

Article received 1 June 2022, accepted 25 June 2022

***Amanita* section *Vaginatae* in Lazio. First contribution.
Institution of *Amanita griseocaerulea* sp. nov., description of *Amanita fulvoides* and
*Amanita huijsmanii***

(versione italiana a pag. 32)

Vincenzo Migliozi^{1*}, Giuseppe Donato²

¹Viale G. Marconi 196, I-00146 Roma, Italia; vincenzomigliozi@alice.it

²Via Nomentana 861 R, I-00137 Roma, Italia; gdonato01@libero.it

*Corresponding author: vincenzomigliozi@alice.it

Key words:

Basidiomycota

Agaricales

Amanitaceae

ITS sequences

taxonomy

Italy

Abstract: Only recently, thanks to phylogenetic investigations in the ITS region, a complete knowledge of the diversity of *Amanita* sect. *Vaginatae* in Europe has begun to be framed using the results of the morphological, microscopic and molecular study of collections made in the last few years. At the same time a molecular-based revision on available and sequenceable types described in Europe was carried out. In this first contribution the species *Amanita griseocaerulea* sp. nov., *A. fulvoides* and *A. huijsmanii* are described.

INTRODUCTION

The territory of Lazio (Italy) has always been especially rich in entities belonging to the so-called “ringless *Amanita*” which have been known over time as genera *Vaginata* Nees ex Gray, *Amanitopsis* Roze and *Amanitella* Earle. Those taxa are currently included in *Amanita* section *Vaginatae* QuéL.

Over time we have tried several times to assign a scientifically correct name to the numerous collections we quite frequently made in the Mediterranean area in broad-leaved woods and, less often, in conifer woods.

If on one hand few species were determinable already in the field, such as *A. crocea* (QuéL.) Singer, *A. fulva* Fr., *A. mairei* Foley, *A. dryophila* Consiglio & Contu and *A. ceciliae* (Berk. & Broome) Bas, on the other hand we sometimes found ourselves before specimens possessing an ambiguous monotony in their macro and microscopic characters. For several specimens it was not possible to distinguish if we were facing an exacerbated chromatic variability of one entity or different species extremely related to each other and therefore indistinguishable in the field. We also found ourselves in the presence of species described in recent decades and still unprovided with an adequate iconographic support for documenting their variability.

In this situation, the studies by the transalpine Hanss & Moreau (2020) and Russian Malysheva & Kovalenko (2015) authors proved particularly useful; these authors have had the enormous merit of having carried out phylogenetic studies quite similar to those proposed by non-European authors (Tang et al. 2015; Cui et al. 2018; Thongbai et al. 2018).

What is and will be reported in these papers dedicated to the study of section *Vaginatae* simply wants to constitute a modest contribution of experiences based on numerous findings made in a broadleaves xerophilous habitat in a strictly Mediterranean area during our mycological forays in search of lepiotoid mushrooms.

Some other collections of ours, used for comparison, come from the Umbrian hills of Valnerina. The Lazio localities we frequented led us to herborize in plain broad-leaved woods of the Tyrrhenian coast dominated by the presence of *Quercus ilex*, *Quercus suber*, *Quercus cerris* with *Arbutus unedo*, *Pistacia lentiscus*, *Myrtus communis*, *Calluna vulgaris*, several species of *Cistus* and other plants typical of the Mediterranean shrub.

We premise that not all of our collections were sequenced, however for those that were sequenced, inclusive of the newly described taxa, we report their Genbank accession numbers; we also report the fungarium where the types and the most interesting collections were deposited.

Two brief notes are necessary regarding the phylogenetic analysis we used in a massive way to confirm the determinations. The results of the phylogenetic analysis of our collections and of some other similar ones we

took into consideration confirmed what Hanss & Moreau (2020), and before them Malysheva & Kovalenko (2015), found. The above led us to consider the importance of the obviously inseparable set represented by the macroscopic, microscopic and phylogenetic characters for each species or grouping of species.

In fact, as validly evinced by the transalpine authors in the revision of a morphological group of silver-gray cap species of section *Vaginatae*, there is not always phylogenetic homogeneity as some entities, previously considered close to each other according to an outdated systematic methodology based on some morphological parameters, are currently divided into different phylogenetic clades based on the genetic marker ITS. Consequently, this led the aforementioned authors to search for a new set of morphological characters with a higher systematic value that could be combined with the phylogenetic evidence of the ITS gene; they identified them in the structure of the volva, the texture of the lamellae and the morphology of the subhymenium.

Given that at present we are not able to know which cladistic structure, possibly different, could be produced by different DNA regions not yet examined, we can note that the nrITS marker has proved highly informative both for the distinction of the species and for the delimitation of robust clades.

That said, the analysis of our phylograms will allow to observe moderately robust clades containing one or more stirps.

In the phylogram of this first contribution, which coincides with clades 2 and 3 of Hanss & Moreau (2020), the stirps *Argentea* is inserted, among others, which contains the species *A. huijsmanii* F. Massart & Rouzeau, *A. electra* Hanss and *A. argentea* Huijsman sensu lato.

A robust clade corresponding to clade 3 (stirps *Fulva*) by Hanss & Moreau (2020) includes the European species *A. umbrinolutea* (Secr. Ex Gillet) Bataille and *A. fulvoides* Neville & Poumarat, together with some non-European species such as *A. nishidae* Tulloss nom. prov., *A. sarahae* Tulloss & S. D. Russell nom. prov., *A. jakeslandingensis* Tulloss nom. prov., which we did not include in the cladogram.

In our humble opinion, the new entity described in this contribution based on two collections, *A. griseocaerulea*, would seem to belong to the latter clade but we prudently believe that this will have to be confirmed in the future to be definitively accepted.

MATERIALS AND METHODS

Morphology

Basidiomes were photographed in habitat by a Nikon Colpix 4500 digital camera. For each described entity the finding site and date, and the type of habitat are indicated. The macroscopic description was made by observing fresh specimens. In the microscopy analysis, carried on both fresh and dried specimens previously rehydrated in water, the material was treated with Congo Red or Melzer's reagent, washed and then observed after staining again with Melzer's reagent or Congo red.

Microscopy imagery was produced by V. Migliozi using an AmScope model T490B trinocular biological microscope equipped with 20x, 40x, 100x apochromatic optics and 10x eyepieces and supported by an MC500 digital electronic video camera. The bar value in microscopy images is 50 µm for the general veil and the marginal cells, and 25 µm for the spores.

The measurements of microscopical data, carried out on at least 50 elements for each type and each collection, are reported in the two-value form where the observed range is expressed in the "minimum – maximum" formula with exceptional or out of the norm values put in brackets.

The dried material is housed in VER and in M.V.'s private fungarium.

For the spore morphology description the indications contained in Bas (1969: 321) and adopted by Neville & Poumarat (2009: 5) were used which are based on the Q ratio (length / width) of the spore dimensions:

Q = 1,00 – 1.05, globose spores;

Q = 1.05 – 1.15, subglobose spores;

Q = 1.15 – 1.30, broadly ellipsoid spores;

Q = 1.30 – 1.60, ellipsoid spores.

As regards the shape of the volva we refer to the types indicated by Bas (1997: 83) and adopted by Hanss & Moreau (2020: 70). The six types, precisely illustrated by Fraiture (1993: 19-17), can be summarized as follows:

Type 1a and 1b:

general veil friable to brittle, with a powdery consistency, with numerous remnants on the pileus and at the stipe base which can form very little membranous flaps.

Type 2a and 2b:

a more or less membranous veil tightly attached to the stipe in the lower portion and flared and well detached from the stipe in the upper portion.

Type 3:

a membranous, typically vaginated volva, not or moderately dilated-detached from the stipe; only exceptionally also with remnants on the pileus.

Type 4:

a membranous and (very) thick sack-like volva, distinctly dilated-detached from the stipe; without remnants on the pileus.

Phylogeny

Total DNA of our collections was extracted by the Alvalab laboratory of Oviedo (Spain) following the standardized method described in Murray & Thompson (1980).

For amplification by PCR (Mullis et al. 1987) primers ITS 1F and ITS4 were used for the ITS r-DNA region (Gardes & Bruns, 1993; White et al., 1990).

PCR products were highlighted and controlled by electrophoresis in 1% agarose gel. Finally, the chromatograms were checked and read errors were corrected.

Phylogenetic analysis was conducted on the ITS marker of rRNA. The data set includes 29 taxa (Table 3) of which one, *A. pantherina*, chosen as outgroup. The sequences were obtained from the public databases GenBank (Sayers et al., 2020), UNITE (Nilsson et al., 2019) and BoldSystem (Ratnasingham & Herbert, 2007).

The sequence dataset was assembled in Mega X (Tamura et al., 2021) and aligned, using the same software, using the MUSCLE algorithm (Edgar, 2004b, 2004b) leaving the default settings unchanged. The training was finally edited manually.

Alignment optimization for phylogenetic analysis was accomplished through Mesquite (Maddison & Maddison, 2021). Phylogenetic analyses were conducted on ITS markers according to the methods of maximum likelihood (ML) and bayesian posterior inference (BI).

For the ML analysis was used RAXML GUI 2.0 (Edler et al., 2020) with ML+rapid bootstrap search algorithm, 1000 bootstrap replicas (Felsenstein, 1985) and GTR+GAMMA model was used.

The BI analysis was conducted through MrBayes 3.2.7 (Ronquist et al., 2012) with GTR+GAMMA evolutionary model, two separate analyses of four Markov-Chain of Monte-Carlo for 10,000,000 generations, with one sampling per 1000 generations and the elimination of 25% of the sampled trees.

The final typologies obtained with the two methods of analysis were essentially overlapping, so it was decided to represent only the tree based on ML. The significance threshold was set above 95% for BI and 70% for ML.

The phylogram produced here will be taken up and integrated with the other species treated in the next contributions.

TAXONOMY

***Amanita griseocaerulea* Migl. & Donato, sp. nov. [MB845027]**

Etymology: the name refers to the grey and light blue colour of the pileus.

ORIGINAL DIAGNOSIS



Amanita griseocaerulea. V.M. 21.5369. Typus



Amanita griseocaerulea. V.M. 21.5369. Typus



Amanita griseocaerulea. V.M. 20.86431. Paratypus

Typus: Italy, Lazio region, Rome province, Pomezia municipality, Parco Regionale dei Castelli Romani, Riserva Naturale della Sughereta di Pomezia, 24.11.2021, V. Migliozi M.V. 21.5369, VER fu17, GenBank ITS: ON818545.

Paratypus: at same location, 31.10.2020, V. Migliozi M.V. 20.86431, VER fu18, GenBank ITS: ON994667.

Pileus 40 – 100 mm broad, at start campanulate, then convex, finally applanate, with a low umbo, mainly of a grey - light blue colour with greyish shades at centre, margin sulcate for 10 – 18 mm. Veil remnants absent on pileus. Lamellae at start whitish, then weakly greyish and locally brownish. Stipe 60 – 140 × 6 – 12 (14) mm, tapering upwards, at start whitish, then suffused with light blue, light blue - grey, finally partly covered with greyish fibrils; annulus absent. Upper portion of volva detached from the stipe, lower portion of volva strictly adhering to the stipe. Context white then whitish finally slightly turning grey.

Spores (9.5) 10.0 – 11.5 (12.2) × 10.0 – 10.8 μm, globose to subglobose, smooth, hyaline. Basidia 50 – 70 × 12 – 16 μm, 4-spored, sterigmata up to 7 μm long, clampless. Oil hyphae present in subhymenium. Marginal cells claviform to pyriform, scattered. Pileipellis made of an ixocutis in the upper layer, with presence of oil hyphae. Veil texture mixed, mainly filamentous in the inner portion, mainly spherocytic in the outer portion.

Habitat: gregarious under *Quercus* sp., *Quercus suber* and *Quercus ilex*.

The phylogenetic analysis demonstrated that the ITS sequence is not similar to any other present in the dedicated databases. Macroscopically it could be confused with *A. vladimirii* but this entity, together with other species of section *Vaginatae*, has a decidedly low molecular identity percentage.

Macroscopic characters

Pileus: 40 – 100 (120) mm broad, at start campanulate, then convex-campanulate, finally applanate, with a low umbo. Predominantly grey - light blue coloured, more distinctly greyish at center, more light blue in the median zone, pale grey-cream coloured at the margin. Cuticle sulcate for 10 – 18 mm of radius at margin, smooth elsewhere. In the collection M.V. 20.86431 the colour is uniformly tending to grey which is most likely due to the maturity of the specimens. No veil remains are present on the pileus in all specimens observed.

Lamellae: crowded, with numerous lamellulae, at start whitish, then greyish and brownish on some specimens.

Stipe: 60 – 140 × 6 – 12 (14) mm, progressively tapering upwards. At start whitish, then rapidly suffused with light blue, light blue - grey, finally in mature specimens covered with greyish fibrils in the median and basal portion; annulus absent.

Volva: of type 2b following Fraiture's (1993) cataloging, with the upper portion distant from the stipe and the lower portion adherent to the stipe. As observed in collection M.V. 20.86431 the texture is extremely fragile and tending to fracture on picking up the carpophores, leaving exclusively the lower portion adhering to the stipe. The colour, white at start, tends to brown on both the outer and inner surface. In dried material a distinct two-layered structure is visible.

Context: white, then whitish, finally turning locally and slightly grey, without any distinct odour and taste.

Microscopic characters

Spores: (9.5) 10.0 – 11.5 (12.2) × 10.0 – 10.8 μm, globose to subglobose, smooth, hyaline, Q = 1.00 – 1.08, apiculus not much developed.

Basidia: 50 – 70 × 12 – 16 μm, 4-spored, with sterigmata up to 7 μm long, clampless.

Subhymenium: of a branching type, with narrow underlying cells and numerous, 5 – 8 (14) μm broad oil hyphae.

Marginal cells: up to 50 × 40 μm, claviform to pyriform, scattered.

Pileipellis: an ixocutis in the upper portion made of cylindrical hyphae of modest diametric dimensions emerging from a lower layer made of broader (4 – 6 μm) cylindrical hyphae. Oil hyphae present.

Veil texture: slightly different between outer and inner surface but in both cases of a mixed type with a different ratio: the inner layer prevalingly filamentous with rare spherocytic to cylindraceous elements, the outer layer mainly with spherocytes some of which up to 70 × 50 μm large. Oil hyphae scattered.

Clamp connections: not observed except very rarely and exclusively in the veil texture.

Habitat: the two studied collections were found, at a distance of one year, in the Sughereta [*'cork oak wood'*] of Pomezia (RM), under *Quercus* sp., *Quercus suber* and *Quercus ilex*. In both occasions the collections consisted of several specimens. In the first collection (M.V. 20.86431, paratype) the specimens were in an advanced state of maturation and we had difficulty in extracting them intact from the ground. The second collection (M.V. 21.5369, type) consisted of primordia, young specimens and well-developed specimens. As both collections were found in the same identical spot it is reasonably conceivable that they may belong to the same mycelium.

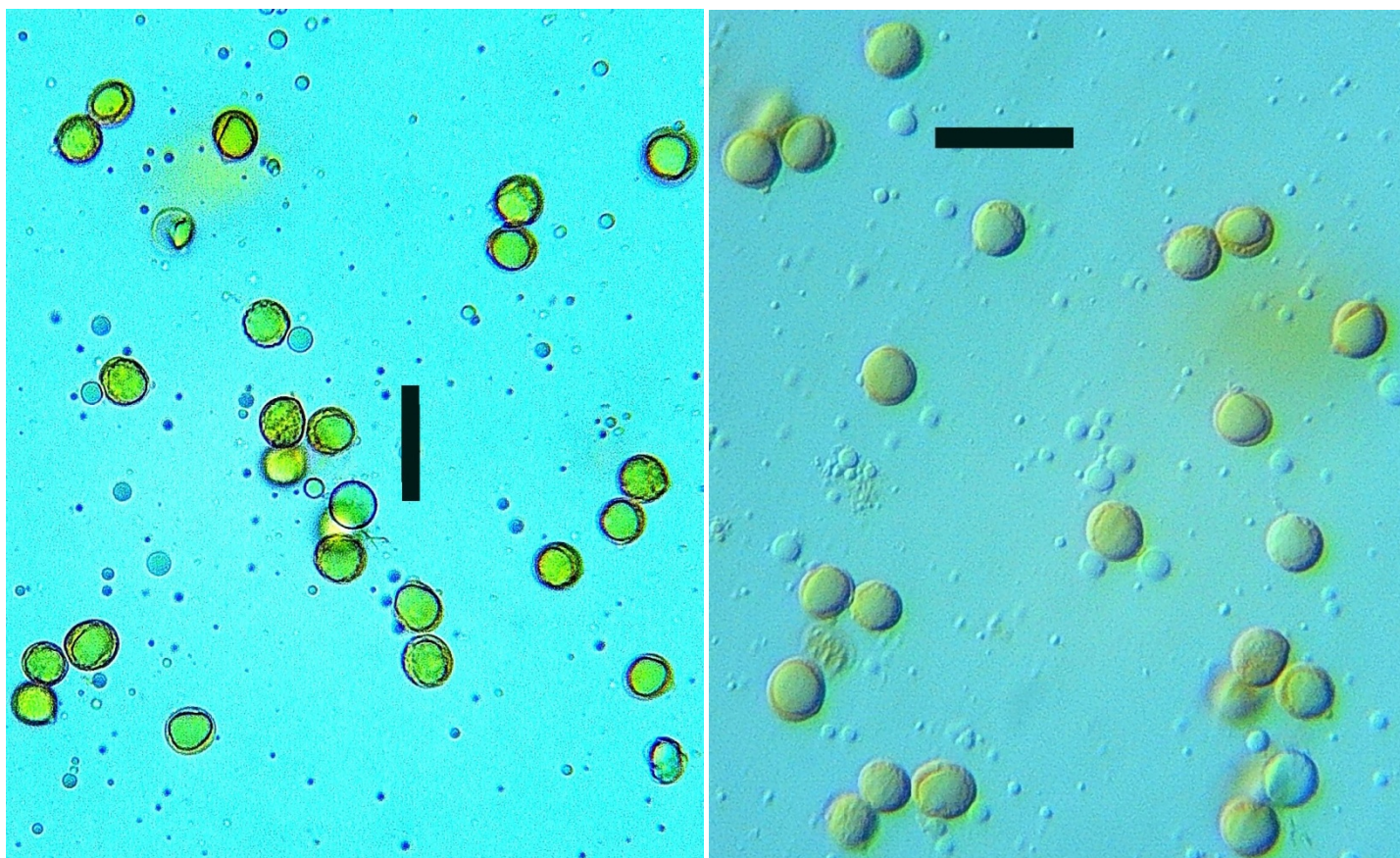
NOTES

We admit we could not conceive any determination hypothesis at the moment of the first collection (M.V. 20.86431), in part conditioned by the advance state of maturation of the specimens and by the careless way we had picked them up.

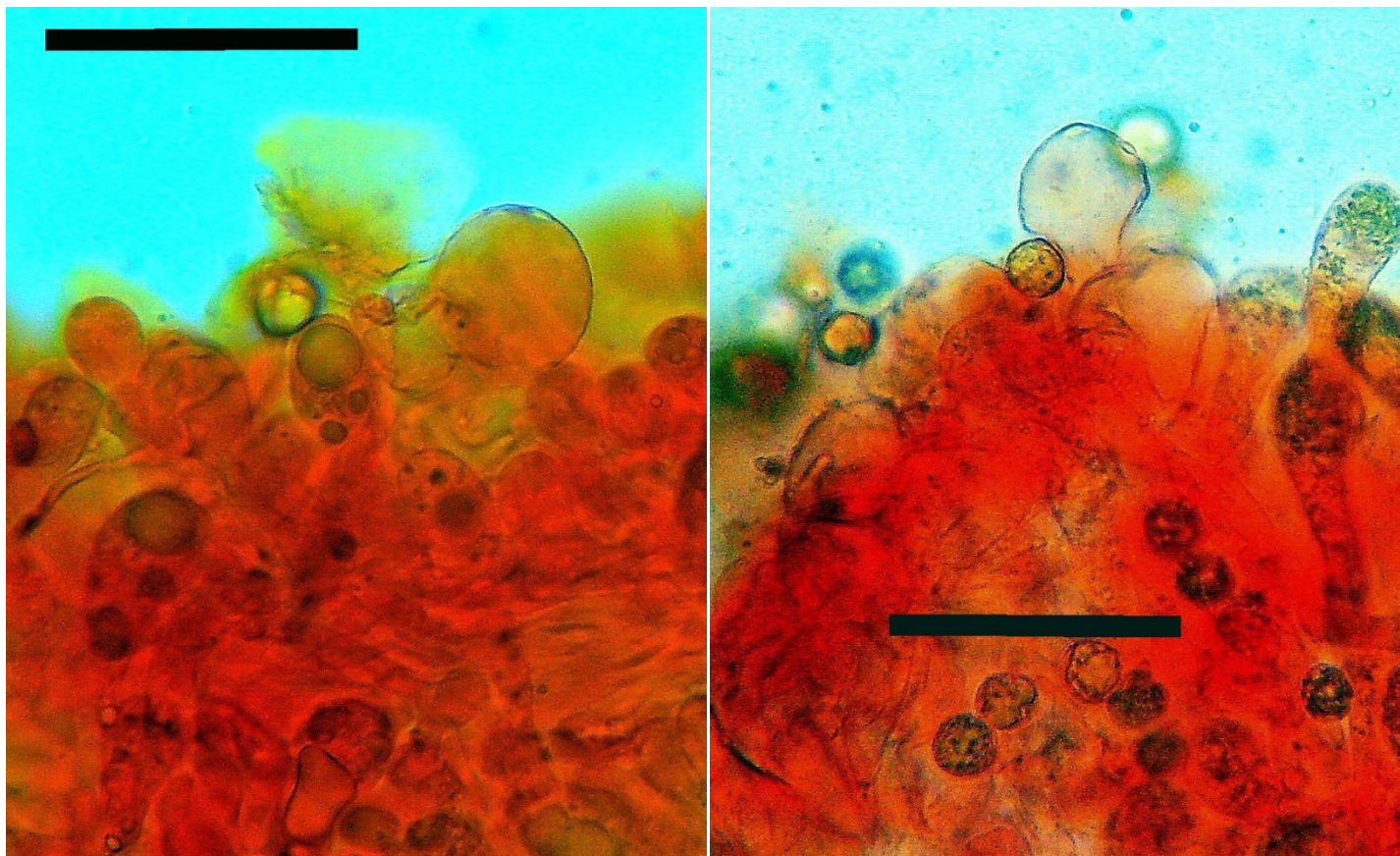
The specimens of the first collection emerged to be completely superimposable with those of the second only as a result of microscope observations first and, successively, of the comparison of their phylogenetic sequences which proved to have an extremely high identity of 99.72%.

The second collection had let us to speculate in the field that it could be *A. vladimirii* Ševčíková, Hanss & P.-A. Moreau (Ševčíková, Hanss & Moreau 2021) because of the light blue - grey shades of the pileus and stipe.

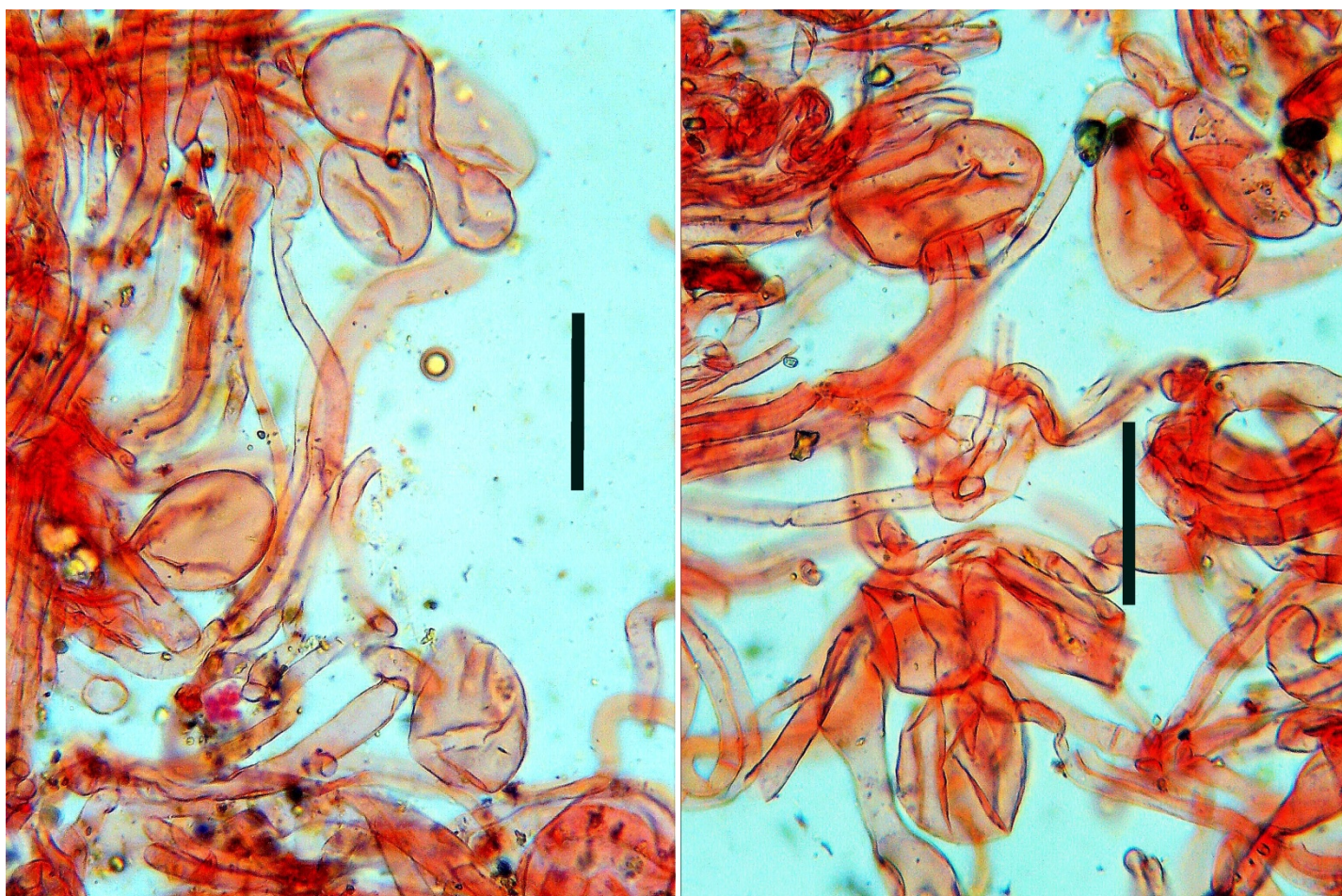
On the other hand, we were aware that the habitat, belonging to the *Abieto-Fagetum* vegetational association under *Fagus*, *Abies* and *Picea* in a continental environment in the Czech Republic, was very different from that present in the Sughereta di Pomezia of the typical Mediterranean area.



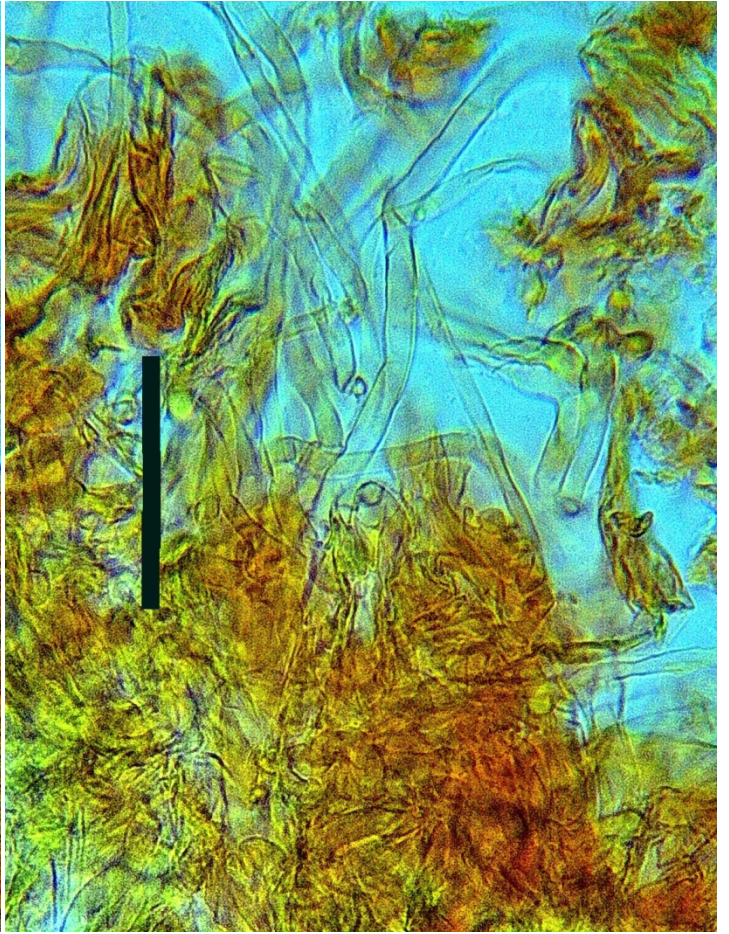
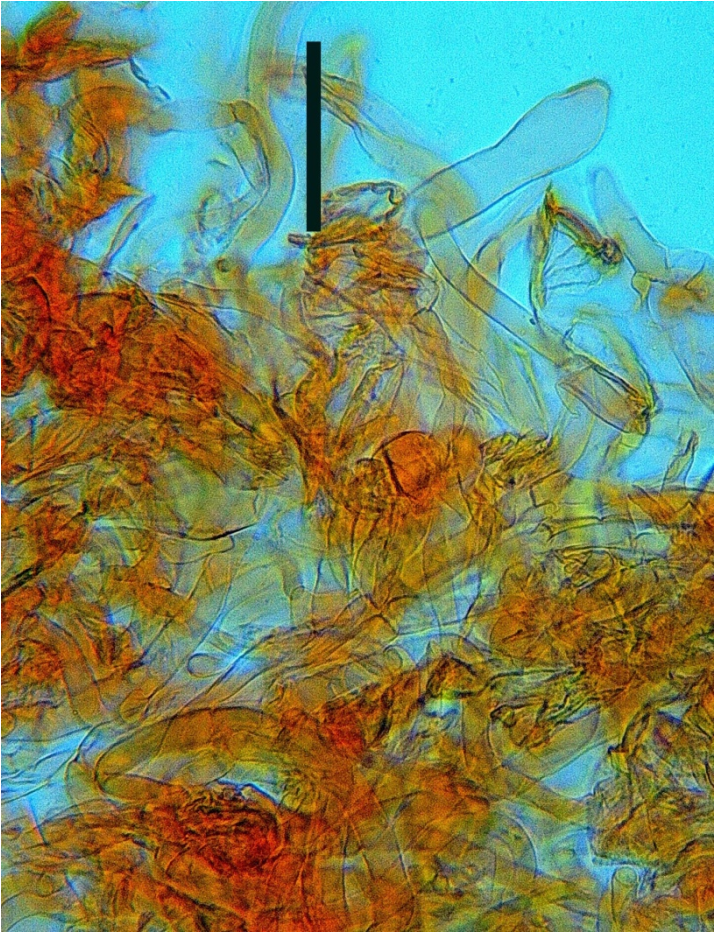
Spores / spore



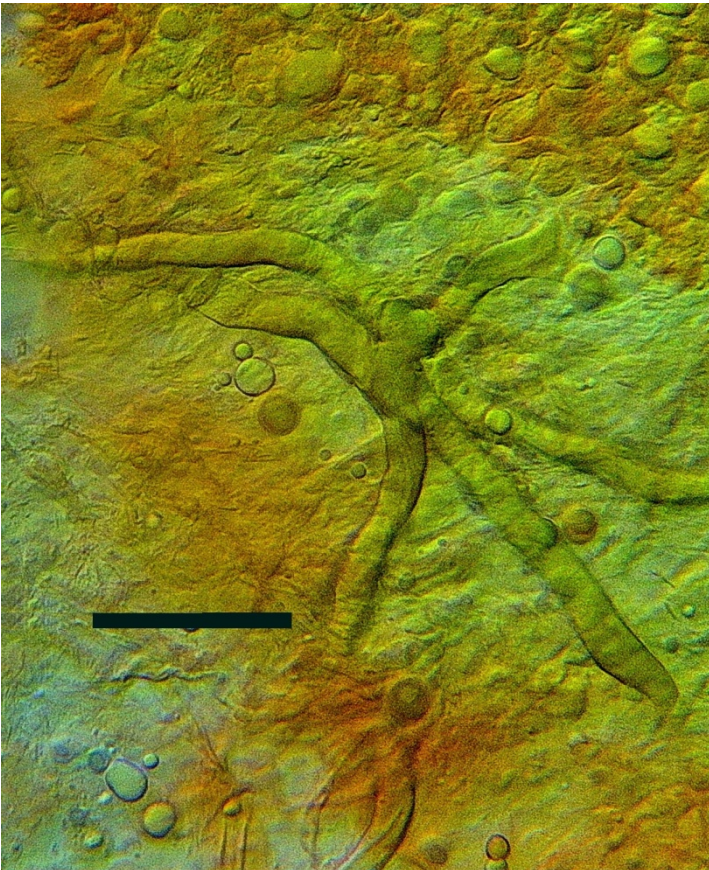
Marginal cells / cellule marginali



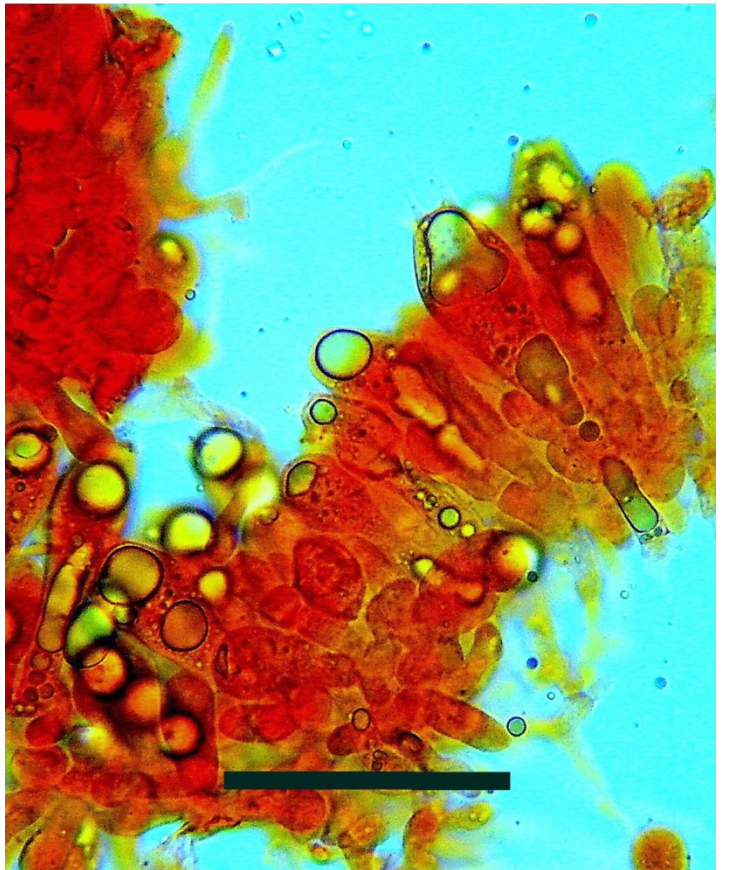
Outer layer of veil texture / Strato esterno della textura del velo



Inner layer of veil texture / Strato interno della textura del velo



Oil hyphae / Ife oleifere



Hymenium / Imenio

Other differences between *A. griseocaerulea* and *A. wladimirii* are due to micro anatomical characters and, over all, to the phylogenetic sequences. While *A. wladimirii* is placed by its authors in clade 6, our new species could be placed, in our humble opinion, in clade 3 beside *A. fulvoides*, *A. vaginata* (Bull.) Lam. and some other North American *Amanita* such as *A. cyclops* Tulloss, Kudzma & Wasilewski nom. prov. (voucher RET 706-8, USA, GB MG252695), *A. vaginata* (voucher JMP0004, USA, GB EU819489) and *A. salmonriverensis* Tulloss & Kudzma nom. prov. (voucher RET 715-6, USA, GB MK569747).

In order to avoid misunderstandings, we specify that the best identity percentage obtained blasting our sequence with some *Amanita* of stirps *Lividopallescens* is very low, less than 90%. In fact we obtained 86.06% with *A. lividopallescens* (Gillet) Bigeard & H. Guill. (KX834242), 89.31% with *A. helianthemicola* Zotti, Vizzini & M. Traverso (KX834259), and 89.47% with *A. simulans* Contu (KX834260).

These low identity percentages between our collections and any other entity freed us from any reason for perplexity and gave us the certainty that they must be a species not yet described to science or, at least, not yet sequenced or present in GenBank.

In Table 1 below we report, independently from the clade they belong, some species whose morphological characters aroused our interest. We only report those entities with identity percentage equal to or greater than 90%.

Species / specie	GenBank Nr.	Id. %
<i>A. ochraceomaculata</i>	MN490673	90.72
<i>A. ochraceopallida</i>	MT490660	91.47
<i>A. subnigra</i>	KX270326	91.76
<i>A. subnigra</i>	MT073017	92.04
<i>A. vaginata</i> (USA)	EU819489	92.60
<i>A. lindgreniana</i>	KY817312	90.49
<i>A. aff. brunneofuliginea</i>	MH508250	92.25
<i>A. aff. brunneofuliginea</i>	MH508268	92.44
<i>A. cyclops</i>	MG252695	91.72
<i>A. umbrinolutea</i>	MN490658	91.65
<i>A. griseoumbonata</i>	NR_159579	90.74
<i>A. griseoargentata</i>	MN490661	91.11
<i>A. salmonriverensis</i>	MK569747	94.77

Table 1

Basidium / Basidio



***Amanita fulvoides* Neville & Poumarat**

Fungi Europaei 9. *Fungi non delineati, raro vel haud perspecte et explorata descripti aut definite picti* 51-52: 44, f. 10-11 (2009).

- = *Amanita vaginata* f. *avellanea* M. Traverso (1999: 46)
- = *Amanita avellanea* (M. Traverso) Neville & Poumarat (2009: 77)
- = *Amanita vaginata* var. *badia* sensu Traverso (1999: 48)
- = *Amanita badia* sensu Consiglio (2000: 215)

Macroscopic characters

Pileus: 30 – 60 mm broad, at start paraboloid, then campanulate-convex, with a more or less distinct umbo rarely evident in primordia. Margin distinctly striate for 10 – 15 mm. Colour variable from brown to hazel-brown or grey-brown up to deep hazel-brown. Normally without remains of the general veil.





Lamellae: free, white to cream-white, intermixed with lamellulae.

Stipe: 60 – 80 × 8 – 14 mm, slender, cylindric, progressively widening towards the base, at start white, whitish, then subconcolorous with the pileus with a cream - hazel-brown tone. Glabrous and rarely with cream-brown ornamentation. Annulus absent.

Volva: of a membranous type but fragile and little consistent, of the type 3 according to Bas's (1997) classification, strictly adherent to the stipe exclusively in the basal part. Whitish with numerous cream-orange spots.

Context: whitish, without any distinct odour and taste.

Microscopic characters

Spores: 9.0 – 12.0 (12.8) μm in diameter, Q = 1.00 – 1.06, globose to subglobose, apiculus well evident, smooth, hyaline.

Basidia: 45 – 75 × 12 – 18 μm , with sterigmata up to 8 μm long, 4-spored, clampless.

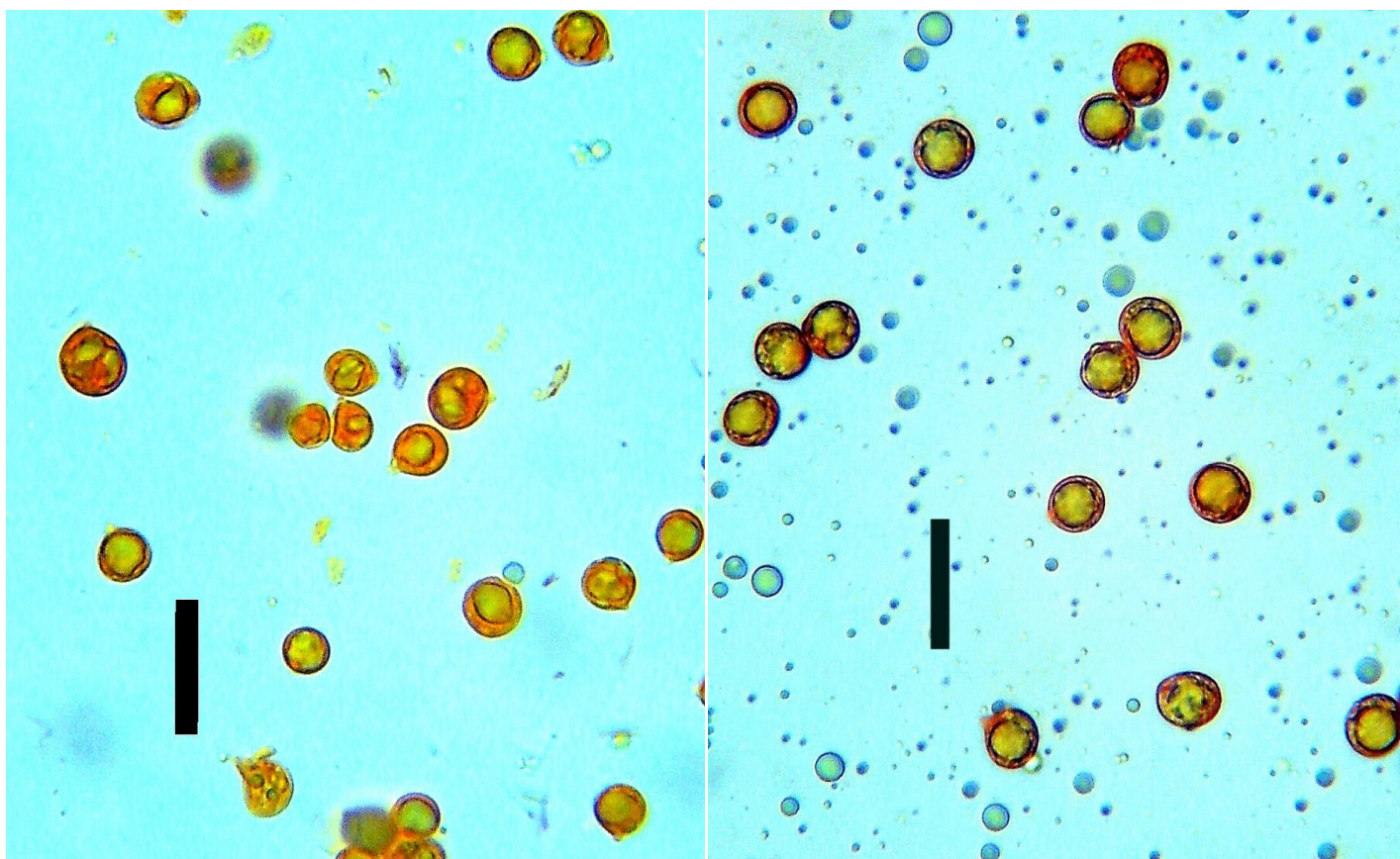
Subhymenium: made of cellular to subglobose or broadly elongate elements. Several oil hyphae present and easily visible.

Marginal cells: 25 – 50 × 25 – 40 μm , extremely numerous in a continuous layer, spherocytic, pyriform, claviform or ellipsoid.

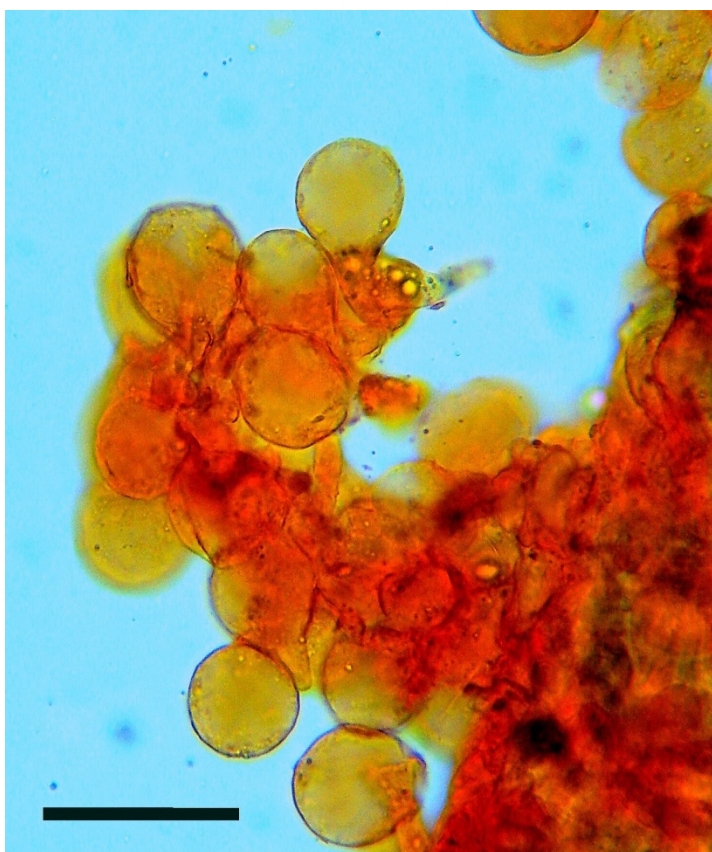
Pileipellis: made of an ixocutis in the upper portion with narrow (up to 4 μm) cylindric hyphae and of an underlying layer constituted by weaved cylindric hyphae.

Veil texture: mixed, of a moderately filamentous type mixed with numerous and evident spherocytes (up to 70 × 60 μm) and some cylindraceous elements (up to 90 × 30 μm). Oil hyphae present.

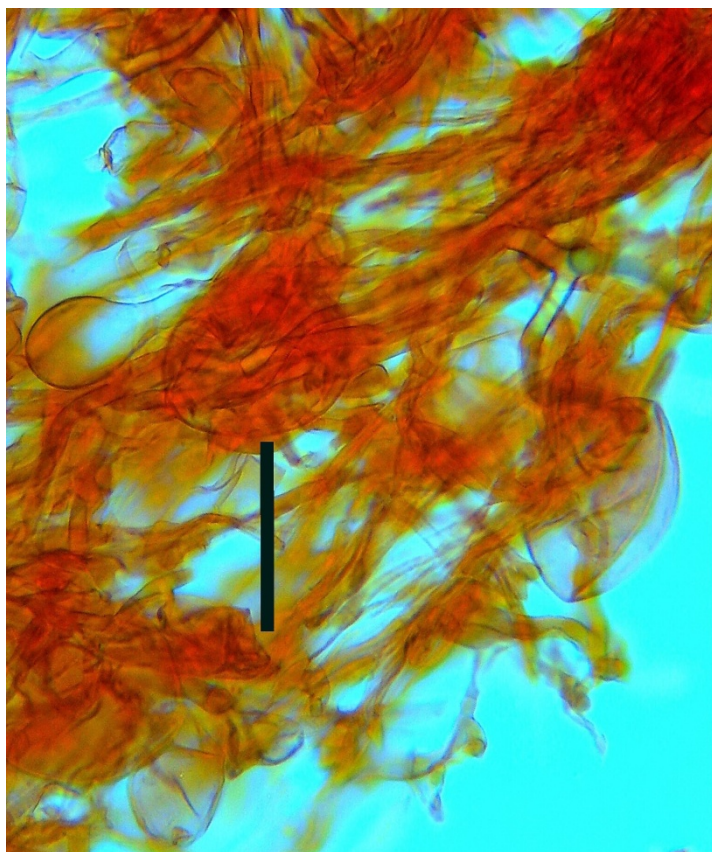
Habitat: often found under *Quercus ilex*, *Quercus suber* and other plants of the Mediterranean shrub in the Sughereta di Pomezia in the months of November and December. It is frequent in this location. The collection M.V. 20.9291 (GB ON922886) was made on 11.11.2020 and was observed several times in the following weeks. The species was found again also on 24.11.2021 (collection M.V. 21.5431, GB ON922887) in a similar habitat. Further collections were only photographed, not herborized.



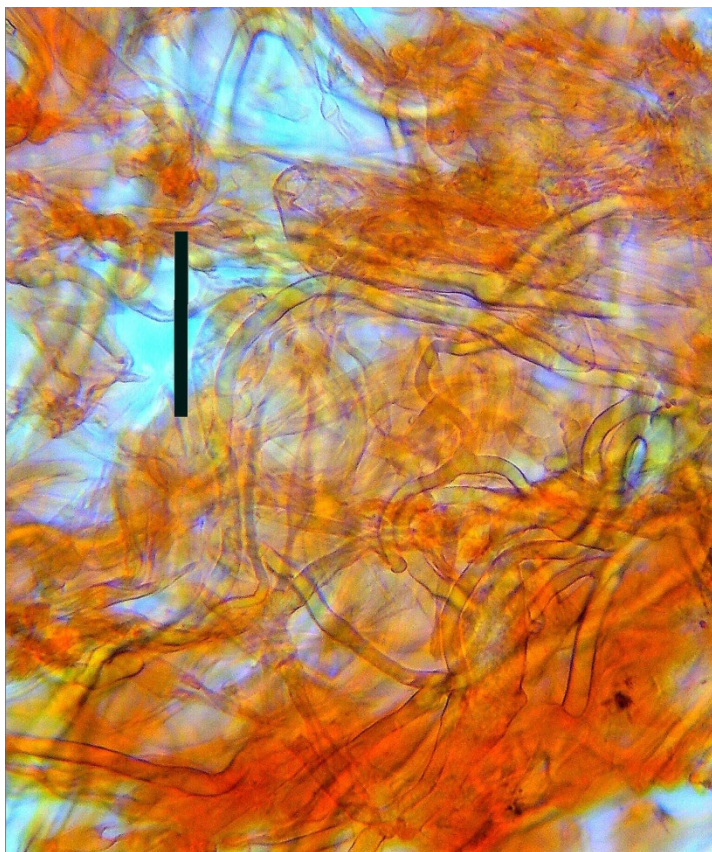
Spores / spore



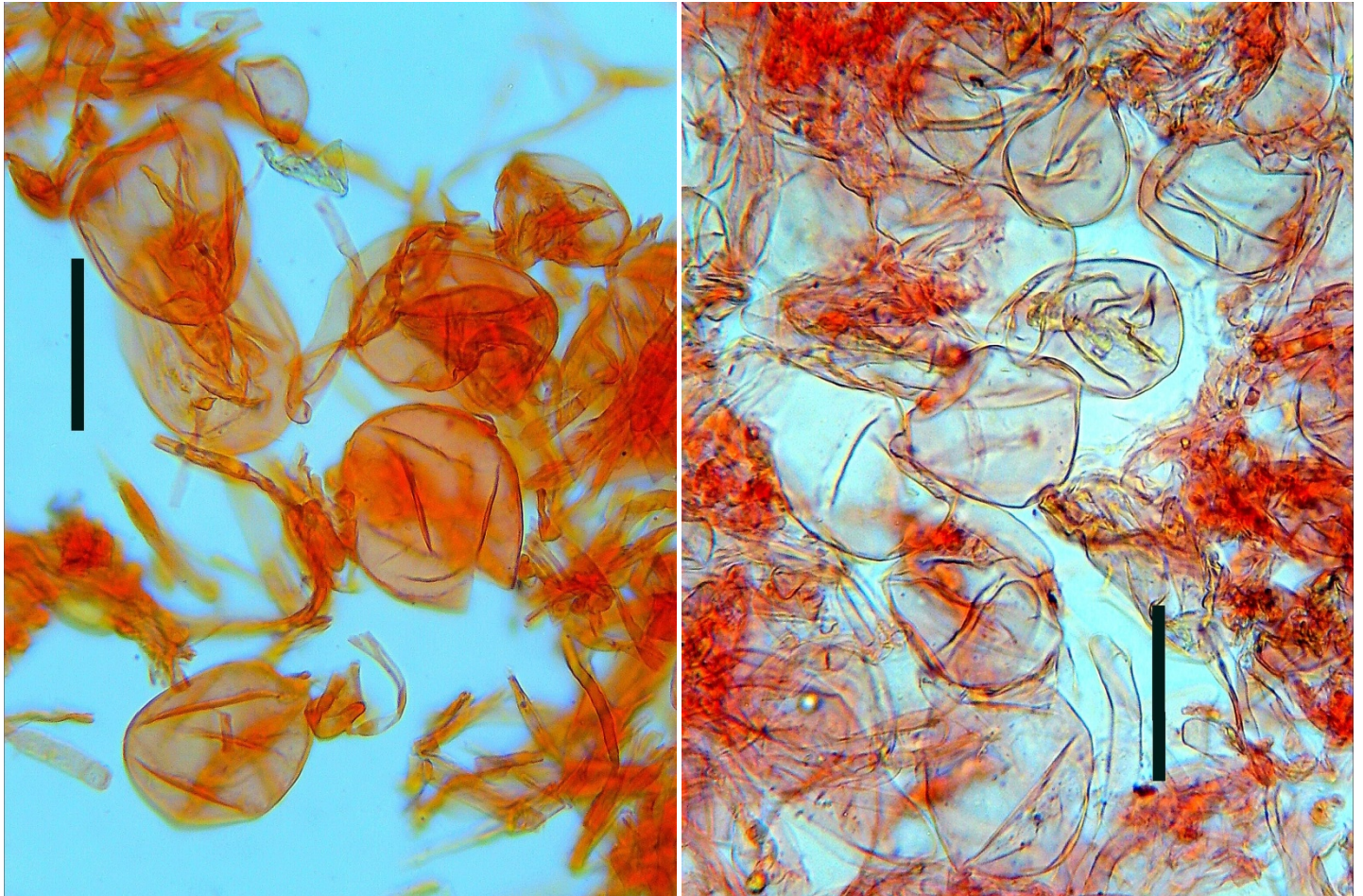
Marginal cells / cellule marginali



Outer layer of veil texture / Strato esterno della
textura del velo



Oil hyphae / Ife oleifere



Inner layer of veil texture / Strato interno della textura del velo

NOTES

The specimens we observed match perfectly with the description and protolog by Neville & Poumarat

(2009) and with the description and illustration by Eyssartier & Roux (2011). From a phylogenetic point of view the conspecificity with other collections of this species is evinced by the consensus phylogram in figure 1 in which a comparison can be made between our two collections (MV 20.9291 e MV 21.5431) and the sequences indicated by Hanss & Moreau (2020) such as MN490672, MN490680, MN490674 and MT980918.

Table 2 below clearly shows that our collections correspond in an extraordinarily univocal way to *A. fulvoides*.



Hymenium / Imenio

Voucher	VM20.9291	VM21.5431	MN490672	MN490680	MN490676	MN490674	MT980918
MV20.9291	=	99.80	99.75	99.83	99.82	99.81	99.19
MV21.5431	99.80	=	99.75	99.45	99.73	99.80	99.80
MN490672	100.00	99.75	=	99.83	99.82	99.81	99.34
MN490680	99.83	99.45	99.83	=	99.63	99.65	99.12
MN490676	99.82	99.73	99.82	99.63	=	99.81	99.45
MN490674	99.81	99.72	99.81	99.63	99.81	=	99.07
MT980918	99.19	99.80	99.19	99.12	99.45	99.07	=

Table 2

It is to be noted that the sequence MN490674, registered in GenBank by Hanss & Moreau (2020) as *A. fulvoides*, corresponds to the holotype of *A. vaginata* var. *avellanea* M. Traverso (Hanss & Moreau, 2020: 135) which was combined to *A. avellanea* (M. Traverso) Neville & Poumarat in the same paper where *A. fulvoides* was described; as the two names were successively reduced to synonymy by Hanss & Moreau (2020) the doubt arises as to whether the epithet to be used is *A. fulvoides* or *A. avellanea*.

***Amanita huijsmanii* F. Massart & Rouzeau [as '*huijsmanii*'].**

Bull. Soc. linn. Bordeaux 17(3): 159 (1990 '1989').



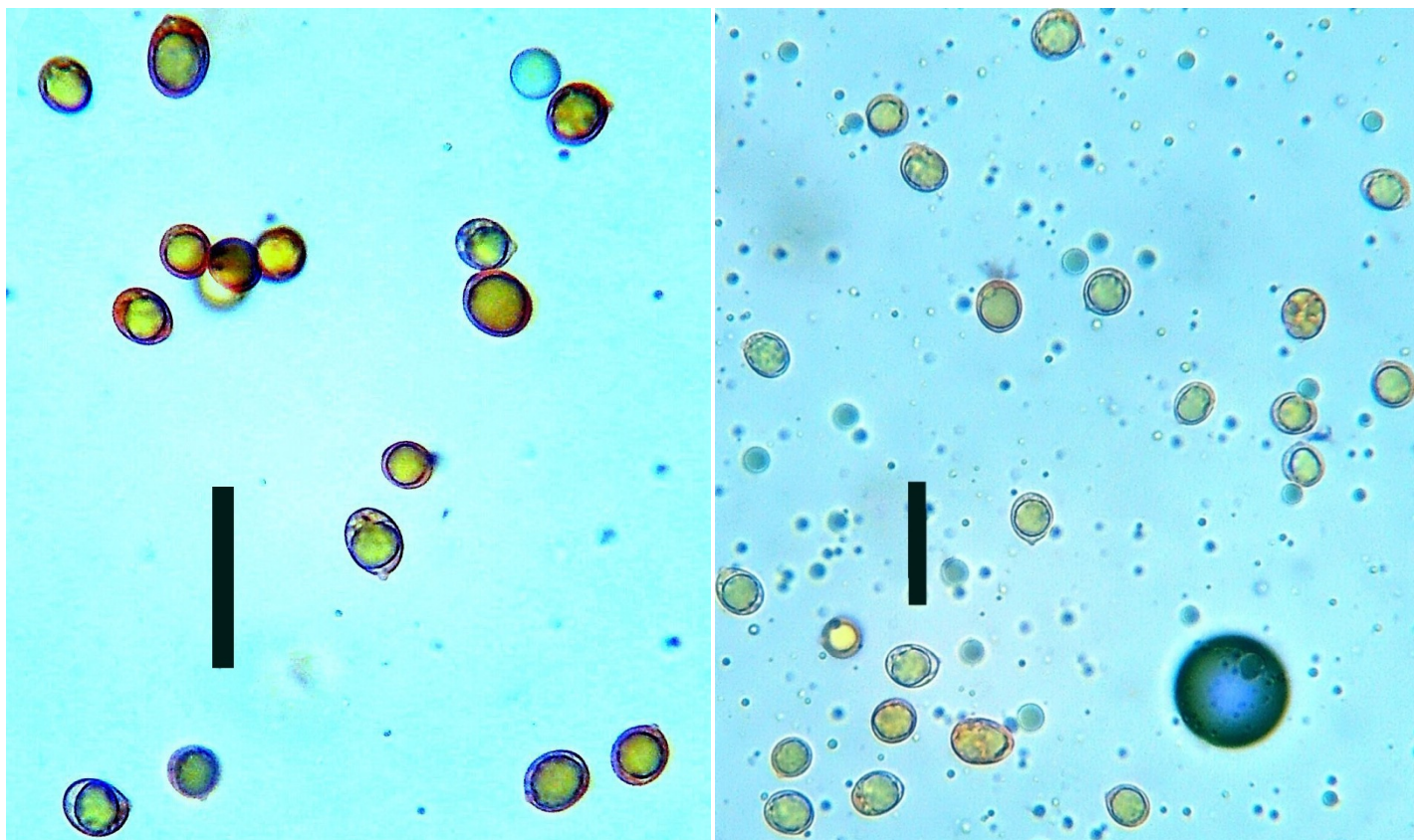
Due to the inadequacy of our material, consisting of one collection with a single specimen, we present this taxon only with images of the carpophore and the main micro characters.

The description, though in a photographic form only, of this species is meant to represent a sign of gratitude from Vincenzo Migliozi towards his late friend Francis Massart who gratified him with his not only mycological friendship. The only specimen of this entity so far found in the Sughereta di Pomezia, on 24.11.2021 (M.V. 21.5404, GB ON922912), features a large size, with the pileus 10 cm broad, and an nrITS sequence identical to that found by Hanss & Moreau (2020) for the voucher "89A1" indicated as holotype by Massart & Rouzeau (1989) in the original diagnosis. The identity percentage of our collection with respect to the holotype (MN490694) came out to be 99.08, while with respect to the other sequences obtained by Hanss & Moreau (2020) (MN490689, MN490683, MN490687 e MN490666) it turned out to be between 97.08 and 98.40. We have only a minimum of doubt regarding a French collection, GenBank MN490666, which, compared to ours, has an identity of 96.30%.

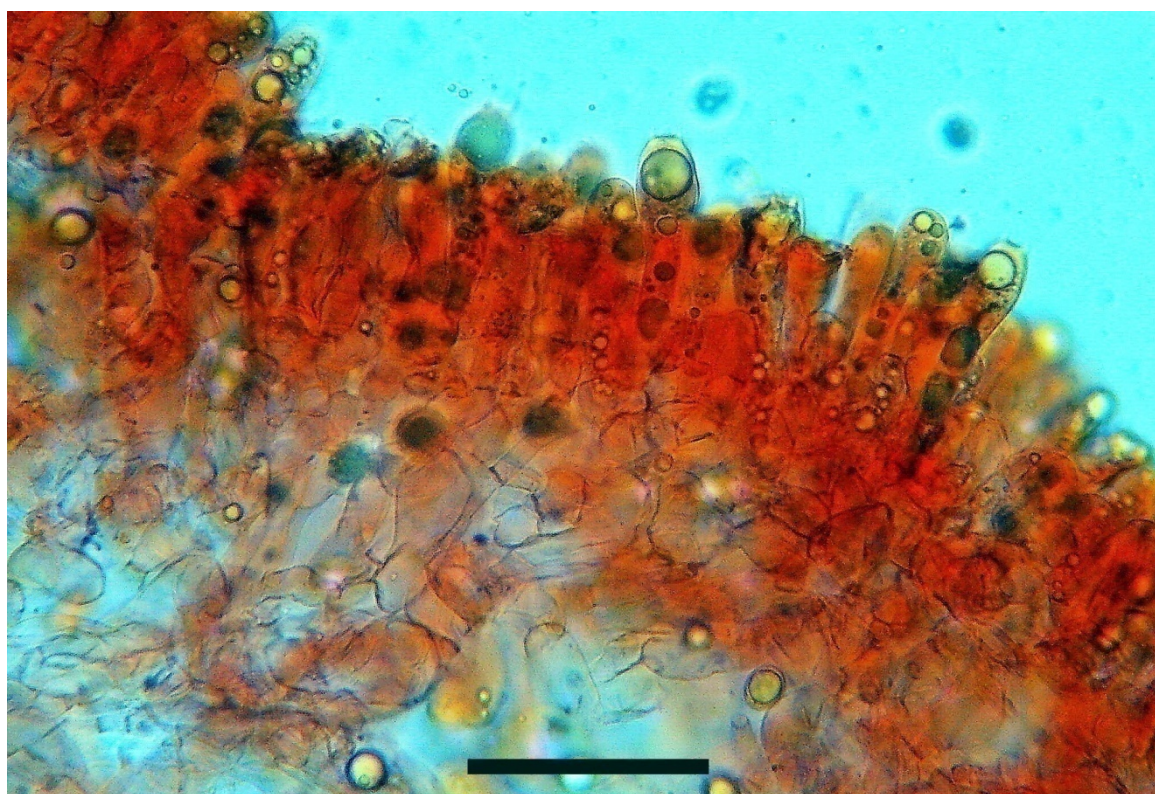
The difference between *A. huijsmanii* and *A. electra* is quite stark and even starker is the ITS difference between *A. huijsmanii* and the *A. argentea* complex which will be treated in our next contribution.

A. huijsmanii belongs to the stirps *Argentea* which groups broadleaves-connected entities such as *A. electra*, *A. argentea* and *A. aff. argentea* which we will describe in the next contribution. As evidenced by Hanss & Moreau (2020) there are globally two subtypes in the stirps *Argentea*, one European and one Asiatic. It is to be noticed that *A. supravolvata* Lanne, a species Massart also found in a similar environment, is not included in clade 2 but in clade 5, in particular in the stirps *Mairei*, beside *A. mairei*, *A. ochraceopallida* Contu, *A. pini* Neville & Poumarat and *A. ochraceomaculata* Neville, Poumarat & Fraiture. The great dimension of our specimen confirms, if anything were needed, the extreme variability of the species. This variability was

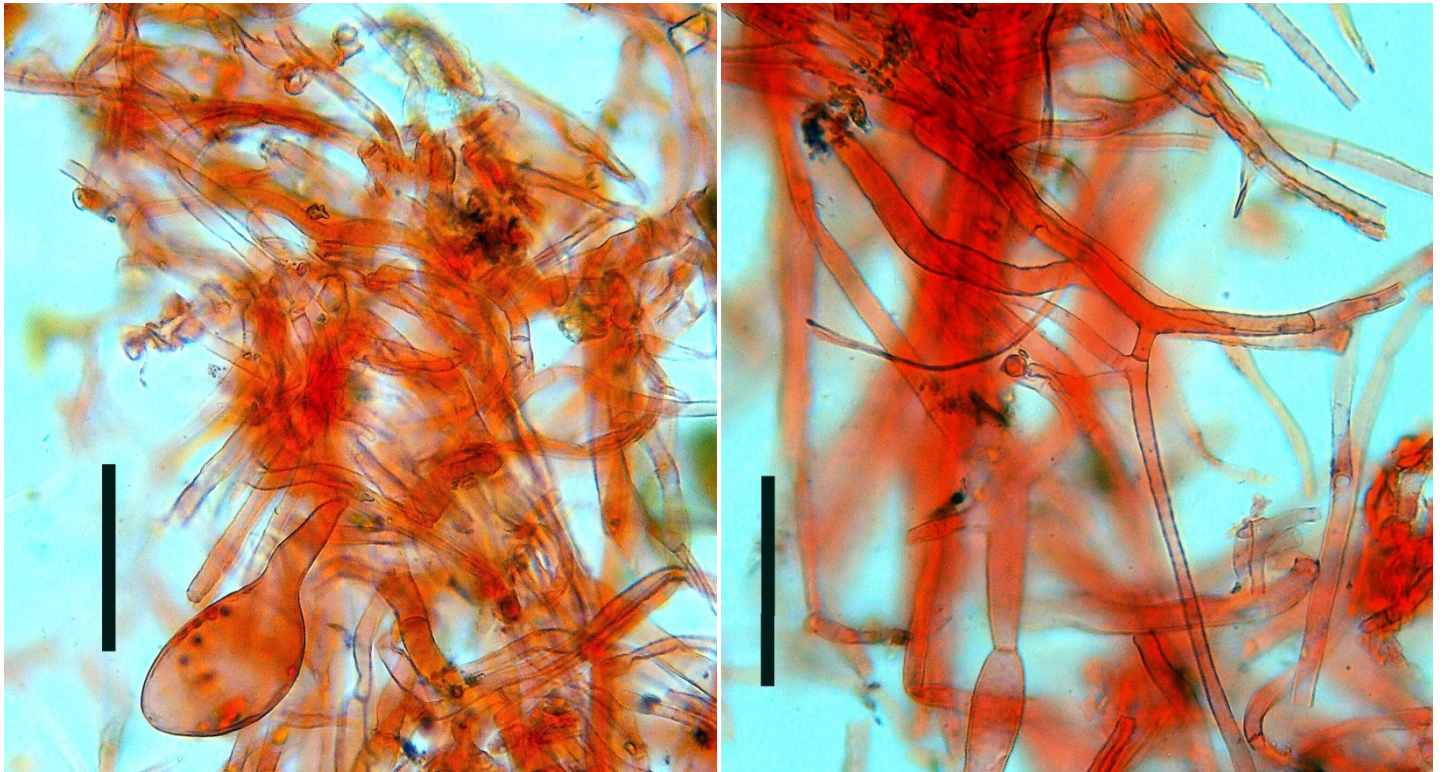
evidenced by the two transalpine mycologists, with reference to the spore quotient, the typology of the volva and, overall, the fairly consistent and slender habit when compared with the description and protolog by Massart & Rouzeau (1989) (mature pilei 4.5 – 6 cm broad for the eight specimens they studied). The microcharacters of our collection, despite the limitation due to the availability of a single specimen, sufficiently match with what is reported by Hanss & Moreau (2020); the spore dimension ($12.5 - 14.5 \times 9.0 - 10.5 \mu\text{m}$) is larger than what they reported, yet smaller than those indicated in the original diagnosis.



Spores / spore



Hymenium / Imenio



Elements of veil / Elementi del velo

In conclusion, we can only acknowledge the extreme importance of the phylogenetic sequences which, in cases like this one, provide confirmation of the correctness of the determinations.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Pablo Alvarado, Jean-Michel Hanss, Gianluigi Maraia, Pierre-Arthur Moreau and Pietro Voto for their kind cooperation in various capacities.

REFERENCES cited or consulted / BIBLIOGRAFIA citata o consultata

- Bas C (1969). Morphology and subdivision of *Amanita* and a monograph of its section *Lepidella*. *Persoonia* 5(4):285 – 573.
- Bas C (1977). Species-concept in *Amanita* sect. *Vaginatae*. Dans H. Cléménçon (dir.). The species concept in *Hymenomycetes*. Proceedings of a Herbette Symposium, Lausanne, pp. 79 – 103.
- Cui Y-Y, Cai Q, Tang L-P, Liu J-W, Yang ZL (2108). The family *Amanitaceae*: molecular phylogeny, higher-rank taxonomy and the species in China. *Fungal Diversity* 91:5 – 230.
- Edgar RC (2004a). MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792 – 1797. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- Edgar RC (2004b). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>.
- Edler D, Klein J, Antonelli A, Silvestro D (2020). raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods in Ecology and Evolution* 12(2):1 – 5. doi: 10.1111/2041-210X.13512
- Eyssartier G, Roux P. (2011). Le guide des champignons. France et Europe, pp. 1 – 940.
- Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783 – 791.
- Fraiture A (1993). Les *Amanitopsis* d'Europe (genre *Amanita*, *Agaricales*, *Fungi*) – Synthèse critique de la littérature. *Opera botanica belgica* 5:1 – 128.
- 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.
- Hanss J-M (2015). Trois amanites de la section *Vaginatae* (Fr.) Quél. récoltées en Franche-Comté en 2014. *Bull. mycol. bot. Dauphiné-Savoie* 217(215):27 – 36.

- Hanss J-M, Moreau P-A (2020 '2017'). Une révision des amanites «vaginées» (*Amanita* sect. *Vaginatae*) en Europe, 1re partie: quelques amanites argentées. *Bulletin de la Société Mycologique de France* **133**(1-2):67 – 141.
- Kantharaja R, Krishnappa M (unpubl.). Genus *Amanita* from Western Ghats of India. GenBank Direct Submission 2020.
- Kim CS, Jo JW, Kwag YN, Oh J, Shrestha B, Sung GH, Han SK (2013). Four newly recorded *Amanita* species in Korea: *Amanita* sect. *Amanita* and sect. *Vaginatae*. *Mycobiology* **41**(3):131 – 138.
- Loizides M (2016). *Macromycetes* within *Cistaceae*-dominated ecosystems in Cyprus. *Mycotaxon* **131**(1):255 – 256. doi:10.5248/131.255.
- Maddison WP, Maddison DR (2021). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.70. <http://www.mesquiteproject.org>
- Malysheva EF, Kovalenko AE (2015). Fungi of the Russian Far East 4. Contribution to the study of *Amanita* sect. *Vaginatae* in the Central Sikhote-Alin. *Mikologiya i Fitopatologia* **149**:151 – 163.
- Massart F (1983). Approche du genre *Amanita*. Observations effectuées en Gironde de 1959 a 1982. pp. 138.
- Massart F, Rouzeau C (1990 '1989'). Une Amanite nouvelle dans la section des *Vaginatae*. *Bull. Soc. linn. Bordeaux* **17**(3):159 – 168.
- Massart F (2000). Amanite osservate in Gironda. Parte I. *Amanitopsis*. *Boll. Gr. Micol. G. Bresadola N.S.* **43**(2):241 – 259.
- Massart F (2007). Guide pratique des champignons. 400 espèces. Éditions Sud Ouest. pp. 280.
- 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.
- Neville P, Poumarat S (2009). Quelques espèces nouvelles ou mal délimitées d'*Amanita* de la sous-section *Vaginatinae*. 1er complément à AMANITEAE, Fungi Europaei 9. *Fungi non delineati* **51-52**:1 – 200.
- Nilsson RH, Larsson K-H, Taylor AFS, Bengtsson-Palme J, Jeppesen TS, Schigel D, Kennedy P, Picard K, Glöckner FO, Tedersoo L (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Res* **47**(D1):D259–D264.
- Palmer JM, Lindner DL, Volk TJ (2008). Ectomycorrhizal characterization of an American chestnut (*Castanea dentata*)-dominated community in Western Wisconsin. *Mycorrhiza* **19**(1):27 – 31.
- Pizzelli V (2021). *Amanita huijsmanii* e *Amanita dryophyla*, due interessanti *Amanitaceae* dal lazio (Centro Italia). *Rivista Micologica Romana* **113**:76 – 86.
- Ratnasingham S, Hebert PDN (2007). bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes*. 2007 May 1;**7**(3):355 – 364. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**(3):539 – 542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Russell SD (unpubl.). GenBank Direct Submission 2019.
- Sayers EW, Cavanaugh M, Clark K, Ostell J, Pruitt KD, Karsch-Mizrachi I (2020). Genbank. *Nucleic Acids Res* **48**: D84–D86. 10.1093/nar/gkz956.
- Ševčíková H, Hanss J-M, Moreau P-A (2021). *Amanita vladimirii* (*Amanitaceae*, *Agaricales*), a new European species in section *Vaginatae*. *Phytotaxa* **482**(2):159 – 172.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* **38**(7):3022 – 3027. doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tang LP, Cai Q, Lee SS, Buyck B, Zhang P, Yang ZL (2015). Taxonomy and phylogenetic position of species of *Amanita* sect. *Vaginatae* s.l. from tropical Africa. *Mycol Progress* **14**:39. doi: 10.1007/s11557-015-1061-z
- Thongbai B, Hyde KD, Lumyong S, Raspé O (2018). High undescribed diversity of *Amanita* section *Vaginatae* in northern Thailand. *Mycosphere* **9**(3):462 – 494.
- Tulloss RE (1994). Type studies in *Amanita* section *Vaginatae* I: Some taxa describe in this century (studies 1-23) with notes on description of spore and refractive hyphae in *Amanita*. *Mycotaxon* **52**(1):305 – 396.
- Tulloss RE, Kudzma LV, Tulloss MK (unpubl.). GenBank Direct Submission 2019.

Vizzini A, Zotti M, Traverso M, Ercole E, Moreau P-A, Kibby G, Consiglio G, Cullington AP, Moingeon J-M, Peintner U (2016). Variability, host range, delimitation and neotypification of *Amanita simulans* (*Amanita* section *Vaginatae*): collections associated with *Helianthemum* grasslands, and epityfication of *A. lividopallescens*. *Phytotaxa* **280**(1):1 – 22.

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.

Zhang Z-G, Li Z, Cao J (unpubl.). GenBank Direct Submission 2008.

WEBSITE / SITOGRAFIA

Index fungorum: <http://www.indexfungorum.org/>

Mycobank: <http://www.mycobank.org/>

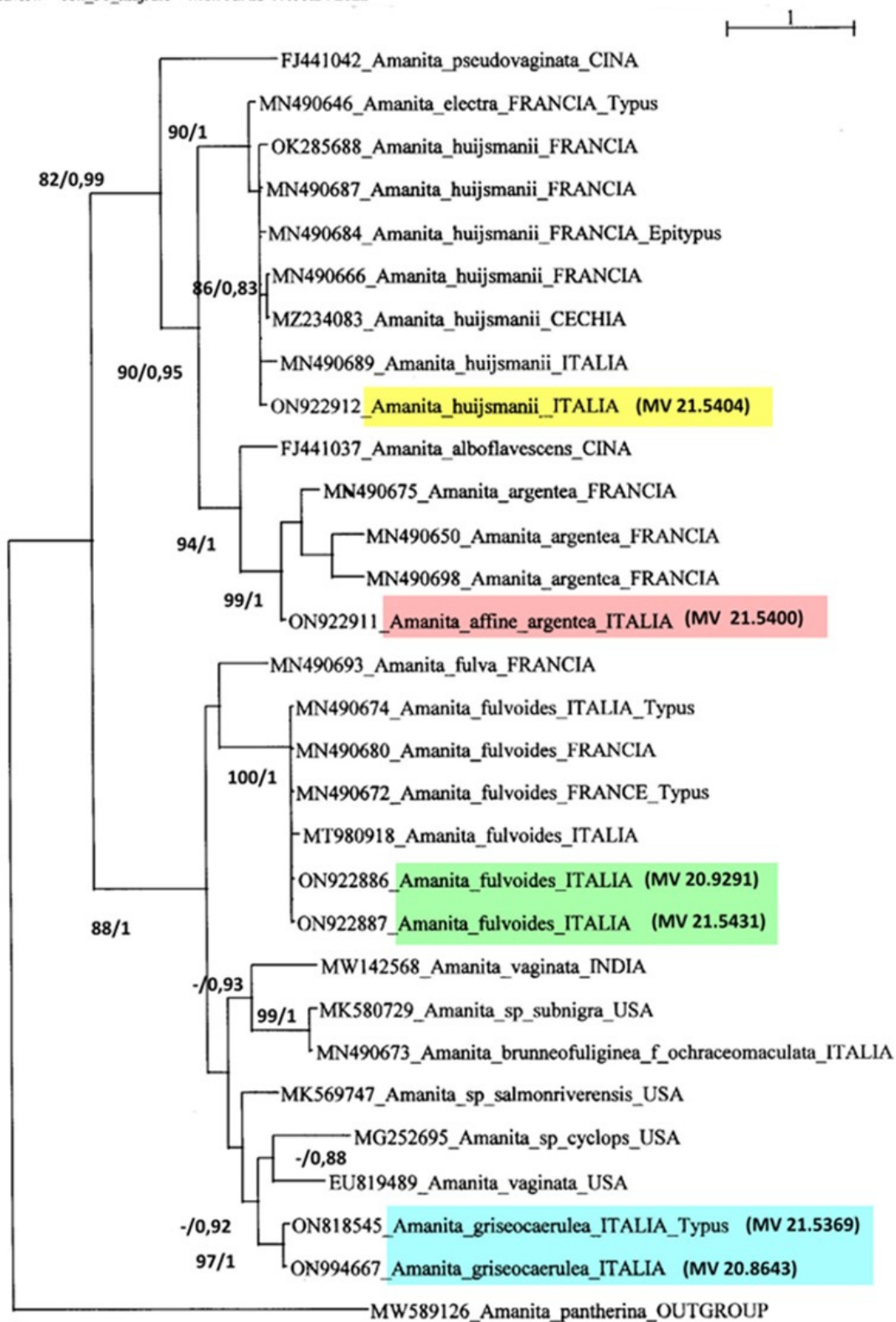
Mikoweb: <http://www.mykoweb.com/>

NCBI National centre for biotechnology information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Species	ITS Acc. Nr.	Type	Origin	Reference / Bibliografia
<i>A. alboflavescens</i>	FJ441037		China	Zhang, Li & Cao (unpubl.)
<i>A. aff. argentea</i>	ON922911		Italy	this publication
<i>A. argentea</i>	MN490698		France	Hanss & Moreau (2020)
<i>A. argentea</i>	MN490698		France	Hanss & Moreau (2020)
<i>A. argentea</i>	MN490650		France	Hanss & Moreau (2020)
<i>A. argentea</i>	MN490675	epitype	France	Hanss & Moreau (2020)
<i>A. brunneofuliginea</i> f. <i>ochraceomaculata</i>	MN490673		Italy	Hanss & Moreau (2020)
<i>A. electra</i>	MN490646	holotype	France	Hanss & Moreau (2020)
<i>A. fulva</i>	MN490693		France	Hanss & Moreau (2020)
<i>A. fulvoides</i>	ON922887		Italy	this publication
<i>A. fulvoides</i>	ON922886		Italy	this publication
<i>A. fulvoides</i>	MT980918		France	Tulloss et. al. (unpubl.)
<i>A. fulvoides</i>	MN490672	holotype	France	Hanss & Moreau (2020)
<i>A. fulvoides</i>	MN490680		France	Hanss & Moreau (2020)
<i>A. fulvoides</i>	MN490674	holotype	Italy	Hanss & Moreau (2020)
<i>A. griseocaeerulea</i>	ON818545	holotype	Italy	this publication
<i>A. griseocaeerulea</i>	ON994667	paratype	Italy	this publication
<i>A. huijsmanii</i>	ON922912		Italy	this publication
<i>A. huijsmanii</i>	MN490689		Italy	Hanss & Moreau (2020)
<i>A. huijsmanii</i>	MZ234083		Czech Rep.	Tulloss et. al. (unpubl.)
<i>A. huijsmanii</i>	MN490666		France	Hanss & Moreau (2020)
<i>A. huijsmanii</i>	MN490684	holotype	France	Hanss & Moreau (2020)
<i>A. huijsmanii</i>	MN490687		France	Hanss & Moreau (2020)
<i>A. huijsmanii</i>	OK285688		France	Tulloss et. al. (unpubl.)
<i>A. pseudovaginata</i>	FJ441042		China	Zhang, Li & Cao (unpubl.)
<i>A. cyclops</i> nom. prov.	MG252695		U.S.A.	Tulloss et. al. (unpubl.)
<i>A. salmonriverensis</i> nom. prov.	MK569747		U.S.A.	Tulloss et. al. (unpubl.)
<i>A. subnigra</i> nom. prov.	MK580729		U.S.A.	Russel (unpubl.)
<i>A. vaginata</i>	EU819489		U.S.A.	Palmer, Lindner & Volk (2008)
<i>A. vaginata</i>	MW142568		India	Kanharaja & Krishnappa (unpubl.)

Table 3. Sequences used in the ITS analysis / sequenze usate nell'analisi ITS

Seaview con_50_majrule Mon Jul 25 17:00:24 2022



Phylogram of sequences of the genus *Amanita* sez. *Vaginatae* based on Maximum Likelihood analysis of ITS1 and ITS2 gene regions supported by Bayesian inference values. On the nodes are shown on the left the values of MLB ≥ 70 on the right the values of BPP ≥ 0.90 . (Detail in materials and methods) /

Filogramma di sequenze del genere *Amanita* sez. *Vaginatae* basato sull'analisi di Massima Verosimiglianza relativa a regioni geniche ITS1 e ITS2 rafforzata dai valori di Inferenza Bayesiana. Sui nodi sono riportati a sinistra i valori di MLB ≥ 70 a destra i valori di BPP $\geq 0,90$. (Dettaglio in materiali e metodi). N.B. Per un fortuito errore, la registrazione in GenBank di *Amanita fulvooides* voucher MV 20.9291 è stata effettuata come *Amanita fulgineoides*, conseguentemente la correzione ha comportato la produzione di un nuovo number access OP082403 con voucher MV 20.9291b che non corrisponde a quello originale. Per le stesse ragioni *Amanita griseocaerulea* number access ON994667 dopo la modifica è divenuta voucher MV 20.86431 anziché quello originale MV 20.8643.

***Amanita* sezione *Vaginatae* nel Lazio. Primo contributo.**

Istituzione di *Amanita griseocaerulea* sp. nov., descrizione di *Amanita fulvoides* e *Amanita huijsmanii*

Parole chiave: *Basidiomycota*
Agaricales
Amanitaceae
sequenze ITS
tassonomia
Italia

Riassunto: Solo recentemente, per merito di indagini filogenetiche nella regione ITS, si è iniziato a comporre il quadro completo della diversità della sezione *Vaginatae* in Europa utilizzando i risultati dello studio morfologico, microscopico e molecolare di raccolte realizzate negli ultimi anni. Contemporaneamente si è proceduto alla revisione su base molecolare dei tipi descritti in Europa laddove gli stessi siano risultati disponibili e sequenziabili. In questo primo contributo sono descritte le specie *Amanita griseocaerulea* sp. nov., *Amanita fulvoides* ed *Amanita huijsmanii*.

INTRODUZIONE

Il territorio del Lazio si è da sempre dimostrato particolarmente ricco di entità appartenenti alle cosiddette “*Amanita* prive di anello” nel tempo note come generi *Vaginata* Nees ex Gray, *Amanitopsis* Roze ed *Amanitella* Earle. Le stesse entità sono oggi racchiuse in *Amanita* sezione *Vaginatae* QuéL.

Nel tempo abbiamo più volte provato a dare un nome scientificamente corretto alle numerose raccolte realizzate con discreta frequenza in areale mediterraneo nei boschi di latifoglie e, con minore intensità, in quelli di conifere. A fronte di poche specie determinabili già sul campo quali *A. crocea* (QuéL.) Singer, *A. fulva* Fr., *A. mairei* Foley, *A. dryophila* Consiglio & Contu ed *A. ceciliae* (Berk. & Broome) Bas ci siamo talvolta trovati al cospetto di esemplari dotati di una ambigua monotonia nei caratteri macro e microscopici. Per diversi esemplari non era possibile distinguere se si fosse trattato di una esacerbata variabilità cromatica di una sola entità oppure della presenza di due specie estremamente affini tra loro e quindi indistinguibili sul campo. Ci siamo trovati anche al cospetto di specie istituite negli ultimi decenni prive di un adeguato supporto di immagini in grado di documentarne la variabilità.

In queste condizioni sono risultati particolarmente utili gli studi degli autori transalpini Hanss & Moreau (2020) e russi Malysheva & Kovalenko (2015). Questi autori hanno avuto l'enorme merito di aver realizzato studi filogenetici del tutto simili a quelli proposti da studiosi extra-europei (Tang et al. 2015; Cui et al. 2018; Thongbai et al. 2018).

Quanto riportato in questi contributi dedicati allo studio della sezione *Vaginatae* vuole semplicemente costituire un modesto apporto di esperienze basate su ritrovamenti, numerosi e copiosi, realizzati in ambiente xerofilo di latifoglia durante le nostre prospezioni micologiche alla ricerca di funghi lepiotoidi in areale strettamente mediterraneo. Altre nostre raccolte, utilizzate per confronto, provengono dal territorio collinare umbro della Valnerina. Le località laziali da noi frequentate ci hanno portato ad erborizzare in boschi planiziali di latifoglie del litorale tirrenico dominati dalla presenza di *Quercus ilex*, *Quercus suber*, *Quercus cerris* con *Arbutus unedo*, *Pistacia lentiscus*, *Myrtus communis*, *Calluna vulgaris*, varie specie di *Cistus* ed altre essenze tipiche della macchia mediterranea.

Premettiamo che non tutte le nostre raccolte sono state sequenziate ma di quelle di nuova istituzione e di quelle sequenziate sono riportati i codici delle sequenze immesse in GenBank nonché l'erbario nel quale sono stati depositati i tipi e le raccolte più interessanti.

Sono doverose due brevi note in merito all'analisi filogenetica di cui ci siamo avvalsi in maniera massiva per la conferma delle determinazioni. Le risultanze dell'analisi filogenetica delle nostre raccolte e delle consimili prese in esame hanno confermato quanto rilevato da Hanss & Moreau (2020) e prima di loro da Malysheva & Kovalenko (2015). Quanto sopra ci ha portato a valutare l'importanza dell'insieme ovviamente inscindibile tra i caratteri macroscopici, microscopici e filogenetici per ciascuna specie e/o per ogni raggruppamento di specie.

Infatti, come validamente dimostrato dagli autori transalpini nella revisione di un gruppo morfologico di specie a cappello grigio-argentato della sez. *Vaginatae*, non sempre vi è omogeneità filogenetica in quanto entità precedentemente considerate prossime tra loro secondo una oramai superata metodologia sistematica basata su alcuni parametri morfologici attualmente le possiamo ritrovare ripartite su cladi filogenetici diversi

sulla base del marcatore genetico ITS. Conseguentemente ciò ha indotto i succitati autori a ricercare un nuovo insieme di caratteri morfologici con un più alto valore sistematico che potessero combinarsi con le evidenze filogenetiche del gene ITS individuandoli nella struttura della volva, la trama delle lamelle e la morfologia del subimenio. Premesso che allo stato attuale non siamo in grado di sapere quale strutturazione cladistica, eventualmente differente, potrebbe essere prodotta da differenti regioni del DNA non ancora esaminate, possiamo notare che il marcatore nrITS si è dimostrato altamente informativo sia per la distinzione delle specie che per la delimitazione di cladi robusti.

Ciò premesso, l'analisi dei filogrammi che produrremo consentirà di osservare cladi moderatamente robusti e contenenti una o più stirpi.

Nel filogramma di questo primo contributo, coincidente con i cladi 2 e 3 di Hanss & Moreau (2020), è inserita, tra le altre, la Stirpe *Argentea* con le specie *A. huijsmanii* F. Massart & Rouzeau, *A. electra* Hanss ed *A. argentea* Huijsman sensu lato. Un clado robusto corrispondente al clado 3 di Hanss & Moreau (2020) (stirpe *Fulva*) comprende le specie europee *A. umbrinolutea* (Secr. ex Gillet) Bataille, *A. fulvoides* Neville & Poumarat ed altre non-europee quali *A. nishidae* Tulloss nom. prov., *A. sarahae* Tulloss & S. D. Russell nom. prov., *A. jakeslandingensis* Tulloss nom. prov., da noi non inserite nel cladogramma.

A quest'ultimo clado sembrerebbe, a nostro modesto parere, appartenere l'entità istituita nel presente contributo, *Amanita griseocaerulea*, in virtù di due nostre raccolte ma riteniamo prudentemente che ciò dovrà in futuro essere confermato per essere definitivamente avallato.

MATERIALI E METODI

Morfologia

I basidiomi sono stati fotografati in habitat mediante fotocamera digitale Nikon modello Coolpix 4500. Per ogni entità descritta vengono indicate località e data del ritrovamento, e la tipologia dell'habitat. La descrizione macroscopica è stata formulata osservando esemplari freschi. Nell'analisi della microscopia, eseguita sia su esemplari freschi sia su esemplari essiccati preventivamente reidratati in acqua, il materiale è stato trattato con Rosso Congo o con reattivo di Melzer, lavato e poi osservato ulteriormente con reattivo di Melzer o con rosso Congo.

Le descrizioni e le immagini di microscopia sono state prodotte da V. Migliozzi utilizzando un microscopio biologico trinoculare AmScope modello T490B dotato di ottiche apocromatiche 20x, 40x, 100x ed oculari 10x e supportato da una videocamera elettronica digitale MC500. Il valore della barra nelle foto della microscopia è di 50 µm per il velo generale e cellule marginali e di 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 in VER e nell'erbario privato di M.V.

Per la descrizione della morfologia sporale sono state usate le indicazioni contenute in Bas (1969: 321) ed adottate da Neville & Poumarat (2009: 5) basate sul rapporto Q (lunghezza / larghezza) delle dimensioni sporiali:

Q = 1,00 – 1.05, spore globose;

Q = 1.05 - 1.15, spore subglobose,

Q = 1.15 - 1.30, spore largamente ellissoidi;

Q = 1.30 – 1.60, spore ellissoidi.

Per quanto attiene alla forma della volva facciamo riferimento alle tipologie indicate da Bas (1997: 83) ed adottate da Hanss & Moreau (2020: 70). Le sei tipologie, illustrate in modo preciso da Fraiture (1993: 19-17), possono essere sintetizzate come segue:

Tipo 1a ed 1b:

velo generale da friabile a fragile, di consistenza pulverulenta, con numerosi residui sul cappello ed alla base del gambo fino a formare residui in lembi molto poco membranacei.

Tipo 2a e 2b:

velo più o meno membranaceo con una parte inferiore strettamente adesa al gambo ed una superiore svasata e ben distante dal gambo.

Tipo 3:

volva tipicamente vaginata, membranacea, non o moderatamente dilatata-distante dal gambo. Solo eccezionalmente sono presenti resti di velo sul cappello.

Tipo 4:

volva a sacco, membranacea e (molto) spessa, distintamente dilatata-distante dal gambo. Non sono presenti resti di velo sul cappello.

Filogenetica

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 (Gardes & Bruns, 1993; White et al., 1990).

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.

L'analisi filogenetica è stata condotta sul marcatore ITS dell'rRNA. Il data set comprende 29 taxa (Tabella 3, pag. 30) di cui una, *Amanita pantherina*, scelta come outgroup. Le sequenze sono state ottenute dai database pubblici GenBank (Sayers et al., 2020), UNITE (Nilsson et al., 2019) e BoldSystem (Ratnasingham & Herbert, 2007).

Il dataset delle sequenze è stato assemblato in Mega X (Tamura et al., 2021) ed allineato, tramite il medesimo software, utilizzando l'algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004a, 2004b) lasciando invariate le impostazioni di default. L'allineamento è stato infine editato manualmente.

L'ottimizzazione dell'allineamento per le analisi filogenetica è stata realizzata tramite Mesquite (Maddison & Maddison, 2021). Le analisi filogenetiche sono state condotte sui marcatore ITS secondo i metodi della massima verosimiglianza (ML, maximum likelihood) e dell'inferenza bayesiana a posteriori (BI, baeyesian inference).

Per l'analisi ML è stato utilizzato RAxML GUI 2.0 (Edler et al., 2020) con algoritmo di ricerca ML+rapid bootstrap, 1000 repliche di bootstrap (Felsenstein, 1985) e modello GTR+GAMMA.

L'analisi BI è stata condotta tramite MrBayes 3.2.7 (Ronquist et al., 2012) con modello evolutivo GTR+GAMMA, due analisi separate di quattro Markov-Chain of Monte-Carlo per 10.000.000 di generazioni, con un campionamento ogni 1000 generazioni e l'eliminazione del 25% degli alberi campionati.

Le tipologie finali ottenute con i due metodi di analisi sono risultate essenzialmente sovrapponibili è stato quindi deciso di rappresentare unicamente l'albero basato su ML. La soglia di significatività è stata impostata sopra il 90% per BI e 70% per ML.

Il filogramma qui prodotto verrà ripreso ed integrato con le altre specie trattate nei prossimi contributi.

TASSONOMIA

***Amanita griseocaerulea* Migl. & Donato, sp. nov.**

Typus: Italia, Regione Lazio, Provincia di Roma, Comune di Pomezia, Parco Regionale dei Castelli Romani, Riserva Naturale della Sughereta di Pomezia, 24.11.2021, V. Migliozi M.V. 21.5369, VER fu17, GenBank ITS ON818545.

Paratypus: stesso posto, 31.10.2020, V. Migliozi M.V. 20.86431, VER fu18, GenBank ITS ON994667.

Etimologia: il nome si riferisce al colore grigio celeste del cappello.

DIAGNOSI ORIGINALE

Cappello 40-100 mm, inizialmente campanulato poi convesso infine piano con modesto umbone, colorazione dominante grigio-celeste con tonalità grigiastre al disco, margine cannellato per 10-18 mm. Assenza di resti di velo sul cappello. Lamelle inizialmente biancastre poi debolmente grigiastre e localmente brunicce. Gambo 60-140 x 6-12 (14) mm, attenuato verso l'alto, inizialmente biancastro poi soffuso di celeste, celeste grigio e infine parzialmente coperto da fibrille grigiastre; anello assente. Volva con la parte superiore distante dal gambo ma con quella inferiore ben aderente. Carne bianca, poi biancastra infine debolmente ingrignata. Spore (9,5) 10.0-11.5 (12,2) x 10,0-10,8 µm, da globose a subglobose, lisce, ialine. Basidi 50-70 x 12-16 µm, tetrasporici, sterigmi lunghi fino a 7 µm, senza giunti a fibbia. Iife oleifere presenti nel subimenio. Cellule marginali da claviformi a piriformi, poco frequenti. Pileipellis costituita da ixocutis nella parte superiore con presenza di ife oleifere. Textura del velo di tipo misto, nella parte interna in prevalenza filamentosa, nella parte esterna con prevalenza di sferociti. Habitat: gregaria sotto *Quercus* sp., *Quercus suber* e *Quercus ilex*.

L'analisi filogenetica ha dimostrato trattarsi di specie con sequenza ITS non assimilabile ad altre presenti nei banca-dati dedicati. Macroscopicamente potrebbe essere confusa con *A. vladimirii* ma questa entità ed altre specie della sezione *Vaginatae* presentano percentuali di identità molecolare decisamente basse.

Caratteri macroscopici

Cappello: 40-100 (120) mm, inizialmente campanulato poi campanulato convesso infine piano. È presente un modesto umbone. La colorazione dominante è grigia-celeste ma a tonalità nettamente grigiastre al disco per poi decolorarsi verso il celeste nella parte mediana fino a divenire grigio-crema pallido al margine. La superficie pileica è liscia fatta eccezione al margine dove si presenta cannellato per 10-18 mm. Nella raccolta M.V. 20.86431 la colorazione è uniforme e tendente al grigio; molto probabilmente da imputarsi alla maturità degli esemplari. La superficie pileica non presenta resti di velo su tutti gli esemplari osservati.

Lamelle: fitte, con numerose lamellule, inizialmente biancastre, poi grigiastre e brunicce su alcuni esemplari.

Gambo: 60-140 x 6-12 (14) mm, progressivamente attenuato verso l'alto. Inizialmente biancastro, poi rapidamente soffuso di celeste, celeste grigio, infine negli esemplari maturi coperto da fibrille grigiastre nella parte mediana ed in quella basale; anello assente.

Volva: di tipo 2b secondo la catalogazione di Fraiture (1993), con la parte superiore distante dal gambo ma con quella inferiore ben aderente al gambo. Come riscontrato nella raccolta M.V. 20.86431 il tessuto è estremamente fragile e tende a frazionarsi durante la fase della raccolta, lasciando adesa al gambo esclusivamente la parte inferiore. La colorazione, inizialmente bianca, tende ad imbrunire su tutta la superficie sia esterna sia interna. Nel materiale d'erbario si riscontra una struttura a due distinti strati.

Carne: bianca, poi biancastra, infine localmente leggermente ingrignata, priva di odori e sapori particolari.

Caratteri microscopici

Spore: (9.5) 10.0-11.5 (12.2) x 10.0-10.8 µm, da globose a subglobose, lisce, ialine, Q = 1.00-1.08. Apicolo non particolarmente sviluppato.

Basidi: 50-70 x 12-16 µm, tetrasporici, con sterigmi lunghi fino a 7 µm, privi di giunti a fibbia alla base.

Subimenio: di tipo ramoso con le cellule sottostanti strette. Sono presenti numerose ife oleifere dotate di consistente sviluppo diametrico, larghe 5-8 (14) µm.

Cellule marginali: di dimensioni fino a 50 x 40 µm, da claviformi a piriformi, poco frequenti.

Pileipellis: costituita da ixocutis nella parte superiore con ife cilindriche di modeste dimensioni diametriche emergenti da uno strato inferiore costituito da ife cilindriche di diametro maggiore (4-6 µm). Iife oleifere presenti.

Textura del velo: leggermente differente tra la superficie esterna e quella interna ma, in entrambi i casi, di tipo misto pur con proporzioni differenti. La porzione interna è prevalentemente filamentosa con rari elementi sferocitici o cilindrici. Quella esterna possiede un numero predominante di sferociti alcuni dei quali dotati di grandi dimensioni (fino a 70 x 50 µm). Le ife oleifere, pur presenti, sono poco frequenti.

Giunti a fibbia: non osservati se non rarissimi ed esclusivamente nella texture del velo.

Habitat: gli esemplari studiati sono stati raccolti, a distanza di un anno, nella Sughereta di Pomezia (RM) sotto *Quercus* sp., *Quercus suber* e *Quercus ilex*. In entrambe le occasioni le raccolte sono risultate costituite da più

esemplari. Nella prima raccolta (M.V. 20.86431, paratypus) gli esemplari erano in avanzato stato di maturazione ed abbiamo avuto difficoltà ad estrarli integri dal terreno. Nella seconda raccolta (M.V. 21.5369, typus) gli esemplari erano costituiti da primordi, da esemplari giovani e da esemplari ben sviluppati. Essendo stati rinvenuti nell'identico spazio puntuale è ragionevolmente ipotizzabile che possano appartenere allo stesso micelio della precedente.

COMMENTI

Non abbiamo difficoltà ad ammettere che al momento della prima raccolta (M.V. 20.86431), non riuscivamo a concepire alcuna ipotesi di determinazione, condizionati in parte anche dall'avanzato stato di maturazione degli esemplari nonché da una incauta modalità di raccolta.

Che gli esemplari della prima raccolta fossero del tutto sovrapponibili con quelli della seconda (M.V. 21.5369) è emerso solamente a seguito delle osservazioni al microscopio prima e di una successiva comparazione delle sequenze filogenetiche risultate in possesso di una percentuale di identità estremamente alta, pari al 99,72%.

La seconda raccolta ci aveva indotto sul campo ad ipotizzare potersi trattare di *A. vladimirii* Ševčíková, Hanss & P.-A. Moreau (Ševčíková, Hanss & Moreau 2021) a causa delle tonalità grigio-celesti del cappello e del gambo.

Di contro eravamo ben consci che le condizioni ambientali, da ascrivere alla Associazione vegetazionale *Abieto-Fagetum* sotto *Fagus*, *Abies* e *Picea* in ambiente continentale nella Repubblica ceca, fossero ben diverse da quelli presenti nella Sughereta di Pomezia in pieno areale mediterraneo. Altre differenze tra *A. griseocaerulea* e *A. vladimirii* sono a carico dei caratteri della microscopia e, soprattutto, delle sequenze filogenetiche. Mentre *A. vladimirii* trova posto, secondo gli autori che l'hanno istituita, nel clado 6, la nostra nuova specie, a nostro modesto parere, dovrebbe trovare posto nel clado 3 accanto ad *A. fulvoides*, *A. vaginata* (Bull.) Lam. ed altre *Amanita* nordamericane quali *A. cyclops* Tulloss, Kudzma & Wasilewski nom. prov. (voucher RET 706-8, USA, GB MG252695), *A. vaginata* (voucher JMP0004, USA, GB EU819489) ed *A. salmonriverensis* Tulloss & Kudzma nom. prov. (voucher RET 715-6, USA, GB MK569747).

Allo scopo di evitare equivoci, precisiamo che la migliore percentuale di identità ottenuta tramite BLAST della nostra sequenza in NCBI con alcune *Amanita* della Stirpe *Lividopallescens* ha evidenziato un bassissimo valore, inferiore al 90 %. Infatti con *A. lividopallescens* (Gillet) Bigeard & H. Guill. (KX834242) abbiamo ottenuto un valore pari a 86.06%, con *A. helianthemicola* Zotti, Vizzini & M. Traverso (KX834259) del 89.31% e con *A. simulans* Contu (KX834260) del 89.47%.

In tutti i casi la bassa percentuale di identità delle nostre raccolte con ogni altra entità non ci ha fornito alcun motivo di perplessità e ci ha dato la certezza di doversi trattare di specie non descritta, nuova per la scienza, o quanto meno con sequenza non presente in GenBank od in altre banca-dati.

Nella Tabella 1 (pag. 20) riportiamo, indipendentemente dal clado di appartenenza, alcune specie con caratteristiche morfologiche tali da suscitare il nostro interesse. Sono riportate esclusivamente quelle entità con percentuale d'identità pari o superiore al 90%.

***Amanita fulvoides* Neville & Poumarat.**

Fungi Europaei 9. *Fungi non delineati, raro vel haud perspecte et explorate descripti aut definite picti* 51-52: 44, f. 10-11 (2009).

- = *Amanita vaginata* f. *avellanea* M. Traverso (1999: 46)
- = *Amanita avellanea* (M. Traverso) Neville & Poumarat (2009: 77)
- = *Amanita vaginata* var. *badia* sensu Traverso (1999: 48)
- = *Amanita badia* sensu Consiglio (2000: 215).

Caratteri macroscopici

Cappello: 30-60 mm, inizialmente parabolico poi campanulato-convesso. È presente un umbone più o meno pronunciato, raramente evidente nei primordi. Margine nettamente striato per 10-15 mm. Colorazione pileica

variabile ma compresa tra il bruno, bruno-nocciola, bruno-grigio fino a nocciola carico. Normalmente privo di residui del velo generale.

Lamelle: libere, da bianche a bianco-crema, intercalate da lamellule.

Gambo: 60-80 x 8-14 mm, slanciato, cilindrico, progressivamente allargato verso la base, inizialmente bianco, biancastro poi subconcolore al cappello con tonalità crema-nocciola. Liscio e raramente dotato di decorazioni crema-brune. Anello assente.

Volva: di tipo membranacea ma poco consistente e fragile, di tipo 3 secondo la classificazione di Bas (1997), strettamente aderente al gambo esclusivamente nella parte basale. Biancastra ma dotata di numerose macchie di colore crema-arancio.

Carne: biancastra, priva di odore e sapore particolari.

Caratteri microscopici

Spore: 9.0-12.0 (12.8) μm in diametro, Q = 1.00-1.06, da globose a sub globose, apicolo ben evidente, lisce, ialine.

Basidi: 45-75 x 12-18 μm , con sterigmi lunghi fino a 8 μm , tetrasporici, privi di giunti a fibbia alla base.

Subimenio: costituito da elementi cellulari, subsferici o largamente allungati. Sono presenti diverse ife oleifere facilmente visibili.

Cellule marginali: 25-50 x 25-40 μm , estremamente numerose fino a formare uno strato continuo, sferocitiche, piriformi, claviformi o ellittiche.

Pileipellis: costituita da una parte superiore in ixocutis con ife cilindriche poco dimensionate in larghezza (fino a 4 μm) e da una parte sottostante costituita da ife cilindriche intrecciate.

Textura del velo: mista, di tipo moderatamente filamentosa frammista a numerosi ed evidenti sferociti (fino a 70 x 60 μm) con alcuni elementi cilindracei (fino a 90 x 30 μm). Sono presenti ife oleifere.

Habitat: gli esemplari descritti ed illustrati sono stati più volte osservati nella Sughereta di Pomezia, sotto *Quercus ilex*, *Quercus suber* ed altre essenze della macchia mediterranea nei mesi di novembre e dicembre. In questa località risulta essere specie frequente. La raccolta M.V. 20.9291 (GB ON922886) è stata realizzata in data 11.11.2020 e più volte osservata nelle settimane successive. Ritrovata ulteriormente anche in data 24.11.2021 (raccolta M.V. 21.5431, GB ON922887) in habitat analogo. Altre successive raccolte non sono state conservate ma solamente fotografate.

COMMENTI

Gli esemplari da noi osservati quadrano perfettamente con la descrizione ed il protologo di Neville & Poumarat (2009) e con la descrizione ed illustrazione di Eyssartier & Roux (2011). Dal punto di vista filogenetico la conspecificità con altre raccolte si evidenzia nel filogramma di consenso già riportato in figura 1. È possibile un confronto dell'identità delle nostre due raccolte (MV 20.9291 e MV 21.5431) con le sequenze disponibili in GenBank o riportate in Hanss & Moreau (2020) quali quelle con codici MN490672, MN490680, MN490674 e MT980918.

Dalla visione della Tabella 2 (pag. 25) si evince che le nostre raccolte corrispondono in modo straordinariamente univoco alla entità *A. fulvoides*.

Si noti comunque che la sequenza MN490674, registrata in GenBank da Hanss & Moreau (2020) come *A. fulvoides*, corrisponde all'olotipo di *A. vaginata* var. *avellanea* M. Traverso (Hanss & Moreau, 2020: 135), ricombinata in *A. avellanea* (M. Traverso) Neville & Poumarat nello stesso articolo dove è stata descritta *A. fulvoides*; dato che i due nomi sono stati poi ridotti in sinonimia da Hanss & Moreau (2020) emerge il dubbio se l'epiteto da usare sia *A. fulvoides* o *A. avellanea*.

***Amanita huijsmanii* F. Massart & Rouzeau [as '*huijsmanii*'].**

Bull. Soc. linn. Bordeaux 17(3): 159 (1989)(1990).

A causa dell'inadeguatezza del nostro materiale, consistente di una sola raccolta con un singolo esemplare, presentiamo questo taxon solo con immagini del carpoforo e i suoi principali caratteri micro.

La descrizione, sebbene solo in forma fotografica, di questa specie vuole costituire un segno di gratitudine di Vincenzo Migliozi nei confronti del compianto amico Francis Massart che lo ha gratificato della sua amicizia e non solamente micologica.

Dotato di grandi dimensioni, pari a 10 cm nel pileo, l'unico esemplare di questa entità fino ad ora rinvenuto nella Sughereta di Pomezia in data 24.11.2021 (M.V. 21.5404, GB ON922912), sottoposto a sequenziamento, ha denotato una sequenza nrITS identica a quella riscontrata da Hanss & Moreau (2020) sul materiale "89A1" indicato come holotypus da Massart & Rouzeau (1989) nella diagnosi originale. La percentuale di identità della nostra raccolta rispetto all'olotipo (MN490694) è risultato pari al 99,08. Rispetto ad altre sequenze ottenute da Hanss & Moreau (2020) (MN490689, MN490683, MN490687 e MN490666) la percentuale di identità è risultata compresa tra 97,08 e 98,40. Nutriamo solamente un minimo di dubbio relativamente alla raccolta francese con voucher MN490666 che, rispetto alla nostra, presenta una identità del 96,30%.

La differenza tra *A. huijsmanii* ed *A. electra* è abbastanza netta ed ancor più netta è la differenza su base ITS tra *A. huijsmanii* ed il complesso *A. argentea* da noi trattato nel prossimo contributo.

A. huijsmanii appartiene alla stirpe *Argentea* raggruppante entità associate a latifolia quali *A. electra*, *A. argentea* ed *A. aff. argentea* che sarà da noi descritta nel prossimo contributo. Come evidenziato da Hanss & Moreau (2020) a livello globale sono presenti nella stirpe *Argentea* due sottotipi di cui uno europeo ed un secondo asiatico. È doveroso far notare che *A. supravolvata* Lanne, specie anch'essa ritrovata da Massart in Gironde in ambienti simili, viene inserita non nel clado 2 ma nel clado 5, in particolare nella stirpe *Mairei* accanto a *A. mairei*, *A. ochraceopallida* Contu, *A. pini* Neville & Poumarat ed *A. ochraceomaculata* Neville, Poumarat & Fraiture. Le grandi dimensioni del nostro esemplare avallano, semmai ce ne fosse bisogno, l'estrema variabilità a carico della specie. Questa variabilità è stata ben messa in evidenza dai due micologi transalpini, con riferimento al quoziente sporale, alla tipologia della volva e, soprattutto, al portamento abbastanza consistente e più slanciato se confrontato con quanto descritto nella diagnosi e nel protologo da Massart & Rouzeau (1989) (cappello a maturità pari a 4,5-6 cm per gli otto esemplari da loro studiati). Le caratteristiche micro, pur nella limitazione legata alla presenza di un solo esemplare, nella nostra raccolta collimano sufficientemente con quanto riportato da Hanss & Moreau (2020); le dimensioni sporiali (12,5-14,5 x 9-10,5 μm) risultano superiori alle loro indicazioni ma pur sempre inferiori a quelle indicate nella diagnosi originale.

Non possiamo quindi, concludendo, che dare atto dell'estrema importanza costituita dalla sequenza filogenetica che, in casi come questo, fornisce la conferma della correttezza della determinazione.

RINGRAZIAMENTI

Desideriamo esprimere il nostro ringraziamento per la loro gradita collaborazione a Pablo Alvarado, Jean-Michel Hanss, Gianluigi Maraia, Pierre-Arthur Moreau e Pietro Voto.