

The first Hungarian documentation of the pink variant of *Entoloma pseudoturci*, from the *Cyanula* (*Entolomataceae*) subgenus

György Vrba^{1*}, Dorottya Vrba¹

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

*Corresponding author: info@mikochips.com

Introduction

Our present publication is about the determination of the pink *Entoloma* mushroom fruiting bodies (Figure 1) at species level which were collected on the occasion of a mushroom inspector fieldwork day, held on the 30th of September, 2023.

Description of the fruiting bodies

Cap: collybioid, 15-35 mm, flat-convex, slightly grooved, bright pink when young, faded when older, finely fibrous, tomentose, indented in the middle, deeply umbilicate, in the depressions with small darker scales, radially fissured, split cap skin, the brim of the cap is also split (probably due to the weather).

Lamellae: moderately rare and wide, with monochromatic edges, notched, growing to the stem, cream-colored when young, pinkish over time, then flesh-pink.

Stipe: thin, hollow, even, fragile, whitish, but turns yellowish over time.

Context: thin, fragile.

Odour and flavour is not recorded.

From a taxonomic point of view, the presence or the absence (mainly in the case of the cap and the stipe) of colours (blue/purple, brownish, pinkish) was previously of great importance in the case of species and higher taxonomic classifications within the *Entoloma* genus /Romagnesi & Gilles (1979), Largent (1977, 1994) és Noordeloos (1992, 2004)/.

According to the latest molecular researches, the presence or absence of blue or purple shades is a characteristic of many well-supported clades, but at the same time, within species, quite striking variety can be observed.

It has been confirmed that the specimens with a pinkish tone (mainly in the cap) do not represent an independent taxonomic category, they are only the pink variant of a species, which can also occur, e.g. in the *Nolanea*, *Claudopus*, and *Cyanula* subgenus^[1].

Subsequent documentation of the mushroom's habitat (Figure 2)

The fruiting bodies were collected in the southern part of Vértess, above Pusztavám, in a pine forest with sandy soil (*Pinus nigra* and *Pinus sylvestris*). It is a grassy area next to a forest road /47,398962° N, 18,259747° E/ which overtook the place of an approximately 30x100-meter section clear-cut forest. In the habitat, woody new growth scattered around the fruiting bodies can be found (*Tilia* sp., *Populus* sp., *Quercus cerris*, *Crataegus* sp., *Prunus* sp.).

Materials and methods

We first studied the fruiting body macroscopically, then we analyzed the micromorphological features (Figure 3) 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 (nrDNS ITS1F-ITS4).

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 product was electrophoresed on 2% agarose gel, stained with nucleic acid stain and then visualized by UV transilluminator.

The sequencing of the finished PCR product was performed by a third party, after cleaning, with the Sanger dideoxy method.

We checked, cleaned and edited the chromatogram with the ChromasPro program. As a result, we noticed that it isolated nucleotide polymorphisms at six base positions of the ITS region, and then we manually corrected these with the IUPAC code for the case of nucleotide ambiguity.

The sequence obtained this way was compared with the available sequences from GenBank, UNITE and BOLDSYSTEMS using BLAST.

After that, we supplemented our ITS data with additional high-quality sequences available from GenBank and UNITE (Table 1), then we created a phylogenetic tree with the RaxmlGUI program and with the help of the phylogeny.fr portal /maximum likelihood analysis (Maximum Likelihood) using PhyML/.

In the first case, the maximum likelihood (ML) tree was created with 1000 bootstrap replications, and then the tree was visualized with the UGENE application (Figure 4).

In the second case, the reliability of the internal branch was examined with the approximate likelihood-ratio test /aLRT (SH-Like)/ (Figure 5).

The *Entoloma incarnatofuscescens* taxon was used as an outgroup in both cases. Sequence alignments were performed by using SeaView.

Results

The result of the BLAST search, along with 100% query coverage, taking the strong nucleotide polymorphism into account showed a

relatively high percentage of similarity with the *Entoloma* sp. and *Entoloma odoratum* sequences available from UNITE and GenBank (Per. Ident. 97.49% (350/359, Gaps 3/359) E-value 7e-173, MZ6116333.1; Per. Ident. 93.33% (336/360, Gaps 7/360), E-value 3e-152, MZ869017.1).

Notes

Based on the phylogenetic studies (ITS/LSU), the morphologically very similar *E. odoratum* and *E. depressum* species with no significant genetic differences were combined into the *Entoloma pseudoturci* clade^[1].

During the ITS sequence analyses, we included 17 *Entoloma* ITS sequences in our phylogenetic analysis.

Our analysis identified four strongly supported species-level clades (*Entoloma pulchripes*, *E. chalybaeum*, *E. pseudoturci* /*E. odoratum*/, *E. turci*).

The alignment of the sequences, the creation and testing of 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 the pink variant of the *Entoloma pseudoturci* species.

At the same time as our present publication, we would like to mention that, as far as we know, this is the first documentation of the pink variant of *Entoloma pseudoturci* from the *Cyanula* subgenus.

Az *Entoloma pseudoturci* rózsaszín változatának első magyarországi dokumentálása, a *Cyanula* (*Entolomataceae*) alnemzettségéből

Vrba György^{1*}, Vrba Dorottya¹

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

*A szerző levelezési címe: info@mikochips.com

Bevezetés

Jelen publikációnk egy 2023. szeptember 30-án megtartott gombaszakellenőri terepgyakorlat alkalmával begyűjtésre került rózsaszínű *Entoloma* gomba termőtestek (Ábra 1.) fajszerű meghatározásáról szól.

A termőtestek leírása

Kalap: collybioid, 15-35 mm, laposan domború, enyhén barázdált, fiatalon élénk rózsaszín, idősebben kifakult, finoman szárazott, tomentosus, közepén bemélyedő, mélyen köldökös (umbilicate), a mélyedésekben sötétebb színű, apró pikkelykékkel, sugárirányban felrepedezett, felszakadozott kalapbőr, a kalap széle behasadozott (vélelmzetten időjárástól függő).

Lemezek: közepesen ritkák, mérsékelten szélesek, élük egyszínű, rovátkolt, tönkhöz nőttek, fiatalon krémszínű, idővel rózsaszínes, majd húsrózsás árnyalatúak.

Tönk: vékony, üreges, sima, törékeny, fehéres színű, idővel sárgás árnyalatúvá válik.

Hús: vékony, törékeny.

Szag és íz nem rögzített.

Taxonómiai szempontból az *Entoloma* nemzetségen belül korábban kiemelt jelentőséget tulajdonítottak a színek (kék/lila, barnás, rózsaszínes) meglétének (főként kalap és a tönk esetében), avagy hiányának a fajok és magasabb taxonómiai besorolások esetében /Romagnesi & Gilles (1979), Largent (1977, 1994) és Noordeloos (1992, 2004)/.

A legújabb molekuláris kutatások szerint a kék vagy lilás árnyalatok jelenléte, avagy hiánya jellemző számos jól alátámasztott kládra, de fajon belül, ugyanakkor gyakran meglehetősen feltűnő változatosság figyelhető meg.

A rózsaszínes árnyalatú példányokról (főként kalapban) beigazolódott, hogy nem képviselnek önálló taxonómia kategóriát, csupán valamely fajnak a rózsaszín formája, ami egyaránt előfordulhat pl. a *Nolanea*, a *Claudopus*, valamint a *Cyanula* alnemzettségben^[1].

A gomba élőhelyének utólagos dokumentálása (Ábra 2.)

A Vértes déli részén, Pusztavám feletti homokos talajú fenyvesben (*Pinus nigra* és *Pinus sylvestris*), egy kb. 30x100 méteres tarvágott erdőréz helyét átvevő, erdei út melletti füves terület /47,398962° É, 18,259747° K/, rajta elszórtan, a termőtestek körül szintúgy megjelenő fásszárú újulattal (*Tilia* sp., *Populus* sp., *Quercus cerris*, *Crataegus* sp., *Prunus* sp.).

Anyagok és módszerek

A termőtestet először makroszkopikusan tanulmányoztuk, majd fénymikroszkóp /Nikon Alphaphot + Hoffman Modulation Contrast, 100x (olajimmerzió)/ alatt analízáltuk a gomba mikromorfológiai jegyeit (Ábra 3.).

A gomba pontos, fajszerű meghatározásához a továbbiakban molekuláris módszereket alkalmaztunk (nrDNS ITS1F-ITS4).

Molekuláris módszerek

A szárított gomba lemezéből vett mintából Direct PCR eljárással (Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Master Mix) nyert DNS-t gombaszpecifikus primerpárral (ITS1F – CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A; ITS4 – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) polimeráz láncreakcióban (PCR) amplifikáltuk.

A PCR terméket 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 kromatogram ellenőrzését, tisztítását és szerkesztését a ChromasPro programmal végeztük, amelynek eredményeként megkapott ITS régió hat bázishelyén izolált nukleotid polimorfizmust, a nukleotid kétértelműségének esetére vonatkozó, IUPAC kóddal manuálisan korrigáltuk.

Az így megkapott szekvenciát a GenBank, a UNITE és a BOLDSYSTEMS rendelkezésre álló szekvenciáival – BLAST segítségével – hasonlítottuk össze.

Ezt követően az ITS-adatunkat, kiegészítve a GenBank és a UNITE kínálatában elérhető jó minőségű további szekvenciákkal (Táblázat 1.) törzsfát készítettünk a RaxmlGUI programmal, valamint a phylogeny.fr portál segítségével /maximális valószínűségi analízis (Maximum Likelihood) PhyML használatával/.

Az első esetben a maximális valószínűségi (ML) törzsfát 1000 bootstrapreplikációval készítettük, majd a törzsfát a UGENE alkalmazással vizualizáltuk (Ábra 4.).

A második esetben a belső ág megbízhatósága approximate likelihood-ratio teszttel /aLRT (SH-Like)/ vizsgált (Ábra 5.).

Külső csoportként mindkét esetben az *Entoloma incarnatofuscescens* taxont használtuk. A szekvenciák illesztését a SeaView programmal végeztük.

Eredmények

A BLAST keresés eredménye 100%-os lekérdezési lefedettség mellett, figyelembe véve az erős nukleotid polimorfizmust, relatív magas százalékos hasonlóságot mutatott a UNITE, valamint a GenBank-ból elérhető *Entoloma sp.*, és *Entoloma odoratum* szekvenciákkal (Per. Ident. 97.49% (350/359, Gaps 3/359) E-value 7e-173, MZ6116333.1; Per. Ident. 93.33% (336/360, Gaps 7/360), E-value 3e-152, MZ869017.1).

Jegyzet

A filogenetikai vizsgálatok (ITS/LSU) alapján az *Entoloma pseudoturci* kládba egyesítették a morfológiailag nagyon hasonló, ugyanakkor jelentős genetikai különbségek nélküli *E. odoratum* és az *E. depressum* fajokat^[1].

Az ITS szekvencia elemzések során 17 *Entoloma* ITS szekvenciát vontunk be a filogenetikai analízisünkbe.

Az elemzésünk négy erősen támogatott fajszerű kládot azonosított (*Entoloma pulchripes*, *E. chalybaeum*, *E. pseudoturci* /*E. odoratum*/, *E. turci*).

A szekvenciák illesztése, valamint a filogenetikai fák elkészítése és tesztelése szintén megerősítette a BLAST keresés eredményét, konszenzusban a mikro- és makromorfológiai jegyekkel, amelyek alapján az anyagunkat az *Entoloma pseudoturci* faj rózsaszín formájának tekintjük.

Jelen cikkünkkel egyidejűleg meg kívánjuk említeni, hogy tudomásunk szerint, ez az első riportolása az *Entoloma pseudoturci* rózsaszín formájának a *Cyanula* alnemzetségből.

Figure 1. / Ábra 1. Basidiomes of the pink variant of *Entoloma pseudoturci*. / Az *Entoloma pseudoturci* rózsaszín változatának a termőtestei.

A-D: Basidiomes (V80_SVRG-28)/Termőtestek (V80_SVRG-28).

Photographs/Fotók: **A-D** (ex situ) by György Vrba



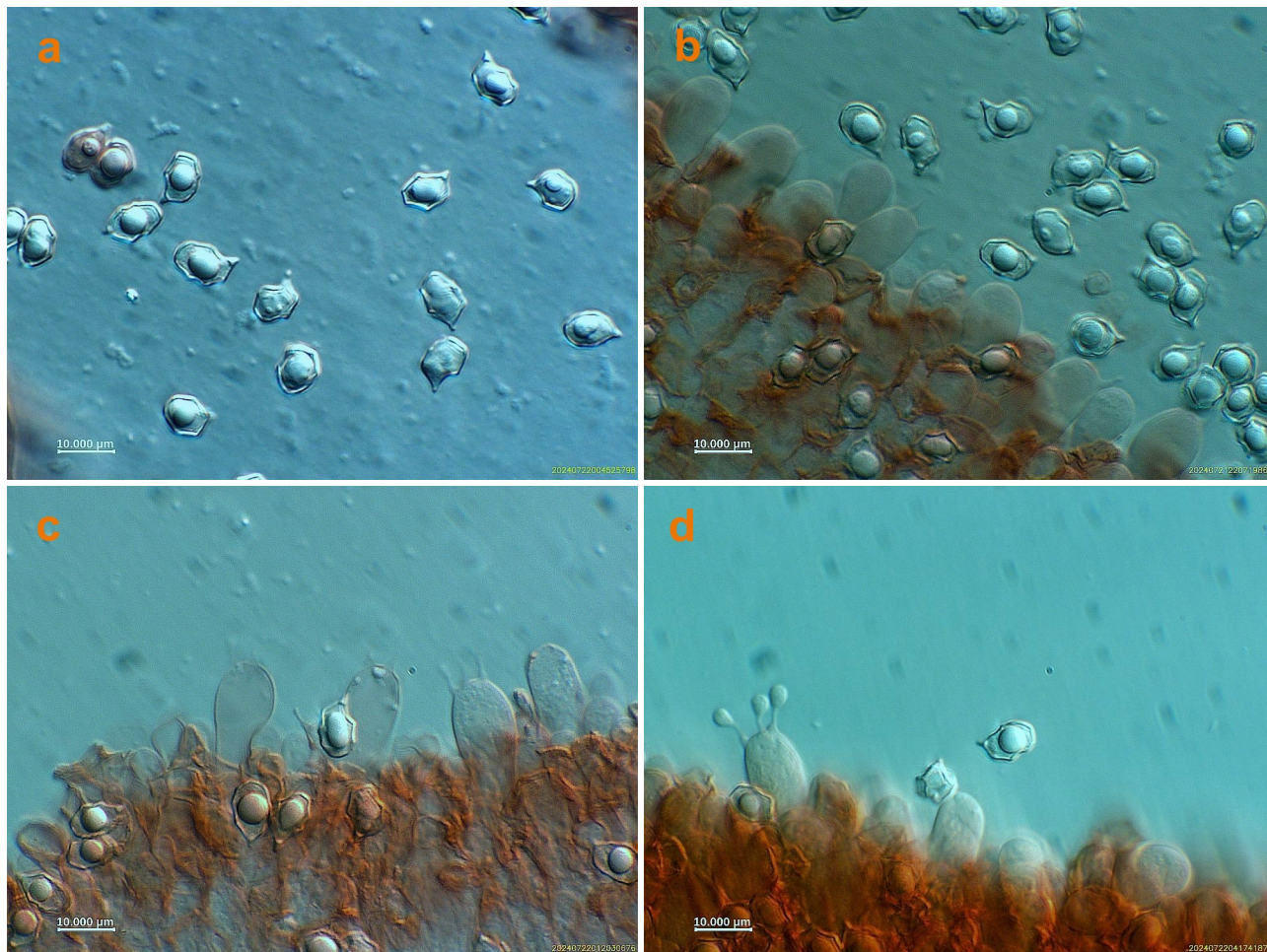
Figure 2. Photos of the habitat. / **Ábra 2.** Fotók az élőhelyről.
 Photographs/Fotók: **a, b** by György Vrba



Figure 3./Ábra 3. Microscopical features of the pink variant of *Entoloma pseudoturci* (V80_SVRG-28). / Az *Entoloma pseudoturci* rózsaszín változatának mikroszkopikus jellemzői (V80_SVRG-28).

a: Basidiospores./Bazidiospórák. **b-d:** Basidia and basidiospores./Bazídiumok és bazidiospórák. **d:** Cheilocystidia and basidiospore./Keilocsztida és bazidiospóra. **f:** Pileipellis elements./Kalapbőr elemei.
a-f in ammoniacal Congo red./**a-f** ammóniás Kongó vörösből.

Photographs/Fotók: **a-f** by György Vrba



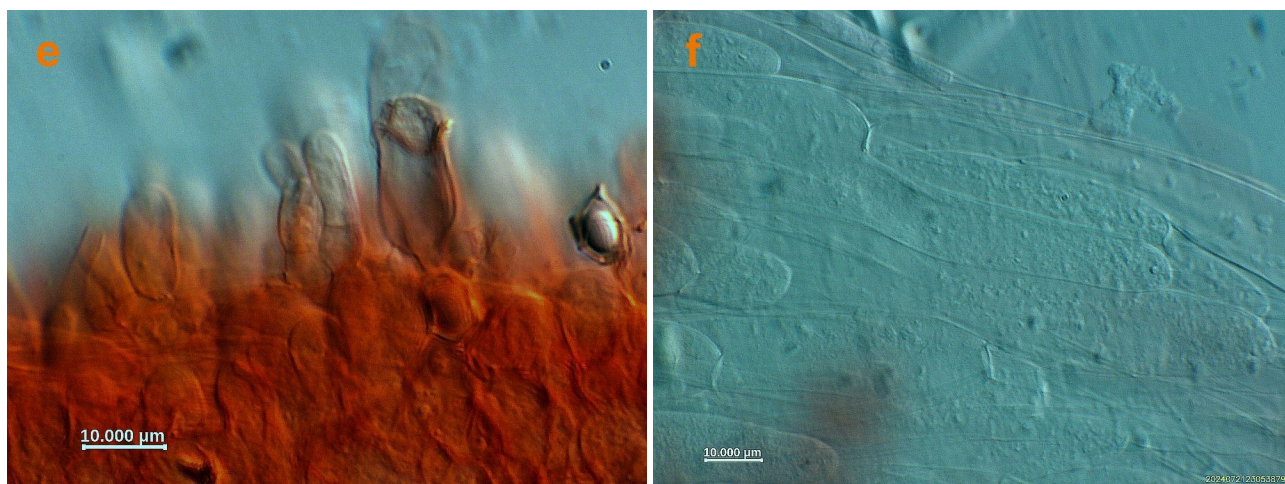


Table 1. The nrDNA ITS sequences of *Entoloma* species used in the phylogenetic analysis. Hungarian data is in bold. /
Táblázat 1. A filogenetikai analízisben használt *Entoloma* fajok nrDNS ITS szekvenciái. A hazai adatok félkövér betűvel láthatóak.

No.	Species name / Faj	Country / Ország	ITS (Sequences ID)
1.	<i>Entoloma pulchripes</i>	USA	PP156347.1
2.	<i>Entoloma pulchripes</i>	USA	OR824639.1
3.	<i>Entoloma pulchripes</i>	China	OR236869.1
4.	<i>Entoloma chalybaeum</i>	United_Kingdom	MW727235.1
5.	<i>Entoloma chalybaeum</i>	Russia	KC898445.1
6.	<i>Entoloma chalybaeum</i>	Italy	JF907995.1
7.	<i>Entoloma chalybaeum</i>	Hungary	V99_SVRG-47
8.	<i>Entoloma mediterraneense</i>	Croatia	MZ611634.1
9.	<i>Entoloma odoratum</i>	Estonia	UDB0355729
10.	<i>Entoloma odoratum</i>	Estonia	UDB0523482
11.	<i>Entoloma odoratum</i>	Denmark	MZ869017.1
12.	<i>Entoloma sp.</i>	Croatia	MZ611633.1
13.	<i>Entoloma pseudoturci pink variant</i>	Hungary	V80_SVRG-28
14.	<i>Entoloma turci</i>	Kyrgyzstan	MK351757.1
15.	<i>Entoloma turci</i>	Germany	MZ611693.1
16.	<i>Entoloma turci</i>	France	OR419871.1
17.	<i>Entoloma incarnatofuscescens</i>	Hungary	V81_SVRG-29

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

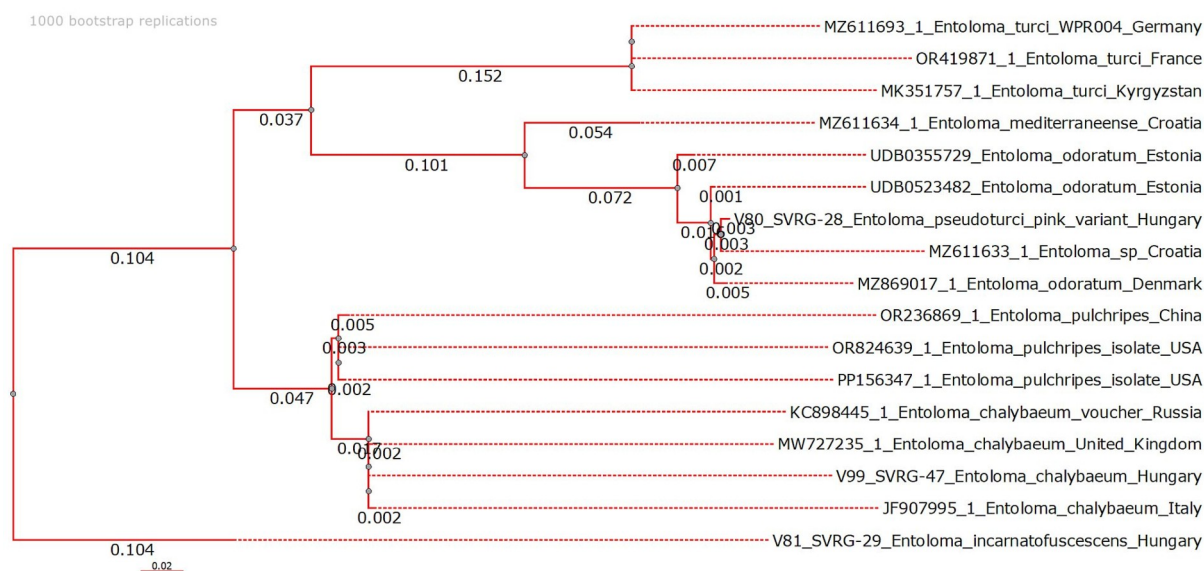
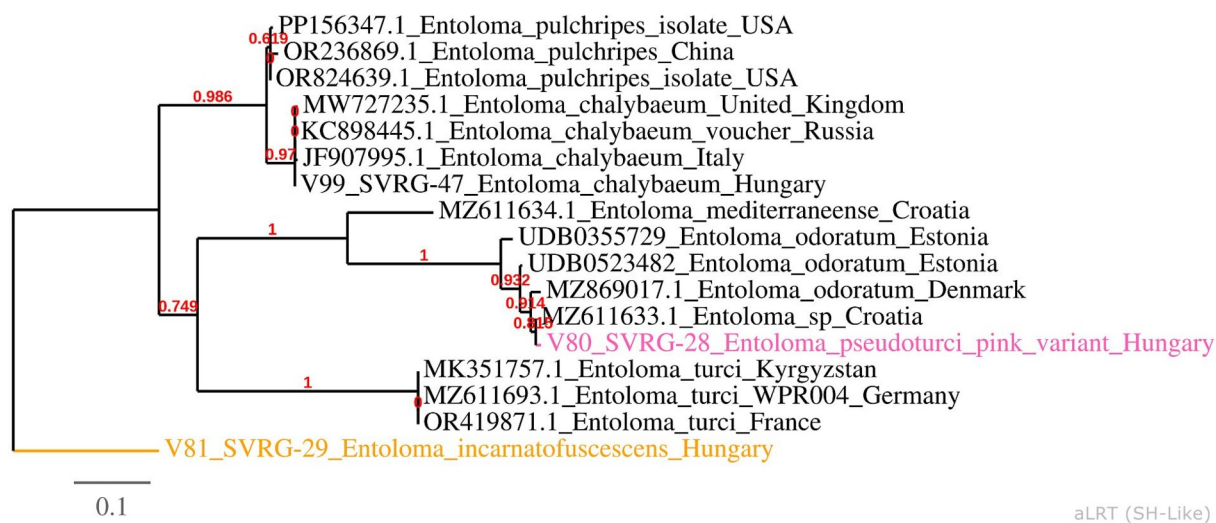


Figure 3. (Maximum likelihood analysis, PhyML, aLRT (SH-Like) test) / **Ábra 3.** (Maximum likelihood analízis, PhyML, aLRT (SH-Like) teszt)



Acknowledgements / Köszönetnyilvánítás

We would like to express our special thanks to Anna Tamara Németh for the mushroom bodies and the data of the habitat. / Ezúton is külön köszönetünket fejezzük ki Németh Tamara Annának a rendelkezésünkre bocsátott gombatermőtestekért és az élőhely adataiért.

References / Referencia

[1] Machiel E Noordeloos, Olga Morozova, Bálint Dima, Kai Reschke, Gerrit Jansen, Tor Erik Brandrud, John Bjarne Jordal, Egil Bendiksen & Jordi Vila; Flora agaricina neerlandica, vol. 1, supplement, subgenera *Cyanula*, *Leptonia*, *Nolanea*, *Trichopilus*, and the *Rhombisporum* clade. – Candusso Editrice (2022), ISBN 978-88-943710-3-1