

The first molecular-based identification of *Chlorociboria aeruginosa* (Ascomycota, Helotiales) from Hungary

György Vrba^{1*}, Erika Szajkó-Petykó², Attila Szajkó², Dorottya Vrba¹, Bálint Dima³

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

²Pipacs street 17, H-5700 Gyula

³Department of Plant Anatomy, Institute of Biology, Eötvös Loránd University, Pázmány Péter sétány 1/c, H-1117 Budapest, Hungary.

*Corresponding author: info@mikochips.com

Abstract

The present work discusses the occurrence of *Chlorociboria aeruginosa* in Hungary which was initially identified based on macromorphological features. Our molecular genetic study confirmed the identification using nrDNA ITS sequence data and maximum likelihood (raxmlGUI, PhyML) phylogenetic analyses.

Introduction

An interesting bluish green ascomycetous fungi was collected in a mixed deciduous forest in the outskirts of Gyula city (SE Hungary). Based on macromorphological features, the ascomata undoubtedly belonged to the genus *Chlorociboria* (*Chlorociboriaceae*, *Helotiales*). Further investigation of the morphology of the apothecium and colour of the hymenium pointed toward the direction of the rare species *Chlorociboria aeruginosa* (Figure 1). In order to confirm our identification, we conducted molecular phylogenetic analyses using nrDNA ITS sequence data.

Materials and methods

Fruiting bodies were photographed in situ (Figure 1). Before conducting molecular methods, we first studied the morphology of the ascomata macroscopically, as well as the greenish colour present in the fruiting bodies, which is dependent on the presence of the xylindein compound (Donner et al. 2012).

Molecular methods

Direct PCR method using Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific, USA) was applied from a sample taken from one apothecium 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 product was electrophoresed on 2% agarose gel, stained with nucleic acid stain (DNA Safe Strain) and then visualized by UV transilluminator. The sequencing of the successful PCR product was performed by a third party, after purification, with the Sanger dideoxy method (LGC Genomics GmbH Berlin, Germany). The checking, cleaning, and editing of the chromatogram was performed using FinchTV V. 1.4.0 software (Geospiza, Inc., Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com>). We compared the obtained ITS sequence to GenBank using BLASTn and downloaded the additional high-quality sequences of the closely related species (Table 1) with available sequences in GenBank - using BLAST. *Heyderia abietis* was used as an outgroup. Multiple sequence alignment was performed using MUSCLE implemented in the Geneious Prime software (Figure 2). After careful inspection of the alignment, maximum likelihood phylogenetic analyses were performed using the raxmlGUI 2.0 program (Edler et al. 2020) and the phylogeny.fr portal (PhyML). In raxmlGUI, the maximum likelihood (ML) tree was created with 1000 bootstrap replications, and the tree was visualized with the UGENE application (Figure 3). In PhyML, the approximate likelihood-ratio test (SH-aLRT) was used to test branch support (Figure 4).

Results

The results of the BLASTn search showed a high percentage of similarity with the *Chlorociboria aeruginosa* sequences available from GenBank, along with a query coverage of 96–99–100% (per. ident. 99.40% (497/500), E-value 0.00, OQ534206; per. ident. 99.23% (513/517), E-value 0.00, LC425047; per. ident. 99.22% (510/514), E-value 0.00, AY755360).

In our ITS phylogenetic analyses (Figures 3–4), we included 45 *Chlorociboria* and 1 *Heyderia* (outgroup) sequences. The outcome was in line with the results of the BLAST search, as well as the prior macromorphological identification and confirmed the studied species as *Chlorociboria aeruginosa*.

Chlorociboria aeruginosa (Oeder) Seaver 1936 – Hungary, Békés County, Gyula, 46.649068° N, 21.295457° E, 6 February 2021, E. Szajkó-Petykó, A. Szajkó, V6.

A *Chlorociboria aeruginosa* (Ascomycota, Helotiales) első molekuláris alapú azonosítása Magyarországról

Vrba György^{1*}, Szajkó-Petykó Erika², Szajkó Attila², Vrba Dorottya¹, Dima Bálint³

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

²5700 Gyula, Pipacs utca 17.

³Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológiai Intézet Növényismereti Tanszék, H-1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/c.

*A szerző levelezési címe: info@mikochips.com

Absztrakt

A jelen publikációnk a *Chlorociboria aeruginosa* előfordulását tárgyalja Magyarországon, amelyet kezdetben makromorfológiai jellemzők alapján azonosítottak. A molekuláris genetikai vizsgálatunk megerősítette a morfológiai azonosítást nrDNS ITS szekvencia adatok és maximum likelihood (raxmlGUI, PhyML) filogenetikai elemzések segítségével.

Bevezetés

Egy érdekes, kékes-zöld tömlősgombát gombát gyűjtöttünk vegyes lombhullató erdőben Gyula város külterületén, 2021-ben. A makromorfológiai jellemzők alapján a termőtestek egyértelműen a *Chlorociboria* nemzetséghez (*Chlorociboriaceae*, *Helotiales*) tartoztak. Az apotécium morfológiája, valamint a himénium színének további vizsgálata a ritka *Chlorociboria aeruginosa* faj irányába mutatott (1. ábra). Az azonosításunk megerősítése érdekében molekuláris filogenetikai elemzéseket végeztünk nrDNS ITS szekvencia adatok felhasználásával.

Anyagok és módszerek

A termőtesteket in situ fényképeztük (1. ábra). Molekuláris módszerek alkalmazása előtt először makroszkopikusan tanulmányoztuk a termőtesteket, valamint az ezekben megjelenő zöldes színt, amely a xylindein vegyület jelenlététől függ (Donner és mtsai 2012).

Molekuláris módszerek

Direkt PCR módszert alkalmaztunk a Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific, USA) segítségével, amelyet egy apotéciumból vett minta alapján végeztünk el a szárított példányból. 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 terméket 2%-os agarózgélén elektroforetizáltuk, nukleinsavfestékkel (DNA Safe Strain) megfestettük, majd UV transzilluminátor segítségével vizualizáltuk. A sikeres PCR-termék szekvenálását egy harmadik fél (LGC Genomics GmbH, Berlin, Németország) 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; <http://www.geospiza.com>). A kapott ITS szekvenciát összehasonlítottuk a GenBank-ban találhatókkal BLASTn segítségével, majd letöltöttük a közeli rokon fajok további, magas minőségű szekvenciáit (1. táblázat). Külsőportként a *Heyderia abietis*-t használtuk. Többszörös szekvencia-illesztést végeztünk a MUSCLE programmal a Geneious Prime szoftver segítségével (2. ábra). Az illesztés ellenőrzése után az adatsorunkat maximum likelihood (ML) módszerrel elemeztük a raxmlGUI 2.0 program és a phylogeny.fr portál (PhyML) használatával. A raxmlGUI programban a törzs-fát 1000 bootstrap replikációval hoztuk létre, majd a fát az UGENE alkalmazás segítségével vizualizáltuk (3. ábra). A PhyML-ben az approximate likelihood-ratio tesztet (SH-aLRT) használtuk az elágazások támogatottságának tesztelésére (4. ábra).

Eredmények

A BLASTn keresés eredményei magas százalékos hasonlósági arányt mutattak a GenBankból elérhető *Chlorociboria aeruginosa* szekvenciákkal, a lekérdezés lefedettsége pedig 96–99–100% volt (per. ident. 99.40% (497/500), E-value 0.00, OQ534206; per. ident. 99.23% (513/517), E-value 0.00, LC425047; per. ident. 99.22% (510/514), E-value 0.00, AY755360).

Az ITS filogenetikai elemzéseinkbe (3-4. ábra) 45 *Chlorociboria* és 1 *Heyderia* (külsőport) szekvenciát vontunk be. Az eredmény összhangban volt a BLAST-keresés eredményeivel, valamint a korábbi makromorfológiai azonosítással, és megerősítette, hogy a vizsgált faj a *Chlorociboria aeruginosa*.

Chlorociboria aeruginosa (Oeder) Seaver 1936 – Békés vármegye, Gyula, 46.649068° É, 21.295457° K, 2021. február 6., Szajkó-Petykó Erika, Szajkó Attila, V6.



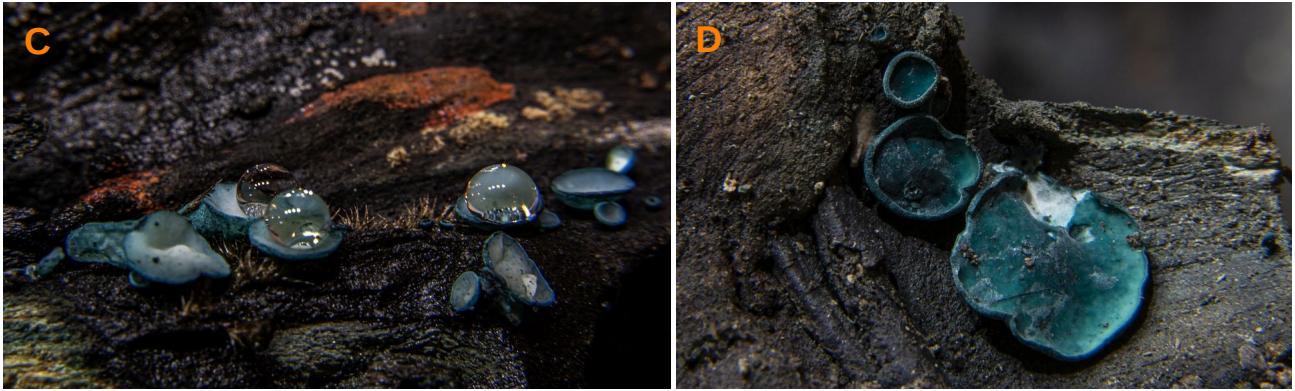


Figure 1 / 1. ábra. A–D: Ascomata of *Chlorociboria aeruginosa*. / A *Chlorociboria aeruginosa* termőtestei.
Photographs / Fotók: Attila Szajkó

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

1. táblázat. A filogenetikai elemzésben használt *Chlorociboria* fajok nrDNS ITS szekvenciái. A hazai adat félkövér betűvel látható.

No.	Species name / Fajnév	Country / Ország	ITS (Sequences ID)
1.	<i>Chlorociboria awakinoana</i>	New Zealand	JN943461
2.	<i>Chlorociboria awakinoana</i>	New Zealand	JN943462
3.	<i>Chlorociboria awakinoana</i>	New Zealand	AY755339
4.	<i>Chlorociboria aeruginascens</i> subsp. <i>australis</i> (holotype)	New Zealand	NR_119520
5.	<i>Chlorociboria aeruginascens</i> subsp. <i>australis</i>	New Zealand	JN943459
6.	<i>Chlorociboria aeruginascens</i> subsp. <i>australis</i>	New Zealand	AY947345
7.	<i>Chlorociboria aeruginascens</i> subsp. <i>australis</i>	New Zealand	JN943460
8.	<i>Chlorociboria aeruginascens</i>	China	AY755359
9.	<i>Chlorociboria aeruginascens</i>	USA	MK966427
10.	<i>Chlorociboria aeruginascens</i>	Estonia	LT158477
11.	<i>Chlorociboria aeruginascens</i>	Austria	MK480517
12.	<i>Chlorociboria aeruginascens</i>	USA	AY755358
13.	<i>Chlorociboria spathulata</i>	New Zealand	AY755344
14.	<i>Chlorociboria spathulata</i>	New Zealand	JN943463
15.	<i>Chlorociboria spathulata</i>	New Zealand	JN943464
16.	<i>Chlorociboria spathulata</i>	New Zealand	AY755342
17.	<i>Chlorociboria aeruginosa</i>	Japan	LC425047
18.	<i>Chlorociboria aeruginosa</i>	South_Korea	KY744738
19.	<i>Chlorociboria aeruginosa</i>	USA	DQ491501
20.	<i>Chlorociboria aeruginosa</i>	Canada	HQ604856
21.	<i>Chlorociboria aeruginosa</i>	USA	MF161176
22.	<i>Chlorociboria aeruginosa</i>	Canada	JX843710
23.	<i>Chlorociboria aeruginosa</i>	USA	AY755360
24.	<i>Chlorociboria aeruginosa</i>	Hungary	V6
25.	<i>Chlorociboria aeruginosa</i>	Norway	Z81426
26.	<i>Chlorociboria pardalota</i>	New Zealand	AY755353
27.	<i>Chlorociboria daliensis</i>	China	OM021876
28.	<i>Chlorociboria daliensis</i>	China	OM321599
29.	<i>Chlorociboria daliensis</i>	China	OM022017
30.	<i>Chlorociboria laojunense</i>	China	OR753794
31.	<i>Chlorociboria laojunense</i>	China	OR753795
32.	<i>Chlorociboria ailaoense</i>	China	OR753790
33.	<i>Chlorociboria ailaoense</i>	China	OR753791
34.	<i>Chlorociboria poutoensis</i>	China	MH648614
35.	<i>Chlorociboria poutoensis</i>	China	KC904943
36.	<i>Chlorociboria poutoensis</i>	South Korea	MH390723
37.	<i>Chlorociboria poutoensis</i>	China	MK253757
38.	<i>Chlorociboria poutoensis</i>	South_Korea	KY744740
39.	<i>Chlorociboria poutoensis</i>	New_Zealand	AY755352

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

No.	Species name / Fajnév	Country / Ország	ITS (Sequences ID)
40.	<i>Chlorociboria poutoensis</i>	Thailand	MK584968
41.	<i>Chlorociboria poutoensis</i>	South_Korea	KY744739
42.	<i>Chlorociboria bannaensis</i>	China	OR753792
43.	<i>Chlorociboria bannaensis</i>	China	OR753793
44.	<i>Chlorociboria yulongense</i>	China	OR753796
45.	<i>Chlorociboria yulongense</i>	China	OR753797
46.	<i>Heyderia abietis</i>	USA	OR387456

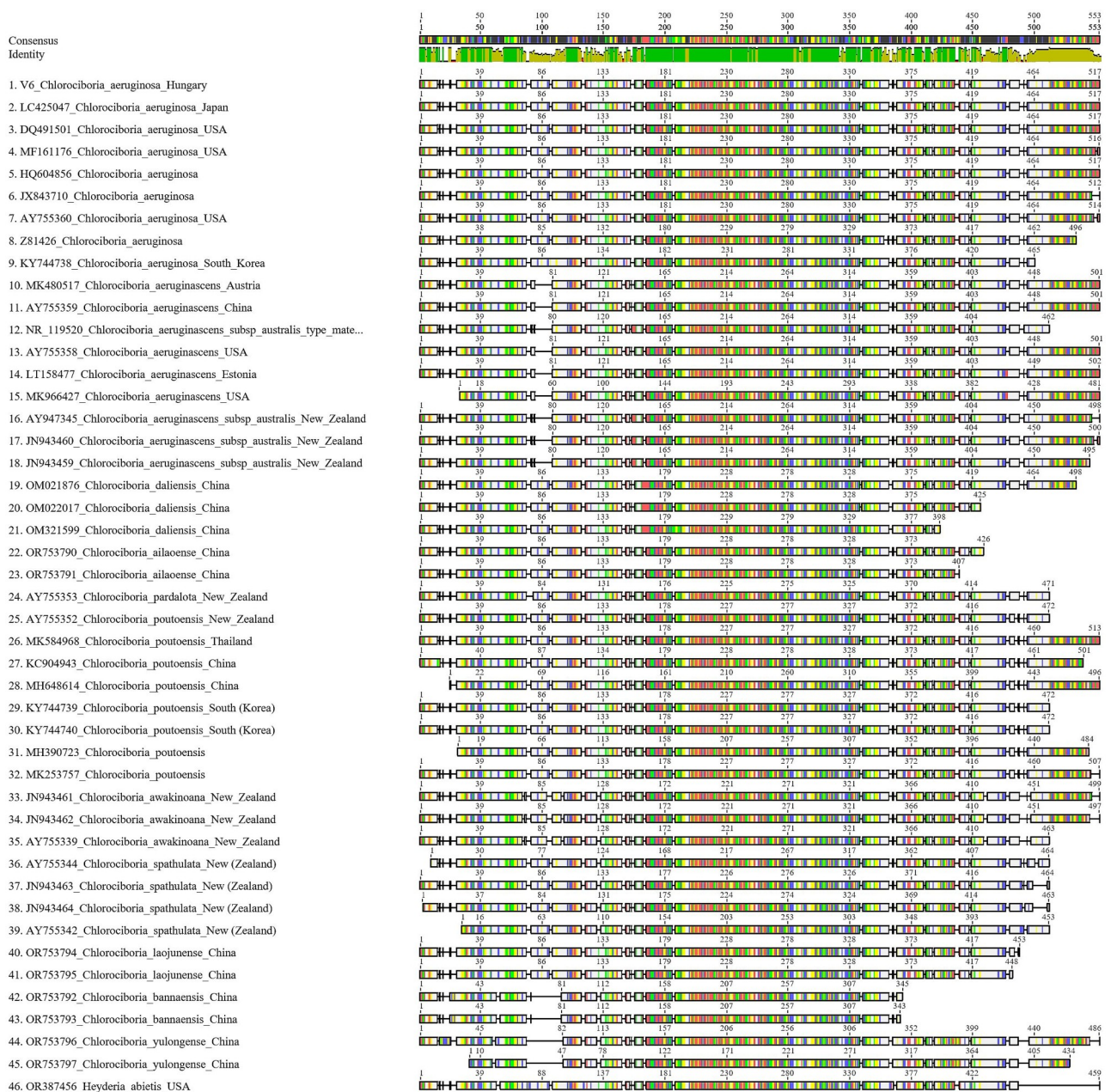


Figure 2 Alignment view (Geneious Prime, MUSCLE alignment, threshold:100% – identical (bases matching all sequences)). / 2. ábra. Illesztés nézete (Geneious Prime, MUSCLE illesztés, küszöbérték: 100% – azonos (az összes szekvenciának megfelelő bázisok)).

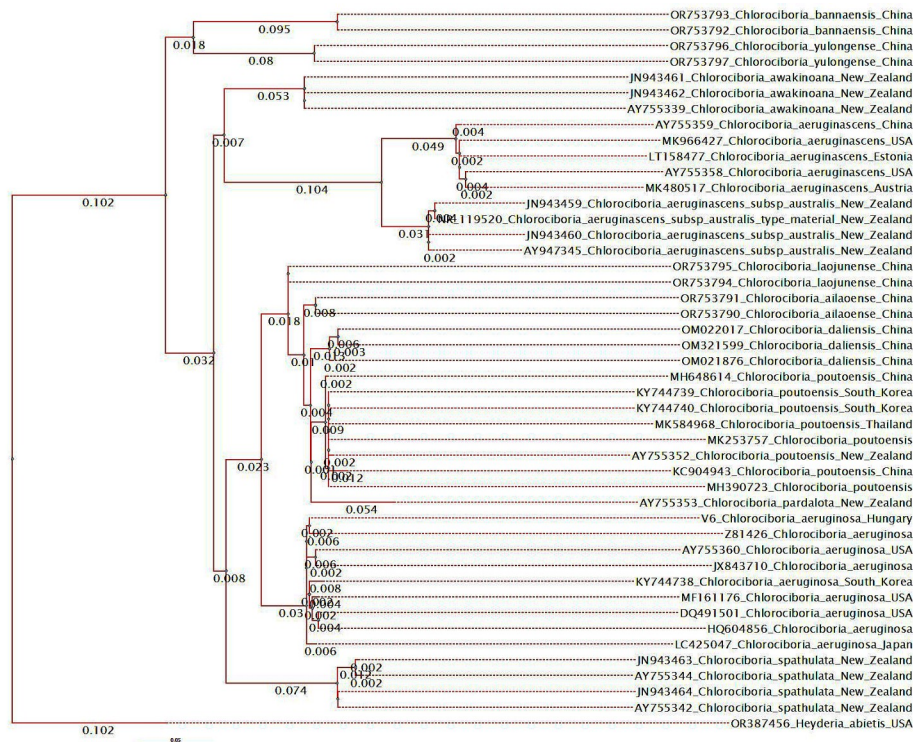


Figure 3 Maximum likelihood phylogenetic tree of the genus *Chlorociboria* generated from ITS sequences using raxmlGUI 2.0. / **3. ábra.** A *Chlorociboria* nemzetség ITS szekvenciáiból generált maximum likelihood filogenetikai fa a raxmlGUI 2.0 program segítségével.



Figure 4 Maximum likelihood phylogenetic tree of the genus *Chlorociboria* generated from ITS sequences using PhyML / **4. ábra.** A *Chlorociboria* nemzetség ITS szekvenciáiból generált maximum likelihood filogenetikai fa a PhyML segítségével.

References / Irodalomjegyzék

Donner C.D., Cuzzupe A.N., Falzon C.L., Gill M. (2012) Investigations towards the synthesis of xyloindin, a blue-green pigment from the fungus *Chlorociboria aeruginosa* – *Tetrahedron* 68: 2799–2805

Edler D, Klein J, Antonelli A, Silvestro D. (2020) raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods in Ecology and Evolution* 12: 373–377. doi: <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13512>