

The first documented data of *Pluteus necopinatus* (Pluteaceae) in Hungary

György Vrba^{1*}, Katalin Császárné Erdélyi¹, Dorottya Vrba^{1,2}

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

²Gymnasium of László Bárdos, 701 Gál István Housing Complex, H-2800 Tatabánya

*Corresponding author: gomba@napora.hu

Introduction

Three small pluteoid fruiting bodies, together with three small fruiting bodies which were in primordial state were collected from the terrarium of „giant katydid” (*Stilpnochlora coulouiana*) from the Capital City Zoo (6-12 Állatkerti Boulevard, 1146 Budapest).

All three developed small specimens were characterized by the following macromorphological features, as well as the habitat which was mixed with coconut fiber and rich in lignin and cellulose.

The pileus is convex (approx. 15 mm), depressed in the middle and there are clearly visible brownish, velvety fibrils on its entire surface, also, completely covered, differentiating dark brown fibrils are visible in the center of the pileus.

Lamellae are free, pinkish.

Stipe is thin, semi-transparent upwards, whitish below and brownish toned from the fine fibrils downwards. The stipe is whitish directly above the slightly bulbous base.

The colour, odour and flavour of context is not recorded.

Based on the preliminary macroscopic (Figure 1.) and subsequent microscopic examination (Figure 2.), as well as the molecular analysis, (ITS 1F – ITS4) the fruiting bodies were identified as *Pluteus necopinatus* species.

Materials and methods

We first studied the fruiting bodies macroscopically (Nikon SMZ-1 stereomicroscope, 7x-30x magnification), then we analyzed the micromorphological features of the fungus under a biological microscope (Nikon Alphaphot + Hoffman Modulation Contrast, 100x (oil immersion)).

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

Molecular methods

From a sample taken from the lamellae of the dried fungus using the Direct PCR method (Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Master Mix), 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), then we amplified it 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 by a third party, after cleaning, with the Sanger dideoxy method.

The results of the Sanger sequencing were purified by using ChromasPro.

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 phylogeny.fr portal /Maximum Likelihood tree, was made by using PhyML, the reliability of the internal branch was assessed by the aLRT test (SH-Like) (Figure 3.)/, together with the RaxmlGUI software /the Maximum Likelihood tree, was created with 1000 bootstrap replications in this case and the tree was visualized with the UGENE program (Figure 4.)/.

We used the *Pluteus thomsonii* taxon as an outgroup. Sequence alignments were performed by using SeaView.

Results

The result of the BLAST search showed a high percentage /Percent Identities (99,56%); Identities 454/456 (99%) KM983693.1/ similarity to the sequence of the holotype (FK1701) of the *Pluteus necopinatus* available from GenBank.

Besides the micro- and macromorphological features, the alignment of the sequence and the preparation of the phylogenetic trees confirmed the result of the BLAST search. We verified that the fungus in question is the same species as the *Pluteus necopinatus* taxon [1].

This is the first documented occurrence and report of the *Pluteus necopinatus* /podospileus clade/ species in Hungary.

A *Pluteus necopinatus* (Pluteaceae) első magyarországi dokumentált adata

Vrba György^{1*}, Császárné Erdélyi Katalin¹, Vrba Dorottya^{1,2}

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

²Bárdos László Gimnázium, H-2800 Tatabánya, Gál István-lakótelep 701.

*A szerző levelezési címe: gomba@napora.hu

Bevezetés

A Fővárosi Állat- és Növénykert (1146 Budapest, Állatkerti krt. 6-12) floridai levélszöcskék (*Stilpnochlora coulouiana*) terráriumából került begyűjtésre három kisméretű pluteoid habitusú, valamint három primordiális állapotú gombatermőtest.

Mindhárom fejlett kisméretű példányt az alábbi makromorfológiai jegyek, valamint a kókuszrosttal vegyes, ligninben és cellulózban gazdag élőhely jellemezte.

Kalap domború (kb. 15 mm), közepén benyomott, annak teljes felszínét jól látható barnás, bársonyszerű szálak borítják, a kalap közepén differenciálós, teljesen fedett sötétbarna fibrillumok láthatóak.

Lemezek szabadon állók, rózsaszínesek.

Tönk vékony, a felső részén áttetsző, lejjebb fehéres, majd lefelé a finom szálaktól barnás árnyalatú, közvetlen az enyhén bulbózus bázis felett fehéres színű.

Hús színe, szag és íz nem rögzített.

A termőtesteket, az előzetes makroszkópikus (Ábra 1.) és a későbbi mikroszkópikus vizsgálat (Ábra 2.), valamint az elvégzett molekuláris (ITS 1F – ITS4) analízis alapján, *Pluteus necopinatus* fajként azonosítottuk.

Anyagok és módszerek

A termőtesteket először makroszkópiusan /Nikon SMZ-1 szteromikroszkóp, 7x-30x nagyítás) tanulmányoztuk, majd biológiai mikroszkóp (Nikon Alphaphot + Hoffman Modulation Contrast, 100x (olajimmerzió) alatt analizáltuk a gomba mikromorfológiai jegyeit.

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

Molekuláris módszerek

A szárított gomba lemezéből vett mintából 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 fényel vizualizáltuk.

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

A Sanger-féle szekvenálás eredményeit a ChromasPro programmal tisztítottuk.

Ezt követően az ITS-adatunkat, kiegészítve a GenBank kínálatában elérhető jó minőségű további szekvenciákkal (Táblázat 1.) törzsfát készítettünk a phylogeny.fr portál segítségével /maximális valószínűségi analízis (Maximum Likelihood) PhyML használatával, a belső ág megbízhatósága aLRT teszttel (SH-Like) értékelve (Ábra 3.)/, valamint a RaxmlGUI programmal /a maximális valószínűségi törzsfá ebben az esetben 1000 bootstrapreplikációval készült, a törzsfát az UGENE alkalmazással vizualizáltuk (Ábra 4.)/.

Külső csoportként a *Pluteus thomsonii* taxont használtuk. A szekvenciák illesztését a SeaView programmal végeztük.

Eredmények

A BLAST keresés eredménye magas százalékos /Percent Identities (99,56%); Identities 454/456 (99%) KM983693.1/ egyezőséget mutatott a GenBank-ból elérhető *Pluteus necopinatus* holotípusának (FK1701) szekvenciájával.

A mikro- és makromorfológiai jegyek, ezenfelül a szekvencia illesztése, valamint a filogenetikai fák elkészítése megerősítette a BLAST keresés eredményét, igazolva a kérdéses gombának a *Pluteus necopinatus* taxonnal [1] történő fajazonosságát.

Magyarországon ez az első dokumentált előfordulása és riportolása a *Pluteus necopinatus* /podospileus klád/ fajnak.

Figure 1./Ábra 1. Basidiomes of *Pluteus necopinatus*. / *A Pluteus necopinatus* termőtestei.

a-b, h: Basidiomata./Termőtestek. **c-d:** Pileus surface./Kalap felszíne. **e:** Lamellae and stipe./Lemezek és a tönk. **f:** Stipe and stipe base./Tönk és a tönkbázis. **g:** Primordial basidioma./Primordiális termőtest.

Photographs/Fotók: **a, h** (in situ) by Mátyás Farkas; **b-g** by Katalin Császárné Erdélyi

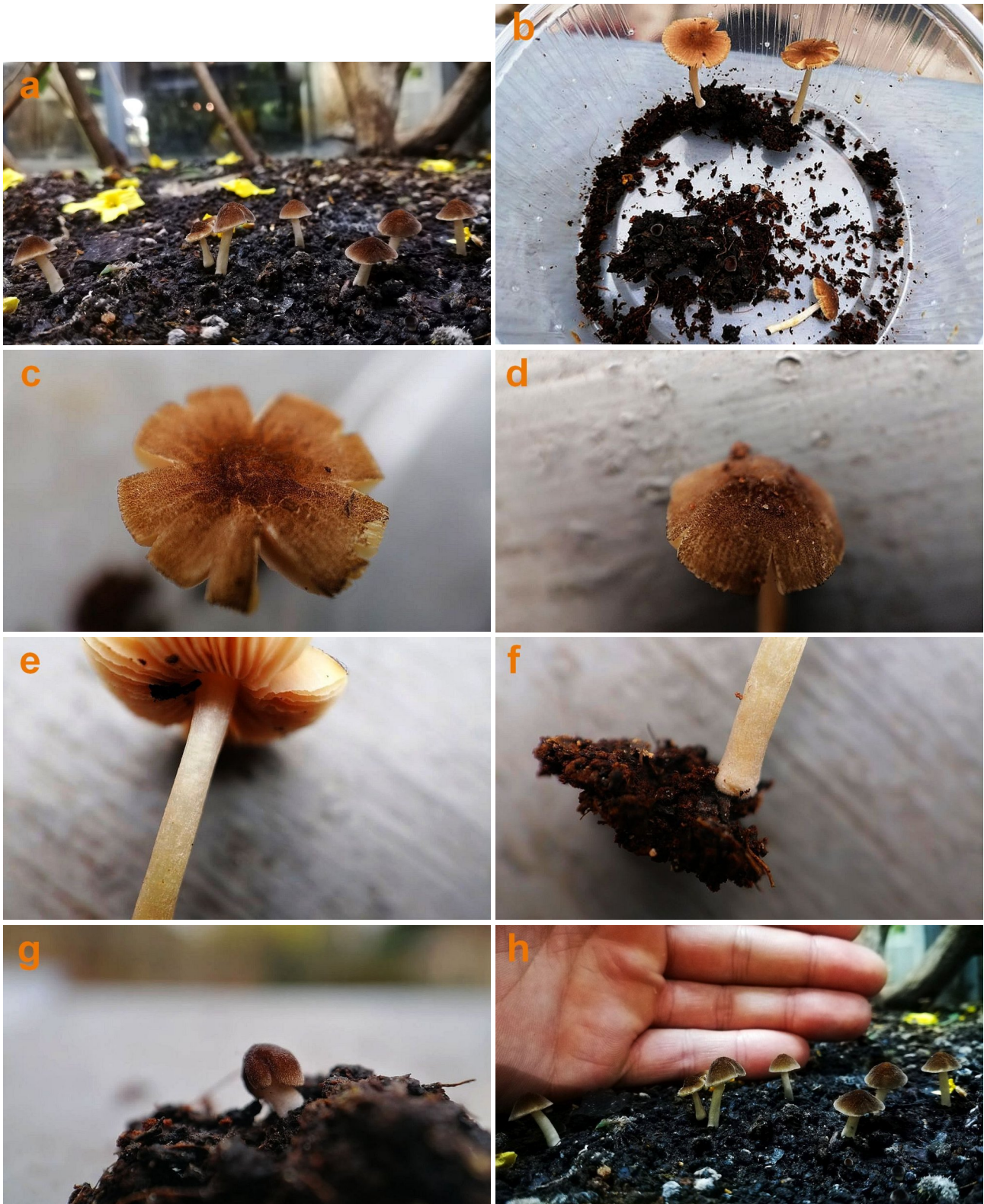


Figure 2./Ábra 2. Microscopical features of *Pluteus necopinatus* (V59_SVRG-17). / A *Pluteus necopinatus* mikroszkópikus jellemzői (V59_SVRG-17).

a: Spores./Spórák. **b-c:** Basidia and spores, /Bazídiumok és spórák. **d:** Cheilocystidia and spores./Keilocsztidák és spórák. **e-f:** Hymenial elements and spores./Termőréteg elemei és spórák. **g-i:** Pileipellis elements./Kalapbőr elemei.
Photographs/Fotók: **a-f** by György Vrba; **g-i** by Katalin Császárné Erdélyi

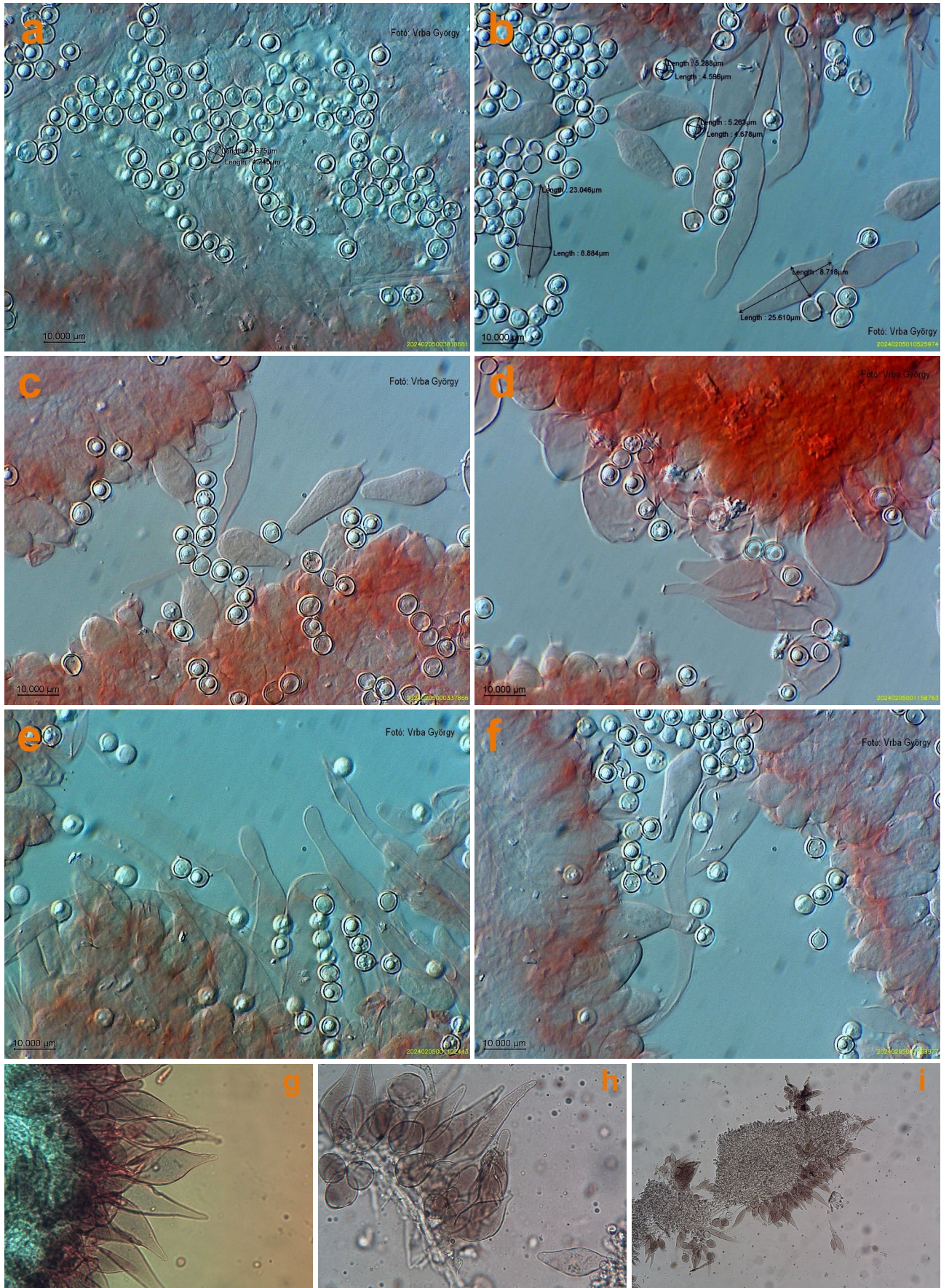


Table 1. The nrDNA ITS sequences of *Pluteus* species used in the phylogenetic analysis. Hungarian data is in bold. / **Táblázat 1.** A filogenetikai analízisben használt *Pluteus* fajok ITS szekvenciái. A hazai adat félkövér betűvel látható.

No.	Species name / Faj	Country / Ország	ITS (Sequences ID)
1.	<i>Pluteus necopinatus</i> (holotype)	Brazil	KM983693.1
2.	<i>Pluteus</i> sp.	French_Polynesia	MZ997096.1
3.	<i>Pluteus necopinatus</i>	Hungary	V59_SVRG-17
4.	<i>Pluteus</i> sp.	USA	KM983694.1
5.	<i>Pluteus brunneocrinitus</i> (holotype)	Brazil	KM983692.1
6.	<i>Pluteus crinitus</i> (holotype)	Brazil	KM983691.1
7.	<i>Pluteus seticeps</i>	USA	HM562191.1
8.	<i>Pluteus seticeps</i>	USA	HM562199.1
9.	<i>Pluteus seticeps</i>	USA	HM562192.1
10.	<i>Pluteus podospileus</i>	USA	KM983686.1
11.	<i>Pluteus podospileus</i>	USA	KM983687.1
12.	<i>Pluteus podospileus</i>	Japan	HM562122.1
13.	<i>Pluteus podospileus</i>	USA	KM983688.1
14.	<i>Pluteus podospileus</i>	Spain	HM562049.1
15.	<i>Pluteus</i> aff. <i>podospileus</i>	United_Kingdom	KM983690.1
16.	<i>Pluteus</i> aff. <i>podospileus</i>	Sweden	HM562196.1
17.	<i>Pluteus</i> aff. <i>podospileus</i>	USA	KM983689.1
18.	<i>Pluteus thomsonii</i>	Italy	JF908607.1

Figure 3. (Maximum likelihood analysis, PhyML, aLRT test) / **Ábra 3.** (Maximum likelihood analízis, PhyML, aLRT teszt)

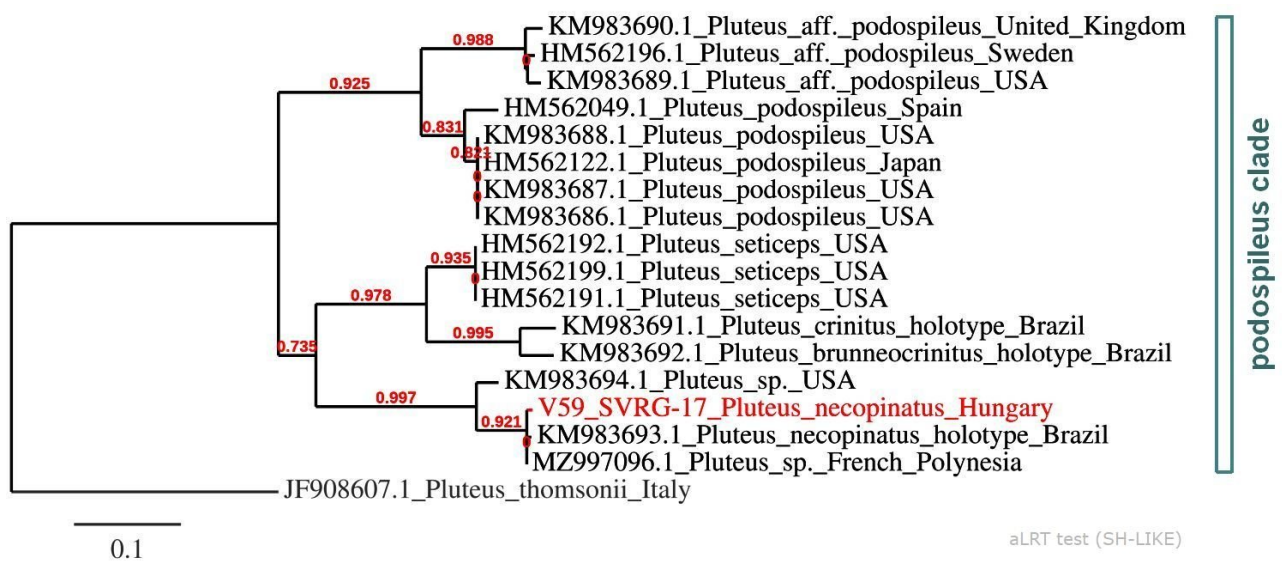
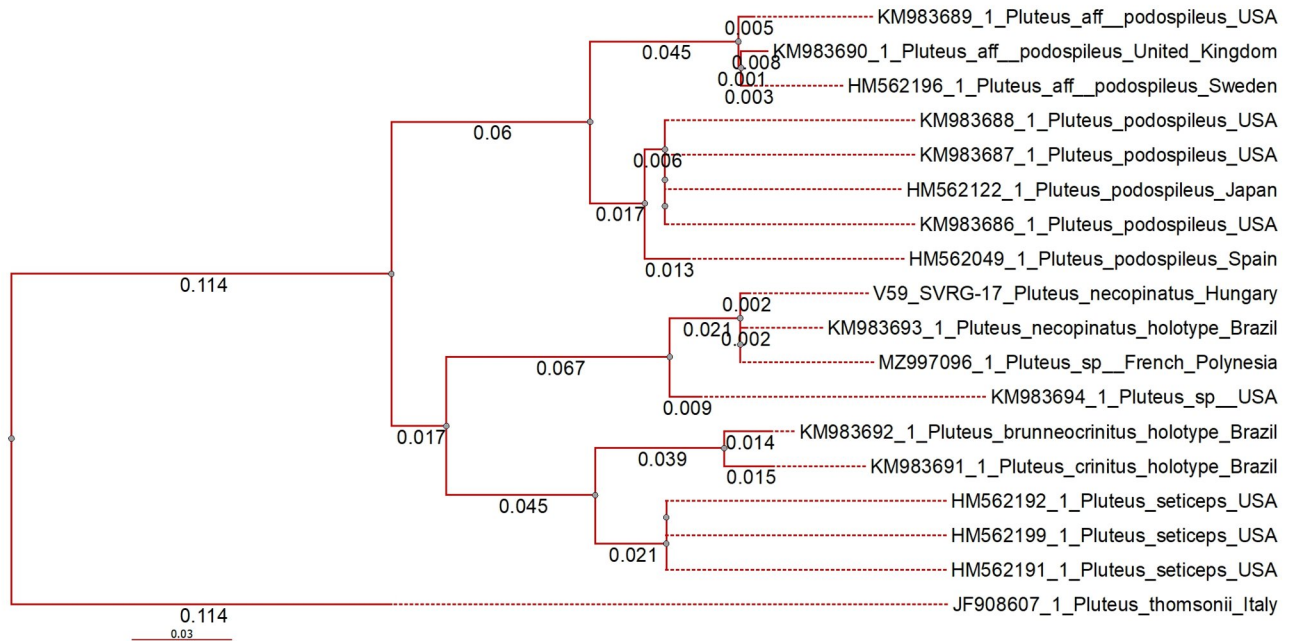


Figure 4. (Maximum likelihood analysis, RaxmlGUI, bootstrap: 1000) / **Ábra 4.** (Maximum likelihood analízis, RaxmlGUI, bootstrap: 1000)



Acknowledgements / Köszönetnyilvánítás

We would like to express our special thanks to András Benyó, Mátyás Farkas and the Capital City Zoo for providing us with the mushroom bodies and in situ photos. / Ezúton is külön köszönetünket fejezzük ki Benyó Andrásnak, Farkas Mátyásnak és a Fővárosi Állat- és Növénykertnek a rendelkezésünkre bocsátott gombatermőtestekért és az élőhelyi fotókért.

References / Referencia

[1] Nelson Menolli, Alfredo Justo; Marina Capelari; Phylogeny of *Pluteus* section *Celluloderma* including eight new species from Brazil - *Mycologia*, 107(6), 2015