

ENZO MUSUMECI, MARCO CONTU

CLITOPILUS ALBOMINUTELLUS COMB. NOV., CON CHIAVE PER LA DETERMINAZIONE DELLE SPECIE DEL GENERE CLITOPILUS SEZ. OMPHALOIDEI IN EUROPA

Riassunto

Omphalina albominutella è trasferita nel genere *Clitopilus* sulla base di dati molecolari e di essa viene fornita una ridescrizione basata su recenti raccolte dalla Francia. Viene aggiunta una chiave per la determinazione delle specie del genere *Clitopilus* sez. *Omphaloidei* in Europa, includente le specie a spore lisce, comprendente *C. albominutellus* e *C. giovanellae*. Sono fornite illustrazioni a colori di basidiomi freschi di entrambe le specie e illustrazioni dei principali caratteri micromorfologici di *C. albominutellus*.

Abstract

Omphalina albominutella is transferred to *Clitopilus* on the basis of molecular data and a redescription of it is given based on recent collections from France. A key for the identification of the european smooth-spored species of *Clitopilus*, currently placed in *Clitopilus* sect. *Omphaloidei*, is added including *C. giovanellae*. Illustrations of fresh basidiomata of both species and drawings of the main microcharacters of *C. albominutellus* are provided.

Key Words: *Basidiomycota*, *Clitopilus*, smooth-spored species, *Clitopilus albominutellus* comb. nov., *Clitopilus* sez. *Omphaloidei*, identification key, Europe.

Introduzione

In un precedente articolo, apparso su questa Rivista, n.100, (MUSUMECI, 2017), veniva segnalata la presenza in territorio alsaziano di un'esile e minuta entità riconducibile negli aspetti morfocromatici e microscopici alla descrizione di *Omphalina albominutella*, redatta da Ludwig. Tuttavia successive analisi di natura molecolare effettuate dal genetista spagnolo Pablo Alvarado hanno sorprendentemente evidenziato delle similiarità genetiche alla famiglia *Entolomataceae* e precisamente al genere *Clitopilus*.

La nuova specie *Omphalina albominutella* era stata recentemente introdotta da LUDWIG (2001) per ridescrivere l'*Agaricus schyphoides* Fries, attualmente ascritto al genere *Clitopilus* Kumm., così come interpretato da BRESADOLA (1928), che ne fece un'entità a spore lisce ed ife prive di giunti a fibbia (LUDWIG, 1997).

Non c'è dubbio che il taxon *Agaricus schyphoides* Fries sia stato variamente interpretato da vari AA (per una rassegna v. LUDWIG, 2001), ma l'accezione attualmente riconosciuta dalla dottrina specialistica è quella di un fungo a spore rosa in massa, ornamentate ed ife prive di giunti a fibbia.

Uno di noi, E.M., ha avuto modo, in una precedente comunicazione (MUSUMECI, 2017, pubbl. 2018), di soffermarsi su questa interessante specie ma riteniamo utile ritornare sulla stessa in quanto lo studio molecolare del materiale raccolto, peraltro in zona geografica non distante dai luoghi di provenienza delle collezioni di Bresadola (Nord Italia) e Ludwig (Germania), ha consentito di accertare che questa specie appartiene al genere *Clitopilus* Kumm., sez. *Omphaloidei* G. Moreno, Contu, A. Ortega, Platas & Pelàez.

La suddetta coupure infragenerica fu introdotta da MORENO ET AL., (2007) per collocare, soprattutto per fini pratici, in *Clitopilus*, l'*Omphalia giovanellae* nel senso originariamente

attribuitogli da Bresadola [non da altri AA (v. MORENO *ET AL.*, 1997, CONTU, 2009, BARONI 1995)], il cui materiale originale rappresenta una specie a spore lisce e bianche o pallide in massa, quindi non rosa, e ornamentate [per quest'ultima specie BARONI (1995), ha proposto il nuovo nome *Clitopilus bigelowii*].

L'assenza di ornamentazione al dettaglio ottico nella spora rappresenta, per quanto di nostra conoscenza, un fenomeno raro in *Clitopilus* e, infatti, in Europa, sono solo due le specie a presentare tale peculiarità. Una è appunto "*Omphalina*" *albominutella* che, in questa comunicazione, noi proponiamo di trasferire appunto nel genere *Clitopilus* Kumm.

Crediamo utile riproporre una descrizione dettagliata di questa specie arricchita da nuove illustrazioni di basidiomi freschi perché si tratta di un fungo ancora poco conosciuto, sebbene peculiare.

Materiali e metodi

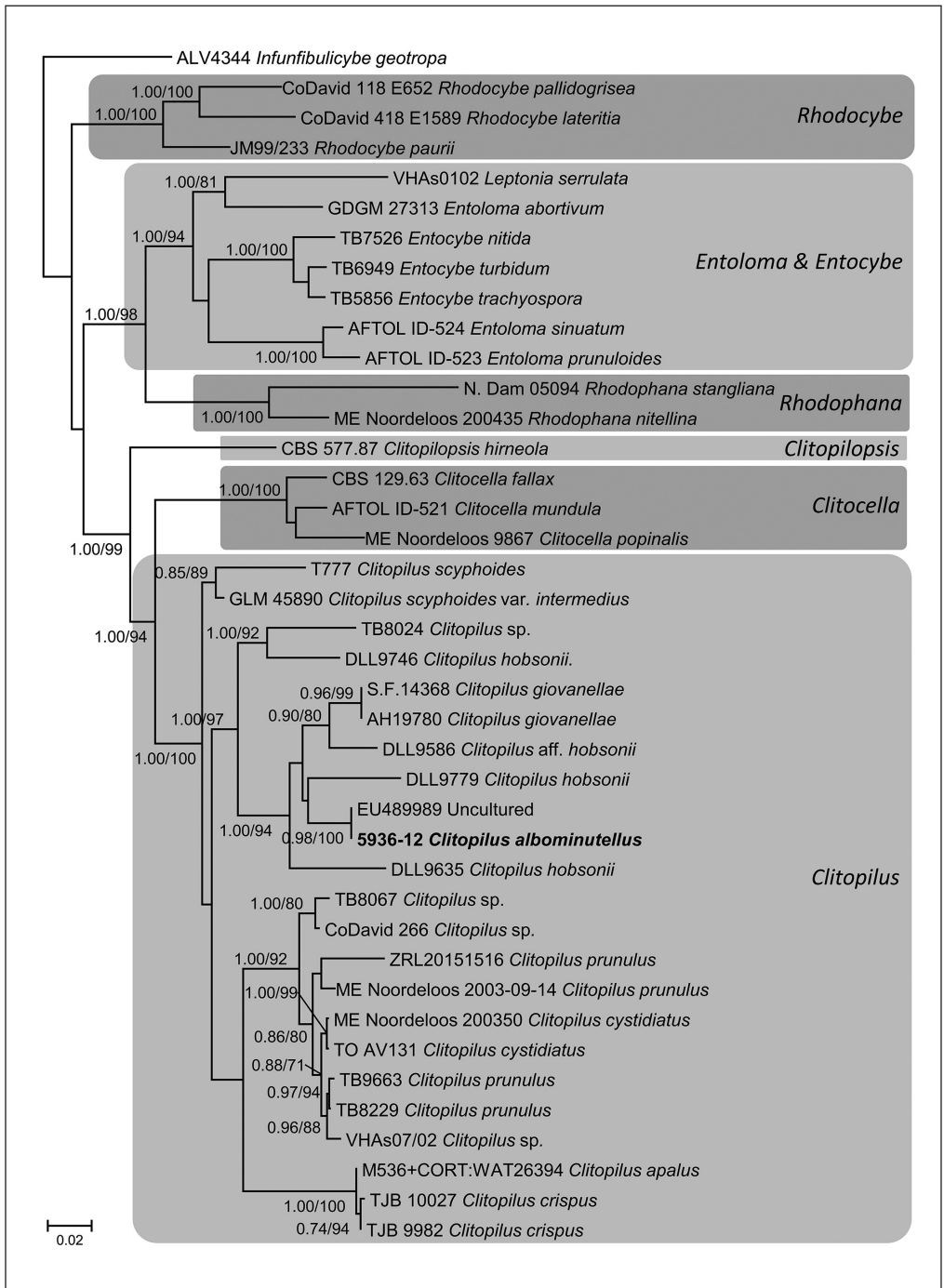
I basidiomi sono stati fotografati in habitat con un dispositivo digitale NIKON 7600 della serie Coolpix, per le immagini di laboratorio e microscopia è stata utilizzata una NIKON Coolpix 4100. Per le analisi di microscopia è stato utilizzato un microscopio binoculare Leica DME con obiettivi acromatici; per specifiche ispezioni di dettaglio è stato utilizzato un obiettivo ad immersione planapocromatico. Il materiale fresco è stato osservato in soluzione acquosa, KOH 3% o colorato con Rosso Congo. Inoltre per saggiare eventuali reazioni di amiloidia e/o di destrinoidia è stato utilizzato il reattivo di Melzer, per verificare la reazione metacromatica nelle spore e nei tessuti imeniali il Blu di cresile e per evidenziare la presenza di strati gelificati nel rivestimento pileico il Blu di toluidina.

Analisi molecolare

Il DNA totale è stato estratto da campioni di erbario essiccati utilizzando una modifica del protocollo MURRAY & THOMPSON (1980). L'amplificazione della PCR è stata effettuata con i primers ITS1F e ITS4 (WHITE *ET AL.*, 1990 e GARDES & BRUNS, 1993) per la regione dell'rDNA ITS, con i primers LR0R e LR5 (VILGALYS & HESTER, 1990 e CUBETA *ET AL.*, 1991) per la regione rDNA 28S, così come con i primers RPB2-i6f-RhoF1 e RPB2-i7r-RhoR1b per il gene rpb2 (CO-DAVID *ET AL.*, 2014). I risultati sono stati controllati in un gel di agarosio all'1% e le reazioni positive sono state purificate e sequenziate con uno o più primers PCR. Le sequenze ottenute sono state confrontate con i cromatogrammi originali per rilevare e correggere possibili errori di lettura. Poi sono state allineate con una selezione di sequenze 28S rDNA, 18S rDNA, rpb2 e tef1, rappresentative della famiglia *Entolomataceae*, seguendo principalmente CO-DAVID. *ET AL.* (2009) e KLUTING *ET AL.* (2014). Tutte sono state poi allineate nel software MEGA 5.0 (TAMURA *ET AL.*, 2011) attraverso la loro applicazione Clustal W e successivamente corrette manualmente. L'allineamento finale include posizioni variabili 181/733 (28S rDNA), 292/645 (rpb2), 176/435 (tef1, introni non inclusi) e 30/756 (18S rDNA).

L'allineamento finale è stato caricato in MrBayes 3.1 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003), dove è stata condotta un'analisi bayesiana (analisi per partizione, due analisi simultanee, sei catene, temperatura 0,2°, campionamento ogni 100 generazioni), fino alla convergenza dei parametri dopo generazioni di 0,93 M, con una deviazione standard inferiore a 0,01. Infine, è stata condotta un'analisi completa per eseguire il paracalcolo dell'albero a massima verosimiglianza con il punteggio migliore in RAXML (STAMATAKIS, 2006), utilizzando l'algoritmo di ricerca standard (analisi per partizione, modello GTRMIX, 2000 repliche di bootstrap). Soglie di significatività sono state stabilite nel 70% delle proporzioni di bootstrap (BP) e il 0,95 di probabilità posteriore (PP).

Studio molecolare realizzato da Pablo Alvarado - laboratorio ALVALAB (SPAGNA).



Albero filogenetico

TASSONOMIA

Clitopilus albominutellus (E. Ludwig) Musumeci & Contu comb. nov. - I.F. n. 556164

Basionimo: *Omphalina albominutella* E. Ludwig in *Pilzkompendium* 1: 432, 2001

Nomi mal applicati: *Omphalia schyphoides* ss Bresadola in *Icon. Mycol.* Tab. 260/1

Collezioni studiate:

cod.: 5645-12 - Rixheim (FRA), 14.10.2012, 8 esemplari;

cod.: 5936-12 - Rixheim (FRA), 20.10.2012, 35 esemplari;

cod.: 6429-12 - Rixheim (FRA), 01.11.2012, 3 esemplari;

cod.: 2871-14 - Rixheim (FRA), 18.10.2014, 22 esemplari.

Ecologia-Habitat: Rixheim (FRA), Dipartimento Haut Rhin – Alsazia, 14.10.2012, 8 esemplari. Temperatura: 9-14 °C, umidità: 93-97%. Zona collinare pianeggiante 240 m s.l.m., non boschiva, in un settore adibito a fabbrica, in tratto aperto-soleggiato con *Corylus avellana* L., *Populus* sp., *Acer platanoides* L., su terreno sabbioso-sassoso alluvionale, substrato finemente sabbioso a tratti ricco di carbonati e residui vegetali in decomposizione. Superficie muscosa a tratti erbosa con presenza di piccole piante praticole. Nelle 4 raccolte sono stati rinvenuti in totale oltre 60 esemplari direttamente su terreno finemente sabbioso nelle vicinanze di *Corylus avellana* e *Populus* sp. Altre specie rinvenute nelle vicinanze: *Scleroderma bovista* Fr., *Arrhenia rickenii* (Hora) Watling, *Hemimycena pseudogracilis* (Kühner & Maire) Singer.

Descrizione dei caratteri morfocromatici

Cappello 0,4-1,2 cm, inizialmente subgloboso poi irregolarmente emisferico-convesso, quindi espanso, disteso-appianato, umbone nullo o debolmente accennato, negli esemplari maturi con depressione centrale con parvenza quasi imbutiforme, margine assolutamente privo di striature, da regolare a sinuoso, a volte anche lobato. Cuticola non igrofana, superficie finemente tomentoso-asperulosa, uniforme poi feltrata, minutamente fibrillosa. Bianco candido, bianco-avorio.

Lamelle mediamente fitte, in alcuni esemplari piuttosto spaziate fino a rade, con presenza di lamellule, basse e sottili, a volte anche forcate, chiaramente decorrenti al gambo. Bianche, uniformi, filo concolore.

Gambo 0,8-1,8 × 0,05-0,15 cm, leggermente più lungo del cappello, tuttavia in alcuni esemplari della medesima misura o perfino più corto. Subcilindrico poco sinuoso, leggermente svasato in alto, claviforme-bulboso alla base. Superficie interamente e finemente pruinosa, rivestita da una finissima granulazione biancastra, finemente feltroso-tomentosa, in basso con residui miceliari biancastri. Colore uniforme bianco-candido.

Carne esigua, quasi assente, odore e sapore poco rilevanti.

Descrizione dei caratteri microscopici

Spore 4,8-7 × 3,5-4,2 µm, lisce, ialine, inamiloidi, non destrinoidi, ellittico-subovali fino a sublarminiformi. Parete sottile, apicolo brevemente fino a mediamente ingrossato, senza poro germinativo. In alcune spore si ha la vaga sensazione di osservare delle sottilissime striature, tuttavia non verificabili al microscopio ottico.

Basidi 16-22 × 6-8 µm, subclaviformi, tetrasporici, raramente bisporici. Trama imenoforale regolare-subregolare, ife (× 3-10 µm) a parete spessa, molto compatte, metacromatiche.

Cheilocistidi non osservati.



Clitopilus albominutellus in habitat.

Foto di Enzo Musumeci



C. albominutellus in habitat.

Foto di Enzo Musumeci



C. albominutellus in habitat.

Foto di Enzo Musumeci



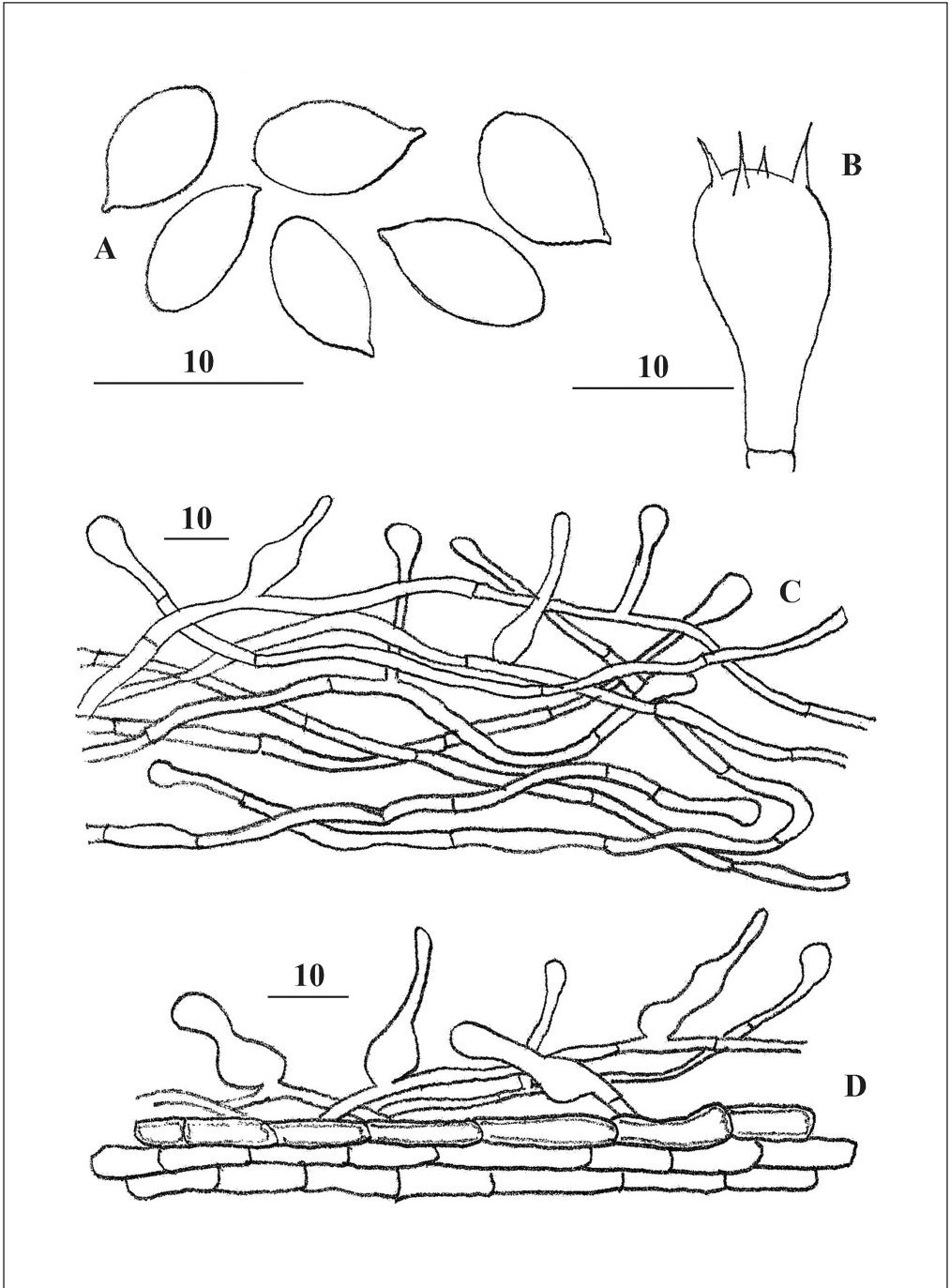
C. albominutellus particolare del cappello.

Foto di Enzo Musumeci



C. albominutellus particolare delle lamelle.

Foto di Enzo Musumeci



Clitopilus albominutellus. A. Spore; B. Basidi; C. Epicute; D. Caulocististidi.

Disegno di Enzo Musumeci

Pleurocistidi non osservati.

Epicute rivestimento pileico non gelificato, ife superficiali ($\times 2-6 \mu\text{m}$) disposte in senso parallelo o irregolarmente intrecciate, non pigmentate, non incrostate. Ife terminali molto ben conformate evocanti dei pileocistidi cilindrici, cilindrico-capitulati, sublageniformi, claviformi. Subcute poco differenziata, ife non pigmentate, non incrostate.

Caulocute con presenza di caulocistidi? ($16-30 \times 4-7 \mu\text{m}$), subcilindrici, sublageniformi, claviformi o irregolarmente conformati. Ife superficiali della caulocute ($\times 2-5 \mu\text{m}$) senza pigmentazione e nessuna incrostazione. Ife trama centrale ($\times 3-10 \mu\text{m}$) a parete spessa, non pigmentate, non incrostate.

Unioni a fibbia assenti in tutti i tessuti, sporadica presenza di pseudo giunti.

Osservazioni

Questa specie può risultare difficile da determinare perché esistono svariati piccoli funghi di aspetto simile fra i quali *Hemimycena ignobilis* Joss. ex Bon, *Omphalina mutila* (Fr.) P.D. Orton e *Delicatula integrella* (Pers.) Fayod, ma questi hanno sempre ife munite di giunti a fibbia e basidi non così corti e larghi. Le varie altre specie di *Clitopilus* a colorazioni bianche possiedono spore ornamentate e rosa in massa onde la distinzione è anche più agevole (NOORDELOOS, 1993, 2008).

In realtà la confusione più facile sarebbe con *C. giovanellae* (Bres.) Singer (ss. orig Bres. non Singer, 1946, 1978, Joss., 1955, Contu, 1992, etc), che pure possiede taglia ridotta, colorazioni a volte pallide (non sempre grigie o grigio-ocra) ed habitat alofilo, in terreni aperti, sabbiosi e con cotica costituita da muschi ed erbe basse.

Tuttavia *C. albominutellus* si distingue per le colorazioni bianche, la superficie pileica più liscia e opaca, la carne priva di odore e le spore mediamente di dimensioni minori.

Nello studio di microscopia non si evidenziano marcate peculiarità specifiche sulla specie (assenza totale di cistidi imeniali) pertanto ad una prima superficiale analisi le strutture appaiono relativamente banali. Da rilevare tuttavia la presenza di sporadiche forme nel rivestimento pileico e nella caulocute, che appaiono simili a pileocistidi e caulocistidi anche se non sono sempre così bene evidenziate in quanto i tessuti sono molto compatti, difficili da frammentare e il rischio di collassamento è molto elevato.

La spora al dettaglio ottico, come menzionato, si presenta priva di ornamentazione. Tuttavia in alcune spore collassate si ha la sensazione di osservare delle sottilissime striature longitudinali o almeno si evidenzia una effimera ornamentazione. Probabilmente con l'aiuto di un microscopio elettronico sarebbe possibile ottenere un'immagine più dettagliata.

Di seguito proponiamo una chiave per la determinazione delle specie europee di *Clitoplus*, sez. *Omphaloidei*, includente sia *C. albominutellus* che *C. giovanellae*.

Chiave per la determinazione delle specie europee di:

Clitoplus* sez. *Omphaloidei G. Moreno, Contu, A. Ortega, Platas & Pelàez in *Mycol. Res.* 111: 1401, 2007:

1. odore sempre assente, cappello non o solo molto leggermente tomentoso, bianco candido, spore per lo più non oltre i $7 \mu\text{m}$ di lunghezza. Europa centrale e settentrionale, soprattutto in montagna, in terreni umidi muscosi *C. albominutellus*

1^a. odore forte, farinoso, penetrante, cappello spesso finemente feltrato o tomentoso, sericeo, da grigio a grigio-ocraceo, spore spesso lunghe oltre i $7 \mu\text{m}$. Europa meridionale, soprattutto in terreni sabbiosi costieri (= *Omphalina farinolens* Moreno & Esteve-Rav.) *C. giovanellae*

Per ragioni di completezza riportiamo qui di seguito la descrizione di una recente raccolta di *C. giovanellae* fatta da M.C. in Sardegna:

Clitopilus giovanellae (Bres.) Singer in *Mycologia* 34, 66, 1942

Sinonimi:

= *Omphalia giovanellae* Bresadola in *Fungi Tridentini*, I: 9, tab. V, fig.2, 1881

Non *Clitopilus giovanellae* (Bres.) Singer s. Singer, loc. cit., *Omphalia giovanellae* ss. Joss. (1955), Noordel. (1993), Singer p.p. (1946, 1978), Contu (1992) (= *Clitopilus bigelowii* T.J. Baroni)

= *Omphalina farinolens* G. Moreno & Esteve-Rav. in *Micologia* 2000: 303, 2001

Cappello 5-15 mm, pochissimo carnoso, convesso poi allargato e con centro nettamente depresso-ciatiforme, mai umbonato, secco, non striato, da grigio-cenere pallido a grigio-ocra, superficie leggermente tomentosa e debolmente sericea.

Lamelle piuttosto sottili, strette, alquanto fitte, decorrenti, bianche ed immutabili.

Gambo 10-20 × 1-2 mm, cilindrico a base eguale, secco, opaco, liscio, bianco oppure leggermente concolore al cappello; micelio bianco.

Carne fragile, bianca, immutabile odore fortemente farinoso; sapore simile, non amaro.

Sporata non ottenuta, ma probabilmente bianca.

Spore 6-8,2 × 3,7-4,2 μm, ialine, non cianofile, lungamente ellissoidali, ovoidi o amigdaliformi, talvolta subnaviculari, per lo più, comunque, con sommità ogivale, lisce, con parete sottile e una o più guttule oleose, apicolo evidente.

Basidi 15-25 × 6-7 μm, tetrasporici, clavati, senza giunto a fibbia basale; subimenio con textura a puzzle, composto da elementi allargati.



Clitopilus giovanellae in habitat.

Foto di Marco Contu

Trama dell'imenoforo parallela, composta da ife piuttosto sottili, oleifere sparse. Cistidi assenti. Cellule marginali assenti.

Rivestimento pileico composto da una xerocutis di ife cilindriche molto gracili, intrecciate e spesso disordinatamente erette, larghe 2-3(4,5) µm, pigmento intraparietale. Giunti a fibbia assenti.

Habitat gregario in terreni sabbiosi a cotica erbosa discontinua. Autunno. Conosciuto dall'Italia e dagli USA.

Materiale studiato: Italia, prov. Sassari, Aglientu, loc. "Riu Li Saldi", vicino alla spiaggia, fra muschi ed erba bassa, in terreno sabbioso, 16.10.2005, leg. M. Contu (GDA).

Bibliografia

- BARONI T.J. — 1995: Entolomataceae in North America IV: *Clitopilus bigelowii* sp. nov. Documents Mycologiques 25(98-100): 59-64.
- BRESADOLA G. — 1928: *Iconographia Mycologica*. Vol. VI., tab.260/1. S.B.I, Milano.
- CONTU M. — 1992: Agaricales rare o interessanti dalla Sardegna. II. Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid 17: 95-100.
- CONTU M. — 2009: *Studi sul genere Clitopilus (incl. Rhodocybe) - I. Prima segnalazione in Italia di Clitopilus blancii* comb. nov., nuove raccolte di *Clitopilus giovanellae*, iconografia di *Clitopilus carneolus* comb. nov. e ulteriori nuove combinazioni. Boll. AMER 77-78: 15-31.
- CUBETA M.A., ECHANDI E., ABERNETHY T. & VILGALYS R. — 1991: Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* species using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. Phytopathology 81: 1395-1400.
- CO-DAVID D., LANGEVELD D. & NOORDELOOS M.E. — 2009: Molecular phylogeny and spore evolution of Entolomataceae. Persoonia 23:147-176.
- 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.
- JOSSERAND M. — 1955: *Clitopilus omphaliformis* Joss. et *Clitopilus giovanellae* (Bres.) Singer. Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon 24: 161-164.
- LUDWIG E. — 2000-2001: *Pilzkompedium. Band 1. Die kleineren Gattungen der Makromyzeten mit lamelligem Hymenophor aus den Ordnungen Agaricales, Boletales und Polyporales. Beschreibungen*. IHW Verlag, Eching.
- LUDWIG E. — 1997: Was ist *Omphalia schyphoides* ss Bres.?. Boll. Gr. Micol. G. Bresadola 40:291-295.
- KLUTING K.L., BARONI T.J. & BERGEMANN S.E. — 2014: Toward a stable classification of genera within the Entolomataceae: a phylogenetic re-evaluation of the *Rhodocybe-Clitopilus* clade. Mycologia 106(6):1127-1142.
- MORENO G. & ESTEVE-RAVENTÓS F. — 2000: *Omphalina farinolens* sp. nov., a new species from the iberian xerophytic grasslands. Micologia 2000 (Trento): 393-396.
- MORENO G., CONTU M., ORTEGA A., PLATAS G. & PELÀEZ F. — 2007: Molecular phylogenetic studies show *Omphalina giovanellae* represents a new section in *Clitopilus* (Agaricomycetes). Mycol. Res. 111: 1399-1405.
- MURRAY M.G. & THOMPSON W.F. — 1980: Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8(19): 4321-4325.
- MUSUMECI E. — 2017, pubbl. 2018: *Omphalina albominutella* e altre specie interessanti del territorio alsaziano. R.M.R., Boll. Amer 100-101: 51-70.
- NOORDELOOS M.E. — 1984: *Notulae ad floram agaricinam neerlandicam IV-V. Clitopilus and Leucopaxillus*. Persoonia 12: 155-167.

- NOORDELOOS M.E. — 1993: *Studies in Clitopilus (Basidiomycetes, Agaricales) in Europe*. Persoonia 15: 241-248.
- NOORDELOOS M.E. — 2008: *Clitopilus (Fr.: Fr.) P. Kumm.* In: KNUDSEN H. & VESTERHOLT J. (eds.): *Funga Nordica - Agaricoid, boletoid and cyphelloidgenera*. Nordsvamp, Copenhagen, pp. 431-432.
- RONQUIST F. & HUELSENBECK J.P. — 2003: *MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models*. Bioinformatics 19: 1572-1574.
- SINGER R. — 1946: *The Boletinae of Florida, with notes on extralimital species. IV. The lamellate families (Gomphidiaceae, Paxillaceae and Jugasporaceae)*. Farlowia 2: 527-567.
- SINGER R. — 1978: *Keys for the identifications of the species of Agaricales. II*. Sydowia 31: 193-237.
- STAMATAKIS A. — 2006: *RAxML-VI-HPC: maximum likelihoodbased phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models*. Bioinformatics 22: 2688-2690.
- 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.
- VILGALYS R. & HESTER M. — 1990: *Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several Cryptococcus species*. Journal of Bacteriology 172: 4238-4246.
- 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.