

Article received 27 April 2022, accepted 11 May 2022

La variabilità di *Leucoagaricus sublittoralis*

(English version on page 22)

Vincenzo Migliozi^{1*}, Arianna Martolini², Giuseppe Donato³¹Viale G. Marconi 196, I- 00146 Roma - email vincenzomigliozi@alice.it²Via Torres 21, I-57023 Cecina (LI) - email ari_mar@hotmail.it³Via Nomentana 861 R, I-00137 Roma – email gdonato01@libero.it

*Corresponding author: vincenzomigliozi@alice.it

Parole chiave:*Agaricomycetidae*,
Lepiotaceae, *Leucoagaricus*,
Leucoagaricus sublittoralis,
sequenze ITS, tassonomia,
Italia**Riassunto:** Gli autori basandosi su alcune raccolte realizzate nel corso del tempo in diverse località dei Castelli Romani, provincia di Roma (Italia), illustrano la variabilità macroscopica e microscopica di *Leucoagaricus sublittoralis*, specie poco diffusa sul territorio nazionale. Vengono discussi i rapporti con altre specie della sezione *Leucoagaricus*, sottosezione *Rubrotincti*. L'analisi filogenetica basata sul marcatore nrITS consente anche un confronto con numerose entità recentemente descritte per territori estranei all'areale mediterraneo.**INTRODUZIONE**

Negli ultimi anni abbiamo avuto modo di osservare nei boschi collinari dei Castelli Romani (Provincia di Roma) diversi esemplari di *Leucoagaricus sublittoralis*, specie che sembrerebbe assente nei boschi planiziali presenti lungo la costa tirrenica. Detti esemplari, identici nei caratteri della microscopia e confermati dall'analisi filogenetica, presentano una estrema variabilità nei caratteri macroscopici tanto da dare lo spunto per l'elaborazione delle presenti note dedicate, è bene precisarlo, ad una specie non particolarmente frequente nel territorio nazionale Italiano.

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 della microscopia 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 con reattivo di Melzer, lavato 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 sono di V. Migliozi. Il valore della barra nelle foto della microscopia è 50 µm per la pileipellis, 40 µm per i cheilocistidi e 25 µm per le spore.

I risultati delle misurazioni della microscopia, effettuati su almeno 50 elementi per ciascuna tipologia di ciascuna raccolta, sono riportati nella forma "a due valori" che rappresentano l'intervallo osservato espresso con la formula "minimo-massimo" 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 (Cubeta 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.

TASSONOMIA

Leucoagaricus sublittoralis (Kühner ex Hora) Singer 1969
Nova Hedwigia **29**(1-2): 163 (1969) [1977]

Basionimo: *Lepiota sublittoralis* Kühner ex Hora, Trans. Brit. Mycol. Soc. 43(2): 450. 1960

= *Lepiota sublittoralis* Kühner 1936 (nomen nudum)
= *Leucocoprinus sublittoralis* (Kühner) Locquin 1960
= *Leucoagaricus sublittoralis* (Kühner) Singer 1945
= *Leucoagaricus sublittoralis* (Kühner ex Hora) Bon et Boiffard 1984
non *Lepiota sublittoralis* sensu D.A. Reid 1967 (= *Leucoagaricus wichanskyi*)

Holotypus basionimico: "Windsor Great Park, 18 Oct. 1957, in Herb. Hora" disperso, non più esistente (fide Vellinga, 2001).

Neotypus: raccolta Peter Mohr 90066 effettuata da P. Mohr il 24.09.1990 in località Berlin-Grünau (leg. et det. P. Mohr), conservato presso l'erbario BHU (Berrich Botanic und arboretum des Museums für Naturkunde der Humboldt-Universität zu Berlin), designato da Migliozi & Mohr (1992).





Posizione sistematica: Regno *Fungi* R.T. Moore, Sottoregno *Dicarya* Hibbett, T.Y. James & Vilgalys, Divisione *Basidiomycota* R.T. Moore, Sottodivisione *Agaricomycotina* Doweld, Classe *Agaricomycetes* Doweld, Sottoclasse *Agaricomycetidae* Parmasto, Ordine *Agaricales* Underw., Famiglia *Agaricaceae* Chevall., Genere *Leucoagaricus* Locq. ex Singer, Sezione *Leucoagaricus*.

Diagnosi originale

Pileo 35-55 mm lato, sub-globoso, sericeo-levi sed paucis floccis veli universalis obtecto, dilute brunneolo-incarnato, pallidiore ad marginem, denique campanulato-convexo vel convexo-subumbonato et in floccoso-squamis secedente, disco levi; lamellis liberis ab stipite remotis, sub-ventricosis, albidis, acie denique flocculoso; stipite 65-110 x 3,5-5,0 mm ad apicem, sub-clavariforme, 13 mm ad basim, albido, sericeo-levi, farcto; annulo membranaceo albido; sporis in cumulo albis, amigdaliformibus 6,7-7,2 x 3,5-4,5 μ , destrinoideis; basidiis 4-sporis, clavariformibus 29 x 8 μ ; acie lamellarum pilis obtusis, plus minus ventricosis vel fusiformibus 9-12 μ

latis: trama lamellarum laxa, ex hyphis intermixtis 20-22 μ latis composita; cute pilei ex hyphis jacentibus 3,5-5,5 μ latis instructa, et pilis elongatis numerosis claviformibus 10-19 μ latis ferente; hyphis fibuligeris nullis. Inter foliis mortuis in silvis frondosis. Typus: Windsor Great Park, Berks, 18 Oct. 1957, in Herb. Hora.

Iconografia selezionata:

- Migliozi & Mohr (1992), Pl. 63-64;
- Partacini (1995).

Bibliografia selezionata:

- Kühner (1936)
- Migliozi & Mohr (1992)
- Keldermann (1994)
- Partacini (1995)
- Vellinga (2001)
- Caballero & Pérez-Butròn (2006).

Raccolte esaminate (per tutte legit V. Migliozi):

- MV 04.0049 (= MV AA 09) del 26.10.2004 realizzata in località Vivaro sud sotto quercia e castagno, GenBank ON459708;
- MV 17.9565 (=MV AA 08) del 21.10.2017 realizzata in località Vivaro, sotto quercia e castagno, GenBank ON479651;
- MV 16.1516 (=MV Leu 003) del 27.09.2016 realizzata in località Cerquone di Rocca di Papa, carpino e castagno, GenBank ON470008;
- MV 15.2403 (= MV Leu 002) del 26.09.2015 realizzata in località Pratonì del Vivaro sotto quercia e carpino, GenBank ON036476;
- MV 15.2524 del 26.09.2015 realizzata in località Corsi di Rocca di Papa, nocciolo e castagno;
- MV 18.2383 del 22.09.2018 realizzata in località Cerquone di Rocca di Papa, sotto carpino;
- MV 18.2504 del 22.09.2018 realizzata in località Cerquone di Rocca di Papa, sotto quercia, nocciolo e carpino.

Caratteri macroscopici

Cappello: (20) 30 – 60 mm, inizialmente subgloboso poi convesso infine piano con, talvolta, una modesta depressione nella zona discale. È presente un piccolo umbone maggiormente evidenziato dai cromatismi del disco che, in questo intorno, presenta una colorazione nettamente più scura della restante porzione pileica. Essa varia dal carnicino-bruno al bruno-rossastro fino al rosso-ocraceo se non addirittura al bruno-grigiastro. Questa mutevolezza nella colorazione del disco si rispecchia, con mutate tinte, anche nella zona mediana ed al margine con tonalità che variano dal crema al crema-bruno, al crema-arancio fino all'arancio con sfumature rosate. La cuticola è normalmente asciutta salvo al disco dove può presentarsi subviscida e lucida restando sempre liscia, contrariamente al margine con la superficie che tende a fessurarsi radialmente per la formazione di modeste squamule basse simulanti delle granulazioni che permettono il riscontro della sottostante carne bianca o biancastra. Al margine è possibile riscontrare la presenza di residui fioccosi ma solamente negli esemplari giovani. Raramente sono stati osservati sulla superficie pileica modesti residui di velo, araneosi, biancastri.

Lamelle: libere e separate dal gambo, intercalate da lamellule, inizialmente di colore bianco poi biancastre, bianco-avorio poi crema. Filo moderatamente fioccoso e subconcolore alla superficie lamellare.

Gambo: 50 – 90 (100) \times 4 – 8 (10) mm, facilmente separabile dal cappello, cilindro-claviforme, clavato alla base ma mai submarginato dove può raggiungere uno sviluppo diametrico pari a (8) 10 – 12 (15) mm. In alcuni casi è stato osservato un modesto fittone radiceiforme. La superficie, biancastra, è liscia, sericea e lucente, raramente coperta da minuscole fioccosità. È sempre presente un anello semplice, membranaceo, biancastro, supero, debolmente fioccoso al bordo, in genere posto nella metà superiore del gambo.

Carne: bianca, senza odore e sapore particolari, invariante per manipolazione o contatto con soluzioni acquose ammoniacali (NH_4OH).

Caratteri microscopici

Spore: 6.5 – 8.4 (9.0) \times 3.8 – 4.6 (4.9) μm , in media 7.2 \times 4.2, μm , da ellittiche a subamigdaliformi molto spesso ad apice più o meno moderatamente rastremato, ialine, destrinoidi e metacromatiche in Blu di cresile, a parete spessa, prive di poro germinativo.

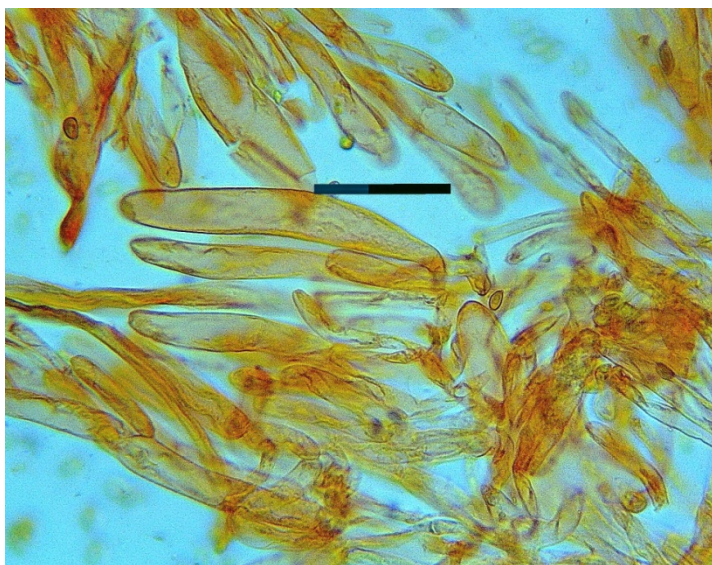
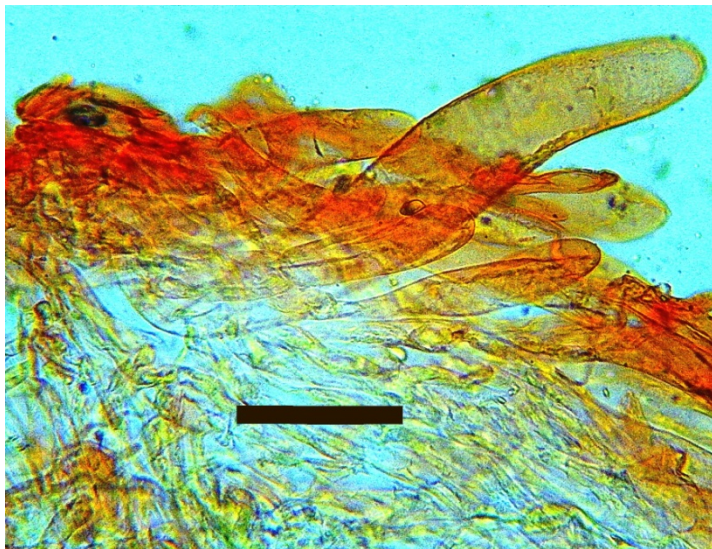
Basidi: 24 – 28 \times 6 – 8 μm , tetrasporici, claviformi.

Cheilocistidi: (25) 30 – 40 (45) \times 10 – 12 (14) μm , da ventricosi a claviformi, raramente fusiformi, normalmente coperti da cristalli di ossalato di calcio nella parte superiore. **Pleurocistidi:** non osservati.

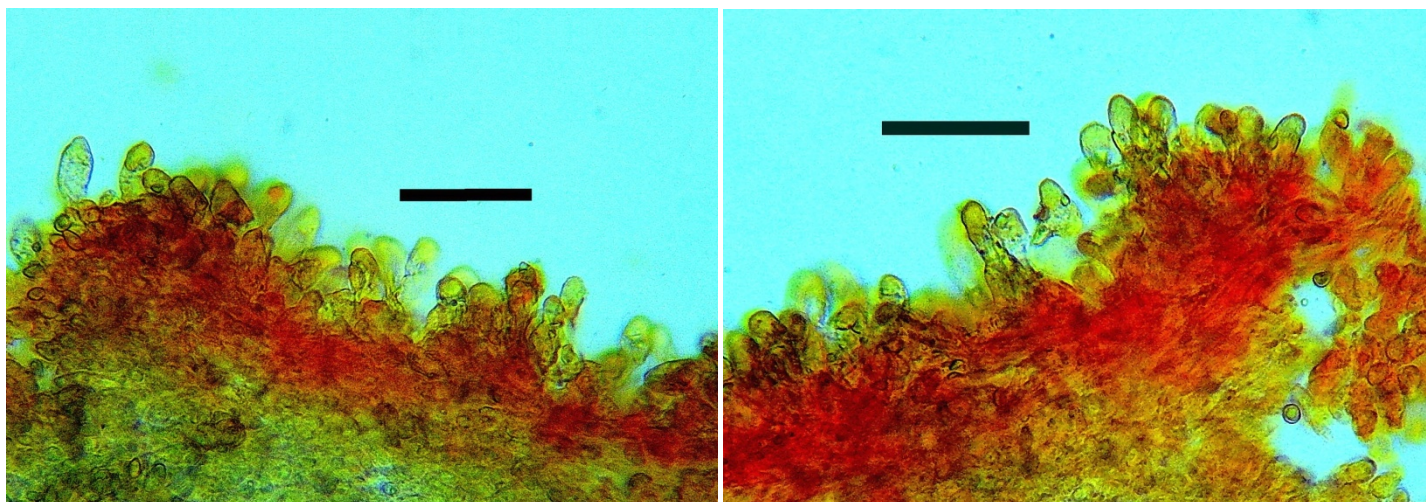
Epicute: in tricoderma con peli emergenti da una struttura di base gelificata costituita da ife intrecciate. Gli elementi terminali emergenti misurano 60 – 210 (250) \times (10) 12 – 20 (25) μm e sono differenziati, subfusiformi o cilindro-claviformi ad apice arrotondato. È presente contemporaneamente un debole pigmento vacuolare e parietale, raramente anche incrostante negli elementi preterminali.

Giunti a fibbia: assenti.

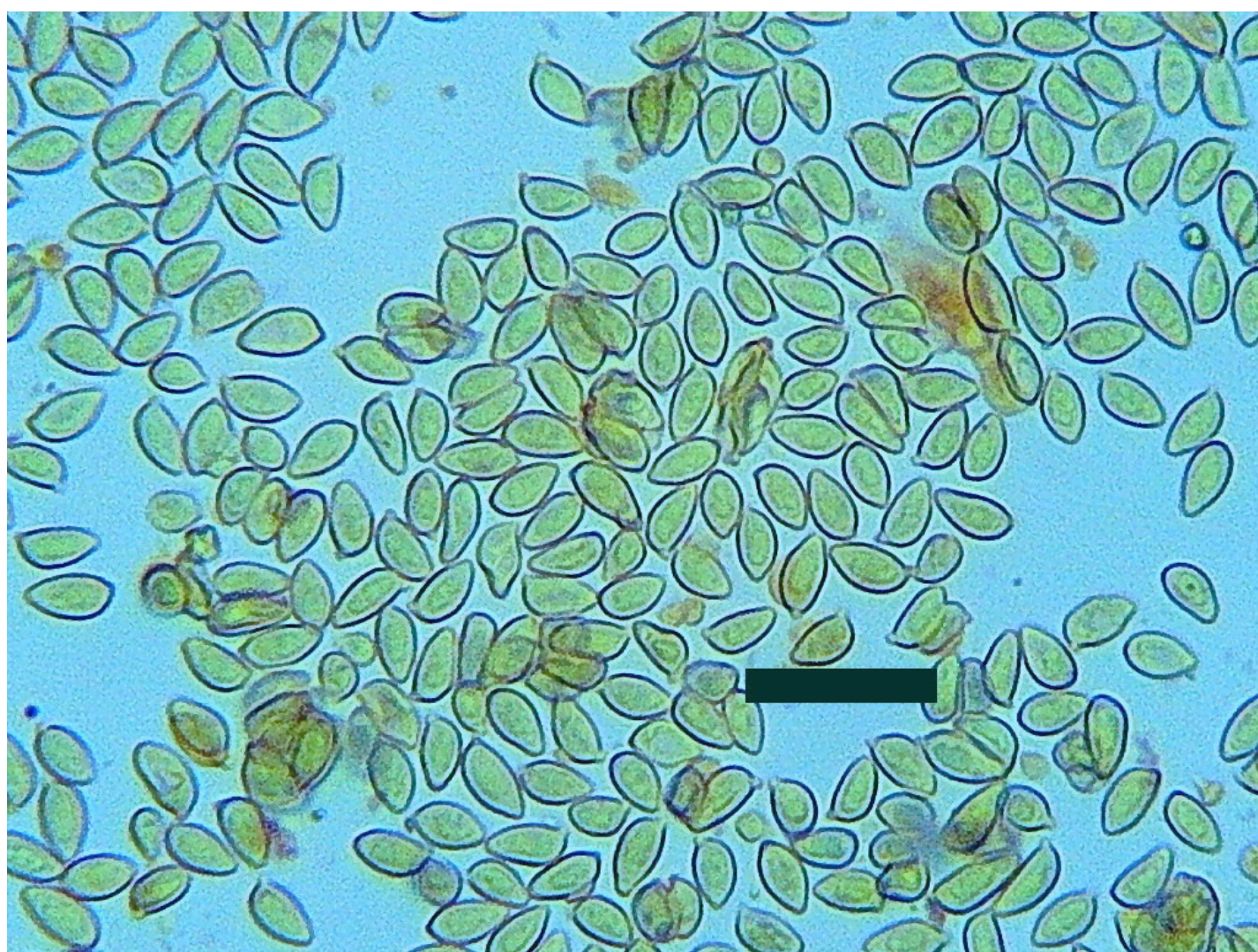
Habitat: nei boschi collinari freschi di quercia, nocciolo, carpino e castagno. Tutti i ritrovamenti descritti nella presente nota sono avvenuti nei mesi di settembre ed ottobre nella zona dei Castelli Romani. Questa specie finora non è stata da noi mai osservata nei boschi del litorale laziale e nei boschi planiziali dell'entroterra romano.



Pileipellis



Cheilocistidi / cheilocystidia



Spore / spores

DISCUSSIONE

Con le numerose raccolte a nostra disposizione ritrovate in diversi boschi dei Castelli Romani possiamo confermare quanto precedentemente affermato da Migliozi & Mohr (1992). Infatti questi ritrovamenti, pur nella variabilità di alcuni loro caratteri, si sono dimostrati perfettamente sovrapponibili con quelli sapientemente descritti da P. Mohr che aveva utilizzato diverse raccolte continentali effettuate nei dintorni di Berlino (Berlin Adlershof, Berlin Grünau, Egsdorf, Königs Wusterhausen), da J. Kuthan in Slovacchia e da G. Zecchin nei dintorni di Maniago (PN). Queste raccolte nulla hanno a che vedere con *L. littoralis* (Ménier) Bon & Boiffard che differisce sensibilmente nei caratteri morfocromatici, ambientali e filogenetici.

L. sublittoralis nasce per opera di Kühner (1936) mediante una descrizione completa ma non valida in quanto priva della diagnosi latina. Successivamente Hora (1960) provvede a colmare il vuoto (cfr. diagnosi latina sopra riportata) citando il *typus* che malauguratamente è andato successivamente smarrito e non risultando più esistente. Da questo momento la storia diventa ancora più incomprensibilmente travagliata.

Infatti Reid (1967) propone, nella Pars II di *Coloured Illustrations of Rare and Interesting Fungi*, una ridescrizione della specie e designa un ulteriore neotipo. Le cui caratteristiche purtroppo non quadrano con quanto indicato da Kühner. In particolare i peli terminali del rivestimento pileico '*having a width of 4,75-13 μm*' in contrasto con quanto riportato dall'eminente micologo transalpino '*poils très allongés... de 10-19 μ de large*'. Ma non è tutto in quanto Reid (1972) ridescrive la stessa specie sotto il nome di *L. wychanskyi* Pilát ponendola in sinonimia con *Lepiota sublittoralis* Hora e dando vita ad una discussa sinonimia che, attualmente, possiamo definitivamente escludere per merito dell'analisi filogenetica.

Per quanto sopra, la specie risultava priva di materiale olotipico realmente rappresentativo della specie. Pertanto Migliozzi & Mohr (1992) proposero un ulteriore neotypus per *L. sublittoralis* individuandolo nella raccolta P.M. 90066 realizzata da Mohr il 24.9.1990 in località Berlin-Grünau e conservato presso l'erbario BHU (Bereich Botanik und Arboretum des Museums für Naturkunde der Humboldt-Universität zu Berlin). Ignoriamo le motivazioni per le quali non troviamo segnalazione di tale neotypus nelle pubblicazioni degli autori che, negli anni successivi, si sono interessati a questa specie. Ci riferiamo in particolare a Bon (1993), Kelderman (1994), Partacini (1995), Vellinga (2001) e Caballero-Pérez Buron (2006).

In tutti i casi la variabilità riscontrata in determinati caratteri della specie quali colorazione pileica, dimensioni sporiali nonché morfologia degli elementi terminali della pileipellis hanno indotto diversi autori ad avallare la sinonimia tra *L. sublittoralis* e *L. wychanskyi*, basata proprio sull'errore di Reid (1967). Prima ancora dell'evidenza messa a fuoco dalla filogenesi con una differente sequenza tra le due entità, erano evidenti le differenze esistenti quali i larghi residui velari totalmente assenti in *L. sublittoralis* così come la diversa struttura della pileipellis, la diversa morfologia dei cheilocistidi e le dimensioni sporiali.

Tra i micologi assertori della sinonimia, oltre a Reid, possiamo ascrivere Babos (1970), Wasser (1980), Ferrari (1982), Moser (1986), Guzmán & Guzmán Dávalos (1992) e Cetto (1993). Viceversa, Bon (1993) e Vellinga (2001), consapevoli delle tante differenze esistenti, hanno tenuto ben distinte le due entità. Naturalmente gli studi filogenetici condotti su collezioni europee hanno ulteriormente supportato la distinzione tra le due entità.

A titolo banalmente esemplificativo riportiamo il confronto, poi meglio evidenziato nel filogramma illustrato in Fig. 1, tra il voucher AY176442 (*L. sublittoralis*) basato su una raccolta olandese di E. Vellinga datata 19.IX.1998 realizzata a Bunderbos, Geulle-Elsloo nella provincia di Limburg (NL) ed il voucher AF482874 (*L. wychanskyi*) basato su una raccolta (depositata da Vellinga, Bruns, de Kok) di H.A. Huijser del IX/X.1987, realizzata a Cannerbos, Neercanne nella provincia di Limburg (NL). In questo caso la percentuale di identità è pari a 85,89% e tale quindi da eliminare ogni ragionevole dubbio.

Alcune nostre raccolte, pur nella variabilità denotata dalla colorazione pileica, sottoposte ad analisi filogenetica si sono dimostrate affini al voucher GenBank AY176442 (raccolta olandese di E.C. Vellinga); nella tabella qui accanto sono riportate le relative percentuali di identità ITS ottenute eseguendo un confronto BLAST.

raccolta	GenBank	identità
MV 04.0049= MV AA09	ON459708	97,69 %
MV 05.2403= MV Leu 002	ON036476	99,00 %
MV 16.1516= MV Leu 003	ON470008	99,00 %
MV 17.9565= MV AA 08	ON479651	98,93 %

L'analisi filogenetica comparativa tra le quattro sequenze delle nostre collezioni e quelle di specie di *Leucoagaricus* similari attualmente disponibili in GenBank indica una condizione di sister group con una delle tante e diverse raccolte cinesi di *L. rubrotinctus* (Peck) Singer. Si tratta della raccolta con sequenza GenBank KP300877. Questa affinità di sequenza nrITS è in contrasto con le caratteristiche morfologiche in possesso della specie *L. rubrotinctus*, in particolare con quanto riguarda la colorazione pileica, la morfologia sporale e la pileipellis trichodermica con elementi terminali di dimensioni diametrali nettamente inferiori.

In Fig. 1 viene riportato il filogramma con le entità con le quali *L. sublittoralis* può avere punti di similitudine macro e microscopici. Senza entrare nel merito di ciascuno di questi ultimi e considerando fondamentale l'indice di identità tra le sequenze, per tutte pari o inferiore al 94%, possiamo escludere per le nostre raccolte la confusione con specie europee (*L. lidensis* Migl. & P. Alvarado, *L. purpureorimosus* Bon & Boiffard, *L. purpureoilacinus* Huijsman, *L. vassilijevae* E.F. Malysheva, Svetash. & Bulakh, *L. erminiae* Consiglio, Setti & Vizzini, *L. rubroconfusus* Migl. & Coccia), con specie americane (*L. rubrotinctus* e *Lepiota rubrotinctoides* Murrill), e con specie asiatiche [*L. truncatus* Z.W. Ge & Zhu L. Yang, *L. asiaticus* Qasim, Nawaz & Khalid, *L. japonicus* (Kawam. ex Hongo) Hongo, *L. lahorensis* Qasim, T. Amir & Nawaz, *L. subpurpureoilacinus* Z.W. Ge & Zhu L. Yang, *L. rubrobrunneus* E.F. Malysheva, Svetash. & Bulakh, *L. proximus* E.F. Malysheva, Svetash. & Bulakh e *L. lateritiopurpureus* (Lj.N. Vassiljeva) E.F. Malysheva, Svetash. & Bulakh)]. In tutti questi casi alle differenze filogenetiche si accompagnano sempre differenze morfocromatiche. L'enunciazione delle stesse rappresenterebbe solamente un inutile sfoggio e nulla aggiungerebbe all'argomento trattato.

RINGRAZIAMENTI

Per la gradita collaborazione a vario titolo intendiamo esprimere il nostro ringraziamento a Pablo Alvarado e a Pietro Voto, e per i chiarimenti nomenclaturali a Luis Alberto Parra Sanchez.

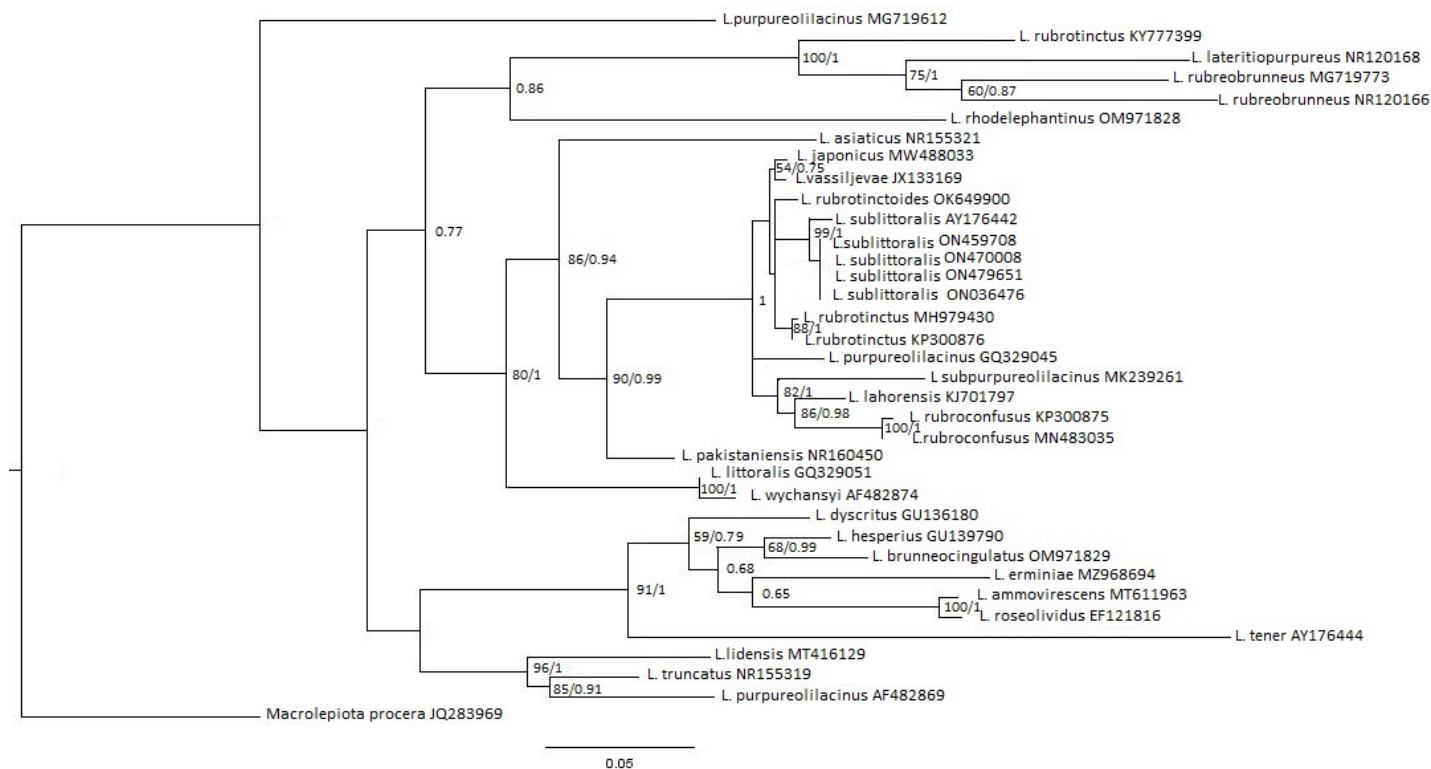


Fig. 1 Le sequenze analizzate fanno parte della regione ITS del rDNA e regione codificante contigua per una lunghezza di 715 basi; l'allineamento è stato eseguito con Muscle e il data set è stato validato tramite neighbour joining. Il filogramma è stato ottenuto tramite il confronto tra analisi bayesiana e massima verosimiglianza. Sui nodi sono rappresentati i valori di bootstrap (da 1 a 100) e le probabilità posteriori bayesiane (da 0 a 1); almeno uno dei due metodi supporta la robustezza dei nodi. Il modello di sostituzione nucleotidica è stato individuato con jModelTest in TPM2uf+I+G valutando il relativo BIC per l'analisi bayesiana. Il modello più simile utilizzato poi nel programma MrBayes è stato GTR+G (nst=6 rates=gamma); sono state eseguite 4 catene Markov, tre calde e una fredda, con due corse parallele per 2 milioni di generazioni con campionamento (samplefreq) ogni 1000. La massima verosimiglianza invece è stata calcolata con RaxML (ML + rapid Bootstrap) e 1000 generazioni. /

A range of 715 bp from ITS region and part of adjacent rRNA gene sequence has been analyzed. The sequences were aligned using Muscle and evolutionary relationship was inferred by employing neighbor-joining. Phylogenetic tree has been estimated through Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) method. Bootstrap values (1 to 1000) and bayesian posterior probabilities (0 to 1) are shown as node labels. Evolutionary model has been selected by jModelTest, BIC has been used to evaluate the best substitution pattern (TPM2uf+I+G). MrBayes performed the following parameters setting: GTR+G (nst=6 rates=gamma); 4 Markon chains (three heated chains and one cold chain), in two parallel analysis with 2 million generations and sampling frequency = 1000. The maximum likelihood has been generated from RAXML, with 1000 bootstrap iterations.

BIBLIOGRAFIA citata o consultata / **REFERENCES** cited or consulted

Aparici IR, Mahiques R (1996). *Leucocoprineae* de la zona litoral de "El Saler" (Valencia) I. *Bulletin de la Societat Micologica Valenciana* **2**:67 – 82.

Babos M (1970). *Lepiota wychanskyi* Pilat rara conspectaque species in Hungaria. *Česká Mykologie* **24**(4):217 – 219.

Bon M (1982). Novitates. Validations de taxons. *Leucoagaricus sublittoralis* (Kühn. ex Hora). *Documents Mycologiques* **12**(48):44 – 44.

Bon M (1976). Lépiotes rares, critiques ou nouvelles aux Dreilantertagung d'Emmendingen, September 1975. *Bulletin trimestriel de la Société Mycologique de France* **92**(3):317 – 334.

Bon M (1993). Flore mycologique d'Europe 3. Les Lépiotes. *Doc. Mycol. Mémoire hors série* 3. Lille.

Bon M (1981). Clé monographique des lépiotes d'Europe (*Agaricaceae*, Tribus *Lepioteae* et *Leucocoprineae*). *Doc. Mycol.* **11**(43):1 – 77.

Bon M, Boiffard J (1972). Lépiotes des dunes Vendéennes. *Bulletin trimestriel de la Société Mycologique de France* **88**:15 – 28.

Bon M, Boiffard J (1974). Lépiotes de Vendée et de la côte Atlantique française. *Bulletin de la Société Mycologique de France* **90**: 287 – 306.

Caballero A (1997). Flora Micologica de La Rioja, 1. *Lepiotaceae*. CD ROM, Calahorra. La Rioja.

Caballero A (2005). Setas y Hongos de la Rioja. II logroño.

Caballero A, Pérez-Butrón JL (2006). *Leucoagaricus sublittoralis* y *Leucoagaricus wichanskyi*, dos interesantes especies a comparar. *Yesca* **18**:12 – 19.

Candusso M, Lanzoni C (1990). *Lepiota* s.l.. *Fungi Europei* Vol. 4. Saronno.

Cetto B (1983). I funghi dal vero Vol. 4. Tavola 1284. Trento.

de la Fuente JL, Hernández-Del Valle JF, Aguirre-Acosta CE, GarcíaJiménez J (2018). First record of *Leucoagaricus lilaceus* (*Agaricales: Agaricomycetes*) from mexico. *Studies in fungi* **3**:1 doi:10.5943/sif/3/1/19.

- 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.
- Ferrari E (1982). Alcuni funghi particolari del Novarese. *Boll. Gruppo Micol. Bresadola* **25**(1-2):90 – 94.
- 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.
- Ge ZW (2010). *Leucoagaricus orientiflavus*, a new yellow lepiotoid species from south western China. *Mycotaxon* **111**:121 – 126.
- Ge ZW, Yang ZL, Qasim T, Nawaz R, Khalid AN, Vellinga EC (2015). Four new species in *Leucoagaricus* (*Agaricaceae*, *Basidiomycota*) from Asia. *Mycologia* **107**:1033 – 1044 doi: <https://doi.org/10.3852/14-351>
- Guzmán G, Guzmán-Dávalos L (1992). A checklist of the Lepiotaceous Fungi. Koeltz Scientific Books.
- Hausknecht A, Pidlich-Aigner H (2004). *Lepiotaceae* (Schirmlinge) in Österreich. 1. *Österr. Z. Pilzk.* **13**:1 – 38.
- Heisecke C, Duque Barbosa JA, Neves MA, Carvalho AA (2021). Taxonomic and nomenclatural novelties in *Leucoagaricus* (*Agaricaceae*) from Brazil. *Phytotaxa* **494**(1):42 – 58 doi: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.494.1.2>
- Hora FB (1960). New checklist of British Agarics and Boleti: Pars IV. Validations, new species and critical notes. *Transactions British Mycol. Soc.* **43**(2):440 – 459.
- Hussain S, Jabeen S, Khalid AN, Ahmad H, Afshan NUS, Sher H, Pfister DH (2018). Underexplored regions of Pakistan yield five new species of *Leucoagaricus*. *Mycologia* **110**(2):387 – 400 doi: 10.1080/00275514.2018.1439651.
- Keldermann PH (1994). Parasolzwammen van Zuid-Limburg. Nederland. *Lepiota* s.l. excl. *Macrolepiota*. Paddestoelenstudiegroep van het Natuurhistorisch Genootschap in Limburg.
- Kühner R (1936). Recherches sur le genre *Lepiota*. *Bulletin de la Société Mycologique de France* **52**:175 – 238.
- Kumar TKA, Manimohon P (2020). The genera *Leucoagaricus* and *Leucocoprinus* (*Agaricaceae*, *Basidiomycota*) in Kerala state. India. *Mycotaxon* **108**:385 – 428.
- Kumari B, Atri NS, Upadhyay RC (2012). Three new records of the genus *Leucoagaricus* from North west India. *Botany Research International* **5**(4):71 – 74.
- Lange C (2012). *Leucoagaricus* Locq. ex Singer. In: Knudsen, H. & Vesterholt, J. (Eds.) *Funga Nordica*. Agaricoid, boletoid, clavarioid, cyphelloid and gastroid genera. Nordsvamp, Copenhagen, pp. 637 – 642.
- Locquin M (1945). Notes sur le lépiotes (II). *Bull. Soc. Linn. Lyon* **14**:82 – 110.
- Malysheva EF, Svetasheva TY, Bulakh EM (2013). Fungi of the Russian Far East I. New combination and new species of the genus *Leucoagaricus* (*Agaricaceae*) with red-brown basidiomata. *Mikologiya i Fitopatologiya* **47**:169 – 179.
- Migliozzi V (1991). Liste provisoire des lépiotes observées dans la région italienne du Lazio. *Coordination Mycologique du Midi Toulousain et Pyrénéen* **10**:37 – 44.
- Migliozzi V (2021) *Leucoagaricus lidensis*. *Boll. Gr. Micol. Bresadola* **40-41**:69 – 75.
- Migliozzi V, Alvarado P (2021). Nomenclatural novelties. *Index fungorum* **478**:1.
- Migliozzi V, Martolini A, Donato G (2022). Segnalazione per il territorio italiano di *Leucoagaricus rhodelephantinus*. *Mycological Observations* **3**:8 – 18.
- Migliozzi V, Mohr P (1992). La sezione *Rubrotincti* Singer ss. str. del genere *Leucoagaricus* (Locquin) Singer. *Micologia Italiana* **21**(1):37 – 65.
- 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.
- Partacini G (1995). Due specie rare in trentino. *Leucoagaricus sublittoralis* (Kühn, ex Hora) Sing. e *Echinoderma carinii* (Bres.) Bon. *Rivista di Micologia* **38**(3):278 – 284.
- Pegler DN (1977). A preliminary Agaric Flora of East Africa. *Kew Bulletin Add. Ser.* **6**. London. 615 pp.
- Pilát A (1953). *Hymenomyces* novi vel minus cogniti, Čechoslovakiae, II. *Sb. Nár. Mus. v Praze, Rada B, Prír. Vedy* **9**(2):1 – 109.
- Qasim T, Amir T, Nawaz R, Niazi AR, Khalid AN (2015). *Leucoagaricus lahorensis*, a new species of *L.* sect. *Rubrotincti*: *Mycotaxon* **130**(2):533 – 541.
- Raiithelhuber J (1987). *Flora Mycologica Argentina: Hongos I.* 405 pp.
- Redhead SA (2016). Nomenclatural novelties. *Index Fungorum* **315**:1.
- Reid DA (1967). Coloured Icones of Rare and Interesting Fungi. II (*Supplement to Nova Hedwigia XIII*). (Part 2 of *Fungorum Rariorum Icones Coloratae*). 32 pp. Lehre, Verlag von J. Cramer.
- Reid DA (1972). *Fungorum Rariorum Icones Coloratae*. VI. 59 pp. Lehre, Verlag von J. Cramer.
- Usmam M, Khaid AN (2018). *Leucoagaricus pabbiensis* sp. nov. from Punjab, Pakistan. *Mycotaxon* **133**(2):355 – 364.
- 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* **5**:85 – 108. A.A. Balkema, Lisse.
- Vellinga EC (2003). Phylogeny and taxonomy of lepiotaceous fungi. 259 pp. Thesis; Proefschrift Universiteit Leiden.
- Vellinga EC (2004). Genera in the family *Agaricaceae*: evidence from nrITS and nr LSU sequences. *Mycol. Res.* **108**(4):354 – 377.
- Vellinga EC, Bruns TD, De Kok RPJ (2003). Phylogeny and taxonomy of *Macrolepiota* (*Agaricaceae*). *Mycologia* **95**(3):442 – 456.
- Vellinga EC, Balsley RB (2010). *Leucoagaricus dacrytus* a new species from New Jersey, USA. *Mycotaxon* **113**:73 – 80.
- Wasser SP (1980). *Flora Fungorum RSS Ucrainicae: Agarikovye griby*. 326 pp.
- Wasser SP (1985). *Agarikovye Griby SSSR*. 184 pp.
- White TJ, Bruns T, Lee S, 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.

Winterhoff W, Krieglsteiner J (1984). Gefährdete Pilze in Baden-Württemberg: Rote Liste der gefährdeten Grosspilze in Baden-Württemberg. Beihefte zu den Veröffentlichungen für Naturschutz Landschaft in Baden-Württemberg 40. 120 pp.

The variability of *Leucoagaricus sublittoralis*

Key words:

Agaricomycetidae,
Lepiotaceae, *Leucoagaricus*,
Leucoagaricus sublittoralis,
ITS sequences, taxonomy, Italy

Abstract: Based on some findings made over time in several localities of the Castelli Romani, province of Rome (Italy), the authors illustrate macro and microscopic variability of *Leucoagaricus sublittoralis*, a species not very widespread on the national territory. Relations with other species of subsection *Rubrotincti* are discussed. Phylogenetic analysis based on the nrITS marker allows a comparison with numerous new entities recently described for territories outside the Mediterranean area.

INTRODUCTION

In recent years we have been able to observe in the hilly woods of the Castelli Romani several specimens of *Leucoagaricus sublittoralis*, a species that would seem absent in the lowland woods along the Tyrrhenian coast. These specimens, identical in microscopy characters and confirmed by the phylogenetic analysis, show a so extreme variability to the extent of giving the starting point for the elaboration of these notes; the species, it should be noted, is not particularly frequent in the Italian territory.

MATERIALS AND METHODS

Basidiomes were photographed in habitat by a Nikon Colpix 4500 digital camera. The macroscopic description was obtained by observing fresh specimens while the microscopic analysis was made on both fresh and dried material. In the latter case the material was previously imbibed with distilled water, then stained with Congo red or Melzer's reagent, washed two more times and finally observed. For microscopy observation and imagery an AmScope model T490B trinocular biological microscope supported by an MC500 digital electronic video camera was used. The microscope was equipped with 20x, 40x, 100x apochromatic optics and 10x eyepieces.

All microscopy imagery was produced by V. Migliozi; the bar value in them is 50 µm for the pileipellis, 40 µm for cheilocystidia, 25 µm for the spores.

Measurements, carried out on at least 60 elements for each parameter of each collection, are reported in the two-value form representing the observed range expressed in the "minimum – maximum" formula with exceptional or out of the norm values put in brackets. The dried material is housed in M.V.'s private fungarium.

All DNA was extracted by the Alvalab laboratory of Oviedo (Spain) following 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 sublittoralis (Kühner ex Hora) Singer 1969
Nova Hedwigia **29**(1-2): 163 (1969) [1977]

Basionimo: *Lepiota sublittoralis* Kühner ex Hora, Trans. Brit. Mycol. Soc. 43(2): 450. 1960

= *Lepiota sublittoralis* Kühner 1936 (nomen nudum)
= *Leucocoprinus sublittoralis* (Kühner) Locquin 1960
= *Leucoagaricus sublittoralis* (Kühner) Singer 1945
= *Leucoagaricus sublittoralis* (Kühner ex Hora) Bon et Boiffard 1984
non *Lepiota sublittoralis* sensu D.A. Reid 1967 (= *Leucoagaricus wichanskyi*)

Basionymic holotypus: "Windsor Great Park, 18 Oct. 1957, in Herb. Hora" lost, any more extant (fide Vellinga, 2001).

Neotypus: voucher Peter Mohr 90066 collected by P. Mohr on 24.09.1990 in Berlin-Grünau (legit. et det. P. Mohr), housed at the BHU herbarium (Berrich Botanic und arboretum des Museums für Naturkunde der Humboldt-Universität zu Berlin), designated by Migliozi & Mohr (1992).

Systematics: Kingdom *Fungi* R.T. Moore, Subkingdom *Dicarya* Hibbett, T.Y. James & Vilgalys, Division *Basidiomycota* R.T. Moore, Subdivision *Agaricomycotina* Doweld, Class *Agaricomycetes* Doweld, Subclass *Agaricomycetidae* Parmasto, Order *Agaricales* Underw., Family *Agaricaceae* Chevall., Genus *Leucoagaricus* Locq. ex Singer, Section *Leucoagaricus*.

Original diagnosis

Pileo 35-55 mm lato, sub-globoso, sericeo-levi sed paucis floccis veli universalis obtecto, dilute brunneolo-incarnato, pallidiore ad marginem, denique campanulato-convexo vel convexo-subumbonato et in floccoso-squamis secedente, disco levi; lamellis liberis ab stipite remotis, sub-ventricosis, albidis, acie denique flocculoso; stipite 65-110 x 3,5-5,0 mm ad apicem, sub-clavariforme, 13 mm ad basim, albido, sericeo-levi, farcto; annulo membranaceo albido; sporis in cumulo albis, amigdaliformibus 6,7-7,2 x 3,5-4,5 µ,

destrinoideis; basidiis 4-sporis, clavariiformibus 29 x 8 μ; acie lamellarum pilis obtusis, plus minus ventricosis vel fusiformi bus 9-12 μ latis.: trama lamellarum laxa, ex hyphis intermixtis 20-22 μ latis composita; cute pilei ex hyphis jacentibus 3,5-5,5 μ latis instructa, et pilis elongatis numerosis clavariiformibus 10-19 μ latis ferente; hyphis fibuligeris nullis. Inter foliis mortuis in silvis frondosis. Typus: Windsor Great Park, Berks, 18 Oct. 1957, in Herb. Hora.

Selected iconography:

- Migliozzi & Mohr (1992), Pl. 63-64;
- Partacini (1995).

Selected literature:

- Kühner (1936)
- Migliozzi & Mohr (1992)
- Keldermann (1994)
- Partacini (1995)
- Vellinga (2001)
- Caballero & Pérez-Butròn (2006).

Examined collections (for all legit V. Migliozzi):

- MV 04.0049 (= MV AA 09) del 26.10.2004 realizzata in località Vivaro sud sotto quercia e castagno, GenBank ON459708;
- MV 17.9565 (=MV AA 08) del 21.10.2017 realizzata in località Vivaro, sotto quercia e castagno, GenBank ON479651;
- MV 16.1516 (=MV Leu 003) del 27.09.2016 realizzata in località Cerquone di Rocca di Papa, carpino e castagno, GenBank ON470008;
- MV 15.2403 (= MV Leu 002) del 26.09.2015 realizzata in località Pratonì del Vivaro sotto quercia e carpino, GenBank ON036476;
- MV 15.2524 del 26.09.2015 realizzata in località Corsi di Rocca di Papa, nocciolo e castagno;
- MV 18.2383 del 22.09.2018 realizzata in località Cerquone di Rocca di Papa, sotto carpino;
- MV 18.2504 del 22.09.2018 realizzata in località Cerquone di Rocca di Papa, sotto quercia, nocciolo e carpino.

Macroscopic characters

Pileus: (20) 30 – 60 mm, at first subglobose then convex, finally applanate, sometimes with a low depression in the central zone, with a small umbo; in the central area incarnate-brown, reddish-brown, ochraceous-red or greyish brown, in the median and marginal zone cream coloured, cream-brown, orange-cream, pinkish orange; dry but at center possibly subviscidulous and polished, smooth, at margin becoming radially cracked with modest low squamules similar to granulations and showing white to whitish underlying flesh. Scarce arachnoid, whitish veil remains rarely on the pileus, possibly flocculose at the margin of young specimens.

Lamellae: free, intermixed with lamellulae, at start white then whitish to ivory-white, finally cream coloured; edge moderately floccose, subconcolorous with the sides.

Stipe: 50 – 90 (100) × 4 – 8 (10) mm, easily separable from the pileus, cylindraceous-claviform, base (8) 10 – 12 (15) mm broad, clavate, not marginate, sometimes modestly rooting; whitish, smooth or rarely minutely flocculose, sericeous, polished; annulus always present, simple, membranous, whitish, superior, with a weakly flocculose margin, usually on the upper half of the stipe.

Context: white, unchanging on handling and at contact with aqueous ammonia solution (NH₄OH), odour and smell indistinct.

Caratteri microscopici

Spores: 6.5 – 8.4 (9.0) × 3.8 – 4.6 (4.9) μm, on average 7.2 × 4.2, μm, elliptic to subamygdaliform, very often with a moderately tapering apex, hyaline, dextrinoid, metachromatic in cresyl blue, thick-walled, without germ pore.

Basidia: 24 – 28 × 6 – 8 μm, tetrasporic, claviform.

Cheilocystidia: (25) 30 – 40 (45) × 10 – 12 (14) μm, ventricose to claviform, rarely fusiform, usually incrustated towards apex.

Pleurocystidia: not found.

Pileipilis: a trichoderm with hairs emerging from a gelatinized base made of intertwined hyphae; differentiated terminal elements 60 – 210 (250) × (10) 12 – 20 (25) μm, subfusiform to cylindraceous-claviform, with rounded apex; pigment weakly vacuolar and parietal, rarely also incrustated on preterminal cells.

Giunti a fibbia: absent.

Habitat: in hilly cool woods with oak, hazelnut, hornbeams and chestnut trees; all findings between september and october in the Castelli Romani area; so far never found in the woods of the Lazio coast and in the plain woods of the Roman hinterland.

NOTES

With the numerous collections at our disposal from different woods of the Castelli Romani we can confirm what Migliozzi & Mohr (1992) previously stated. In fact, these findings, despite the variability of some of their characters, proved to be perfectly superimposable with those well described by P. Mohr who had used various continental collections made by himself around Berlin (Berlin Adlershof, Berlin Grünau, Egisdorf, Königs Wusterhausen) by J. Kuthan in Slovakia and by G. Zecchin in Italy [in the surroundings of Maniago (PN)]. These collections have nothing to do with *L. littoralis* (Ménier) Bon & Boiffard which differs significantly in the morphochromatic, environmental and phylogenetic characters.

L. sublittoralis was described by Kühner (1936) with a complete but invalid description as it lacks the Latin diagnosis. Subsequently Hora (1960) filled the gap (see Latin diagnosis above), unfortunately the typus he designated was subsequently lost and is no longer extant. From this moment the story becomes even more incomprehensibly troubled.

In fact Reid (1967) proposes, in Pars II of Colored Illustrations of Rare and Interesting Fungi, a redescription of the species and designates a further neotype whose characteristics unfortunately do not coincide with those indicated by Kühner. In particular, the terminal hairs of the pileipellis 'having a width of 4.75-13 μm ' are in contrast to what was reported by the eminent transalpine mycologist 'poils très allongés.... de 10-19 μ de large'. But that's not all as Reid (1972) redescribes the same species under the name of *L. wychanskyi* Pilát and places it in synonym with *Lepiota sublittoralis* Hora so starting a controversial synonymy that, currently, we can definitively exclude thanks to phylogenetic analysis.

As a result of the above, the species was missing a holotypic material truly representative of the species. Therefore Migliozi & Mohr (1992) proposed a further neotypus for *L. sublittoralis* identifying it in the collection P.M. 90066 made by Mohr on 24.9.1990 in Berlin-Grünau and housed in the BHU herbarium (Bereich Botanik und Arboretum des Museums für Naturkunde der Humboldt-Universität zu Berlin). We ignore the reasons why no mention can be found of this neotypus in the publications of the authors who, in the following years, treated this species. We refer in particular to Bon (1993), Kelderman (1994), Partacini (1995), Vellinga (2001) and Caballero-Pérez Buron (2006).

In all cases, the variability found in some characters of the species such as the pileus colour, spore dimensions and the morphology of the terminal elements of the pileipellis have led various authors to accept the synonymy between *L. sublittoralis* and *L. wychanskyi*, based precisely on Reid's (1967) misinterpretation. Even without the phylogenetic support, morphological differences such as the large velar residues totally absent in *L. sublittoralis* as well as the different structure of the pileipellis, the different morphology of the cheilocystidia and the spore dimensions are evident.

Several other authors followed this synonymy: Babos (1970), Wasser (1980), Ferrari (1982), Moser (1986), Guzmán & Guzmán Dávalos (1992) and Cetto (1993). Conversely, Bon (1993) and Vellinga (2001), aware of the many existing differences, kept the two entities very distinct. Of course, phylogenetic studies conducted on European collections have further supported the distinction between the two entities.

As an example, we report the comparison, well highlighted in the phylogram in Fig. 1, between the voucher AY176442 (*L. sublittoralis*) based on a Dutch collection by E. Vellinga dated 19.IX.1998 made in Bunderbos, Geulle-Elsloo, province of Limburg (NL) and the voucher AF482874 (*L. wychanskyi*) based on a collection (deposited by Vellinga, Bruns, de Kok) by H.A. Huijser dated IX/X.1987, made in Cannerbos, Neercanne, province of Limburg (NL). In this case, the identity percentage is equal to 85.89% and therefore such as to eliminate any reasonable doubt.

Some of our findings, although variable in pileus colour, when submitted to the phylogenetic analysis, proved to be similar to the GenBank voucher AY176442 (Dutch collection by E.C. Vellinga); the table opposite shows the relative high percentages of ITS identity obtained by running a BLAST comparison.

collection	GenBank	identity
MV 04.0049= MV AA09	ON459708	97,69 %
MV 05.2403= MV Leu 002	ON036476	99,00 %
MV 16.1516= MV Leu 003	ON470008	99,00 %
MV 17.9565= MV AA 08	ON479651	98,93 %

The comparative phylogenetic analysis between the four sequences of our collections and those of similar *Leucoagaricus* species currently available in GenBank indicates a sister group condition with one of the many and different Chinese collections of *L. rubrotinctus* (Peck) Singer (the one with GenBank accession number KP300877). This nrITS sequence affinity is in contrast with the morphological characteristics possessed by the species *L. rubrotinctus*, in particular with regard to the pileus colour, the spore morphology and the trichodermal pileipellis with terminal elements of clearly smaller dimension across.

Fig. 1 shows the phylogram with the taxa with which *L. sublittoralis* can have macro and microscopic points of similarity. Without going into the merits of each of the latter and considering as decisive the identity values between the sequences, for all of them equal to or less than 94%, we can exclude for our collections any confusion with European species (*L. lidensis* Migl. & P. Alvarado, *L. purpureorimosus* Bon & Boiffard, *L. purpureoilacinus* Huijsman, *L. vassiljevae* E.F. Malysheva, Svetash. & Bulakh, *L. erminiae* Consiglio, Setti & Vizzini, *L. rubroconfusus* Migl. & Coccia), with American species (*L. rubinctrotus* and *Lepiota rubrotinctoides* Murrill), and with Asian species [*L. truncatus* Z.W. Ge & Zhu L. Yang, *L. asiaticus* Qasim, Nawaz & Khalid, *L. japonicus* (Kawam. Ex Hongo) Hongo, *L. lahorensis* Qasim, T. Amir & Nawaz, *L. subpurpureoilacinus* Z.W. Ge & Zhu L. Yang, *L. rubrobrunneus* E.F. Malysheva, Svetash. & Bulakh, *L. proximus* E.F. Malysheva, Svetash. & Bulakh and *L. lateriopurpureus* (Lj.N. Vassiljeva) E.F. Malysheva, Svetash. & Bulakh]. In all these cases the phylogenetic differences are always accompanied by morphochromatic differences whose enunciation would only represent a useless display and would add nothing to the discussion.

AKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Pablo Alvarado and Pietro Voto for their kind cooperation in various capacities, and Luis Alberto Parra Sanchez for nomenclatural clarifications.