

The first documented data of *Paralepistopsis amoenolens* (Agaricales) in Hungary

Attila Czeglédi^{1,2}, Dorottya Vrba¹, György Vrba^{1*}

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

²DMJV Mushroom Inspector Station, 7 Papírgyári Road, H-2400 Dunaújváros

*Corresponding author: info@mikochips.com

Introduction

The singular specimen of the mushroom fruiting body was given to us by a mushroom collector. The collection took place on the 22nd of November, 2023, near the location of Sukoró in a deciduous forest along with black pines (*Pinus nigra*) (Figure 1).

Based on the macromorphological features (robustness, color scheme) of the lepidoid fruiting body, as well as its scent reminiscent of pear blossoms, we assumed that a fruiting body of the *Paralepistopsis amoenolens* species could have been collected.

Besides the macromorphological features, the shape and sizes of the microscopically observed spores ruled out the micromorphological similarity with taxa similar in appearance, but at the same time it confirmed the identicalness of the fungus in question with the *Paralepistopsis amoenolens* species.

Materials and methods

The evaluation of the microscopic features included the observation (Figure 2) and measurement of the spore image. The examination was carried out with Optika B-130 and Nikon Labophot 2 biological microscopes with a 40x objective, the photos were taken with a Euromex CMEX 5 camera, and the measurements were taken with the ImageFocus Plus V2 application (Figure 2).

Later on, in order to determine the exact species of the fungus, we used molecular methods.

Molecular methods

From a sample taken from the dried mushroom's cap tissue and the lamellae, we obtained DNA with a fungus-specific primer pair (ITS1F – CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A; ITS4 – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) using the DNA extraction method (DNeasy PowerSoil Pro Kit) then we amplified it in a polymerase (Thermo Scientific DreamTaq Green PCR Master Mix) chain reaction (PCR).

The PCR products were electrophoresed on 2% agarose gel, stained with nucleic acid stain and then visualized by UV transilluminator.

The sequencing of the finished PCR products were performed by a third party, after cleaning, with the Sanger dideoxy method.

The chromatogram was checked and cleaned with the ChromasPro program, as a result of which we isolated polymorphisms at the four base positions of the ITS1 region, which were corrected with IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) codes for the case of nucleotide ambiguity (Cornish-Bowden, 1985).

The sequence (ITS1) obtained this way was compared with the sequences available in GenBank - using BLAST.

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

In the first case, the Maximum Likelihood tree was created with 1000 bootstrap replications, and then the tree was visualized (Figure 3) 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 4).

In both cases, the taxon *Paralepista flaccida* was used as an outgroup. Sequence alignments were performed by using SeaView.

Results and discussion

The result of the BLAST search showed a high percentage of similarity with the *Paralepistopsis amoenolens* sequences available from GenBank with 100% query coverage (Per. ident. 98.07%, E-value 3e-97, OR863470.1; Per. ident. 98.07%, E-value 3e-97, MZ088114.1;). It also showed similarity with the sequence of two *Clitocybe amoenolens* (Per. ident. 98.07%, E-value 3e-97, JQ585655.1; Per. ident. 98.07%, E-value 3e-97, JQ585653.1).

During the ITS sequence analyses, we included 7 *Paralepistopsis* + 1 *Paralepista* (outgroup) ITS sequences in our phylogenetic analysis.

Our analysis identified two strongly supported species-level clades (*Paralepistopsis amoenolens* and *Paralepistopsis acromelalga*).

The alignment of the sequences and the creation of phylogenetic trees also confirmed the results of the BLAST search, in consensus with the micro- and macromorphological characteristics, on the basis of which we consider our material *Paralepistopsis amoenolens* species.

Paralepistopsis amoenolens (Malençon) Vizzini 2012 is a species described from Morocco as *Clitocybe amoenolens*, but there are already documented data in Spain^[5], France, Italy^[1], Türkiye^[2] and Switzerland^[4], so it was expected that it would also appear in Hungary. Based on molecular tests, it was classified in the *Paralepistopsis* genus in 2012, along with *Clitocybe acromelalga* which was already known from Asia and Japan^[1], however, the exact taxonomic situation of it is still unclear to this day^[6].

Due to the content of the species' dangerous toxin (neurotoxic acromelic acid)^{[1][3]}, further continuous monitoring of the distribution of the taxon would be necessary, as some people collect certain species similar in morphological characteristics for eating purposes.

At the same time as our present publication, we would like to mention that, as far as we know, this is the first confirmed documentation of the *Paralepistopsis amoenolens* species in Hungary.

A *Paralepistopsis amoenolens* (Agaricales) első magyarországi dokumentált adata

Czeglédi Attila^{1,2}, Vrba Dorottya¹, Vrba György^{1*}

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

²DMJV Gombavizsgáló Állomás, H-2400 Dunaújváros, Papírgyári út 7.

*A szerző levelezési címe: info@mikochips.com

Bevezetés

Gombagyűjtő által került bevizsgálásra hozzánk a gombatermőtest egyetlen példánya. A gyűjtés 2023. november 22-én történt, Sukoró település közelében egy lombegyes feketefenyvesben (*Pinus nigra*) (1. ábra).

A lepestoid habitusú termőtest makromorfológiai jegyei (robosztussága, színvilága), valamint leginkább a körtevirágra emlékeztető illata alapján vélelmeztük, hogy a *Paralepistopsis amoenolens* faj egy termőteste kerülhetett begyűjtésre.

A makromorfológiai jegyek mellett, a mikroszkóposan megfigyelt spórák alakja és méretei is kizárták a megjelenésében hasonló taxonokkal való mikromorfológiai egyezőséget, ugyanakkor erősítették a kérdéses gombának a *Paralepistopsis amoenolens* fajjal történő egyezőségét.

Anyagok és módszerek

A mikroszkopikus jegyek értékelése a spórákép megfigyelésére (2. Ábra) és mérésére terjedt ki. A vizsgálat Optika B-130 típusú, valamint Nikon Labophot 2 biológiai mikroszkópokkal, 40x objektívvel történt, a fotók Euromex CMEX 5 kamerával, a mérések az ImageFocus Plus V2 alkalmazással készültek (2. ábra).

A gomba pontos, fajszintű meghatározásához a továbbiakban molekuláris módszereket alkalmaztunk.

Molekuláris módszerek

A szárított gomba kalapszövetéből és lemezéből vett mintából történő DNS kivonással (DNeasy PowerSoil Pro Kit) nyert DNS-t gombaszpecifikus primerpárral (ITS1F – CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A; ITS4 – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) polimeráz (Thermo Scientific DreamTaq Green PCR Master Mix) láncreakcióban (PCR) amplifikáltuk.

A PCR termékeket nukleinsav festéssel 2%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk, majd UV fénnel vizualizáltuk.

A kész PCR termék szekvenálása harmadik fél által, egyszeres tisztítást követően, Sanger dideoxy eljárással történt.

A kromatogram ellenőrzését, tisztítását a ChromasPro programmal végeztük, melynek eredményeként megkapott ITS1 régió négy bázishelyén izoláltunk polimorfizmust, amelyeknek korrigálása IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), a nukleotid kétértelműségének esetére (CORNISH-BOWDEN, 1985) vonatkozó, kódokkal megtörtént.

Az így megkapott szekvenciát (ITS1) a GenBank rendelkezésre álló szekvenciáival – BLAST segítségével – hasonlítottuk össze.

Ezt követően az ITS1-adatunkat, kiegészítve a GenBank 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 az UGENE alkalmazással vizualizáltuk (Ábra 3.).

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

Külső csoportként mindkét esetben a *Paralepista flaccida* taxont használtuk. A szekvenciák illesztését a SeaView programmal végeztük.

Eredmények és diszkusszió

A BLAST keresés eredménye 100%-os lekérdezési lefedettség mellett, magas százalékos hasonlóságot mutatott a GenBank-ból elérhető *Paralepistopsis amoenolens* szekvenciákkal (Per. ident. 98.07%, E-value 3e-97, OR863470.1; Per. ident. 98.07%, E-value 3e-97, MZ088114.1;), továbbá két *Clitocybe amoenolens* szekvenciájával (Per. ident. 98.07%, E-value 3e-97, JQ585655.1; Per. ident. 98.07%, E-value 3e-97, JQ585653.1).

Az ITS szekvencia elemzések során 7 *Paralepistopsis* + 1 *Paralepista* (outgroup) ITS szekvenciát vontunk be a filogenetikai elemzésünkbe.

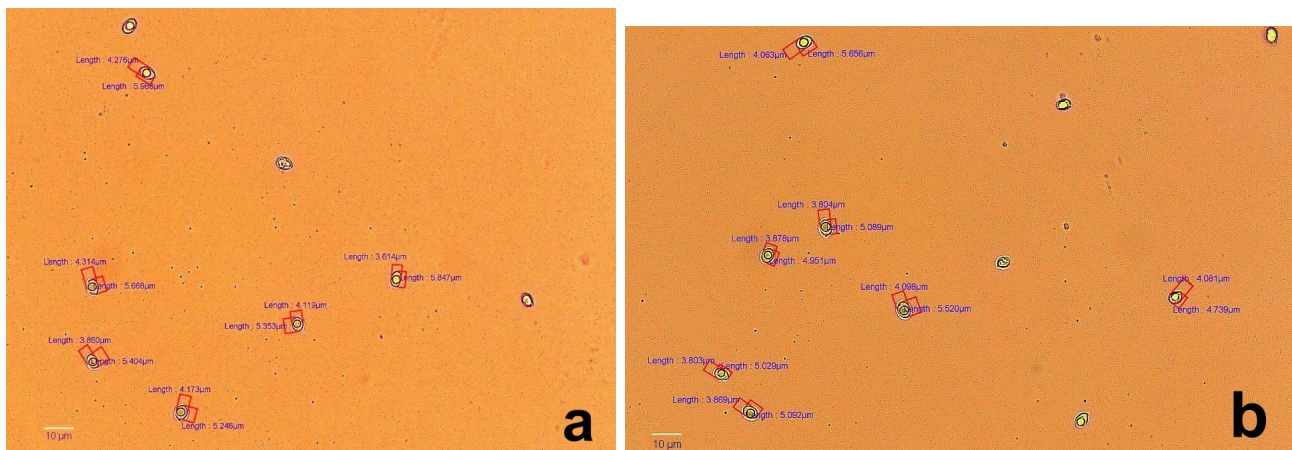
Az analízisünk két erősen támogatott fajszintű kládot azonosított (*Paralepistopsis amoenolens* és *Paralepistopsis acromelalga*).

A szekvenciák illesztése, valamint a filogenetikai fák elkészítése is megerősítette a BLAST keresés eredményét, konszenzusban a mikro- és makromorfológiai jegyekkel, amely alapján az anyagunkat *Paralepistopsis amoenolens* fajnak tekintjük.

A *Paralepistopsis amoenolens* (Malençon) Vizzini 2012. *Clitocybe amoenolens* néven Marokkóból leírt faj, ugyanakkor Spanyolországban^[5], Franciaországban, Olaszországban^[1], Törökországban^[2] és Svájcban^[4] is van már dokumentált adata, így várható volt magyarországi megjelenése is. A molekuláris vizsgálatok alapján 2012. évben a *Paralepistopsis* nemzetségbe sorolták az Ázsiából és Japánból már ismert *Clitocybe acromelalga* fajjal együtt^[1] a pontos taxonómia helyzete azonban máig tisztázatlan maradt^[6].

A faj veszélyes mérgeanyag tartalma (neurotoxikus akromelsav)^{[1][3]}, ugyanakkor a morfológiai jegyeikben hasonló fajok étkezésre történő fogyaszthatósága végett, szükséges lenne a taxon elterjedtségének további folyamatos monitorozása.

Jelen publikációnkkal egyidejűleg meg kívánjuk említeni, hogy tudomásunk szerint, Magyarországon ez az első igazolt dokumentálása a *Paralepistopsis amoenolens* fajnak.

Figure 1./Ábra 1. Basidiomes of *Paralepistopsis amoenolens*. / A *Paralepistopsis amoenolens* termőtestei.**A-B:** Fresh basidiomes./Friss termőtesek. **C, E:** Basidioma./Termőtest. **D:** Pileus surface./Kalap felszíne.Photographs/Fotók: **A-B:** (in situ) by Anikó Zám; **C-D:** (ex situ) by Attila Czeglédi**Figure 2./Ábra 2.** Microscopical features of *Paralepistopsis amoenolens* (V104_SVRG-52). / A *Paralepistopsis amoenolens* mikroszkopikus jellemzői (V104_SVRG-52).**a-d:** Basidiospores./Bazidiospórák.Photographs/Fotók: **a-d** by Attila Czeglédi

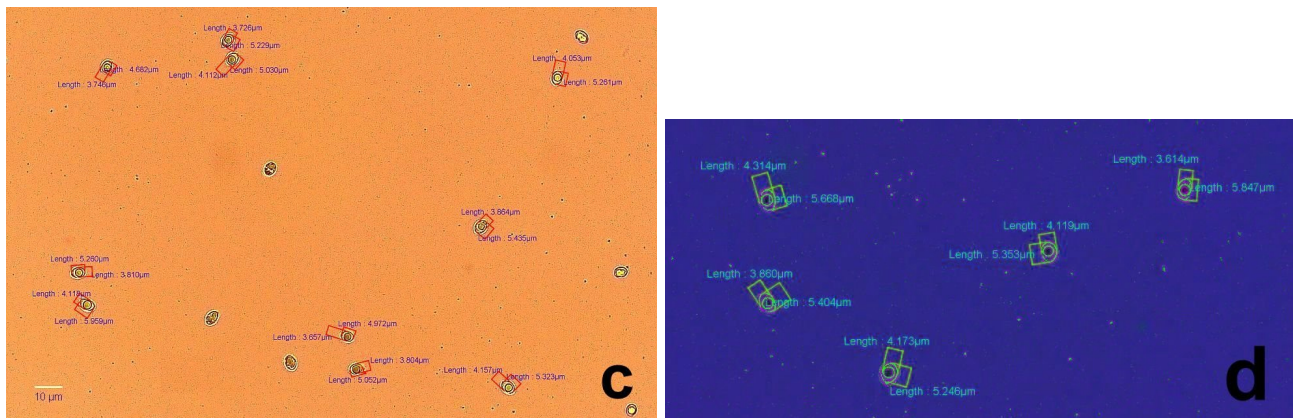


Table 1. The nrDNA ITS sequences of *Paralepistopsis* species used in the phylogenetic analysis. Hungarian data is in bold. /
Táblázat 1. A filogenetikai analízisben használt *Paralepistopsis* fajok ITS szekvenciái. A hazai adat félkövér betűvel látható.

No.	Species name / Faj	Country / Ország	ITS (Sequences ID)
1.	<i>Paralepistopsis amoenolens</i>	Hungary	V104 SVRG-52
2.	<i>Paralepistopsis amoenolens</i>	Italy	OR863470.1
3.	<i>Paralepistopsis amoenolens</i>	Lebanon	MZ088114.1
4.	<i>Clitocybe amoenolens</i>	France	JQ585653.1
5.	<i>Clitocybe amoenolens</i>	Italy	JQ585655.1
6.	<i>Clitocybe acromelalga</i>	Japan	AB301606.1
7.	<i>JP_2012179066-A_2</i>	Japan	HW365750.1
8.	<i>Paralepista flaccida</i>	Turkey	OR243910.1

Figure 3. (Maximum Likelihood analysis, RaxmlGUI, bootstrap: 1000) / **Ábra 3.** (Maximum likelihood analízis, RaxmlGUI, bootstrap: 1000)

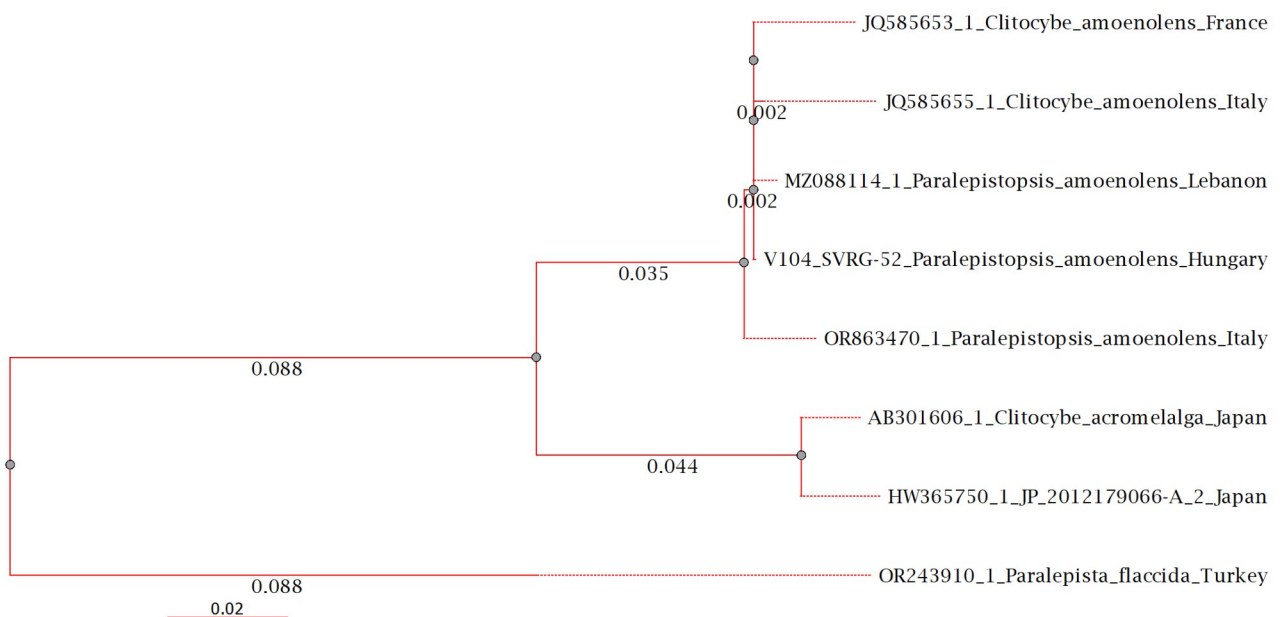
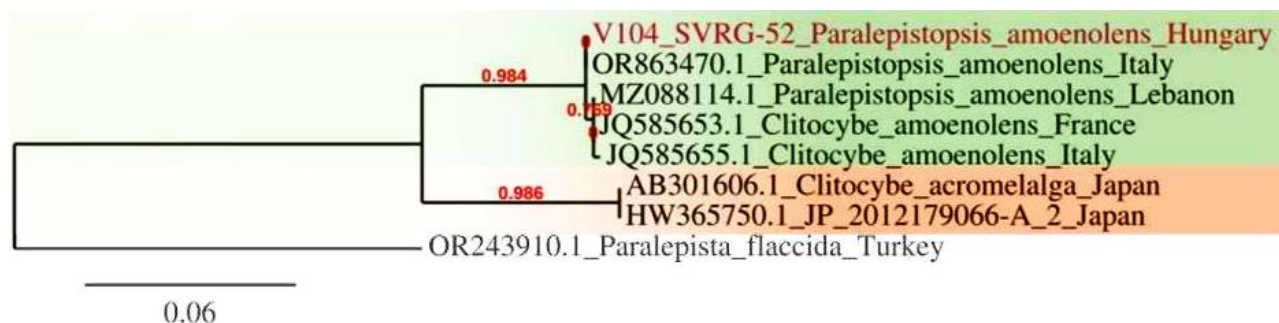


Figure 4. (Maximum Likelihood analysis, PhyML, (aLRT: SH-Like) test) / **Ábra 4.** (Maximum likelihood analízis, PhyML, (aLRT: SH-Like) teszt)



Acknowledgements / Köszönetnyilvánítás

We would like to express our special thanks to Anasztázia Beatrix Baróti for her contribution, moreover to Anikó Zám for the mushroom body and the in situ photos. / Ezúton is külön köszönetünket fejezzük ki Baróti Beatrix Anasztáziának a közreműködéséért, továbbá Zám Anikónak a rendelkezésünkre bocsátott gombatermőtestért és az élőhelyi fotókért.

References / Referencia

- [1] Vizzini A., Ercole E., (2012.) *Paralepistopsis* gen. nov. and *Paralepista* (Basidiomycota, Agaricales). *Mycologia*, <http://dx.doi.org/5248/120.253>, pp. 253-267
- [2] Colak ÖF., Kaygusuz O., Battistin E., (2017.) *Paralepistopsis amoenolens*: First Record of A Rare and Poisonous Taxon in Turkey. *Turkish Journal of Life Sciences* 2/2: 175-179
- [3] Leonardi M., Ciulli G., Pacioni G., Recchia G., (2002.) Una Intossicazione collettiva da *Clitocybe amoenolens* riconducibile sindrome acromelalgia. *Micol. e Veget. Medit.*, 17 (2): 133-142.
- [4] Auf Der Maur B., Brännhage J., Gross A., Schenk-Jager K., (2021.) Factsheet Neomyceten-Parfümierter Trichterling-SwissFungi <https://swissfungi.wsl.ch/>
- [5] Martínez F., Martínez R., Meléndez A., Pérez Del Amo C.M., (2010.) *Clitocybe amoenolens* primera cita para Espana. *Bol. Soc. Micol. Madrid* 34: 103-112.
- [6] Vizzini A., Alvarado P., Consiglio G., Marchetti M., Xu J. (2024). Family matters inside the order Agaricales: systematic reorganization and classification of incertae sedis clitocyboid, pleurotoid and tricholomatoid taxa based on an updated 6-gene phylogeny *Studies in Mycology* 107: 68-122