

Extended abstract

HRSM FUNGI – five years of DNA barcoding of Austrian fungi specimens

Irmgard Krisai-Greilhuber

Due to the presence of diverse climatic (transitional oceanic, Pannonian and Illyrian climate) and orographic (planar to nival altitude; plains, hilly areas, and high mountain landscape) conditions, along with a diversity in vegetation (dry grasslands to upland moors, a wide variety of coniferous and deciduous forests, salt steppes to snow valleys), and substrates (herbs, animals, wood from fine to coarse woody debris), Austria is a hot-spot of fungal diversity. However, it is difficult to record species distribution, since identification often relies on the analyses of only a few morphological characters (i.e. macroscopical ones, such as fruiting-body type, hymenophore type, colour, size, veil and surface conditions, as well as microscopical characters, e.g. pileipellis, context structure, asci or basidia, and spores), and the density of mycologists is also fairly moderate. In the face of these limitations, DNA barcoding accelerates species identification, eliminates last doubts regarding correct identifications, discovers misidentifications, and reveals cryptic and less cryptic diversity. Within the Austrian Barcode of Life Initiative ABOL, the HRSM (Hochschulraumstrukturmittel) project “Establishment of DNA-Barcoding pipelines at Austrian universities” offered the opportunity to build upon the reference database of fungi, especially macromycetes. Since Schoch et al. (2012) there is the general agreement to use the internal transcribed spacer region ITS for fungal barcoding, because this region shows a high rate of successful identification for many fungal groups, with a clear barcode gap between inter- and intraspecific variation. Thus, ITS became the primary fungal barcode marker, together with supplementary secondary barcode regions, e.g. LSU, RPB 1 and 2 or *tefl*, for some fungal groups.

At the University of Vienna from 2017 to date more than 5,500 fungal ITS reference sequences have been generated by the mycology working group, spanning over ca. 440 genera and resulting in DNA barcodes of more than 2,600 species. To obtain DNA barcodes, exsiccata from herbaria, primarily from the herbaria WU-Mycologicum and GJO (Graz Joanneum), as well as fresh samples were used, both newly self-collected and sent by mycologists from all over Austria. For a low number of specimens, sequencing was unsuccessful or resulted in contaminations. The majority of specimens could be successfully processed. The aim was to generate DNA barcodes from four individuals per species ideally covering the distributional range in Austria. Besides DNA barcodes for common species, e.g. *Amanita strobiliformis*, *Cortinarius anserinus* or *Russula vesca*, a considerable number of new records for Austria, e.g., *Hebeloma celatum*, *Polyporus tubaeformis* (Holec et al. 2021), *Ophiocordyceps ditmarii* (Haelewaters et al. 2021), for Central Europe (e.g., *Entoloma graphitipes*, *Amanita olivaceo-grisea*) and for Europe (e.g., *Mycena chloroxantha*) could be revealed. New disease records (e.g., *Coleosporium montanum*, *Erysiphe corylacearum*, Voglmayr et al. 2020 a,b), new combinations (e.g., *Arrhenia tillii*, Voitk et al. 2020), new typifications (e.g., *Arrhenia glauca*, Voitk et al. 2020), cryptic new species (e.g., *Chalciporus pseudopiperatus*, Klofac & Krisai-Greilhuber 2020) and very distinct new species for science (e.g., *Cortinarius glaucoelotus*, *Entoloma aurantioalpinum*, *Entoloma silvae-frondosae*, *Inocybe antoniniana*) popped up. *Inocybe antoniniana*, is a new species of *Inocybe* section *Marginatae* with nodulose spores and yellowish-ochraceous cap colour. It could be simultaneously found in Austria, Germany and Turkey. It differs from other species of the group with a similar cap colour in spore and cystidia characters, and ITS sequence data (Bandini et al. 2020). The orange-yellow-capped *Entoloma aurantioalpinum* (Fig. 1) is a look-alike of *E. formosum* and *E. xanthochroum*, which occur in lowlands and in montane regions, so are not strictly alpine species. Apart from the sequence it can be differentiated from the two by a more striate cap and from *E. xanthochroum* additionally by the concolourous lamella edge. Interestingly as is the case with the new *Inocybe* species, the new *Entoloma* spe-



Fig. 1. *Entoloma aurantioalpinum*, WU-Myc 22353, Porzehütte, 2002-08-25. Photo: A. Hausknecht. – Abb. 1. *Entoloma aurantioalpinum*, WU-Myc 22353, Porzehütte, 2002-08-25. Foto: A. Hausknecht.

cies was not only found in Austria but also in France and Italy. As far as is known it is restricted to alpine grassland (Buyck et al. 2022).

Cortinarius glaucoelotus (Dima et al. 2020) belongs to the *Humolentes* (within the Calochroi clade, which is now in the new segregate genus *Calonarius* as *C. glaucoelotus*, provided one is willing to follow Liimatainen et al. (2022) and accepting the splitting of the huge but monophyletic genus *Cortinarius*), near to *C. pseudoglaucopus* and *C. praetermissus*. From the European *C. pseudoglaucopus* it can be delimited by differences in ITS sequences. The two species overlap in distribution and habitats, growing in calcareous coniferous forests, but *C. glaucoelotus* is possibly more bound to *Abies*. They are found in W Caucasus and in in E Austria and NE Spain. Morphologically the new species can be separated from *C. pseudoglaucopus* by a narrow lilac-amethyst zone at the stipe apex.

In 2017 *Mycena chloroxantha* in its variety *appalachienensis*, originally described from Appalachia, was collected in the tropical greenhouse of the Botanikzentrum Klagenfurt, Carinthia. The species that has been found in Europe only in the greenhouse, is characterized by unique cells in the universal veil on the cap, the variety especially by white veil grains. It is known from the USA (North and South Carolina, Texas), Mexico, Ecuador, Brazil and Puerto Rico (Brodegger et al. 2019).

There are no further records available for Central Europe of *Amanita olivaceogrisea*, which was found by Thomas Rücker in Upper Austria in the Gerlhamer Moos, a birch bog forest, in 2020 and the sequence identification has been confirmed by the worldwide *Amanita* expert Rodham Tulloss.

A remarkable problem for a relaxed and fruitful future is the steadily growing number of invasive alien species, plants, animals and also fungal species. In Austria alone, the number of neomycota has increased fivefold in the last 20 years to more than 280 already established species (Voglmayr et al. 2022). Prominent examples for this ongoing process are the rather recently found and genetically confirmed phytoparasitic species *Erysiphe corylacearum*, a powdery mildew on *Corylus avellana* and *C. colurna* in Austria (Voglmayr et al. 2020a,b), which is native to East Asia and probably North America,

has been first observed in Turkey, is spreading to West Asia and Europe and already causing significant yield losses in hazelnut orchards in Turkey, Iran and Georgia, and *Coleosporium montanum*, a rust fungus on *Symphytotrichum* spp., ornamental plants which are widely used in gardens. Both introduced fungi may have a considerable impact on economy.

Finally, in BOLD the project FABOL (Fungi-ABOL) has been created, with 758 fungal barcodes of 507 species already uploaded. Many more will follow in the near future. DNA barcoding for fungi could thus be successfully established within the framework of the HRSM project at the University of Vienna and is a substantial contribution to the expansion of the ABOL database.

Krisai-Greilhuber I (2023) HRSM FUNGI – fünf Jahre DNA Barcoding österreichischer Pilze.

Aufgrund der vielfältigen klimatischen, orographischen, vegetationskundlichen und substratkundlichen Gegebenheiten ist Österreich ein Hotspot der Pilzvielfalt. Da jedoch oft nur wenige morphologische Merkmale, d. h. makroskopische Merkmale sowie mikroskopische Merkmale zur Pilzbestimmung zur Verfügung stehen und auch die Dichte an Mykologen eher mäßig ist, ist es schwierig, die Vielfalt mit klassischen Feld- und mikroskopischen Studien zu erfassen.

Mit Hilfe von DNA-Barcoding wird die Artbestimmung oft beschleunigt, letzte Bestimmungszweifel können ausgeräumt, Fehlbestimmungen entdeckt und kryptische und weniger kryptische neue Arten gefunden werden. Im Rahmen der Austrian Barcode of Life Initiative ABOL konnte das HRSM-Projekt (Hochschulraumstrukturmittel) „Etablierung von DNA-Barcoding Pipelines an österreichischen Universitäten“ etabliert werden und bot die Möglichkeit Pilze miteinzubeziehen. Seit Schoch et al. (2012) wird die interne transkribierte Spacer-Region ITS für das Barcoding von Pilzen verwendet, da diese Region für viele Pilzgruppen eine hohe Erfolgsrate bei der Identifizierung aufweist, zusammen mit ergänzenden Barcode-Regionen, z. B. LSU, RPB 1 und 2 oder tef1, für einige Pilzgruppen.

An der Universität Wien wurden von 2017 bis heute mehr als 5.500 ITS-Referenzsequenzen von Pilzen durch die Arbeitsgruppe Mykologie generiert, die ca. 440 Gattungen umfassen und zu Barcodes von mehr als 2.600 Arten führten. Zur Gewinnung der Barcodes wurden sowohl neu gesammelte Frischfunde und Exsikkate aus Herbarien, vor allem aus den Sammlungen WU-Mycologicum und GJO (Grazer Joanneum), als auch andere interessante Proben, die von Mykologen aus ganz Österreich eingesandt wurden, verwendet. Bei einer geringen Anzahl von Proben war die Sequenzierung erfolglos oder führte zu Kontaminationen. Ziel war es, DNA-Barcodes für vier Individuen pro Art zu generieren, geographisch über ganz Österreich verteilt. Neben Barcodes für häufige Arten, wie z. B. *Amanita strobiliformis*, *Cortinarius anserinus* oder *Russula vesca*, wurde eine beträchtliche Anzahl von Neufunden für Österreich, wie z. B., *Hebeloma celatum*, *Polyporus tubaeformis* (Holec et al. 2021), *Ophiocordyceps ditmarii* (Haelewaters et al. 2021), für Mitteleuropa (z. B. *Entoloma graphitipes*, *Amanita olivaceogrisea*) und für Europa (z. B. *Mycena chloroxantha*) erlangt. Neue Krankheitsnachweise (z. B. *Coleosporium montanum*, *Erysiphe corylacearum*), neue Kombinationen (z. B. *Arrhenia tillii*, Voitk et al. 2020), neue Typisierungen (z. B. *Arrhenia glauca*, Voitk et al. 2020), kryptische neue Arten (z. B., *Chalciporus pseudopiperatus*, Klofac & Krisai-Greilhuber 2020) und sehr auffällige für die Wissenschaft neue Arten (z. B. *Cortinarius glaucoelotus*, *Entoloma aurantioalpinum*, *Entoloma silvae-frondosae*, *Inocybe antoniniana*) wurden gefunden.

Inocybe antoniniana, ist eine neue Art aus der Sektion Marginatae mit knotigen Sporen und gelblich-ockerfarbener Hutfarbe. Sie konnte gleichzeitig in Österreich, Deutschland und der Türkei gefunden werden (Bandini et al. 2020).

Die orange-gelb gefärbte *Entoloma aurantioalpinum* (Abb. 1) ähnelt *E. formosum* und *E. xanthochroum*, die im Tiefland und in montanen Regionen vorkommen, aber keine streng alpinen Arten sind, und unterscheidet sich neben der Sequenz außerdem durch einen stärker gestreiften Hut, den alpinen Standort und von *E. xanthochroum* zusätzlich durch die gleichfarbige Lamellenschneide. Interessanterweise wurde die neue *Entoloma*-Art, wie auch die neue *Inocybe*-Art, nicht nur in Österreich, sondern auch in Frankreich und Italien gefunden (Buyck et al. 2022).

Cortinarius glaucoelotus (Dima et al. 2020) gehört zu den Humolentes (syn. *Calonarius glaucoelotus*, Liimatainen et al. 2022), in der Nähe von *C. pseudoglaucopus* und *C. prae-*

termisus. Unterschiede finden sich in den ITS-Sequenzen und in der Ökologie. Ihre Verbreitungsgebiete überschneiden sich im westlichen Kaukasus und in Ostösterreich und Nordostspanien.

Im Jahr 2017 wurde *Mycena chloroxantha* in der Varietät *appalachienensis*, die ursprünglich aus den Appalachen beschrieben wurde, im Tropengewächshaus des Botanikzentrums Klagenfurt, Kärnten, gesammelt. Die Art zeichnet sich durch einzigartige Zellen im Hutvelum aus. Sie ist aus den USA, Mexiko, Ecuador, Brasilien und Puerto Rico bekannt (Brodegger et al. 2019).

Von *Amanita olivaceogrisea*, die 2020 von Thomas Rücker in Oberösterreich im Gerlhamer Moos, einem Birkenmoorwald, gefunden wurde, liegen für Mitteleuropa keine weiteren Nachweise vor, und die Identität wurde vom weltweiten *Amanita*-Experten Rodham Tulloss bestätigt.

Ein bemerkenswertes Problem für eine entspannte und fruchtbare Zukunft ist die stetig wachsende Zahl invasiver gebietsfremder Arten, Pflanzen, Tiere und auch Pilze. Allein in Österreich hat sich die Zahl der Neomycota in den letzten 20 Jahren auf mehr als 280 bereits etablierte Arten vervielfacht (Voglmayr et al. 2022). Prominente Beispiele für diesen laufenden Prozess sind die erst kürzlich entdeckte und genetisch bestätigte phytoparasitische Art *Erysiphe corylacearum*, ein Echter Mehltau auf *Corylus avellana* und *C. colurna* in Österreich (Voglmayr et al. 2020a,b), der in Ostasien und wahrscheinlich Nordamerika beheimatet ist, erstmals in der Türkei beobachtet wurde, sich ausbreitet und Ertragseinbußen in Haselnussplantagen verursacht, und *Coleosporium montanum*, ein Rostpilz auf *Symphyotrichum* spp., Zierpflanzen, die in Gärten weit verbreitet sind. Beide eingeschleppten Pilze können erhebliche negative Auswirkungen auf die Wirtschaft haben.

Abschließend wurde in BOLD das Projekt FABOL (Fungi-ABOL) eingerichtet. 758 Pilz-Barcodes von 507 Arten wurden bereits hochgeladen. Viele weitere werden in naher Zukunft folgen. DNA-Barcoding für Pilze konnte somit im Rahmen des HRSM-Projektes an der Universität Wien erfolgreich etabliert werden und ist ein wesentlicher Beitrag zum Ausbau der ABOL-Datenbank.

Keywords: fungal diversity, fungal barcoding, fungal survey, molecular genetic identification, new records.

Acknowledgments

I would like to thank all providers of fungal specimens, ABOL and herbarium curators, and especially Michael Barfuß, Dominik Metschina, Oliver Macek, Kesiban Özdemir and Hermann Voglmayr for assistance in various matters, and the Ministry of Science for funding the HRSM project under ABOL.

Literature

- Bandini D, Sesli E, Oertel B, Krisai-Greilhuber I (2020) *Inocybe antoniniana*, a new species of *Inocybe* section *Marginatae* with nodulose spores. *Sydowia* 72, 95–106
- Brodegger E, Koncilja M, Krisai-Greilhuber I (2018) Ein rezenter Fund von *Mycena chloroxantha* var. *appalachienensis* aus dem Botanikzentrum Klagenfurt. *Österr. Z. Pilzk.* 27, 59–64
- Buyck B, Eyssartier G, Armada F, Hembrom M E, Corrales A, Rossi W, Vera M, Adamčíková K, Bellanger J M, Bizzio E, Caboň M, Consiglio G, Das K, Dima B, Ghosh A., Hampe F, Krisai-Greilhuber I, Leonardi M, Noordeloos M E, Papp V, Parihar A, Piepenbring M, Villa J, Adamčík S (2022) Fungal Biodiversity Profiles 111-120. – *Cryptogamie, Mycologie* 43 (2), 23–60. <https://doi.org/10.5252/cryptogamie-mycologie2022v43a2>. <http://cryptogamie.com/mycologie/43/2>
- Dima B, Brandrud T E, Krisai-Greilhuber I, Ballarà J, Peintner U (2020) *Cortinarius glaucoelotus* Brandrud, Dima, Krisai, Ballarà, Peintner, sp. nov. *Fungal Planet* 1181, pp.4040-405, suppl. FP1181. In: Crous P W et al.: *Fungal Planet description sheets*, 1112–1181. *Persoonia* 45, 251–409

- Haelewaters D, Dima B, Abdel-Hafiz B I I, Abdel-Wahab M A, Abul-Ezz S R, Acar I, Aguirre-Acosta E, Aime M C, Aldemir S, Ali M, Ayala-Vásquez O, Bakhit M S, Bashir H, Battistin E, Bendiksen E, Castro-Rivera R, Çolak Ö F, De Kesel A, de la Fuente J I, Dizkırıcı A, Hussain S, Jansen G M, Kaygusuz O, Khalid A N, Khan J, Kiyashko A A, Larsson E, Martínez-González C R, Morozova O V, Niazi A R, Noordeloos M E, Pham T H G, Popov E S, Psurtseva N V, Schoutteten N, Sher H, Türkekul I, Verbeken A, Ahmad H, Afshan N S, Christe P, Fiaz M, Glaizot O, Liu J, Majeed J, Markotter W, Nagy A, Nawaz H, Papp V, Péter Á, Pfliegler W P, Qasim T, Riaz M, Sándor A D, Szentiványi T, Voglmayr H, Yousaf N, Krisai-Greilhuber I (2020) Fungal Systematics and Evolution 6. *Sydowia* 72, 271–296. doi:10.12905/0380.sydowia72-2020-0231
- Holec J, Vampola P, Kout J, Beran M, Krisai-Greilhuber I, Hahn C, Kolařík M (2021) *Polyporus tubaeformis* (Basidiomycota, Polyporaceae) – identity, ecology and distribution in the Czech Republic, Austria, Slovakia and Ukraine. *Sydowia* 73, 245–256
- Klofac W, Krisai-Greilhuber I (2020): *Chalciporus pseudopiperatus*, a new taxon in the *Chalciporus piperatus* species complex. *Chalciporus pseudopiperatus*, ein neues Taxon des *Chalciporus piperatus* Artkomplexes. *Österr. Z. f. Pilzkunde* 28, 75–78
- Liimatainen K, Kim J T, Pokorny L, Kirk P M, Dentinger B, Niskanen T (2022) Taming the beast: a revised classification of Cortinariaceae based on genomic data. *Fungal Diversity* <https://doi.org/10.1007/s13225-022-00499-9>
- Schoch C L, Seifert, K A, Huhndorf S, Vincent R, Spouge J L, Levesque C A, Chen W, Fungal Barcoding Consortium (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109 (16), 6241–6246
- Voitk A, Saar I, Lücking R, Moreau P-A, Corriol G, Krisai-Greilhuber I, Thorn R G, Hay C R J, Moncada B, Gulden G (2020) Surprising morphological, ecological and ITS sequence diversity in the *Arbentia acerosa* complex (Basidiomycota: Agaricales: Hygrophoraceae). *Sydowia* 73, 133–162, online December 11, 2020, <https://www.verlag-berger.at/res/user/berger/media/2900.pdf>
- Voglmayr H, Zankl T, Krisai-Greilhuber I, Kirisits T (2020 a) First report of *Erysiphe corylacearum* on *Corylus avellana* and *C. colurna* in Austria. *New Disease Reports* 42, 14. doi.org/10.5197/lj.2044-0588.2020.042.014 <https://www.ndrs.org.uk/article.php?id=042014>
- Voglmayr H, Krisai-Greilhuber I, Kirisits T (2020 b) First report of *Coleosporium montanum* on *Symphyotrichum* in Austria and Europe. *New Disease Reports* 42, 24. <http://dx.doi.org/10.5197/lj.2044-0588.2020.042.024>
- Voglmayr H, Schertler A, Essl F, Krisai-Greilhuber I (2022) Alien and cryptogenic fungi and oomycetes in Austria: an annotated checklist (2nd edition). *Biological Invasions* (submitted).

Received: 2023 03 07

Address:

Irmgard Krisai-Greilhuber, E-mail: irmgard.greilhuber@univie.ac.at,
ORCID 0000-0003-1078-3080. Department of Botany and Biodiversity, University of
Vienna, Rennweg 14, A-1030 Wien.

