

Magyarországi *Xerocomellus* (Boletaceae) fajok hazai dokumentálása molekuláris módszerekkel

Vrba György^{1*}, Vrba Dorottya², Dima Bálint³

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

²Erdei Gombász Tanoda Bt., H-2800 Tatabánya, Moravcsik u. 4., Bárdos László Gimnázium

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

*A szerző levelezési címe: gomba@napora.hu

Bevezetés

A *Xerocomellus* nemzetség fajainak diverzitása a mai napig eléggé tisztázatlan. Ez részben a fajok belüli nagyfokú morfológiai változatosságnak, azonfelül bizonyos esetekben a megbízható fajkonceptió hiányának köszönhető.

Mindezeknek részbeni tisztázása végett a *Xerocomellus* nemzetség eklektikus megjelenésű magyarországi fajait vizsgáltuk és azonosítottuk – döntően a 2018-2022. évben – az ITS szekvenciák alapján.

Anyagok és módszerek

A terepi gombászatok alkalmával, Magyarország különféle régióiból (főként a Vértes és a Gerecse területeiről), friss gombapéldányokat gyűjtöttünk a *Xerocomellus* fajok közül – kiemelten fókuszálva az a *X. porosporus* taxonra – a fungáriumba. A makromorfológiai jegyeket, azonfelül az élőhelyeket elemezve határoztuk meg a fajokat, majd ezeket az eredményeket molekuláris módszerekkel pontosítottuk. Kimondottan előnyben részesítettük a nem tipikus kutikulával (szín és morfológia) rendelkező példányokat.

Molekuláris módszerek

A szárított gombák kalapszövetéből vett mintákból Direct PCR eljárással (Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Master Mix), valamint egy esetben DNS kivonást követően (NucleoSpin Plant II, Mini kit for DNA from plants; Thermo Scientific DreamTaq Green 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 termékeket nukleinsav festéssel agaróz gélen elektroforetizáltuk, majd UV fénnel vizualizáltuk.

A kész PCR termékek szekvenálása kétféle módszerrel történt.

- 1.) Harmadik fél által, egyszeres tisztítást követően, Sanger-féle eljárással.
- 2.) Rendelkezésünkre álló harmadik generációs szekvenálási technológiával: Oxford Nanopore Technologies – Flow Cell (R10 Version), chemistry: Native Barcoding Kit 24, multiplexing/.

A Sanger-féle szekvenálás eredményeit a FinchTV és a SnapGene Viewer programmal tisztítottuk.

Az Oxford Nanopore Technologies eljárással nyert szekvenciaadatok elemzését és a konszenzus fájl elkészítését az Amplicon_sorter alkalmazással végeztük.

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

Ezt követően az ITS-adatainkat, kiegészítve a GenBank és a UNITE kínálatában elérhető jó minőségű további szekvenciákkal (Táblázat 1.) törzsfákat készítettünk a phylogeny.fr portál segítségével /maximális valószínűségi analízis (Maximum Likelihood) PhyML használatával, a belső ág megbízhatósága aLRT teszttel (SH-Like) értékelve (Ábra 1.)/, valamint a RaxmlGUI programmal /a maximális valószínűségi törzsfá ebben az esetben 1000 bootstrap-replikációval készült, a törzsfát az UGENE alkalmazással vizualizáltuk (Ábra 2.)/. Külső csoportként mindkét esetben a Hortiboletus rubellus-t használtuk. A szekvenciák illesztését a SeaView és a Geneious Prime programmal végeztük (Ábra 3.)

Eredmények

A begyűjtött *Xerocomellus* fajok előzetes makromorfológiai határozása többnyire pontosnak bizonyult és ezt a molekuláris módszerek is megerősítették.

Azokban az esetekben, amikor nem volt tipikus a tinóruk megjelenése (főként a kalapbőrszín, felrepedezettség, vagy annak hiánya, a metszetben a hússzín és annak elszíneződése) kétséget kizáróan hasznosnak bizonyult az alaposabb vizsgálat.

Mindenképpen megemlítenő, hogy a munkánk során kuriózumként dokumentálhattuk a *Xerocomellus sarnarii* első hazai példányát a Gerecséből (2019. június 01.).

További – többgényes – molekuláris vizsgálatok, valamint újabb példányok különféle élőhelyekről történő begyűjtése szintén kíváncsú lenne a *Xerocomellus porosporus* taxon esetében, tisztázandó a variabilitások mértékét, szükség esetén a fajhatár újradefiniálásának megítélését.

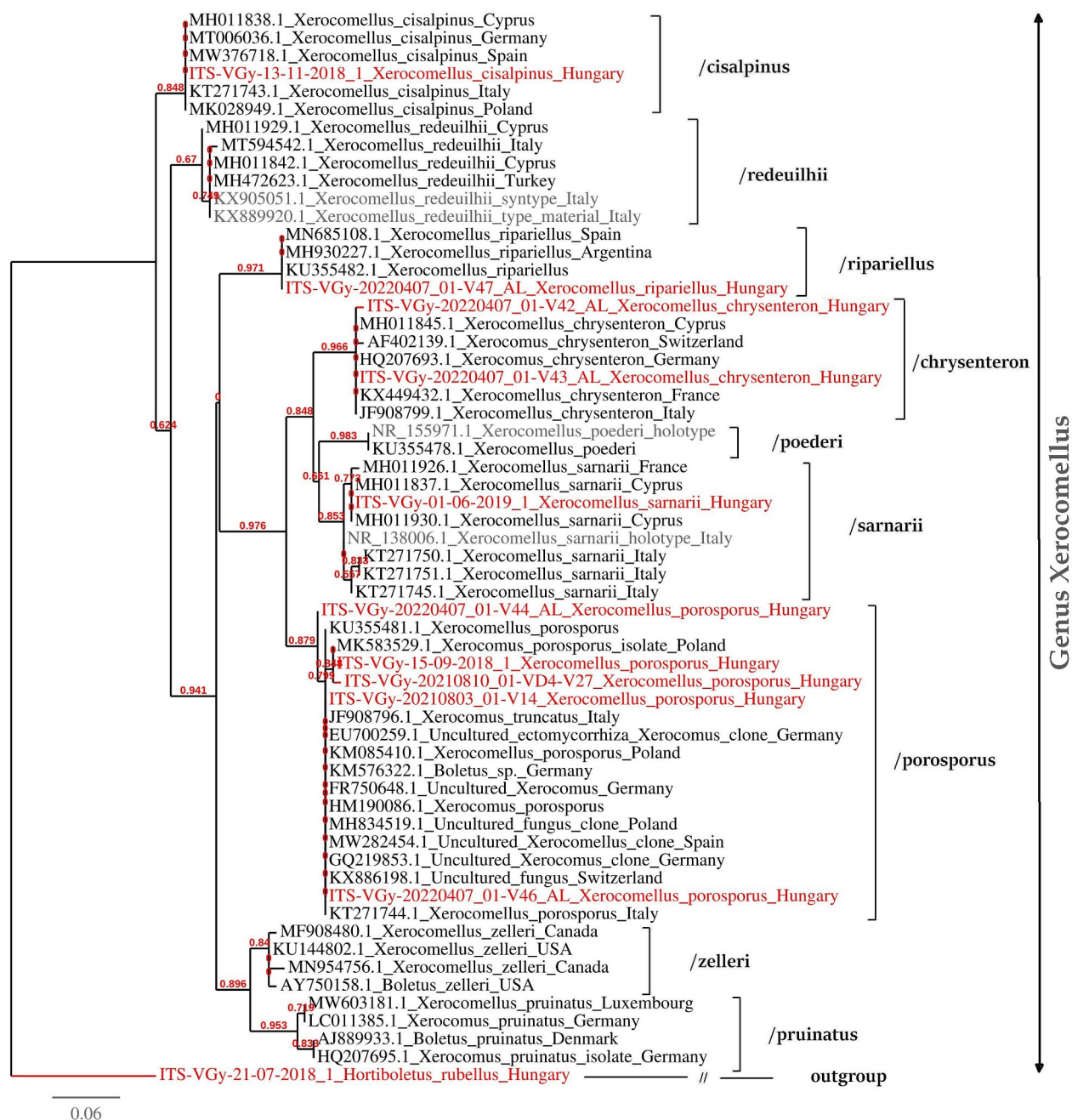
Táblázat 1. A filogenetikai analízisben használt *Xerocomellus* fajok ITS szekvenciái. A hazai adatok félkövér betűkkel láthatók.

No.	Faj	Ország	ITS (Sequences ID)
1.	<i>Xerocomellus cisalpinus</i>	Olaszország	KT271743.1
2.	<i>Xerocomellus cisalpinus</i>	Magyarország	ITS-VGy-13-11-2018_1
3.	<i>Xerocomellus cisalpinus</i>	Spanyolország	MW376718.1
4.	<i>Xerocomellus cisalpinus</i>	Németország	MT006036.1
5.	<i>Xerocomellus cisalpinus</i>	Ciprus	MH011838.1
6.	<i>Xerocomellus cisalpinus</i>	Lengyelország	MK028949.1
7.	<i>Xerocomellus redeuilhii</i>	Ciprus	MH011929.1
8.	<i>Xerocomellus redeuilhii</i>	Olaszország	MT594542.1
9.	<i>Xerocomellus redeuilhii</i>	Ciprus	MH011842.1
10.	<i>Xerocomellus ripariellus</i>	Törökország	MH472623.1
11.	<i>Xerocomellus ripariellus</i> (szüntípus)	Olaszország	KX905051.1
12.	<i>Xerocomellus ripariellus</i> (típusanyag)	Olaszország	KX889920.1
13.	<i>Xerocomellus ripariellus</i>	Spanyolország	MN685108.1
14.	<i>Xerocomellus ripariellus</i>	Argentína	MH930227.1
15.	<i>Xerocomellus ripariellus</i>		KU355482.1
16.	<i>Xerocomellus ripariellus</i>	Magyarország	ITS-VGy-20220407_01-V47_AL
17.	<i>Xerocomellus chrysenteron</i>	Magyarország	ITS-VGy-20220407_01-V42_AL
18.	<i>Xerocomellus chrysenteron</i>	Ciprus	MH011845.1
19.	<i>Xerocomellus chrysenteron</i>	Svájc	AF402139.1
20.	<i>Xerocomellus chrysenteron</i>	Németország	HQ207693.1
21.	<i>Xerocomellus chrysenteron</i>	Magyarország	ITS-VGy-20220407_01-V43_AL
22.	<i>Xerocomellus chrysenteron</i>	Franciaország	KX449432.1
23.	<i>Xerocomellus chrysenteron</i>	Olaszország	JF908799.1
24.	<i>Xerocomellus poederi</i> (holotípus)		NR_155971.1
25.	<i>Xerocomellus poederi</i>		KU355478.1
26.	<i>Xerocomellus sarnarii</i>	Magyarország	ITS-VGy-01-06-2019_1
27.	<i>Xerocomellus sarnarii</i>	Ciprus	MH011930.1
28.	<i>Xerocomellus sarnarii</i>	Ciprus	MH011837.1
29.	<i>Xerocomellus sarnarii</i>	Franciaország	MH011926.1
30.	<i>Xerocomellus sarnarii</i> (holotípus)	Olaszország	NR_138006.1
31.	<i>Xerocomellus sarnarii</i>	Olaszország	KT271750.1
32.	<i>Xerocomellus sarnarii</i>	Olaszország	KT271751.1
33.	<i>Xerocomellus sarnarii</i>	Olaszország	KT271745.1
34.	<i>Xerocomellus porosporus</i>	Magyarország	ITS-VGy-20220407_01-V44_AL
35.	<i>Xerocomellus porosporus</i>		KU355481.1
36.	<i>Xerocomus porosporus</i> isolate	Lengyelország	MK583529.1
37.	<i>Xerocomellus porosporus</i>	Magyarország	ITS-VGy-15-09-2018_1
38.	<i>Xerocomellus porosporus</i>	Magyarország	ITS-VGy-20210810_01-VD4-V27
39.	<i>Xerocomellus porosporus</i>	Magyarország	ITS-VGy-20210803_01-V14
40.	<i>Xerocomus truncatus</i>	Olaszország	JF908796.1
41.	Uncultured ectomycorrhiza <i>Xerocomus</i> clone	Németország	EU700259.1
42.	<i>Xerocomellus porosporus</i>	Lengyelország	KM085410.1
43.	<i>Boletus</i> sp.	Németország	KM576322.1
44.	Uncultured <i>Xerocomus</i>	Németország	FR750648.1
45.	<i>Xerocomus porosporus</i>		HM190086.1
46.	Uncultured fungus clone	Lengyelország	MH834519.1
47.	Uncultured <i>Xerocomellus</i> clone	Spanyolország	MW282454.1
48.	Uncultured <i>Xerocomus</i> clone	Németország	GQ219853.1
49.	Uncultured fungus	Svájc	KX886198.1
50.	<i>Xerocomellus porosporus</i>	Magyarország	ITS-VGy-20220407_01-V46_AL

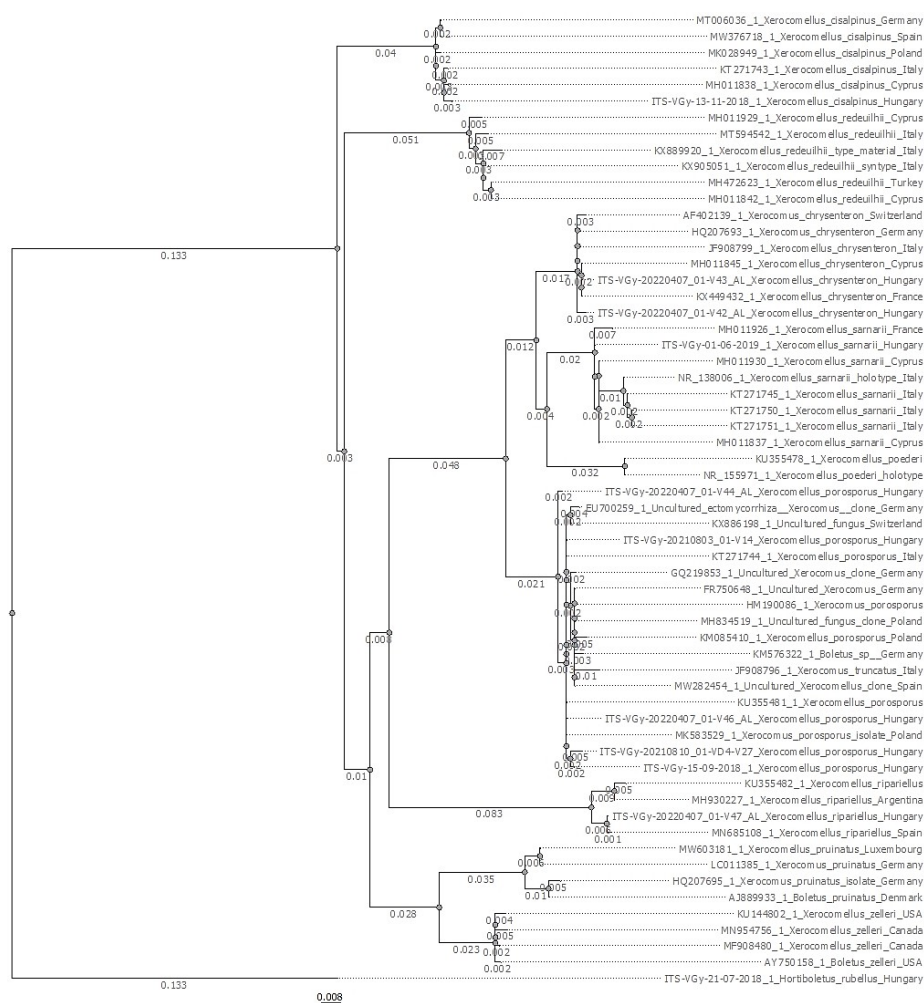
Táblázat 1. (folytatás)

No.	Faj	Ország	ITS (Sequences ID)
51.	<i>Xerocomellus porosporus</i>	Olaszország	KT271744.1
52.	<i>Xerocomellus zelleri</i>	Kanada	MF908480.1
53.	<i>Xerocomellus zelleri</i>	Amerikai Egyesült Államok	KU144802.1
54.	<i>Xerocomellus zelleri</i>	Kanada	MN954756.1
55.	<i>Boletus zelleri</i>	Amerikai Egyesült Államok	AY750158.1
56.	<i>Xerocomellus pruinatus</i>	Luxemburg	MW603181.1
57.	<i>Xerocomus pruinatus</i>	Németország	LC011385.1
58.	<i>Boletus pruinatus</i>	Dánia	AJ889933.1
59.	<i>Xerocomus pruinatus</i> isolate	Németország	MW603181.1
60.	<i>Hortiboletus rubellus</i>	Magyarország	ITS-VGy-21-07-2018_1

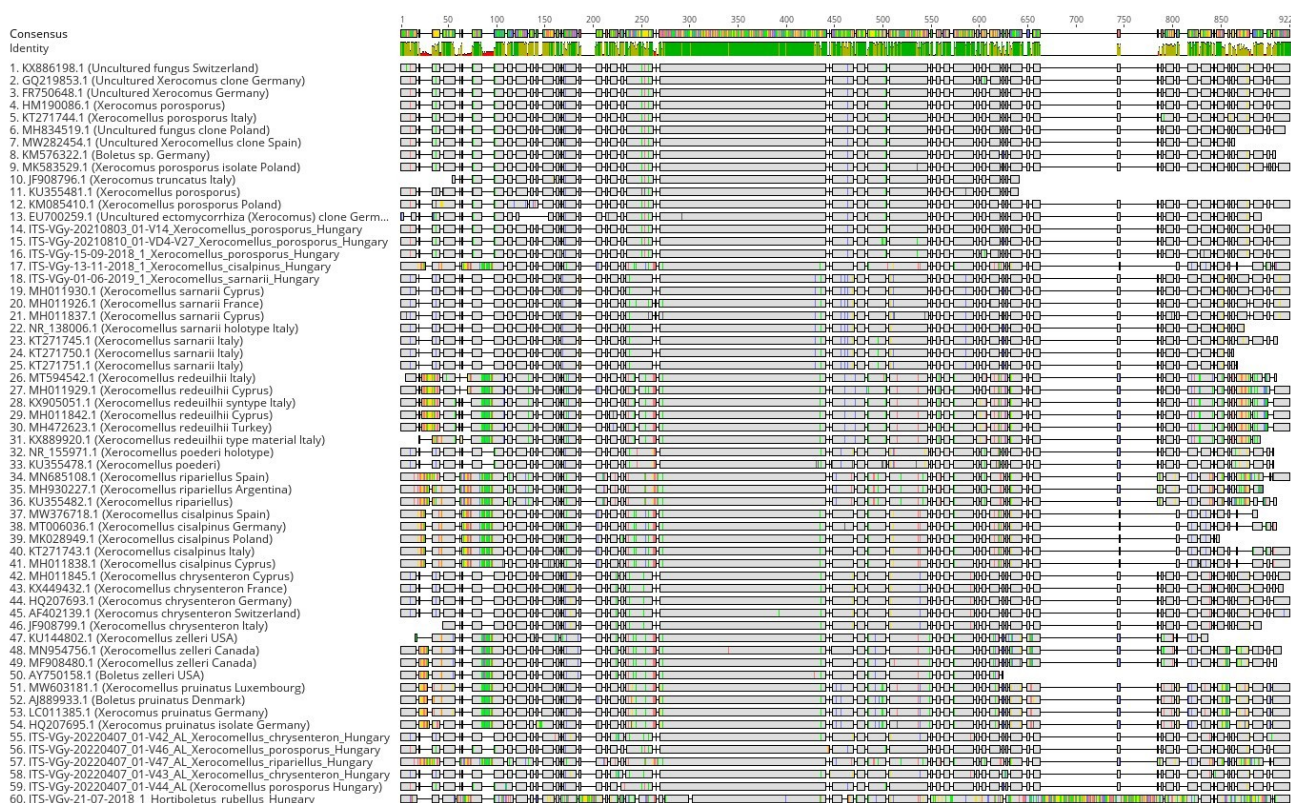
Ábra 1. (Maximum likelihood analízis, PhyML, aLRT teszt)



Ábra 2. (Maximum likelihood analysis, RaxmlGUI, bootstrap: 1000)



Ábra 3. (illesztett szekvenciák, Geneious Prime)



Ábra 4. (A *Xerocomellus* fajok termőtestei I.)



A: *X. cisalpinus* (ITS-VGy-13-11-2018_1); B: *X. ripariellus* (ITS-VGy-20220407_01-V47_AL, Fotó: Albert László); C: *X. chrysenteron* (ITS-VGy-20220407_01-V42_AL, Fotó: Albert László); D: *X. chrysenteron* (ITS-VGy-20220407_01-V43_AL, Fotó: Albert László); E-F: *X. sarnarii* ITS-VGy-01-06-2019_1)

Ábra 5. (A *Xerocomellus* fajok termőtestei II.)



G: *X. porosporus* (ITS-VGy-20220407_01-V44_AL, Fotó: Albert László); **H:** *X. porosporus* (ITS-VGy-15-09-2018_1);
I: *X. porosporus* (ITS-VGy-20210810_01-VD4-V27; **J-K:** *X. porosporus* (ITS-VGy-20210803_01-V14; **L:** *X. porosporus* (ITS-VGy-20220407_01-V46_AL, Fotó: Albert László)

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is külön köszönetünket fejezzük ki Albert Lászlónak a rendelkezésünkre bocsátott *Xerocomellus* fajok fotóiért és herbáriumi példányaiért.