour, subamygdaliform spores with a stretched apex, and presence of subhymeniform pileocystidia.

On the other hand, a truly critical species that could be hard to determine is *L. brunneocingulatus*. It is an extremely rare species, discussed by one of the authors (M.V.) in an old note (Migliozi & Perrone, 1991) and which deserves to be further studied. As already pointed out by Orton (1960), in figure 427 depicting the "end-cells of scales on cap", the pre-terminal hyphae of the trichoderm are decidedly short and strongly encrusted. This trait, already reported in Migliozi & Perrone (1991), is of fundamental importance to distinguish *L. brunneocingulatus* from the *L. tener* complex. A double collection from the Macchia della Signora,

municipality of Cerveteri (RM), with macro and micro characteristics perfectly overlapping those previously observed by us (Migliozzi & Perrone, 1991) is also being studied; these collections were also sequenced and their sequences are distinct from the species treated in this work.

Furthermore, in our old description the pileus disc is brown, red-brown or orange-red while the annulus has a distinct reddish brown margin. Finally, we also note that the dimensions of the pileic trichoderm endcells are at most 250 x 20 µm in the original diagnosis, 220 x 14 (17) µm in the 1991 description, 200 x 16 (18) in the Macchia della Signora's finding. Other species, although included in our phylogram, must be excluded for their colour change on handling or for their reaction to ammonia. Similarly, other entities with a relevant gelification in the discal area, such as those belonging to stirps *Littoralis* and to subsection *Rubrotincti* (Singer) Bon, must be excluded.

Figure 1 shows the phylogram of the species related to *L. rhodelephantinus* in macroscopic and microscopic characters as well as similar species belonging to subsections *Trichoderma* and *Melanotrichae*. A complete dataset of the sequences included in the phylogenetic tree is in Table 2 below.

#### AKNOWLEDGMENTS

We wish to express our thanks to Guillaume Eyssartier, Pierre Roux and Pablo Alvarado for their kind collaboration and for updating our literature. We also thank Antonio Pizzuti Piccoli for the access to the Natural Oasis of Palo Laziale.