

Record of the anamorphic form of *Pachyphlodes thysellii* (Pezizaceae, Pezizales) in Hungary; the taxonomic status of *Pachyphlodes ligerica* findings in Hungary and Transylvania

György Vrba^{1*} and Dorottya Vrba¹

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

*Corresponding author: info@mikochips.com

Abstract

The present publication discusses the occurrence of the anamorphic form of *Pachyphlodes thysellii* in Hungary, which we initially studied based on its macromorphological characteristics. For the identification of the asexual structures, we subsequently conducted molecular genetic analyses. The nrDNA ITS sequence data, along with the Bayesian analysis and maximum likelihood (raxmlGUI) phylogenetic analyses clearly placed our asexual specimen within the *Pachyphlodes thysellii* / *P. ligerica* clade. Furthermore, based on the analyses of sequences, we determined that the previously uploaded Hungarian and Transylvanian *P. ligerica* specimens in GenBank should be considered conspecific with the taxon *P. thysellii*.

Keywords: *Pachyphlodes thysellii* · *Pachyphlodes ligerica* · DNA barcoding · Phylogeny · Taxonomy · Hungary

Introduction

The collection of the small colonies composed of distinctive, 5–30 mm, pinkish, fibrillose, mitosporic structures occurred on 21 May 2021, from a sandy-soiled Turkey oak forest located in the northern part of Vértess. The study of macromorphological characteristics did not yield conclusive results; therefore, to achieve accurate species-level identification, we conducted molecular phylogenetic analyses using nrDNA ITS sequence data.

Materials and methods

The asexual fruiting body colony was photographed in situ (Figure 1). Later on, the conidial hyphae were analyzed macroscopically and then using molecular methods (nrDNA ITS1F–ITS4).

Molecular methods

Direct PCR method using the Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific, USA), based on samples taken from the dried asexual conidial hyphae. In the PCR (polymerase chain reaction) we amplified the nrDNA ITS region with the primer pair ITS1F (CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A) and ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC). The PCR products were electrophoresed on 1% agarose gel, stained with nucleic acid stain (ECO Safe Nucleic Acid Staining Solution) and then visualized by UV transilluminator. The sequencing of the successful PCR product was performed by a third party (Delta Bio 2000 Kft., Hungary), after purification, with the Sanger dideoxy method. The checking, cleaning, and editing of the chromatogram was performed using FinchTV V. 1.4.0 software (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA). We compared the obtained ITS sequence to GenBank using BLASTn and downloaded the additional high-quality sequences of the closely related species (Table 1). *Amylascus luteosporus* was used as an outgroup. Multiple sequence alignment was performed using MUSCLE program with the help of the SeaView 5.1 software. In the case of the ITS sequences, the phylogenetically informative gap characters were coded as described in FastGap 1.2 (Borchsenius 2009), following the simple indel coding algorithm (Simmons et al. 2001). After checking the alignment, our dataset was analyzed using Bayesian analysis /MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al. 2012) and maximum likelihood (ML) method using the raxmlGUI 2.0 (Edler et al. 2021) program. The Bayesian inference (BI) phylogenetic tree was constructed using the MrBayes program and illustrated using the Geneious Prime software. The phylogenetic tree was generated using a 1000 bootstrap replications in the raxmlGUI program, and then the tree was visualized and edited (Figure 2) using the MEGA7 (Kumar et al. 2016) software.

Results

The results of the BLASTn search showed a high percentage of similarity with the *Pachyphlodes thysellii* and *Pachyphlodes ligerica* sequences available in GenBank, with a query coverage of 100–98–98–100% (per. Ident. 99.33% (592/596, gaps 1/596), E-value 0.00, JN102419; per. Ident. 99.31% (578/582, gaps 1/582), E-value 0.00, OQ150448; per. ident. 99.14% (577/582), E-value 0.00, KU955293; per. Ident. 98.99% (590/596, gaps 2/596), E-value 0.00, KU955291).

We included 58 *Pachyphlodes* sequences and 1 *Amylascus* (outgroup) sequence in our ITS phylogenetic analyses (Figure 2). The phylogenetic trees generated by Bayesian analysis and maximum likelihood (ML) showed congruent topology. We found that our sequence aligns closely with the sequence of the paratype of the American *P. thysellii*. The result was in consensus with the BLAST search findings, confirming that the studied species is *Pachyphlodes thysellii*/ligerica.

Discussion

The hypogeous, pleiomorphic, mycorrhizal genus *Pachyphlodes* was originally described from Europe. In our study, we analyzed the taxonomic position of the monophyletic *P. thysellii* and *P. ligerica* clade based on molecular data. Healy et al. (2018) had previously confirmed records of *P. thysellii* from Spain, North America, and China. Furthermore, the species was found in Denmark, which was originally identified as *P. ligerica*. Following the molecular analysis, the Danish specimen was shown to be in consensus with the paratype of the American *P. thysellii* (M. Jeppson & E. Larsson 2021). We also found sequences in GenBank, labeled as *P. ligerica*, from Hungary, Transylvania and Italy, which closely align with the sequence of the paratype of the *P. thysellii*. We also included in the phylogenetic tree the *P. ligerica* sequence from France uploaded to GenBank (MT461402) by R. Healy (2021), which is clearly distinct from the sequence of the paratype of *P. thysellii*.

Phylogenetic methods

In our study, we performed a separate alignment of the ITS sequences of 19 *Pachyphlodes thysellii* and *P. ligerica* specimens (excluding the French *P. ligerica* sample), downloaded from GenBank, using the MUSCLE program, SeaView 5.1 software.

Subsequently, we recorded the variable positions within the ITS1F–ITS4 region in a table, highlighting three highly polymorphic positions (98, 126, 140) located in the ITS1 segment. We determined that, based on the three informative polymorphic positions, the ITS sequences could be classified (Table 2) into four distinct (A, B, C, D) types. The specimens classified into four sequence types were also illustrated in a set diagram (Figure 4). After checking the alignment, we analyzed our dataset using the maximum likelihood (ML) method implemented in the raxmlGUI 2.0 software. *Amylascus luteosporus* was also used as the outgroup. The phylogenetic tree was generated in the raxmlGUI program using a 1000 bootstrap replicates, and then it was visualized and edited with MEGA7 software (Figure 3). The topology of the phylogenetic tree was absolutely consistent with the sequences classified into four different types based on the three polymorphic positions of the alignment. The Canadian and North American specimens came from four biogeographic regions, the European specimens also came from four biogeographic regions, and one specimen came from China (Figure 5).

We found that the *P. ligerica* from Komárom-Esztergom County (Száríliget: KU955293) has a "B" type sequence, similar to the two North American *P. thysellii* samples from the east coast (Durham: JN102419 and Kentucky: OQ150448), as well as the *P. thysellii* specimen (Vértes: PV190204) also collected by us from Komárom-Esztergom County. The Transylvanian *P. ligerica* (Transylvania, Covasna County: KU955292) has an "A" type sequence.

From the informative sequence of type "D", which also includes the paratype of *P. thysellii*, type "B" differed in 2 nucleotide positions (98, 140), and type "A" in 3 nucleotide positions (98; 126; 140).

The comparison and analysis of ITS sequences, the relatively small molecular differences in the sequences within the species boundary, the study of phylogenetic trees, and the biogeographic overview of the samples suggested, in agreement with the work of M. Jeppson & E. Larsson (2021), that at the species level, *Pachyphlodes thysellii* and *P. ligerica* can be considered a single phylogenetic unit. We hypothesize that the differences in ITS sequences may be related to different geographical distributions (Figure 5).

Conclusion

We believe that a more comprehensive assessment of the species' geographic distribution and diversity would be desirable, including the collection of further samples and their molecular analysis. In our opinion, a better quality type sequence and a comprehensive molecular taxonomic revision of the *P. thysellii/ligerica* clade would be necessary.

A *Pachyphlodes thysellii* (Pezizaceae, Pezizales) anamorf formájának magyarországi feljegyzése; a *Pachyphlodes ligerica* hazai és erdélyi leleteinek taxonómiai helyzete

Vrba György^{1*} és Vrba Dorottya¹

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

*A szerző levelezési címe: info@mikochips.com

Absztrakt

A jelen publikációnk az *Pachyphlodes thysellii* anamorf formájának magyarországi előfordulását tárgyalja, amelyet kezdetben makromorfológiai jellemzők alapján tanulmányoztunk. Az ivartalan képletek identifikálásához a továbbiakban molekuláris genetikai vizsgálatokat alkalmaztunk. A nrDNS ITS szekvencia adatok és Bayesian analízis, valamint maximum likelihood (raxmlGUI) filogenetikai elemzések egyértelműen a *Pachyphlodes thysellii* / *P. ligerica* kládba sorolták az ivartalan mintánkat. Továbbá a szekvenciaelemzések alapján megállapítottuk, hogy a már korábban GenBank-ba feltöltésre került hazai, valamint erdélyi *P. ligerica* példányok azonosnak tekintendők a *P. thysellii* taxonnal.

Bevezetés

A különleges, 5-30 mm rózsaszínes, fibrillózus, mitospórikus képletek alkotta kisméretű telepek begyűjtése 2021. május 21-én történt, a Vértes északi területén található, homokos talajú cseres-tölgyesből. A makromorfológiai jegyek tanulmányozása nem hozott eredményt, ezért a pontos fajszintű azonosítás érdekében molekuláris filogenetikai elemzéseket végeztünk nrDNS ITS szekvencia adatok felhasználásával.

Anyagok és módszerek

Az ivartalan termőtesttelepet in situ fényképeztük (1. ábra). Ezt követően makroszkopikusan, majd molekuláris módszerek alkalmazásával analizáltuk a konídiumos szájakat (nrDNS ITS1F-ITS4).

Molekuláris módszerek

Direkt PCR módszert alkalmaztunk a Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific, USA) segítségével, amelyet a szárított, ivartalan, konídiumos szájakból vett minták alapján végeztünk el. A PCR (polimeráz láncreakció) során a nrDNS ITS régiót amplifikáltuk az ITS1F (CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A) és az ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) primerpárral. A PCR termékeket 1%-os agarózgélén elektroforetizáltuk, nukleinsavfestékkel (ECO Safe Nucleic Acid Staining Solution) megfestettük, majd UV transzilluminátor segítségével vizualizáltuk. A sikeres PCR-termék szekvenálását egy harmadik fél (Delta Bio 2000 Kft., Magyarország) végezte el a Sanger dideoxy módszerrel, tisztítást követően. A kromatogram ellenőrzését, tisztítását és szerkesztését a FinchTV V. 1.4.0 szoftver segítségével végeztük (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA). A kapott ITS szekvenciát összehasonlítottuk a GenBank-ban találhatókkal BLASTn segítségével, majd letöltöttük a közeli rokon fajok további, magas minőségű szekvenciáit (1. táblázat). Külsőportként az *Amylascus luteosporus*-t használtuk. Többszörös szekvencia-illesztést végeztünk a MUSCLE programmal a SeaView 5.1 szoftver segítségével. Az ITS szekvenciák esetében a filogenetikailag informatív gap karaktereket a FastGap 1.2-ben (Borchsenius 2009) leírtak szerint kódoltuk, az egyszerű indel kódolási algoritmust követve (Simmons et al. 2001). Az illesztés ellenőrzése után az adatsorunkat Bayes-analízissel /MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al. 2012)/ vizsgáltuk, valamint maximum likelihood (ML) módszerrel elemeztük a raxmlGUI 2.0 (Edler et al. 2021) program használatával. A Bayes-féle következtetés (BI) filogenetikai fát a MrBayes programmal készítettük el és a Geneious Prime szoftver segítségével ábrázoltuk, a raxmlGUI programban a törzsfát 1000 bootstrap replikációval hoztuk létre, majd a fát a MEGA7 (Kumar et al. 2016) szoftverrel vizualizáltuk és szerkesztettük (2. ábra).

Eredmények

A BLASTn keresés eredményei magas százalékos hasonlósági arányt mutattak a GenBankból elérhető *Pachyphlodes thysellii* és *Pachyphlodes ligerica* szekvenciákkal, a lefedettség lefedettsége pedig 100–98–98–100% volt (per. Ident. 99.33% (592/596), gaps 1/596), E-value 0.00, JN102419; per. Ident. 99.31% (578/582), gaps 1/582), E-value 0.00, OQ150448; per. ident. 99.14% (577/582), E-value 0.00, KU955293; per. Ident. 98.99% (590/596), gaps 2/596), E-value 0.00, KU955291).

Az ITS filogenetikai elemzéseinkbe (2. ábra) 58 *Pachyphlodes* és 1 *Amylascus* (külsőport) szekvenciát vontunk be. A Bayes-analízissel és a maximális valószínűséggel (ML) létrehozott filogenetikai fák kongruens topológiát mutattak. Megállapítottuk, hogy a szekvenciánk szorosan illeszkedik az amerikai *P. thysellii* paratípusának szekvenciájához. Az eredmény összhangban volt a BLAST-keresés eredményeivel és megerősítette, hogy a vizsgált faj a *Pachyphlodes thysellii/ligerica*.

Diskusszió

A hipogeikus, pleiomorf, mikorrhiza *Pachyphlodes* nemzetséget eredetileg Európából írták le. A tanulmányunkban a monofiletikus *P. thysellii* és a *P. ligerica* klád taxonómiai helyzetét elemeztük molekuláris alapon. Healy és mtsai (2018) korábban már megerősítették a *P. thysellii* leleteit Spanyolországból, Észak-Amerikából és Kínából. Továbbá megtalálták a fajt még Dániában, amelyet eredetileg *P. ligerica*-nak határoztak.

A molekuláris vizsgálatot követően a Dán leletről kimutatták, hogy konszenzusban van az amerikai *P. thysellii* paratípusával (M. Jeppson & E. Larsson 2021). A GenBank-ban találtunk még Magyarországról, Erdélyből és Olaszországból is olyan szekvenciákat *P. ligerica* néven, amely szekvenciák szorosan illeszkednek a *P. thysellii* paratípusának szekvenciájához. A filogenetikai fába belefoglaltuk R. Healy (2021) által a GenBank-ba (MT461402) feltöltött franciaországi *P. ligerica* szekvenciáját is, amely egyértelműen elkülönül a *P. thysellii* paratípusának szekvenciájától.

Filogenetikai módszerek

Tanulmányunkban elvégeztük külön, a Genbank-ból letöltött 19 *Pachyphlodes thysellii* és *P. ligerica* (kivéve a Francia *P. ligerica* mintát) példányok ITS szekvenciájának az illesztését MUSCLE programmal, a SeaView 5.1 szoftver segítségével. Ezt követően táblázatban rögzítettük az eltérő pozíciókat az ITS1-ITS4 régióban, kiemelve három erősen polimorf pozíciót (98., 126., 140.) az ITS1 szakaszban. Megállapítottuk, hogy a három informatív polimorf pozíció alapján az ITS szekvenciák négy különböző (A; B; C; D) típusba sorolhatók (2. táblázat). A négyféle szekvenciatípusba sorolt példányokat egy halmazábrában is szemléltettük (4. ábra).

Az illesztés ellenőrzése után az adatsorunkat maximum likelihood (ML) módszerrel elemeztük a raxmlGUI 2.0 program használatával. Külcsoportként szintén az *Amylascus luteosporus*-t használtuk. A raxmlGUI programban a filogenetikai fát 1000 bootstrap replikációval hoztuk létre, majd a fát MEGA7 szoftverrel vizualizáltuk és szerkesztettük (3. ábra). A filogenetikai fa topológiája abszolút összhangban volt az illesztés három polimorf pozíciója alapján, a négy különböző típusba sorolt szekvenciákkal. A kanadai és észak-amerikai példányok négy, az európai minták szintén négy biogeográfiai régióból származtak, valamint egy minta Kínából (5. ábra). Megállapítottuk, hogy a Komárom-Esztergom vármegyei *P. ligerica* (Szárliiget: KU955293) „B” típusú szekvenciával rendelkezik, hasonlóan a két észak-amerikai *P. thysellii* mintához a keleti partról (Durham: JN102419 és Kentucky: OQ150448), valamint az általunk gyűjtött, szintén Komárom-Esztergom vármegyei *P. thysellii* (Vértes: PV190204) példányhoz. Az erdélyi *P. ligerica* (Transsylvania, Kovászna megye: KU955292) pedig „A” típusú szekvenciával rendelkezik.

A *P. thysellii* paratípusát is magába foglaló „D” típusú informatív szekvenciától a „B” típus 2 nukleotid pozícióban (98, 140), az „A” típus pedig 3 nukleotid pozícióban (98; 126; 140) tért el.

Az ITS szekvenciák összehasonlítása és elemzése, a fajhatáron belüli relatív kismértékű molekuláris differenciák a szekvenciákban, a filogenetikai fák tanulmányozása, valamint a minták biogeográfiai áttekintése arra utaltak, M. Jeppson & E. Larsson (2021) munkájával egyezően, hogy faji szinten a *Pachyphlodes thysellii* és a *P. ligerica* esetében egyetlen filogenetikai egységről beszélhetünk. Az ITS szekvenciákban meglévő eltérések vélelmünk szerint a különböző földrajzi elterjedtséggel lehetnek összefüggésben.

Konklúzió

Meglátásunk szerint kívánatos lenne a faj további szélesebb körű földrajzi elterjedésének és diverzitásának feltérképezése, újabb minták begyűjtése és molekuláris vizsgálata. Álláspontunk alapján szükséges lenne egy jobb minőségű típus szekvencia, valamint a *P. thysellii/ligerica* klád átfogó molekuláris taxonómiai revíziójának elvégzése.



Figure 1 / 1. ábra. A–D: Anamorphic form of *Pachyphlodes thysellii*. / A *Pachyphlodes thysellii* anamorf alakja. Photographs / Fotók: A–D by Dorottya Vrba

Table 1 The nrDNA ITS sequences of *Pachyphlodes* species used in the phylogenetic analyses. The sequence originated from Hungary is marked in boldface.

1. táblázat. A filogenetikai elemzésben használt *Pachyphlodes* fajok nrDNS ITS szekvenciái. A hazai adatok félkövér betűvel láthatóak.

No.	Species name / Fajnév	Country / Ország	ITS (Sequences ID)
1.	<i>Pachyphlodes thysellii</i>	USA	JN102419
2.	<i>Pachyphlodes ligerica</i>	Hungary	KU955291

Table 1 (continued) / 1. táblázat. (folytatás)

No.	Species name / Fajnév	Country / Ország	ITS (Sequences ID)
3.	<i>Pachyphlodes thysellii</i>	Spain	KJ720736
4.	<i>Pachyphlodes ligerica</i>	Italy	JF908780
5.	<i>Pachyphlodes thysellii</i>	China	JN102437
6.	<i>Pachyphlodes ligerica</i>	Romania: Transsylvania	KU955292
7.	<i>Pachyphlodes thysellii</i>	USA	OQ150448
8.	<i>Pachyphlodes ligerica</i>	Hungary	KU955293
9.	<i>Pachyphlodes thysellii</i>	Hungary	PV190204
10.	<i>Pachyphlodes thysellii</i>	USA	PV591156
11.	<i>Pachyphlodes thysellii</i>	USA	PV591137
12.	<i>Pachyphlodes thysellii</i>	USA	PV591197
13.	<i>Pachyphlodes thysellii</i>	Canada	OQ418563
14.	<i>Pachyphlodes thysellii</i>	USA	KJ720733
15.	<i>Pachyphlodes thysellii</i> (paratype)	USA	EU543197
16.	<i>Pachyphlodes thysellii</i>	USA	JN102479
17.	<i>Pachyphlodes thysellii</i>	USA	JN102370
18.	<i>Pachyphlodes thysellii</i>	USA	PP866757
19.	<i>Pachyphlodes thysellii</i>	USA	KX577745
20.	<i>Pachyphlodes brunnea</i>	Mexico	MT461399
21.	<i>Pachyphlodes brunnea</i>	Mexico	JN102443
22.	<i>Pachyphlodes brunnea</i>	Mexico	HQ324990
23.	<i>Pachyphlodes brunnea</i>	Mexico	EU427551
24.	<i>Pachyphlodes marronina</i>	USA	JN102364
25.	<i>Pachyphlodes marronina</i> (holotype)	USA	EU427549
26.	<i>Pachyphlodes marronina</i>	USA	KJ720786
27.	<i>Pachyphloeus coalescens</i> (holotype)	Mexico	KJ595000
28.	<i>Pachyphloeus coalescens</i>	Mexico	EU543209
29.	<i>Pachyphloeus oleifera</i> (holotype)	Spain	JQ996421
30.	<i>Pachyphloeus oleifera</i>	Spain	KJ720787
31.	<i>Pachyphlodes carnea</i>	Mexico	KC152163
32.	<i>Pachyphlodes carnea</i>	USA	ON383347
33.	<i>Pachyphlodes carnea</i>	USA	JX414189
34.	<i>Pachyphlodes conglomerata</i>	Spain	KJ720788
35.	<i>Pachyphlodes conglomerata</i>	Spain	JN102487
36.	<i>Pachyphlodes cinnabarina</i>	China	MK192829
37.	<i>Pachyphlodes cinnabarina</i>	China	MK192831
38.	<i>Pachyphlodes cinnabarina</i> (holotype)	China	MK192830
39.	<i>Pachyphlodes nemoralis</i> (holotype)	England	JN102469
40.	<i>Pachyphlodes nemoralis</i>	Sweden	JX414218
41.	<i>Pachyphlodes nemoralis</i>	Spain	MF462328
42.	<i>Pachyphlodes nemoralis</i>	France	MT461400
43.	<i>Pachyphlodes pfisteri</i> (holotype)	USA	JN102474
44.	<i>Pachyphlodes austro-oregonensis</i> (holotype)	USA	JX414191
45.	<i>Pachyphlodes annagardnerae</i>	USA	JN102375
46.	<i>Pachyphlodes annagardnerae</i> (holotype)	USA	JN102472
47.	<i>Pachyphlodes melanoxantha</i>	England	JX414217
48.	<i>Pachyphlodes melanoxantha</i>	France	KJ720792
49.	<i>Pachyphlodes melanoxantha</i>	Spain	KJ720793
50.	<i>Pachyphlodes citrina</i>	France	KJ720747
51.	<i>Pachyphlodes citrina</i>	Italy	EU543196
52.	<i>Pachyphlodes citrina</i>	England	JN102468
53.	<i>Pachyphlodes ligerica</i>	France	MT461402
54.	<i>Pachyphlodes wulushanensis</i> (holotype)	China	MK192827
55.	<i>Pachyphlodes depressa</i>	China	KP027406
56.	<i>Pachyphlodes depressa</i> (holotype)	China	KP027405
57.	<i>Pachyphlodes virescens</i>	USA	MT461401
58.	<i>Pachyphlodes virescens</i>	USA	JX414219
59.	<i>Amylascus luteosporus</i> (holotype)	Australia	MN653041

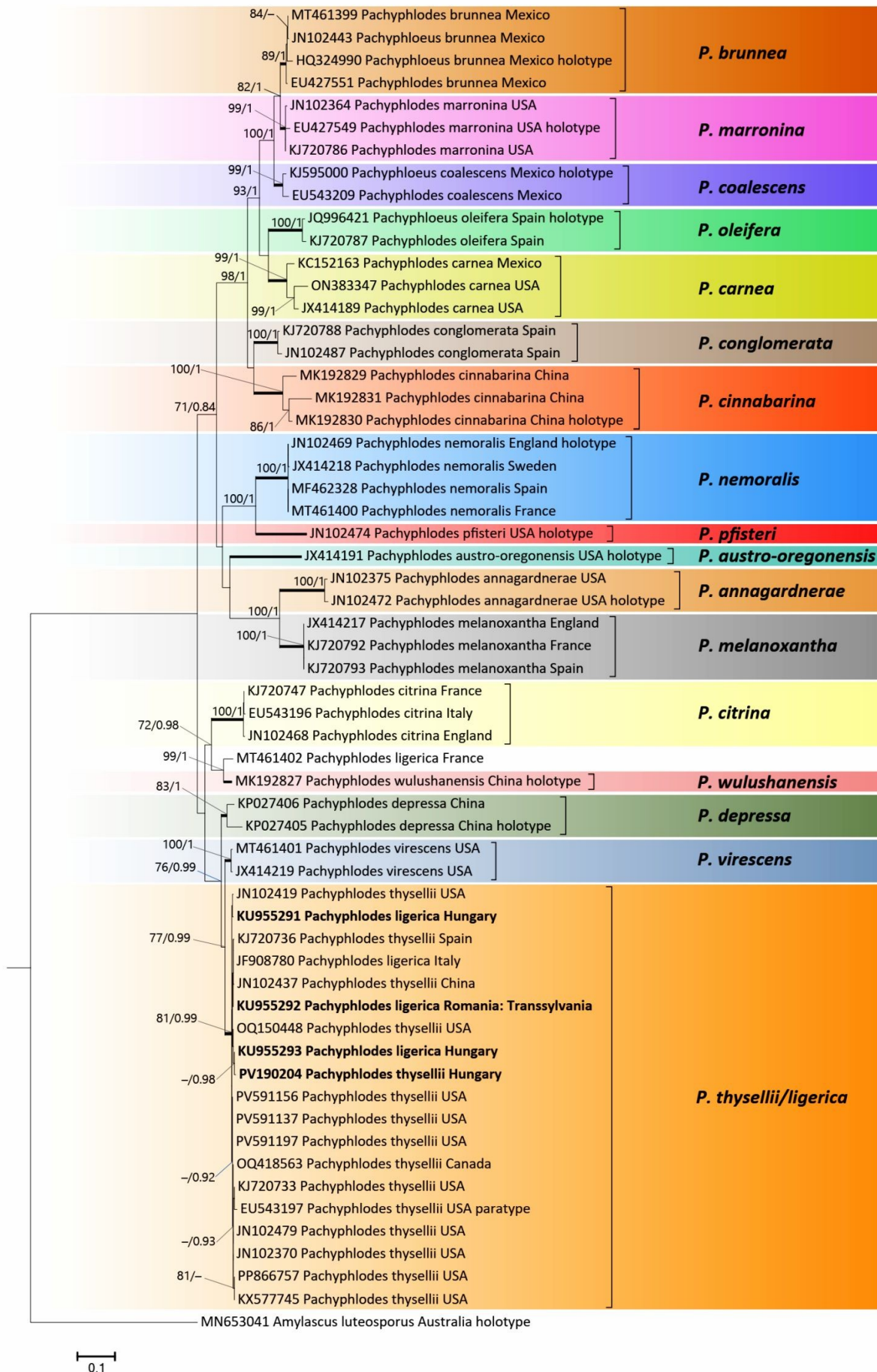


Figure 2 Phylogenetic tree based on maximum likelihood and Bayesian analyses, derived from ITS sequences of *Pachyphloides* specimens and those of reference materials. ML bootstrap values ($\geq 70\%$) and Bayesian posterior probabilities (≥ 0.9) are reported above branches, on the left and right sides of the slashes, respectively. The scale bar represents 0.1 expected substitutions per site per branch. / **3. ábra.** A *Pachyphloides* példányok és a referenciaanyagok ITS szekvenciáiból származó, maximum likelihood és Bayes-féle analízisen alapuló filogenetikai fa. Az ML bootstrap értékeket ($\geq 70\%$), a Bayes-féle posterior valószínűségeket ($\geq 0,9$) az ágak felett, a perjelek bal, illetve jobb oldalán tüntettük fel. A skálásáv 100 karakterre eső 10 szubsztitúciónak megfelelő ághosszat jelöl.

Table 2 Variable positions within the ITS sequence of 19 specimens of *P. thysellii*. / **2. táblázat.** Változó pozíciók a 19 *P. thysellii* példányának ITS szekvenciájában.

GenBank	Origin	Species name	Position																
			1	2	3	8	10	11	29	83	98	126	140	190	229	230	314	392	
EU543197	USA	<i>Pachyphlodes thysellii</i> (paratype)	A	T	G	–	C	T	A	A	T	G	T	T	–	–	N	N	
JN102479	USA	<i>Pachyphlodes thyselli</i>								A	T	G	T	T	–	–	N	N	
PP866757	USA	<i>Pachyphlodes thyselli</i>			A	T	A	A	A	A	T	G	T	T	–	–	A	A	
KJ720733	USA	<i>Pachyphlodes thyselli</i>					–	A	A	A	A	T	G	T D	T	–	–	G	G
KX577745	USA	<i>Pachyphlodes thyselli</i>					A	A	A	A	A	T	G	T	T	–	–	A	A
JN102370	USA	<i>Pachyphlodes thyselli</i>								A	A	T	G	T	T	–	–	N	N
OQ418563	Canada	<i>Pachyphlodes thyselli</i>	C	A	T		A	A	A	A	A	T	G	T	T	–	–	G	G
PV591197	USA	<i>Pachyphlodes thyselli</i>					A	A	A	A	A	T	G	C	T	–	–	G	G
PV591156	USA	<i>Pachyphlodes thyselli</i>					A	A	A	A	A	T	G	C C	T	–	–	G	G
PV591137	USA	<i>Pachyphlodes thyselli</i>					A	A	A	A	A	T	G	C	T	–	–	G	G
JN102419	USA	<i>Pachyphlodes thyselli</i>	C	A	T		–	A	A	A	A	C	G	C	T	–	A	G	G
PV190204	Hungary	<i>Pachyphlodes thyselli</i>	C	A	T		–	A	A	A	A	C	G	C B	A	A	A	A	A
OQ150448	USA	<i>Pachyphlodes thyselli</i>	C	A	T		–	A	A	A	A	C	G	C B	T	–	A	G	G
KU955293	Hungary	<i>Pachyphlodes ligerica</i>								A	A	C	G	C	A	A	A	G	G
KJ720736	Spain	<i>Pachyphlodes thyselli</i>					–		A	A	–	A	C	T C	T	–	–	G	G
JN102437	China	<i>Pachyphlodes thyselli</i>									T	C	T C	C	T	–	–	G	G
KU955292	Transsylvania	<i>Pachyphlodes ligerica</i>	C	A	T		–	A	A	A	A	C	T C	C A	T	–	–	G	G
KU955291	Hungary	<i>Pachyphlodes ligerica</i>	C	A	T		–	A	A	A	A	C	T C	C	T	–	–	G	G
JF908780	Italy	<i>Pachyphlodes ligerica</i>									A	C	T C	C	T	–	–	G	G

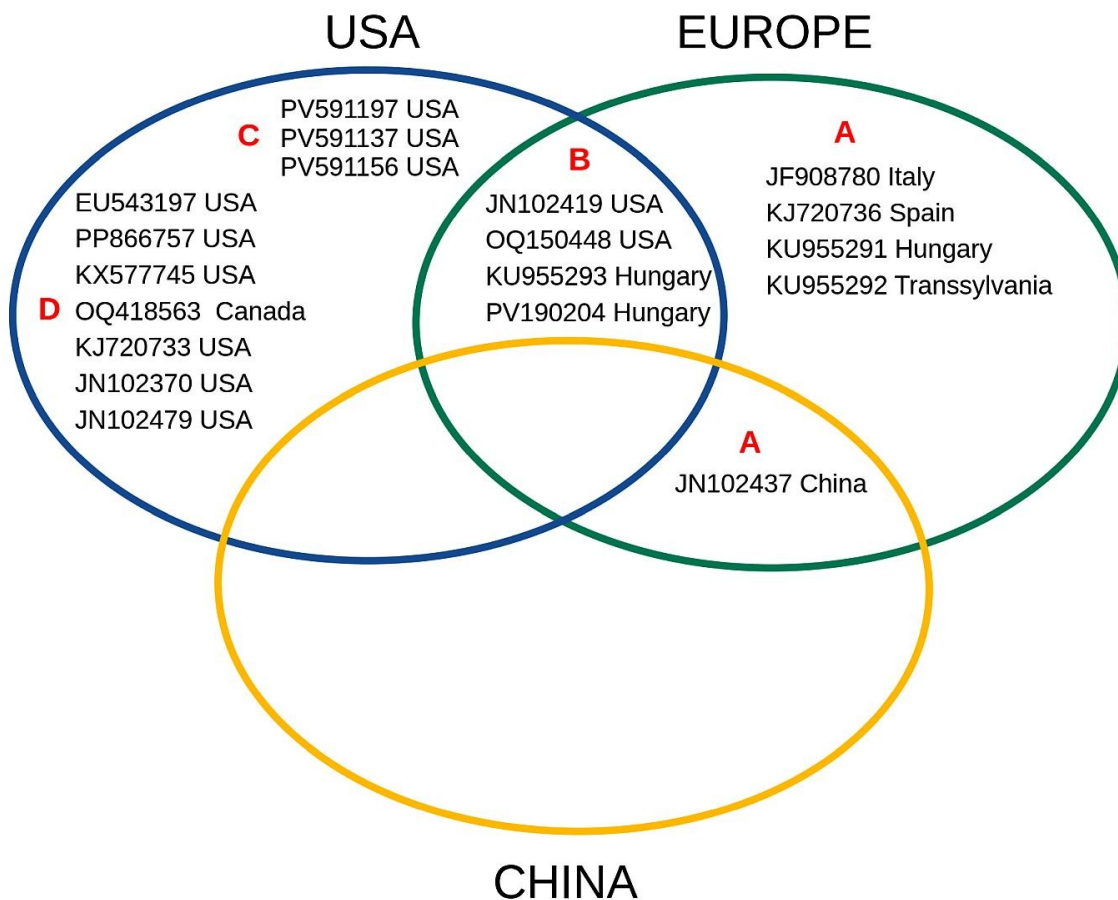


Figure 4 Illustration of the four sequence types (A; B; C; D) in a set diagram. / **4. ábra.** A négyféle szekvenciatípus (A; B; C; D) szemléltetése halmazábrában.

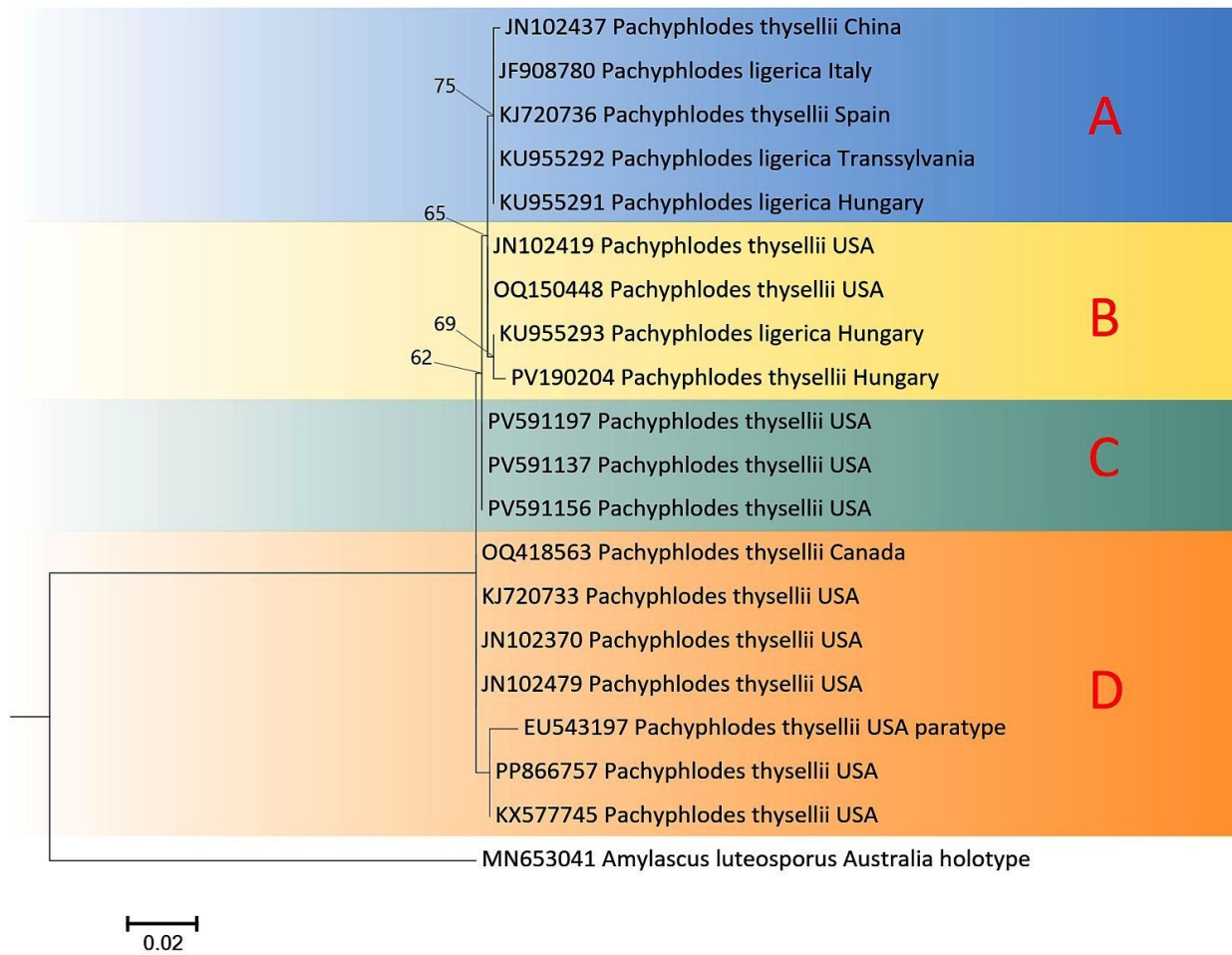


Figure 3 Maximum likelihood phylogenetic tree generated from ITS sequences of *Pachyphlodes thysellii* and *P. ligerica* specimens using the program raxmlGUI 2.0. ML bootstrap values ($\geq 50\%$) are reported above branches, respectively. The scale bar represents 0.02 expected substitutions per site per branch. / **3. ábra.** A *Pachyphlodes thysellii* és *P. ligerica* példányok ITS szekvenciáiból generált maximum likelihood filogenetikai fa a raxmlGUI 2.0 program segítségével. Az ML bootstrap értékeket ($\geq 50\%$) az ágak felett tüntettük fel. A skálásáv 100 karakterre eső 2 szubsztitúciónak megfelelő ághosszat jelöl.



Figure 5 The biogeographic map of *Pachyphlodes thysellii* and *P. ligerica* specimens from Canada, North America, Europe and China. / **5. ábra.** A kanadai, az észak-amerikai, valamint az európai és a kínai *Pachyphlodes thysellii* és *P. ligerica* példányok biogeográfiai térképe.

Data availability / Adatok elérhetősége

Data sets generated and/or analyzed during the current study are available in GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). / A jelenlegi tanulmány során keletkezett és/vagy elemzett adatkészletek elérhetők a GenBank-ban (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

References / Irodalomjegyzék

- Edler D., Klein J., Antonelli A., Silvestro D. (2021) raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML – Methods Ecol Evol 12(2):373–377
- Borchsenius F. (2009) FastGap 1.2. Department of Bio-sciences, Aarhus University, Denmark – http://www.aubot.dk/FastGap_home.htm
- Healy R., Horner HT., Bonito G., McLaughlin DJ., Smith ME. (2018) An ultrastructural study of spore wall development and septal pores in species of the *Pachyphlodes* (*Pezizaceae*, *Pezizales*) lineage, with a description of the new species *Pachyphlodes annagardnerae* – Mycological Progress 17: 45–63. <https://doi.org/10.1007/s11557-017-1348-3>
- Jeppson M. & Larsson E. (2021) Kratertryfflar (*Pachyphlodes*) i Sverige och Norden – en preliminär rapport – Svensk Mykologisk Tidskrift 42 (3): 26–31.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets – Mol Biol Evol 33(7):1870–1874
- Ronquist F., Teslenko M., Van Der Mark P., Ayres DL., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard MA., Huelsenbeck JP. (2012) MrBayes 3.2 efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space – Syst Biol 61(3):539–542
- Simmons MP., Ochoterena H., Carr TG. (2001) Incorporation, Relative Homoplasy, and Effect of Gap Characters in Sequence-Based Phylogenetic Analyses – Syst Biol 50(3):454–462