

## The first documented data of *Gymnopilus dilepis* (currently described as part of *Hymenogastraceae*) in Hungary

György Vrba<sup>1\*</sup>, Anasztázia Beatrix Baróti<sup>2</sup>, Dorottya Vrba<sup>1</sup>, Attila Nagy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Erdei Gombász Tanoda Lp., 4 Moravcsik Street, H-2800 Tatabánya

<sup>2</sup>National Food Chain Safety Office, Microbiological National Reference Laboratory, 81 Mester Street, H-1095 Budapest

\*Corresponding author: info@mikochips.com

### Introduction

The fruiting body came from a pot of a *Polyscias* plant species which was bought in a chain store in Hungary. The fruiting body was sent to the the National Food Chain Safety Office, Microbiological National Reference Laboratory, as it was suspected that a child could have eaten from the mushroom that got into their household together with the pot.

The macroscopic (Figure 1) and microscopic examination (Figure 2) of the purple, wine-coloured fruiting body confirmed that the mushroom in question probably belongs to the exotic, previously undescribed in Hungary, relatively well-defined *Gymnopilus* (*dilepis*-*lepidotus*-*subearlei* group) species.

### Materials and methods

We first studied the fruiting bodies macroscopically, then we analyzed the micromorphological features of the fungus under a biological microscope (Zeiss Axioscop 2, 400x, 1000x magnification).

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

### Molecular methods

From a sample taken from the cap tissue, 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 chromatograms were checked, edited and assembled with the ChromasPro program.

We compared the obtained sequence 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 phylogeny.fr portal /maximum likelihood analysis (Maximum Likelihood) using PhyML/, and the RaxmlGUI program.

In the first case, the Maximum Likelihood tree was created with 1000 bootstrap replications, and then the tree was visualized (Figure 3) by the UGENE program. In the second case, the reliability of the internal branch was tested by approximate likelihood-ratio test /aLRT: SH-Like/ (Figure 4).

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

### Results

In the course of the ITS sequence analysis, we included 49 *Gymnopilus* ITS sequences in our phylogenetic analysis.

Our analysis identified four strongly supported species-level clades (without a closer examination of the *Gymnopilus purpureosquamulosus* group).

The results of the BLAST search showed a high percentage of similarity with *Gymnopilus dilepis* sequences available from GenBank, and a query coverage of 100-95-94% (Per. ident. 99.74%, E-value 0.00, ON715770.1; Per. ident. 99.73%, E-value 0.00, MH185801.1;). It also showed similarity to the sequence of one of the *G. lepidotus* (Per. ident. 99.72%, E-value 0.00, KP764811.1). The alignment of the sequences and the creation of robust 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 a *Gymnopilus dilepis* species.

In our opinion, following the necessary multi-gene examination of the *Gymnopilus dilepis* group, taking the principle of priority into account, the *Gymnopilus lepidotus* Hesler (1969) and *G. subearlei* taxon R. Valenz., Guzmán & J. Castillo (1981) will most probably be considered a synonym of *Gymnopilus dilepis* (Berk. & Broome) Singer [1949], regardless of the micro- and macromorphological differences of the described specimens from different continents.

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 *Gymnopilus dilepis* species in Hungary.

Since the possibility of accidental consumption arose at the time of notification, we also assessed the toxicological data of the species in order to evaluate the possible risk.

### Discussion

14 species of the *Gymnopilus* genus contain psilocybin, one of which is *Gymnopilus dilepis*.

Psilocybin (4-phosphoryloxy-N,N-dimethyl-tryptamine) is a psychoactive alkaloid which belongs to the tryptamine family.

After chewing in the mouth, it starts working in 10 minutes, after consumption, within 30-60 minutes, but it may also occur that the first signs only appear 2 hours after consumption.

The effect of psilocybin lasts for 2-6 hours and gradually decreases in the last half or third.

Chills, nausea, increased intestinal gas activity, pupil dilation, dizziness may appear. In case of higher doses, vomiting is also a possible occurrence. Most of the unpleasant physical effects are primarily characteristics of the first stage of the change of consciousness; with the fulfillment of the mental effects, they are mostly pushed into the background. The perception, the way of thinking, the feelings and the perceiving of being changes. In addition to the changes in perception, heightened thinking and sometimes an increased ability to concentrate are typical. Extreme emotional reactions might take place, repressed memories or latent psychic crises may surface.

The effect, until the perception of everyday reality completely returns, can last up to 8 hours; during this time, pathological insomnia can appear as a side effect. [1]

It does not cause physical addiction, and the development of psychological addiction is unlikely. [2-4]

In China in 2022, out of 482 mushroom poisoning incidents (28 deaths occurred out of 1332 affected persons), *G. dilepis* caused the illness in 10 incidents involving 34 affected persons. Among all the cases, among the 32 species that cause psycho-neurological symptoms, one of the first 5 most common fungal species is the new species that has just been detected in Hungary. [5]

In conclusion, it can be said that the identified species is one of the psychoactive mushrooms, the consumption of which causes mental symptoms through psilocybin, and this implies a serious risk, especially after accidental consumption by children.

## A *Gymnopilus dilepis* (jelenleg *Hymenogastraceae* részeként leírt) első magyarországi dokumentált adata

Vrba György<sup>1\*</sup>, Baróti Beatrix Anasztázia<sup>2</sup>, Vrba Dorottya<sup>1</sup>, Nagy Attila<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Erdei Gombász Tanoda Bt., H-2800 Tatabánya, Moravcsik u. 4.

<sup>2</sup>Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Mikrobiológiai Nemzeti Referencia Laboratórium, H-1095 Budapest, Mester u. 81.

\*A szerző levelezési címe: info@mikochips.com

### Bevezetés

A termőtest egy üzletlánc magyarországi áruházában vásárolt árnyékarália (*Polyscias sp.*) cserepéből került a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Mikrobiológiai Nemzeti Referencia Laboratóriumába, mivel felmerült a gyanú, hogy egy kisgyermek fogyasztott a gombából, amely a csereppel együtt került a háztartásukba.

A lilás, borvörös színű gombatermőtest makroszkopikus (Ábra 1.) és mikroszkopikus vizsgálata (Ábra 2.) megerősítette, hogy vélelmezten, egy egzotikus, hazánkban korábban még leírásra nem került, viszonylag jól körülhatárolható *Gymnopilus* (dilepis-lepidotus-subearlei csoport) fajhoz tartozhat a kérdéses gomba.

### Anyagok és módszerek

A termőtestet először makroszkopikusan tanulmányoztuk, majd fénymikroszkóp (Zeiss Axioscop 2, 400x, 1000x nagyítás) alatt analizáltuk a gomba mikromorfológiai jegyeit.

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

### Molekuláris módszerek

A gomba kalapszövetéből 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 fényel vizualizáltuk.

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

A kromatogramok ellenőrzését, szerkesztését és összeállítását a ChromasPro programmal végeztük.

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

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/, valamint a RaxmlGUI programmal.

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 *Gymnopilus penetrans* taxont használtuk. A szekvenciák illesztését a SeaView programmal végeztük.

### Eredmények

Az ITS szekvencia elemzések során 49 *Gymnopilus* ITS szekvenciát vontunk be a filogenetikai elemzésünkbe.

Az analízisünk négy erősen támogatott fajszintű kládot azonosított (a *Gymnopilus purpureosquamulosus* csoport alaposabb vizsgálata nélkül).

A BLAST keresés eredménye 100-95-94%-os lekérdezési lefedettség mellett, magas százalékos hasonlóságot mutatott a GenBank-ból elérhető *Gymnopilus dilepis* szekvenciákkal (Per. ident. 99.74%, E-value 0.00, ON715770.1; Per. ident. 99.73%, E-value 0.00, MH185801.1.); továbbá az egyik *G. lepidotus* szekvenciájával (Per. ident. 99.72%, E-value 0.00, KP764811.1).

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

Véleményünk szerint a *Gymnopilus dilepis* csoport szükségzerű, többgének vizsgálatát követően, a prioritás elvét figyelembe véve, nagy valószínűséggel a *Gymnopilus lepidotus* Hesler (1969) és a *G. subearlei* R. Valenz., Guzmán & J. Castillo (1981) taxonokat a *Gymnopilus dilepis* (Berk. & Broome) Singer [1949] szinonimájaként kell majd tekinteni, függetlenül a különböző kontinensekről leírt példányok mikro- és makromorfológiai differenciájától.

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

Mivel a bejelentéskor felmerült a véletlen fogyasztás lehetősége, felmértük egyúttal a gombafaj toxikológiai adatait a lehetséges kockázat értékelése érdekében.

## Diszkusszió

A *Gymnopilus* nemzetség 14 faja tartalmaz pszilocibint, ezek egyike a *Gymnopilus dilepis*.

A pszilocibin (4-foszforiloxi-N,N-dimetil-triptamin) a triptamin családba tartozó pszichoaktív alkaloid. Megrágás után a szájban tartva 10 perc alatt, elfogyasztva 30-60 perc alatt kezd hatni, de előfordul az is, hogy az első jelek csak 2 órával az elfogyasztás után jelentkeznek.

Hatása 2-6 óra hosszan tart, és utolsó felében-harmadában fokozatosan csökken.

Megjelenhet hidegrázás, émelygés, fokozott bélgáztevékenység, pupillatágulat, szédülés. Nagyobb dózis esetén hányás is előfordulhat. A kellemetlen fizikai hatások nagy része elsősorban a tudatváltozás első szakaszára jellemző; a mentális hatások kiteljesedésével jórészt a háttérbe szorulnak. Megváltozik az érzékelés és a gondolkodásmód, az érzésvilág és a létszemlélet.

Az érzékelésbeli változásokon kívül jellemző a gondolati felfokozottság, néha fokozott koncentrációs képesség. Szélsőséges érzelmi reakciók jelentkezhetnek, elnyomott emlékek vagy látens pszichés krízisek a felszínre jöhetnek.

A hatás, amíg teljesen visszatér a hétköznapi valóság észlelése, akár 8 óráig is eltarthat; ez idő alatt mellékhatásként kóros álmatlanság léphet fel. [1]

Nem okoz fizikai függőséget, és a pszichés függőség kialakulása sem valószínű. [2-4]

Kínában 2022-ben 482 gombamérgezéses eseményből (1332 érintett személy közül 28 halálest történt) 10 eseményben 34 érintett személy esetén okozta a *G. dilepis* a megbetegedést. Az összes megbetegedés között a pszicho-neurológiai tünetegyüttest okozó 32 faj között az első 5 leggyakoribb gombafaj egyike a most kimutatott új hazai faj. [5]

Összefoglalóan elmondható, hogy az azonosított gombafaj a pszichoaktív gombák egyike, amely fogyasztása a pszilocibin révén mentális tüneteket okoz, és ez súlyos kockázatot jelent, főleg kisgyermekes esetében történő véletlen fogyasztást követően.

## Figure 1./Ábra 1. Basidiomes of *Gymnopilus dilepis* / A *Gymnopilus dilepis* termőtestei.

**a:** Basidioma./Termőtest. **b:** Basidioma section./Termőtest metszete. **c:** Pileus surface./Kalap felszíne. **d:** Lamellae, remains of velum parziale and upper part of stipe./Lemezek, a részleges burok maradványai és a tönk felső része.

Photographs/Fotók: **a-d** (ex situ) by Anasztázia Beatrix Baróti

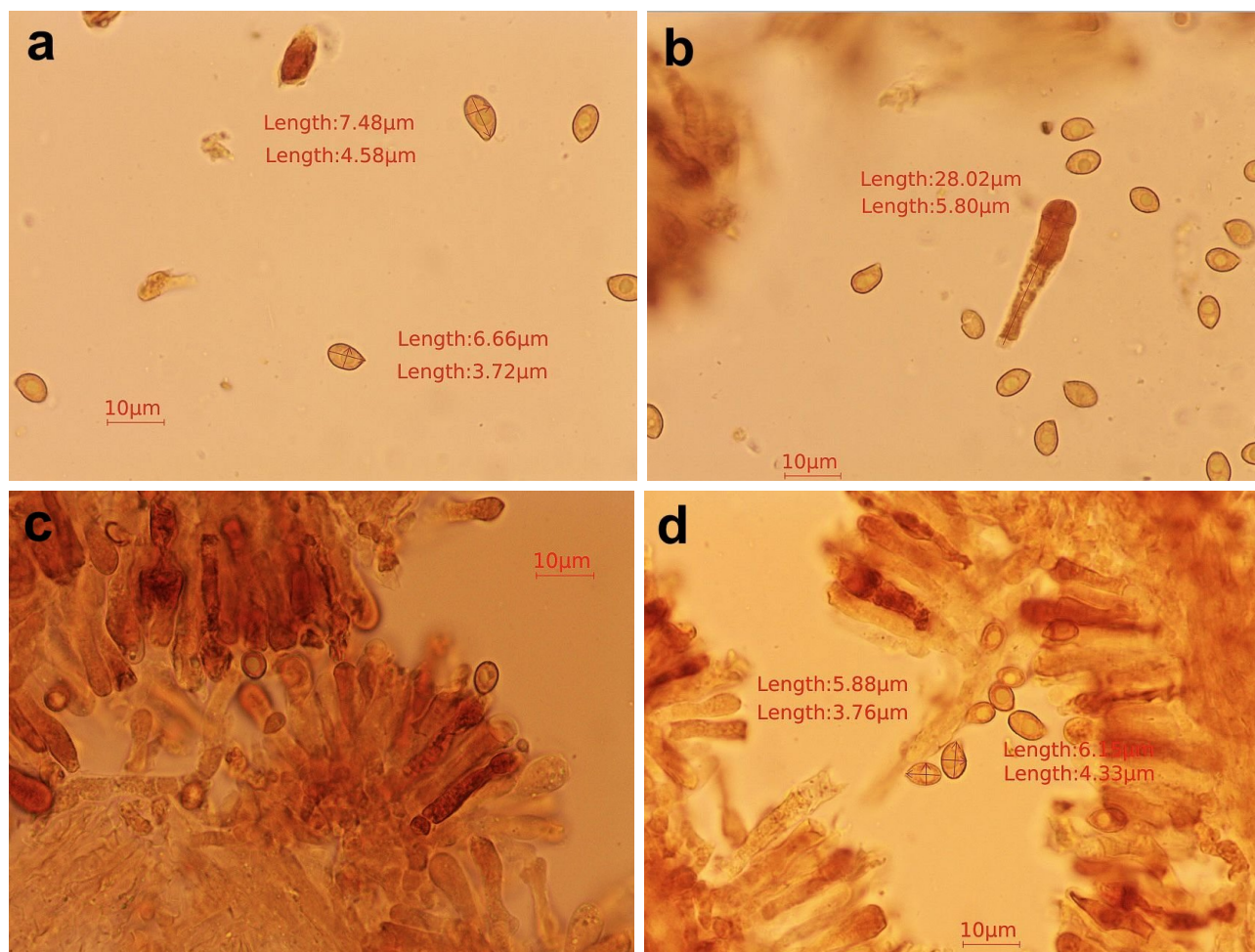




**Figure 2./Ábra 2.** Microscopical features of *Gymnopilus dilepis* (BBA\_SSRD-812). / A *Gymnopilus dilepis* mikroszkopikus jellemzői (BBA\_SSRD-812).

**a:** Basidiospores./Bazidiospórák. **b:** Pseudocystidia and basidiospores./Pseudocisztidia és bazidiospórák. **c:** Pseudocystidia and cheilocystidia./Pseudocisztidia és keilocisztida. **d:** Basidia, pseudocystidia, cheilocystidia and basidiospores./Bazídium, pszeudocisztidia, keilocisztida és bazidiospórák.

Photographs/Fotók: **a-d** by Anasztázia Beatrix Baróti

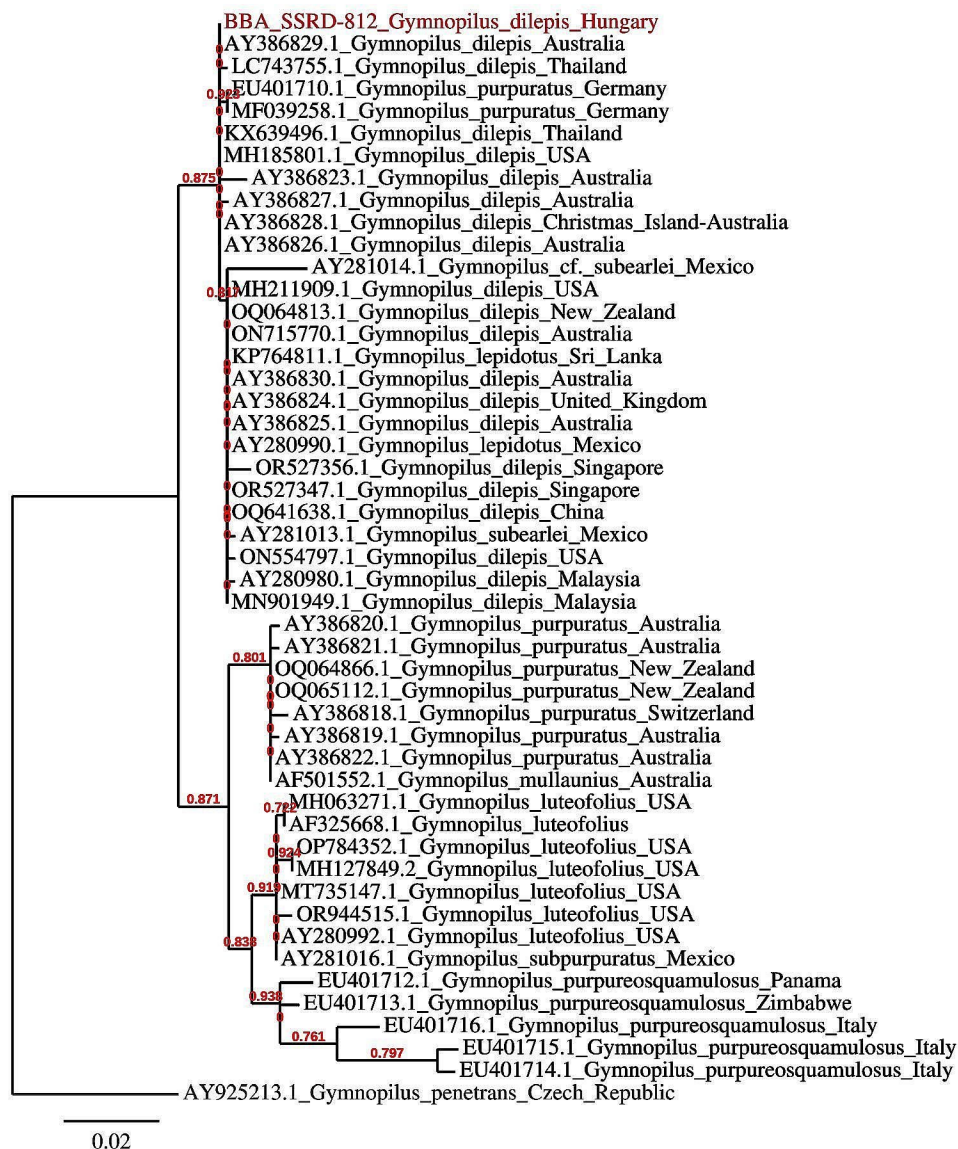


**Table 1.** The nrDNA ITS sequences of *Gymnopilus* species used in the phylogenetic analysis. Hungarian data is in bold. / **Táblázat 1.** A filogenetikai analízisben használt *Gymnopilus* fajok ITS szekvenciái. A hazai adat félkövér betűvel látható.

No.	Species name / Faj	Country / Ország	ITS (Sequences ID)
1.	<b><i>Gymnopilus dilepis</i></b>	<b>Hungary</b>	<b>BBA_SSRD-812</b>
2.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Australia	AY386830.1
3.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Australia	AY386825.1
4.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Christmas Island-Australia	AY386828.1
5.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Australia	AY386826.1
6.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Australia	AY386823.1
7.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	United Kingdom	AY386824.1
8.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Australia	AY386827.1
9.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Australia	AY386829.1
10.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Malaysia	AY280980.1
11.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Thailand	KX639496.1
12.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	USA	MH211909.1
13.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Singapore	OR527356.1
14.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Singapore	OR527347.1
15.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Australia	ON715770.1
16.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	China	OQ641638.1
17.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Thailand	LC743755.1
18.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	New Zealand	OQ064813.1
19.	<i>Gymnopilus dilepis</i>	Malaysia	MN901949.1





**Figure 4.** (Maximum Likelihood analysis, PhyML, (aLRT) test) / **Ábra 4.** (Maximum likelihood analízis, PhyML, (aLRT) teszt)**References / Referencia**

Fernando Fabrini, Ricardo Koroiva, Felipe Wartchow; *Gymnopilus dilepis* and *G. lepidotus* (Agaricales, Basidiomycota): synonym or not? - *Karstenia*, (2023)

Laura Guzmán-Dávalos et al.; New morphological and molecular data on *Gymnopilus purpureosquamulosus* and its phylogenetic relationships among similar species – *Sydowia*, (2008)

Laura Guzmán-Dávalos et al.; Traditional infrageneric classification of *Gymnopilus* is not supported by ribosomal DNA sequence data - *Mycologia*, (2003)

[1] Mao-Qiang He, Mei-Qi Wang, Zuo-Hong Chen, Wang-Qiu Deng, Tai-Hui Li, Alfredo Vizzini, Rajesh Jeewon, Kevin D. Hyde, Rui-Lin Zhao; Potential benefits and harms: a review of poisonous mushrooms in the world - *Fungal Biology Reviews*, 42: 56-68, 2022. ISSN 1749-4613, DOI: 10.1016/j.fbr.2022.06.002

[2] Paul Stamets; *Psilocybin Mushrooms of the World: An Identification Guide*, Ten Speed Press 1996

[3] Klara Gotvaldova, Jan Borovicka, Katerina Hajkova, Petra Cihlarova, Alan Rockefeller, Martin Kuchar; Extensive Collection of Psychotropic Mushrooms with Determination of Their Tryptamine Alkaloids - *International Journal of Molecular Sciences* 23(22): 14068, 2022. ISSN 1422-0067, DOI:10.3390/ijms232214068

[4] Gastón Guzmán, John W. Allen, Jochen Gartz; A worldwide geographical distribution of the neurotropic fungi, an analysis and discussion – *Annali del Museo Civico di Rovereto*, 14: 189, 1998

[5] Haijiao Li, Yizhe Zhang, Hongshun Zhang, Jing Zhou, Jiaqi Liang, Yu Yin, Qian He, Shaofeng Jiang, Yutao Zhang, Yuan Yuan, Nan Lang, Bowen Cheng, Mei Wang, Chengye Sun; Mushroom Poisoning Outbreaks — China, 2022[J]. *China CDC Weekly*, 5(3): 45-50, 2023. DOI: 10.46234/ccdcw2023.009