

MARIO MELIS, ALBERTO MUA, MASSIMO SANNA, GIUSEPPE PORCU, MARCO CASULA

LYOPHYLLUM MALEOLENS E *LYOPHYLLUM AEMILIAE*
DUE SPECIE SIMILI MA DISTINTE

Riassunto

Viene stabilita l'indipendenza di *L. maleolens* da *L. aemiliae* tramite l'analisi molecolare dei *typus* e chiarite alcune interpretazioni corrette e non, presenti nella letteratura. Al presente numero viene allegata una versione in inglese dell'articolo.

Abstract

The independence of *L. maleolens* from *L. aemiliae* is sanctioned through the molecular analysis of the *typus* and clarified some correct and incorrect interpretations present in the literature. An English version of the article is attached to this issue.

Key words Agaricales, Lyophyllaceae, *Lyophyllum*, *L. aemiliae*, *L. maleolens*, taxonomy.

Introduzione

Lyophyllum maleolens Melis & Contu e *Lyophyllum aemiliae* Consiglio sono due specie che in base alle caratteristiche macro e micromorfologiche sono appartenenti alla sez. *Semitalina* (Singer) Consiglio & Contu per le spore lisce e i basidi in media superiori a 30 µm ed alla subsez. *Semitalina* Consiglio & Contu, per le spore ellissoidali o subfusiformi e per le lamelle non gialle. All'interno della subsezione si caratterizzano per le lamelle assumenti al tocco una colorazione da gialla ad arancio-rossastra prima di annerire. Le specie in questione sono poco conosciute e talvolta mal interpretate. Per evitare che le stesse siano sinonimizzate o cadano nell'oblio, gli autori ne hanno tratto sequenze delle regioni ITS e rpb2 del rDNA, utilizzando due raccolte di *L. aemiliae* (tra cui un *isotypus*) e una di *L. maleolens* (*epitypus*). Tale esigenza è emersa nel momento in cui alcuni autori hanno interpretato diversamente *L. maleolens*.

BELLANGER (2016) fa riferimento ad un *L. maleolens* ss. Corriol ed a un *L. maleolens* ss. Bidaud, che nell'albero filogenetico proposto da Bidaud e precedentemente dallo stesso BELLANGER *et al.* (2015) si posizionano rispettivamente nei cladi Va 13 e Va 11.

Ebbene il *typus* di *L. maleolens* corrisponde alla raccolta presente nel clado Va 13 (ss. CORRIOL FR2014066), mentre il *typus* di *L. aemiliae* a quella presente nel clado Va 11 (ss. BIDAUD FR2014018).

In questo lavoro vengono confrontati i caratteri macroscopici, microscopici, ambientali e molecolari dei due taxa.

Materiali e Metodi

Descrizione macroscopica e microscopica

Per la descrizione macroscopica si rimanda ai lavori originali (CONSIGLIO 1998, MELIS & CONTU 2001). L'osservazione microscopica, invece, è stata effettuata in questo studio e confrontata con quella dei lavori originali. Essa è stata compiuta su materiale essiccato dei *typus*, (compreso l'*holotypus* di *L. maleolens*, del quale è stato possibile studiare la microscopia ma non è stato possibile ottenere le sequenze genetiche). Il materiale essiccato è stato reidratato con idrato

d'ammonio al 3%. I preparati sono stati osservati in rosso Congo anionico o in acqua con microscopi OPTIKA. I dati relativi alle misure sporiali sono il risultato di almeno 32 misurazioni per ogni raccolta. Ogni spora è stata misurata tramite il software piximètre su immagini ottenute da telecamere dedicate ai microscopi utilizzati.

Il dato relativo alle dimensioni sporiali, lunghezza e larghezza, è stato ottenuto seguendo il metodo statistico proposto da HEINEMANN & RAMMELOO (1985). Il dato ottenuto è composto da un primo numero tra parentesi che rappresenta le spore più piccole, un secondo numero senza parentesi che rappresenta il valore minore ottenuto dalla deviazione standard, un terzo numero sottolineato che indica il valore medio, un quarto numero che individua il valore maggiore ricavato dalla deviazione standard ed infine un ultimo numero il cui valore è quello relativo alle spore più grandi. Il QM (Quoziente Medio) è dato dalla media aritmetica dei quozienti delle singole spore. Il quoziente di una spora è il rapporto tra lunghezza e larghezza. Dalle misurazioni è escluso l'apicolo.

Scelta dei campioni

Sono stati analizzati i caratteri microscopici e molecolari dell'*isotypus* di *L. aemiliae* e di un'altra raccolta della stessa specie, entrambe gentilmente fornite dal prof. Giovanni Consiglio, autore delle specie (CONSIGLIO 1998). È stata rianalizzata microscopicamente anche la raccolta *holotypus* di *L. maleolens*, purtroppo i vari tentativi di estrazione del DNA sono falliti. È stata quindi presa in esame una raccolta effettuata da Mario Melis, coautore della specie e raccogliitore dell'*holotypus*, nello stesso luogo della raccolta originale, che in questa sede viene designata come *epitypus*.

Analisi molecolare

Il DNA totale è stato estratto ed amplificato dal laboratorio Alvalab di Oviedo (Spagna) secondo la metodica standardizzata del laboratorio. (ALVARADO *et al.* 2010, 2012). Dopo aver ottenuto le sequenze del tratto che comprende 18S parziale, ITS1, 5,8S e ITS2 totali, 28S parziale, è stato analizzato il marcatore rpb2. Le sequenze sono state confrontate tramite il software Blast (ALTSCHUL *et al.* 1990) del website NCBI con le sequenze simili presenti nelle banche dati presenti sul web, Unite e GenBank.

L'albero filogenetico è stato così ottenuto: sono stati elaborati due dataset contenenti diverse sequenze delle regioni ITS e rpb2 relative alle specie appartenenti al genere *Lyophyllum*, clado Va secondo BELLANGER *et al.* (2015), prelevate dal database GenBank, includendo anche le sequenze delle raccolte dei *typus* di *L. aemiliae* e di *L. maleolens*; è stata aggiunta anche la sequenza relativa a *Tephrocycbe anthracophila*, GenBank KP192640 (regione ITS), KP192522 (rpb2) con funzione di outgroup.

Le sequenze dei due database sono state allineate separatamente tramite l'applicazione Muscle del software MEGA 6 (TAMURA *et al.* 2013); esse sono state combinate tramite il software MESQUITE (MADDISON & MADDISON 2017) e, dopo aver ottenuto il file con estensione .phy, è stato utilizzato il sistema di massima verosimiglianza (Maximum Likelihood) per mezzo del programma RAXMLGUI 2.0 (EDLER *et al.* 2020), impostando come parametri bootstrap 1000 e modello GTRGAMMA. L'albero filogenetico così ottenuto dall'analisi combinata è stato elaborato con il software ThreeGraph 2.

Dal software Mesquite è stato ottenuto anche il file "nexus for Mr. Bayes" che ha permesso di calcolare la probabilità a posteriori per mezzo del programma Mr. Bayes versione 3.2.7 (RONQUIST *et al.* 2012), utilizzando i seguenti parametri: 10 milioni di generazioni, frequenza di campionamento 1000 e infine il valore del 25% per il sumt e sump burnin. Anche in questo caso l'albero filogenetico ottenuto è stato elaborato con il software ThreeGraph 2 tramite il quale i valori di ML sono stati trasferiti nei corrispondenti rami dell'albero ottenuto con M. Bayes.

TASSONOMIA

Lyophyllum aemiliae Consiglio, *Rivista di Micologia* LXI (2): 99-104 (1998)

Raccolte studiate GC 92218 - AE01 (*isotipus*): Parco La Martina (Monterenzio, BO), 14.11.1992, leg. G. Consiglio & S. Spisni, GenBank regione ITS OQ195776, rpb2 OQ286519. GC 92219 - AE02 è una seconda raccolta fatta lo stesso giorno nella stessa stazione. GenBank regione ITS OQ195773.

Descrizione macroscopica (da CONSIGLIO 1998)

Cappello 4-7 cm, piano-convesso con largo umbone ottuso e margine ondulato-lobato, leggermente striato.

Rivestimento pileico lubrificato, igrofano, grigio-bruno non uniforme, irregolarmente macchiato di larghe chiazze più scure, bruno-nerastre.

Lamelle piuttosto fitte, adnate o smarginate biancastre o un po' grigiastre, viranti al tocco al giallo rossiccio ruggine, un po' aranciato, più o meno persistente, e poi annerenti.

Gambo 50-80 × 4-8 mm., piuttosto slanciato, regolare, cilindraceo o leggermente attenuato in basso, talvolta leggermente ricurvo, di colore grigiastro-brunastro, più chiaro nel cappello, al di sotto di finissime fibrille sericee biancastre, longitudinali, con la base irsuta per un feltro miceliare cotonoso, biancastro.

Carne soda, biancastra, ingrignente al taglio, odore e sapore deboli, gradevoli, erbacei.

Descrizione microscopica (effettuata nuovamente in questo lavoro)

Spore (7,69) 7,93-8,66-9,4 (10,47) × (4,6) 4,67-5,08-5,49 (6,07) µm, Q = 1,61-1,81, QM = 1,71, ellissoide-fusiformi, lisce, spesso con grossa guttula centrale.

Basidi 36-46 × 11-13,5 µm, clavati, tetrasporici.

Pleurocistidi assenti.

Cellule marginali non osservate.

Pileipellis cutis con ife gelificate, cilindriche, parallele, spesse 2,5-6 µm.

Lyophyllum maleolens Melis & Contu, *Micologia e Vegetazione Mediterranea*, vol. 15 (2): <101-105 (2001) [2000]

Raccolte studiate *holotipus*: Italia, Sardegna, Domusnovas (SU), Foresta del Marganai, loc. Sa Duchessa, 13 gennaio 2001, leg. Mario Melis.

Epitypus qui designato, poiché dopo vari tentativi, non è stato possibile ottenere la sequenza dell'*holotipus*, in quanto deteriorato; inoltre la specie viene interpretata da vari autori in modo non univoco. L'*epitypus* proviene da Domusnovas (SU), loc. Sa Duchessa, raccolto da Mario Melis in data 1° dicembre 2012 ed è stato depositato nell'erbario CAG (HOLMGREN *et al* 1990) con il numero C 13.9.6a (copia in erbario Mua EX13); GenBank: Regione ITS OQ195779, rpb2 OQ286518.

L'*holotipus* venne depositato da Mario Melis nell'erbario del dipartimento delle Scienze e dell'Ambiente, sez. Botanica, dell'Università degli Studi di Cagliari, censito nell'*Index Herbariorum* con l'acronimo CAG (HOLMGREN *et al.* 1990) al quale fu assegnato il codice C/13.9.6.

Descrizione macroscopica (da MELIS & CONTU 2002)

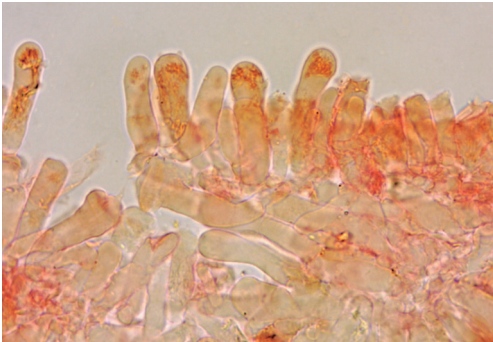
Cappello 2-6,5 cm, mediamente carnoso di consistenza non cartilaginea, emisferico poi più allargato ed infine appianato, centro non umbonato, umido, nudo, radialmente fibrilloso ma liscio, beige-brunastro, bruno carico o bruno-grigio, margine ondulato con brevi e sottili striature anche nel giovane.



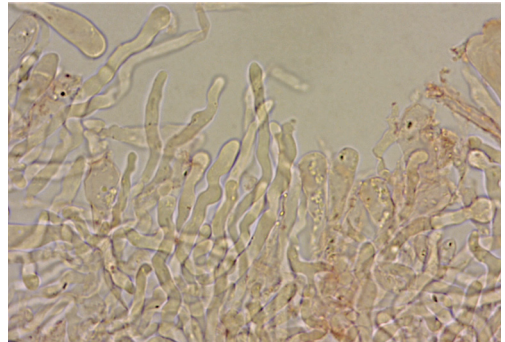
Lyophyllum aemiliae GC 92219. Foto di Giovanni Consiglio



Lyophyllum maleolens C 13.9.6a. Foto di Mario Melis



L. aemiliae. Filo lamellare privo di peli marginali (1000×).
Foto di Giuseppe Porcu



L. maleolens. Filo lamellare con numerosi peli marginali (1000×).
Foto di Giuseppe Porcu

Lamelle mediamente fitte, diseguali, adnato-smarginate o uncinato-adnate, beige-ocracee, relativamente cupe, al tocco viranti istantaneamente al fulvo ruggine, poi spiccatamente annerenti, taglio concolore alla faccia.

Gambo 5,8 × 1,5-2,5 cm, pieno poi cavo, cilindrico, biancastro, finemente fibrilloso, alla base ornato da evidenti tricoidi bianchi lunghi fino a 2 mm.

Carne elastica, arrossante al tocco, al taglio imbrunente poi annerente, odore forte, farinoso-spermatocico, persistente e intensificantesi nell'essiccamento, nel complesso piuttosto sgradevole; sapore nettamente farinoso poi (dopo alcuni secondi) leggermente astringente. Probabilmente non commestibile.

Descrizione microscopica (effettuata nuovamente in questo lavoro)

Spore (8,05) 8,22-8,78-9,34 (9,84) × (4,06) 4,56-4,88-5,2 (5,87) μm, Q = 1,69-1,92, QM = 1,8, ellissoide-fusiformi, anche larmiformi, lisce, spesso monoguttulate.

Basidi clavati, tetrasporici, 35-40 × 9-15 μm con evidenti granulazioni siderofile.

Pleurocistidi assenti.

Cellule marginali numerose, filiformi, talvolta capitulate, raramente lageniformi, spesse 2,5-7 μm.

Pileipellis cutis con ife gelificate, parallele e in parte intrecciate, spesse 2-5,5 μm.

Differenze macroscopiche e microscopiche tra i due taxa

Sono state tratte in parte dai nostri studi e in parte dalle descrizioni originali: *L. aemiliae* (CONSIGLIO 1998) e *L. maleolens* (MELIS & CONTU 2001); e, per entrambe, da CONSIGLIO & CONTU (2002).

Lyophyllum maleolens ha di norma il colore del cappello più chiaro, beige-brunastro e fibrille radiali innate, lamelle viranti inizialmente al fulvo ruggine, infine annerenti, carne arrossante, poi imbrunente, infine annerente, odore e sapore sgradevoli con componente farinosa e presenza di numerosissime cellule marginali.

Taxa voucher ITS rpb2

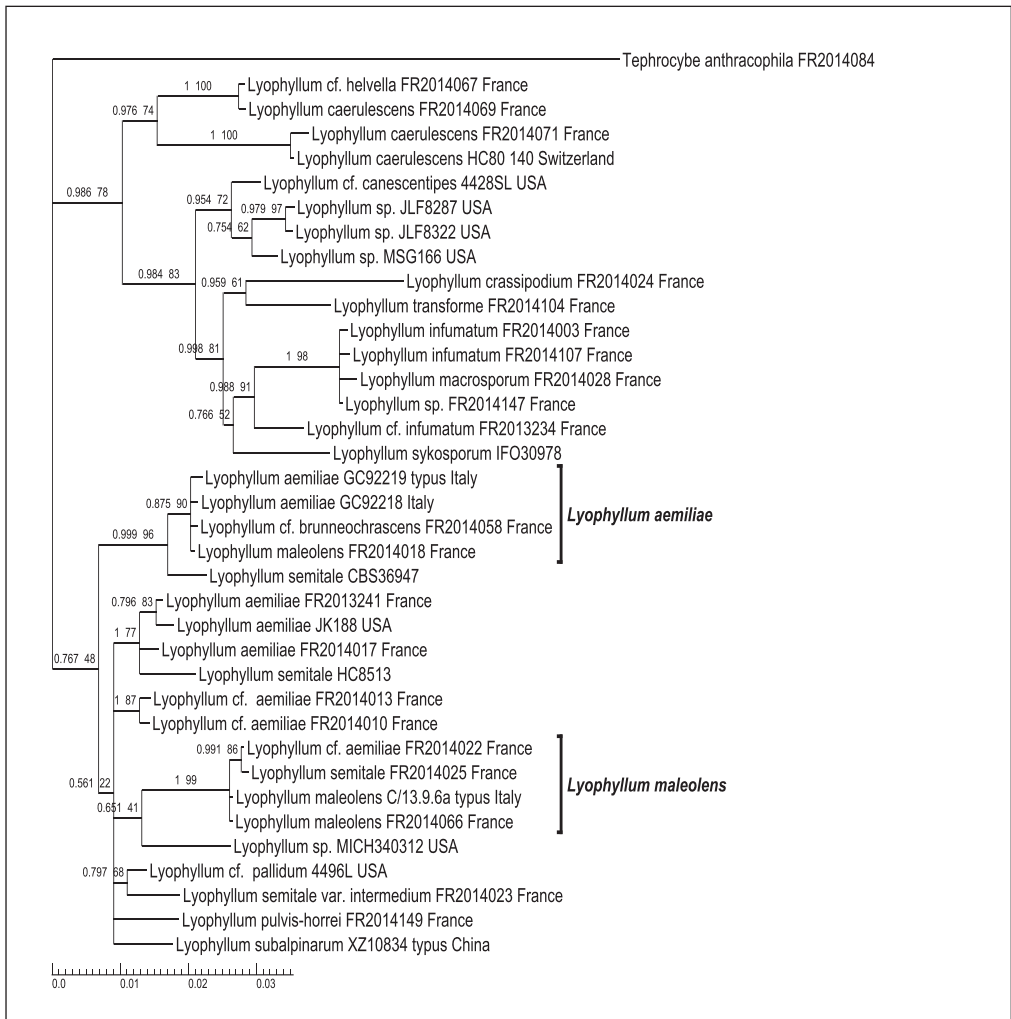
Taxa	voucher	ITS	rpb2
<i>Lyophyllum aemiliae</i>	GC 92219	OQ195773	OQ286519
<i>Lyophyllum aemiliae</i>	GC 92218	OQ195776	
<i>Lyophyllum aemiliae</i>	FR2013241	KP192562	
<i>Lyophyllum aemiliae</i>	FR2014017	KP192596	
<i>Lyophyllum aemiliae</i>	JK188	ON503032	
<i>Lyophyllum cf. aemiliae</i>	FR2014013	KP192591	
<i>Lyophyllum cf. aemiliae</i>	FR2014010	KP192582	KP192505
<i>Lyophyllum cf. aemiliae</i>	FR2014022	KP192597	KP192507
<i>Lyophyllum cf. brunneochrascens</i>	FR2014058	KP192618	
<i>Lyophyllum cf. helvella</i>	FR2014067	KP192625	KP192516
<i>Lyophyllum caerulescens</i>	FR2014069	KP192626	
<i>Lyophyllum caerulescens</i>	FR2014071	KP192628	KP192517
<i>Lyophyllum caerulescens</i>	HC80/140	AF357052	EF421000
<i>Lyophyllum cf. canescentipes</i>	4428SL	KU574741	
<i>Lyophyllum crassipodium</i>	FR2014024	KP192608	KP192509
<i>Lyophyllum infumatum</i>	FR2014003	KP192584	KP192504
<i>Lyophyllum infumatum</i>	FR2014107	KP192655	KP192529
<i>Lyophyllum cf. infumatum</i>	FR2013234	KP192557	KP192500
<i>Lyophyllum macrosporum</i>	FR2014028	KP192612	
<i>Lyophyllum maleolens</i>	C/13.9.6 a	OQ195779	OQ286518
<i>Lyophyllum maleolens</i>	FR2014066	KP192624	KP192515
<i>Lyophyllum maleolens</i>	FR2014018	KP192607	KP192506
<i>Lyophyllum cf. pallidum</i>	4496SL	KU574739	
<i>Lyophyllum pulvis-horrei</i>	FR2014149	KP192665	KP192532
<i>Lyophyllum semitale</i>	CBS36947	AF357048	
<i>Lyophyllum semitale</i>	FR2014025	KP192598	
<i>Lyophyllum semitale</i>	HC85/13	AF357049	EF421002
<i>Lyophyllum semitale var. intermedium</i>	FR2014023	KP192604	KP192508
<i>Lyophyllum subalpinarum</i>	XZ10834	OP605492	
<i>Lyophyllum sykosporum</i>	IFO30978	AF357050	EF421003
<i>Lyophyllum transforme</i>	FR2014104	KP192653	KP192528
<i>Lyophyllum sp.</i>	JLF8287	ON259690	
<i>Lyophyllum sp.</i>	JLF8322	MT355555	
<i>Lyophyllum sp.</i>	MICH340312	OM985834	
<i>Lyophyllum sp.</i>	FR2014147	KP192664	KP192531
<i>Lyophyllum sp.</i>	MSG166	KU058499	KU138999
<i>Tephrocybe anthracophila</i>	FR2014084	KP192640	KP192522

Lyophyllum aemiliae ha il colore del cappello più scuro, grigio-bruno con chiazze brunonerastre, assenza di fibrille, lamelle viranti, inizialmente con una componente giallastra, giallo-aranciata, infine annerenti, carne ingrignente, con odore e sapore deboli, gradevoli, erbacei e assenza di cellule marginali.

Le differenze sporali tra le due specie non sono significative.

Risultati

L'albero filogenetico proposto evidenzia la separazione delle specie riferentesi a *L. aemiliae* e a *L. maleolens*, per le quali si conferma la diversità interspecifica; inoltre, si attribuisce a *L. maleolens* ss. Corriol la corrispondenza al *typus*, mentre *L. maleolens* ss. Bidaud è da attribuire a *L. aemiliae*.



Albero filogenetico bayesiano dedotto dai dataset nrITS e rpb2 di *Lyophyllum* clado Va (BELLANGER 2015). Sui rami sono riportati i valori di probabilità bayesiana a posteriori (BPP) e i corrispondenti valori di supporto di Maximum Likelihood Bootstrap (MLB). *Tephrocye anthracophila*, Genbank KP192640, è stato utilizzato come taxon outgroup.

Discussione

In rapporto alle collezioni francesi di cui ai Cladi Va 13 e Va 11 nell'albero filogenetico, proposto da BELLANGER (2016) e precedentemente da BELLANGER *et al.* (2015), possiamo evidenziare le differenze macro e micromorfologiche tra *L. maleolens*, *L. aemiliae* e le altre specie indicate:

Lyophyllum brunneo-ochrascens E. Ludw. si caratterizza per i carpofori di piccole dimensioni (il cappello misura 2-4,5 cm) direttamente annerenti in tutte le loro parti, l'odore e sapore farinosi, le spore ellissoidi e l'assenza di cellule marginali (LUDWIG 2001);

Lyophyllum semitale (Fr.) Kühner è una specie fortemente e direttamente annerente in tutte le sue parti, con odore debole farinoso e spore fusiformi allungate;

Lyophyllum semitale var. *intermedium* Romagn. si distinguerebbe dal precedente, con cui attualmente viene sinonimizzato, per le piccole dimensioni (il cappello misura 2-4 cm) e le spore più piccole (ROMAGNESI 1987);

Lyophyllum pulvis-horrei E. Ludw. & Koeck si caratterizza per le piccole dimensioni (cappello 1-3,8 cm), il carpoforo e le lamelle direttamente annerenti se contuse, con odore caratteristico come di polvere di fienile, poi farinoso allo sfregamento e spore sferiche o largamente ellittiche di dimensioni inferiori (LUDWIG 2001).

Recentemente (WEI *et al.* 2023) sono state pubblicate dalla Cina nuove specie di *Lyophyllum*, in particolare *Lyophyllum subalpinarum* S.W. Wei, Q. Wang & Yu Li, che nell'articolo appare filogeneticamente correlato a *Lyophyllum maleolens*, a *Lyophyllum pulvis-horrei* e a *Lyophyllum semitale*. La nuova specie *L. subalpinarum* si differenzia da *L. maleolens* per il cappello con colorazioni giallastre, giallo-grigiastre, le lamelle direttamente annerenti se contuse, le spore da cilindrico arrotondate a irregolarmente romboidali di dimensioni inferiori e l'assenza di cellule marginali.

Ringraziamenti

Si ringrazia sentitamente il prof. Giovanni Consiglio per aver messo a disposizione alcune foto e alcune raccolte *typus* relative a *L. aemiliae*, nonché per i preziosi suggerimenti e l'attiva collaborazione nella parte relativa alla biologia molecolare. Si ringrazia, inoltre, la D.ssa Roberta Lai, curatrice dell'erbario CAG, per aver messo a disposizione l'*holotypus* relativo a *L. maleolens*.

Indirizzi degli autori

MARIO MELIS

Via Cavarò 45 - 09131 Cagliari (CA).

E-mail: mariomelis02@gmail.com

ALBERTO MUA

Via Spano 8 - 09045 Quartu Sant'Elena (CA).

E-mail: albermua@gmail.com

MASSIMO SANNA

Via Famagosta 13, 09134 Cagliari (CA).

E-mail: massanfungo@gmail.com

GIUSEPPE PORCU

Via Marongiu 32 - 09026 S. Sperate (SU).

E-mail: pinoporcu.ss@gmail.com

MARCO CASULA

Via Piave 21 - 09048-Sinnai (CA).

E-mail: casula.mek@gmail.com

Bibliografia

- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W. & LIPMAN D.J. – 1990: Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- ALVARADO P., MANJÓN J.L., MATHENY P.B. & ESTEVE-RAVENTÓS F. – 2010: *Tubariomyces*, a new genus of *Inocybaceae* from the Mediterranean region. *Mycologia* 102 (6): 1389-1397.
- ALVARADO P., MORENO G. & MANJÓN J.L. – 2012: Comparison between *Tuber gennadii* and *T. oligospermum* lineages reveals the existence of the new species *T. cistophilum* (Tuberaceae, Pezizales). *Mycologia* 104 (4): 894-910.
- BELLANGER J.M., MOREAU, P.A., CORRIOL, G., BIDAUD, A., CHALANGE, R., DUDOVA, Z. & RICHARD, F. – 2015: Plunging hands into the mushroom jar: a phylogenetic framework for *Lyophyllaceae* (Agaricales, Basidiomycota). *Genetica* 143 (2): 169-194.
- BELLANGER J.M. – 2016: Les *Lyophyllaceae*. *Bull. FAMM., N. S.*, 49: 31-40.
- CONSIGLIO G. – 1998: Un nuovo *Lyophyllum* dall'Italia. *Rivista di Micologia* XLI (2): 99-104.
- CONSIGLIO G. & CONTU, M. – 2002: Il genere *Lyophyllum* P. Karst. emend. Kühner in Italia. *Rivista di Micologia* XLV (2): 116-119.
- 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*, 00: 1-5.
- HEINEMANN P. & RAMMELOO J. – 1985: De la mesure des spores et son expression. *Agarica* 6: 366-380.
- HOLMGREN P.K., HOLMGREN N.H. & BARNETT L.C. – 1990: *Index herbariorum. Part I: The herbaria of the world. 8th edition*. New York Botanical Garden.
- LUDWIG E. – 2001: *Pilzkompedium, Band 1 (Textband)*. IHW-Verlag, Eching.
- MADDISON W.P. & MADDISON D.R. – 2017: *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Version 2.0.
- MELIS M. & CONTU M. – 2001 [2000]: Una nuova specie di *Lyophyllum* sect. *Lyophyllum* dalla Sardegna meridionale: *L. maleolens* spec. nov. *Micologia e Vegetazione Mediterranea* Vol.15 (2): 101-105.
- ROMAGNESI E. – 1986: *Sur la tribu del Lyophylleae Kühner* (Agaricales, Tricholomaceae). *Beitr Kenn. Pilz Mittel* 'III: 17-123.
- RONQUIST, F. M. TESLENKO P., VAN DER MARK D.L., AYRES A., DARLING S., HÖHNA B., LARGET L., LIU L., SUCHARD, M.A. & HUELSENBECK J.P. – 2012: MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61 (3): 539-542.
- TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., & KUMAR S. – 2013: MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30 (12): 2725-2729.
- WEI S.-W., LU B.-Y., WANG Y., DOU W.-J., WANG Q. & LI Y. – 2023: Morphology and phylogeny of lyophylloid mushrooms in China with description of four new species. *Journal of Fungi* 9: 77.