

The monitoring and documentation of a certain habitat of *Tricholoma cingulatum* (*Tricholomataceae*)

János Molnár¹, Dorottya Vrba¹, György Vrba^{1*}

¹Erdei Gombász Tanoda Lp., 4 Moravcsik Street, H-2800 Tatabánya

*Corresponding author: info@mikochips.com

Introduction

Our present publication is about the species-level molecular determination of the *Tricholoma cingulatum* taxon, as well as the two-year monitoring of its habitat. The publication is mainly about the exploration of its tree and shrub phytocoenosis, and due to its presumptive host-specific lifestyle, it is about searching for its mycorrhizal partner^{[1][2]}, willow (*Salix spp.*), and the documentation of the habitat.

We documented the *Tricholoma cingulatum* ramets on the 19th of November, 2022 (V63_B16) and on the 25th of November, 2023 (V84_SVRG-32), approximately 4 meters from each other in the Gerecse Mountains, above Dunaalmás, right next to the Római Road, in front of the mine yards of the former quarries (stony soil with a shallow tilth), in a pine forest along with deciduous trees that had a strong shrub layer /47,71527° É, 18,33155° K/.

In the time interval between the 19th of November, 2022 and the 7th of July, 2024, we examined the habitat of the fruiting bodies in various aspects, especially looking for its mycorrhizal partner plant (*Salix spp.*) [3], which we did not find when we documented the first find (19 November, 2022).

Materials and methods

We first studied the fruiting bodies macroscopically (Figure 1), then later on, in order to identify the mushroom on exact, species-level, we used molecular methods.

We monitored the mushroom's habitat between the 19th of November, 2022 and the 7th of July, 2024, and we continuously documented its phytocoenosis in the fall, spring, and summer periods, one aspect at a time.

Molecular methods

We obtained DNA from samples taken from the cap tissue of the dried mushrooms by Direct PCR method (Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Master Mix), then we amplified the DNA with a fungus-specific primer pair (ITS1F – CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A; ITS4 – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) in a polymerase chain reaction (PCR).

The PCR products were electrophoresed on agarose gel, stained with nucleic acid stain and then visualized by UV transilluminator.

The sequencing of the finished PCR products were performed in two ways.

1.) By a third party, after cleaning, with the Sanger dideoxy method.

2.) With the third generation sequencing technology available to us: Oxford Nanopore Technologies – Flow Cell (Flongle), chemistry: Native Barcoding Kit 24, multiplexing/.

The results of the Sanger sequencing were cleaned with the ChromasPro program.

The analysis of the sequence data obtained by the Oxford Nanopore Technologies method and the preparation of the consensus file were performed using the Amplicon_sorter application.

Afterwards, we supplemented our ITS data with additional high-quality sequences available from GenBank and UNITE (Table 1) and then we created a phylogenetic tree by using the RaxmlGUI program and the phylogeny.fr portal /maximum likelihood analysis (Maximum Likelihood) using PhyML/.

In the first case, the Maximum Likelihood (ML) tree was created with 1000 bootstrap replications, and then the tree was visualized (Figure 2) with the UGENE program.

In the second case, the reliability of the internal branch was examined with the approximate likelihood-ratio test /aLRT: SH-Like/ (Figure 3, 4).

The *Tricholoma virgatum* taxon was used as an outgroup. Sequence alignments were performed by using SeaView.

Results and discussion

In both cases, the result of the BLAST search showed a high percentage of similarity to the *Tricholoma cingulatum* sequences available from GenBank with a 100% query coverage.

1./ V63_B16_ *Tricholoma cingulatum*_Hungary (Per. ident. 100.00%, E-value 0.00, KU695460).

2./ V84_SVRG-32_ *Tricholoma cingulatum*_Hungary (Per. ident. 99.77%, E-value 0.00, KU695460).

The isolated base polymorphism at the 438th position of the ITS region (V84_SVRG-32), which probably resulted from a sequencing error, was corrected with the IUPAC code for the case of nucleotide ambiguity.

/At this point, we would like to note that, unfortunately, the sequence of the Danish neotype of *Tricholoma cingulatum* (GenBank LT000015) is not of the best quality, so it is not included in the BLAST results in our publication./

During the ITS sequence analyses, we included 22 *Tricholoma* ITS sequences in our phylogenetic analysis.

The macromorphological features, the alignment of the sequences and the creation of the phylogenetic trees confirmed the results of the BLAST search, identifying the mushroom specimens we examined as *Tricholoma cingulatum* taxon.

Plant species documented in the habitat (Figure 5)

Pinus nigra, *Pinus sylvestris*, *Juniperus communis*, *Quercus cerris*, *Quercus spp.*, *Ulmus laevis*, *Ulmus spp.*, *Fraxinus sp.*, *Populus sp.*, ***Salix caprea***, *Cornus sp.*, *Crataegus spp.*;

Berberis vulgaris, *Viburnum sp.*;

Hieracium sp., *Rubus sp.*, *Euphorbia sp.*.

As a result of several inspections of the habitat, we found and recorded the presumed tree partner of *Tricholoma cingulatum*, the goat willow (*Salix caprea*).

The comprehensive research and revision of lifestyle types is an extremely complex, complicated and expensive process.

Starting with less relevant methods on the topic, such as analyzing the quantity and weight of the fruiting body, as well as the amount of spores, studying the relative quantity and ratio of carbon and nitrogen isotopes, the analyzation of the enzymatic qualities, the detection of mycorrhiza in pure culture and the Hartig net and so on, to various molecular methods.

In the case of fungi living a root-linked lifestyle in the habitat, its exact mycorrhizal partner can mostly only be determined by molecular means, despite the fact that there is a tendency of defining them based on the microscopic features of the root tips as well.

The *Tricholoma cingulatum* supposedly lives a lifestyle tied to a special host genus^{[1][2]}, despite this, there are several reports that, unfortunately, have not been verified by scientific means, according to which the mushroom's tree partner has not been found in the habitat.

In our opinion, the verification or refutation of these hypotheses could only be made possible by molecular methods.

As long as this procedure and these tools are not available, thorough, multiple visits in various aspects, furthermore, accurate examination and documentation of the ecosystem are essential for ambitious publication.

A *Tricholoma cingulatum* (*Tricholomataceae*) egy bizonyos élőhelyének monitorozása és dokumentálása

Molnár János¹, Vrba Dorottya¹, Vrba György^{1*}

¹Erdei Gombász Tanoda Bt., H-2800 Tatabánya, Moravcsik u. 4.

*A szerző levelezési címe: gomba@napora.hu

Bevezetés

Jelen publikációnk a *Tricholoma cingulatum* taxon fajszintű molekuláris meghatározásáról, valamint élőhelyének kétéves monitorozásáról, főként fás- és cserjés növénytársulásának, azonfelül vélelmezett gazdaspecifikus életmódja folytán, a fűz (*Salix spp.*) mikorrhiza partnerének^{[1][2]} felkutatásából és az élőhely dokumentálásáról szól.

A *Tricholoma cingulatum* rameteket 2022. november 19-én (V63_B16) és 2023. november 25-én (V84_SVRG-32) egymástól kb. 4 méterre dokumentáltuk a Gerecse-hegységben, Dunaalmás felett, közvetlenül a Római út mellett, az egykori kőbányák bányaudvarai előtti (sekély termőrétegű, köves talaj), erős lombhullató cserjeszinttel bíró, lombelegyes fenyőerdőben /47,71527° É, 18,33155° K/.

2022. november 19. és 2024. július 7. közötti időintervallumban vizsgáltuk különféle aszpektusokban a termőtestek élőhelyét, kiemelten keresve mikorrhiza partnernövényét (*Salix spp.*)^[3], amelyet az első lelet dokumentálásakor (2022. november 19.) nem találtunk meg.

Anyagok és módszerek

A termőtesteket először makroszkopikusan (Ábra 1.) tanulmányoztuk, majd a gomba pontos, fajszintű identifikációjához a továbbiakban molekuláris módszereket alkalmaztunk.

A gomba élőhelyét 2022. november 19. - 2024. július 7. között kísértük figyelemmel, valamint dokumentáltuk folyamatosan a növénytársulását az őszi, a tavaszi és a nyári időszakban, egy-egy alkalommal.

Molekuláris módszerek

A szárított gombák kalapszövetéből vett mintákból Direct PCR eljárással (Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Master Mix) nyert DNS-t gombaspecifikus primerpárral (ITS1F – CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A; ITS4 – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) polimeráz láncreakcióban (PCR) amplifikáltuk.

A PCR termékeket nukleinsav festéssel agaróz gélen elektroforetizáltuk, majd UV fénnnyel vizualizáltuk.

A kész PCR termékek szekvenálása kétféle módszerrel történt.

1.) Harmadik fél által, egyszeres tisztítást követően, Sanger dideoxy eljárással.

2.) Rendelkezésünkre álló harmadik generációs szekvenálási technológiával: Oxford Nanopore Technologies – Flow Cell (Flongle), chemistry: Native Barcoding Kit 24, multiplexing/.

A Sanger-féle szekvenálás eredményét a ChromasPro programmal tisztítottuk.

Az Oxford Nanopore Technologies eljárással nyert szekvenciaadatok elemzését és a konszenzus fájl elkészítését az Amplicon_sorter alkalmazással végeztük.

Ezt követően az ITS-adatainkat, kiegészítve a GenBank és a UNITE kínálatában elérhető jó minőségű további szekvenciákkal (Táblázat 1.) törzsfát készítettünk a RaxMLGUI programmal, valamint a phylogeny.fr portál segítségével /maximális valószínűségi analízis (Maximum Likelihood) PhyML használatával/.

Az első esetben a maximális valószínűségi (ML) törzsfát 1000 bootstrapreplikációval készítettük, majd a törzsfát a UGENE alkalmazással vizualizáltuk (Ábra 2.).

A második esetben a belső ág megbízhatósága approximate likelihood-ratio teszttel /aLRT: SH-Like/ vizsgált (Ábra 3., 4.).

Külső csoportként a *Tricholoma virgatum* taxont használtuk. A szekvenciák illesztését a SeaView programmal végeztük.

Eredmények és diszkusszió

A BLAST keresés eredménye 100%-os lekérdezési lefedettség mellett, minden esetben magas százalékos hasonlóságot mutatott a GenBank-ból elérhető *Tricholoma cingulatum* szekvenciákkal.

1./ V63_B16_ *Tricholoma cingulatum*_Hungary (Per. ident. 100.00%, E-value 0.00, KU695460).

2./ V84_SVRG-32_ *Tricholoma cingulatum*_Hungary (Per. ident. 99.77%, E-value 0.00, KU695460).

Az ITS-régió (V84_SVRG-32) 438. pozíciójában izolált bázispolimorfizmust, amely véletlmezzen szekvenálási hibából adódhatott, a nukleotid kétértelműségének esetére vonatkozó, IUPAC kódossal korrigáltuk.

/Itt kívánjuk megjegyezni, hogy sajnos a *Tricholoma cingulatum* Dán neotípusának (GenBank LT000015) szekvenciája nem a legjobb minőségű, ezért nem is szerepel cikkünkben a BLAST eredmények között./

Az ITS szekvencia elemzések során 22 *Tricholoma* ITS szekvenciát vontunk be a filogenetikai elemzésünkbe.

A makromorfológiai jegyek, ezenfelül a szekvenciák illesztése, valamint a filogenetikai fák elkészítése megerősítették a BLAST keresés eredményét, *Tricholoma cingulatum* taxonként identifikálva a vizsgált gombapéldányainkat.

Az élőhelyen (Ábra 5.) dokumentált növényfajok

Pinus nigra, *Pinus sylvestris*, *Juniperus communis*, *Quercus cerris*, *Quercus spp.*, *Ulmus laevis*, *Ulmus spp.*, *Fraxinus sp.*, *Populus sp.*, *Salix caprea*, *Cornus sp.*, *Crataegus spp.*;

Berberis vulgaris, *Viburnum sp.*;

Hieracium sp., *Rubus sp.*, *Euphorbia sp.*

Az élőhely többszöri átvizsgálásának eredményeképpen megtaláltuk és rögzítettük a *Tricholoma cingulatum* véletlmezett fapartnerét, a kecskefüzet (*Salix caprea*).

Az életmódtípusoknak az átfogó kutatása, revízioja, rendkívül összetett, bonyolult és költséges folyamat.

Kezdve a témaiban csekélyebb relevanciával bíró, a termőtest mennyiséget és tömegét, továbbá a spórák mennyiséget analizáló módszereken át, a szén- és nitrogénizotópok relatív mennyiséget, arányát vizsgáló, azonfelül az enzimatikus tulajdonságokat elemző eljárásokon keresztül, a tiszta kultúrában történő mikorrhiza és a Hartig-háló detektálásán túl, a különféle molekuláris módszerekig.

Az élőhelyen a gyökérkapcsolt életmódot élő gombák esetében a pontos mikorrhizapartner meghatározása leginkább csak molekuláris eszközökkel lehetséges, annak ellenére, hogy létezik tendencia a gyökércsúcok mikroszkopikus jegyei alapján történő definiálásnak szintűgy.

A *Tricholoma cingulatum* véletlmezzen speciális gazdanemzetségezhez^{[1][2]} kötött életmódot él, ennek ellenére több esetben lehet találkozni olyan, sajnos tudományos eszközökkel nem igazolt riportolásokkal, amelyek szerint az élőhelyen nem találták meg a gomba fapartnerét.

Véleményünk szerint ezen hipotézisek igazolása, vagy cáfolata kizárolag a molekuláris módszerek által válthat lehetővé. Amíg ezen eljárásmód és eszközök nem állnak rendelkezésre, addig az ökoszisztemára alapos, különféle aszpekterekben történő többszöri felkeresése, akkurátus vizsgálata és dokumentálása elengedhetetlen az igényes publikáláshoz.

Figure 1. / **Ábra 1.** Basidiomes of *Tricholoma cingulatum*. / A *Tricholoma cingulatum* termőtesteit.

A-B: Fresh basidiomes./Friss termőtesek (V63_B16). C-D: Fresh basidiomes./Friss termőtesek (V84_SVRG-32).

Photographs/Fotók: A, B (in situ) by György Vrba; C, D: (in situ) by János Molnár

**Table 1.** The nrDNA ITS sequences of *Tricholoma* species used in the phylogenetic analysis. Hungarian data is in bold. / **Táblázat 1.** A filogenetikai analízisben használt *Tricholoma* fajok nrDNS ITS szekvenciái. A hazai adat félkövér betűvel látható.

No.	Species name / Faj	Country / Ország	ITS (Sequences ID)
1.	<i>Tricholoma terreum</i>	Nepal	LT000116
2.	<i>Tricholoma terreum</i> (epitype)	Germany	LT000098
3.	<i>Tricholoma terreum</i>	Slovenia	LT000149
4.	<i>Tricholoma bonii</i> (holotype)	Italy	LT000101
5.	<i>Tricholoma bonii</i>	Estonia	AM181413
6.	<i>Tricholoma bonii</i>	Denmark	LT000013
7.	<i>Tricholoma cingulatum</i> (neotype)	Denmark	LT000015
8.	<i>Tricholoma cingulatum</i>	Spain	KU695460
9.	<i>Tricholoma cingulatum</i>	Hungary	V63_B16
10.	<i>Tricholoma cingulatum</i>	Netherlands	LT000200
11.	<i>Tricholoma cingulatum</i>	Slovakia	LT000128
12.	<i>Tricholoma cingulatum</i>	Hungary	V84_SVRG-32
13.	<i>Tricholoma inocybeoides</i>	Sweden	LT000175
14.	<i>Tricholoma inocybeoides</i>	Denmark	LT000025
15.	<i>Tricholoma inocybeoides</i>	Sweden	LT000176
16.	<i>Tricholoma sculpturatum</i>	Denmark	LT000042
17.	<i>Tricholoma sculpturatum</i>	Slovenia	LT000146
18.	<i>Tricholoma sculpturatum</i> (neotype)	Sweden	LT000187
19.	<i>Tricholoma sculpturatum</i>	Denmark	LT000043
20.	<i>Tricholoma argyraceum</i>	France	HQ184113

Table 1. (continued) / **Táblázat 1.** (folytatás)

No.	Species name / Faj	Country / Ország	ITS (Sequences ID)
21.	<i>Tricholoma argyraceum</i>	Denmark	LT000010
22.	<i>Tricholoma argyraceum</i>	Sweden	LT000155
23.	<i>Tricholoma argyraceum</i> (epitype)	Netherlands	LT000198
24.	<i>Tricholoma virgatum</i>	Estonia	UDB011593

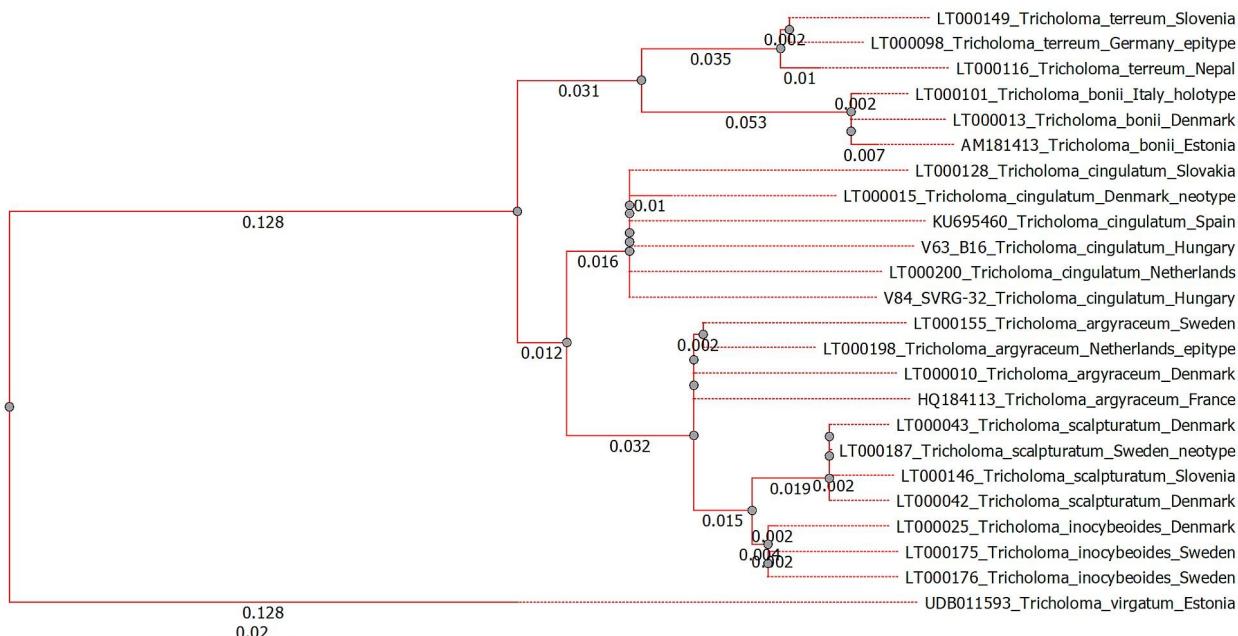
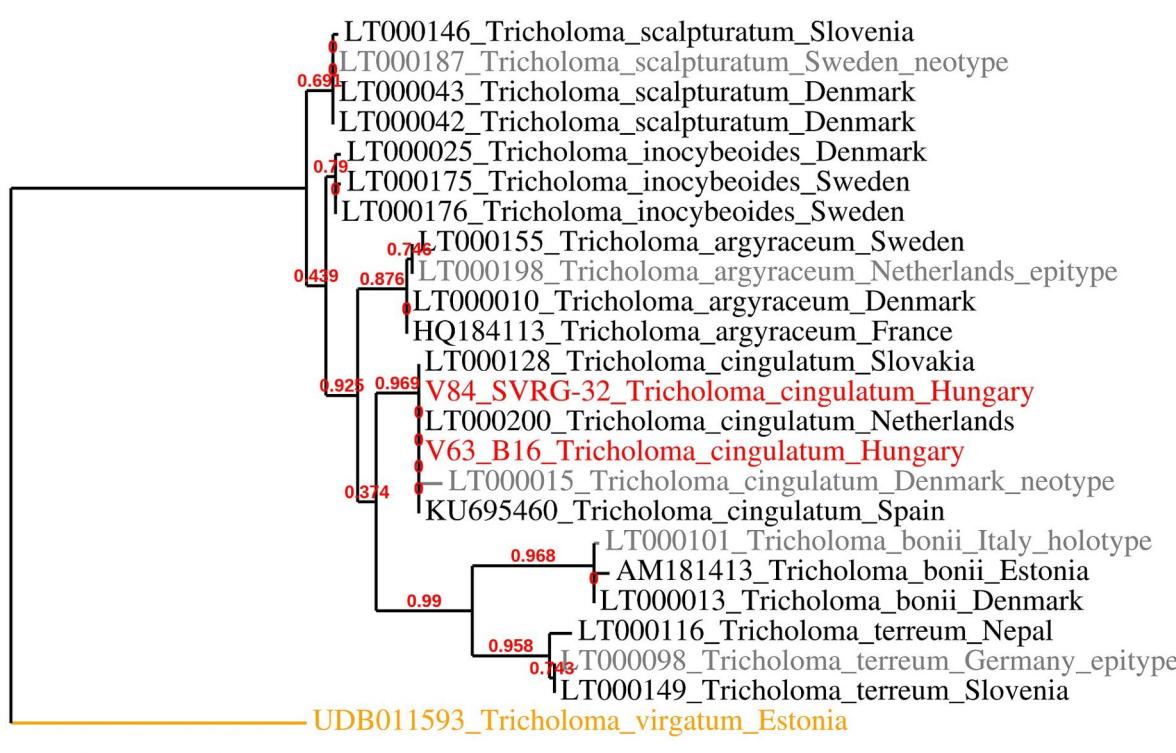
Figure 2. (Maximum likelihood analysis, RaxmlGUI, bootstrap: 1000) / **Ábra 2.** (Maximum likelihood analízis, RaxmlGUI, bootstrap: 1000)**Figure 3.** (Maximum likelihood analysis, PhyML, (aLRT: SH-Like) test) / **Ábra 3.** (Maximum likelihood analízis, PhyML, (aLRT: SH-Like) teszt)

Figure 4. (Maximum likelihood analysis, PhyML, (aLRT: SH-Like) test, with Gblocks) / **Ábra 4.** (Maximum likelihood analízis, PhyML, (aLRT: SH-Like) teszt, Gblocks használatával)

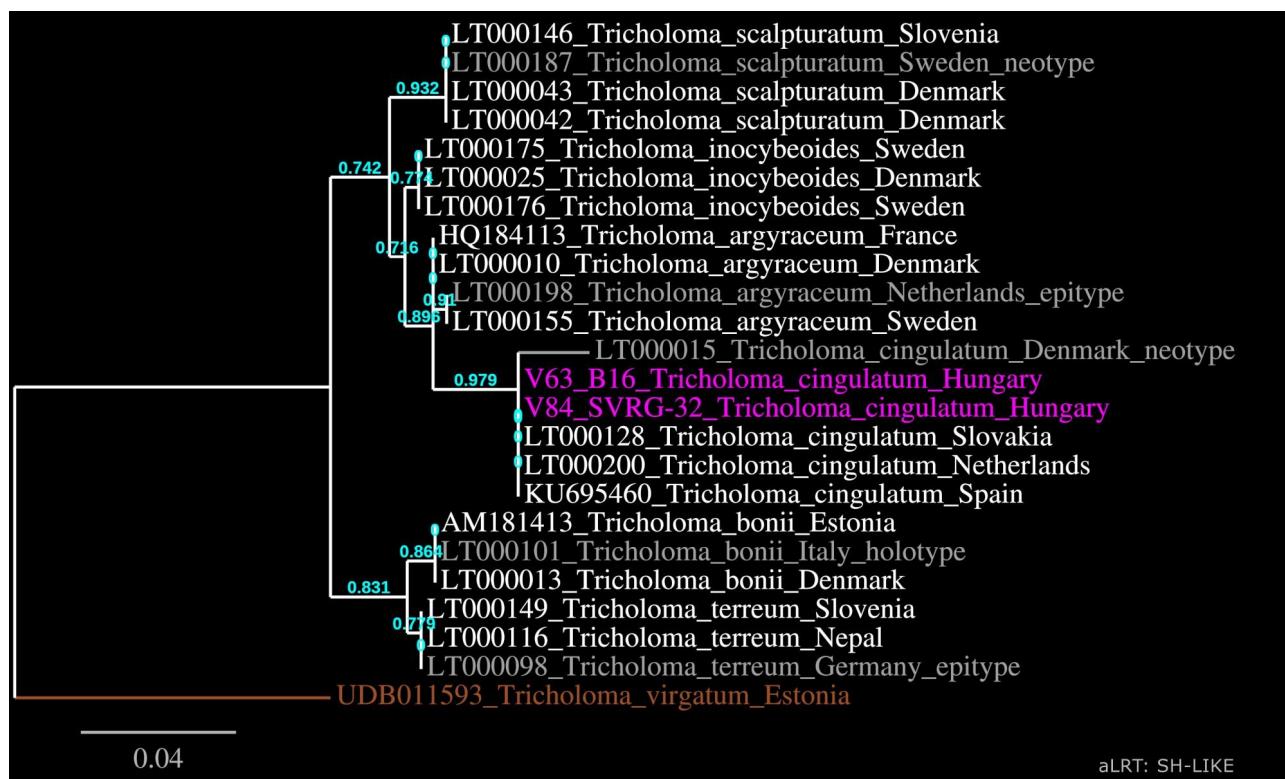
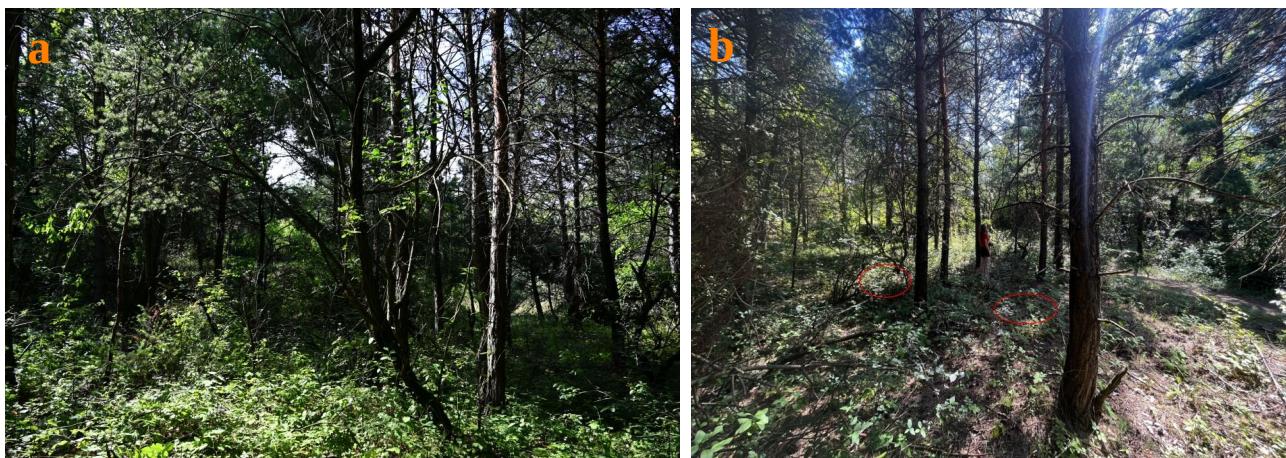


Figure 5. Photos of the habitat. / **Ábra 5.** Fotók az élőhelyről.
Photographs/Fotók: **a, b** by György Vrba



Acknowledgements / Köszönetnyilvánítás

We would like to express our special thanks to Attila Czeglédi for his botanical contribution. / Ezúton is külön köszönetünket fejezzük ki Czeglédi Attilának a botanikai közreműködéséért.

References / Referencia

- [1] Christensen, M. and Heilmann-Clausen, J. 2013. *The Genus Tricholoma Fungi of Northern Europe*, Vol. 4. Svampetryk, Denmark.
- [2] Heilmann-Clausen, J., Christensen, M., Frøslev, T.G. and Kjøller, R. 2017. Taxonomy of Tricholoma in northern Europe based on ITS sequence data and morphological characters. *Persoonia* 38: 38-57.
doi:org/10.3767/003158517X693174
- [3] Petra M. A. Fransson, Ylva K. Toljander, Christel Baum, Martin Weih (2013) Host Plant—Ectomycorrhizal Fungus Combination Drives Resource Allocation in Willow: Evidence for Complex Species Interaction from a Simple Experiment. *Ecoscience*, 20(2):112-121.