

## The first Hungarian record of *Agaricus subrufescens* (Agaricales, Agaricaceae) with molecular identification

György Vrba<sup>1\*</sup> and Dorottya Vrba<sup>1</sup>

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

\*Corresponding author: info@mikochips.com

### Abstract

The present publication discusses the first Hungarian record of *Agaricus subrufescens*, which we initially attempted to identify based on macro- and micromorphological characteristics. In order to identify the fruiting body, we subsequently used molecular methods. The nrDNA ITS sequence data, the neighbor-joining and the maximum likelihood (Geneious Prime, raxmlGUI, PhyML) phylogenetic analyses clearly placed our fungal specimen within the *Agaricus subrufescens* sensu lato group.

### Introduction

The fruiting body was collected from a raised garden bed in a private garden in Piliscsaba in 2021. The macro- and micromorphological examinations clearly pointed towards the genus *Agaricus* (Agaricales, Agaricaceae), specifically the *A. subrufescens* species. Molecular phylogenetic analyses were conducted using nrDNA ITS sequence data for accurate species-level identification.

### Materials and methods

The fruiting body was photographed ex situ, and later, we also received in situ photos of the habitat (Figure 1). Before applying molecular methods, we first studied the fungus macroscopically, then we analyzed the micromorphological features of the specimen under a light microscope (Nikon Alphaphot + Hoffman Modulation Contrast, 100x (oil immersion)) (Figure 2).

### Molecular methods

Direct PCR method using Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific, USA) was applied from samples taken from the plates 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 (DNA Safe Strain) 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; <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). *Agaricus litoralis* was used as an outgroup. Multiple sequence alignment was performed using MUSCLE program with the help of the SeaView 5.1 software. After checking the alignment, our dataset was analyzed using the neighbor-joining (NJ) method with the Geneious Prime software, as well as the maximum likelihood (ML) method with the raxmlGUI 2.0 program and the phylogeny.fr platform (PhyML). In Geneious Prime, we constructed the phylogenetic tree using the neighbor-joining method with a 1000 bootstrap replicates and we visualized it (Figure 3). In raxmlGUI, the phylogenetic tree was created with a 1000 bootstrap replications, and the tree was visualized with the UGENE application (Figure 4). In PhyML, the approximate likelihood-ratio test (SH-aLRT) was used to test branch support (Figure 5).

### Results

The results of the BLASTn search showed a high percentage of similarity with the *Agaricus subrufescens* sequences available in GenBank, with a query coverage of 99–97–100% (per. ident. 100% (676/676), E-value 0.00, MF511115; per. ident. 100% (658/658), E-value 0.00, MH620769; per. ident. 99.85% (680/681), E-value 0.00, PV109381).

We included 63 *Agaricus* sequences in our ITS phylogenetic analysis (Figure 4). The result was in consensus with the BLAST search findings as well as the macro- and micromorphological identification, confirming that the studied species is *Agaricus subrufescens*.

***Agaricus subrufescens*** Peck 1894 – Hungary, Pest County, Piliscsaba (2801), 60 Szent László Király Road, 47.63934° N, 18.83340° E, 3 July 2021, Dr. György Bence Halász, V15.

### Discussion

*Agaricus subrufescens* is an edible, medicinal mushroom originally described from North America by C.H. Peck in 1893. *A. subrufescens* has been shown to exhibit many pharmaceutical traits such as anti-cancer, anti-microbial and immunomodulatory properties and is rich in bioactive compounds, especially  $\beta$ -glucans (Zied et al. 2017).

*A. subrufescens* was cultivated first in the late 1800s in eastern North America, then it was widely cultivated, sold and eaten in the Atlantic states of the United States from at least Massachusetts to Washington D.C., from the late 19th century into the 20th (Falconer 1894a, b; Anon. 1904; Anonymous1909; Kauffman 1918).

Once a popular market mushroom, the species faded from commerce in the early 20th century. More recently, a mushroom species growing wild in Brazil has been introduced into cultivation in Brazil, Japan and elsewhere. This Brazilian mushroom has been referred to by various names, most commonly as *A. blazei* Murrill (sensu Heinemann) and most recently as *A. brasiliensis* Wasser et al. (Kerrigan 2005).

According to Kerrigan (2005), the species has an amphithallic pattern of reproduction. Based on DNA sequence analysis of the rDNA ITS region and on mating studies and genetic analysis of hybrid progeny, there is a strong case for conspecificity of the Brazilian mushrooms with *A. subrufescens*. Based on a study of the type and other data, the recent lectotypification of *A. subrufescens* is accepted.

Data are presented on mushrooms of diverse geographical origins, including *Agaricus rufotegulis* Nauta from western Europe, another apparent conspecific from the Netherlands, the United Kingdom and Portugal (Nauta 1999, Hausknecht 2002) which is also extremely similar and considered here to be conspecific with *A. subrufescens*. A possible role for interpopulational hybridization in current populations of *A. subrufescens* is proposed. The breeding data show that isolates once assigned to different species can interbreed and produce offspring; the biological species concept of *A. subrufescens* therefore appears to be inclusive. The sequence data presented here suggest that this is a single phylogenetic unit at the species level, possibly with population level divergence (Kerrigan 2005).

*A. bambusae* var. *bambusae* Beeli, which was described from Africa was shown to be a synonym of *Agaricus subrufescens* based on molecular data (N. Thongklang et al. 2016).

L.A. Parra et al. (2018) note in their study that the cosmopolitan *A. subrufescens* exhibits an unusual level of intraspecific variability. Chen et al. (2016a) described that the ITS can be classified into three distinct types based on nine informative polymorphic positions. The ITS sequences of American and European collections are of type A/A, B/B, or A/B, while specimens collected from Hawaii, Thailand, China, and more recently Iran (Mahdizadeh et al. 2017) are of type C. The representation of this intraspecific diversity in the phylogenetic tree is unreliable, as heteromorphisms and indels in key informative positions are not taken into account.

In their study, R. Medel-Ortiz et al. (2022) concluded that *A. fiardii* Pegler, now recognized as a new synonym of *A. subrufescens*, and the sympatric and morphologically cryptic species *A. macrochlamys*, newly described within the *Arvenses* section, together form a well-supported sister clade to *A. subrufescens* based on the combined phylogenetic analyses. / *A. macrochlamys* showed significant differences compared to *A. subrufescens* in the ITS region (five positions) and in the *TEF1- $\alpha$*  regions (six positions and a 4 bp insertion)./

#### Notes

In our study, we performed a separate alignment of the ITS sequences of the 53 *Agaricus subrufescens* specimens using the MUSCLE algorithm implemented in Geneious Prime. As a result, we identified 18 polymorphic positions within the ITS1F–ITS4 region (Table 2), which were subsequently visualized in the alignment (Figure 6).

#### Conclusion

In our opinion, the taxonomic status of the highly variable and cosmopolitan *Agaricus subrufescens* sensu lato is still far from being fully resolved. Therefore, we would consider it necessary to further investigate the geographical distribution and diversity of the species, collect new samples, and decide whether the taxa already identified in different parts of the world truly belong to one species. To clarify this issue, it would be justified to first perform the molecular-based retyping of the *Agaricus subrufescens* taxon using species-specific markers (ITS and *TEF1- $\alpha$* ), as well as a 2-locus molecular phylogenetic analysis of the cryptic species belonging to the complex, and if necessary, its revision.

## Az *Agaricus subrufescens* (*Agaricales*, *Agaricaceae*) első magyarországi feljegyzése molekuláris azonosítással

Vrba György<sup>1\*</sup> és Vrba Dorottya<sup>1</sup>

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

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

#### Absztrakt

A jelen publikációnk az *Agaricus subrufescens* első magyarországi előfordulását tárgyalja, amelyet kezdetben makro- és mikromorfológia jellemzők alapján próbáltunk meg azonosítani. A gombatermőtestet identifikálásához a továbbiakban molekuláris genetikai vizsgálatokat alkalmaztunk. A nrDNS ITS szekvencia adatok és neighbor-joining, valamint maximum likelihood (Geneious Prime, raxmlGUI, PhyML) filogenetikai elemzések egyértelműen az *Agaricus subrufescens* sensu lato csoportba sorolták a gombamintánkat.

#### Bevezetés

A gombatermőtest egy piliscsabai magánkert magasságából került begyűjtésre 2021-ben. A makro- és mikromorfológiai vizsgálatok egyértelműen az *Agaricus* nemzetségben (*Agaricales*, *Agaricaceae*), az *A. subrufescens* faj irányába mutattak. A pontos fajszerű azonosítás érdekében molekuláris filogenetikai elemzéseket végeztünk nrDNS ITS szekvencia adatok felhasználásával.

#### Anyagok és módszerek

A termőtestet ex situ fényképeztük, valamint utóbb kaptunk in situ fotókat is a termőhelyről (1. ábra). Molekuláris módszerek alkalmazása előtt először makroszkopikusan, majd fénymikroszkóp /Nikon Alphaphot + Hoffman Modulation Contrast, 100x (olajimmerzió)/ alatt analizáltuk a gomba mikromorfológiai jegyeit (2. ábra).

#### 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 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 termékeket 1%-os agarózgélben elektroforetizáltuk, nukleinsavfestékkel (DNA Safe Stain) 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; <http://www.geospiza.com>). A kapott ITS szekvenciát összehasonlítottuk a GenBank-ban található BLASTn segítségével, majd letöltöttük a közeli rokon fajok további, magas minőségű szekvenciáit (1. táblázat). Külsőportként az *Agaricus litoralis*-t használtuk. Többszörös szekvencia-illesztést végeztünk a MUSCLE programmal a SeaView 5.1 szoftver segítségével. Az illesztés ellenőrzése után az adatsorunkat neighbor-joining módszerrel a Geneious Prime program, valamint maximum likelihood (ML) módszerrel a raxmlGUI 2.0 program és a phylogeny.fr portál (PhyML) használatával elemeztük. A Geneious Prime programban a törzs-fát neighbor-joining (NJ) 1000 bootstrap támogatottság replikációval hoztuk létre és vizualizáltuk (3. ábra). A raxmlGUI programban a törzs-fát 1000 bootstrap replikációval hoztuk létre, majd a fát az UGENE alkalmazás segítségével vizualizáltuk (4. ábra). A PhyML-ben az approximate likelihood-ratio tesztet (SH-aLRT) használtuk az elágazások támogatottságának tesztelésére (5. ábra).

### Eredmények

A BLASTn keresés eredményei magas százalékos hasonlósági arányt mutattak a GenBankból elérhető *Agaricus subrufescens* szekvenciákkal, a lekérdezés lefedettsége pedig 99–97–100% volt (per. ident. 100% (676/676), E-value 0.00, MF511115; per. ident. 100% (658/658), E-value 0.00, MH620769; per. ident. 99.85% (680/681), E-value 0.00, PV109381).

Az ITS filogenetikai elemzéseinkbe (4. ábra) 63 *Agaricus* szekvenciát vontunk be. Az eredmény összhangban volt a BLAST-keresés eredményeivel, valamint a makro- és mikromorfológiai azonosítással, és megerősítette, hogy a vizsgált faj az *Agaricus subrufescens*.

*Agaricus subrufescens* Peck 1894 – Pest vármegye, 2801 Piliscsaba, Szent László király útja 60., 47.63934° É, 18.83340° K, 2021. július 3., dr. Halász Bence György, V15.

### Diskusszió

Az *Agaricus subrufescens* ehető, gyógyhatású gomba, amelyet eredetileg Észak-Amerikából C.H. Peck írt le 1893-ban. Kimutatták, hogy számos gyógyászati tulajdonsággal rendelkezik, például rákellenes, antimikrobiális és immunmoduláló tulajdonságokkal, valamint gazdag bioaktív vegyületekben, különösen  $\beta$ -glükánokban (Zied és mtsai 2017).

Az *A. subrufescens*-t először az 1800-as évek végén kezdték el termesztetni Észak-Amerika keleti részén, majd széles körben folytatták a termesztését, árusítását és fogyasztását az Egyesült Államok atlanti államaiban, Massachusettstól Washington D.C.-ig, a XX. századig (Falconer 1894a, b; Anon. 1904; Anonymous 1909; Kauffman 1918).

A valaha népszerű piaci gombafaj a XX. század elején kiveszett a kereskedelemből. Ezt követően egy Brazíliában vadon növő gombafajt vezettek be a termesztésbe Brazíliában, Japánban és másutt is. Ezt a brazil gombát különböző neveken emlegették, leggyakrabban *A. blazei* Murrill (sensu Heinemann), majd *A. brasiliensis* Wasser et al. néven (Kerrigan 2005).

Kerrigan (2005) megállapítása szerint a faj amfitalikus szaporodási mintázattal rendelkezik. Az rDNS ITS régió DNS szekvenciaelemzése, valamint a hibrid utódok ivaros szaporodásának vizsgálatai és genetikai elemzése alapján erős érvek szólnak a brazil gombák és az *A. subrufescens* konspicifikussága mellett. A típus és egyéb adatok tanulmányozása alapján az *A. subrufescens* legújabb lektotipizálása elfogadott.

Adatok kerültek bemutatásra változatos földrajzi eredetű gombákról, mint a nyugat-európai *Agaricus rufotegulis* Nauta Hollandiából, az Egyesült Királyságból, valamint Portugáliából (Nauta 1999, Hausknecht 2002), amely rendkívül hasonló és konspicifikusnak tekintendő az *A. subrufescens*-szel. Felmerült a populációk közötti hibridizáció lehetséges szerepe az *A. subrufescens* jelenlegi populációiban. A tenyésztési adatok azt mutatták, hogy a különböző fajokhoz rendelt izolátumok kereszteződhetnek és utódokat hozhatnak létre; az *A. subrufescens* biológiai fajkonceptiója ezért befogadónak tűnik. A bemutatott szekvenciaadatok arra utalnak, hogy faji szinten egyetlen filogenetikai egységről van szó, esetleg populációs szintű eltérésekkel (Kerrigan 2005).

Molekuláris adatok alapján az is bizonyítást nyert, hogy az *Agaricus bambusae* var. *bambusae* Beeli, amelyet Afrikából írtak le, az *Agaricus subrufescens* szinonimája (N. Thongklang és mtsai 2016).

L.A. Parra és mtsai (2018) tanulmányukban megjegyzi, hogy a kozmopolita *A. subrufescens* esetében szokatlan fajon belüli variabilitás ismert. Chen és mtsai (2016a) leírták, hogy az ITS három különböző típusba sorolható kilenc informatív polimorf pozíció alapján. Az amerikai és európai gyűjtemények ITS szekvenciái A/A, B/B vagy A/B típusúak, míg a Hawaii-ról, Thaiföldről, Kínából és újabban Iránból (Mahdizadeh és mtsai 2017) gyűjtött mintákból származók C típusúak. Ennek a fajon belüli diverzitásnak a filogenetikai fában való ábrázolása nem megbízható, mivel a heteromorfizmusokat és a kulcsfontosságú informatív pozíciókban lévő indelleket nem veszik figyelembe.

R. Medel-Ortiz és mtsai (2022) tanulmányukban megállapították, hogy *A. fiardii* Pegler, az *A. subrufescens* új szinonimája, valamint az Arvenses szekcióban új fajként írták le a szimpatikus és morfológiailag kriptikus *A. macrochlamys* fajt, amely az összesített filogenetikai elemzések alapján az *A. subrufescens* teljes mértékben támogatott testvérkládját alkotta. /Az *A. macrochlamys* jelentős különbségeket mutatott az *A. subrufescens*-szel szemben az ITS (öt pozíció) és a *TEF1-a* régiókban (hat pozíció és egy 4 bps inszerció)./

### Megjegyzés

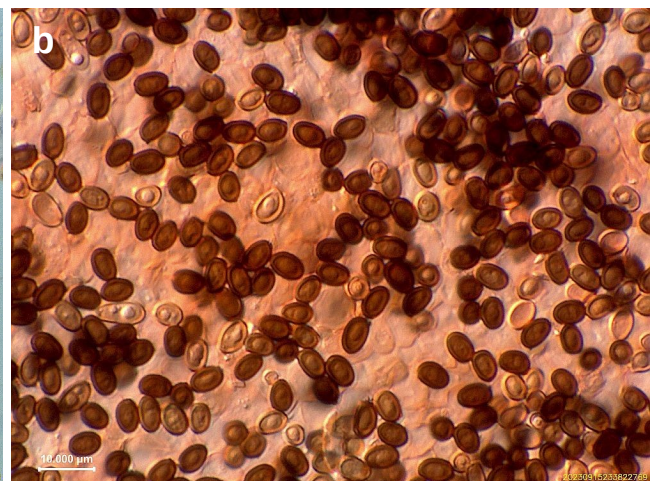
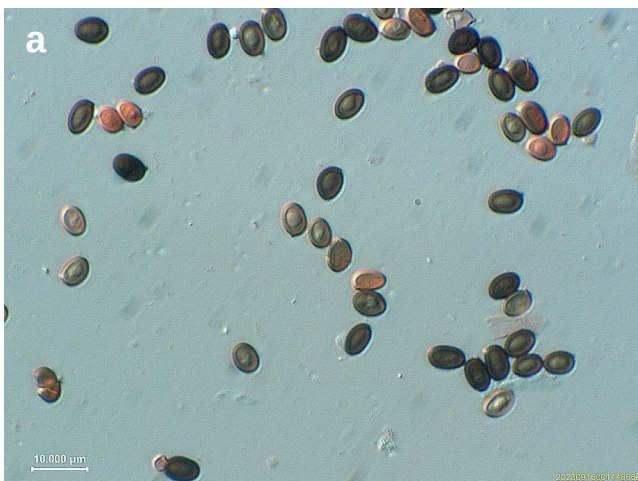
Tanulmányunkban elvégeztük külön az 53 *Agaricus subrufescens* példány ITS szekvenciájának az illesztését MUSCLE programmal a Geneious Prime szoftver segítségével, amelynek eredményeként 18 polimorf pozíciót rögzítettünk az ITS1F-ITS4 régióban (2. táblázat), majd ezt követően ezeket a polimorf pozíciókat az illesztésben is vizualizáltuk (6. ábra).

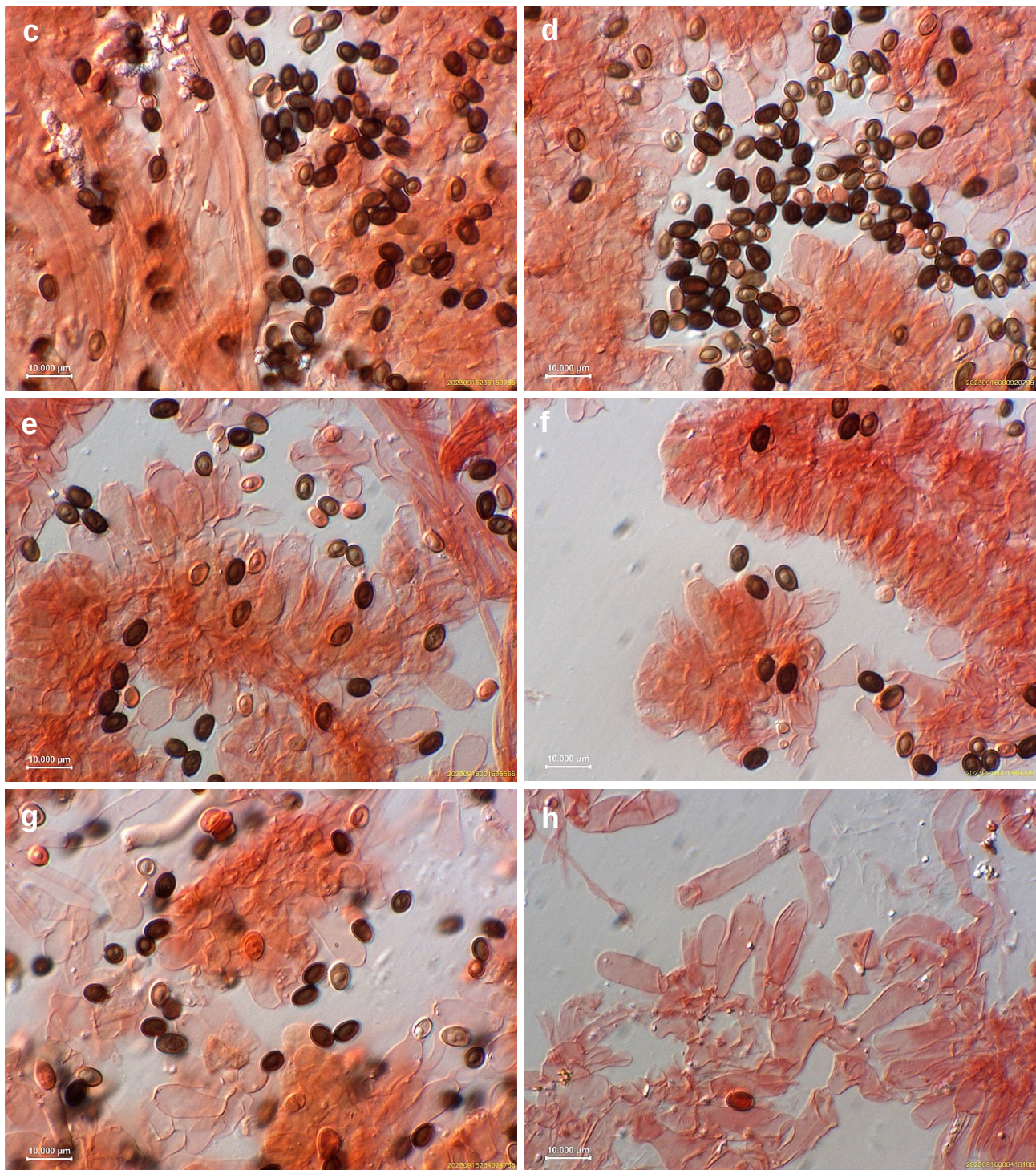
### Konklúzió

Véleményünk szerint a rendkívül variábilis, kozmopolita *Agaricus subrufescens* sensu lato taxonómiai helyzete még messze nem tisztázott teljeskörűen. Ezért szükségesnek tartanánk a faj földrajzi elterjedésének és diverzitásának további feltérképezését, újabb minták begyűjtését, valamint annak a kérdésnek az eldöntését, hogy a világ különböző részein már azonosított taxonok valóban egy fajhoz tartoznak-e. Ennek tisztázására indokolt lenne fajspecifikus markerek (ITS és *TEF1-a*) alkalmazásával először az *Agaricus subrufescens* taxon molekuláris alapú újratipizálása, valamint a komplexbe tartozó kriptikus fajok 2 lókuszos molekuláris filogenetikai analízise, szükség esetén revíziója.



**Figure 1 / 1. ábra.** A–C: Basidioma of *Agaricus subrufescens*. / Az *Agaricus subrufescens* termőteste. D–E: Photo of the habitat of *Agaricus subrufescens*. / Az *Agaricus subrufescens* élőhelyének a fotója.  
 Photographs / Fotók: A-C by Éva Vass; D, E by Dr. György Bence Halász





**Figure 2./Ábra 2.** Microscopical features of *Agaricus subrufescens*. / Az *Agaricus subrufescens* mikroszkopikus jellemzői.

**a-c:** Basidiospores. / Bazidiospórák. **d-f:** Basidia and basidiospores. / Bazídiumok és bazidiospórák. **g-h:** Cheilocystidia and basidiospores. / Keilocsisztida és bazidiospórák. Photographs / Fotók: György Vrba.  
Scale bars: **a-h** = 10 µm.

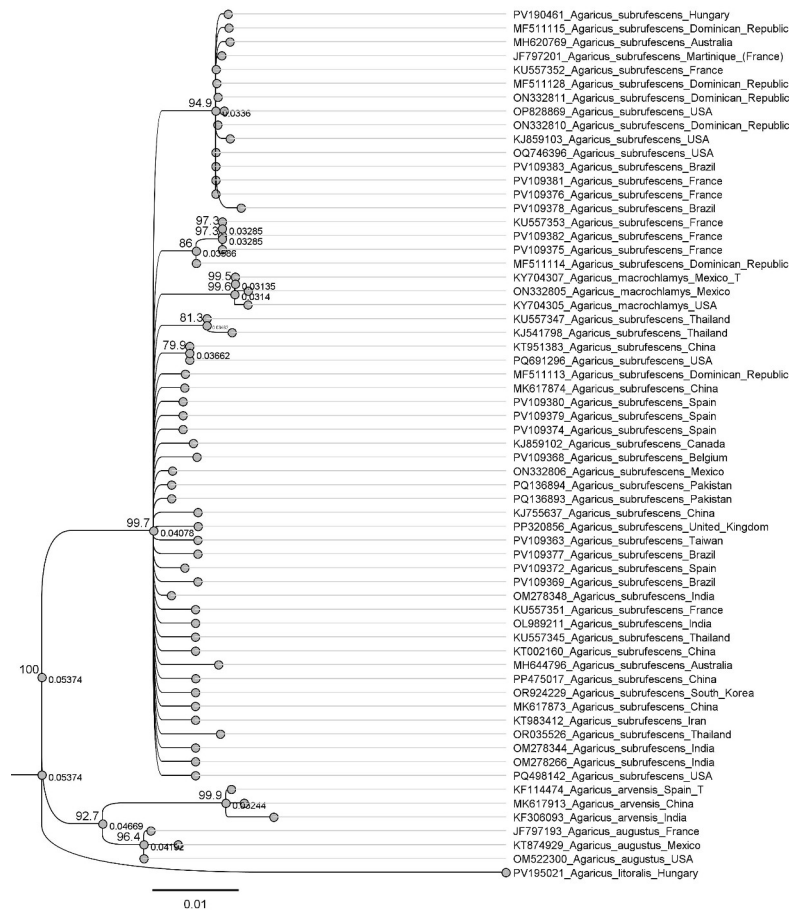
**Table 1** The nrDNA ITS sequences of *Agaricus* species used in the phylogenetic analyses. The sequence originated from Hungary is marked in boldface.

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

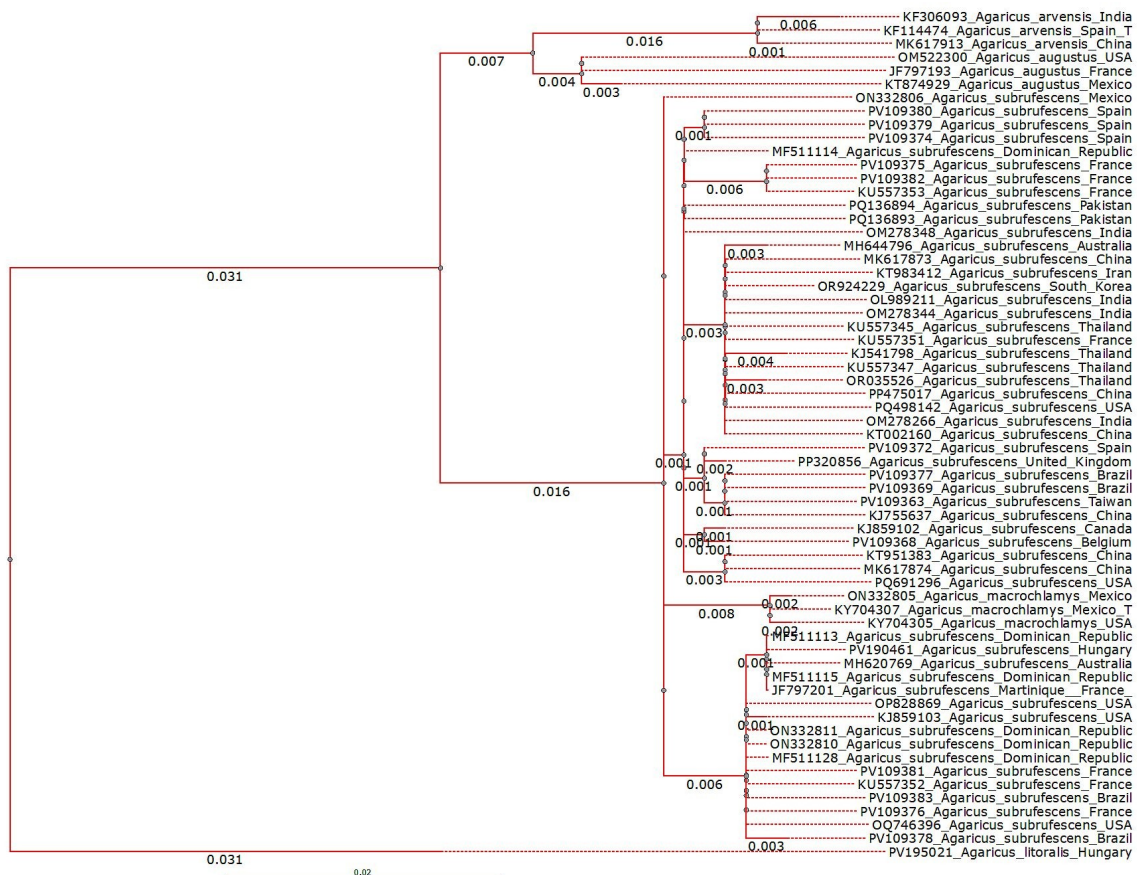
No.	Species name / Fajnév	Country / Ország	ITS (Sequences ID)
1.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Mexico	ON332806
2.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Dominican Republic	MF511113
3.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Brazil	PV109378
4.	<i>Agaricus subrufescens</i>	France	KU557352
5.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Dominican Republic	MF511115
6.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Australia	MH620769

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

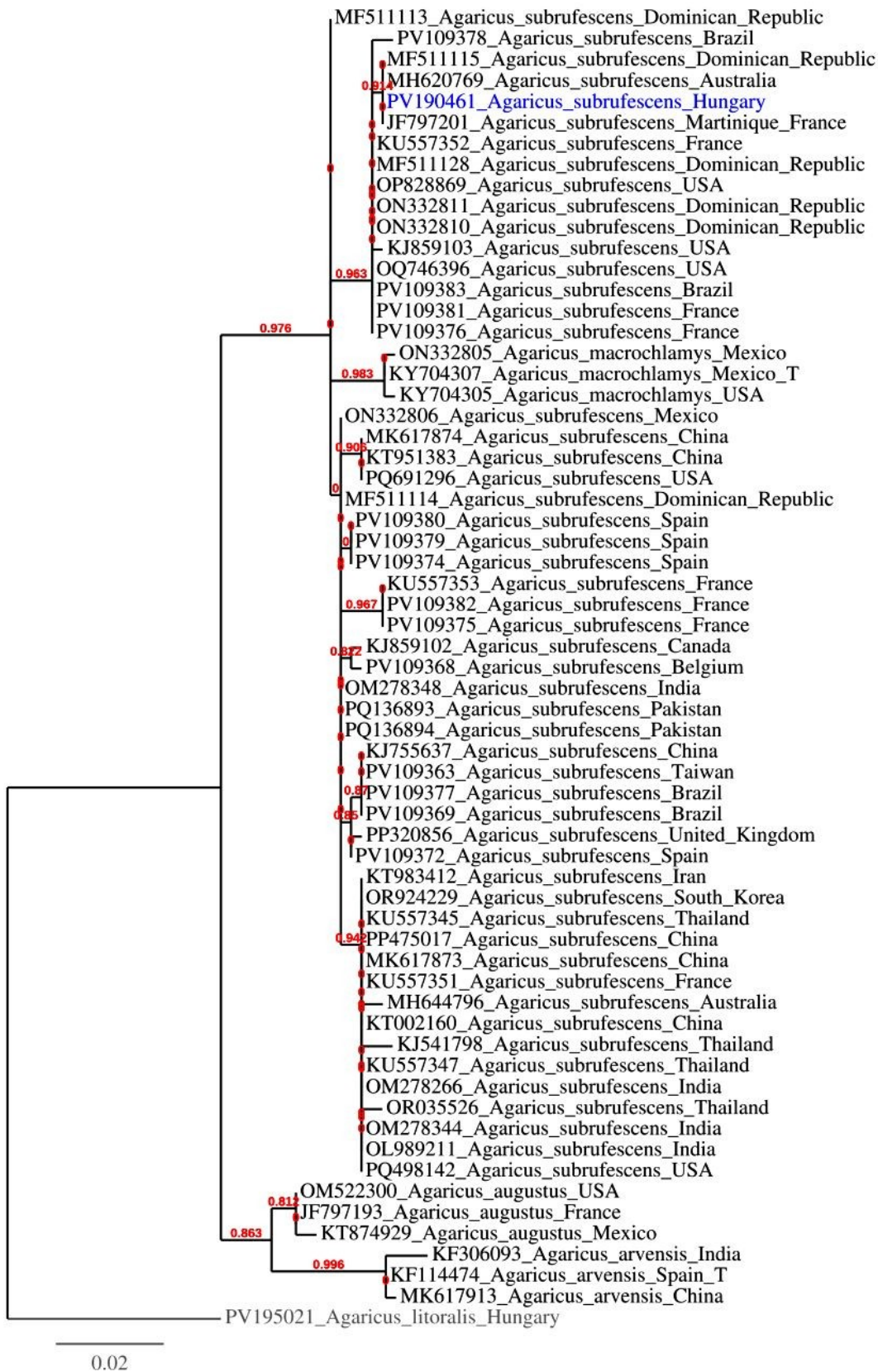
No.	Species name / Fajnév	Country / Ország	ITS (Sequences ID)
7.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Hungary	PV190461
8.	<i>Agaricus subrufescens</i>	France (Martinique)	JF797201
9.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Dominican Republic	MF511128
10.	<i>Agaricus subrufescens</i>	USA	OP828869
11.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Dominican Republic	ON332811
12.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Dominican Republic	ON332810
13.	<i>Agaricus subrufescens</i>	USA	KJ859103
14.	<i>Agaricus subrufescens</i>	USA	OQ746396
15.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Brazil	PV109383
16.	<i>Agaricus subrufescens</i>	France	PV109381
17.	<i>Agaricus subrufescens</i>	France	PV109376
18.	<i>Agaricus subrufescens</i>	China	MK617874
19.	<i>Agaricus subrufescens</i>	China	KT951383
20.	<i>Agaricus subrufescens</i>	USA	PQ691296
21.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Dominican Republic	MF511114
22.	<i>Agaricus subrufescens</i>	France	KU557353
23.	<i>Agaricus subrufescens</i>	France	PV109382
24.	<i>Agaricus subrufescens</i>	France	PV109375
25.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Spain	PV109380
26.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Spain	PV109379
27.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Spain	PV109374
28.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Canada	KJ859102
29.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Belgium	PV109368
30.	<i>Agaricus subrufescens</i>	India	OM278348
31.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Pakistan	PQ136893
32.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Pakistan	PQ136894
33.	<i>Agaricus subrufescens</i>	China	KJ755637
34.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Taiwan	PV109363
35.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Brazil	PV109377
36.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Brazil	PV109369
37.	<i>Agaricus subrufescens</i>	United Kingdom	PP320856
38.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Spain	PV109372
39.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Iran	KT983412
40.	<i>Agaricus subrufescens</i>	India	OL989211
41.	<i>Agaricus subrufescens</i>	China	MK617873
42.	<i>Agaricus subrufescens</i>	China	PP475017
43.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Thailand	KU557345
44.	<i>Agaricus subrufescens</i>	France	KU557351
45.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Australia	MH644796
46.	<i>Agaricus subrufescens</i>	China	KT002160
47.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Thailand	OR035526
48.	<i>Agaricus subrufescens</i>	India	OM278344
49.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Thailand	KJ541798
50.	<i>Agaricus subrufescens</i>	Thailand	KU557347
51.	<i>Agaricus subrufescens</i>	India	OM278266
52.	<i>Agaricus subrufescens</i>	South Korea	OR924229
53.	<i>Agaricus subrufescens</i>	USA	PQ498142
54.	<i>Agaricus macrochlamys</i>	Mexico	ON332805
55.	<i>Agaricus macrochlamys</i>	Mexico T	KY704307
56.	<i>Agaricus macrochlamys</i>	USA	KY704305
57.	<i>Agaricus augustus</i>	USA	OM522300
58.	<i>Agaricus augustus</i>	France	JF797193
59.	<i>Agaricus augustus</i>	Mexico	KT874929
60.	<i>Agaricus arvensis</i>	India	KF306093
61.	<i>Agaricus arvensis</i>	Spain T	KF114474
62.	<i>Agaricus arvensis</i>	China	MK617913
63.	<i>Agaricus litoralis</i>	Hungary	PV195021



**Figure 3** Neighbor-joining phylogenetic tree of the genus *Agaricus* generated from ITS sequences (incl. *Agaricus macrochlamys*) using Genius Prime. Bootstrap values ( $\geq 76\%$ ) are reported above the branches. / **3. ábra.** Az *Agaricus* nemzetség ITS szekvenciáiból (beleértve *Agaricus macrochlamys*) generált neighbor-joining filogenetikai fa a Genius Prime program segítségével. A bootstrap értékeket ( $\geq 76\%$ ) az ágak felett közöljük.



**Figure 4** Maximum likelihood phylogenetic tree of the genus *Agaricus* generated from ITS sequences (incl. *Agaricus macrochlamys*) using raxmlGUI 2.0. / **4. ábra.** Az *Agaricus* nemzetség ITS szekvenciáiból (beleértve *Agaricus macrochlamys*) generált maximum likelihood filogenetikai fa a raxmlGUI 2.0 program segítségével.



**Figure 5** Maximum likelihood phylogenetic tree of the genus *Agaricus* generated from ITS sequences (incl. *Agaricus macrochlamys*) using PhyML / 5. ábra. Az *Agaricus* nemzetség ITS szekvenciáiból (beleértve *Agaricus macrochlamys*) generált maximum likelihood filogenetikai fa a PhyML segítségével.



**Table 2** Variable positions within the ITS sequence of 53 specimens of *A. subrufescens*. / **2. táblázat.** Változó pozíciók az 53 *A. subrufescens* példányának ITS szekvenciájában.

GenBank No.	Origin	Position																	
		41	119	127	135	150	151	159	205	251	274	282	339	471	476	499	565	595	655
PV190461	Hungary	T	A	A	A	G	A	C	T	A	G	A	A	A	T	T	G	A	T
MF511113	Dominican Republic	T	A	R	R	R	W	C	Y	R	G	A	A	A	T	Y	G	A	T
MF511115	Dominican Republic	T	A	A	A	G	A	C	T	A	G	A	A	A	T	T	G	A	T
JF797201	Martinique (France)	T	A	A	A	G	A	C	T	A	G	A	A	A	T	Y	G	A	T
KU557352	France	T	A	A	A	G	A	C	T	A	G	A	A	A	T	C	G	A	T
MF511128	Dominican Republic	T	A	A	A	G	A	C	T	A	G	A	A	A	T	C	G	A	T
MF511114	Dominican Republic	-	R	G	G	A	T	C	C	R	G	A	R	A	T	C	R	A	W
KU557353	France	-	G	G	G	A	T	C	C	A	G	A	G	A	T	C	A	A	A
KU557351	France	-	A	G	G	A	T	C	C	A	A	A	A	C	-	C	G	A	T
ON332811	Dominican Republic	T	A	A	A	G	A	C	T	A	G	A	A	A	T	C	G	A	T
ON332810	Dominican Republic	T	A	A	A	G	A	C	T	A	G	A	A	A	T	C	G	A	T
ON332806	Mexico	T	A	R	R	A	T	C	Y	A	G	A	A	A	T	C	G	A	T
KU557347	Thailand	-	A	G	G	A	T	C	C	A	A	A	A	C	-	C	G	A	T
KU557345	Thailand	-	A	G	G	A	T	C	C	A	A	A	A	C	-	C	G	A	T
KT983412	Iran	-	A	G	G	A	T	C	C	A	A	A	A	C	-	C	G	A	T
KJ541798	Thailand	-	A	G	G	A	T	C	C	A	A	A	A	C	-	C	G	A	T
KT002160	China	-	A	G	G	A	T	C	C	A	A	A	A	C	-	C	G	A	T
KJ755637	China	-	A	G	G	A	T	T	C	A	G	A	A	A	T	C	G	G	T
MH644796	Australia	T	G	G	G	A	T	C	C	A	A	A	A	C	-	C	G	A	T
MH620769	Australia	T	A	A	A	G	A	C	T	A	G	A	A	A	T	T	G	A	T
KJ859103	USA	T	A	A	A	G	A	C	T	A	G	A	A	A	T	C	G	A	T
KJ859102	Canada	-	A	G	G	A	T	C	C	A	G	A	A	A	T	C	G	A	T
OP828869	USA	T	A	A	A	G	A	C	T	A	G	A	A	A	T	C	G	A	T
OM278348	India	-	A	G	G	A	T	C	C	A	G	A	A	A	-	C	G	A	T
OM278344	India	-	A	G	G	A	T	C	C	A	A	A	A	C	-	C	G	A	T
OM278266	India	-	A	G	G	A	T	C	C	A	A	A	A	C	-	C	G	A	T
OL989211	India	-	A	G	G	A	T	C	C	A	A	A	A	C	-	C	G	A	T
MK617874	China	-	A	A	G	A	T	C	C	A	G	G	A	A	-	C	G	A	T
MK617873	China	-	A	G	G	A	T	C	C	A	A	A	A	C	-	C	G	A	T
PV109363	Taiwan	-	A	G	G	A	T	T	C	A	G	A	A	A	T	C	G	G	T
PQ691296	USA	-	A	A	G	A	T	C	C	A	G	G	A	A	-	C	G	A	T
PQ498142	USA	-	A	G	G	A	T	C	C	A	A	A	A	C	-	C	G	A	T
PQ136894	Pakistan	-	A	G	G	A	T	C	C	A	G	A	A	A	-	C	G	A	T
PQ136893	Pakistan	-	A	G	G	A	T	C	C	A	G	A	A	A	-	C	G	A	T
PP475017	China	-	A	G	G	A	T	C	C	A	A	A	A	C	-	C	G	A	T
PP320856	United_Kingdom	-	A	G	G	A	T	C	C	A	G	A	A	A	T	C	G	G	T
OR035526	Thailand	-	A	G	G	A	T	C	C	A	A	A	A	C	-	C	G	A	T
OR924229	South_Korea	-	A	G	G	A	T	C	C	A	A	A	A	C	-	C	G	A	T
OQ746396	USA	T	A	A	A	G	A	C	T	A	G	A	A	A	T	C	G	A	T
PV109383	Brazil	T	A	A	A	G	A	C	T	A	G	A	A	A	T	C	G	A	T
PV109382	France	-	G	G	G	A	T	C	C	A	G	A	G	A	T	C	A	A	A
PV109381	France	T	A	A	A	G	A	C	T	A	G	A	A	A	T	C	G	A	T
PV109380	Spain	-	A	G	G	A	T	C	C	G	G	A	A	A	T	C	G	A	T
PV109379	Spain	-	A	G	G	A	T	C	C	G	G	A	A	A	T	C	G	A	T
PV109378	Brazil	T	A	A	A	G	A	C	T	A	G	A	A	A	T	C	G	A	T
PV109377	Brazil	-	A	G	G	A	T	T	C	A	G	A	A	A	T	C	G	G	T
PV109376	France	T	A	A	A	G	A	C	T	A	G	A	A	A	T	C	G	A	T
PV109375	France	-	G	G	G	A	T	C	C	A	G	A	G	A	T	C	A	A	A
PV109374	Spain	-	A	G	G	A	T	C	C	G	G	A	A	A	T	C	G	A	T
PV109372	Spain	-	A	G	G	A	T	C	C	A	G	A	A	A	T	C	G	G	T
PV109369	Brazil	-	A	G	G	A	T	T	C	A	G	A	A	A	T	C	G	G	T
PV109368	Belgium	-	A	G	G	A	T	C	C	A	G	A	A	A	T	C	G	A	T
KT951383	China	-	A	A	G	A	T	C	C	A	G	G	A	A	-	C	G	A	T



**Figure 6** View of the alignment of 53 *Agaricus subrufescens* specimens (Geneious Prime, Muscle alignment, consensus threshold: 95% (bases matching at least 95% of the sequences, highlighting all discrepancies)). / **6. ábra.** Az 53 *Agaricus subrufescens* példány illesztésének nézete (Geneious Prime, Muscle illesztés, konszenzus küszöbérték: 95% (a szekvenciák legalább 95%-nak megfelelő bázisok, kiemelve minden eltérést)).

### Acknowledgements / Köszönetnyilvánítás

We would like to express our special thanks to Dr. György Bence Halász and Éva Vass for providing us with the mushroom fruiting body, habitat data and photos. / Ezúton is külön köszönetünket fejezzük ki dr. Halász Bence Györgynek és Vass Évának a rendelkezésünkre bocsátott gombatermőtestért, az élőhely adataiért 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 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### References / Irodalomjegyzék

- D.C. Zied, J.E. Pardo, R.S. Tomaz, C.T. Miasaki & A. Pardo-Giménez (2017) Mycochemical Characterization of *Agaricus subrufescens* considering Their Morphological and Physiological Stage of Maturity on the Traceability Process – BioMed Research International, Article ID 2713742, <https://doi.org/10.1155/2017/2713742>
- Falconer W. 1894a. A talk about mushrooms – Trans. Massachusetts Hort. Soc. 1984(I):98–123.
- Anonymous. 1904. *Agaricus subrufescens*, Peck. Boston Mycol Club Bull 21.
- Anonymous. 1909. Mushrooms. Guide to Mushroom Culture. St. Louis, Missouri: Challenge Mushroom and Pure Culture Spawn Co. 32 p. 1 plates.
- Kauffman C.H. 1918. The *Agaricaceae* of Michigan – Michigan Geological and Biological Survey, Lansing, Michigan. Vol. 1, 918 p.; Vol. 2, pl. I-CLXII.
- Kerrigan R.W. (2005) *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms – Mycologia 100: 876–892. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1>.
- Nauta MM. 1999. Notulae ad floram agaricinam Neerlandicam-XXXIII. Notes on *Agaricus* section *Spissicaules* Persoonia 17:221–233.
- Hausknecht A. 2002. *Agaricus rufotegulis* Nauta in Portugal – Rev Catal Micol 24:225–227.
- Thongklang N., Chen J., Bandara A.R., Hyde K.D., Raspé O., Parra L.A. & Callac P. (2016) Studies on *Agaricus subtilipes*, a new cultivatable species from Thailand, incidentally reveal the presence of *Agaricus subrufescens* in Africa – Mycoscience 57 (4): 239–250. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2016.02.003>
- Parra L.A., Angelini C., Ortiz-Santana B., Mata G., Billette C., Rojo C., Chen J., & Callac P. The genus *Agaricus* in the Caribbean. Nine new taxa mostly based on collections from the Dominican Republic – Phytotaxa 345 (3): 219–271, <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.345.3.2>
- Chen J., Moirand M., Xu J., Wang S., Foulongne-Oriol M., Zhao R., Hyde K.D. & Callac P. (2016a) Genetic Analyses of the Internal Transcribed Spacer Sequences Suggest Introgression and Duplication in the Medicinal Mushroom *Agaricus subrufescens* – PLoS ONE 11 (5): e0156250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156250>
- Mahdizadeh V., Safaie N., Goltapeh E.M., Asef M.R. & Callac P. (2017) Medicinal Mushroom *Agaricus subrufescens* shares genetic markers with collections from China and Thailand – Botany 95: 579–585. <https://doi.org/10.1139/cjb-2016-0198>
- Medel-Ortiz R., Garibay-Orijel R., Argüelles-Moyao A., Mata G., Kerrigan R.W., Bessette A.E., Geml J., Angelini C., Parra L.A. and Chen J. (2022) *Agaricus macrochlamys*, a New Species from the (Sub)tropical Cloud Forests of North America and the Caribbean, and *Agaricus fiardii*, a New Synonym of *Agaricus subrufescens* – J. Fungi, 8, 664., <https://doi.org/10.3390/jof8070664>