

بررسی تنوع ژنتیکی دو گونه براق *Ganoderma lucidum* و *Ganoderma resinaceum* به وسیله نشانگر RAPD

سمیه کی پور^۱، حسین ریاحی^۲، مصطفی عبادی نهاری^{۳*}، محمدرضا آصف^۴، علی برهانی^۵ و ناصر صفایی^۶

دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۰۵ / اصلاح: ۱۳۹۷/۰۶/۱۹ / پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۰۳ / انتشار: ۱۳۹۷/۱۲/۲۸

^۱ گروه زیست شناسی، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران

^۲ گروه علوم و زیست فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

^۳ گروه زیست شناسی گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

^۴ بخش تحقیقات رستنی‌ها، مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

^۵ مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، بهشهر، ایران

^۶ گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: m.ebadi@azaruniv.ac.ir

چکیده. سرده *Ganoderma* Karst. متعلق به راسته Polyporales بوده و از قارچ‌های مهم دارویی و بیماری‌زای گیاهی است. هدف از انجام این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های طبیعی دو گونه براق *Ganoderma* با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD است. بدین منظور چهار جمعیت از گونه *Ganoderma resinaceum* Boud. و هشت جمعیت از گونه *Ganoderma lucidum* Karst. جمع‌آوری شده از جنگل‌های شمال کشور طی سال‌های ۹۱-۹۰ برای اولین بار در ایران مورد بررسی قرار گرفت. برای تکنیک RAPD، از ۱۰ آغازگر تصادفی استفاده شد. نتایج RAPD-PCR مویید وجود تنوع ژنتیکی وسیعی بین جمعیت‌های مورد مطالعه بود به طوری که تنوع درون گونه‌های *G. lucidum* و *G. resinaceum* به ترتیب ۶۱/۴۸ و ۴۰/۱۶ برآورد گردید. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان داد که جدایی‌ها در سه خوشه قرار گرفتند و این گروه‌بندی جدایی جمعیت‌های دو گونه مورد مطالعه را تایید نمود. در ارزیابی تجزیه ساختار ژنتیکی، دو گروه احتمالی (K=2) در ژرم پلاسم مورد مطالعه شناسایی شد به طوری که نتایج حاصل از بارپلات نیز آنرا تایید کرد. **واژه‌های کلیدی.** آغازگر تصادفی، تجزیه ساختار ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، ژرم پلاسم

The Study of the genetic diversity of two laccate species of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma resinaceum* using RAPD marker

Somayeh Keypour¹, Hossein Riahi², Mostafa Ebadi Nahari^{3*}, Mohammad Reza Asef⁴, Ali Borhani⁵ and Naser Safaie⁶

Received 27.09.2017/ Revised 10.09.2018/ Accepted 25.09.2018/ Published 19.03.2019

¹Department of Biology, Farhangian University, Tehran, Iran

²Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, G.C., Tehran, Iran

^{3*}Department of Plant Biology, Science Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

⁴Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

⁵Agriculture and Natural Research Center of Mazandaran, Behshar, Iran

⁶Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

* Correspondent author: m.ebadi@azaruniv.ac.ir

Abstract. The genus *Ganoderma* belongs to Polyporales, well-known for its medicinal properties and as a plant pathogen. The aim of this study was to identify the genetic variation between populations of two *Ganoderma lucidum* Karst. complex isolates using RAPD. For this purpose, four populations of *G. resinaceum* Boud. and eight populations of *G. lucidum* collected and purified during 2011-2012, were studied for the first time in Iran. Ten random primers were used for RAPD reaction. The result for RAPD-PCR studies of *G. lucidum* complex showed a wide range of diversity, as scores of 61.48 and 40.16 were estimated for the inter-specific diversity of *G. lucidum* and *G. resinaceum*, respectively. Cluster analysis confirmed the separation of two species populations in different clusters. In the analysis of genetic structure, two probable groups (K = 2) were identified in the studied germplasm which was also confirmed by the results of bar plot.

Keywords. cluster analysis, genetic structure analysis, genetic variation, germplasm, random primers

مقدمه

طول پایه یا فقدان آن تحت تأثیر محیط است. مشکلات به وجود آمده در زمینه تاکسونومی *Ganoderma* ریشه در استفاده نادرست از اسامی گونه‌ها، عدم وجود نمونه‌های تیپ، وجود اسامی مترادف بسیار و استفاده از صفات ریخت‌شناسی مبهم دارد (Ryvarden, 1994). بر همین اساس، ریواردن پیشنهاد نمود که براساس این صفات هیچ گونه جدیدی در سرده *Ganoderma* تا مدت زمان معین معرفی نشود (Ryvarden, 1994). جهت بر طرف شدن این مشکل محققین برای شناسایی گونه‌های این سرده به استفاده از روش‌های دیگر روی آوردند. با توجه به عدم کارآمد بودن صفات ریخت‌شناسی در شناسایی دقیق، امروزه از روش‌های دقیق‌تری چون RFLP (Miller *et al.*, 1999)، توالی‌یابی ژنی (تک ژن و یا چند ژن همراه با هم) (Hong *et al.*, 2002; Moncalvo *et al.*, 1995a,b; Smith & Sivasithamparam, 2000a; Cao *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012a,b)، الکتروفورز ایزوآنزیم‌ها (Gottlieb *et al.*, 1998; Gottlieb & Wright, 1999 a; Smith & Zakaria *et al.*, 2000b) و RAPD (Sivasithamparam, 2000b) استفاده می‌شود. مطالعات نشان داده است که بهره‌گیری از روش‌های جدید در شناسایی دقیق کمک شایانی می‌کند؛ به طوری که برخی شناسایی‌های قدیمی، که براساس صفات ریخت‌شناختی بنا نهاده شده بود، را تأیید نمی‌کند (Gottlieb *et al.*, 1998; Moncalvo *et al.*, 1995a,b). هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های دو گونه از سرده *Ganoderma* با نام‌های *G. lucidum* گونه مهم دارویی این سرده، و *G. resinaceum* برای اولین بار در ایران است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها در تابستان سال ۱۳۹۰ و بهار، تابستان و پاییز سال ۱۳۹۱ از مناطق مختلف استان‌های گلستان، مازندران و گیلان و از ارتفاعات مختلف انجام گرفت. این نمونه‌ها برای بررسی بیشتر و شناسایی به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه شهید بهشتی منتقل و با کلیدهای شناسایی معتبر بررسی شدند (Moradali *et al.*, 2007; Moncalvo & Ryvarden, 1997; Steyaert, 1972).

سرده *Ganoderma* Karst. متعلق به سلسله قارچها، شاخه Basidiomycota، رده Agaricomycetes، راسته Polyporales و تیره Ganodermataceae است (Wasser & Weis, 1999; Cao & Yuan, 2013). گونه‌های این سرده مانند برخی دیگر از قارچها بر روی درختان مختلف نهان‌دانه و بازدانه رشد می‌کنند و به مرور زمان با ترشح آنزیم‌های مختلف سبب بروز پوسیدگی سفید در طوقه درخت می‌شوند. در حدود ۲۵۰ نام از گونه‌های مختلف *Ganoderma* از سراسر جهان گزارش شده است (Ryvarden, 1994). به نظر می‌رسد که برخی از این نام‌ها، مترادف بوده و تعداد گونه‌ها کمتر از گزارش‌های موجود باشد. علت این امر استفاده از صفات ظاهری در شناسایی گونه است. چانگ و همکاران براساس مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۶ اعلام کردند که سرده *Ganoderma* براساس ساختارهای موجود در قارچ به دو زیرسرده *Elfvigia* Karst. (گونه‌های غیر براق) و *Ganoderma* (گونه‌های براق) تقسیم می‌شود (Chang *et al.*, 1996). برخی از صفات ظاهری مورد استفاده در تاکسونومی سرده *Ganoderma* عبارتند از: خصوصیات بازیدیوکارپ، اندازه اسپور و رنگ آن‌ها در واکنش به معرف ملزر، نوع اجزای کوتیس و آمیلوئیدی یا دکسترونوئیدی بودن آن‌ها و انواع هیف‌های موجود در قارچ (Furtado, 1965; Gottlieb & Wright, 1999a, b; Smith & Sivasithamparam, 2003). علاوه بر آن شناسایی این سرده به صورت سنتی بر پایه خصوصیات دیگری چون خصوصیات فیزیولوژیکی، رشد میسلیم و وجود انواع متابولیت‌های ثانویه صورت می‌گیرد (Takamatsu, 1998)؛ ولی مطالعات چندین ساله حاکی از این است که موارد ذکر شده تحت تأثیر شرایط محیطی است و صفات مناسبی برای شناسایی نیست. این موارد از دلایلی هستند که تعداد اسامی مترادف زیادی را برای گونه‌های *Ganoderma* به وجود آورده است (Moncalvo, 2000). به عقیده محققین شکل اندام بارده تحت تأثیر محیط، بازیدیوسپورها تحت تأثیر طول و عرض جغرافیایی و رنگ بافت زمینه در برخی گونه‌ها تحت تأثیر عرض جغرافیایی است (Steyaert, 1972, 1975). تحقیقات (Moncalvo, 2002) نشان داد که رنگ، اندازه و میزان درخشندگی، با پایه بودن و

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق.

Table 1. Characteristics of isolates used in this study.

| میزبان | محل جمع آوری | نام گونه براساس شناسایی مورفولوژیکی | جمعیت | کد جدایه |
|-----------------------|-----------------------|-------------------------------------|-------|----------|
| ممرز زنده | کردکوی، گلستان | <i>G. lucidum</i> | ۱ | GIran9 |
| ممرز پوسیده | کردکوی، گلستان | <i>G. lucidum</i> | ۱ | GIran20 |
| صنوبر | ساری، مازندران | <i>G. resinaceum</i> | ۲ | GIran30 |
| تنه ممرز سالم | النگدره، گلستان | <i>G. lucidum</i> (Eurasian) | ۳ | GIran40 |
| تنه بلوط پوسیده | نور، مازندران | <i>G. lucidum</i> | ۴ | GIran73 |
| جوف کنده ممرز پوسیده | النگدره، گلستان | <i>G. lucidum</i> (Eurasian) | ۳ | GIran42 |
| بالای ممرز سالم | النگدره، گلستان | <i>G. lucidum</i> (Eurasian) | ۳ | GIran43 |
| ریشه ممرز پوسیده | آهنگر محله، گلستان | <i>G. lucidum</i> (Eurasian) | ۵ | GIran47 |
| ریشه ممرز سالم | آهنگر محله، گلستان | <i>G. lucidum</i> (Eurasian) | ۵ | GIran48 |
| کنده ممرز | فاضل آباد، گلستان | <i>G. lucidum</i> (Eurasian) | ۶ | GIran58 |
| جوف بلوط زنده | نور، مازندران | <i>G. resinaceum</i> | ۷ | GIran70 |
| لیلکی زنده | املش، گیلان | <i>G. lucidum</i> (Eurasian) | ۸ | GIran98 |
| سیاه پلت | نور، مازندران | <i>G. resinaceum</i> | ۷ | GIran74 |
| جوف بلوط زنده | نور، مازندران | <i>G. resinaceum</i> | ۷ | GIran76 |
| تنه ممرز زنده | چنگل دوهزار، مازندران | <i>G. lucidum</i> | ۹ | GIran84 |
| تنه پوسیده کاج تدا | سیاهکل، گیلان | <i>G. lucidum</i> (Eurasian) | ۱۰ | GIran92 |
| تنه پوسیده راش | سیاهکل، گیلان | <i>G. lucidum</i> | ۱۰ | GIran95 |
| تنه ممرز افتاده | سیاهکل-دیلمان، گیلان | <i>G. lucidum</i> (Eurasian) | ۱۰ | GIran96 |
| ریشه کنده ممرز پوسیده | فاضل آباد، گلستان | <i>G. resinaceum</i> | ۱۱ | GIran57 |
| لیلکی زنده | املش، گیلان | <i>G. resinaceum</i> | ۱۲ | GIran100 |
| تنه افتاده لیلکی | املش، گیلان | <i>G. resinaceum</i> | ۱۲ | GIran102 |

نور، مازندران)، افراد هر گونه به عنوان جمعیت‌های جدا در نظر گرفته شد.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA، از کشت تازه میسلیم گونه‌های *G. lucidum* و *G. resinaceum* به قطر ۶ میلی‌متر برداشت کرده و به محیط پتیتو دکستروز برات (PDB) انتقال داده شدند. ظروف حاوی میسلیم در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۴-۱۰ روز روی شیکر (AIKA, Germany) با دور ۱۵۰rpm قرار داده شدند. به منظور استخراج DNA، از میسلیم خالص، از روش صفایی و همکاران، (۲۰۰۵) استفاده شد (Safaie et al., 2005).

استفاده از واکنش RAPD برای بررسی تنوع *G. lucidum* complex

به منظور بررسی تنوع بین جدایه‌های گونه‌های *G. lucidum* و *G. resinaceum* از واکنش RAPD استفاده شد (Gell et al., 2007).

کشت قارچ‌های جمع‌آوری شده

قارچ‌های جمع‌آوری شده پس از انتقال به آزمایشگاه قارچ‌شناسی، با الکل ۷۰٪ ضدعفونی سطحی و در شرایط سترون روی محیط کشت MEA (Malt Extract Agar, Merck) کشت شدند. پلیت‌ها به انکوباتور (Memmert, Germany) با دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل و پس از رشد میسلیم، برای خالص‌سازی چندین بار واکنش انجام شد (Keypour et al., 2014). ۲۱ جدایه از گونه‌های جمع‌آوری و خالص‌سازی شده که متعلق به دو گونه *G. resinaceum* و *G. lucidum* بودند، جهت بررسی تنوع جمعیت انتخاب شدند (جدول ۱). در این مطالعه جدایه‌های بدست آمده از هر گونه در منطقه جغرافیایی مشخص، بدون در نظر گرفتن نوع میزبان، به عنوان یک جمعیت در نظر گرفته شد. در مناطقی که هر دو گونه حضور داشتند (به عنوان مثال

جدول ۲- آغازگر های مورد استفاده در RAPD و توالی آنها.

Table 2. Primers used for RAPD and their sequences.

| نام آغازگرهای انتخاب شده به منظور انجام واکنش RAPD | توالی آغازگر ها (5'→3') |
|--|-------------------------|
| OPD-3 | GGACCCAACC |
| OPD-8 | TGAGCGGACA |
| OPD-5 | TGAGCGGACA |
| OPD-2-3 | CTCTGGAGAC |
| OPD-2 | GGACCCAACC |
| OPC-9 | CTCACCGTCC |
| OPC-5 | GATGACCGCC |
| OPC-18 | TGTCTGGGTG |
| OPC-7 | GTCCCGACGA |
| OPC-10 | TGTCTGGGTG |

حضور باند) انجام شد. برای رسم دندروگرام از نرم افزار Past ver 2.17 (Hammer *et al.*, 2012)، ضریب جاکرد و روش UPGMA استفاده شد. میزان تنوع ژنتیکی توسط نرم افزار POPG-ENE 32 و محاسبه ضریب شانون مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر آن جهت ارزیابی ساختار جمعیت به منظور تجزیه موثر ساختار جمعیت، دسته بندی دقیق ژنوتیپ ها و تشخیص ژنوتیپ های مختلط از نرم افزار Structure 2.3.4 استفاده شد. برای این منظور از مدل ترکیبی Admixture و استقلال فراوانی آلی با ۵۰۰۰ تکرار آزمایش و ۵۰۰۰۰ MCMC (Markov Chain Monte Carlo) استفاده شد تا منحنی حداکثر درست نمایی حاصل شود. سپس تعداد واقعی گروه های ژنوتیپی با استفاده از ΔK بر اساس روش Evanno و همکاران (2005) تعیین شد.

نتایج

بررسی واکنش RAPD

از بین ده آغازگر انتخاب شده برای انجام آزمایش، آغازگرهای OPD 2- و OPC5, OPC10, OPC18, OPD5, OPD3, OPD8 3 به عنوان مناسب ترین آغازگرها برای افتراق بین جدایه های مورد بررسی ارزیابی شدند. این انتخاب بر پایه تعداد باندهای RAPD، محدوده اندازه باندها، شدت درخشش باندها در مورد هر آغازگر انجام گرفت. آغازگرهای OPD8 و OPC18 با ۱۶ باند پلی مرف و آغازگر OPC5 با ۱۱ باند پلی مرف به ترتیب بیشترین و کمترین

برای انجام این واکنش از ۱۰ آغازگر (۵ آغازگر متعلق به OPD و ۵ آغازگر متعلق به OPC) (سیناکلون) استفاده شد (جدول ۲) (Ebadi *et al.*, 2013).

واکنش RAPD

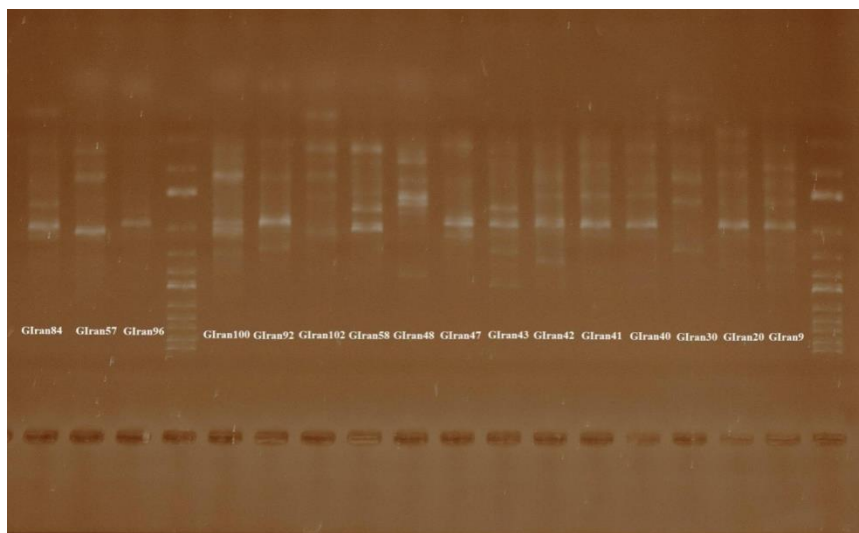
واکنش PCR طبق روش Ebadi و همکاران (2013) انجام شد؛ ۲ دقیقه دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای دناتوره کردن DNA در مرحله اول (۱ چرخه)، ۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه دمای ۳۸ درجه سلسیوس برای اتصال آغازگر، ۲ دقیقه دمای ۷۲ درجه سلسیوس به منظور طویل شدن (۴۰ چرخه) در مرحله دوم و ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس به منظور طویل شدن نهایی در مرحله سوم است. برای اطمینان از صحت واکنش های انجام شده از یک کنترل منفی که شامل تمامی مواد واکنش به غیر از DNA الگو بود استفاده شد. ارزیابی غلظت بهینه برای ترکیبات PCR مورد بررسی که به تولید الگوهای RAPD قابل تکرار منجر می شد، با استفاده از یک سیستم امتیاز دهی شامل تعداد باندهای RAPD، شدت درخشش باندها و تشکیل اسمیر انجام گرفت.

توانایی RAPD برای جداسازی جدایه های گونه مرکب *Ganoderma lucidum*

به منظور تعیین قدرت افتراق پروتکل RAPD بهینه سازی شده، پس از بررسی جدایه های گونه مرکب *G. lucidum*، آنالیز خوشه ای انجام گرفت. الگوهای RAPD حاصل به صورت چشمی بررسی شدند و امتیازدهی دوتایی (۰ برای عدم حضور باند و ۱ برای

جدول ۳- پارامترهای تنوع ژنتیکی دو گونه *G. resinaceum* و *G. lucidum* بر اساس داده‌های حاصل از RAPD.Table 3. Genetic diversity parameters of *G. lucidum* and *G. resinaceum* based on RAPD data.

| درصد پلی مورفیسم | تعداد جایگاه ژنی پلی مورف | ضریب شانون (I) | تنوع ژنتیکی Nei's (h) | تعداد ال‌های مشاهده شده | |
|------------------|---------------------------|----------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|
| ۶۱/۴۸٪ | ۷۵ | ۰/۳۱ ± ۰/۲ | ۰/۲۱ ± ۰/۱ | ۱/۶۱ ± ۰/۴ | <i>G. lucidum</i> |
| ۴۰/۱۶٪ | ۴۹ | ۰/۲۱ ± ۰/۲ | ۰/۱۴ ± ۰/۱ | ۱/۴۵ ± ۰/۴ | <i>G. resinaceum</i> |

شکل ۱- محصولات به دست آمده از تکثیر DNA گونه مرکب *G. lucidum* با استفاده از آغازگر OPD5.Fig. 1. *G. lucidum* complex PCR products using OPD5 primer.

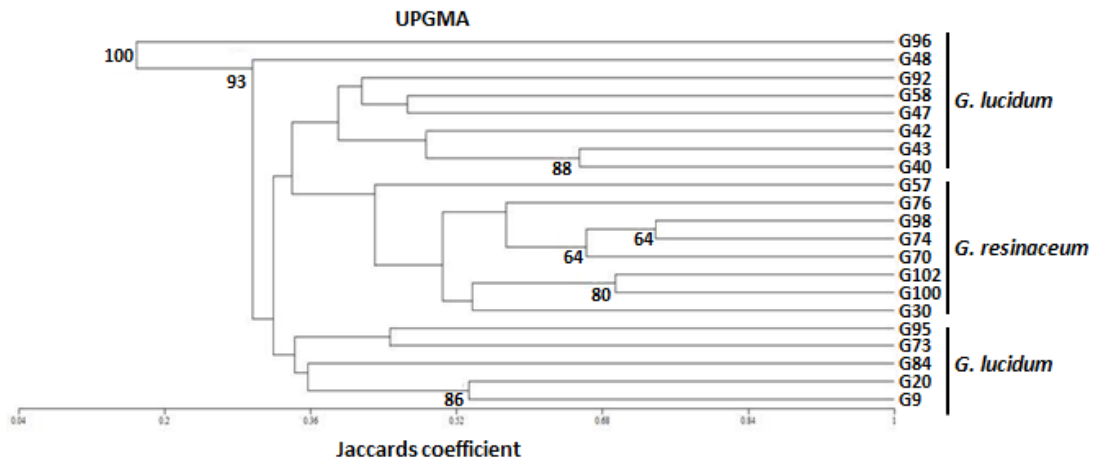
می‌شود. در اولین زیرخوشه GIran98 (*G. lucidum* (Eurasian) و *G. resinaceum*) GIran74 با حمایت ضعیف (۶۴٪) به یکدیگر و *G. resinaceum* GIran70 نیز با حمایت ضعیف (۶۴٪) به آنها متصل شده است. دو جدایه GIran100 و *G. resinaceum* GIran102 نیز در زیرخوشه دیگر با حمایت خوب (۸۰٪) در کنار هم قرار گرفته‌اند. در دومین زیرخوشه کد-های GIran43 و *G. lucidum* (Eurasian) GIran40 با حمایت خوب (۸۸٪) در کنار هم واقع شده‌اند. در خوشه فرعی دوم دو جدایه *G. lucidum* با کدهای GIran20 و GIran9 (*G. lucidum*) با حمایت خوب (۸۶٪) در کنار هم قرار گرفته‌اند (شکل ۲). در اکثر مواقع نتایج آنالیز تجزیه خوشه‌ای توسط آنالیز رسته‌بندی تأیید شد. جدایه GIran48 که در تجزیه خوشه‌ای دور از سایر جدایه‌ها قرار داشت در اینجا در کنار سایر جدایه‌های *G. lucidum* (Eurasian) قرار می‌گیرد (شکل ۲).

در این مطالعه که با استفاده از نشانگر RAPD انجام شد، اکثر جدایه‌های *G. lucidum* complex در دندروگرام حاصل، با ضرایب حمایت پایین تا متوسط و به ندرت با ضریب حمایت

باند را نمایان ساختند. باندها بین ۳۰۰ تا ۴۰۰۰ bp وزن داشتند. ضریب تنوع شانون برای گونه *G. resinaceum* و *G. lucidum* به ترتیب ۰/۳۱ و ۰/۲۱ بر آورد گردید. در این میان تعداد ۷۵ جایگاه ژنی پلی مورف و میزان پلی مورفیسم ۶۱/۴۸ درصد برای گونه *G. lucidum* و تعداد ۴۹ جایگاه ژنی پلی مورف و میزان پلی مورفیسم ۴۰/۱۶ درصد برای گونه *G. resinaceum* محاسبه گردید (جدول ۳).

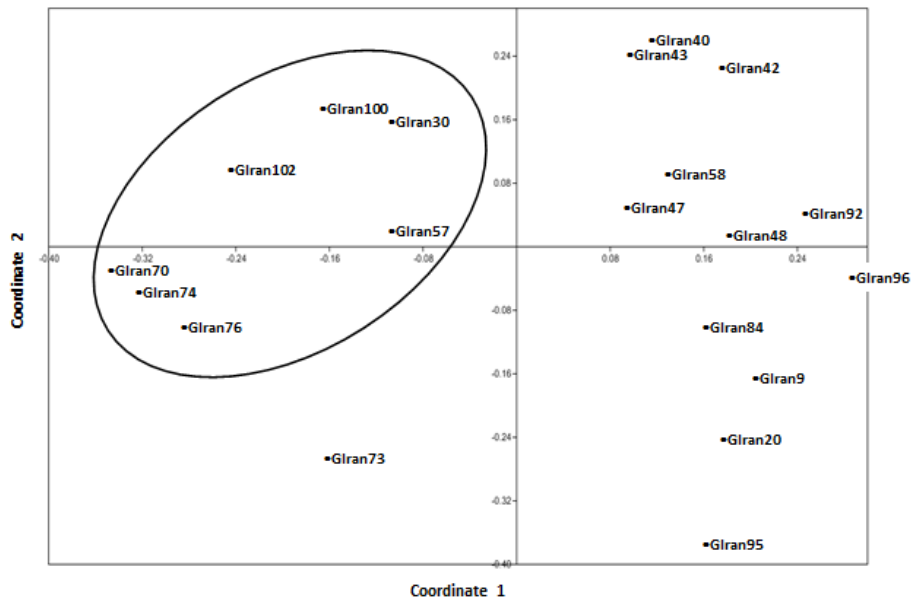
درخت حاصل از آنالیز دسته‌ای جدایه‌های *G. lucidum* complex بر پایه RAPD

این نتایج، حاصل مطالعه ۱۲ جمعیت و ۲۱ فرد از جدایه‌های *G. lucidum* complex است. جدایه GIran96 که به لحاظ ریختی *G. lucidum* (Eurasian) شناسایی شده بود (Keypour et al., 2014) با حمایت بالای ۱۰۰٪ از سایر جدایه‌ها جدا شده است. *G. lucidum* (Eurasian) GIran48 در کنار سایر جدایه‌ها که خوشه جدا و بزرگی را تشکیل داده‌اند با حمایت قوی ۹۳٪ قرار گرفته است. خوشه اصلی دوم، دارای دو خوشه فرعی است که خوشه فرعی اول از پایین خود به دو زیرخوشه دیگر تقسیم



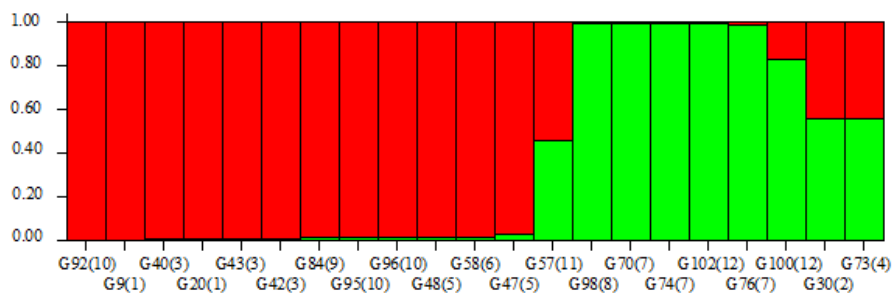
شکل ۲- دندروگرام حاصل از آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار Past.

Fig. 2. Dendrogram based on data analysis using Past software.



شکل ۳- آنالیز رسته‌بندی جدایی‌های *G. lucidum* complex بدست آمده از نتایج RAPD.

Fig. 3. PCO analysis of *G. lucidum* complex using RAPD data.



شکل ۴- بررسی ساختار جمعیت با استفاده از نرم افزار استراکچر.

Fig. 4. Population structure survey using structure software.

آخرین باند تشکیل شده توسط آغازگر OPC18 تا ۳۰۰۰ جفت باز است. تمامی جدایه‌های این گونه با آغازگر OPC18 باند ۱۳۰۰ جفت باز تشکیل می‌دهند. بررسی الگوی باندهای تشکیل شده در جدایه‌های *G. resinaceum* نشان داد که آخرین باند تشکیل شده توسط آغازگر OPD8 تا ۱۸۰۰ جفت باز و آخرین باند تشکیل شده توسط آغازگر OPC18 تا ۲۰۰۰ جفت باز است. تمامی جدایه‌های این گونه با آغازگر OPD8 سه باند ۶۵۰، ۵۰۰ و ۱۸۰۰ جفت باز و با آغازگر OPC18 دو باند ۹۰۰ و ۱۵۰۰ جفت باز تشکیل می‌دهند. جدایه GIran96 با آغازگر OPD8 هیچ بانندی تشکیل نداد و آخرین باند تشکیل شده توسط آغازگر OPC18 تا ۱۳۰۰ جفت باز است. آخرین باند تشکیل شده در جدایه GIran48 با آغازگر OPD8، ۱۲۰۰ جفت باز و آخرین باند تشکیل شده توسط آغازگر OPC18 تا ۱۵۰۰ جفت باز است. جدایه‌های گونه *G. lucidum* با پرایمر OPD5 باندهای اختصاصی ۶۵۰، ۷۰۰ و ۱۵۰۰ تولید نمودند. جدایه‌های گونه *G. lucidum* (Eurasian) با پرایمر OPC18 باند اختصاصی ۱۳۰۰ تولید نمود. جدایه‌های گونه *G. resinaceum* با پرایمر OPD8 باندهای اختصاصی ۵۰۰، ۶۵۰ و ۱۸۰۰ و با پرایمر OPD2-3 باندهای ۱۲۰۰ و ۱۸۰۰ و با پرایمر OPC10 باند ۱۵۰۰ و با پرایمر OPC18 باند ۱۵۰۰ جفت بازی تولید نمودند. در مواردی جدایه‌های دو گونه دارای باندهای مشترک تولید شده توسط یک پرایمر خاص بودند؛ جدایه‌های تمامی نمونه‌ها با پرایمر OPD3 باند ۵۰۰ جفت بازی تولید می‌کنند. جدایه‌های نمونه‌های *G. lucidum* و *G. lucidum* (Eurasian) با پرایمر OPD5 باند ۵۰۰ جفت بازی تولید می‌کنند. جدایه‌های گونه *G. lucidum* و *G. resinaceum* با پرایمر OPC18 باند ۹۰۰ جفت بازی تولید می‌کنند؛ ولی با وجود باندهای مشترک، درخوشه‌بندی انجام شده توسط UPGMA، گونه‌ها به طرز قابل قبولی با فاصله از یکدیگر قرار گرفته‌اند. بیشتر باندهای تکثیر شده حالت پلی‌مرف دارند که این نشان‌دهنده تنوع میان جدایه‌های *Ganoderma* است. در برخی موارد نیز جدایه‌های یک گونه دارای الگوی بانندی متنوع بودند. این مورد نشان‌دهنده وجود تنوع زیاد حتی بین جدایه‌های یک گونه است که نیازمند بررسی‌های بیشتر است. تجزیه موثر ساختار جمعیت و دسته بندی دقیق افراد با استفاده از نرم افزار Structure نیز انجام گرفت (شکل ۴). با توجه به اینکه مقادیر

خوب تا عالی در کنار هم قرار گرفتند که این نشان دهنده تنوع زیاد بین افراد دو گونه مورد بررسی است. علاوه بر آن همانطور که در دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای مشاهده می‌شود جدایه‌های جمعیت ده (GIran92، GIran95 و GIran96) در سه خوشه متفاوت قرار گرفتند که این امر نشان دهنده نقش میزبان در تنوع بین جدایه‌ها است.

جدایه‌هایی که به لحاظ ریخت‌شناسی *G. lucidum* شناسایی شده بودند در کنار هم در بالای درخت قرار گرفته‌اند. تزئینات اسپور این جدایه‌ها کاملاً واضح و رنگ بافت زمینه از کرم روشن تا کرم تیره است. در ۹۹٪ موارد دارای پایه (بجز GIran95) و اغلب پیلئوسیتیدیوم‌ها دکسترونوئید و در دو مورد (GIran95 و GIran20) دکسترونوئید-آمیلوئید هستند. جدایه‌های GIran40 تا GIran92 که در خوشه‌های پایین قرار گرفته‌اند و به لحاظ ریخت‌شناسی *G. lucidum* (Eurasian) نامگذاری شده بودند رنگ بافت زمینه از کرم روشن تا کرم تیره متغیر و اسپورها همه دارای تزئینات مشخص هستند. اکثر جدایه‌ها به جز GIran58 دارای پایه و اکثر پیلئوسیتیدیوم‌ها آمیلوئید هستند، ولی GIran92 دارای پیلئوسیتیدیوم‌های آمیلوئید-دکسترونوئید است. جدایه‌های GIran30 تا GIran57 که در خوشه‌های پایینی قرار گرفته‌اند و به لحاظ ریخت‌شناسی *G. resinaceum* شناخته شده‌اند، به جز *G. lucidum* (Eurasian) GIran98، همه فاقد پایه، رنگ بافت زمینه کرم روشن تا تیره و گاهی با لکه‌های نارنجی است. اسپورها اغلب دارای تزئینات نامشخص و پیلئوسیتیدیوم‌ها از آمیلوئید، دکسترونوئید و آمیلوئید-دکسترونوئید متغیر هستند. جدایه‌های GIran96 و GIran48 در انتهای درخت با نام *G. lucidum* (Eurasian) هر دو دارای پایه و رنگ بافت زمینه کرم تا کرم نارنجی است. اسپورها دارای تزئینات مشخص، پیلئوسیتیدیوم‌ها آمیلوئید و آمیلوئید-دکسترونوئید هستند. بررسی الگوی باندهای تشکیل شده در جدایه‌های *G. lucidum* نشان داد که آخرین باند تشکیل شده توسط آغازگر OPD8 تا ۱۸۰۰ جفت باز و آخرین باند تشکیل شده توسط آغازگر OPC18 تا ۲۵۰۰ جفت باز است. تمامی جدایه‌های این گونه با آغازگر OPC18 باند ۹۰۰ جفت باز تشکیل می‌دهند. بررسی الگوی باندهای تشکیل شده در جدایه‌های *G. lucidum* (Eurasian) نشان داد که آخرین باند تشکیل شده توسط آغازگر OPD8 تا ۴۰۰۰ جفت باز و

دارای پروفایل RAPD مشابه هستند؛ به طوری که جدایه‌های فرانسه و اتریش با حمایت کامل ۱۰۰٪ و جدایه‌های کریمه و قفقاز نیز با حمایت قوی ۹۷٪ در کنار هم قرار می‌گیرند؛ حتی دو جدایه به دست آمده از مسکو که ناسازگاری رویشی داشتند نیز دارای پروفایل RAPD مشابه هستند و با حمایت ۱۰۰٪ در کنار یکدیگر واقع می‌شوند. اما نتایج بدست آمده توسط Ariffin و همکاران (2000) که با بررسی جدایه‌های مختلف *Ganoderma* از میزبان و کشورهای مختلف انجام گرفت، مشابه نتایج بدست آمده از مطالعه جدایه‌های ایران بود. آن‌ها در مطالعه خود متوجه وجود تنوع الگوی بانندی میان جدایه‌ها شدند. به اعتقاد آن‌ها شاید این تنوع به علت توانایی سازگار نمودن جدایه‌های *Ganoderma* برای رشد بر روی میزبان‌های مختلف باشد. Zakaria و همکاران (2005) با بررسی پروفایل RAPD گونه *G. boninense* و *Ganoderma* sp. از پایه درختان خرما و نارگیل متوجه شدند که گونه‌های جمع‌آوری شده از این دو درخت در الگوی بانندی متفاوتند؛ ولی هیچ باند خاصی وجود نداشت که این دو را از هم جدا کند. تحلیل‌های RAMS نیز نشان داد که این دو گونه پنج باند مشترک دارند و حتی در خوشه‌بندی‌های UPGMA این دو در کنار هم قرار می‌گیرند که نشان دهنده ارتباط نزدیک آن‌ها به یکدیگر است. در مطالعه‌ای که توسط Hseu و همکاران (1996) انجام گرفت مشخص شد که گونه‌هایی مانند *G. lucidum* و *G. oerstedii* که به لحاظ توالی نوکلئوتیدی ITS اختلاف چندانی با هم نداشتند (۰ تا ۱ نوکلئوتید) بوسیله پروفایل‌های ایجاد شده توسط RAPD از یکدیگر جدا می‌شوند. اگرچه *G. ahmadii* و *G. valesiacum* در درختی که با داده‌های RAPD رسم شده بود در یک گروه قرار گرفتند؛ ولی حمایت این خوشه صفر بود. این در حالی است که دو گونه *G. oregonense* و *G. valesiacum* با داشتن توالی نوکلئوتیدی ITS مشابه، بوسیله پروفایل‌های ایجاد شده توسط RAPD کاملاً از یکدیگر جدا می‌شدند. Mei و همکاران (2014) در مطالعه‌ای با استفاده از روش RAPD دریافتند که گونه‌های *Ganoderma* و حتی جدایه‌های *G. lucidum* تا میزان ۹۳٪ تنوع ژنتیکی از خود نشان می‌دهند. با توجه به یافته‌های بدست آمده توسط محققین و نیز نتایج حاصل شده از این مطالعه در زمینه تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف *Ganoderma* می‌توان این گونه نتیجه گرفت که گونه‌های مختلف

حداکثر $K\Delta$ در $K=2$ بدست آمده است، بنابراین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به‌احتمال قوی در دو گروه قرار می‌گیرند. گروه اول شامل تمامی جدایه‌های گونه *G. resinaceum* به‌همراه دو جدایه از گونه *G. lucidum* (G73 و G98) و گروه دوم شامل سایر جدایه‌های مورد مطالعه است. برخی از جدایه‌ها در بخش‌هایی از ژنوم خود به سایر جدایه‌ها شباهت دارند اما با وجود این، میزان شباهت‌شان به گروه خودشان بیشتر است. به‌عنوان مثال GIran30 در بخش‌هایی از ژنوم خود به جدایه‌های *G. lucidum* شباهت دارد. سرده *Ganoderma* دارای گونه‌های مهم به لحاظ کاربرد در صنایع دارویی است. برخی از این گونه‌ها از جنبه دارویی از دیگر گونه‌های این سرده مهم تر هستند (Fu et al., 2015). بنابراین شناسایی دقیق گونه‌ها جهت بهره‌گیری بهتر در صنایع داروسازی از اهمیت زیادی برخوردار است. علیرغم ابداع روش RAPD در دهه ۱۹۹۰، مطالعات اخیر در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی جانداران از RAPD به عنوان روشی موثر و سریع در شناسایی تنوع ژنتیکی بدون نیاز به دانستن توالی DNA الگو بهره گرفته‌اند (Shakeel et al., 2013). در این مطالعه از روش RAPD برای بررسی تنوع گونه‌های *G. lucidum* و *G. resinaceum* از ایران استفاده شد. یافته‌های این مطالعه حاکی از وجود تنوع ژنتیکی زیاد در بین جدایه‌های *G. lucidum* و *G. resinaceum* است. به‌علاوه جدایه GIran 98 که با بررسی حمایت خوشه‌ها جز در موارد اندک حتی برای جدایه‌های یک گونه بسیار کم است. به‌علاوه جدایه GIran 98 که با بررسی خصوصیات ریختی با عنوان *G. lucidum* (Eurasian) نامگذاری شده بود در این مطالعه در کنار گونه‌های *G. resinaceum* قرار گرفته است. قرارگیری این جدایه در کنار *G. resinaceum*‌های مورد بررسی در این مطالعه احتمال وجود تنوع ژنتیکی بالا در این جدایه و بروز صفات مورفولوژیکی متفاوت از آنچه برای *G. resinaceum* در کلید شناسایی ذکر شده را در ذهن تداعی می‌کند. نتیجه‌گیری قطعی در این مورد نیازمند بررسی بیشتر توسط روش‌های مولکولی دقیق‌تر برای تأیید و یا رد شناسایی ریختی است. پستنوا و اسکالنتوا (Postnova & Skolotneva, 2010) با مطالعه جدایه‌های *G. lucidum* از کشورهای مختلف به نتایج متفاوتی دست یافتند. آن‌ها دریافتند که با وجود جدایی مکانی، جدایه‌های مورد بررسی

REFERENCES

- Ariffin, D., Idris, A.S. and Singh, G.** 2000. Status of *Ganoderma* in oil palm. – In: Flood, J. (ed.), *Ganoderma* diseases of perennial crops. – CABI Bioscience, Egham, UK. pp: 49-68.
- Cao, Y. and Yuan, H.S.** 2013. *Ganoderma mutabile* sp. nov. from southwestern China based on morphological and molecular data. – Mycol. Prog. 12: 121-126.
- Cao, Y., Wu, S.H. and Dai, Y.C.** 2012. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom “Lingzhi”. – Fungal Divers. 56: 49-62.
- Chang, C.Y., Yeh, Z.Y. and Lee-Chen, G.J.** 1996. Analysis of genetic diversity of two intersterility groups of *Ganoderma australe* by DNA sequencing. – Biol. Bull. Natl. Taiwan Normal Univ. 31: 47-53.
- Ebadi, M., Riahi, H. and Zare, R.** 2014. Genetic diversity of *Fusarium semitectum* isolates from rice, using RAPD and REP-PCR markers. – Mycol. Iran 1: 19-26.
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J.** 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. – Mol. Ecol. 14: 2611-2620.
- Fu, J.J., Mei, Z.Q., Tania, M., Yang, L.Q., Cheng, J.L. and Khan, M.A.** 2015. Development of RAPD-SCAR markers for different *Ganoderma* species authentication by improved RAPD amplification and molecular cloning. – Genet. Mol. Res. 14: 5667-5676.
- Furtado, J.S.** 1965. *Ganoderma colossus* and the status of *Tomophagus*. – Mycologia. 979-984.
- Gell, I., Cubero, J. and Melgarejo, P.** 2007. Two different PCR approaches for universal diagnosis of brown rot and identification of *Monilinia* spp. in stone fruit trees. – J. Appl. Microbiol. 103: 2629-2637.
- Gottlieb, A.M. and Wright, J.E.** 1999 a. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Ganoderma*. – Mycol. Res. 103: 661-673.
- Gottlieb, A.M. and Wright, J.E.** 1999 b. Taxonomy of *Ganoderma* from southern South America: subgenus *Elfvingia*. – Mycol. Res. 103: 1289-1298.
- Gottlieb, A.M., Saidman, B.O. and Wright, J.E.** 1998. Isoenzymes of *Ganoderma* species from southern South America. – Mycol. Res. 102: 415-426.
- Hammer, O., Harper, D.A.T. and Ryan, P.D.** 2012. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. – Palaeontol. Electronica. 4 (art. 4): 9.
- Hong, S.G., Jeong, W. and Jung, H.S.** 2002. Amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of polypores and its potential for phylogenetic analysis. – Mycologia 94: 823-833.
- Hseu, R.S., Wang, H.H., Wang, H.F. and Moncalvo, J.M.** 1996. Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. – Appl. Environ. Microbiol. 62: 1354-1363.
- Keypour, S., Riahi, H., Safaie, N. and Borhani, A.** 2014. Mycelial Growth Rate and Macro-and Micromorphological Characteristics of Medicinal Species of Genus *Ganoderma* (Higher Basidiomycetes) from Iran. – Int. J. Med. Mushrooms. 16: 365-374.

این سرده به علت دارا بودن خصوصیات ژنتیکی مختلف که در برخی موارد تحت تاثیر محیط قرار گیرد می‌تواند از تنوع زیادی برخوردار باشند. علاوه بر آن، داشتن میزان رشد متفاوت و نیز تفاوت در تولید مواد موثره دارویی به علت تفاوت ژنتیکی، از مواردی است که در علوم کاربردی می‌تواند مد نظر قرار گیرد (Fu et al., 2015).

با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان اینگونه ذکر کرد که استفاده از روش RAPD نه تنها در اکثر مواقع می‌تواند برای جدا کردن گونه‌های نزدیک به هم که توالی‌های مشابه دارند و یا به تازگی از هم جدا شده‌اند مورد استفاده قرار گیرد، بلکه می‌تواند در شناسایی مناطق رویشی گونه‌های مورد بررسی که از تنوع بالای ژنتیکی برخوردار هستند جهت بهره‌گیری از ذخایر ژنتیکی و بهینه‌سازی آن مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه شهید بهشتی برای حمایت‌های مادی این پژوهش و از دکتر شریعتمداری و دکتر افتخاریان برای نظرات ارزشمند خود در جهت بهبود مقاله سپاسگزاری می‌نمایند.

- Mei, Z., Yang, L., Khan, M.A., Yang, M., Wei, C., Yang, W. and Fu, J. 2014. Genotyping of *Ganoderma* species by improved random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. – *Biochem. Syst. Ecol.* 56: 40-48.
- Miller, R.N.G., Holderness, M., Bridge, P.D., Chung, G. F. and Zakaria, M.H. 1999. Genetic diversity of *Ganoderma* in oil palm plantings. – *Plant. Pathol.* 48: 595-603.
- Moncalvo, J.M., Wang, H.F. and Hseu, R.S. 1995a. Gene phylogeny of the *Ganoderma lucidum* complex based on ribosomal DNA sequences. Comparison with traditional taxonomic characters. – *Mycol. Res.* 99: 1489-1499.
- Moncalvo, J.M., Wang, H.H. and Hseu, R.S. 1995b. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. – *Mycologia* 87: 223-238.
- Moncalvo, J.M. and Ryvardeen L. 1997. A nomenclatural study of the Ganodermataceae Donk. – *Synopsis fungorum*, Oslo-Norway. pp: 11-114.
- Moncalvo, J.M. 2000. Systematics of *Ganoderma*2. – In: Flood, J. (ed.), *Ganoderma* diseases of perennial crops. 23-49. – CABI Bioscience, Egham, UK.
- Moradali, M.F., Hedjaroude, G.A., Mostafavi, H., Abbasi, M., Ghods, S. and Sharifi-Tehrani, A. 2007. The genus *Ganoderma* (Basidiomycota) in Iran. – *Mycotaxon* 99: 251-269.
- Park, Y.J., Kwon, O.C., Son, E.S., Yoon, D.E., Han, W., Nam, J.Y. and Lee, C.S. 2012a. Genetic diversity analysis of *Ganoderma* species and development of a specific marker for identification of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. – *Afr. J. Microbiol. Res.* 6: 5417-5425.
- Park, Y.J., Kwon, O., Son, E.S., Yoon, D.E., Han, W., Yoo, Y.B. and Lee, C.S. 2012b. Taxonomy of *Ganoderma lucidum* from Korea based on rDNA and partial β -tubulin gene sequence analysis. – *Mycobiology* 40: 71-75.
- Postnova, E.L. and Skolotneva, E.S. 2010. *Ganoderma lucidum* complex: Some individual groups of strains. – *Microbiol.* 79: 270-276.
- Ryvardeen, L. 1994. Can we trust morphology in *Ganoderma*? – In *Systematics, Phytopathology and Pharmacology*. 5th Int Mycol Congress (eds. P.K. Buchanan, R.S. Hseu and J.M. Moncalvo), Dept. Agric. Chem., National Taiwan University, Taipei, China: 19-24.
- Safaie, N., Alizadeh, A., Saidi, A., Rahimian, H. and Adam, G. 2005. Molecular characterization and genetic diversity among Iranian populations of *Fusarium graminearum*, the causal agent of wheat head blight. Iran – *J. Plant. Pathol.* 41: 171-189.
- Shakeel, M., Ilyas, M. and Kazi, M. 2013. Evaluation of synthetic hexaploid wheats (derivative of durum wheats and *Aegilops tauschii* accessions) for studying genetic diversity using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. – *Mol. Biol. Rep.* 40: 21-26.
- Smith, B.J. and Sivasithamparam, K. 2000a. Internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence of five species of *Ganoderma* from Australia. – *Mycol. Res.* 104: 943-951.
- Smith, B.J. and Sivasithamparam, K. 2000b. Isozymes of *Ganoderma* species in Australia. – *Mycol. Res.* 104: 952-961.
- Smith, B.J. and Sivasithamparam, K. 2003. Morphological studies of *Ganoderma* (Ganodermmataceae) from the Australasian Pacific regions. – *Aust. Syst.* 16: 487-503.
- Steyaert, R.L. 1972. Species of *Ganoderma* and related genera mainly of Bogor and Leiden Herbaria. – *Rijksherbarium publishing*, Leiden. pp: 55-118.
- Steyaert, R.L. 1975. The concept and circumscription of *Ganoderma tornatum*. – *Trans. Br. Mycol. Soc.* 65: 451-467.
- Takamatsu, S. 1998. PCR applications in fungal phylogeny. – In: P. Bridge, D. Arora, C. Reddy and R. Elander (ed.), *Applications of PCR in Mycology*: 125-152. CAB International.
- Wasser, S.P. and Weis, A.L. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (Review). – *Int. J. Med. Mushrooms.* 1: 31-62.
- Zakaria, L., Kulaveraasingham, H., Guan, T.S., Abdullah, F. and Wan, H.Y. 2005. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and random amplified microsatellite (RAMS) of *Ganoderma* from infected oil palm and coconut stumps in Malaysia. – *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 13: 23-34.

How to cite this article:

Keypour, S., Riahi, H., Ebadi Nahari, M., Asef, M.R., Borhani, A. and Safaie, N. 2019. The Study of the genetic diversity of two laccate species of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma resinaceum* using RAPD marker. – *Nova Biolo. Reperta* 5: 379-388.

سمیه کی‌پور، س. ریاحی، ح. عبادی نهاری، م. آصف، م.ر، برهانی، ع. و صفا، ن. ۱۳۹۷. بررسی تنوع ژنتیکی دو گونه براق *Ganoderma resinaceum* و *Ganoderma lucidum* به وسیله

نشانگر RAPD. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۵: ۳۷۹-۳۸۸.