

The first Eastern European record of *Deconica subfusispora* (Agaricales, Strophariaceae) from the Carpathians, with its genus-level taxonomy still awaiting resolution

Dorottya Vrba¹, Attila Czeglédi¹, György Vrba^{1*}

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

*Corresponding author: info@mikochips.com

Abstract

The present publication reports the first Eastern European record of *Deconica subfusispora* (Strophariaceae, Agaricales), a species previously assigned to five different genera, from the Harghita Mountains, which we unsuccessfully attempted to identify based on macro- and micromorphological characters obtained in situ from fresh basidiomata. To identify the basidiomata, we subsequently conducted molecular genetic analyses using nrDNA ITS sequence data and phylogenetic analyses (raxmlGUI, MrBayes), which confirmed that our specimen is identical to the *Deconica subfusispora* taxon. At the same time, based on the sequence data, we clearly determined that the current classification of the species within the genus *Deconica* is incorrect.

Keywords: *Deconica subfusispora* · Strophariaceae · DNA barcoding · Phylogeny · Taxonomy · Transsylvania

Introduction

A small, dark-spored agaric was collected on 2 August 2024, during the first EGT – Székelyföld Mycological Camp in the Harghita Mountains. The specimen was found at an elevation of $\approx 1,615$ m a.s.l., on moist, mossy soil (*Dicranum* sp., *Plagiomnium* sp.) covered with needles in a Norway spruce (*Picea abies*) forest above the Cabana Madarasi Menedékház.

Description of the basidiomata

Pileus: 10 mm, convex, light ochre yellow color, decorated with fibrillose papillae, the margin with fine, thin, veil-like velar remnants; not striate, not hygrophanous. Lamellae: initially pale beige, later light brown, broadly adnate, sometimes slightly decurrent, the lamellar edge is finely serrulate. Stipe: 22 mm, light beige below the pileus, darkening downwards to reddish-brown, densely covered with creamy-whitish hyphal structures, ornamented in a zig-zag (squamulose) pattern, the base is slightly bulbous. Odour and taste: not recorded.

Since the macro- and micromorphological analyses were inconclusive, we further conducted molecular phylogenetic analyses using nrDNA ITS sequence data to achieve accurate species-level identification.

Materials and methods

The basidioma was photographed and studied in situ, followed by the recording of its macroscopic characters (Figure 1). Prior to carrying out molecular methods, the micromorphological characters were analyzed and documented using light microscopy /Nikon Alphaphot + Hoffman Modulation Contrast, 100x (oil immersion); Nikon Labophot 2, 60x/. The photographs were taken with an Euromex CMEX 5 camera, and the measurements were performed using ImageFocus Plus V2 software (Figure 2).

Molecular methods

Direct PCR method using Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific, USA) was applied from a sample taken from the lamellae of the dried specimen. 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). The obtained ITS sequence was compared with sequences available in GenBank and UNITE using BLASTn, then we downloaded the sequences of closely related species and sequences of diverse members of the Strophariaceae family from the GenBank and UNITE databases (Table 1). *Agaricus praecox* was used as the outgroup. Multiple sequence alignment was performed using Clustal Omega with the help of the SeaView 5.1 software. For the ITS sequences, 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 subjected to Bayesian inference /MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al. 2012)/ and analyzed using the Maximum Likelihood (ML) method within the raxmlGUI 2.0 (Edler et al. 2021) software. The Bayesian Inference (BI) phylogenetic tree was generated using MrBayes and visualized with Geneious Prime, while the Maximum Likelihood tree was constructed in raxmlGUI with 1,000 bootstrap replicates, then visualized and edited using MEGA7 (Kumar et al. 2016) (Figure 2).

Results

The results of the BLASTn search showed a high percentage of similarity with the *Deconica subfusispora* sequences available in GenBank and UNITE, with a query coverage of 99–99–98–97% (per. Ident. 98.76% (398/403), E-value 0.00, PP356671; per. Ident. 98.76% (403/408), E-value 0.00, UDB0778021; per. Ident. 98.75% (394/399), E-value 0.00, KX100413; per. ident. 98.73% (389/394), E-value 0.00, PP356672).

We included 57 Strophariaceae sequences and 1 *Agrocybe* sequence in our ITS phylogenetic analyses (Figure 2). The phylogenetic trees generated by Bayesian analysis and maximum likelihood (ML) showed congruent topology. The result was in consensus with the BLAST search results and confirmed that the investigated species is *Deconica subfusispora*.

Deconica subfusispora (F.H. Møller) Noordel. 2011 – Romania: Transylvania, Covasna County, Harghita, Madarasi-Hargita, 2 August 2024, Bálint Dima, V148_SVRG-155.

Discussion

The species, described as *Naematoloma subfusisporum* by Møller (1945) from the Faroe Islands and considered extremely rare, was classified into the genus *Hypholoma* by Moser (1967), *Galerina* by Horak (1987), *Phaeogalera* by Bon (1991), reclassified into *Psilocybe* by Horak (2005) again, and finally placed in the genus *Deconica* by Noordeloos (2011). The nomenclatural history of *D. subfusispora* clearly demonstrates that its generic classification is relatively problematic due to its non-descript appearance and rarity. To clarify the taxonomic status of the species, further well-documented collections are required (Noordeloos 2011). Based on molecular studies, it has been established that *Deconica subfusispora* is currently placed in the wrong genus, therefore, a new combination for the taxon is required (Karich 2024).

Conclusion

Based on its macro- and micromorphological, histochemical, and ecological characteristics, *D. subfusispora* has been assigned to various genera, however, certain attributes consistently exclude it from these same genera. The molecular phylogenetic analysis of our find confirmed that the current classification into the genus *Deconica* is likewise erroneous in accordance with the work of Karich (2024).

For the new combination of the taxon, it is essential to map the broader geographical distribution and diversity of *D. subfusispora*, collect new specimens, and subsequently conduct a multilocus phylogenetic analysis of these together with existing samples.

A *Deconica subfusispora* (Agaricales, Strophariaceae) első kelet-európai feljegyzése a Kárpátokból, melynek a nemzetségszintű taxonómiája változatlanul megoldásra vár

Vrba Dorottya¹, Czeglédi Attila¹ Vrba György^{1*}

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

*A szerző levelezési címe: info@mikochips.com

Absztrakt

A jelen publikációnk a korábban már öt nemzetségbe sorolt *Deconica subfusispora* (Strophariaceae, Agaricales) első kelet-európai leletének feljegyzését tárgyalja, a Hargita-hegységből, melyet a helyszínen a friss termőtestből nyert makro- és mikromorfológia jellemzők alapján próbáltunk meg sikertelenül azonosítani. A gombatermőtest identifikálásához a továbbiakban molekuláris genetikai vizsgálatokat végeztünk nrDNS ITS szekvencia adatok és filogenetikai elemzések (raxmlGUI, MrBayes) felhasználásával, amelyek alapján a mintánk a *Deconica subfusispora* taxonnal való egyezést mutatta. A szekvencia adatok alapján ugyanakkor egyértelműen megállapítottuk, hogy a faj *Deconica* nemzetségbe történő jelenlegi besorolása hibás.

Bevezetés

Az első EGT - Székelyföldi Mikológustábor alkalmával, 2024. augusztus 2-án került begyűjtésre egy kisméretű, sötétspórás, lemezes gomba a Hargitán, a Madarasi Menedékház feletti lucfenyves (*Pice abies*), tülvelekkel borított, mohás (*Dicranum sp.*, *Plagiomnium sp.*), nedves, talajáról, ≈ 1.615 m tengerszint feletti magasságból.

A termőtest leírása

Kalap: 10 mm, domború, világos okkersárgás színű, fibrillosus papillákkal díszített, szélén finom, vékony fátyolszerű vélummaradványokkal, nem bordázott, nem higrofán. Lemezek: kezdetben halványbézs-, később világosbarna színűek, szélesen tönkhöz nőttek, néha enyhén lefutók, lemezél finoman fogazott. Tönk: 22 mm, a kalap alatt világos bézs színű, lefelé sötétedő, majd lejjebb vörösesbarna, krémes-fehéres színű hifális képletekkel gazdagon borított, kígyóbőrszerűen díszített, a bázisban enyhén, hagymaszerűen bulbózus. Illat és íz: nem rögzített.

A makro- és mikromorfológiai vizsgálatok nem hoztak eredményt, ezért a pontos fajsztípus azonosítás érdekében a továbbiakban molekuláris filogenetikai elemzéseket végeztünk a nrDNS ITS szekvencia adatok felhasználásával.

Anyagok és módszerek

A termőtestet in situ fényképeztük, tanulmányoztuk, majd rögzítettük makroszkopikus adatait (1. ábra). A molekuláris módszerek alkalmazása előtt fénymikroszkópok /Nikon Alphaphot + Hoffman Modulation Contrast, 100x (olajimmerzió); Nikon Labophot 2, 60x/ alkalmazásával analizáltuk és dokumentáltuk a gomba mikromorfológiai jegyeit. A fotók Euromex CMEX 5 kamerával, a mérések az ImageFocus Plus V2 szoftver alkalmazásával készültek (2. ábra).

Molekuláris módszerek

Direkt PCR módszert alkalmaztunk a Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific, USA) segítségével, amelyet a szárított termőtest lemezéből vett minta 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 elektroforezizáltuk, 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 és a UNITE-ban található BLASTn segítségével, majd letöltöttük a közeli rokon fajok, továbbá a *Strophariaceae* család eltérő, magas minőségű szekvenciáit a Genbank-ból és a UNITE adatbázisából (1. táblázat). Kulcsoportként az *Agaricus praecox*-t használtuk. Többszörös szekvencia-illesztést végeztünk a Clustal Omega 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 és a UNITE adatbázisból elérhető *Deconica subfusispora* szekvenciákkal, a lekérdezés lefedettsége pedig 99–99–98–97% volt (per. Ident. 98.76% (398/403), E-value 0.00, PP356671; per. Ident. 98.76% (403/408), E-value 0.00, UDB0778021; per. Ident. 98.75% (394/399), E-value 0.00, KX100413; per. ident. 98.73% (389/394), E-value 0.00, PP356672).

Az ITS filogenetikai elemzéseinkbe (2. ábra) 57 *Strophariaceae* és 1 *Agrocybe* (kulcsoport) szekvenciát vontunk be. A Bayes-analízissel és a maximális valószínűséggel (ML) létrehozott filogenetikai fák kongruens topológiát mutattak. Az eredmény összhangban volt a BLAST-keresés eredményeivel és megerősítette, hogy a vizsgált faj a *Deconica subfusispora*.

Deconica subfusispora (F.H. Møller) Noordel. 2011 – Románia: Erdély, Kovászna megye, Hargita, Madarasi-Hargita, 2024. augusztus 2., Dima Bálint, V148_SVRG-155.

Diszkusszió

Möller (1945) által *Naematoloma subfusisporum* néven, a Feröer-szigetéről leírt, rendkívül ritkának tekinthető fajt, Moser (1967) a *Hypholoma*, Horak (1987) a *Galerina*, Bon (1991) a *Phaeogalera*, újra Horak (2005) a *Psilocybe*, majd végül Noordeloos (2011) a *Deconica* nemzetségbe sorolta. A *D. subfusispora* nevezéktani története egyértelműen azt mutatja, hogy a nemzetségbe való besorolása viszonylag problematikus, jellegtelen megjelenése és ritkasága miatt. A faj taxonómiai státuszának tisztázásához további jól dokumentált gyűjteményekre van szükség (Noordeloos 2011). A molekuláris vizsgálatok alapján megállapították, hogy a *Deconica subfusispora* jelenleg rossz nemzetségben van, ezért a taxon új kombinációjára van szükség (Karich 2024).

Konklúzió

A *D. subfusispora*-t makro-, mikromorfológiai, hisztokémiai és ökológiai jellemzői alapján sorolták különféle nemzetségekbe, ugyanakkor bizonyos attribútumok rendre kizárják ezeket a nemzetségeket. Leletünk molekuláris filogenetikai elemzése megerősítette, hogy a jelenlegi *Deconica* nemzetségbe történő besorolás, Karich (2024) munkájával egyezően, ugyancsak hibás.

A taxon új kombinációjához elengedhetetlen a *D. subfusispora* további szélesebb körű földrajzi elterjedésének és diverzitásának feltérképezése, újabb minták begyűjtése, majd ezeknek a már meglévő példányokkal együtt történő multilokuszos filogenetikai vizsgálata.



Figure 1 / 1. ábra. A–C: Basidioma of *Deconica subfusispora*. / A *Deconica subfusispora* termőteste. Photographs / Fotók: Bálint Dima

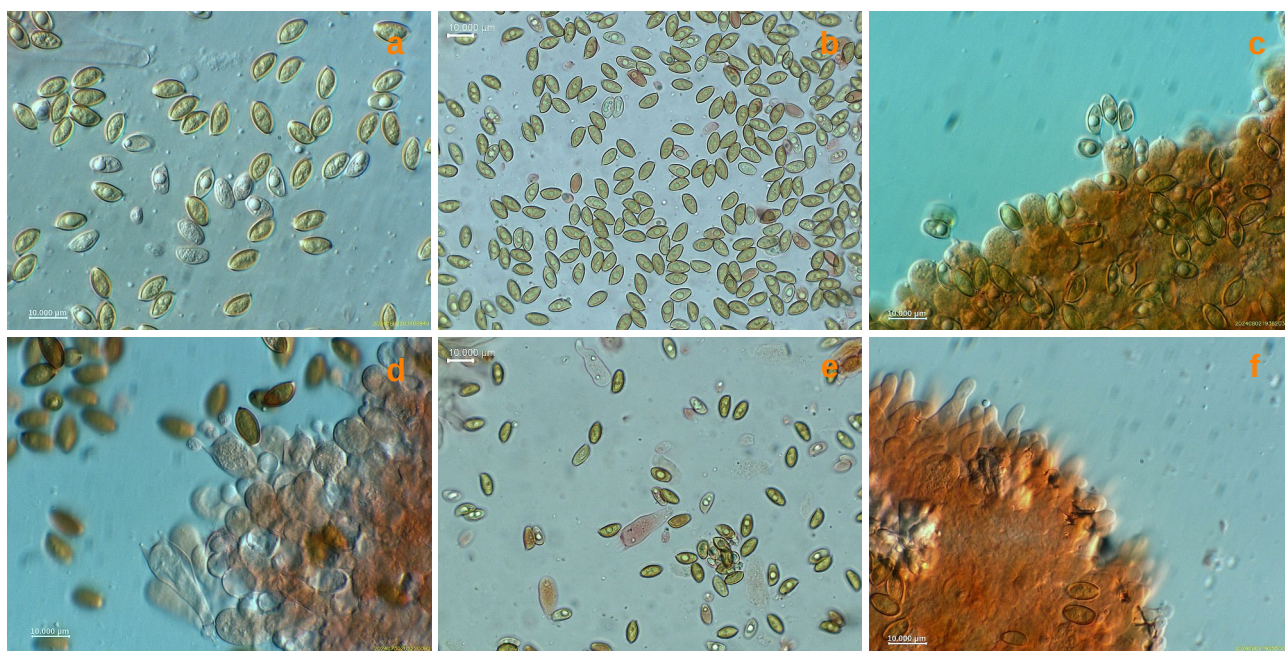


Figure 2. / Ábra 2. Microscopical features of *Deconica subfusispora*. / Az *Deconica subfusispora* mikroszkopikus jellemzői.

a-b: Basidiospores. / Bazidiospórák. **c-e:** Basidia and basidiospores. / Bazídiumok és bazidiospórák. **f:** Cheilocystidia and basidiospores. / Keilocsisztida és bazidiospórák.

a-f in ammoniacal Congo red. / **a-f** ammóniás Kongó vörösbén.
Photographs/Fotók: **a, c-d, f** György Vrba; **b, e** Attila Czeglédi

Table 1 The nrDNA ITS sequences of *Strophariaceae* species used in the phylogenetic analyses. Newly generated data is shown in bold.
1. táblázat. A filogenetikai elemzésben használt *Strophariaceae* fajok nrDNS ITS szekvenciái. Az újonnan generált adat félkövér betűvel látható.

No.	Species name / Fajnév	Country / Ország	ITS (Sequences ID)
1.		Switzerland	UDB0778021
2.	<i>Deconica subfusispora</i>	Germany	PP356671
3.	<i>Deconica subfusispora</i>	Germany	PP356672
4.	<i>Deconica subfusispora</i>	Romania: Transsylvania	PX842505
5.	<i>Strophariaceae</i> sp.	Iceland	KX100413
6.	<i>Deconica subfusispora</i>	Germany	PP356673
7.	<i>Flammula alnicola</i>	Germany	OL771968
8.	<i>Flammula alnicola</i>	USA	PQ256491
9.	<i>Flammula alnicola</i>	USA	PX139659
10.	<i>Flammula alnicola</i>	USA	DQ486703
11.	<i>Flammula alnicola</i>	Spain	OL739386
12.	<i>Flammula pinicola</i>	Norway	MF511078
13.	<i>Flammula pinicola</i>	Italy	JF908587
14.	<i>Flammula pinicola</i>	France	ON322973
15.	<i>Flammula abieticola</i>	USA	MN209719
16.	<i>Flammula abieticola</i> (holotype)	USA	HQ222017
17.	<i>Hemipholiota populnea</i>	USA	OP549062
18.	<i>Hemipholiota populnea</i>	Russia	OL839251
19.	<i>Hemipholiota populnea</i>	USA	MZ318311
20.	<i>Hemipholiota populnea</i>	USA	PX474828
21.	<i>Hemipholiota populnea</i>	Hungary	PV339409
22.	<i>Hypholoma lateritium</i>	USA	PV124322
23.	<i>Hypholoma lateritium</i>	Hungary	PV200309
24.	<i>Hypholoma lateritium</i>	Germany	OP162986
25.	<i>Hypholoma lateritium</i>	China	PV938733
26.	<i>Hypholoma fasciculare</i>	Czech Republic	FJ430716
27.	<i>Hypholoma fasciculare</i>	China	OL457978
28.	<i>Pyrrhulomyces astragalinus</i>	Italy	OR381142
29.	<i>Pyrrhulomyces astragalinus</i>	Italy	OR381144
30.	<i>Pyrrhulomyces astragalinus</i>	Italy	OR381141
31.	<i>Pyrrhulomyces astragalinus</i>	Canada	PV839186
32.	<i>Stropharia coronilla</i>	United Kingdom	PP887484
33.	<i>Stropharia coronilla</i>	Canada	KY706180
34.	<i>Stropharia coronilla</i>	USA	PX499561
35.	<i>Stropharia coronilla</i>	Hungary	MW355007
36.	<i>Stropharia coronilla</i>	France	MH856747
37.	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	Hungary	PV221117
38.	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	USA	KC176328
39.	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	Canada	ON943277
40.	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	Austria	PP085445
41.	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	China	PV938658
42.	<i>Pholiota squarrosa</i>	Denmark	MT644907
43.	<i>Pholiota squarrosa</i>	Italy	OR381140
44.	<i>Pholiota squarrosa</i>	China	PX411784
45.	<i>Pholiota squarrosa</i>	USA	OR984738
46.	<i>Pholiota limonella</i>	China	MN209745
47.	<i>Pholiota aurivella</i>	Netherlands	MH855317
48.	<i>Pholiota aurivella</i>	Germany	MH854669
49.	<i>Pholiota aurivella</i>	Italy	JF908584
50.	<i>Pholiota adiposa</i>	Canada	MH855073
51.	<i>Deconica montana</i>	USA	MT913618
52.	<i>Deconica montana</i>	USA	PP407461
53.	<i>Deconica montana</i>	Canada	OQ225683
54.	<i>Deconica coprophila</i>	China	PP930819
55.	<i>Deconica coprophila</i>	USA	PP971231
56.	<i>Deconica coprophila</i>	Australia	PV710199
57.	<i>Deconica coprophila</i>	Mongolia	PQ732965
58.	<i>Agrocybe praecox</i>	USA	OQ389432

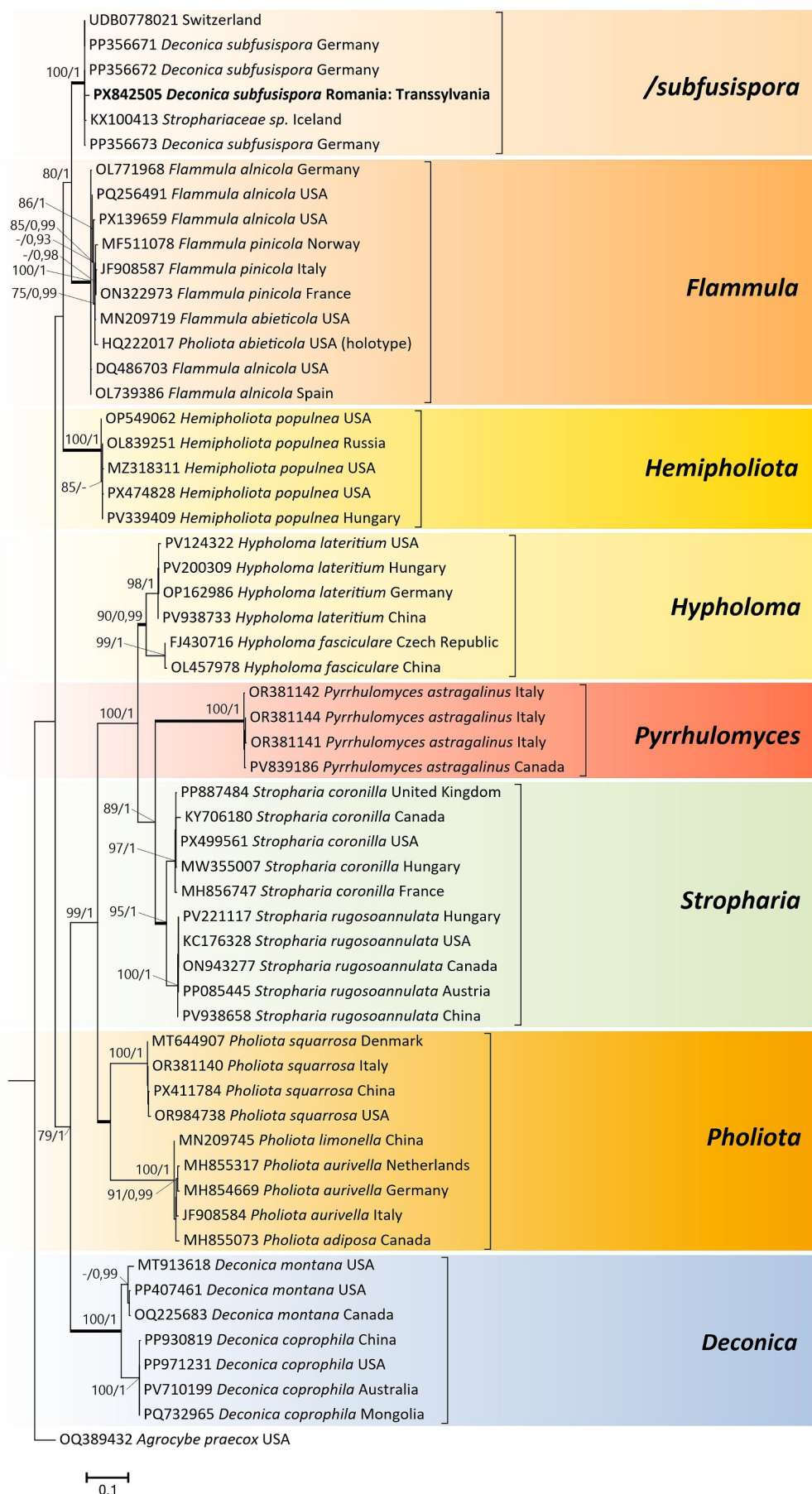


Figure 3. The phylogenetic tree of specimens belonging to the color-coded genera of the *Strophariaceae* family, generated from ITS sequences based on Maximum Likelihood (ML) and Bayesian inference. The "/subfusi-spora" clade contains exclusively sequences of *Deconica subfusi-spora*. The ML bootstrap values ($\geq 70\%$) and Bayesian posterior probabilities (≥ 0.9) are indicated above the branches, on the left and right sides of the forward slashes. The scale bar represents branch lengths corresponding to 10 substitutions per 100 characters. / 3. ábra. A *Strophariaceae* család színekkel jelölt nemzetségeihez tartozó példányok ITS szekvenciáiból generált, maximum likelihood és Bayes-féle analízisen alapuló filogenetikai fa. A "/subfusi-spora" klád kizárólag a *Deconica subfusi-spora* szekvenciáit tartalmazza. 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 10 karakterre eső 10 szubsztitúciónak megfelelő ághosszat jelöl.

Acknowledgements / Köszönetnyilvánítás

We would like to express our special thanks to Dr. Bálint Dima for providing us with the mushroom fruiting body and photos. / Ezúton is külön köszönetünket fejezzük ki dr. Dima Bálintnak a rendelkezésünkre bocsátott gombatermőtestért és a fotókért.

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 és a UNITE-ban (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <https://unite.ut.ee/>).

References / Irodalomjegyzék

- Borchsenius F. (2009) FastGap 1.2. Department of Bio-sciences, Aarhus University, Denmark – http://www.aubot.dk/FastGap_home.htm
- 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
- Horak E. (2005) Röhrlinge und Blätterpilze in Europa. – Heidelberg: Elsevier
- Karich A (2024) *Deconica subfusispora* - ein seltener Blätterpilz auf der Suche nach einer Gattung – *Boletus* 45(1): 3-13
- 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
- Møller F.H. (1945): Fungi of the Færøes, Part I: *Basidiomycetes*. – Einar Munksgaard, Kopenhagen. 295 S.
- Moser M. (1983): Röhrlinge und Blätterpilze. 5. Aufl. Kleine Kryptogamenflora Mitteleuropas. Bd. 2b/2 – Gustav Fischer, Stuttgart, 533 S.
- Noordeloos M.E. (2011): *Strophariaceae s. l.* (Fungi Europaei Vol. 13) – Edizioni Candusso, Alassio. 648 SV
- 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