

FRANCESCA FLOCCIA, GIOVANNI SEGNERI, PABLO ALVARADO

COPRINUS XEROPHILUS
UNA SPECIE AMERICANA TROVATA A ROMA

Riassunto

Viene segnalata e descritta una raccolta di *Coprinus xerophilus* Bogart avvenuta nell'areale romano. Viene fornita una descrizione dei caratteri morfologici e microscopici. Vengono, infine, fatte alcune considerazioni sulle sequenze ITS, tef1 e rpb2.

Abstract

A collection of *Coprinus xerophilus* Bogart collected near the city of Rome is here reported. A description of the macro-morphological and microscopic characters is provided. ITS, tef1 and rpb2 sequences were obtained and compared with those of the most closely related species.

Key words Basidiomycota, Agaricomycetes, Agaricaceae, *Coprinus*, *C. xerophilus*, Roma, Italy.

Introduzione

Il genere *Coprinus*, inteso in senso tradizionale, è uno dei generi più studiati fra i Basidiomycetes, probabilmente per la facilità con la quale diverse specie nascono o possono essere coltivate in ambiente artificiale. Tradizionalmente comprende specie saprotrofe, a lamelle, di taglia piccola o media, generalmente gracili, più o meno deliquescenti, con o senza anello, con sporata nera o nera con tonalità porpora e spore da lisce a verrucose. La classificazione all'interno del genere è stata da sempre fondata sulle caratteristiche delle spore, dei cheilocistidi, del velo generale e della pileipellis.

LANGE (1938) ha sottolineato l'importanza della struttura della pileipellis, creando un sistema di suddivisione sottospecifico che con il passare degli anni ha mantenuto buona parte della propria validità; a tale sistema si sono rifatti gli studi di KÜHNER & ROMAGNESI (1953) e SINGER (1975).

Sebbene sia stato studiato con particolare attenzione fin dai tempi di FRIES (1874), il genere *Coprinus* si è rivelato poi essere eterogeneo (REIJNDERS 1979). La caratteristica più diffusa che aveva tenuto insieme questi taxa era la deliquescenza (oggi considerato un carattere omoplastico), malgrado alcune specie non la avessero manifestato in modo chiaro e inequivocabile; altro elemento fondamentale che ne aveva ostacolato la separazione, era costituito dalla presenza di molte forme con caratteristiche intermedie.

KÜHNER (1928) aveva tentato una separazione delle specie non deliquescenti, ma risultò problematico il trasferimento di taxa nel vicino genere *Psathyrella* (Fr.) Quél., in quanto i due generi non erano stati ben circoscritti e differenziati. Nello scorso secolo, lo studio tassonomico fondato sulle caratteristiche morfologiche, ecologiche e ontologiche per individuare le relazioni fra le specie, è stato utilizzato da diversi autori, tra cui KÜHNER & ROMAGNESI (1953); REIJNDERS (1963, 1979), ORTON & WATLING (1979); KITS VAN WAVEREN (1985); CITÉRIN (1992, 1994).

Comunque, per quanto pregevoli, i risultati prodotti non hanno permesso di risolvere le problematiche esistenti, infatti i caratteri morfologici da soli si sono dimostrati inadeguati e con grossi limiti. Nessuna delle suddivisioni sottogeneriche adottate da diversi autori fino alla fine del secolo scorso è stata in grado di interpretare correttamente le reali relazioni filogenetiche.

Studi molecolari iniziati verso la fine dello scorso secolo e proseguiti in questi primi anni del corrente secolo hanno dimostrato che il genere *Coprinus* s.l. è inequivocabilmente polifiletico

(HOPPLE & VILGALYS 1994, 1999) e alcuni caratteri morfologici, fino ad allora poco valutati, hanno assunto in quel momento un significato tassonomico di rilievo.

Più in dettaglio, i taxa del genere *Coprinus* risultano oggi suddivisi in due gruppi monofiletici (MONCALVO *et al.* 2002; HOPPLE *et al.* 1999), il primo ulteriormente divisibile in due sottogruppi o cladi, molto vicini a *Psathyrella*, il secondo, un po' a sorpresa, vicino alle *Agaricaceae* Chevall.

Infatti, non è trascorso molto tempo da quando è stata pubblicata una riforma sistematica e tassonomica (REDHEAD *et al.* 2001) che rassomiglia a una vera e propria rivoluzione. I taxa che sono risultati raggruppati nel primo gruppo monofiletico sono stati trasferiti e distribuiti su tre generi, due già disponibili, *Coprinopsis* P. Karst. e *Coprinellus* P. Karst., il terzo, nuovo, *Parasola* Redhead, Vilgalys & Hopple.

Questi tre generi, unitamente a *Psathyrella* (Fr.) Quél., con cui formano un unico grande gruppo, sono stati collocati nella famiglia Psathyrellaceae (Singer) Vilgalys, Moncalvo & Redhead, che presto mostra caratteri di polifilia. Vengono trasferiti molti taxa da un genere a un altro (LARSSON & ÖRSTADIUS 2008; ÖRSTADIUS *et al.*, 2015) e ove necessario vengono pubblicati nuovi generi (ÖRSTADIUS *et al.* 2015; WÄCHTER & MELZER 2020).

Proprio WÄCHTER & MELZER (2020) hanno pubblicato il nuovo genere *Tulosesus*, nel quale vengono inseriti taxa che erano stati raggruppati nel genere *Coprinellus*. Alcuni di questi, come *C. impatiens* (Fr.) Quél., *C. marculentus* Britzelm. e *C. subimpatiens* M. Lange & A.H. Sm. provengono dal vecchio genere *Coprinus*.

Oggi, il genere *Coprinus* s.str., inserito nella famiglia *Agaricaceae*, comprende i taxa che erano compresi nella vecchia sez. *Coprinus*, sottosez. *Coprinus* (ULJÉ & NOORDELOOS 1993, 1997), come *C. comatus* (O.F. Müll.) Pers., specie tipo del genere, *C. sterquilinus* (Fr.) Fr., *C. spadiceisporus* Bogart, *C. calypttratus* Peck e *C. xerophylus* Bogart, ecc.

Le caratteristiche più significative che posseggono sono: il gambo con trama cotonosa-lanosa lungo l'asse centrale, un anello o una pseudovolvea, il velo generale filamentoso e consistente, unito al disco e rotto in squame rialzate verso la periferia del cappello, lamelle che si colorano di rosa prima di annerire, assenza di pleurocistidi, basidi dimorfici, pileipellis tipo cutis.

La stretta parentela dimostrata con le specie di *Agaricus* L. ha destato una sorpresa in quanto inattesa. Dal punto di vista morfologico questa parentela si spiega per il passaggio delle lamelle dal colore iniziale bianco al rosa prima di annerire a seguito della produzione delle spore.

In data 4 e 5 maggio 2021 una di noi (F.F.) ha trovato diversi carpofori appartenenti al genere *Coprinus* Pers., la cui determinazione di specie è stata oggetto di studio. Gli esemplari raccolti si sono presentati in diversi stadi di accrescimento, giovani, maturi e secchi. Zona del ritrovamento è il quartiere periferico di Roma denominato Ponte di Nona, nel quadrante est della capitale. Il ritrovamento è stato fatto in un campo agricolo abbandonato nella Zona Acqua Vergine (**Foto 1**), situata lungo la Via Collatina ed estesa fuori dal Grande Raccordo Anulare, limitata dalla Via Prenestina a sud e dal Fiume Aniene a Nord. Questa zona ancora oggi conserva aree di campagna prive di costruzioni, mantenendo inalterato il suo aspetto originario.

Il nome della zona è dovuto, appunto, alla sorgente dell'acquedotto dell'Acqua Vergine, che si trova nell'area nota come Salone.

Le sorgenti sono ubicate ove in affioramento sono presenti delle Pozzolane Rosse. Dal punto di vista idrogeologico si tratta di emergenze dell'importante falda idrica di base presente nei depositi vulcanici dell'unità idrogeologica dei Colli Albani. Tale falda trova la sua alimentazione sui rilievi vulcanici e mostra un flusso idrico sotterraneo che scende in maniera radiale dai Colli Albani andando ad alimentare i corsi d'acqua e alcune importanti sorgenti tra cui quelle dell'Acqua Vergine.

La zona dove è avvenuto il ritrovamento è un prato spontaneo privo di alberi e arbusti, dove crescono erbe fra le quali si riconoscono: buglossa ibrida [*Anchusa undulata* subsp. *hybrida*



Foto 1. *C. xerophilus*. Zona della raccolta.

Foto di Francesca Floccia

(Ten.) Bég.]; avena selvatica (*Avena fatua* L.); papavero (*Papaver rhoeas* L.); crisantemo campestre [*Glebionis segetum* (L.) Fourr.]; viperina piantaggine (*Echium plantagineum* L.). Il terreno è arido, probabilmente attraversato negli anni passati da greggi di pecore.

Materiali e metodi

Lo studio macroscopico è avvenuto su materiale fresco ed essiccato, quello microscopico solo su materiale essiccato. Per le osservazioni microscopiche è stata utilizzata ottica Zeiss. Per il montaggio dei frammenti dell'essiccata è stato utilizzato L4, in alcuni casi acqua distillata oppure ammoniaca in soluzione commerciale, in altri KOH al 4%; come colorante il rosso Congo in soluzione ammoniacale. Sono state osservate basidiospore in visione frontale, in visione laterale e in visione promiscua. Per ogni profilo sono state misurate 35 spore. Sono state scelte spore mature e correttamente posizionate per la visione che si stava esaminando. È stato esaminato anche il più giovane esemplare della raccolta, purtroppo con le lamelle corrose dalla deliquescenza. Presentava spore ben mature di colore bruno-nerastro ed altre immature di taglia ridotta, con tonalità brunastra meno intensa; nel rilevare le misure si è proceduto con lo stesso metodo già descritto, in tutti i casi è stata esclusa dalla misurazione l'appendice ilare. Le dimensioni delle spore sono state fornite come $L \times l$, ove L è la lunghezza e l la larghezza, Q_m è il valore medio per ogni singolo aspetto; in dettaglio Q_{fm} si riferisce alla visione frontale, Q_{lm} alla visione laterale e Q_{pm} alla visione promiscua. Si è rilevato che il valore del Q_{fm} per la visione frontale e quello Q_{pm} della visione promiscua sono molto vicini e confrontabili, mentre è diverso e non intercambiabile il valore Q_{lm} della visione laterale. Le foto di microscopia sono state realizzate usando un microscopio trinoculare Zeiss Universal R con

oculari 10× e con obiettivi 10×, 25×, 50×, 60× a immersione in olio e 100× a immersione in olio in campo chiaro. Il materiale è stato trattato con NH₃ per rigonfiare i tessuti e rosso Congo ammoniacale per la colorazione. Per la determinazione dell'amiloidia è stato usato il reagente di Melzer. Il nome del colorante usato per le indagini microscopiche, citato nelle didascalie delle fotografie, è abbreviato per ragioni di spazio, usando il seguente acronimo: rosso Congo ammoniacale uguale RCA. Le citazioni degli autori seguono Index Fungorum, Authors of Fungal Names (www.indexfungorum.org/authorsoffungalnames.htm). Le essiccata sono nell'erbario degli autori.

Estrazione, amplificazione e sequenziamento del DNA

Il DNA totale è stato estratto da campioni secchi utilizzando un protocollo modificato basato su MURRAY & THOMPSON (1980). Le reazioni PCR (MULLIS & FALOONA 1987) hanno incluso 35 cicli con una temperatura di annealing di 54 °C. I primer ITS1F e ITS4 (WHITE *et al.* 1990, GARDES & BRUNS 1993) sono stati impiegati per amplificare la regione ITS rDNA, EF1-728F, EF1-983F, EF1-1567R e EF1-2218R (CARBONE & KOHN 1999, REHNER & BUCKLEY 2005) per il gene del fattore di allungamento della traslazione 1a (*tef1*) e bRPB2-6F2 (inverso di bRPB2-6R2) e bRPB2-7R2 per il gene della seconda subunità più grande della RNA polimerasi II (*rpb2*) (MATHENY *et al.* 2007). I prodotti della PCR sono stati controllati in gel di agarosio all'1% e gli ampliconi sono stati sequenziati con uno o entrambi i primer per PCR. Le sequenze sono state corrette per rimuovere gli errori di lettura nei cromatogrammi. Sequenze depositate in GenBank con i seguenti codici: ITS = OQ692605; TEF1 = OQ18430; R2 = OQ718431.

Analisi filogenetiche

BLASTn (ALTSCHUL *et al.* 1990) è stato utilizzato per selezionare le sequenze ITS rDNA più strettamente correlate dal database pubblico International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC, ARITA *et al.* 2021). Le sequenze recuperate provenivano principalmente da studi condotti da CROUS *et al.* 2016, GORDON (unp.) & PHOOKAMSAK *et al.* (2019). Le sequenze di ITS rDNA sono state prima allineate in MEGA 5.0 (TAMURA *et al.* 2011) con la sua applicazione Clustal W e quindi riallineate manualmente secondo necessità per stabilire l'omologia posizionale. L'allineamento finale è stato caricato in MrBayes 3.2.6 (RONQUIST *et al.* 2012), dove è stata eseguita un'analisi bayesiana (singola partizione, due esecuzioni simultanee, quattro catene, temperatura impostata su 0,2, campionamento ogni 100a generazione) fino a che le frequenze di divisione medie tra le corse simultanee sono scese al di sotto di 0,01 dopo 0,22 milioni di generazioni. Infine, è stata eseguita una ricerca completa per l'albero di massima verosimiglianza con il punteggio migliore in RAxML 8.2.12 (STAMATAKIS 2014), utilizzando l'algoritmo di ricerca standard (stesse partizioni, modello GTRGAMMAI, 2000 repliche bootstrap). La soglia di significatività è stata fissata al di sopra di 0,95 per la probabilità a posteriori (PP) e per le proporzioni bootstrap del 70% (BP).

Risultati

Le sequenze di ITS rDNA ottenute dai campioni raccolti nel presente studio non erano significativamente diverse dalle altre nei database determinati come *Coprinus xerophilus* e *C. trigonosporus*, ma non erano nemmeno identiche, con almeno 6/573 bp diversi da tutti gli altri nello stesso clade (98,43% di somiglianza). Tuttavia, è stata osservata un'elevata variabilità anche tra le raccolte dello stesso clade (98,78% di somiglianza) e anche tra le raccolte determinate come *C. xerophilus* (99,13% di somiglianza). Sono stati indagati altri due marcatori molecolari, sequenze *tef1* sono state ottenute dalle raccolte dei tipi di *C. xerophilus*, *C. trigonosporus* e dal campione analizzato nel presente studio mentre sequenze *rpb2* sono state ottenute dal *typus* di *C. trigonosporus* e dal campione studiato nel presente lavoro (vedi **grafici 1-2-3**) senza risultati significativi.

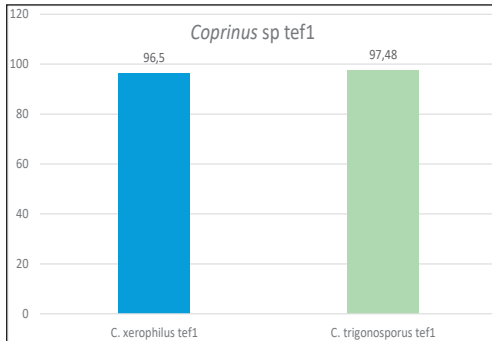


Grafico 1. Confronto fra le percentuali di identità delle sequenze tef1.

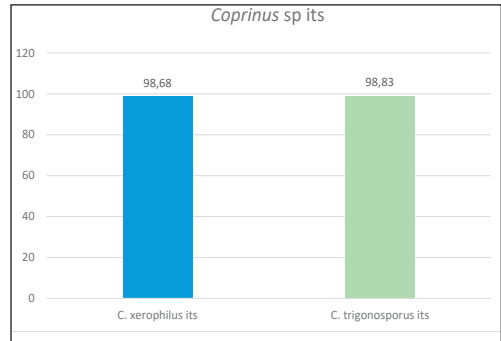


Grafico 2. Confronto fra le percentuali di identità delle sequenze ITS.

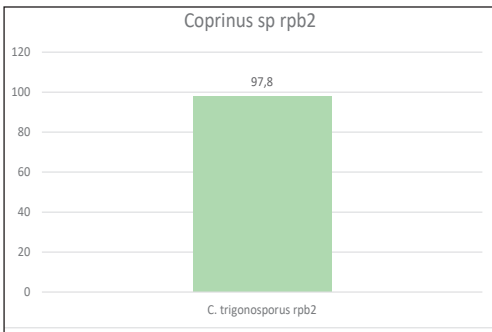


Grafico 3. Confronto della percentuale di identità delle sequenze rpb2.

TASSONOMIA

Coprinus xerophilus Bogart, *Mycotaxon* 4 (1): 255 (1976)

Diagnosi originale

Pileus primo breviter glandiformis vel subglobosus, dein campanulatus, tandem revolutus, apice late tholiformi remanenti, 1,6–4,0 cm latus, primo candidus, ubi velo universali tectus albus remanens, margine atrascenti; pagina pilei leviter plicato-striata vel velo universali crasso coacto albo tecta, velo ex fragmento unico pileato vel fragmentis aliquot irregularis constanti carne tenui

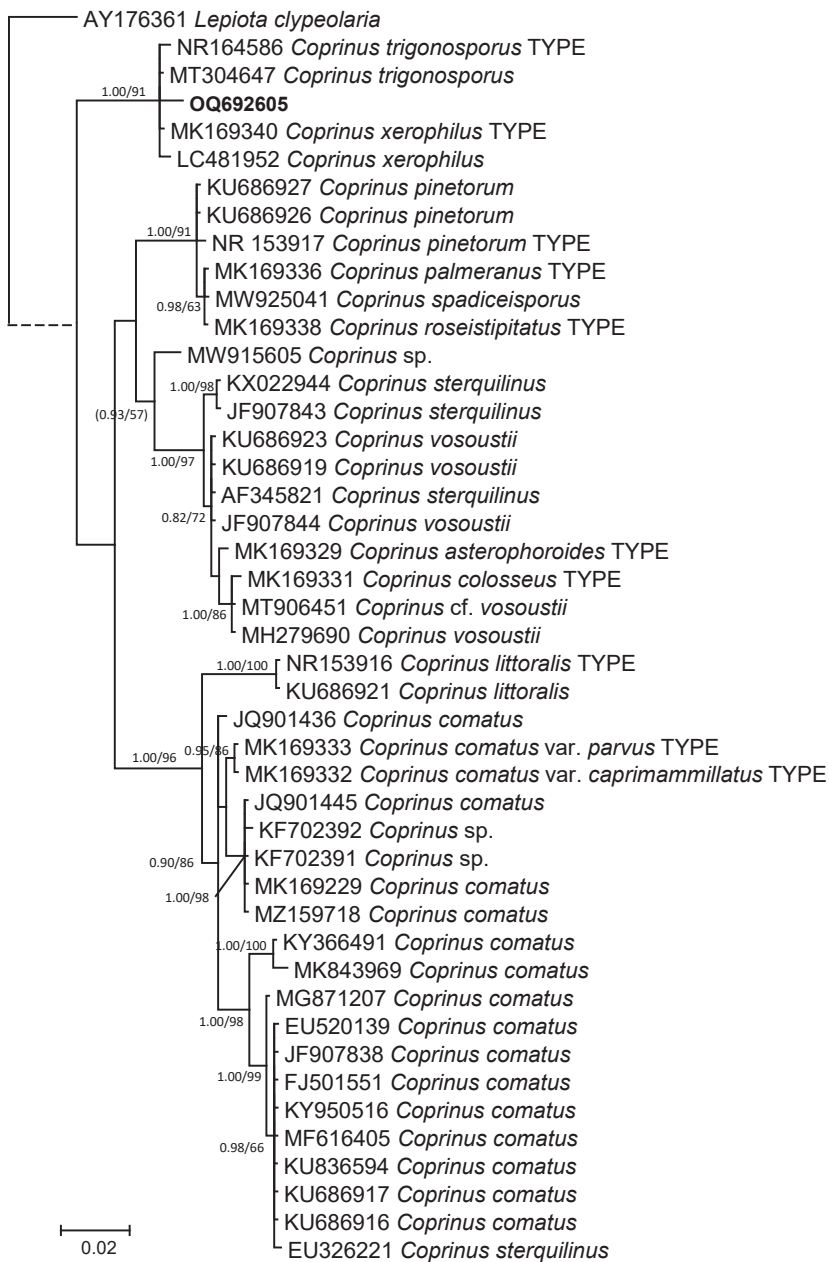
et membranacea; stipes albus, cavus lumine telam subtilam vel filum laneum continenti, gracilis supra fere aequalis, 4,0–7,5 cm. longus, 2,5–6,0 mm crassus basi bulbosa et 6,0–12,0 mm lata, pagina stipitis supra basem crista distincta volvata instructa, carne pro parte maxima crassa et fibrillosa basi solida; lamellae anguste ovatae vel lanceolatae, liberae et remotae, aggregatae, in maturitate atrae autolyse tantum partiali.

Sporae laeves, dorsaliter late ovatae, lateraliter ovato-ellipsoideae, aliquantum complanatae, 17,5–22,6 × 11,2–16,3 × 10,6–12,5 μm, poro germinationis excentrico; basidia trimorphica, tetraspora; basidia breviter clavata 38,8–47,5 μm longa, 18,8 μm crassa; basidia longe clavata 50,0–62,5 μm longa, 17,5–18,8 μm crassa; basidia subululiformia 53,8–60,5 μm longa, 17,5–25,0 μm crassa; sterigmata obturamenta granda refractiva vel pigmentifera praebentia; pagina pilei ex hyphis radiantibus constans; velum universale superficiei pilei ex strato crasso coacto constans strato ex catenis longis cellularum cylindricarum vel oblongarum constanti cellularum catenarum laevibus, hyalinis, tenuitunicatis hyphis nonnullis tenuioribus insuper adsunt; basis stipitis cristam volvaturum cellularum similium praebens; stipes et velum universale fibulata.

Holotypus FVDB 2159 *terrestris in solo arenario vel glareosa locorum aridorum, Nephi, comitato Juab, pago Utah, 15 June, 1957, in herbario Universitatis Washingtonis conservatus* (WTU).

Caratteristiche macroscopiche (Foto 2-3-4-5-6)

Cappello da globoso a campanulato, largo fino a 5 cm, alto fino a 3 cm. Ornato da abbondanti resti del velo generale, unito al disco, altrove sotto forma di grosse placche di colore bianco cinerognolo con tonalità ocracee. Margine a maturità striato o solcato. Cuticola liscia, asciutta, colore bianco cinereo.



Filogramma basato sull'analisi di massima verosomiglianza (RAxML) di sequenze ITS rDNA selezionate da data base pubblico. *Lepiota clypeolaria* è stata utilizzata come outgroup. La soglia di significatività è stata fissata al di sopra di 0,95 per la probabilità a posteriori (PP) e per le proporzioni bootstrap del 70% (BP). Prima del binomio specifico viene indicato il numero di accesso della sequenza nel database pubblico. In grassetto la sequenza oggetto di studio.



Foto 2. *Coprinus xerophilus* in habitat.

Foto di Francesca Floccia



Foto 3. *C. xerophilus*. Esemplare allo stadio embrionale.

Foto di Francesca Floccia



Foto 4. *C. xerophilus*. Cappello in via di maturazione.

Foto di Francesca Floccia



Foto 5. *C. xerophilus*. Cappello allo stadio maturo.

Foto di Francesca Floccia



Foto 6. *C. xerophilus*. Lamelle in via di maturazione.

Foto di Francesca Floccia

Lamelle libere, inizialmente fitte, poi mediamente rade, prima bianche, poi rosa e presto nere; precocemente deliquescenti.

Gambo fino a $7 \times 0,4$ cm, lungo, cilindrico, progressivamente ristretto all'apice, cavo, asciutto, liscio, provvisto alla base di un bulbo marginato, lungo 1 cm, largo 0,8 cm.

Carne sottile, biancastra. Odore fungino. Sapore non testato.

Caratteristiche microscopiche

Spore in vista frontale, da ellissoidali a lungamente mitriformi (a forma di Mitra, il copricapo dei Vescovi e dei Papi), lisce, nere, $17,5-21,6 \times 10,5-12$ μm , $Q_{\text{fm}} = 1,69$; in vista laterale cilindrico-ellissoidali, $17,2-21 \times 10,5-11,5$ μm , $Q_{\text{lm}} = 1,75$; in vista promiscua (si riportano solo le misure) $17-21 \times 10,3-12,5$ μm , $Q_{\text{pm}} = 1,67$. Poro germinativo eccentrico sul lato abassiale, sporgente 2 μm , con diametro di 3 μm , colore ialino. Apicolo ben visibile e in posizione opposta al poro germinativo sul lato abassiale (**Foto 7-8-9-10**).

Basidi tetrasporici $26-66 \times 16-22,6$ μm , clavati, a contenuto bianco-grigiastro, un po' più scuro verso la parte superiore, con sterigmi lunghi fino a 5 μm , pigmentati di bruno bronzeo per circa 3 μm di lunghezza nella parte apicale (**Foto 11-12**).

Imenofisalidi $4,8-43,5 \times 8,7-17,4$ μm , presenti, numerosissime a circondare i basidi (**Foto 13-14-15-16**).

Cheilocistidi e pleurocistidi non osservati nel materiale essiccato.

Trama imeniale ife larghe $17-35$ μm ., cilindriche più o meno parallele, a parete sottile (**Foto 17-18-19**) con terminali lunghi fino a 174 μm (**Foto 20-21**).

Pileipellis costituita da ife cilindriche a parete sottile, coricate, più o meno parallele, larghe $7-11$ μm .

Velo generale costituito da due strati:

Strato esterno sottile, formato da ife cilindriche, larghe $8-9$ μm , a parete sottile, settate, intrecciate, con terminali claviformi (a mazza da baseball), larghi $16-20$ μm , lunghi $71-72$ μm , ad apice arrotondato e disposizione isolata, affiancata o a ciuffetto, coricati o appena emergenti (**Foto 31**).

Strato interno costituito da fisaloife di forma e grandezza diverse, tutte a parete sottile:

- a) ife fusiformi, molto lunghe, larghe nel punto di mezzo $9-12$ μm ;
- b) ife a salsiccio e a catenella, $28-34 \times 52-85$ μm (**Foto 32-33-34**);
- c) ife di tipo sferopedunculato, larghe $6-8$ μm alla base del peduncolo, $32-54$ μm presso l'apice, lunghe $117-147$ μm (**Foto 29-30**). Queste ultime si trovano fra le ife a salsiccio, qualcuna isolata simula dei pleurocistidi.

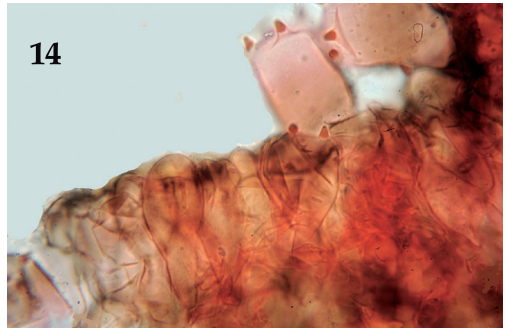
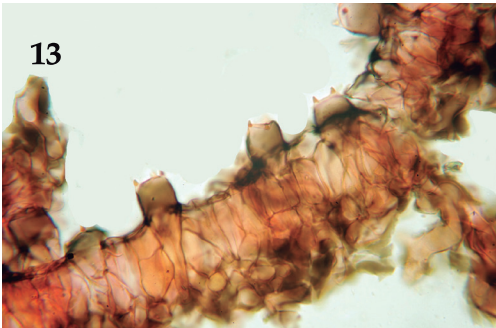
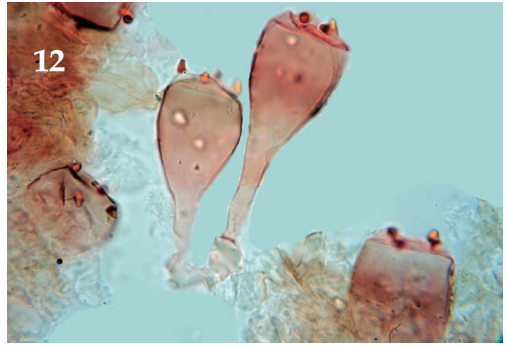
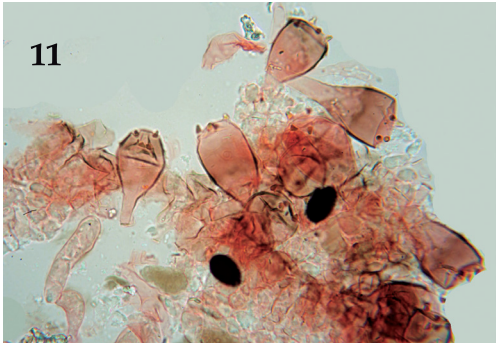
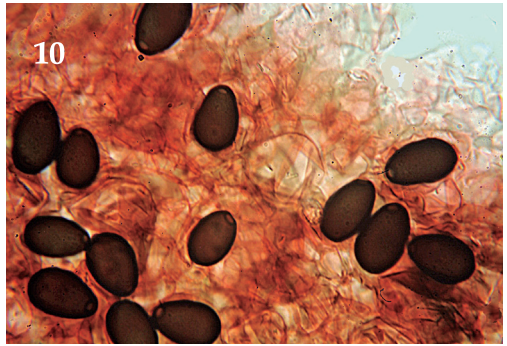
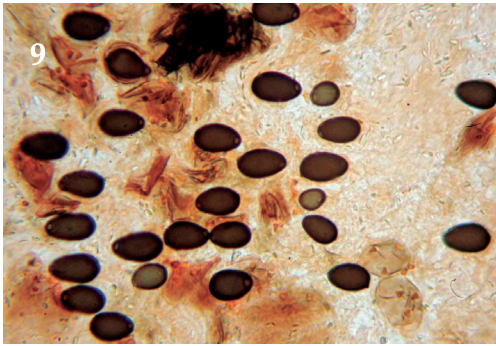
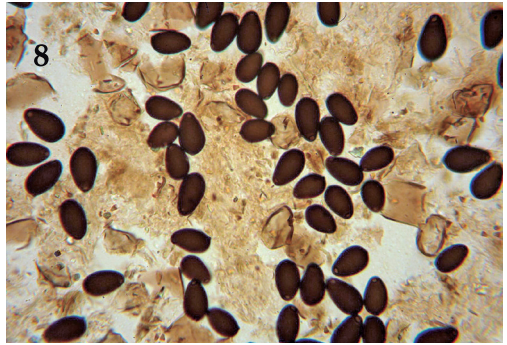
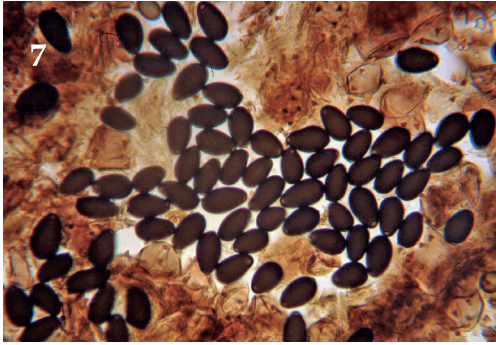
Tutte le ife sono settate e si restringono in prossimità del setto.

Caulopellis costituita da ife cilindriche, settate, ialine, parete sottile, parallele, coricate, larghe $4-6$ μm (**Foto 23-24**).

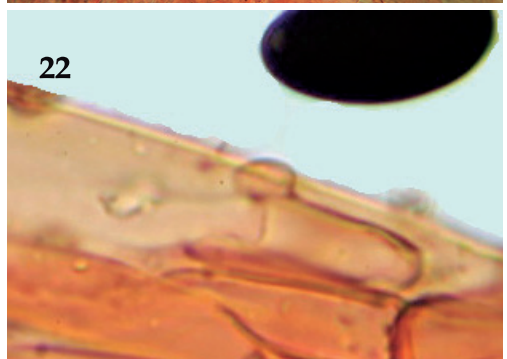
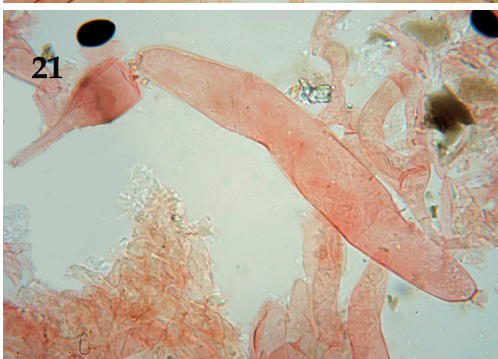
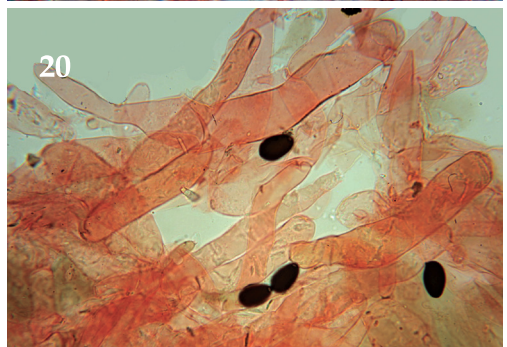
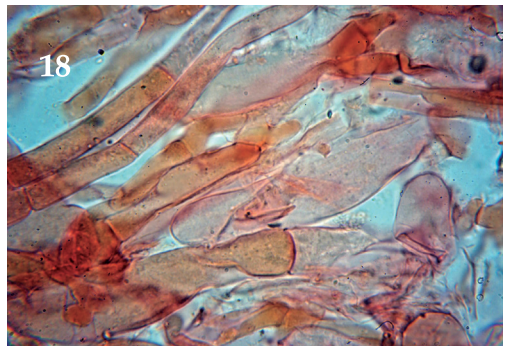
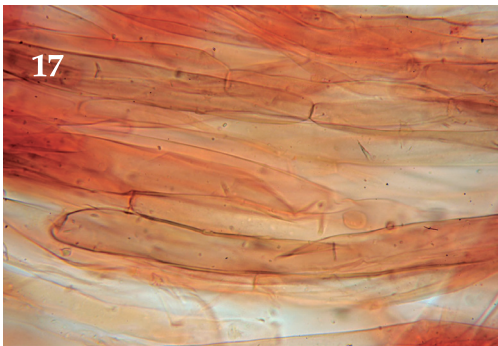
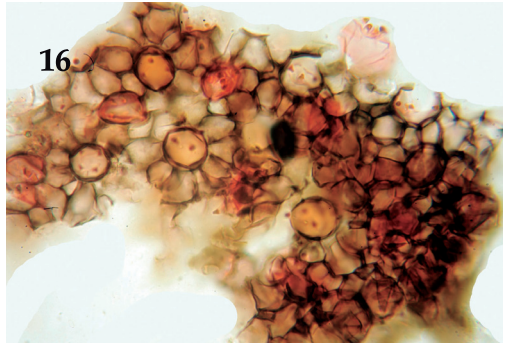
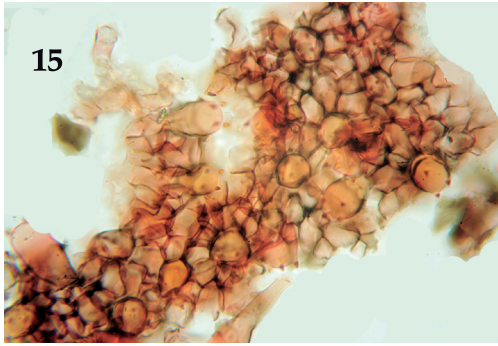
Caulotrampa costituita da ife simili alla caulocutis ma con terminali $117-300 \times 15-28$ μm (**Foto 25-26**).

Giunti a fibbia rarissimi nella struttura del gambo e del tessuto lamellare (**Foto 22 e 28**).

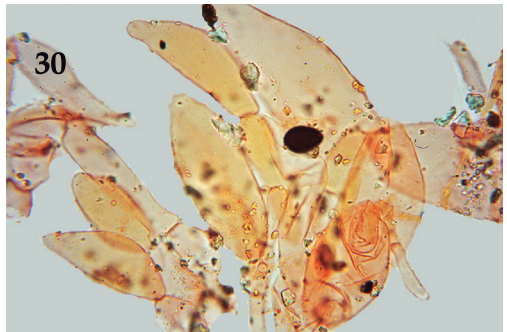
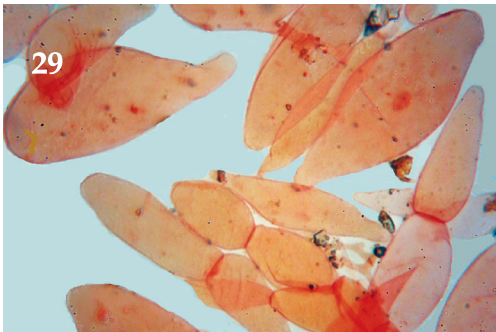
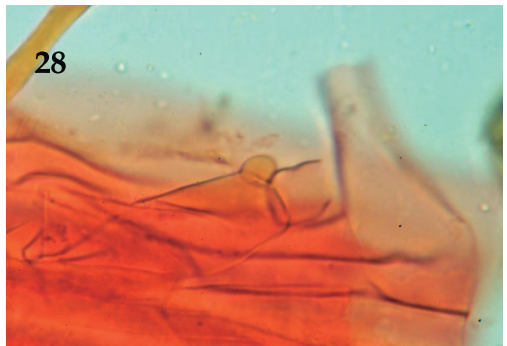
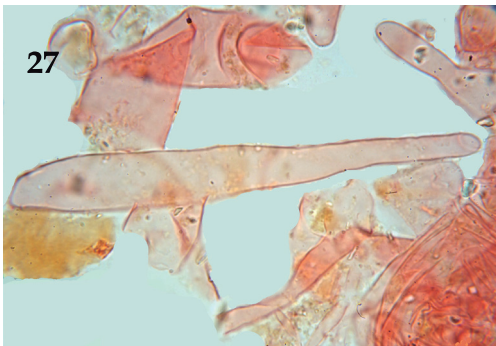
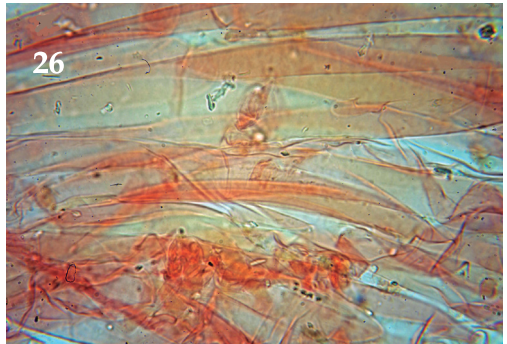
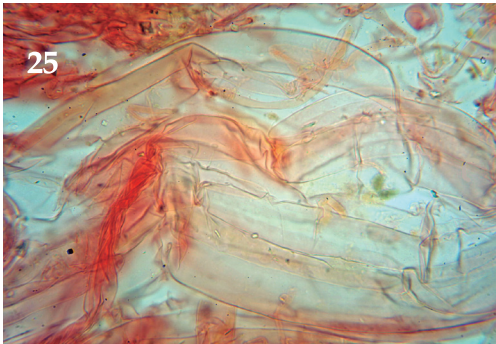
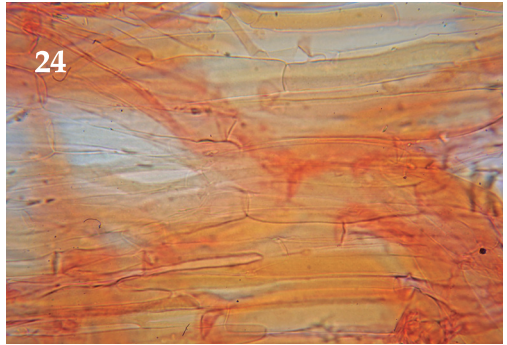
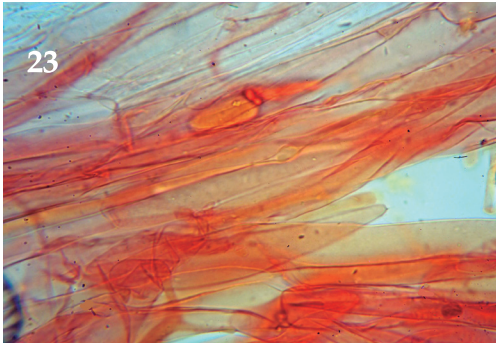
Habitat e distribuzione quartiere periferico di Roma, denominato Ponte di Nona, quadrante est della capitale, lat. $41^\circ 54' 27,4''$ N, long. $12^\circ 39' 02,5$ E, altitudine 55 m s.l.m. (**Fig. 1**), in un campo agricolo abbandonato in località denominata Acqua Vergine, costituita da un prato spontaneo privo di alberi e arbusti, dove crescono erbe fra le quali si riconoscono buglossa ibrida [*Anchusa undulata* subsp. *hybrida* (Ten.) Bég.], avena selvatica (*Avena fatua* L.), papavero (*Papaver rhoeas* L.) e crisantemo campestre [*Glebionis segetum* (L.) Fourr], terreno arido, probabilmente attraversato negli anni passati da greggi di pecore; raccolte effettuate il 4 e 5 maggio 2021, in numerosissimi esemplari, leg. F. Floccia, det. G. Segneri.



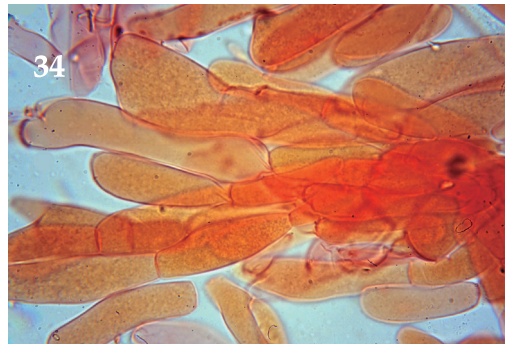
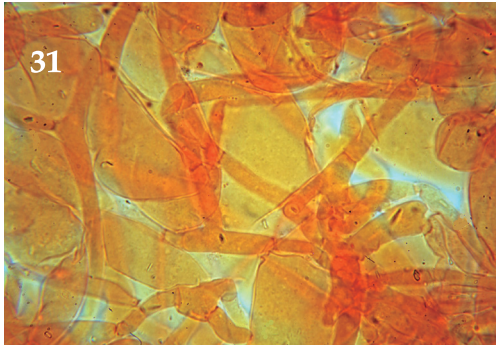
C. xerophilus. 7-8-9-10. Spore, alcune in visione laterale, poro germinativo in posizione eccentrica, rispettivamente in ordine numerico 250 \times , 250 \times , 500 \times , 1000 \times ; 11-12. Basidi con sterigmi pigmentati, rispettivamente 500 \times e 1000 \times ; 13-14. Basidi e imenofisalidi in proiezione laterale, rispettivamente 250 \times e 1000 \times . Il colorante usato è il RCA. Foto di Luigi Perrone



C. xerophilus. 15-16. Basidi e imenofisali visti dall'alto, rispettivamente 250× e 500×; 17-18-19. Ife della trama imeniale tutte a 500×; 20-21. Terminali delle ife imeniali (500×); 22. Giunto a fibbia imeniale (1000×). Il colorante usato è il RCA. Foto di Luigi Perrone



C. xerophilus. 23-24. Ife della caulopellis tutte a 500×; 25-26. Ife della caulotrama (1000×); 27. Terminale della caulotrama (1000×); 28. Giunto a fibbia della trama del gambo (1000×); 29-30. Ife di tipo sferopeduncolato (fiscalofe) del velo generale tutte a 500×. Il colorante usato è il RCA. Foto di Luigi Perrone



C. xerophilus. 31. Ife cilindriche e fialoife del velo generale (1000×); 32-33-34. Ife a catenella ed a salsicciotto del velo generale 1000×. Il colorante usato è il RCA. Foto di Luigi Perrone

Da una ricerca effettuata su GBIF è risultato che *C. xerophilus* è stato segnalato nei seguenti stati: Stati Uniti d'America, Algeria, Spagna, Grecia, Brasile, Ungheria.

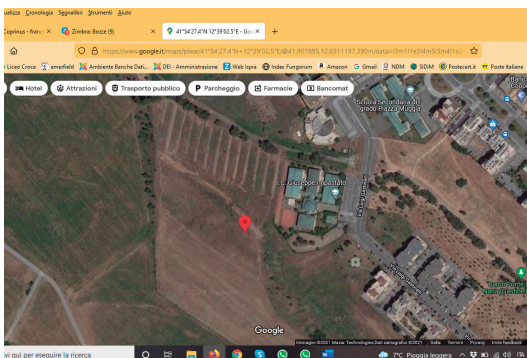


Fig. 1. Geolocalizzazione del punto di raccolta

Discussione

Inizialmente lo studio macro- e micromorfologico ci ha portato a escludere le specie con le spore di lunghezza inferiore a 15 μm , poi quelle con crescita fimicola e ammofila. La nostra attenzione si è concentrata su *Coprinus vosoustii* Pilát e sulle specie descritte in origine dall'America. *Coprinus calyptratus* sembrava la specie con i caratteri più corrispondenti ma anche *Coprinus xerophilus*, *Coprinus asterophorus* Long & V.A.M. Mill., *Coprinus asterophoroides* Bogart

possedevano caratteristiche analoghe a quelle della nostra raccolta.

In ogni caso, una perfetta sovrapposizione non è stata mai raggiunta con nessuna delle specie ora ricordate, in particolare sono diversi i caratteri ecologici, come il tipo di suolo e l'areale geografico. Oggi l'areale geografico viene considerato come un carattere tassonomico da tenere in considerazione (Ko *et al.* 2001).

Gli studi molecolari, che sono stati condotti in parallelo, non hanno fornito dei risultati risolutivi: la sequenza relativa al marcatore ITS effettuata sulla nostra raccolta si è posizionata, come un ponte

tassonomico, fra le sequenze tipo di *Coprinus trigonosporus* Tkalčec & Mešić e *Coprinus xerophilus*, disponibili nelle banche dati pubbliche. La percentuale d'identità nei confronti della sequenza ITS della prima specie è risultata del 98,83% e nei confronti della seconda specie è stata del 98,68%.

Questo risultato fa pensare all'esistenza di una unica specie e ad una possibile sinonimia tra *C. trigonosporus* e *C. xerophilus*. Nel voler dare un significato tassonomico alle modeste differenze evidenziate si può immaginare un complesso di tre taxa, vicini morfologicamente e molecolarmente, semmai separabili a livello sottospecifico di varietà o forma.

Per cercare di comprendere i risultati raggiunti con la sequenza ITS, in aggiunta abbiamo studiato il marcatore molecolare *tef1* e il confronto della sequenza della nostra raccolta ha dato una percentuale d'identità pari al 96,50 rispetto alle sequenze tipo di *C. xerophilus* e del 97,48% rispetto *C. trigonosporus*. Questi risultati fanno pensare all'esistenza di tre lignaggi ben differenziati fra di loro ma i dati in nostro possesso non sono risolutivi. Sarebbero necessarie sequenze ITS e *tef1* da campioni aggiuntivi dei tre cladi presumibilmente distinti per confermare se sono effettivamente isolati o meno.

Abbiamo cercato di produrre anche un fillogramma con le sequenze *tef1* in nostro possesso ma il limitato numero disponibile, solo tre sequenze, non ci ha permesso di avere un risultato significativamente utile.

Coprinus xerophilus Bogart è una specie raccolta in America e pubblicata nel 1976, caratterizzata da spore di grande taglia, lunghe fino a 22 µm, da ovate a mitriformi in visione frontale.

Nel corso degli anni l'*holotypus* è stato sottoposto a studi di revisione (MORENO & HEYKOOP 1998; ULJÉ & NOORDELOOS 2000), che hanno confermato la bontà della specie.

Coprinus trigonosporus è una specie raccolta in Arabia Saudita e pubblicata nel 2019. Morfologicamente si caratterizza per le spore di forma triangolare con gli spigoli arrotondati in visione frontale e un elevato numero di imenofisalidi che circondano il basidio.

Occorre segnalare, peraltro, che, analogamente a *C. trigonosporus*, anche gli esemplari da noi raccolti presentano un numero elevato di imenofisalidi che circondano i basidi, caratteristica mai descritta in letteratura per *C. xerophilus*.

Altre specie del genere *Coprinus* s.str., come *C. comatus* e *C. sterquilinus*, apparentemente hanno strutture genetiche simili a quelle di *C. xerophilus*, *C. trigonosporus* e del campione studiato nel presente lavoro. L'incertezza nell'attribuire una similitudine alle strutture genetiche è dovuta alla marcata carenza di studi molecolari riferiti a questo gruppo di taxa ed è, quindi, difficile avere dati che consentano oggettive conclusioni definitive. Infatti con il marcatore ITS sembrano uguali, mentre con quello *tef1* appaiono diverse.

Questi scenari, con più cladi monofiletici separati da brevi distanze, possono essere interpretati in diversi modi: 1) questi lignaggi non sono completamente isolati o non seguono una dinamica divergente; 2) questi lignaggi hanno iniziato a divergere recentemente a causa di barriere esterne (reversibili); 3) questi lignaggi hanno recentemente stabilito barriere riproduttive intrinseche, ma la loro sopravvivenza è legata a condizioni ambientali esterne (reversibili); 4) questi lignaggi sono intrinsecamente isolati/divergenti e la loro sopravvivenza non è legata a condizioni esterne o tali condizioni non sono reversibili.

Mentre le caratteristiche morfologiche, ecologiche o geografiche possono essere utilizzate per desumere quali indirizzi tassonomici seguire, in queste circostanze (vedi la cosiddetta tassonomia integrativa) ricorre la necessità di esaminare un numero più rappresentativo di campioni.

Nel caso di *C. xerophilus*, *C. trigonosporus* e del campione studiato nel presente lavoro, i tre ceppi sequenziati sono caratterizzati da una geografia distinta, da una morfologia leggermente diversa, da caratteri ecologici diversi come il tipo di suolo, la copertura vegetazionale e, probabilmente, le abitudini trofiche. Tuttavia, ulteriori campioni di tutti i lignaggi dovrebbero essere studiati per individuare e/o confermare le ipotesi interpretative esposte precedentemente.

A causa della grande incertezza causata dalle scarse informazioni ora disponibili, scegliamo in questa sede di seguire l'approccio più conservativo.

Riteniamo, quindi, di poter concludere questo lavoro, considerando la raccolta come un primo ritrovamento romano e anche italiano di *Coprinus xerophilus* (nome prioritario) confermato dall'analisi molecolare.

Questa conclusione si basa sulle risultanze del marcatore ITS unitamente alla rassomiglianza morfologica, della forma e della misura delle spore. Alcuni caratteri che non coincidono perfettamente, al momento, li consideriamo come variabilità della specie tipo.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano Joseph Ammirati per aver fornito con sollecitudine la sequenza tef1 dell'*holotipus* di *C. xerophilus*, il Fungus Herbarium, Burke Museum, University of Washington, Seattle per aver autorizzato l'uso e la pubblicazione della medesima sequenza, Zdenko Tkalčec per aver fornito con sollecitudine le sequenze rpb2 e tef1 dell'*holotipus* di *C. trigonosporus* e l'autorizzazione per il loro utilizzo. Ringraziamo, inoltre, Luigi Perrone per aver realizzato le foto di microscopia e Alfredo Vizzini per i numerosi e proficui consigli per la realizzazione del lavoro.

Indirizzi degli autori

FRANCESCA FLOCCIA

Via Raoul Chiodelli, 41, 00132, Roma (Italia).

E-mail: francesca.floccia@gmail.com

GIOVANNI SEGNERI

Via dei Meli, 3, 00172, Roma (Italia).

E-mail: a.segneri@alice.it

PABLO ALVARADO

ALVALAB Dr. Fernando Bongera st. Severo Ochoa bldg. S1.04, 33006 Oviedo (Spagna).

E-mail: pabloalvarado@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.
- ARITA M., KARSCH-MIZRACHI I. & COCHRANE G. – 2021: The international nucleotide sequence database collaboration. *Nucleic Acids Research* 49: D121–D124.
- BREITENBACH J. & KRANZLIN F. – 1995: *Fungi of Switzerland, Volume 4*. Edition Mykologia Lucerne, Lucerne (Switzerland).
- CARBONE I. & KOHN L. – 1999: A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91 (3): 553-556.
- CECCHI L. & SELVI F. – 2017: Boraginaceae, Boragineae, *Flora Critica D'Italia*. Fondazione per la Flora Italiana, Versione 1.0, pubblicata online.
- CONTI F., ABBATE G., ALESSANDRINI A. & BLASI C. – 2005: *An annotated checklist of Italian vascular flora*. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Direzione per la Protezione della Natura, Dipartimento di Biologia Vegetale – Università degli Studi di Roma "La Sapienza".
- CROUS P.W., WINGFIELD M.J., RICHARDSON D.M., LE ROUX J.J., STRASBERG D., EDWARDS J., ROETS F., HUBKA V., TAYLOR P.W.J., HEYKOOP M. *et al.* – 2016: Fungal planet description sheets: 400-468. *Persoonia* 36: 316-458.
- FRIES E. – 1874: *Hymenomyces europaei*. Upsalie.
- CACIALLI G., CAROTI V. & DOVERI F. – 1999: *Contributio ad Cognitionem Coprinorum*. Monografie di Pagine di Micologia 1: 1-256
- DOVERI F. – 2005: Nuovi ritrovamenti di *Coprinus* s.l. fomicoli in Italia. New finding of fomicolous *Coprinus* s.l. in Italy. *Rivista di Micologia* 4: 319-340.

- 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.
- GOMES A.R.P. & WARTCHOW F. – 2018: Notes on two Coprinoid fungi (Basidiomycota, Agaricales) from the Brazilian semiarid region. *Edinburg Journal of Botany* 75 (3): 285-295.
- HILGER H.H., SELVI F., PAPINI A. & BIGAZZI M. – 2004: Molecular systematics of Boraginaceae, tribe *Boragineae* based on ITS1 and trnL sequences, with special reference to *Anchusa* s. l. *Annals of Botany* 94: 201-212.
- HOPPLE J.S. JR. & VILGALYS R. – 1999: Phylogenetic relationships in the mushroom genus *Coprinus* and dark spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA; divergent domains, outgroups, and monophyly. *Molecular Phylogenetic Evolution* 13:1.
- KEIRLE M.R., HEMMES D.E. & DESJARDIN D.E. – 2004: Agaricales of the Hawaiian Islands 8. Agaricaceae: *Coprinus* and *Podaxis*; Psathyrellaceae; *Coprinopsis*, *Coprinellus* and *Parasola*. *Fungal Diversity* 15: 33-124.
- KO K.S., LIM Y.W., KIM Y.H. & JUNG H.S. – 2001: Phylogeographic Divergences of Nuclear ITS Sequences in *Coprinus* Species sensu lato. *Mycological Research* 105 (12): 1519-1526.
- LANCONELLI L. – 2007: Su *Coprinopsis erythrocephala*, un coprino dal colore sgargiante. *Rivista di Micologia* 2: 159-167.
- LANGE J.E. – 1915: Studies in the Agarics of Denmark. II. The genus *Coprinus*. *Dansk Botanisk Arkiv* 2 (3): 32-53.
- MATHENY P.B., WANG Z., BINDER M., CURTIS J.M., LIM Y.W., NILSSON R.H., HUGHES K.W. *et al.* – 2007: Contributions of rpb2 and tef1 to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 430-451.
- MONCALVO J.M., LUTZONI F.M., REHNER S.A., JOHNSON J. & VILGALYS R. – 2000: Phylogenetic Relationships of Agaric Fungi Based on Nuclear Large Subunit Ribosomal DNA Sequences. *Systematic Biology* 49 (2): 278-305.
- MONCALVO J.M., VILGALYS R., REDHEAD S.A., JOHNSON J.E., JAMES T.Y., AIME M.C., HOFSTETTER V., VERDUIN J.W., LARSSON E., BARONI T.J., THORN R.G., JACOBSSON S., CLÉMENÇON H. & MILLER JR. O.K. – 2002: One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetic Evolution* 23 (3): 357-400.
- MORENO G. & HEYKOOP M. – 1998: Type studies in the genus *Coprinus* (Coprinaceae, Agaricales) *Coprinus xerophilus* a new record in Europe. *Persoonia* 17 (1): 97-111.
- MULLIS K. & FALOONA F.A. – 1987: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- MURRAY M.G. & THOMPSON WF. – 1980: Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8 (19): 4321-4325.
- ORTON P.D. & WATLING R. – 1979: Coprinaceae part I; *Coprinus*. *British Fungus Flora, Agarics and Boleti* 2 – Edinburgh.
- PHOOKAMSAK R., HYDE K.D., JEEWON R., BHAT D.J., JONES E.B.G., MAHARACHIKUMBURA S.S.N., RASPE O., KARUNARATHNA S.C., WANASINGHE D.N., HONGSANAN S. *et al.* – 2019: Fungal diversity notes 929-1035: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungi. *Fungal Diversity* 95: 1-273.
- REDHEAD S.A., VILGALYS R., MONCALVO J.-M., JOHNSON J. & HOPPLE J.S. JR. – 2001: *Coprinus* Pers. and the disposition of *Coprinus* species sensu lato. *Taxon* 50 (1): 203-241.
- REHNER S.A. & BUCKLEY E. – 2005: A Beauveria phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97(1): 84–98. (doi: 10.3852/mycologia.97.1.84)
- REIJNDERS A.F.M. – 1979: Developmental Anatomy of *Coprinus*. *Persoonia* 10 (3): 383-424.
- RONQUIST F., TESLENKO M., VAN DER MARK P., AYRES D.L., DARLING A., HÖHNA S., LARGET B., 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.
- STAMATAKIS A. – 2014: RAXML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30 (9): 1312-1313.
- TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M. & KUMAR S. – 2011: MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.
- ULJÉ C.B. & NOORDELOOS M.E. – 1997: Studies in *Coprinus* IV – *Coprinus* section *Coprinus*. Subdivision and revision of subsection *Alachuanii*. *Persoonia* 16 (3): 265-333.

- ULJÉ C.B., GENNARI A., DOVERI F., CACCIALI G. & CAROTI V. – 1998: First report of *Coprinus spadiceisporus* Van De Bogart in Europe. *Persoonia* 16 (4): 537-540.
- ULJÉ C.B. & NOORDELOOS M.E. – 1999: Studies in *Coprinus* V – *Coprinus* Section *Coprinus*. Revision of subsection *Lanatuli* Sing. *Persoonia* 17 (2): 165-199.
- ULJÉ C.B. & NOORDELOOS M.E. – 2000: Type studies in *Coprinus* subsection *Lanatuli*. *Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. *Persoonia* 17 (3): 339-375.
- VAN DE BOGART F. – 1976: The genus *Coprinus* in Western North America, Part I; Section *Coprinus*. *Mycotaxon* 4: 233-275.
- VIZZINI A. – 2001: Una rara specie del Parco del Valentino (Torino): *Coprinopsis strossmayeri*. *Bollettino del Gruppo Micologico Bresadola - Nuova serie*: 44 (1): 4-12.
- 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 Press, London, 482 pp.