

AGARICUS COLLEGARUM PRIME SEGNALAZIONI DALL'ITALIA

Riassunto

Nel presente lavoro vengono descritte macro- e microscopicamente due raccolte di *Agaricus collegarum*, specie di recente creazione appartenente ad *A. sez. Nigrobrunnescetes*. Le raccolte sono state effettuate in boschi di conifere del Friuli Venezia Giulia e Trentino. Descrizioni e commenti sono corredati da foto, disegni al tratto dei caratteri microscopici e dai risultati dell'indagine molecolare della regione ITS.

Abstract

In this work two collections of *Agaricus collegarum*, a recently created species belonging to *A. sect. Nigrobrunnescetes*, are described macro- and microscopically. The collections were made in coniferous forests from Friuli Venezia Giulia and Trentino (Italy). The descriptions and comments are accompanied by photos, drawings of the microscopic characters and the results of the molecular investigation of the ITS region.

Key words: *Agaricus*, *Nigrobrunnescetes*, *Agaricus collegarum*, Italia.

Introduzione

Durante l'estate 2018 la Federazione dei gruppi micologici del FVG ha organizzato a Paluzza (UD) l'annuale Comitato Scientifico ed in occasione di un'escursione sulle pendici del Monte Zoncolan è stato effettuato il ritrovamento di alcuni esemplari di un *Agaricus* con portamento e aspetto piuttosto inusuale rispetto a quelli finora noti per la zona; un successivo e più approfondito studio, supportato da un'analisi genetica, ha permesso di attribuire questa raccolta ad *Agaricus collegarum* L.A. Parra, Wisman, Guinb., Weholt, Musumeci & Geml, specie creata solo tre anni prima del nostro ritrovamento. L'ambiente di crescita era caratterizzato da un bosco di *Picea abies* (L.) H. Karst. su terreno calcareo e tutti gli esemplari crescevano a ridosso di un formicaio di *Formica rufa* s.l. L'anno dopo in una località della Val di Non (Vigo di Ton - TN), sempre nel mese di agosto ed in situazioni ecologiche analoghe, è stato effettuato un secondo ritrovamento di questa specie confermato successivamente anche in questa occasione da un'indagine genetica. Se nella prima raccolta abbiamo potuto osservare solo esemplari adulti, quelli della seconda erano fortunatamente a vari stadi di sviluppo cosicché abbiamo potuto verificare la variabilità morfologica e cromatica di questa specie di cui, fino ad oggi, non ci sono segnalazioni ufficiali per il territorio italiano.

Materiali e Metodi

Studio macro- e micromorfologico

Il rilievo dei caratteri macroscopici è stato effettuato su materiale fresco e gli esemplari sono stati fotografati in habitat con fotocamere digitali Nikon D5300 e Nikon D80 equipaggiate con obiettivo Nikon 60 mm macro. Lo studio dei caratteri microscopici è stato condotto successivamente su campioni essiccati utilizzando un microscopio ottico Zeiss Primostar trinoculare. Le osservazioni e le misurazioni dei caratteri microscopici sono state effettuate con obiettivi 40×, 60× e 100× ad immersione d'olio, dopo reidratazione in soluzione ammoniacale al 3% e come mezzo di osservazione è stato usato r+osso Congo anionico e acqua per rilevare la

localizzazione ed il colore del pigmento. Per la definizione delle dimensioni sporiali sono state misurate un minimo di 30 spore su almeno due esemplari di ogni raccolta. Gli exsiccata sono stati conservati negli erbari personali degli autori e in TUR-A.

Estrazione del DNA, amplificazione PCR e sequenziamento

Il DNA totale è stato estratto da campioni secchi utilizzando un protocollo modificato basato su MURRAY & THOMPSON (1980). Le reazioni di PCR (MULLIS & FALOONA, 1987) hanno incluso 35 cicli con una temperatura di annealing di 54 °C. Sono stati impiegati i primers ITS1F e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990; GARDES & BRUNS, 1993) per amplificare la regione ITS rDNA. I prodotti PCR sono stati controllati in gel di agarosio all'1% e sequenziati con i primers indicati. I cromatogrammi sono stati verificati, correggendo errori di lettura putativi.

Le sequenze ottenute, relative alla regione ITS, sono state poi confrontate con quelle presenti nei database pubblici Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e UNITE (<http://unite.ut.ee>) attraverso l'algoritmo d'analisi Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1990) al fine di ricercare le sequenze maggiormente simili da includere nel dataset per l'analisi filogenetica. Si sono selezionate le sequenze principalmente derivanti dai lavori condotti da autori notoriamente impegnati nello studio del genere *Agaricus* (PARRA *et al.*, 2015; PARRA *et al.*, 2014; MAHDIZADEH *et al.*, 2017). Le sequenze di *A. campestris* (KM657927) e *A. lanipes* (JF97190) sono state scelte come outgroup seguendo PARRA *et al.* (2015). L'allineamento è stato condotto con MAFFT (KATOHI *et al.*, 2002) mantenendo le impostazioni di default del programma e successivamente importato in MEGA 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013) per l'editing. Il miglior modello di sostituzione nucleotidica (HKY+G) è stato scelto in base ai risultati derivanti dall'analisi condotta con jModelTest 2 (DARRIBA *et al.*, 2012). L'allineamento è stato poi caricato in MrBayes 3.2.6 (RONQUIST *et al.*, 2012), andando a condurre un'analisi bayesiana tramite l'utilizzo del modello evolutivo HKY+G precedentemente stimato con due analisi separate di 4 catene per 1.000.000 di generazioni e campionamento ogni 100 generazioni fino al raggiungimento dei parametri di convergenza (PSFR = 1 e deviazione standard < 0,01). Il 25% degli alberi campionati è stato eliminato e con i rimanenti è stato costruito un albero. I valori di supporto dei nodi (bootstrap Bayesian Posterior Probabilities -BPP-) sono visualizzati sull'albero in **Figura 1**. Le nostre due sequenze sono state depositate in Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) e i loro numeri di accesso sono riportati sempre nella **Figura 1**.

Agaricus collegarum L.A. Parra, Wisman, Guinb., Weholt, Musumeci & Geml, Micol. Veg. Medit. 30 (1): 7, 2015

Raccolte studiate riguardano quattro esemplari a ridosso di un formicaio in bosco di *Picea abies* su suolo calcareo. Monte Zoncolan (1500 m s.l.m.), Ravascletto (UD), 21.07.2018. Leg. U. Zanghi, det. E. Campo, EC 18072018 (duplicato TUR-A 208475 - Genbank MW720698). In corrispondenza di un formicaio di *Formica rufa* s.l., in bosco di *Picea abies* e *Abies alba* Mill. a 1400 m s.l.m., loc. Ciarbonara di Vigo di Ton (TN), 20.08.2019. Leg. & det. A. Fellin AF-105-2019 (Genbank MW720697).

Cappello 40-75 mm, subgloboso, poi largamente convesso, talvolta con la tendenza ad appiattirsi; la superficie è asciutta, caratterizzata da un rivestimento più o meno fibrilloso-cotonoso oca-brunastro, poi con lo sviluppo si delinea meglio un disegno a grosse squame fibrillose ± triangolari più evidenti verso il margine, scurenti con l'età fino al bruno-nerastro. Il margine rimane a lungo involuto, è eccedente ed appendicolato da abbondanti residui anulari biancastri.

Lamelle libere, fitte e basse, grigio-biancastre, poi caffelatte, infine bruno-porpora; virano al rosso vinoso se toccate. Il filo è eroso, biancastro, ma presto maculato di bruno-rossastro.

Gambo 60-120 × 10-15 mm, slanciato, cilindraceo, spesso profondamente immerso nel substrato affusolato e attenuato verso il basso o leggermente allargato, ma non bulboso, sovente tortuoso, fascicolato ad altri gambi. Bianco, ma nella parte subanulare è decorato da fibrille



Foto 1. *Agaricus collegarum*, raccolta friulana del 21.07.2018.

Foto di Emanuele Campo



Foto 2. *Agaricus collegarum*, raccolta trentina del 20.08.2019.

Foto di Alessandro Fellin



Foto 3. *Agaricus collegarum*, dettaglio della raccolta trentina del 20.08.2019.

Foto di Alessandro Fellin

fiocose brunastre più o meno evidenti, disposte a zig-zag o sparse. Tende a sporcarsi di brunonerastro, passando per un rosso vinaccia, se manipolato o contuso. L'anello è supero, collocato a circa $\frac{3}{4}$ di altezza, poco sviluppato, di consistenza bambagiata, con la faccia inferiore brunastro, bianco e striato superiormente; negli esemplari maturi tende a scomparire quasi completamente.

Carne biancastra con rapido viraggio al rosso vinaccia alla sezione. Il viraggio è più intenso nella carne del cappello e nella parte mediana del gambo con annerimento progressivo dopo qualche ora. Il sapore è insignificante e l'odore è pungente, per lo più iodato.

Reazioni macrochimiche reazione di Schäffer negativa, α -Naftolo positiva, violacea sulla carne e sulla superficie del cappello.

Spore da subglobose a largamente ellittiche (4,0-) 4,7-5,8 (-6,3) \times (3,4-) 3,8-4,2 (-4,7) μm , Q = 1,1-1,3-1,5, lisce, brune, a parete spessa, monoguttulate con apicolo ottuso, prive di poro germinativo.

Basidi 18-29,5 × 5,5-7,5 (-8) µm, slanciati, tetrasporici con sterigmi lunghi fino a 3,5 µm, basidioli 9,5-21 × 4,4-5,5 µm, clavati; entrambi gli elementi sono ialini o con pigmento bruno intracellulare.

Cheilocistidi 9-33 × 7-15 µm, abbondanti da rendere sterile il filo lamellare, di forma variabile, da clavati, piriformi a subglobosi, singoli o raggruppati in ciuffi, costituiti da 1 a 4 elementi, con l'elemento preterminale spesso ± isodiametrico; ialini oppure con pigmento bruno intracellulare.

Pleurocistidi non osservati.

Pileipellis di tipo cutis, formata da ife cilindriche larghe 5-10 µm, settate, con terminali ottusi talvolta appena ingrossati; in profondità alcuni segmenti possono presentare qualche occasionale brusco rigonfiamento fino a 12 µm. È presente un pigmento intracellulare bruno.

Giunti a fibbia assenti su tutte le strutture osservate.

Habitat entrambe le raccolte sono state effettuate a ridosso di formicai in boschi montani di *Picea abies* con gli esemplari riuniti in gruppetti di 2/3 basidiomi fascicolati.

Analisi filogenetica

Le nostre due sequenze sono andate a costituire, insieme ad altre 31 sequenze derivate da Genbank, il dataset per l'analisi filogenetica rappresentato da una matrice finale di 33 taxa per un totale di 670 caratteri (inclusi i gap). La nostra analisi, in accordo peraltro con quella di PARRA *et al.* (2015), mostra le nostre due sequenze di *Agaricus collegarum* formare, con le altre 8 depositate con tale nome in Genbank, un clade di dieci sequenze fortemente supportato statisticamente (BPP = 0.99 - **Figura 1**). Le dieci sequenze esibiscono una percentuale di identità del 99,98 % (Pairwise % Identity) con la presenza di un unico polimorfismo (W=A o T) nella sequenza dotata di accession number KP241116 e l'analisi non ha differenziato le raccolte in

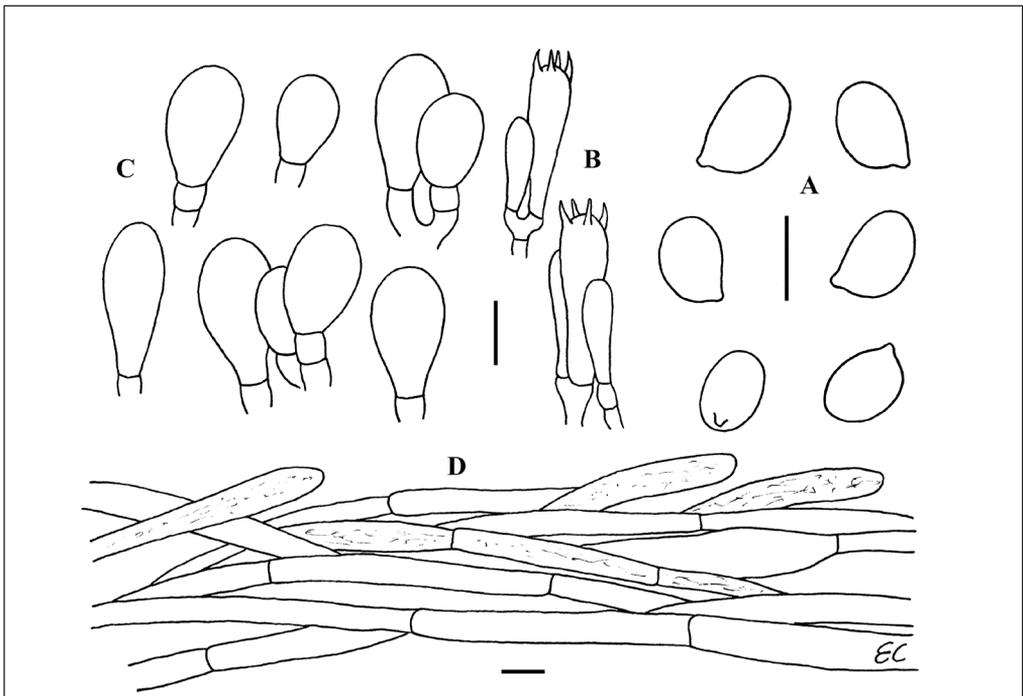


Tavola micro. *Agaricus collegarum*. A) spore; B) basidi; C) cheilocistidi; D) pileipellis. Barre: A = 5 µm; B, C, D = 10 µm.

Disegno di Emanuele Campo

Sect. *Nigrobrunnescentes*

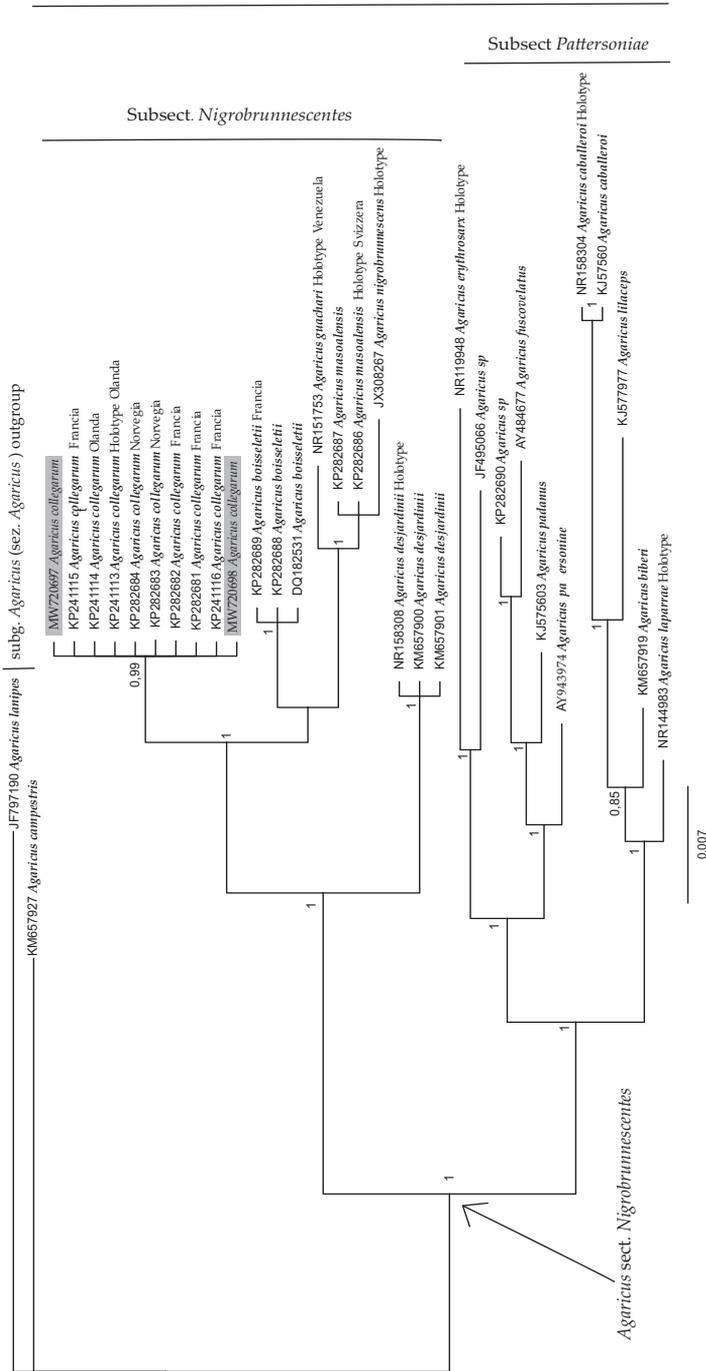


Fig 1: Albero filogenetico prodotto dall'analisi di inferenza bayesiana della regione ITS (ITS1-5.8s-ITS2) di specie appartenenti al genere *Agaricus* sez. *Nigrobrunnescentes*. A livello dei nodi sono indicati i valori di BPP, ≥ 0.8 . Le nostre due sequenze di *A. colligarium* e i relativi accession numbers sono evidenziati con una banda grigia. Albero filogenetico di Alessandro Fellin.

base all'area geografica. Il clade di *Agaricus collegarum* si colloca in posizione sister rispetto al clade di *Agaricus boisseletii* e quello rappresentato dalle sequenze rispettivamente di *Agaricus guachari*, *Agaricus nigrobrunnescens* e *Agaricus masoalensis* e, anche in questo caso, l'ipotesi appare supportata statisticamente (BPP=1 - **Figura 1**).

Osservazioni

Ciò che colpisce di questa specie è l'immediato viraggio delle superfici esterne, dopo manipolazione, al rosso vinaccia, poi al bruno-nerastro dopo qualche ora, carattere che, sommato ad un cappello vellutato-squamuloso e alla reazione di Schäffer negativa, ci ha permesso di ascriverlo ad *A. sez. Nigrobrunnescens* K.R. Peterson, Desjardin & Hemmes, di cui riportiamo la diagnosi originale: "*Pileus velutinus vel squamulosus, brunescens tactu. Stipes farinosus, atrobrunnescens vel nigrescens tactu. Odor mitis. Hyphae cuticulares pigmento brunneo spiralis incrustatae. KOH et Schäffer adficere nullae. Type species: Agaricus nigrobrunnescens K.R. Peterson, Desjardin & Hemmes.*" (PARRA, 2008; PETERSON *et al.*, 2000). Per la definizione macromorfologica della specie è invece importante avere a disposizione esemplari giovani in quanto alcuni caratteri determinanti possono scomparire; il gambo è infatti provvisto di una fine decorazione costituita da fibrille fiocose brunastre disposte a zig-zag e l'anello è effimero e anch'esso di consistenza fibrilloso-cotonosa. L'arrossamento, piuttosto evidente nella carne, può passare quasi inosservato sulle superfici di gambo e cappello quando manipolate, in quanto l'imbrunimento copre quasi istantaneamente questo iniziale passaggio cromatico. Nella stessa pubblicazione, in cui è stato creato *A. collegarum* (PARRA *et al.*, 2015), viene descritto come nuova specie anche *Agaricus masoalensis* L.A. Parra, Wilhelm & Callac, altra entità appartenente alla medesima sezione. Entrambe le specie sono accomunate da numerosi caratteri macro- e micromorfologici, ma avendo a disposizione giovani esemplari il cappello di quest'ultimo ha una colorazione biancastra con squamule più o meno concolori, contrariamente a quanto si nota in *A. collegarum* che presenta squame ocraceo-brunastre e di dimensioni maggiori. Il quadro microscopico non evidenzia differenze di rilievo tranne la dimensione dei cheilocistidi che, dai dati di letteratura, sembrano essere mediamente un po' più piccoli. Nei abbiamo rilevato la presenza delle restrizioni ai setti segnalate dagli autori, che sembrerebbero un carattere incostante e quindi non fondamentale (PARRA *com. pers.*). Per quanto riguarda l'habitat di *A. masoalensis* ad oggi è nota la sola stazione originale, ossia nella ricostruzione artificiale di una foresta pluviale presso lo zoo di Zurigo, mentre per *A. collegarum*, oltre alla sua presenza in ambiente artificiale (alcune raccolte olandesi in una serra con essenze tropicali), è nota la presenza anche in ambiente naturale. A parte le nostre raccolte alpine, è stato segnalato anche in Norvegia sotto *Picea abies* ed in Francia, ai margini di un prato sotto ciliegi e *Cupressus sp.*, e in altre stazioni sotto *Picea abies* e *Abies alba*. Un fattore, probabilmente non occasionale, che accomuna le nostre raccolte a queste ultime francesi è la crescita su formicai di *Formica rufa* s.l. *Agaricus boisseletii* Heinem. sembra essere difficilmente separabile da *A. collegarum* per la sovrapponibilità dei caratteri macro- e microscopici, tuttavia avendo a disposizione esemplari giovani si potrà notare un anello più corposo e di conseguenza più persistente, un odore definito di *Scleroderma*, ma soprattutto la reazione all' α -Naftolo dichiarata negativa (PARRA & MACAU, 2012). Tra i taxa extraeuropei che possono avere delle affinità con la specie in esame, oltre al tipo della sezione, *Agaricus nigrobrunnescens*, possiamo citare *Agaricus guachari* Calonge & Esteve-Rav. e *Agaricus desjardinii* Z.R. Wang, K.D. Hyde & R.L. Zhao. Da quanto si evince dalla descrizione originale e dalle foto a colori disponibili di *A. nigrobrunnescens* (PETERSON *et al.*, 2000; PARRA *et al.*, 2015) e di *A. guachari* (CALONGE & ESTEVE-RAVENTÒS, 1998), in entrambi le colorazioni chiare e le squame non particolarmente grandi li avvicinano di più ad *A. masoalensis*, inoltre il primo sembrerebbe confinato alle isole Hawaii, mentre il secondo al Venezuela. *A. guachari*, inoltre, possiede un pigmento incrostato sulle ife della pileipellis e dei cheilocistidi non rilevato negli altri taxa (CALONGE & ESTEVE-RAVENTÒS, 1998). Considerata l'omogeneità dei caratteri e la possibile variabilità intraspecifica è stato comunque

necessario procedere all'indagine molecolare per stabilire l'indipendenza delle quattro specie. *A. desjardinii* è del gruppo la specie che manifesta le maggiori differenze morfologiche; possiede, infatti, una squamatura del cappello ad apici rialzati, ha spore più grandi ($6,2-8 \times 4,9-6,8 \mu\text{m}$) ed è privo di cheilocistidi (WANG *et al.*, 2015), non per ultimo il fatto che per ora è stato trovato solo in Cina.

Ringraziamenti

Un doveroso ringraziamento a Umberto Zanghi, autore della raccolta friulana, e a Luis Alberto Parra per lo scambio di idee, la conferma della determinazione e la revisione critica del testo. Un ringraziamento per il supporto ricevuto va anche al Gruppo Micologico "G. Bresadola" Val di Sole, grazie al quale è stato possibile condurre le indagini genetiche di conferma sul campione trentino di *Agaricus collegarum*.

Indirizzi degli autori

EMANUELE CAMPO

Via dei Gelsi, 8 – IT 33077 Sacile (PN).

E-mail: emanuelemyc@gmail.com

ALESSANDRO FELLIN

Via G. Canestrini, 10/B – IT 38028 Novella (TN).

E-mail: fellin6384@yahoo.it

Bibliografia

- ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., SCHAFER A.A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W. & LIPMAN D.J. – 1997: *Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. (<https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>)
- CALONGE F.D. & ESTEVE-RAVENTÓS F. – 1998: *Agaricus guachari*, sp. nov. (Agaricales), from Venezuela. Bol. Soc. Micol. Madrid 23: 111-118.
- DARRIBA D., TABOADA GL., DOALLO R. & POSADA D. – 2012: *JMODELTEST2: more models, new heuristics and parallel computing*. Nature Methods 9(8): 772. (<https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>)
- GARDES M. & BRUNS T. D. – 1993: *ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts*. Molecular Ecology 2: 113-118.
- KATO H., MISAWA K., KUMA K. & MIYATA T. – 2002: *MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform*. Nucleic Acids Res. 30: 3059-3066.
- MAHDIZADEH V., PARRA L.A., SAFAIE N., MOHAMMADI-GOLTAPEH E., CHEN J., GUINBERTEAU J. & CALLAC P. – 2017: *A phylogenetic and morphological overview of sections Bohusia, Sanguinolenti, and allied sections within Agaricus subg. Pseudochitonina with three new species from France, Iran and Portugal*. Fungal Biology. 122(1): 34-51.
- MURRAY M.G. & THOMPSON W.F. – 1980: *Rapid isolation of high molecular weight plant DNA*. Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.
- MULLIS K. & FALOONA F.A. – 1987: *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods in Enzymology 155: 335-350.
- PARRA L.A. – 2008: *Agaricus L. - Allopsalliota Nauta & Bas*, Fungi Europaei. Vol. 1. Edizioni Candusso. Alassio.
- PARRA L.A. & MACAU N. – 2012: *Agaricus boisseletii*, primeras citas para España. Bol. Micol. FAMCAL 7: 13-18.
- PARRA L.A., MUÑOZ G. & CALLAC P. – 2014: *Agaricus caballeroi* sp. nov., una nueva especie de la sección *Nigrobrunnescens* recolectada en España. Micol. Veget. Medit. 29(1): 21-38.
- PARRA L.A., WISMAN J., GUINBERTEAU J., WILHELM M., WEHOLT Ø., MUSUMECI E. & GEML J. – 2015: *Agaricus collegarum* and *Agaricus masoalensis*, two new taxa of the section *Nigrobrunnescens* collected in Europa. Micol. Veget. Medit. 30(1): 3-26.

- PETERSON K.R., DESJARDIN D.E. & HEMMES D.E. – 2000: *Agaricales of the Hawaiian Islands. 6. Agaricaceae I. Agaricaceae: Agaricus and Melanophyllum*. *Sydowia* 52(2): 204-257.
- RONQUIST F., TESLENKO M., VAN DER MARK P., AYRES DL., DARLING A., HOHNA S., LARGET B., LIU L., SUCHARD MA. & HUELSENBECK J.P. – 2012: MRBAYES 3.2 *efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space*. *Systematic Biology* 61: 539-542. (<https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>)
- TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A. & KUMAR S. – 2013: *MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0*. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725-2729. (<https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>)
- WANG. Z.-R., PARRA L.A., CALLAC P., ZHOU J.-L., FU W.-J., DUI S.-H., HYDE K.D. & ZHAO R.-L. – 2015: *Edible species of Agaricus (Agaricaceae) from Xinjiang province (Western China)*. *Phytotaxa* 202(3): 185-197.
- WHITE T. J., BRUNS T. D., LEE S. & TAYLOR J. W. – 1990: *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J., White T.J. (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic, San Diego.