



مطالعه و شناسایی قارچ‌های آگاریک جنگل‌های بلوط استان کرمانشاه

فاطمه امید علی^۱، صمد جمالی^{۲*} و سعید عباسی^۳

^۱ کارشناس ارشد، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه
^۲ استادیار، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه
^۳ دانشیار، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۱۸)

چکیده

به منظور مطالعه قارچ‌های آگاریک جنگل‌های بلوط استان کرمانشاه، نمونه‌های ماکروسکوپی طی سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۳ جمع‌آوری شدند. پس از بررسی‌های ریخت‌شناختی، دی‌ان‌ای نمونه‌ها با استفاده از کیت خالص‌سازی دی.ان.ای. ژنومی استخراج شده و ناحیه ITS با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 فزون‌سازی شد. قطعات تقریباً ۶۰۰ جفت بازی به دست آمده پس از توالی‌یابی، در بانک ژن ثبت شدند. با استفاده از ابزار جست‌وجوی BLAST توالی‌های به دست آمده با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند. آنالیز فیلوژنتیکی به دو روش پیوست همسایه‌ها و بیشینه درست‌نمایی، صحت شناسایی نمونه‌ها را تأیید کرد. در نهایت گونه‌های (*Agrocybe* (KT833856)، (*Entoloma serrulatum* (KT833862)، (*Cyclocybe cylindracea praecox* (KT923180)، (*Coprinopsis atramentaria* (KT833863)، (*Lactarius glaucescens* (KT833866)، (*Hebeloma alpinum* (KT833861)، (*Hypholoma fasciculare* (KT833860)، (*Psilocybe cyanescens* (KT833857)، (*Psilocybe atrobrunnea* (KT833864)، (*Pholiota gummosa* (KT833859)، (*Stropharia aeruginosa* (KT833865)، (*Boletus erythropus* و *Irpex lacteus* شناسایی شدند. سه گونه *Entoloma*، *Hebeloma alpinum* و *Cyclocybe cylindracea* و *serrulatum* برای فلور قارچی ایران جدیدند و اولین بار گزارش می‌شوند. نمونه‌های سند در بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی نگهداری می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: جنگل بلوط، قارچ‌های آگاریک، کرمانشاه، ITS.

مقدمه

(Najafi Harsini et al., 2018). جنگل‌های استان کرمانشاه مساحتی حدود ۵۰۰ هزار هکتار دارند که حدود ۲۰ درصد از این استان را بلوط پوشانده است (Mirzaee, 1995). از مهم‌ترین ویژگی‌های جنگل‌های زاگرس به‌عنوان دومین اکوسیستم جنگلی طبیعی کشور، تأمین منابع آب و تعادل اقلیمی کشور، کنترل ریزگردها، خواص دارویی برای تقویت مخاط معده و درمان ورم و زخم معده، تهیه نان، منبع تغذیه‌ای برای دام و جلب

جنگل‌های ناحیه رویشی زاگرس، با مساحت حدود ۵ میلیون هکتار، ۴۱ درصد از جنگل‌های ایران را در بر گرفته است (Heidari et al., 2013). بلوط ایرانی (*Quercus brantii*) در حدود ۳/۵ میلیون هکتار از ۵ میلیون هکتار جنگل‌های زاگرس را شامل می‌شود و گونه غالب این جنگل‌هاست (Khodagholi et al., 2016;)

Entoloma (Bolbitiaceae)، یک گونه از جنس (متعلق به تیره Entolomataceae) و هفت گونه از جنس‌های *Stropharia*، *Agrocybe*، *Pholiota* و *Psilocybe* (متعلق به تیره Strophariaceae) از مناطق کرمانشاه و هرسین بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی گزارش شدند (Fadavi et al., 2013). در بررسی حاضر با توجه به اهمیت قارچ‌های آگاریک در اکوسیستم جنگلی و همچنین کاربرد آنها به‌عنوان میکوریز در کاشت نهال‌های درختان جنگلی به‌منظور ایجاد ثبات و پایداری اکوسیستم جنگل، مطالعه و شناسایی قارچ‌های آگاریک با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناختی و مولکولی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

منطقه پژوهش

این تحقیق طی سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ نمونه‌برداری از مناطق مختلف جنگل‌های استان کرمانشاه صورت گرفت.

روش پژوهش

مطالعات ریخت‌شناختی

برای هر نمونه، مشخصات جغرافیایی محل جمع‌آوری ثبت شد (جدول ۱). پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه صفات میکروسکوپی شامل شکل، رنگ و قطر کلاهک، رنگ تیغه‌ها، نحوه تراکم تیغه‌ها و طرز اتصال آنها به پایه، داشتن پایه (مرکزی یا غیرمرکزی) یا نبود آن، اندازه‌گیری قطر و طول پایه و نیز ساختارهای فرعی شامل: تیغک‌ها، فلس در سطح کلاهک، فنجانک و منطقه رینگی، حلقه و ساختار تار عنکبوتی و صفات میکروسکوپی شامل وجود یا نبود قوس اتصال، نوع هیف و ساختار ترامای بازیدیوکارپ، انواع بازیدیوم و ساختار سیستم‌دیوم و بازیدیوسپور (رنگ، اندازه و تزئینات) بررسی شد (Hawksworth, 1991; Fiore-Donno & Martin, 2001; Dallas & Burgin, 2006).

گردشگران داخلی و خارجی برای اشتغال و درآمدزایی است (Mohammadi Kangarani et al., 2009; Ranjbar et al., 2012; Hosseinzadeh et al., 2015). در اکوسیستم‌های جنگلی، نقش قارچ‌های آگاریک برای ثبات اکوسیستم بسیار حائز اهمیت است. قارچ‌های آگاریک سبب تجزیه چوب‌های در حال پوسیدن و بازگشت مواد غذایی به خاک و همچنین از بین بردن درختان ضعیف و بیمار می‌شوند و از طرفی مواد غذایی مورد نیاز برای بقا و رشد درختان را تأمین می‌کنند. تعدادی از قارچ‌های آگاریک با درختان تشکیل میکوریز خارجی می‌دهند که این نوع قارچ‌ریشه در تأمین مواد غذایی و حفاظت گیاه در برابر تنش‌های آبی، محیطی و همچنین با ترشح انواعی از آنتی‌بیوتیک‌ها و تشکیل غلاف در اطراف ریشه گیاهان در برابر بیمارگرهای گیاهی نظیر *Phytophthora*، *Pythium*، *Rhizoctonia* بسزایی دارد (Borowicz, 2001). استفاده از زادمایه قارچ‌های اکتومیکوریز به‌ویژه *Pisolithus tinctorius* و *Telephora terrestris* در کاشت درختان کاج، از طریق افزایش جذب عناصر غذایی در خاک‌های فقیر و آلوده به عناصر سنگین، به افزایش رشد این گیاهان منجر شده است (Kim et al., 1999). سابقه شناسایی قارچ‌های ماکروسکوپی در ایران به بیش از ۱۵۰ سال قبل و به مطالعات بوهسه باز می‌گردد. از آن زمان تا کنون یعنی در طول حدود یک‌ونیم قرن، آرایه‌های متعددی از این دسته از قارچ‌ها از مناطق مختلف کشور به‌ویژه از رویشگاه اصلی و مهم آنها، یعنی جنگل‌های حاشیه خزری جمع‌آوری، شناسایی و معرفی شده است (Ershad, 2009). با توجه به اهمیت قارچ‌های آگاریک در اکوسیستم جنگلی، تا کنون مطالعه جامعی در خصوص قارچ‌های آگاریک در جنگل‌های استان کرمانشاه صورت نگرفته است. در استان کرمانشاه تنها مطالعه صورت‌گرفته در خصوص قارچ‌های آگاریک، تحقیقات فدوی و همکاران است که دو گونه از جنس *Conocybe* (متعلق به تیره

جدول ۱- مشخصات گونه‌های شناسایی شده قارچ‌های آگاریک جنگل‌های بلوط در استان کرمانشاه به همراه شماره دسترسی در بانک ژن

کد نمونه‌ها	شماره دسترسی در بانک ژن	گونه	ارتفاع از سطح دریا (متر)	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	تاریخ نمونه‌برداری	مکان نمونه‌برداری
AgPr1	KT833856	<i>Agrocybe praecox</i>	۱۵۶۵	۴۶° ۱۸' ۷.۴۳" E	۳۴° ۵' ۳۵.۵۶" N	۱۳۹۳/۲/۲	کرمانشاه- دشت داربر
CyCy1	KM260146	<i>Cyclocybe cylindracea</i>	۱۹۵۴	۴۶° ۱۷' ۱۸.۷۴" E	۳۴° ۴' ۴۸.۸۵" N	۱۳۹۳/۲/۷	کرمانشاه - کوه کانی شمامه
BoEr1	-	<i>Boletus erythropus</i>	۹۱۰	۴۶° ۴۶' ۳۹.۲۸" E	۳۴° ۱۰' ۳۲.۹۹" N	۱۳۹۳/۲/۵	کرمانشاه - چشمه اتاولا
IrLa1	-	<i>Irpex lacteus</i>	۱۶۸۶	۴۶° ۲۱' ۹.۸۶" E	۳۴° ۸' ۷.۴۵" N	۱۳۹۳/۲/۱۰	کرمانشاه - کوه میران
PhGu1	KT833858	<i>Pholiota gummosa</i>	۱۶۲۸	۴۶° ۲۱' ۵۳.۵۷" E	۳۴° ۶' ۱۷.۹۳" N	۱۳۹۳/۳/۱	کرمانشاه - کوه سرتو
LeCr1	KT833859	<i>Lepiota cristata</i>	۱۵۹۳	۴۶° ۲۰' ۱۳.۲۴" E	۳۴° ۶' ۵۰.۶۱" N	۱۳۹۳/۷/۲	کرمانشاه - کوه گرزه قیو
CoAt1	KT833863	<i>Coprinopsis atramentaria</i>	۱۵۹۷	۴۶° ۱۸' ۱۳.۴۱" E	۳۴° ۶' ۴۰.۹۹" N	۱۳۹۳/۷/۸	کرمانشاه - کوه قلالان
EnSe1	KT833862	<i>Entoloma serrulatum</i>	۱۵۶۳	۴۶° ۱۸' ۴۷.۸۲" E	۳۴° ۶' ۴۵.۰۴" N	۱۳۹۳/۸/۴	کرمانشاه - کوه بانچال
PsAt1	KT833864	<i>Psilocybe atrobrunnea</i>	۱۵۷۸	۴۶° ۲۱' ۱.۸۶" E	۳۴° ۶' ۳۱.۵۸" N	۱۳۹۳/۱/۶	کرمانشاه - کوه دارمازگ
StAe1	KT833865	<i>Stropharia aeruginosa</i>	۱۶۲۸	۴۶° ۲۲' ۸.۸۶" E	۳۴° ۶' ۱۵.۷۱" N	۱۳۹۳/۸/۸	کرمانشاه - دشت منته
HyFa1	KT833860	<i>Hypholoma fasciculare</i>	۱۶۹۹	۴۶° ۱۶' ۴۵.۸۴" E	۳۴° ۵' ۲۴.۴۹" N	۱۳۹۳/۸/۹	کرمانشاه - کوه گرمو
HeAl1	KT833861	<i>Hebeloma alpinum</i>	۱۷۳۳	۴۶° ۲۳' ۱۰.۴۴" E	۳۴° ۵' ۳۸.۵۲" N	۱۳۹۳/۹/۳	کرمانشاه - کوه صیاز
PsCy1	KT833857	<i>Psilocybe cyanescens</i>	۱۶۰۸	۴۶° ۱۸' ۵۷.۲" E	۳۴° ۵' ۳۰.۶۵" N	۱۳۹۳/۲/۱۱	کرمانشاه - چشمه کیرز
LaGl1	KT833859	<i>Lactarius glaucescens</i>	۱۵۸۳	۴۶° ۱۶' ۱۵.۰۹" E	۳۴° ۵' ۴۰.۳۲" N	۱۳۹۳/۲/۱۹	کرمانشاه - کوه چلاک

استخراج دی.ان.ای. با استفاده از کیت استخراج دی.ان.ای. بر اساس دستور شرکت سازنده صورت گرفت. درجه خلوص دی.ان.ای. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر (طول موج جذب اسیدنوکلییک) و ۲۸۰ نانومتر (طول موج جذب پروتئین) اندازه‌گیری و در نهایت نسبت جذب نوری محلول دی.ان.ای. در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر که شاخص میزان خلوص دی.ان.ای. است به دست آمد. نواحی ITS1-5.8S-ITS2 با استفاده از ترکیب آغازگرهای عمومی ITS1 (5-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3) به همراه ITS4 (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3)

به ترتیب به عنوان آغازگرهای پیشرو و پسرو توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز فزون‌سازی شدند

اندازه‌گیری میکروسکوپی دست‌کم ۳۰ عدد بازیدیوسپور، بازیدیوم و سیستمیدیوم با استفاده از نرم‌افزار BioloMics Measure صورت گرفت. پس از خشک کردن نمونه‌ها توسط دستگاه خشک‌کن (دهیدراتور)، به منظور حذف آلودگی‌های قارچی، حشرات و کنه‌های پارازیت، نمونه‌های قارچی خشک‌شده، به مدت دست‌کم یک هفته در فریزر، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و داخل پاکت‌های کاغذی قرار داده شدند. پس از خارج کردن از فریزر، نمونه‌های خشک‌شده در کیسه‌های نایلونی زیپ‌دار، برای انتقال و نگهداری قرار داده شدند.

مطالعات مولکولی

در بررسی‌های مولکولی از قسمت داخل بازیدیوکارپ برای استخراج دی.ان.ای. استفاده شد.

Lepiota (Entolomataceae)، یک گونه از جنس (متعلق به تیره Agaricaceae)، یک گونه از جنس *Hebeloma* (متعلق به تیره Cortinariaceae)، یک گونه از جنس *Coprinopsis* (متعلق به تیره Psathyrellaceae)، دو گونه از جنس‌های *Agrocybe* و *Cyclocybe* (متعلق به تیره Bolbitaceae)، یک گونه از جنس *Boletus* (متعلق به تیره Boletaceae)، یک گونه از جنس *Irpex* (متعلق به تیره Steccherinaceae) و پنج گونه از جنس‌های *Psilocybe*، *Stropharia*، *Pholiota*، *Hypholoma* (متعلق به تیره Strophariaceae) بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی و مقایسه توالی ناحیه ITS از جنگل‌های بلوط استان کرمانشاه شناسایی شد. آنالیز فیلوژنتیکی صحت شناسایی گونه‌ها را تأیید کرد و نمونه‌های ما با ضریب اطمینان ۹۸-۱۰۰ درصد در روش پیوست همسایه‌ها و ۸۱-۱۰۰ درصد در روش بیشینه احتمال همراه با نمونه‌های معتبر از کشورهای دیگر در یک گروه قرار گرفتند (شکل‌های ۱ و ۲). همه گونه‌های شناسایی شده در این بررسی به جز *Psilocybe atrobrunnea* برای فلور قارچی استان کرمانشاه و سه گونه برای فلور قارچی ایران جدید بودند. خصوصیات کامل گونه‌های شناسایی شده به شرح زیر است (شکل ۳):

Agrocybe praecox (Agaricales, Bolbitiaceae)
(Pers.: Fr.) Fayod, 1889

کلاهک محدب، به قطر ۴ سانتی‌متر، دارای سطح صاف به رنگ قهوه‌ای مایل به زرد است که به سمت حاشیه کمرنگ‌تر می‌شود. تیغه‌ها فشرده‌اند و ابتدا به رنگ سفید و در نهایت به رنگ قهوه‌ای در می‌آیند. پایه به طول ۵ سانتی‌متر و قطر ۰/۵ سانتی‌متر و هم‌رنگ کلاهک است. بازیدیوسپورها بیضوی، با سطح صاف و به رنگ قهوه‌ای تیره و ابعاد (۶/۴-۹/۵) × ۸/۲۵ (۴/۲-۷/۳) ۵/۷ میکرومتر هستند. سیستیدیوم از نوع pleurocystidia و به ابعاد ۳۸-۵۰ × ۱۸-۱۰ میکرومتر است. در توالی‌یابی ناحیه ITS این گونه،

(White et al., 1990). مواد به کاررفته در هر واکنش شامل ۱۰ نانوگرم دی.ان.ای. قالب، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۲۰۰ میلی‌مول بافر Tris-HCL با pH=۸، ۵۰۰ میلی‌مول KCL) و ۱۰۰ میکرومول BSA در یک حجم ۲۵ میکرولیتری از واکنش بودند. چرخه دمایی و میزان دما بر اساس گزارش طراح آغازگر تنظیم شد (White et al., 1990). قطعات فزون‌سازی شده برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال و از یک جهت به صورت مستقیم با استفاده از آغازگر ITS1 توالی‌یابی شدند. توالی‌های به دست آمده به روش دستی و با استفاده از نسخه ۷.۱ نرم‌افزار Bioedit ویرایش شدند. توالی‌های ویرایش شده با استفاده از نرم‌افزار BankIt (GenBank, NCBI, USA; [Online]) به بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/ GenBank, NCBI, USA; [Online]) و شماره دسترسی برای مطالعات بعدی اخذ شد.

روش تحلیل

هم‌ردیف‌سازی ابتدایی توالی‌های ویرایش شده با نرم‌افزار ClustalW (Thompson et al., 1994) انجام گرفت و سپس به صورت دستی در نرم‌افزار BioEdit تنظیماتی روی آن صورت گرفت. آنالیز فیلوژنتیکی به روش پیوست همسایه‌ها (neighbor joining) و بیشینه درست‌نمایی (maximum likelihood) با تکرار ۱۰۰۰ بار بوت‌استرپ با استفاده از نسخه ۵ نرم‌افزار MEGA صورت گرفت. از گونه *Rhizopogon roseolus* به عنوان گروه خارجی استفاده شد.

نتایج

در این بررسی چهارده گونه شامل یک گونه از جنس *Lactarius* (متعلق به تیره Russulaceae)، یک گونه از جنس *Entoloma* (متعلق به تیره

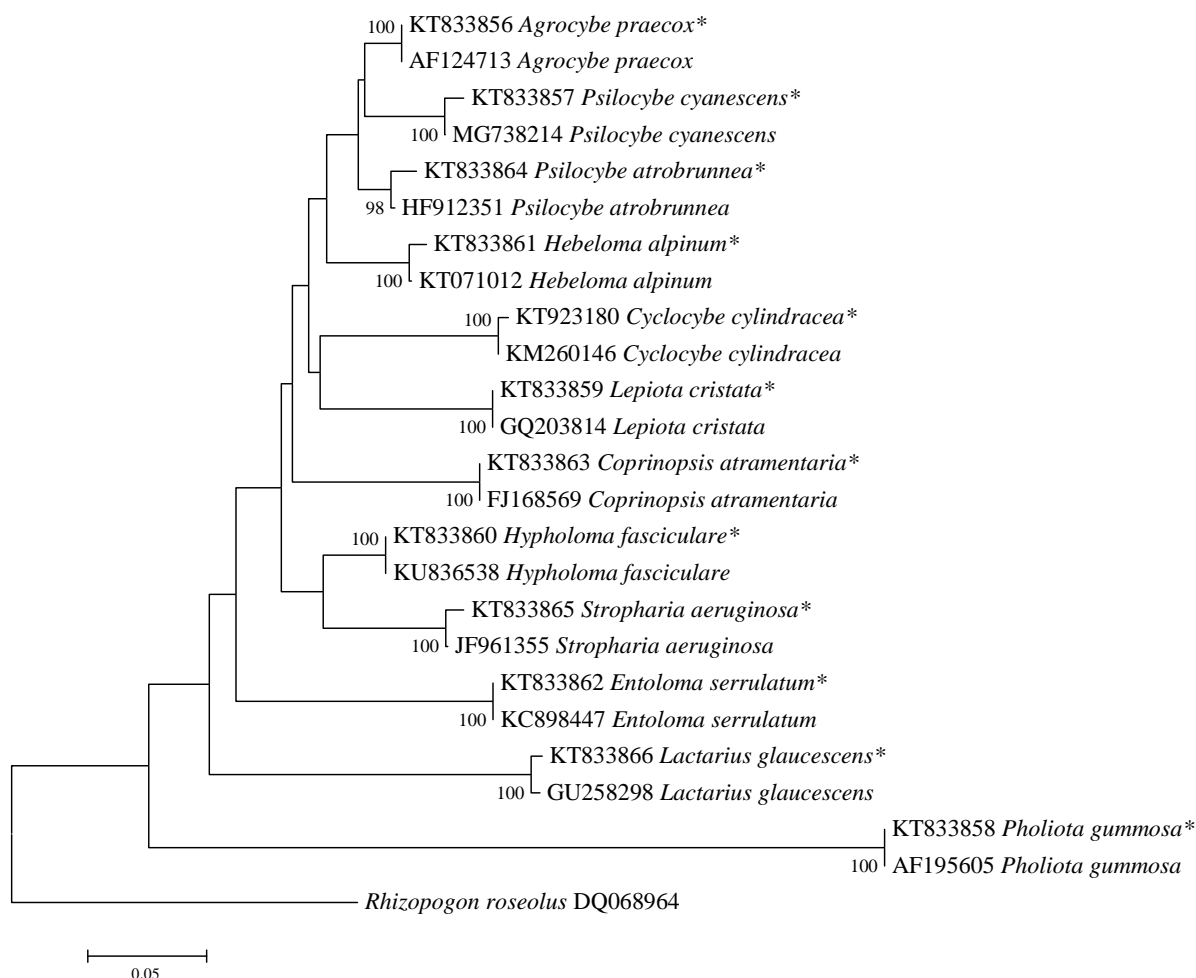
سیستیدیوم از نوع *Cheliocystidia*، دوک شکل و با اندازه ۴۸/۹۷ میکرومتر است. بازیدیوم استوانه‌ای و دارای چهار استریگما است. نام قدیم این گونه *Agrocybe cylindracea* (DC.:Fr.) Maire. 1937 بود که به *Cyclocybe cylindracea* تغییر یافته است. در توالی یابی ناحیه ITS این گونه، ۷۲۳ جفت باز به دست آمد که ۹۷ درصد به گونه *Cyclocybe cylindracea* با شماره دسترسی KM260146 شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی KT923180 در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن ثبت شد.

۵۵۰ جفت باز به دست آمد که ۹۳ درصد با گونه *Agrocybe praecox* با شماره دسترسی AY818348 شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی KT833856 در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن ثبت شد.

Cyclocybe cylindracea (DC.)

Vizzini & Angelini, 2014

کلاهک محدب، به قطر ۳ سانتی‌متر، به رنگ قهوه‌ای روشن، دارای پایه استوانه‌ای زرد روشن به قطر ۰/۵ سانتی‌متر و طول ۲/۵ سانتی‌متر است؛ تیغه‌ها فشرده و زرد رنگ‌اند. بازیدیوسپورها بیضوی تا تخم‌مرغی با سطح صاف به رنگ زرد و ابعاد $(۴/۲-۶/۱) \times (۷/۳-۱۰) / ۸/۶$ میکرومتر هستند.



شکل ۱. فیلوگرام ایجاد شده در نرم‌افزار مگا با روش پیوست همسایه‌ها (Neighbor joining) برای توالی ناحیه آی.تی.اس. ۲۴ نمونه از قارچ‌های آگاریک با استفاده از مدل P-distance و با تکرار ۱۰۰۰ بار اعتبارسنجی (Bootstrap). ستاره‌دارها نمونه‌های ایرانی بررسی شده در این تحقیق هستند. گونه *Rhizopogon roseolus* گروه خارجی است.

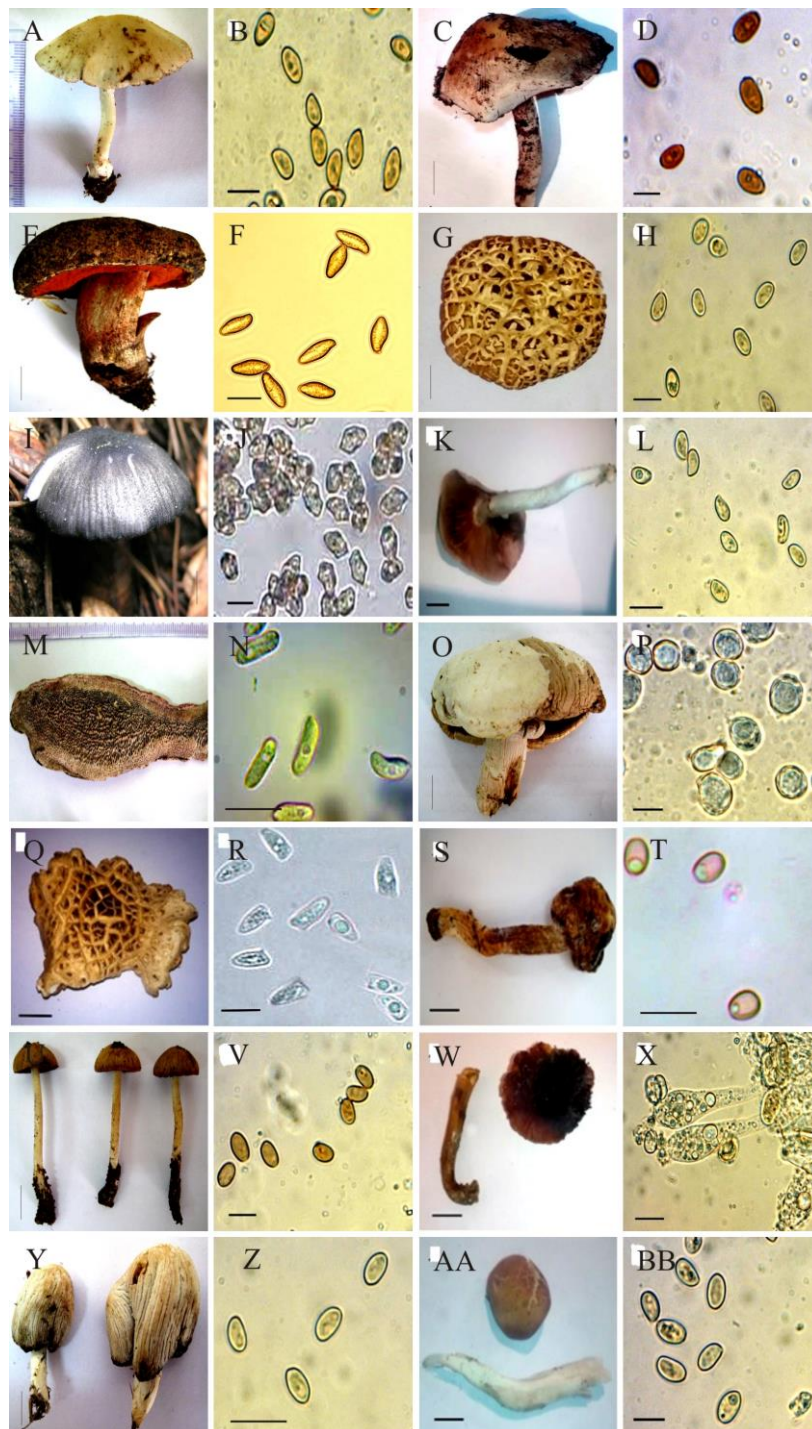


شکل ۲. فیلوگرام ایجاد شده در نرم‌افزار مگا با روش بیشینه درست‌نمایی (Maximum likelihood) برای توالی ناحیه آ.تی.اس. ۲۴ نمونه از قارچ‌های آگاریک با استفاده از مدل K2 (Kimura 2-parameter) و تکرار ۱۰۰۰ بار بوت‌استرپ. ستاره‌دارها نمونه‌های ایرانی بررسی شده در این تحقیق هستند. گونه *Rhizopogon roseolus* گروه خارجی است.

بازیدیوسپورها بیضوی و به‌رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه با سوراخ تندشی مشخص‌اند و اندازه آنها بین $(۷/۵-۱۱/۳) \times ۹/۴$ (۴/۱-۶/۱) میکرومتر است. در توالی‌یابی ناحیه ITS این گونه، ۶۲۲ جفت باز به‌دست آمد که ۹۶ درصد به گونه *Coprinopsis atramentaria* با شماره دسترسی FJ168569 شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی KT833863 در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن ثبت شد.

Coprinopsis atramentaria (Bull.: Fr.) Redhead, 2001.

کلاهک به قطر ۳ سانتی‌متر، به‌رنگ سیاه مایل به خاکستری و تخم‌مرغی است که به‌تدریج حالت زنگوله‌شکل به خود می‌گیرد. در مراحل نهایی کلاهک تجزیه شده و به مایع جوهری سیاه‌رنگی تبدیل می‌شود. اتصال تیغه‌ها از نوع آزاد بوده و رنگ آن در ابتدا سفید است. پایه استوانه‌ای، سفیدرنگ، به طول ۴-۱۰ و قطر ۱-۲ سانتی‌متر است. بازیدیوم‌ها بزرگ و گرزشکل و دارای چهار استریگما هستند.



شکل ۳. مشخصات ریخت‌شناختی قارچ‌های آگاریک. بازیدیوکارب و اسپورهای *Agrocybe praecox* (A, B)، بازیدیوکارب و اسپورهای *Coprinopsis atramentaria* (C, D)، بازیدیوکارب و اسپورهای *Boletus erythropus* (E, F)، بازیدیوکارب و اسپورهای *Cyclocybe cylindracea* (G, H)، بازیدیوکارب و اسپورهای *Entoloma serrulatum* (I, J)، بازیدیوکارب و اسپورهای *Hebeloma alpinum* (K, L)، بازیدیوکارب و اسپورهای *Irpex lacteus* (M, N)، بازیدیوکارب و اسپورهای *Lactarius glaucescens* (O, P)، و اسپورهای بازیدیوکارب و اسپورهای *Lepiota cristata* (Q, R)، بازیدیوکارب و اسپورهای *Pholiota gummosa* (S, T)، بازیدیوکارب و اسپورهای *Psilocybe atrobrunnea* (U, V)، بازیدیوکارب و اسپورهای *Psilocybe cyanescens* (W, X)، بازیدیوکارب و اسپورهای *Stropharia aeruginosa* (Y, Z)، بازیدیوکارب و اسپورهای *Hypholoma fasciculare* (AA, BB). خط مقیاس تمام تصاویر ۱۰ میکرومتر است.

سطحی صاف تا محدب با ترک خوردگی در مرکز است. حاشیه کلاهک گاهی دارای پیچ خوردگی است. تیغه‌ها زرد رنگ و آزادند. طول پایه ۶ و قطر آن ۱ سانتی‌متر و رنگ آن کرم است و در انتها به شکل دسته‌ای دیده می‌شود. سیستم‌دیوم‌ها به ابعاد ۱۲×۳۵ میکرومتر، از نوع pleurocystidia و دارای محتوای کریستالی به رنگ قهوه‌ای درون خود هستند. بازیدیوم چماقی و به ابعاد ۱۰×۳۰ میکرومتر است. بازیدیوسپورها بیضوی همراه یک سوراخ تندشی و به ابعاد $(۷/۲-۹/۴) \times ۸/۳$ (۶-۸) میکرومتر هستند. در توالی‌یابی ناحیه ITS این گونه، ۵۵۴ جفت باز به دست آمد که ۹۵ درصد به گونه *Hypholoma fasciculare* با شماره دسترسی KM44081 شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی KT833860 در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن ثبت شد.

Lactarius glaucescens Crossl., 1900.

کلاهک به قطر ۶ سانتی‌متر، محدب با سطح صاف و چرمی به رنگ سفید با محدوده‌های طلایی‌رنگ است. تیغه‌ها آزاد، نزدیک به هم و به رنگ زرد مایل به نارنجی هستند. پایه هم‌رنگ کلاهک، به طول ۶ و قطر ۱ سانتی‌متر است. بازیدیوسپورها گرد تا کمی بیضوی و توپی هستند و ابعاد آنها $(۸/۲-۱۳) \times ۱۰/۶$ (۷/۵-۱۱) میکرومتر است. بازیدیوم دارای چهار استریگما و سیستم‌دیوم از نوع Cheilocystidia به اندازه ۲۰×۵۰ میکرومتر است. از مشخصات دیگر این جنس ترشح شیرابه است و با ایجاد هر گونه تماس با تیغه‌های قارچ، زخم ایجاد شده و ترشح شیرابه آغاز می‌شود. در توالی‌یابی ناحیه ITS این گونه، ۶۴۳ جفت باز به دست آمد که ۹۶ درصد به گونه *glaucescens* با شماره دسترسی GU258298 شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی KT833866 در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن ثبت شد.

Lepiota cristata (Bolton : Fr.)

P. Kumm., 1871.

کلاهک به قطر ۶ سانتی‌متر، زنگوله‌شکل با

Entoloma serrulatum (Fr.) Hesler, 1967.

کلاهک محدب، به سمت حاشیه موج، به قطر $۳/۵$ سانتی‌متر و به رنگ قهوه‌ای تیره است. تیغه‌ها فشرده و نارنجی‌رنگ‌اند که به تدریج قهوه‌ای می‌شوند. پایه استوانه‌ای، به رنگ قهوه‌ای تیره، به طول ۳ و قطر $۰/۵$ سانتی‌متر است. بازیدیوسپورها چندوجهی و به ابعاد $(۸/۵-۱۳) \times ۱۰/۷۵$ (۶/۵-۹) میکرومتر هستند. در توالی‌یابی ناحیه ITS این گونه، ۶۴۴ جفت باز به دست آمد که ۹۶ درصد به گونه *Entoloma serrulatum* با شماره دسترسی KC898447 شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی KT833862 در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن ثبت شد.

Hebeloma alpinum (J.Favre)

Bruchet, 1970.

کلاهک به قطر ۴ سانتی‌متر، سفید کرمی تا قهوه‌ای، مخروط‌شکل با حاشیه پیچ‌خورده و با فرورفتگی در مرکز دیده می‌شود. نحوه اتصال تیغه‌ها از نوع آزاد است و به صورت فشرده و به رنگ زرد تا قهوه‌ای روشن دیده می‌شود. طول پایه ۶ و قطر آن ۱ سانتی‌متر و رنگ آن سفید است. بازیدیوم دارای چهار استریگما و به ابعاد $۱۰-۱۲ \times ۲۴-۳۴$ میکرومتر و سیستم‌دیوم از نوع Cheilocystidia است. بازیدیوسپورها بادام‌شکل، به رنگ زرد قهوه‌ای و به ابعاد $(۷/۶-۱۰/۸) \times ۹/۵$ (۵/۲-۶/۸) میکرومتر هستند. در توالی‌یابی ناحیه ITS این گونه، ۵۵۰ جفت باز به دست آمد که ۹۳ درصد به گونه *Hebeloma alpinum* با شماره دسترسی KT071012 شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی KT833861 در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن ثبت شد.

Hypholoma fasciculare (Huds.)

P. Kumm., 1871.

کلاهک به قطر ۳ سانتی‌متر، در ابتدا زرد و در نهایت قهوه‌ای کمرنگ، نیم‌کره‌ای تا زنگوله‌ای و دارای

۵ سانتی‌متر است. بازیدیوسپورها بیضوی نامنظم با سطح صاف و به‌رنگ کرمی تا قهوه‌ای روشن به ابعاد $(۵/۹-۹/۱) \times ۷/۵$ ($۳/۸-۵/۳$) میکرومتر هستند. اندازه سیستمیدیوم ۲۵×۱۰ میکرومتر است. در توالی‌یابی ناحیه ITS این گونه، ۵۴۲ جفت باز به‌دست آمد که ۹۵ درصد به گونه *Psilocybe atrobrunnea* با شماره دسترسی HF912351 شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی KT833864 در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن ثبت شد.

Psilocybe cyanescens Wakefield, 1946.

کلاهک ابتدا محدب است که به‌تدریج صاف و موج می‌شود و ۳ سانتی‌متر قطر دارد و به‌رنگ قهوه‌ای مایل به آجری است. پایه به طول ۴ و به قطر $۰/۵$ سانتی‌متر، استوانه‌ای و سفید است و در اثر ضربه تغییر رنگ می‌دهد. تیغه‌ها آزاد، به‌رنگ آجری مایل به قهوه‌ای‌اند. بازیدیوسپورها بیضوی، قهوه‌ای و به ابعاد $(۷/۱-۱۰) \times ۸/۵$ ($۳/۸-۶$) میکرومتر هستند. بازیدیوم‌ها دارای چهار استریگما و به ابعاد ۱۵×۳۵ میکرومتر هستند. در توالی‌یابی ناحیه ITS این گونه، ۵۳۴ جفت باز به‌دست آمد که ۹۵ درصد به گونه *Psilocybe cyanescens* با شماره دسترسی LN714596 شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی KT833857 در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن ثبت شد.

Stropharia aeruginosa (Curtis: Fr.)

Quél., 1872.

کلاهک محدب با سطح صاف و بسیار لزج، به‌قطر ۵-۶ سانتی‌متر و به‌رنگ آبی مایل به سبز است. پایه ۴ سانتی‌متر طول و ۱ سانتی‌متر قطر دارد. تیغه‌ها متصل به پایه، فشرده و سفیدند. بازیدیوسپورها بیضوی، کرم‌رنگ و به ابعاد $(۶/۷-۸) \times ۷/۳۵$ ($۳/۵-۵$) میکرومتر هستند. سیستمیدیوم از نوع Cheilocystidia و به ابعاد ۲۲×۷ میکرومتر است. بازیدیوم دارای ۲-۴ استریگما و به ابعاد ۲۰×۱۲

برآمدگی مرکزی و به‌رنگ زرد متمایل به نارنجی است که به‌سمت حاشیه کرمی رنگ می‌شود و در مراحل تکمیلی رشد شکاف می‌خورد و بقایا به‌شکل پولک‌هایی به‌رنگ قرمز قهوه‌ای روی زمینه سفید کلاهک دیده می‌شوند. تیغه‌ها آزاد، نزدیک به هم و رنگ آنها در ابتدا سفید و سپس قهوه‌ای است. پایه دارای قاعده متورم است که به طرف بالا باریک شده و هم‌رنگ کلاهک به طول ۵ و قطر $۰/۳-۰/۲$ سانتی‌متر است. بازیدیوسپورها به‌شکل گلوله یا فشنگ به ابعاد $(۶/۸-۱۰/۲) \times ۸/۵$ ($۴-۵/۵$) میکرومتر هستند. در توالی‌یابی ناحیه ITS این گونه، ۵۲۳ جفت باز به‌دست آمد که ۹۲ درصد به گونه *Lepiota cristata* با شماره دسترسی GQ203814 شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی KT833859 در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن ثبت شد.

Pholiota gummosa (Lasch) Singer, 1951

کلاهک به‌شکل محدب، به قطر $۳/۵$ سانتی‌متر، به‌رنگ قهوه‌ای تیره و دارای سطحی صاف است. پایه به طول ۶ و قطر ۱ سانتی‌متر و به‌رنگ زرد است. تیغه‌ها آزاد و فشرده‌اند. بازیدیوسپورها بیضوی و به‌رنگ زرد به ابعاد $(۸/۳-۹/۴) \times ۸/۸$ ($۳/۳-۵/۲$) میکرومتر هستند. در توالی‌یابی ناحیه ITS این گونه، ۴۸۹ جفت باز به‌دست آمد که ۹۰ درصد به گونه *Pholiota gummosa* با شماره دسترسی AF195605 شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی KT833858 در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن ثبت شد.

Psilocybe atrobrunnea (Lasch)

Gillet, 1878.

کلاهک محدب، به قطر ۳ سانتی‌متر، به‌رنگ قرمز تیره تا قهوه‌ای، با سطح صاف، در مرکز اندکی برآمده که هنگام بلوغ سطح آن شکاف خورده است. کلاهک دارای شیار است؛ تیغه‌ها فاصله‌دار و متصل به پایه‌اند که ابتدا قهوه‌ای روشن هستند و در نهایت قهوه‌ای تیره می‌شوند. پایه استوانه‌ای، سفت و قهوه‌ای به طول

اخیر در تاکسونومی قارچ‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی، برای تأیید تشخیص مطالعات ریخت‌شناختی، از ویژگی‌های مولکولی نیز استفاده شد. نشانگرهای مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و روش‌های غیرمبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به طور گسترده‌ای برای شناسایی قارچ‌های آگاریک استفاده شده است (Fonseca et al., 2008; Pawlik et al., 2012). توالی‌های تکراری دی.ان.ای. هسته‌ای ابزار قدرتمندی برای شناسایی و مطالعات فیلوژنتیکی قارچ‌های آگاریک هستند (Lee et al., 2006; Nei, 1987). در این بررسی توالی دوازده نمونه از قارچ‌های آگاریک با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد که همه نمونه‌ها شباهت ۹۰ تا ۹۸ درصدی با توالی‌های موجود در بانک ژن داشتند. نتایج بررسی این ناحیه ژنی با نتایج تحقیقات مورفولوژیکی هماهنگی داشت و نشان داد که توالی ناحیه ITS می‌تواند برای شناسایی قارچ‌های آگاریک مفید باشد. در ایران بیشتر مطالعات صورت‌گرفته در خصوص قارچ‌های آگاریک، بر اساس خصوصیات مورفولوژیک بوده (Asef, 2008; Asef, 2007; Fadavi et al., 2013) که تأیید صحت گونه‌های شناسایی‌شده با توجه به معرفی گونه‌های جدید در جهان و از طرفی وجود گونه‌های نهفته، لزوم استفاده از روش‌های مولکولی را پررنگ‌تر می‌کند. بیشتر نمونه‌های ما با نمونه‌های خارج از ایران، در بانک ژن شباهت داشتند که بیانگر ناچیز بودن داده‌ها برای قارچ‌های آگاریک ایران در بانک ژن است. شناسایی مولکولی قارچ‌های آگاریک می‌تواند سبب غنی شدن و ایجاد اطلاعات درباره تنوع زیستی این گروه از قارچ‌ها شود و همچنین افزایش داده‌های مولکولی در پایگاه‌های ژنی به آنالیز فیلوژنتیکی مولکولی کمک می‌کند.

بلوط هستند. در جنگل‌های معتدل و بارانی، ۹۵ درصد گیاهان با ۵۰۰۰ تا ۶۰۰۰ گونه از بازیدیومیست‌ها یا آسکومیست‌ها تشکیل می‌کوریز خارجی می‌دهند (Martin et al., 2001; Buscot et al., 2000). میکوریز خارجی به‌واسطه جذب بهتر مواد غذایی و حفاظت علیه بیمارگرهای گیاهی، تأثیر مثبتی بر رشد گیاهان در طبیعت دارد. گونه *H. alpinum* برای فلور قارچی ایران جدید است و اولین بار گزارش می‌شود. گونه *L. glaucescens* از ساری و گونه *Boletus erythropus* از ارسباران گزارش شده است (Saber, 1997; Asef, 2007, 2008). گونه *Coprinopsis atramentaria* از خانواده *Psathyrellaceae* و گونه *Entoloma serrulatum* از خانواده *Entolomataceae* هر دو ساپروفیت هستند و به‌صورت منفرد یا دسته‌جمعی روی چوب‌های در حال فساد رشد می‌کنند. گونه *C. atramentaria* خوراکی است، اما برای افراد الکلی به‌دلیل وجود ماده کوپرین توصیه نمی‌شود. این گونه همچنین از کرج و چالوس گزارش شده است (Soleimani, 1976). گونه *E. serrulatum* برای فلور قارچی ایران جدید است و اولین بار گزارش می‌شود. گونه *Irpex lacteus* از خانواده *Steccherinaceae* سبب پوسیدگی درختان جنگلی می‌شود. این گونه همچنین از روی درختان آکاسیا، بلوط و مرکبات در ایران گزارش شده است (Ershad, 2009). گونه *Lepiota cristata* از خانواده *Agaricaceae* و زیررده *Agaricomycetidae* است. این گونه ساپروفیت است و به‌صورت منفرد یا دسته‌جمعی رشد می‌کند. این گونه از فومان و کرج گزارش شده است (Zokaei, 2001; Mohammadi Goltepeh, 2002; Saber 1995). همه گونه‌های مذکور با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناختی شناسایی شدند، اما با توجه به تغییرات

References

- Asef, M.R. & Tavanaei, G. (2004). Preliminary identification of macromycetes of Arasbaran (East Azarbaijan). *Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress*, 473.
- Asef, M.R. (2007). Macrofungi flora of Arasbaran, 1. *Cortinari* subgenus *Myxacium*. *Rostaniha*, 8(2), 178–185.
- Asef, M.R. (2008). Macrofungi of Arasbaran (NW Iran). 2. Bolete fungi (Families Boletaceae and Suillaceae). *Rostaniha*, 9(2), 210-229.
- Borovička, J. (2008). The wood-rotting bluing Psilocybe species in central Europe - an identification key. *Czech Mycology*, 60 (2), 173–192.
- Borowicz, V.A. (2001). Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations? *Ecology*, 82 (11), 3057 – 3068.
- Buscot, F., Munch, J.C., Charcosset, J.Y., Gardes, M., Nehls, U., & Hampp, R. (2000). Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in the ecosystem. *FESM Microbiology Reviews*, 24, 601-614.
- Dallas, E.M & Burgin, A. B. (2006). *Among the Mushrooms*. Drexel Biddle, Publisher, 55 p.
- Desjardin, D.E., Wood, M.G. & Stevens, F.A. (2015). *California Mushrooms: The Comprehensive Identification Guide*. Timber Press: Portland, OR. 560 p.
- Doveri, F. (2004). *Fungi Fimicoli Italici*. Associazione Micologica Bresadola: Trento, Italy. 1104 p.
- Ershad, D. (2009). Fungi of Iran. Ministry of Jihad-e-Agriculture Agricultural Research, Education and Extension Organization Iranian Research Institute of Plant Protection. 531p.
- Fadavi, S., Aref, M.R. & Abbasi, S. (2013). A contribution to the identification of agaric fungi of Kermanshah province, W Iran. *Rostaniha*, 14(2), 95-107
- Fiore-Donno, A. M. & Martin, F. (2001). Populations of ectomycorrhizal *Laccaria amethystina* and *Xerocomus* spp. show contrasting colonization patterns in a mixed forest. *New Phytologist*, 152(3), 533–542 pp.
- Fonseca, G. G., Gandra, E. A. L. F., Sclowitz, A. P. A., Correa, J. A. J. Costa & Levy, J. A. (200). Oyster mushrooms species differentiation through molecular markers RAPD, *International Journal of Plant Breeding and Genetics*, 2, 13–18.
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95(6), 641-655 pp.
- Heidari, M., Namiranian, M., Gahramani, L., Zobeiri, M. & Shabanian, N. (2013). Study of vertical and horizontal forest structure in Northern Zagros Forest (case study: West of Iran, Oak forest). *European Journal of Experimental Biology*, 3(1), 268-278.
- HosseinZadeh, G., Aazame, A. & Mohammadpur, M. (2015). Investigate the factors associated with the spread of oak decline ups and downs in the Black Forest Ham attack. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 1, 190-197.
- Khodagholi, M., Mokhtari, E. & Montazeri, M. (2016). Acclimation of *Quercus brantii* in Chaharmahal and Bakhtiari province. *Iranian Journal of Forest*, 7(4), 433-446.
- Kim, S.J., Hiremath, S.T. & Podila, G.K. (1999). Cloning and identification of symbiosis-regulated genes from the ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Mycological Research*, 103,168-172.
- Lee, J.S., Lim, M.O. Cho, K.Y. Cho, J.H. Chang, S.Y. & Nam, D.H. (2006). Identification of medicinal mushroom species based on nuclear large subunit rDNA sequences. *Journal of Microbiology*, 44(1), 29–34.

- Luppi, A.M. & Gautero, C. (1967). Recherche sulle micorrize di *Quercus robur*, *Q. petraea* e *Q. pubescens* in Piemonte. *Allonia*, 13, 129-148.
- Mirzaee, H. (1995). Impact on rangeland vegetation canopy and forest floor in Kermanshah. Master's Thesis, Tarbiat Modares University, 122.
- Mohammadi Goltapeh, E. (2002). Identification of five species of *Lepiota* from Iran. *Rostaniha*, 3, 95–106 (in Persian) and 39–46 (in English).
- Mohammadi Kangarani, H., Shamekhi, T., Babae, M., Ashtarian, K. & Arab, D.R. (2009). Policy-making between institution, forest and water variables by path analysis method (case study; Vezg watershed/ Kohgiluyeh va Boyer-Ahmad province). *Iranian Journal of Forest*, 1(4), 345-359.
- Najafi Harsini, F., Oladi, R. & Pourtahmasi, K. (2018). The mutual relationship between earlywood vessel features of Persian oak (*Quercus brantii* Lindl.) and tree mortality. *Iranian Journal of Forest*, 10(2), 167-179.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Pawlik, A., Janusz, G., Koszerny, J., Małek, W. & Rogalski, J. (2012). Genetic diversity of the edible mushroom *Pleurotus* sp. by amplified fragment length polymorphism. *Current Microbiology*, 65(4), 438–445.
- Ranjbar, A., Ghrmanee, L. & Pourhashemi, M. (2012). The consequences of pollarding (Prune) the biometric characteristics libani trees (*Quercus libani* Oliv.) In forests, like the city of Baneh. *Forest and Poplar Research*, 20, 578-594.
- Saber, M. (1993). Contribution to the knowledge of Bolbiticaceae (Agaricales) collected in Iran. *Proceedings of the 11th Iranian Plant Protection Congress*, 290.
- Saber, M. (1995). New records of Agaricales from Iran. *Proceedings of the 12th Iranian Plant Protection Congress*, 376.
- Saber, M. (1997). *Lactarius glaucescens*, a new record for Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 33, 218 (in Persian) & 74–75 (in English).
- Saber, M. & Mehravaran, H. (2004). A report on Macromycete fungi from Orumieh (West Azarbaijan). *Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran*, 465.
- Soleimani, P. (1976). Wood destroying fungi in Iran. *European Journal of Forest Pathology*, 6, 75–79.
- Watling, R. (1982). *British Fungus Flora: Agarics and Boleti*. Vol 3. Bolbitiaceae: *Agrocybe*, *Bolbitius* and *Conocybe*. Royal Botanic Garden: Edinburgh, Scotland. 139 p.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research*, 22, 4673–4680.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: "PCR Protocols: A guide to methods and applications", (Eds.): Gelfand, M. A., Sninsky, D. H. and White, T. J.. Academic Press, San Diego, CA, PP. 315-322.
- Zokaei, M. (2001). Identification of Agaricales collected in Mashhad area. *Rostaniha*, 2, 7–14 (in Persian with English summary).



Studying and identification of agaric fungi in oak forests of Kermanshah province

F. OmidAli¹, S. Jamali^{2*}, and S. Abbasi³

¹M.Sc., Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, I. R. Iran

²Assistant Prof., Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, I. R. Iran

³Associate Prof., Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, I. R. Iran

(Received: 14 March 2018, Accepted: 10 October 2018)

Abstract

Agaric fungi are a large group of Basidiomycetes that known as mushrooms in the broad sense. In order to identify and characterize the agaric fungi in oak forests of Kermanshah province, specimens were collected in 2014-2015. Microscopic and macroscopic characteristics including size and color of cap and stem, size and shape of basidia, the number of strigma, size, shape and color of spores and cystidia type were checked. Both morphological and ITS sequencing were used for identification. DNA extraction was carried out using a Genomic DNA Purification kit. The ITS1, 5.8S, and ITS2 (ITS) Regions were amplified using ITS1 and ITS4 primers. Fragments about 600 bp were amplified and after sequencing deposited in GenBank. Based on both morphological and molecular characteristics *Agrocybe praecox* (KT833856), *Cyclocybe cylindracea* (KT833863), *Coprinopsis atramentaria* (KT833863), *Entoloma serrulatum* (KT833862), *Hebeloma alpinum* (KT833861), *Hypholoma fasciculare* (KT833860), *Lactarius glaucescens* (KT833859), *Lepiota cristata* (KT833859), *Pholiota gummosa* (KT833858), *Psilocybe atrobrunnea* (KT833864), *Psilocybe cyanescens* (KT833857), *Stropharia aeruginosa* (KT833865). *Boletus erythropus* and *Irpex lacteus* were identified in Kermanshah province. *Hebeloma alpinum*, *Entoloma serrulatum* and *Cyclocybe cylindracea* are new for Iran mycoflora. All representatives were deposited in fungal collection of Plant Protection Department, Razi University, Kermanshah, Iran.

Keywords: Agaric Fungi, Oak forest, ITS region of rDNA, Kermanshah