

## The First Report of *Panaeolus Olivaceus* and *Panaeolus Guttulatus* from Iran

Elham Seidmohammadi<sup>1</sup>, Saeed Abbasi<sup>2\*</sup>, Mohammad Reza Asef<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc. Graduate of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

### Abstract

During macrofungal surveys continually undertaken from 2014 to 2017 at different locations of Eslamabad-e Gharb and Gilan-e Gharb, Kermanshah Province, a large number of agaric fungi including two specimens belonging to the genus *Panaeolus* were collected. At the collection site, while recording geographical coordinates, habitat characteristics, growth patterns, and macroscopic morphological features were recorded and photographed. Microscopic features including basidiospores, basidia, and cystidia were observed, measured, and illustrated using a light microscope, OLYMPUS BX51. Also, the DNA sequence of the rDNA-ITS region was amplified and sequenced using ITS1 and ITS4 primers. The phylogenetic analysis and the determination of species relationships were performed by the Maximum Likelihood method with 1000 repetitions of 1000 bootstrap replicates using the MEGA6 software. Based on the results obtained from morphological examinations along with data obtained from ITS- rDNA sequences, two species including *Panaeolus olivaceus* and *Panaeolus guttulatus* were identified. According to the literature, both species were new records for mycobiota of Iran. In the present paper, the morphological description of the mentioned species is presented.

**Key words:** Eslamabad-e Gharb, Agaric, Macrofungi, Kermanshah.

\* abbasikhs@yahoo.com

## اولین گزارش از *Panaeolus olivaceus* و *Panaeolus guttulatus* در ایران

الهام صید محمدی<sup>۱</sup>، سعید عباسی<sup>۲\*</sup>، محمدرضا آصف<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته کارشناسی ارشد گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

<sup>۳</sup> استادیار بخش تحقیقات رستنی‌ها، مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

### چکیده

طی نمونه برداری‌های مستمر انجام شده از سال ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۶ در مناطق مختلف شهرستان‌های اسلام‌آباد غرب و گیلان غرب واقع در استان کرمانشاه، تعداد زیادی از قارچ‌های کلاهک‌دار از جمله دو نمونه متعلق به جنس *Panaeolus* جمع‌آوری شد. در محل نمونه برداری، ضمن ثبت مختصات جغرافیایی، ویژگی‌های زیستگاه و نحوه رویش، ویژگی‌های ریخت‌شناختی ماکروسکوپی ثبت و از آنها عکس برداری شد. ویژگی‌های ریخت‌شناختی میکروسکوپی شامل بازیدیوسپور، بازیدیوم و سیستم‌دیوم با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل BX51 مشاهده، اندازه‌گیری و عکس برداری شد؛ همچنین توالی DNA مربوط به ناحیه ITS-rDNA با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 تکثیر و تعیین توالی شد. تجزیه و تحلیل تبارشناختی و تعیین روابط گونه‌ها به روش Maximum Likelihood با ۱۰۰۰ تکرار بوت‌استرپ و با نرم‌افزار MEGA6 انجام شد. براساس نتایج مطالعات ریخت‌شناختی، در کنار داده‌های حاصل از توالی‌های ناحیه ITS-rDNA، دو گونه *P. guttulatus* و *P. olivaceus* شناسایی شد. طبق منابع موجود، هر دو گونه برای بیوتای قارچی ایران، جدید هستند. در پژوهش حاضر، توصیف ریخت‌شناختی این گونه‌ها ارائه شده است.

**واژه‌های کلیدی:** اسلام‌آباد غرب، آگاریک، قارچ‌های ماکروسکوپی، کرمانشاه.

### مقدمه

از آنها در مراتع رشد می‌کنند. اسپورها، سیاه‌رنگ و بلوغ آنها غیریکنواخت است؛ به همین دلیل در بخش‌هایی از تیغه که اسپورها بالغ شده‌اند، رنگ تیغه نسبت به قسمت‌هایی که اسپورها هنوز نابالغ هستند، تیره‌تر است و تیغه‌ها ظاهری خال‌دار دارند. برخی از گونه‌های این جنس دارای ترکیب‌های سیلوساییین و

جنس *Panaeolus* (Fr.) Quél دربرگیرنده گونه‌های آگاریک ساپروتروف با اندام باردهی کوچک تا متوسط و اسپورهای تیره است. این جنس شامل حدود ۷۷ گونه می‌شود (Kirk, 2019). گونه‌های جنس *Panaeolus* بیشتر کوددوست هستند و تعدادی

\* abbasikhs@yahoo.com

Copyright©2019, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

Doi: [10.22108/tbj.2020.118170.1093](https://doi.org/10.22108/tbj.2020.118170.1093)

موجود، *Panaeolus* و آرایه‌های وابسته آن بهتر است در خانواده‌ای جدید و در موقعیتی بین *Bolbitiaceae* و *Psathyrellaceae* قرار گیرند (Tóth et al., 2013). تاکنون هشت گونه از این جنس از ایران گزارش شده است (جدول ۱). در این مطالعه، ضمن ارائه ارزیابی‌های تبارشناختی، توصیف ریخت‌شناختی دو گونه جدیدی ارائه شده است که پیش از این از ایران گزارش نشده‌اند.

در نتیجه توهم‌زا هستند (Webster and Weber, 2007). گونه‌های جنس *Panaeolus* که در گذشته در زمره اعضای تیره *Coprinaceae* طبقه‌بندی می‌شدند (Singer, 1986)، با تغییراتی که در طبقه‌بندی انجام شد، در خانواده *Psathyrellaceae* قرار گرفتند؛ حال آنکه برخی قارچ‌شناسان این جنس را در خانواده *Bolbitiaceae* طبقه‌بندی کرده‌اند (Matheny et al., 2006)؛ با این حال موقعیت سیستماتیک این جنس هنوز معلوم نیست (Kirk, 2019). براساس داده‌های

جدول ۱- گونه‌های گزارش شده جنس *Panaeolus* از ایران

Speices	Locality	References
<i>Panaeolus fimicola</i>	Arasbaran	(Asef, 2007)
<i>P. sphinctrinus</i>	Ahar	(Watling and Sweeney, 1974)
<i>P. papilionaceus</i>	Tonekabon,	(Saber, 1995)
<i>P. phalaenarum</i>	Chalus	(Watling and Sweeney, 1974)
<i>P. rickenii</i>	Mashhad	(Zokaei, 2001)
<i>P. serotinus</i>	-	(Saber, 1994)
<i>P. stipticus</i>	-	(Saber, 1994)
<i>P. subbalteatus</i>	Golestan	(Arefipour et al., 2006)
<i>P. subfirmus</i>	-	(Saber, 1994)
<i>P. teutonicus</i>	Amol	(Watling and Gregory, 1977)

در استان کرمانشاه بازدید شد. برای ثبت ارتفاع و مختصات جغرافیایی، از دستگاه مکان‌یاب GPS استفاده شد. در محل نمونه‌برداری، ضمن ثبت ویژگی‌ها، از تمامی نمونه‌ها از زوایای مختلف، به کمک دوربین دیجیتال Samsung S6 عکس‌برداری شد. نمونه‌ها در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه از نمونه‌ها برش‌های میکروسکوپی تهیه شد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری و شناسایی ریخت‌شناختی

جمع‌آوری نمونه‌های قارچی طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۶ با نمونه‌برداری‌های مستمر و در فصول مختلف سال به‌ویژه فصل بهار و پاییز انجام شد؛ به این منظور مناطق مختلف ارتفاعات قلاجه و دشت‌های اطراف، در حد فاصل شهرهای اسلام‌آباد غرب و گیلان غرب واقع

محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. توالی‌های به دست آمده برای هر یک از نمونه‌ها، با استفاده از نسخه هفت نرم‌افزار BioEdit، ویرایش شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی ویرایش شده در مجموعه داده‌های ژنی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) ثبت و شماره دسترسی آنها دریافت شد.

### ارزیابی‌های تبارشناختی

توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار BLAST جستجوی دیگر توالی‌های موجود در مجموعه داده‌های ژنی (NCBI, USA) مقایسه و نزدیک‌ترین توالی‌ها شناسایی شد. ردیف چینی چندگانه با نرم‌افزار Clustal W انجام شد. تجزیه و تحلیل تبارشناختی و تعیین روابط گونه‌ها به روش Maximum Likelihood با تکرار ۱۰۰۰ بوت‌استرپ با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 انجام شد (Tamura et al., 2013).

### نتایج و بحث

بین گونه‌های شناسایی شده در این مطالعه، دو نمونه از جنس *Panaeolus* شامل *P. olivaceus* (MH593015) و *P. guttulatus* (MH592651) بر پایه ویژگی‌های ریخت‌شناختی شناسایی شدند. درباره گونه *P. olivaceus*، درصد تشابه توالی DNA با دیگر توالی‌های همین گونه در بانک داده‌های ژنی، تشابه بیش از ۹۹ درصدی نشان داد؛ اما براساس جستجوی بلاست درباره *P. guttulatus*، با وجود انطباق

برش‌های میکروسکوپی در آب مقطر و معرف ملزر با استفاده از میکروسکوپ Olympus مدل BX51 بررسی شدند. به منظور ثبت ویژگی‌های میکروسکوپی و سایر ساختارهای میکروسکوپی، از حداکثر ۲۰ مورد با عدسی چشمی Dino eye lens 30 mm و نرم‌افزار Dino capture عکس برداری و ابعاد اسپور به کمک همین نرم‌افزار اندازه‌گیری شد. به منظور شناسایی آرایه‌ها از کلیدهای شناسایی معتبر (Gerhardt, 2008; Hansen and Knudsen, 1992) و مقاله‌های تخصصی مرتبط استفاده شد.

### استخراج DNA و تکثیر ناحیه ITS-rDNA

استخراج DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت دنازیست (Denazist Asia) انجام شد. توالی نوکلئوتیدی DNA ناحیه ترانویسی‌شونده داخلی ریبوزومی (ITS1-5.8S-ITS2) با آغازگرهای ITS1 و ITS4 تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با دستگاه ترموسایکلر (مدل Biometra، شرکت Analytic Jena، آلمان) انجام شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، شامل ۲۵ میکرولیتر 2X PCR Master Mix (شرکت سیناکلون)، یک میکرومول از هر کدام از پرایمرها و ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز براساس برنامه‌ای زمانی شامل واسرشتگی ابتدایی در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، هم‌جوشی در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه، انجام شد.

اسپورها، بیضوی تا لیمویی شکل دارای سطحی صاف، دارای سوراخ تندش مرکزی و رنگ آنها قهوه‌ای تیره است. ابعاد اسپور  $10/6-12/8 \times 7/2-9/1$  میکرومتر است (شکل ۱-۱). بازیدیوم‌ها، گریزی شکل و دارای چهار استریگمای بزرگ است که با فاصله از یکدیگر قرار دارند (شکل ۱-۲). سیستیدیوم‌های لبه تیغه به صورت استوانه‌ای تا گریزی شکل هستند. این گونه، روی خاک، به صورت گروهی جمع آوری شد.

نمونه‌های بررسی شده: استان کرمانشاه، شهرستان اسلام‌آباد غرب - روستای داربادام، E631749، N3765171، ۹۵/۱/۳۱ (IRAN 16962 F).

*Panaeolus guttulatus* Bres., *Fungi. trident.*  
1(3): 36 (1883)  
(Agariceles)

کلاهک، در ابتدای رشد مخروطی است و سپس تا حدودی مسطح می‌شود. رنگ کلاهک، خاکستری مایل به سیاه و در حاشیه روشن تر است. در شرایط مرطوب، کلاهک حالت خیس خورده به خود می‌گیرد. سطح کلاهک صاف است و حدود دو سانتی‌متر قطر دارد (شکل ۲-۱). تیغه‌ها، تا حدودی متراکم و نحوه اتصال آنها به پایه از نوع *adnate* است. رنگ تیغه‌ها خاکستری تیره و در حاشیه روشن تر است. در بین تیغه‌ها، تیغک‌ها هم دیده می‌شوند (شکل ۲-۲). نقش اسپور، قهوه‌ای مایل به سیاه است. پایه، توخالی، استوانه‌ای و به رنگ خاکستری است. اتصال پایه به کلاهک به صورت مرکزی است. ارتفاع پایه، حدود سه سانتی‌متر و قطر آن یک سانتی‌متر است. پایه، فاقد حلقه و در سطح خود دارای پوشش آردی است. اسپورها، بیضوی، صاف و دارای سوراخ تندش مرکزی هستند.

ویژگی‌های ریخت‌شناختی نمونه موجود با این گونه، نمونه حاضر از نظر توالی DNA دارای قرابت کافی با توالی‌های موجود *P.guttulatus* در بانک داده‌های ژنی نیست؛ از این رو به نظر می‌رسد که گونه *P.guttulatus* گونه‌ای کمپلکس است؛ با این حال تفکیک گونه‌ها، نیازمند دسترسی به توالی‌های چند ژن برای تجزیه و تحلیل تبارشناختی است که در حال حاضر داده‌های کافی درباره این گونه در بانک داده‌های ژنی موجود نیست؛ بنابراین نمونه حاضر به استناد ویژگی‌های ریخت‌شناسی با نام گونه *P.guttulatus* گزارش می‌شود.

براساس داده‌های موجود این دو گونه، پیش از این از ایران گزارش نشده‌اند. توصیف ریخت‌شناختی این دو گونه به شرح زیر است:

*Panaeolus olivaceus* F.H. Møller, *Fungi of the Faeröes, Part I: Basidiomyceten*: 171 (1945)  
(Agariceles)

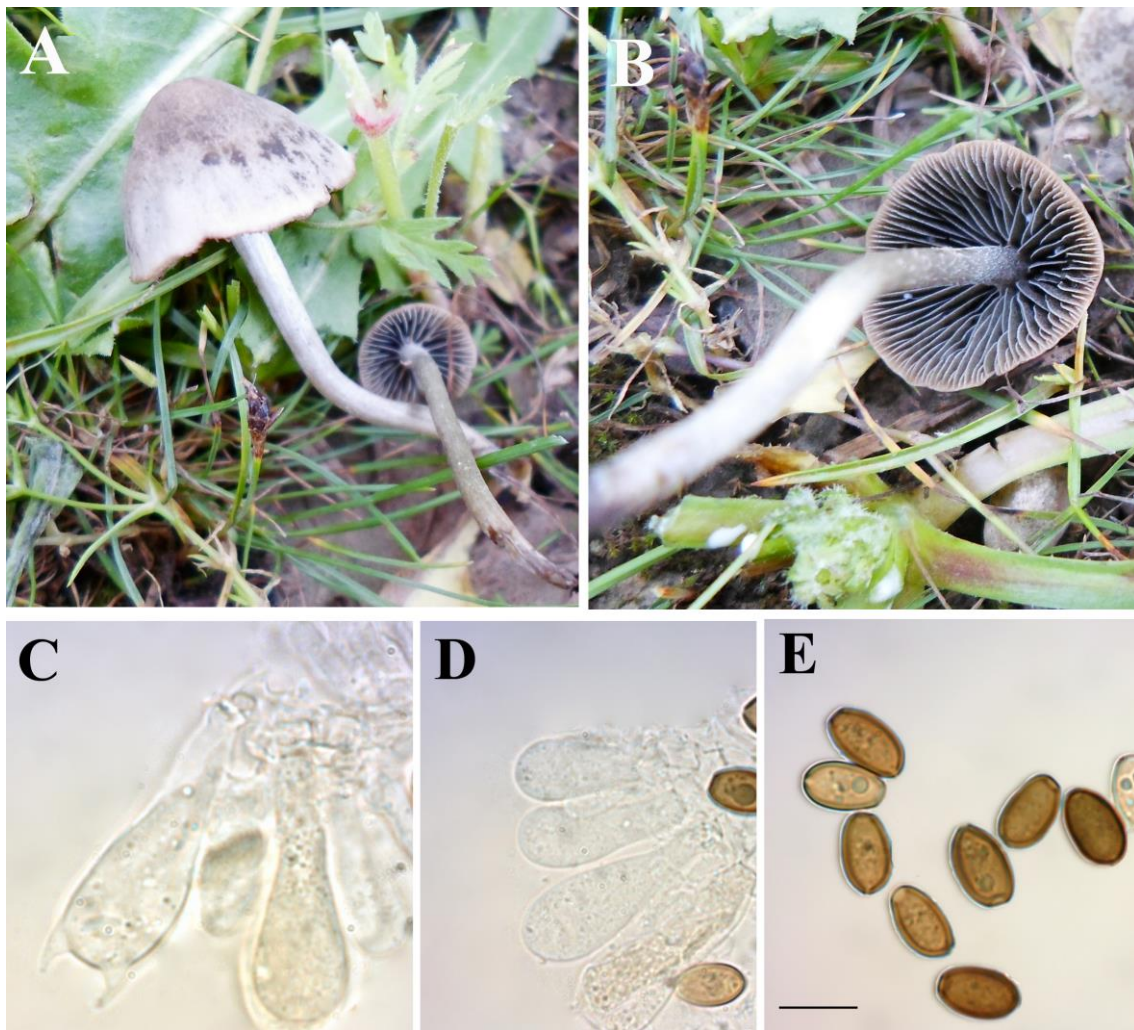
کلاهک، در ابتدای رشد محدب است و سپس تا حدودی مسطح می‌شود. رنگ کلاهک قهوه‌ای است و در شرایط مرطوب، حالت خیس خورده به خود می‌گیرد. سطح کلاهک صاف است و حدود دو سانتی‌متر قطر دارد (شکل ۱-۱). تیغه‌ها، تا حدودی متراکم و نحوه اتصال آنها به پایه از نوع *adnexed* است. رنگ تیغه‌ها، قهوه‌ای تیره است و در بین آنها تیغک هم دیده می‌شود. نقش اسپور، قهوه‌ای مایل به سیاه است. پایه، استوانه‌ای، به رنگ قهوه‌ای و فاقد حلقه است و به صورت مرکزی به کلاهک اتصال دارد. ارتفاع پایه، حدود چهار سانتی‌متر و قطر آن یک سانتی‌متر و در سطح خود دارای پوشش آردی است.

تیغه، از نوع گرزنی شکل هستند که در نوک آنها قطره‌های چسبناک زردرنگی دیده می‌شود (شکل ۲-d). نمونه‌های بررسی شده: استان کرمانشاه، شهرستان گیلان غرب - منطقه میان‌دار، E587462، N3771431، ۹۵/۱/۳۰ (IRAN 16961 F).

اغلب دو قطره روغنی در داخل اسپورها دیده می‌شود. ابعاد اسپور  $4/7-5/1 \times 7/7-8/9$  میکرومتر است (شکل ۲-e). بازیدیوم‌ها، گرزنی شکل و دارای چهار استریگما هستند (شکل ۲-c). این گونه فاقد سیستیدیوم‌های دو طرف تیغه است. سیستیدیوم‌های لبه



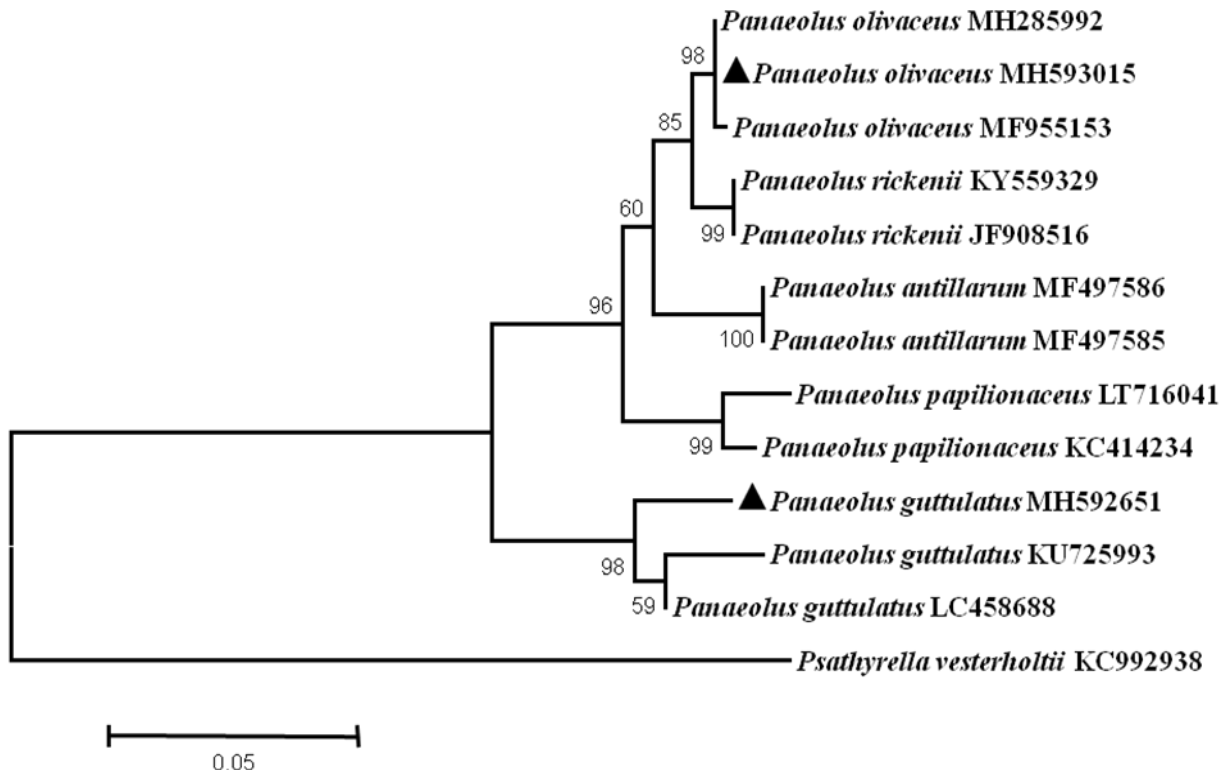
شکل ۱- ریخت‌شناسی گونه *Panaeolus olivaceus*: a: کلاهک، b: بازیدیوم و c: اسپورها (مقیاس: ده میکرومتر)



شکل ۲- ریخت‌شناسی گونه *Panaeolus guttulatus*: a: بازیدیوکارپ، b: تیغه‌ها و پایه، c: بازیدیوم، d: سیستیدیوم‌ها و e: اسپورها (مقیاس: ده میکرومتر)

در آنالیز فیلوژنتیکی براساس توالی نوکلئوتیدی DNA ناحیه ترانوسی‌شونده داخلی ریبوزومی ITS- $\alpha$  DNA (ITS1-5.8S-ITS2) گونه‌های شناسایی شده در گروه‌های تک‌نمایی همراه با سایر گونه‌های معتبر از دیگر مناطق دنیا قرار گرفت (شکل ۳)؛ با این حال درباره *P. guttulatus*، نمونه حاضر از نظر توالی DNA دارای قرابت کافی با توالی‌های موجود *P. guttulatus* در بانک داده‌های ژنی نبود؛ از این رو نمونه حاضر به استناد ویژگی‌های ریخت‌شناختی با نام گونه موجود در بانک داده‌های ژنی میسر نیست.

*P. guttulatus* گزارش می‌شود. انطباق ویژگی‌های ریخت‌شناختی نمونه حاضر با گونه *P. guttulatus* و همچنین درصد تشابه ناکافی توالی DNA این نمونه با توالی‌های موجود در بانک داده‌های ژنی نشان می‌دهد گونه *P. guttulatus* گونه‌ای کمپلکس است؛ با این وجود در حال حاضر، پاسخ‌گویی به ابهامات موجود درباره این گونه، با توجه به ناکافی بودن داده‌های ژنی موجود در بانک داده‌های ژنی میسر نیست.



شکل ۳- درخت فایلوژنتیکی ترسیم شده براساس توالی ناحیه ITS نمونه‌های منتخب *Panaeolus* با استفاده از نرم‌افزار Mega ver. 6.0 به روش Maximum Likelihood با تکرار ۱۰۰۰ بوت‌استرپ. نمونه‌های ایرانی با مثلث سیاه‌رنگ مشخص شده‌اند

## منابع

- Arefipour, M. R., Askary, H., Salari, A. N., Hamzehzarghani, H., Boujari, J., Zahedi, M. and Zeinali, S. (2006) Introduction of hallucinogenic mushrooms new to Iran mycoflora from north and west forests of Iran. In: Proceedings of 17th Iranian Plant Protection Congress, 2-5 September, Karaj, Iran (in Persian).
- Asef, M. R. (2007) Agaric flora of northwest forests of Iran. In: Proceedings of 15th Congress of European Mycologists, 16-21 September, Saint Petersburg, Russia.
- Gerhardt, E. (2008) *Panaeolus* (Fr.) Quél. In: H. Knudsen & J. Vesterholt (eds), *Funga nordica*. Agaricoid, boletoid and cyphelloid genera, pp. 646-651. Nordsvamp, Copenhagen.
- Hansen, L. and Knudsen, H. (1992) *Nordic Macromycetes: Vol. 2. Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales*. Nordsvamp. p.
- Kirk, P. M. (2019) *Species Fungorum* (version Oct 2017). In: *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist* (Roskov Y., Ower G., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., Nieuwerkerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds.). Digital resource at [www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019](http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019). Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X.



- Matheny, P. B., Curtis, J. M., Hofstetter, V., Aime, M. C., Moncalvo, J.-M., Ge, Z.-W., Yang, Z.-L., Slot, J. C., Ammirati, J. F. and Baroni, T. J. (2006) Major clades of Agaricales: A multilocus phylogenetic overview. *Mycologia* 98: 982-995.
- Saber, M. (1994) Contribution to the knowledge of Coprinaceae (Agaricales) collected in Iran. In: Proceedings of 5th International Mycological Congress, 14-21 August, Vancouver, British Columbia, Canada.
- Saber, M. (1995) New records of Agaricales from Iran. In: Proceedings of 12th Iranian Plant Protection Congress, 2-7 Sept, Karaj, Iran (in Persian).
- Singer, R. (1986) The Agaricales in modern taxonomy. Koenigstein, Germany: Koeltz Scientific Books. Koenigstein, Germany. 88 p.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30: 2725-2729.
- Tóth, A., Hausknecht, A., Krisai-Greilhuber, I., Papp, T., Vágvölgyi, C. and Nagy, L. G. (2013) Iteratively refined guide trees help improving alignment and phylogenetic inference in the mushroom family Bolbitiaceae. *PLoS One* 8: e56143.
- Watling, R. and Gregory, N. M. (1977) Larger fungi from Turkey, Iran and neighbouring countries. *Karstenia* 17.
- Watling, R. and Sweeney, J. (1974) Larger fungi from Iran. Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh.
- Webster, J. and Weber, R. (2007) Introduction to fungi. Cambridge, UK; New York: Cambridge University Press. Cambridge, UK; New York. p.
- Zokaei, M. (2001) Identification of Agaricales collected in Mashhad area. *Rostaniha* 2: 7-14 (in Persian).