

The first Hungarian record of *Inocybe aurantiobrunnea* (Agaricales, Inocybaceae) with molecular identification

György Vrba^{1*} and Dorottya Vrba¹

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

*Corresponding author: info@mikochips.com

Abstract

The present work discusses the two occurrences of *Inocybe aurantiobrunnea* in Hungary, which we initially could not identify clearly to species level based on macromorphological characteristics. Therefore, after molecular genetic analyses, we identified our samples using nrDNA ITS sequence data and phylogenetic analyses with maximum likelihood (raxmlGUI, PhyML).

Introduction

In two cases, we collected interesting inocyboid mushrooms with strongly bright yellow plates and also yellow colour in the flesh of the stipe, in a black pine forest (*Pinus nigra*) scattered with deciduous tree species, on the outskirts of Csákvár city, in 2022. Based on the macromorphological characteristics, the fruiting bodies clearly belonged to the *Inocybe* genus (*Inocybaceae*, *Agaricales*). Molecular phylogenetic analyzes were conducted using nrDNA ITS sequence data for accurate species-level identification.

Materials and methods

The fruiting bodies (V65_B18; V66_B19) were photographed in situ (Figure 1). Before applying molecular methods, we first studied the fruiting bodies macroscopically.

Molecular methods

Direct PCR method using Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific, USA) was applied from a sample taken from the plates of the dried specimens. 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 (DNA Safe Strain) and then visualized by UV transilluminator. Sequencing of the successful PCR products was performed using third-generation Oxford Nanopore Technologies (Flow Cell: Flongle, chemistry: Native Barcoding Kit 24, analysis: high-accuracy basecalling, 450 bps). The analysis of the data obtained from sequencing (FASTQ) and the creation of robust ITS consensus files were performed using the Amplicon_sorter program (LINUX platform) (https://github.com/avierstr/amplicon_sorter). We compared the obtained ITS sequences to sequences in GenBank using BLASTn and downloaded the additional high-quality sequences of the closely related species (Table 1). *Inocybe psammobrunnea* was used as an outgroup. Multiple sequence alignment was performed using the Clustal Omega program with the help of the Geneious Prime software (Figure 2). After inspecting the alignment, we analyzed our dataset using the maximum likelihood (ML) method with the raxmlGUI 2.0 program and the phylogeny.fr portal (PhyML). In raxmlGUI, the 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 in the case of both samples with the sequence of the isotype of *Inocybe aurantiobrunnea* available from GenBank as well as with an additional accessible sequence of *I. aurantiobrunnea*, along with a query coverage of 100–97% (per. ident. 99.53% (639/642), gaps (1/642), E-value 0.00, OP164016; per. ident. 98.87% (614/621), gaps (5/621), E-value 0.00, JF908212), in the case of V66_B19 sample it was 97–100% (per. ident. 99.68% (615/617), gaps (2/617), E-value 0.00, JF908212; per. ident. 98.91% (635/642), gaps (6/642), E-value 0.00, OP164016).

In our ITS phylogenetic analyses (Figures 3–4), we included 22 *Inocybe* sequences. The outcome was in line with the results of the BLAST search, and confirmed the studied species as *Inocybe aurantiobrunnea*.

Inocybe aurantiobrunnea Esteve-Rav. & García Blanco 2003 – Hungary, Fejér County, Csákvár (2549), South Vértes District, 100/B(20) 8 October 2022, György Vrba, V65_B18.

Inocybe aurantiobrunnea Esteve-Rav. & García Blanco 2003 – Hungary, Fejér County, Csákvár (2549), South Vértes District, 100/E(50) 15 November 2022, György Vrba, V66_B19.

Az *Inocybe aurantiobrunnea* (Agaricales, Inocybaceae) első magyarországi feljegyzése molekuláris azonosítással

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 *Inocybe aurantiobrunnea* két előfordulását tárgyalja Magyarországon, amelyet kezdetben a makromorfológiai jellemzők alapján nem tudtunk fajsztinon egyértelműen azonosítani. Ezért a mintáinkat molekuláris genetikai vizsgálatokat követően a nrDNS ITS szekvencia adatok és maximum likelihood (raxmlGUI, PhyML) filogenetikai elemzések segítségével identifikáltuk.

Bevezetés

Két esetben gyűjtöttünk érdekes, erősen élénk sárga lemezű és a tönkhúsban szintén sárga színű inocyboid gombákat elszórtan lombos fafajokkal elegyes fekete fenyőerdőben (*Pinus nigra*), Csákvár város külterületén, 2022-ben. A makromorfológiai jellemzők alapján a termőtestek egyértelműen az *Inocybe* nemzetséghez (*Inocybaceae*, *Agaricales*) tartoztak. A pontos fajsztintű azonosítás érdekében molekuláris filogenetikai elemzéseket végeztünk nrDNS ITS szekvencia adatok felhasználásával.

Anyagok és módszerek

A termőtesteket (V65_B18; V66_B19) in situ fényképeztük (1. ábra). Molekuláris módszerek alkalmazása előtt először makroszkopikusan tanulmányoztuk a termőtesteket.

Molekuláris módszerek

Direkt PCR módszert alkalmaztunk a Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific, USA) segítségével, amelyet a lemezekből vett minták alapján végeztünk el a szárított példányokból. 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 (DNA Safe Strain) megfestettük, majd UV transzilluminátor segítségével vizualizáltuk. A sikeres PCR-termékek szekvenálását harmadik generációs Oxford Nanopore Technologies (Flow Cell: Flongle, chemistry: Native Barcoding Kit 24, analízis: high-accuracy basecalling, 450 bps) használatával végeztük. A szekvenálással kapott adatok (FASTQ) elemzését és a robosztus ITS konszenzus fájlakat az Amplicon_sorter programmal (LINUX platform) készítettük el (https://github.com/avierstr/amplicon_sorter). Az így nyert ITS szekvenciákat összehasonlítottuk a GenBank-ban találhatókkal BLASTn segítségével, majd letöltöttük a közeli rokon fajok további, magas minőségű szekvenciáit (1. táblázat). Kulcsoportként az *Inocybe psammobrunnea*-t használtuk. Többszörös szekvencia-illesztést végeztünk a Clustal Omega 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 törzsfát 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 eredménye mindkét minta esetében magas százalékos hasonlósági arányt mutatott a GenBank-ból elérhető *Inocybe aurantiobrunnea* izotípusának szekvenciájával, valamint még egy további hozzáférhető *I. aurantiobrunnea* szekvenciájával, a lekérdezés lefedettsége pedig a V65_B18 minta esetében 100–97% volt (per. ident. 99.53% (639/642), gaps (1/642), E-value 0.00, OP164016; per. ident. 98.87% (614/621), gaps (5/621), E-value 0.00, JF908212), a V66_B19 minta esetében 97–100% volt (per. ident. 99.68% (615/617), gaps (2/617), E-value 0.00, JF908212; per. ident. 98.91% (635/642), gaps (6/642), E-value 0.00, OP164016).

Az ITS filogenetikai elemzéseinkbe (3-4. ábra) 22 *Inocybe* szekvenciát vontunk be. Az eredmény összhangban volt a BLAST-keresés eredményeivel és megerősítette, hogy mindkét vizsgált faj az *Inocybe aurantiobrunnea*.

Inocybe aurantiobrunnea Esteve-Rav. & García Blanco 2003 – Fejér vármegye, Csákvár (2549), Dél-Vértesi körzet, 100/B(20) 2022. október 8., Vrba György, V65_B18.

Inocybe aurantiobrunnea Esteve-Rav. & García Blanco 2003 – Fejér vármegye, Csákvár (2549), Dél-Vértesi körzet, 100/E(50) 2022. november 15., Vrba György, V66_B19.



Figure 1 / 1. ábra. A–D: Basidiomes of *Inocybe aurantiobrunnea* V65_B18. /Az *Inocybe aurantiobrunnea* V65_B18 termőtestei.
E–F: Basidiomes of *Inocybe aurantiobrunnea* V66_B19. /Az *Inocybe aurantiobrunnea* V66_B19 termőtestei.
Photographs / Fotók: György Vrba

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

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

No.	Species name / Fajnév	Country / Ország	ITS (Sequences ID)
1.	<i>Inocybe aurantiobrunnea</i> (isotype)	Spain	OP164016
2.	<i>Inocybe aurantiobrunnea</i>	Hungary	V65_B18
3.	<i>Inocybe aurantiobrunnea</i> as <i>I. luteipes</i>	Italy	JF908212
4.	<i>Inocybe aurantiobrunnea</i>	Hungary	V66_B19
5.	<i>Inocybe iberilepora</i> (holotype)	Portugal	OQ690007
6.	<i>Inocybe iberilepora</i>	Portugal	OQ690008
7.	<i>Inocybe carolina</i> as <i>Inocybe</i> sp.	Italy	JF908222
8.	<i>Inocybe carolina</i> (isotype)	Spain	OR102482
9.	<i>Inocybe carolina</i>	Austria	OR102475

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

No.	Species name / Fajnév	Country / Ország	ITS (Sequences ID)
10.	<i>Inocybe castorina</i> (holotype)	Germany	MN512319
11.	<i>Inocybe tigrina</i> (epitype)	Germany	(NR_174869) MW845933
12.	<i>Inocybe tigrina</i>	United Kingdom	PP992713
13.	<i>Inocybe semifulva</i> (isotype)	Canada	HQ222006
14.	<i>Inocybe semifulva</i>	Germany	MW845916
15.	<i>Inocybe flocculosa</i>	Canada	PP865568
16.	<i>Inocybe flocculosa</i>	Canada	PP865702
17.	<i>Inocybe flocculosa</i>	United Kingdom	PP982795
18.	<i>Inocybe flocculosa</i>	Netherlands	OK057165
19.	<i>Inocybe costinitii</i> (holotype)	Croatia	KX686581
20.	<i>Inocybe beatifica</i> (holotype)	Germany	MW845857
21.	<i>Inocybe beatifica</i>	Germany	MW845859
22.	<i>Inocybe psammobrunnea</i> (holotype)	France	MW845926



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

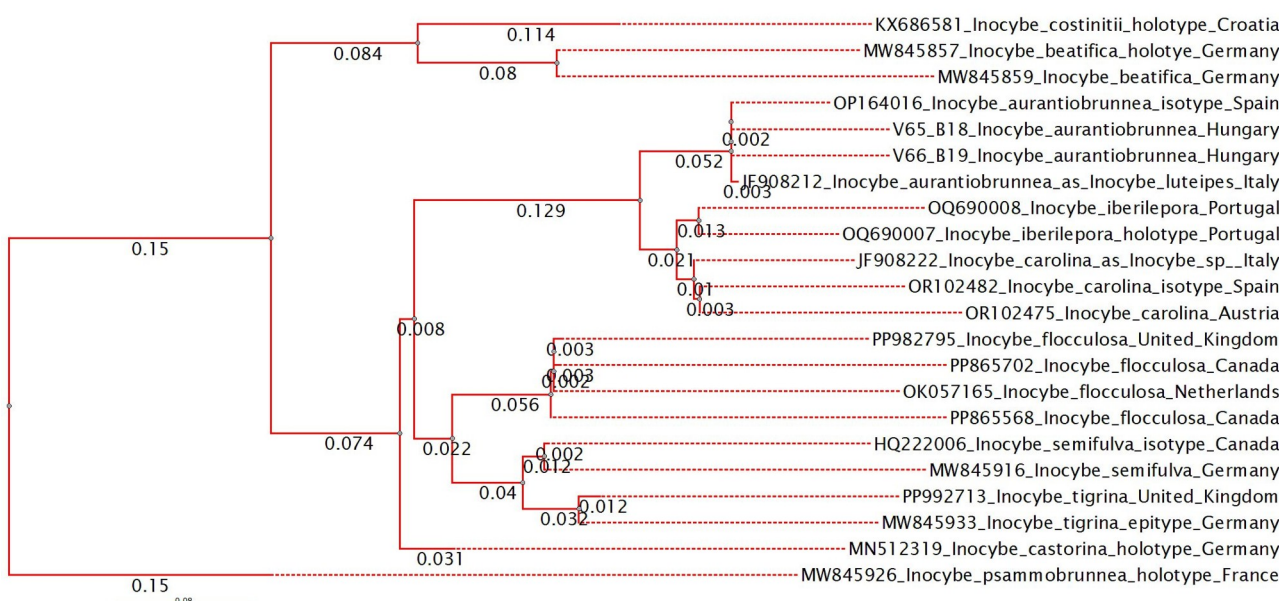


Figure 3 Maximum likelihood phylogenetic tree of the genus *Inocybe* generated from ITS sequences using raxmlGUI 2.0. / 3. ábra. Az *Inocybe* nemzetség ITS szekvenciáiból generált maximum likelihood filogenetikai fa a raxmlGUI 2.0 program segítségével.

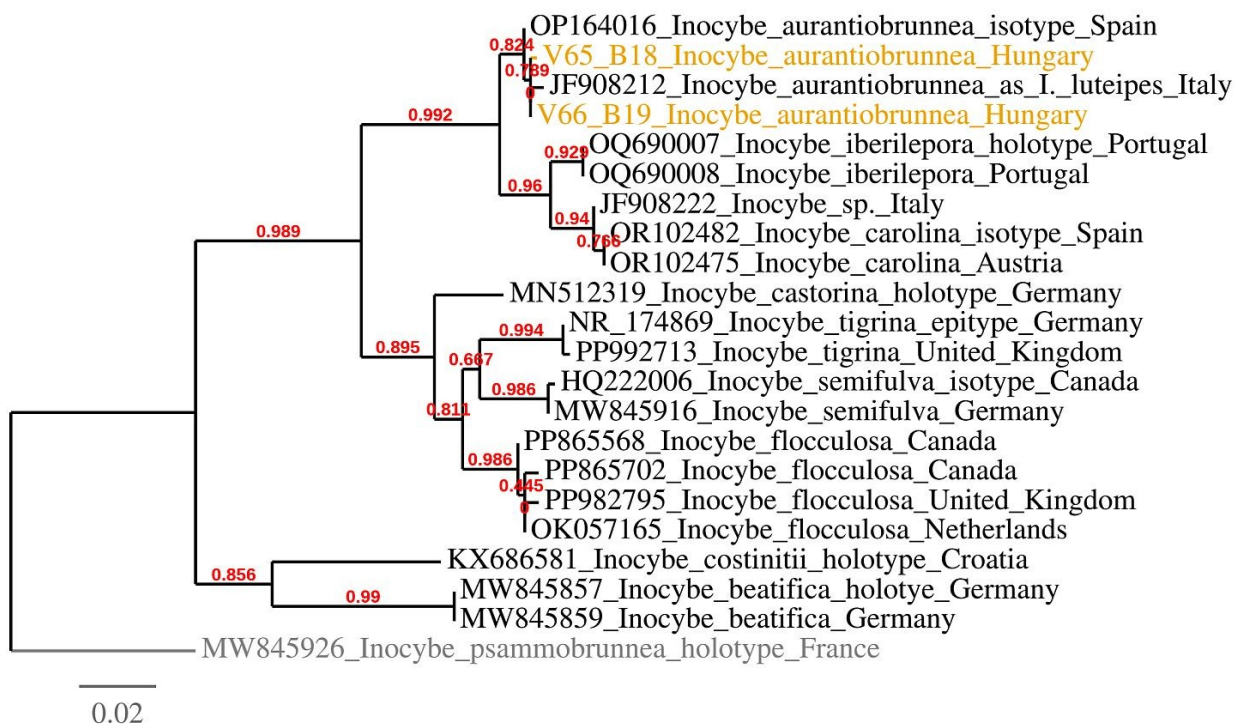


Figure 4 Maximum likelihood phylogenetic tree of the genus *Inocybe* generated from ITS sequences using PhyML / **4. ábra.** Az *Inocybe* nemzetség ITS szekvenciáiból generált maximum likelihood filogenetikai fa a PhyML segítségével.