

ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های وحشی گانودرما لوسیدوم با استفاده از نشانگر ISSR

شبنم لطفی^۱، مهدی بهنامیان^{۱*}، سارا دژستان^۲، اصغر استاجی^۱ و یونس پوربیرامی هیر^۱

^۱ اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، گروه علوم باغبانی

^۲ اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۸



چکیده

ایران کشوری با اقلیم بسیار متنوع و غنی از گیاهان و قارچ‌های دارویی وحشی است. بنابراین، برای استفاده از این تنوع در برنامه‌های اصلاحی و همچنین حفظ این منابع طبیعی، بررسی تنوع ژنتیکی از اهمیت زیادی برخوردار است. در این مطالعه، تنوع ژنتیکی ۳۲ سویه قارچ گانودرما لوسیدوم (*Ganoderma lucidum*) جمع‌آوری شده از نوار شمالی کشور با استفاده از ۲۱ نشانگر ISSR بررسی شد. با توجه به نتایج به دست آمده، میزان اطلاعات چندشکلی بین نشانگرها از ۰/۲۹۴ تا ۰/۴۶۹ با میانگین ۰/۴۰۷ متغیر بود. همچنین تنوع ژنتیکی نی، شاخص شانون و متوسط فاصله ژنتیکی نیز به ترتیب ۰/۳۱۷، ۰/۲۱۴ و ۰/۲۷۸ بود. براساس تجزیه به مولفه‌های اصلی، سه مولفه اول ۶۳٪ از تنوع کل را به خود اختصاص داد. براساس تجزیه خوشه-ای، سویه‌های مورد مطالعه در هشت گروه اصلی قرار گرفتند. آنالیز Sturcture نیز حضور ۹ گروه مجزای ژنتیکی را نشان داد. در مجموع، نتایج نشان داد تنوع ژنتیکی مطلوبی بین سویه‌های مورد مطالعه قارچ گانودرما مورد مطالعه وجود داشت که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: گانودرما، تجزیه کلاستر، چند شکلی، تجزیه ساختار ژنتیکی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۴۱۴۵۰۷۲، پست الکترونیکی: mbehnajian@gmail.com

مقدمه

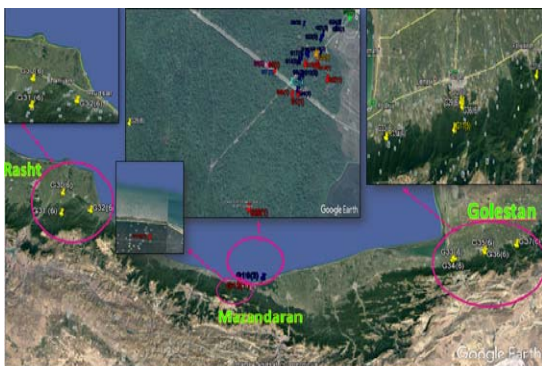
کبد و برونشیت و همچنین در کاهش فشار خون و کلسترول نقش داشته و از تجمع پلاکت‌ها جلوگیری می‌کند (۴). در گذشته طبقه‌بندی گانودرما براساس مشخصات ریخت‌شناسی انجام می‌گرفت ولی امروزه با استفاده از روش انگشت‌نگاری DNA، شناسایی ارقام و گونه‌های گانودرما به راحتی امکان پذیر بوده و به عنوان ابزاری مفید برای حفظ مالکیت ارقام اصلاح شده جدید مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۷). تنوع ژنتیکی برای توصیف تنوع ماده وراثتی در موجودات بیولوژیکی استفاده می‌شود و در سطح فرد، جمعیت و گونه قابل اندازه‌گیری است (۱۴). بدون تنوع ژنتیکی یک جمعیت قادر به تکامل و سازگاری با تغییرات محیطی نبوده و حفظ تنوع ژنتیکی به اولویت

قارچ گانودرما لوسیدوم (*Ganoderma lucidum*) قارچی یک ساله متعلق به شاخه *Basidiomycota* راسته *Aphyllpholales*، تیره *Ganodermatacea* و جنس *Ganoderma* می‌باشد (۲) و با نام‌های عمومی *Yangzhi*، *Reishi*، *Sachitaker*، *Mannetake*، *Lingzhi* شناخته می‌شود (۲۳). این قارچ جزو قارچ‌های تجزیه‌کننده چوب بوده و از گذشته‌های بسیار دور برای اهداف دارویی به ویژه در کشورهای چین، ژاپن و کره به صورت تجاری کشت می‌شده است (۲۵). گانودرما حاوی ترکیباتی است که دارای خواص ضد آلرژی و ضدتوموری بوده، باعث افزایش سطح سیستم ایمنی بدن شده، در درمان بیماری‌های قلبی و عروقی، دیابت، بیماری‌های مرتبط با

مناطق مختلف چین و برزیل گزارش کردند (۲۱). در پژوهشی دیگر، تنوع ژنتیکی ۹ جمعیت گانودرما با استفاده از ۲۰ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت که ۲۴۲ (۹۹/۲۵٪) باند چندشکل تولید و فاصله ژنتیکی قابل توجهی بین سویه‌های مختلف گانودرما با ضریب تشابه ۰/۵۲ تا ۰/۷۴ مشاهده شد (۱۱). با توجه به پراکنش قارچ گانودرما در نوار شمالی کشور و اهمیت بررسی تنوع ژنتیکی موجود، در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۳۶ سویه گانودرما لوسیدوم جمع‌آوری شده با ۲۱ نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

نمونه‌برداری و خالص‌سازی: در پژوهش حاضر، ۳۶ سویه وحشی گانودرما لوسیدوم از جنگل‌های مازندران، گرگان و گیلان جمع‌آوری (جدول ۱، شکل ۱) و از طریق کشت تکه‌ای از کلاهک در محیط کشت مالت اکسترکت آگار خالص‌سازی شدند. پس از خالص‌سازی، تمام سویه‌ها به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۸۵ درصد نگهداری شدند.



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی نمونه‌های جمع‌آوری شده گانودرما لوسیدوم

استخراج DNA: بمنظور استخراج DNA ژنومی، میسلیم هر سویه در محیط کشت مایع حاوی ۲۰ گرم دکستروز، دو گرم پپتون، دو گرم عصاره مخمر، ۰/۵ گرم K_2HPO_4 و ۰/۵ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ مایه‌زنی شده و در شیکر

اصلی بسیاری از برنامه‌های حفاظتی تبدیل شده است (۲۷). تنوع ژنتیکی پایه و اساس گزینش فنوتیپی، ژنوتیپی و اصلاح کمی و کیفی گونه‌های مختلف بوده و کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی میان افراد جمعیت و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه‌ها در برنامه اصلاحی امکان سازماندهی ژرم پلاسم و نمونه‌گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌سازد. امروزه انواع مختلفی از روش‌های آزمایشگاهی برای مطالعه تنوع ژنتیکی در گانودرما مانند آنالیز ایزوآنزیم‌ها، RAPD (Random amplified DNA Amplified fragment) AFLP، (polymorphic DNA Internal Transcribed) ITS، (length polymorphism Restriction fragment length) RFLP و (Spacer Inter Simple Sequence) ISSR (polymorphism Repeat) به طور گسترده استفاده می‌شود (۱، ۲۵). در بین نشانگرهای مختلف، نشانگر بین ریز ماهواره ای یا همان ISSR روشی است که به دانش اولیه در مورد ژنوم، کلون سازی و یا طراحی پرایمر اختصاصی نیاز ندارد چرا که قطعات بین توالی‌های تکراری تکثیر می‌شوند (۲۶، ۲۸). نشانگر ISSR به دلیل ویژگی‌های مطلوبی مانند تکرارپذیری، آنالیز همزمان، تعداد زیاد جایگاه ژنی، دقت بالا، تنوع بسیار بالا، هزینه پایین و سرعت و سهولت اجرا به طور گسترده و موفقیت‌آمیز برای بررسی تنوع ژنتیکی در سطوح بین گونه‌ای و درون گونه‌ای طیف وسیعی از قارچ‌های مختلف به کار رفته است (۸، ۱۵). برای نمونه، در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی ۱۰ سویه گانودرما با استفاده از آغازگرهای RAPD و ISSR، مورد ارزیابی قرار گرفت که در مجموع ۲۲۰ و ۲۱۴ باند چندشکل به ترتیب به وسیله ۲۴ آغازگر RAPD و ۱۷ آغازگر ISSR به دست آمد (۱۱). همچنین سو و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند که نشانگر ISSR به خوبی می‌تواند برای شناسایی سویه‌های گانودرما مورد استفاده قرار گیرد (۲۴). رولیم و همکاران (۲۰۱۱) نیز چندشکلی بین ۲۲ تا ۸۰ درصد و ضریب تشابه بین ۰/۵۲ تا ۰/۷۲ را بین سویه‌های *G. lucidum* جمع‌آوری شده از

با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از برداشتن یک میلی‌لیتر از فاز رویی و انتقال به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری، ایزوپروپانول سرد به میزان ۰/۶ حجم فاز رویی به میکروتیوب‌های فوق افزوده شد و به مدت یک ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس عمل سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت و فاز رویی حذف شد. رسوب حاصل در زیر هود لامینار خشک شد و در نهایت، ۷۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر به میکروتیوب‌ها اضافه گردید و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. تعیین کیفیت DNA به وسیله ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام گرفت.

انکوباتور با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. بعد از گذشت ۱۰ تا ۱۴ روز از زمان مایه‌زنی، توده میسلومی از محیط مایع جداسازی شد. سپس ۰/۵ گرم از میسلوم قارچ در نیتروژن مایع ساییده شده و به آن ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (Tris-HCl) ۱ مولار، NaCl ۵ مولار، EDTA ۵ مولار) با pH ۸ و ۲/۵ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه گردید و میکروتیوب‌ها در حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شدند به طوری که هر دو دقیقه، عمل اینورتن کردن میکروتیوب‌ها انجام گرفت. پس از آن، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه روی یخ نگهداری شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد

جدول ۱- مشخصات موقعیت جغرافیایی نمونه‌های جمع‌آوری شده قارچ گانودرما

شماره نمونه	ارتفاع از سطح دریا (متر)	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	کشور	استان	شماره نمونه	ارتفاع از سطح دریا (متر)	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	کشور	استان
16	052°04'59.8"	36°34'48.4"	G 21	1	-9	052°04'00.7"	36°34'24.6"	G 1	1		
23	052°04'00.2"	36°34'46.2"	G 22	1	-8	052°04'01.4"	36°34'25.5"	G 2	1		
15	052°04'04.8"	36°34'54.0"	G 23	1	-7	052°04'05.0"	36°34'22.7"	G 3	1		
22	052°04'02.82"	36°34'55.1"	G 24	1	-6	052°04'04.7"	36°34'25.2"	G 4	1		
27	052°04'02.89"	36°34'57.6"	G 25	1	-3	052°03'51.1"	36°34'23.15"	G 5	1		
-1	052°03'51.76"	36°34'08.5"	G 26	1	-2	052°34'48.2"	36°34'22.1"	G 6	1		
-7	052°04'07.14"	36°34'26.3"	G 27	1	-2	052°03'48.4"	36°34'22.6"	G 7	1		
4	052°03'42.19"	36°33'49.25"	G 28	1	-13	052°04'03.4"	36°34'28.0"	G 8	1		
-30	054°04'08.4"	36°34'37.7"	G 11	2	-8	052°03'04.1"	36°34'2.32"	G 9	1		
379	052°27'18.88"	36°47'25.42"	G 29	2	-8	052°04'03.7"	36°34'30.5"	G 10	1		
255	054°06'09.88"	36°42'45.9"	G 33	2	21	052°04'01.4"	36°34'34.1"	G 13	1		
215	054°07'03.00"	36°44'31.05"	G 34	2	20	052°03'58.3"	36°34'34.6"	G 14	1		
464	052°04'04.8"	36°47'15.54"	G 35	2	21	052°03'58.5"	36°34'33.0"	G 15	1		
378	054°26'38.28"	36°34'54.30"	G 36	2	18	052°04'00.2"	36°34'37.6"	G 16	1		
520	054°47'38.02"	36°50'38.02"	G 37	2	18	052°04'58.9"	36°34'37.7"	G 17	1		
378	049°52'50.56"	37°10'55.03"	G 30	3	17	052°04'01.1"	36°34'37.8"	G 18	1		
910	049°52'27.26"	37°01'23.89"	G 31	3	14	052°04'25.3"	36°34'37.1"	G 19	1		
789	049°59'23.89"	37°03'09.11"	G 32	3	19	052°04'02.6"	36°34'40.1"	G 20	1		

۱/۱) میکرولیتر DNA، ۲/۷ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱/۲ میکرولیتر آغازگر، ۵ میکرولیتر Master mix تهیه شد و در دستگاه PCR با برنامه واسرشته‌سازی اولیه به مدت

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: بررسی تنوع ژنتیکی سویه‌های گانودرما لوسیدوم با استفاده از ۲۱ نشانگر ISSR انجام شد (جدول ۲). مخلوط واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر

درجه سانتیگراد با ۳۵ چرخه بود و در نهایت، توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه با دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گرفت. پس از انجام واکنش PCR، محصول نهایی واکنش در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE بارگذاری و با ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۷۰ دقیقه الکتروفورز شد. سپس عکس‌برداری با کمک دستگاه ژل داگ صورت گرفت (شکل ۲).

دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، واسرشت‌سازی به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، اتصال به صورت تاج داون (به ازای هر چرخه، ۰/۳ درجه کاهش از دو درجه بالاتر از دمای ذوب آغازگر) و توسعه به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد با ۱۰ چرخه قرار گرفت. مرحله دوم شامل واسرشت‌سازی به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، اتصال به مدت ۶۰ ثانیه در دمای آغازگر مربوطه، توسعه به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲

جدول ۲- توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده

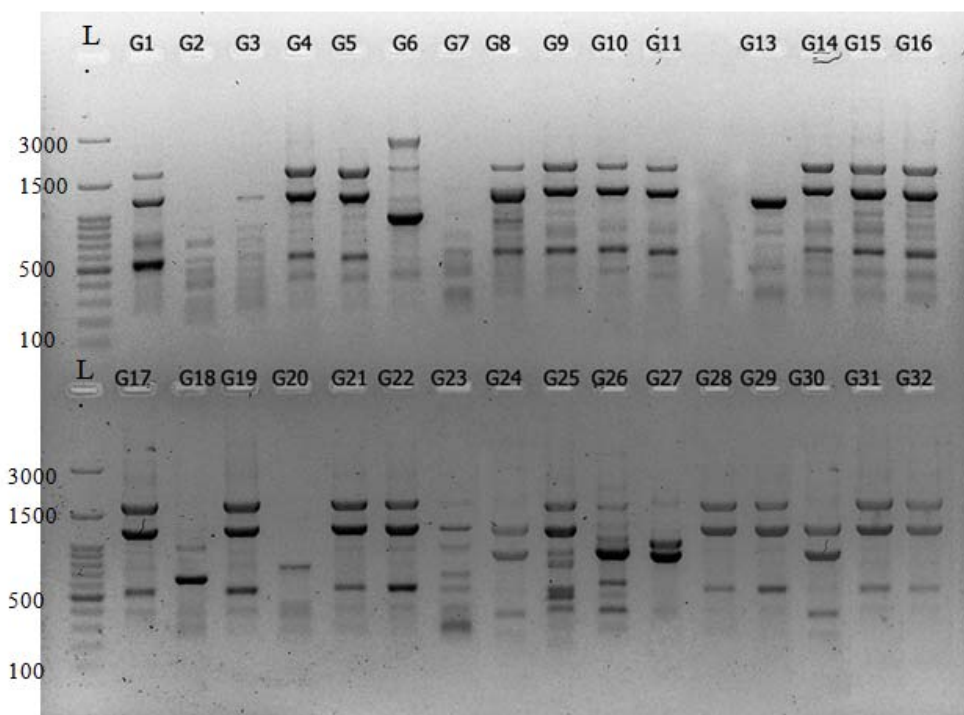
منبع	دمای اتصال (°C)	توالی	آغازگر
Shekhawat et al., 2018	54.8	CACACACACACACACARG	ISSR1
Brake et al., 2014	42.0	CACACACACACARY	ISSR8
Ghanbari et al., 2018	49.2	GACAGACAGACAGACA	ISSR10
Brake et al., 2014	51.9	BDBDCACACACACACAC	ISSR15
Brake et al., 2014	59.7	BDBCACCACCACCACCA	ISSR16
Mehri et al., 2017	58.4	DGCCACCACCACCACCA	ISSR17
Bahmani et al., 2015	59.0	DDBCCACCACCACCACC	ISSR18
Mehri et al., 2017	48.3	VVHTTGTGTGTGTGTGTG	ISSR19
Brake et al., 2014	53.3	GACGACGACGACGAC	ISSR20
Mehri et al., 2017	49.3	ACTCACTCACTCACTC	ISSR21
Brake et al., 2014	56.7	CTGAGAGAGAGAGAGAG	ISSR22
Ghanbari et al., 2018	52.8	GAGAGAGAGAGAGAGAC	ISSR23
Mehri et al., 2017	44.0	GTGTGTGTGTGCG	ISSR25
Shekhawat et al., 2018	44.0	GAGAGAGAGAGACC	ISSR26
Ghanbari et al., 2018	53.7	CTCTCTCTCTCTCTAC	ISSR28
Mehri et al., 2017	56.7	GACACACACACACACAC	ISSR29
Ghanbari et al., 2018	56.7	CCACTCTCTCTCTCTCT	ISSR30
Mehri et al., 2017	46.9	ATGATGATGATGATGATG	ISSR31
Ghanbari et al., 2018	47.8	GGAAGAGAGAGAGAG	ISSR32
Ghanbari et al., 2018	58.8	GGGTGGGGTGGGGTG	ISSR33
Ghanbari et al., 2018	56.0	AGAGAGAGAGAGAGAGGC	ISSR34

B= not A, D= not C, H= not G, V= not T, Y= C or T

شدند. سپس باندهای حاصل از هر آغازگر بر روی ژل براساس هم‌ردیفی باندها به صورت حضور (۱) یا عدم

آنالیز داده‌های مولکولی: بمنظور تعیین تشابه سویه‌های گانودرما لوسیدوم ابتدا باندهای واضح در ژل مشخص

STRUCTURE و NTYSYS, GenAlex, POPGENE حضور باند (۰) وارد نرم افزار Excel شدند. در نهایت، پارامترهای مولکولی با نرم افزارهای 284 آنالیز شدند.



شکل ۲- محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد برای نشانگر ISSR17. لدر ۱۰۰ kb (L)

نتایج و بحث

جدول ۳- میزان اطلاعات چند شکلی آغازگرهای ISSR مورد استفاده

PIC	آغازگر	PIC	آغازگر
۰/۴۱۸	ISSR23	۰/۴۴۲	ISSR8
۰/۴۵۷	ISSR25	۰/۴۲۰	ISSR10
۰/۴۵۵	ISSR26	۰/۳۷۵	ISSR15
۰/۳۳۶	ISSR30	۰/۲۹۴	ISSR16
۰/۴۰۰	ISSR31	۰/۳۸۰	ISSR17
۰/۴۵۱	ISSR32	۰/۳۴۵	ISSR18
۰/۴۵۵	ISSR33	۰/۴۲۰	SSRI20
		۰/۴۶۹	ISSR22
۰/۴۰۷			میانگین

در مطالعه حاضر، PIC بالا می‌تواند ناشی از وجود تنوع زیاد بین سویه‌های مورد مطالعه، چندشکلی بالا و وجود

میزان اطلاعات چند شکلی (PIC = Polymorphism information content): در پژوهش حاضر، میزان PIC برای نشانگرهای ISSR مورد استفاده بین ۰/۲۹۴ برای نشانگر ISSR16 تا ۰/۴۶۹ برای نشانگر ISSR22 متغیر بود (جدول ۳). متوسط PIC برای تمامی نشانگرها ۰/۴۰۷ بود. هو و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای روی نه سویه از *Ganoderma* spp. با استفاده از ۲۰ نشانگر ISSR میزان PIC را ۰/۸۵ بیان کردند. همچنین حیاتی و همکاران (۲۰۲۰) در بررسی روی ۴۹ سویه از *Ganoderma boninense* میانگین PIC را ۰/۴۴ به دست آوردند. میزان اطلاعات چندشکلی یکی از معیارهای قدرت تمایزدهندگی نشانگر مولکولی بوده و هرچه مقدار عددی آن بزرگ‌تر باشد، نشان‌دهنده وجود چندشکلی بالا می‌باشد (۱۶).

آلل‌های نادر در یک مکان ژنی باشد که در تمایز افراد نقش مهمی دارند و نشانگرهایی با PIC بالا برای تمایز افراد با خویشاوندی نزدیک مفیدتر هستند.

میزان هتروزیگوتی مورد انتظار، آلل‌های مؤثر و شاخص اطلاعات شانون: در این پژوهش، میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار برابر با ۰/۲۱۴ بود. این شاخص در محدوده ۰/۱۹۲ در جمعیت سه و ۰/۳۵۸ در جمعیت یک متغیر بود. بالا بودن میزان تنوع ژنی بیانگر قدرت قابل توجه نشانگر ISSR در تشخیص تنوع موجود بین جمعیت‌ها و تفکیک دقیق آنهاست. در مقایسه‌ای که روی دو پارامتر PIC و تنوع ژنی انجام گرفت، مشاهده شد که نشانگرهای دارای PIC بالا، دارای تنوع ژنی بالاتری نیز هستند. میانگین تعداد آلل‌های مؤثر برای سه جمعیت مورد مطالعه، ۱/۴۹۲ بود که بیشترین مقدار آن برای جمعیت یک برابر با ۱/۶۲ و کمترین آن مربوط به جمعیت سه با مقدار ۱/۳۳ برآورد شد (جدول ۴). پوربا و همکاران (۲۰۲۰) در پژوهشی روی سویه‌های قارچ *Ganoderma boninense* با استفاده از ۶ نشانگر SSR میانگین تعداد آلل‌های مؤثر، شاخص اطلاعات شانون و هتروزیگوتی مورد انتظار را به ترتیب ۶/۶۴، ۱/۴۵ و ۰/۶ به دست آوردند. میانگین شاخص اطلاعات شانون در مطالعه حاضر ۰/۳۱۷ بود که بیشترین مقدار این شاخص در جمعیت یک (۰/۵۳۲۱) و کمترین مقدار آن در جمعیت سه (۰/۲۸۵) مشاهده شد.

تنوع ژنتیکی نی بر اساس ماتریس فاصله و شباهت: متوسط فاصله ژنتیکی بین سه گروه گانودرما لوسیدوم براساس ماتریس ژنتیکی نی (۱۷) برابر با ۰/۱۷۹ و میانگین ماتریس شباهت ۰/۶۲۸ برآورد شد. در این مطالعه بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های یک و سه با مقدار ۰/۲۴۷ و کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های یک و دو با مقدار ۰/۰۸۷ مشاهده شد. به عبارت دیگر، جمعیت‌های یک و دو گانودرما لوسیدوم با مقدار ۰/۹۱۷ بیشترین شباهت ژنتیکی و جمعیت‌های یک و سه با مقدار ۰/۷۸۱ کمترین

شباهت ژنتیکی را بین سه جمعیت مورد مطالعه نشان دادند (جدول ۵) که می‌توان علت شباهت ژنتیکی بالای جمعیت‌های یک و دو را به نزدیکی زیستگاه‌های این دو جمعیت با هم و انتقال اسپوره‌های آن‌ها توسط عواملی چون باد، پرندگان، انسان‌ها و شباهت شرایط اکولوژی حاکم بر آن‌ها و همچنین جریان ژنی بین دو جمعیت ارتباط داد (۱۲). در پژوهشی روی ۱۰ نمونه *Ganoderma spp.* فاصله ژنتیکی از ۰/۴۸ تا ۰/۸۵ متغیر بود (۱۵). در مطالعه حاضر، تنوع ژنی یا هتروزیگوتی کل (Ht) و تنوع ژنی درون جمعیتی (Hs) برای نشانگرهای ISSR به ترتیب حدود ۰/۳۶۲۹ و ۰/۲۱۳۷ بود. مقادیر تمایز ژنتیکی (Gst) نیز با ۰/۴۱۱ سطح پایینی از تمایز جمعیت‌ها را نشان داد. در مکان‌های ژنی تحت بررسی در این پژوهش بیشترین جریان ژنی مربوط به جایگاه‌های ۹۳ و ۱۲۵ با مقدار ۱۰/۵۴۵۳ و کمترین میزان جریان ژنی مربوط به جایگاه‌های ۱۲۹ و ۱۳۳ با مقدار ۰/۰۸۹۵ بود. متوسط جریان ژنی و تمایز ژنی به ترتیب ۰/۷۱۶۴ و ۰/۴۱۱ بود. دیودی و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی روی چهار سویه گانودرما لوسیدوم با استفاده از ۷ آغازگر RAPD، میزان هتروزیگوتی کل و تنوع ژنی درون جمعیتی را به ترتیب ۰/۱۸۶ و ۰/۰۵۶ گزارش کردند. مقادیر پایین Gst در پژوهش حاضر، تمایز واضحی را بین جمعیت‌ها نشان نداد که علت این امر را می‌توان کم بودن فاصله جغرافیایی بین جمعیت‌ها و انتقال بالای اسپوره‌های این قارچ به وسیله باد نسبت داد. همچنین گانودرما لوسیدوم یک قارچ هتروتالیک و دارای تیپ آمیزشی چهار قطبی (تتراپولار) است (۵) که این امر می‌تواند بالا بودن میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها را نیز اثبات کند. بالا بودن میزان Nm نسبت به Gst نیز می‌تواند هتروتالیک بودن این قارچ را توجیه کند.

جدول ۴- داده‌های به دست آمده از آغازگرهای ISSR در سه جمعیت مورد مطالعه

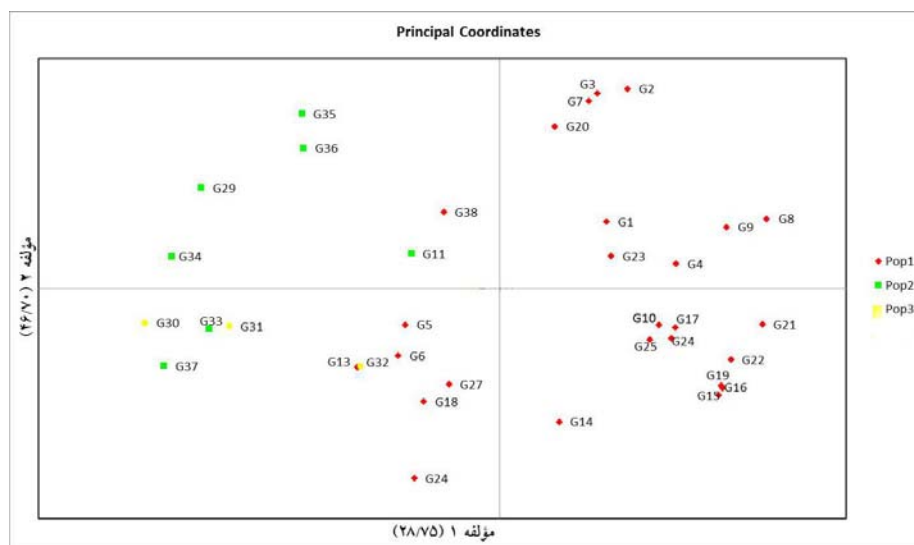
جمعیت	هتروزیگوتی مورد انتظار	آل‌های مؤثر	شاخص اطلاعات شانون
جمعیت ۱	۰/۳۵۸	۱/۶۲۰	۰/۵۳۲
جمعیت ۲	۰/۳۰۵	۱/۵۲۷	۰/۴۵۳
جمعیت ۳	۰/۱۹۲	۱/۳۳۱	۰/۲۸۵
میانگین	۰/۲۱۴	۱/۴۹۲	۰/۳۱۷

جدول ۵ - مقادیر فاصله ژنتیکی درون جمعیت‌ها، فاصله ژنتیکی (پایین قطر) و تشابه ژنتیکی (بالای قطر) بین جمعیت‌ها

جمعیت ۱	جمعیت ۲	جمعیت ۴	جمعیت ۱
۰/۰۰۰	۰/۹۱۶۵	۰/۷۸۱۱	جمعیت ۱
۰/۰۸۷۲	۰/۰۰۰	۰/۸۱۴۴	جمعیت ۲
۰/۲۴۷۰	۰/۲۰۵	۰/۰۰۰	جمعیت ۳

بین جمعیت‌ها را تبیین کردند (مؤلفه اول ۲۸/۷۵ درصد، مؤلفه دوم ۱۷/۹۴ درصد و مؤلفه سوم ۱۶/۳۲ درصد). این نتایج نشان داد که این نشانگر حاوی اطلاعات مفید برای گروه‌بندی سویه‌ها بود، هرچند استفاده از تعداد بیشتری از آغازگرها نیز توصیه می‌شود. در این پژوهش، تجزیه اطلاعات مولکولی به دست آمده از نشانگر ISSR، ۳۲ سویه مورد بررسی را براساس محل جمع‌آوری آن‌ها به سه گروه اصلی نور، گلستان و گیلان تقسیم کرد (شکل ۳).

تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی: تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی یک روش مقیاس‌گذاری یا مختصات‌یابی است که با ماتریس شباهت یا تفاوت‌هایی بین مجموعه‌ای از افراد شروع می‌شود و هدف از آن به وجود آوردن یک نمودار گرافیکی از داده‌ها با ابعاد کمتر است. بدین منظور برای بررسی سویه‌های تحت مطالعه از تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی برای تکمیل تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی نشان داد که سه مؤلفه هماهنگ اول حدود ۶۳/۰۲ درصد تغییرات مولکولی

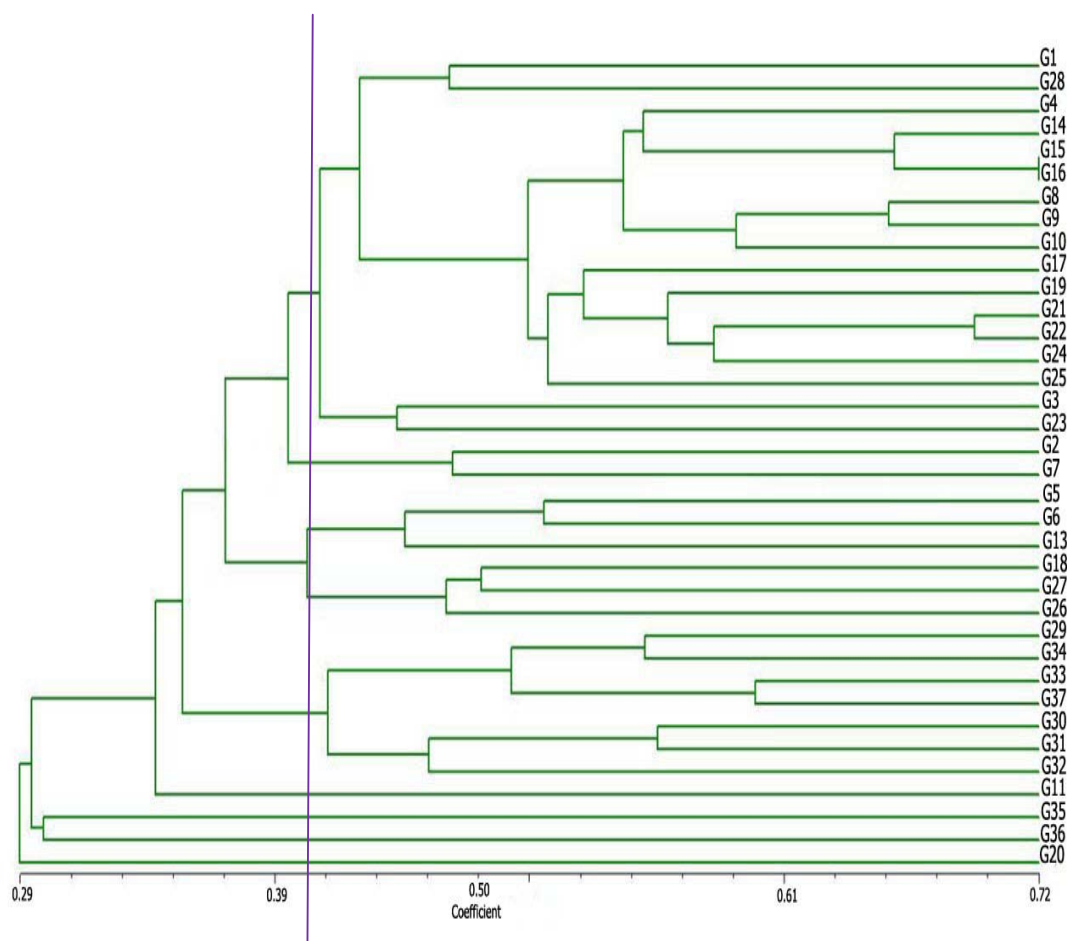


شکل ۳ - گروه‌بندی سه جمعیت مورد مطالعه گانودرما لوسیدوم با استفاده از سه مؤلفه هماهنگ اول حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی

سویه‌های نور و گلستان می‌شوند با آن‌ها مطابقت دارد. سون و همکاران (۲۰۰۶) در پژوهشی روی جمعیت گانودرما به کمک نشانگرهای مولکولی SRAP، سویه‌ها را به وسیله روش UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) در ۵ گروه اصلی قرار دادند. می و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که فاصله ژنتیکی بین گونه‌های مختلف گانودرما و حتی سویه‌های مختلف گونه *G. lucidum* قابل توجه هست و تفاوت‌های جغرافیایی و ماهیت میزبان قارچ می‌تواند در این مورد تاثیرگذار باشد. اسپورها می‌تواند در اتمسفر با توجه به الگوی باد پراکنده شوند. جابجایی اسپور قارچ‌های اکتومایکوریزا تا ۱۰ کیلومتر صورت می‌گیرد (۱۹). این موارد می‌تواند سبب تنوع ژنتیکی بالا بین قارچ‌هایی مانند قارچ‌های گونه گانودرما شود که از طریق اسپور و به وسیله باد پراکنده می‌شود.

تجزیه ساختار ژنتیکی: در این پژوهش، برای ارزیابی ساختار ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه از ۷۳ جایگاه ژنومی تکثیر شده توسط آغازگرهای ISSR استفاده شد. شکل ۵، نمودار دو طرفه تعیین بهینه K را نشان می‌دهد. با توجه به این نمودار، بهترین K در جمعیت مورد مطالعه اوج منحنی است (K=۹) که به عنوان K بهینه در تخمین ساختار جمعیت و محاسبه ماتریس عضویت افراد در هر کلاستر (ماتریس Q) در نظر گرفته شد. براساس نتایج ارائه شده در باریلات (شکل ۶)، از کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با احتمال بیشتر از ۶۰٪ عضویت سویه‌ها، ساختار اول (قرمز) شامل ۸ عضو (G1، G3، G13، G27، G26، G18، G5) ساختار دوم (سبز) شامل یک عضو (G23)، ساختار سوم (آبی) شامل ۱۳ عضو (G4، G8، G9، G10، G14، G15، G16، G17، G19، G21، G22، G24، G25) و ساختار چهارم شامل ۱۰ عضو (G28، G29، G30، G31، G33، G34، G35، G37، G36، G32) بود.

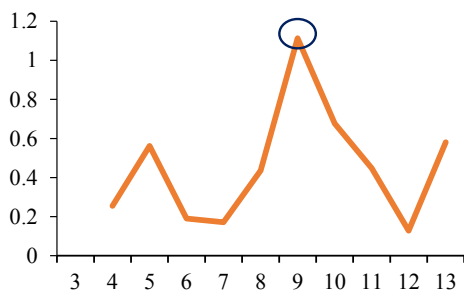
تجزیه خوشه‌ای: در پژوهش حاضر، گروه‌بندی سویه‌ها بر اساس ضریب دایس و روش UPGMA، با نرم‌افزار NTSYS انجام شد. دندروگرام به دست آمده، سویه‌ها را در هشت گروه اصلی طبقه‌بندی کرد (شکل ۴). گروه اول، دوم، سوم و چهارم تک عضو بودند که در مجموع ۱۳/۵ درصد سویه‌ها را در بر گرفتند و به ترتیب شامل سویه‌های G20، G36، G35 و G11 بودند. گروه پنجم با هفت عضو ۱۸/۹۱ درصد سویه‌ها را در برگرفت که شامل سویه‌های G29، G29، G34، G33، G37، G30، G31 و G32 سویه-های G26، G27، G18، G13، G6 و G5 نیز در گروه ششم قرار گرفتند که ۱۶/۲۱ درصد از سویه‌ها را شامل می‌شد. گروه هفتم با دو عضو ۵/۴ درصد سویه‌ها را به خود اختصاص داد که شامل سویه‌های G7 و G2 بود و در نهایت، گروه هشتم با ۱۷ عضو ۴۵/۹ درصد جمعیت سویه‌ها شامل G3، G25، G24، G22، G21، G19، G17، G10، G9، G8، G16، G15، G14، G4، G28 و G1 را در خود جای داد. نتایج حاصل از این دندروگرام، تنوع مولکولی بالا را بین سویه‌های مختلف گانودرما نشان داد به طوری که حتی سویه‌های جمع‌آوری شده از یک شهر مانند نور در سه گروه هشتم، هفتم و اول قرار گرفتند که نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالا در نمونه‌های جمع‌آوری شده از آن منطقه بود. بالا بودن میزان شاخص‌های Ne، He و I برای این جمعیت، این موضوع را تصدیق می‌کند. از طرف دیگر، در گروه پنجم سویه‌هایی از شهرهای استان‌های گلستان و گیلان قرار گرفتند، که این مورد به دلیل تشابه ژنتیکی بالا بین سویه‌ها بود. سویه‌های G20، G36، G35 و G11 هر کدام به تنهایی در یک گروه اصلی قرار گرفتند که نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالا در این سویه‌ها بود. قرار گرفتن گروه‌های اول، دوم، سوم و چهارم با فاصله کم در مجاورت یکدیگر قابل انتظار است و تشابه ژنتیکی بالا نی بین جمعیت‌های ۱ و ۲ که به ترتیب شامل



شکل ۴- نمودار درختی سویه‌های گانودرما لوسیدوم (*Ganoerma lucidum*) بر اساس ضریب تشابه دایس حاصل از داده‌های نشانگر ISSR با استفاده از روش گروه‌بندی UPGMA

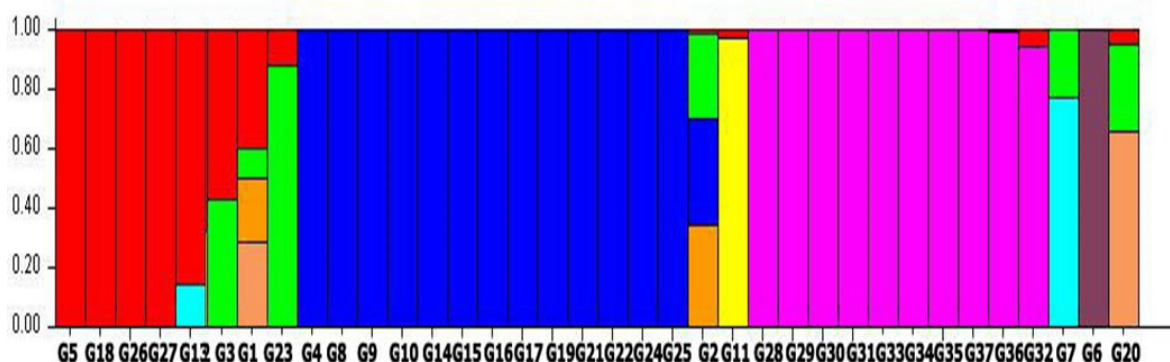
همین ترتیب گروه پنج و شش این دو روش به جز مواردی مشابه هم بودند.

Delta K



شکل ۵- تعیین زیر گروه‌ها با استفاده از Suracture harvester و روش Evanno (Evanno et al., 2005). محور عمودی مقدار آماره ΔK و محور افقی تعداد زیر جمعیت‌ها را نشان می‌دهد.

در بررسی‌های انجام شده، سویه‌های گانودرما لوسیدوم در روش تجزیه خوشه‌ای در هشت و در تجزیه ساختار ژنتیکی در ۹ گروه اصلی طبقه‌بندی شدند که قرارگیری سویه‌ها در هر دو روش به جز مواردی محدود با هم مطابقت داشت. برای مثال، سویه‌های G11 و G20 که در روش تجزیه خوشه‌ای در گروه‌های تک عضوی قرار گرفتند در تجزیه ساختار ژنتیکی نیز رنگ‌بندی مجزایی داشتند. همچنین، سویه‌های G18، G13، G5، G26 و G27 در گروه شش تجزیه خوشه‌ای با گروه یک تجزیه ساختار ژنتیکی و سویه‌های G4، G8، G9، G10، G14، G15، G16، G17، G19، G21، G22، G24 و G25 در گروه ۹ تجزیه خوشه‌ای با گروه سه تجزیه ساختار ژنتیکی و به



شکل ۶- نمودار تجزیه ساختار حاصل از نرم‌افزار Structure بر اساس $k=9$ (تکرار) در سویه‌های گانودرما لوسیدم بر اساس داده‌های نشانگری ISSR. اعداد روی محور افقی ضریب عضویت Q هر سویه را به گروه مربوطه نشان می‌دهد. سویه‌هایی با رنگ مشترک مربوط به یک گروه هستند.

در ایران می‌باشد و نتایج به دست آمده نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های ژنتیکی بالا بین سویه‌های مختلف این قارچ بود. این تنوع می‌تواند به تفاوت‌های جغرافیایی و ژنتیکی و نحوه پراکنش اسپورهای قارچ نسبت داده شود.

تقدیر و تشکر

برخود لازم می‌دانم از زحمات سایر اعضای گروه علوم باغبانی دانشگاه محقق اردبیلی که ما را در انجام این پایان نامه کمک نمودند کمال تشکر را داشته باشم.

این مطالعه نشان داد که نشانگر ISSR به خوبی توانست تنوع ژنتیکی بین سویه‌های گانودرما لوسیدم را آشکار سازد. در بررسی فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها مشخص شد که فاصله جغرافیایی و پراکنش اسپورها بر فاصله ژنتیکی سویه‌ها از همدیگر موثر بوده و بیشترین فاصله ژنتیکی در سویه‌هایی که دورتر از همدیگر بوده‌اند وجود داشته است، با این وجود در کل، سویه‌های مورد بررسی نیز تنوع ژنتیکی مناسبی داشتند که این تنوع ژنتیکی بالا زمینه را برای انتخاب سویه‌های مناسب فراهم می‌کند، این اولین گزارش در مورد بررسی تنوع ژنتیکی این قارچ

منابع

- تقی زاده ح، فهمیده ل، صمصام پور د، عسکری سیاهویی م. ۱۳۹۷. تنوع ژنتیکی ارقام نخل خرما در استانهای سیستان و بلوچستان و هرمزگان با ریزماهوره. مجله پژوهش‌های سلولی diversity (RAPD) among three most frequent species of macrofungi (*Ganoderma lucidum*, *leucoagricus* sp. And *Lentinus* sp.) of tropical forest of central india. J Genet Eng Biotechnol, 16:133-141.
- Boh, B., Berovic, M., Zhang, J., Zhi- Bin, L. 2007. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. Biotechnol. Annu. Rev, 13: 265-301.
- Brake, M., Migdadi, H., Al-Gharaibeh, M., Ayoub, S., Haddad N., El Oqlah A. 2014. Characterization of Jordanian olive cultivars (*Olea europaea* L.) using RAPD and ISSR molecular markers. Sci. Hortic, 176: 282-289.
- Coelho, ma., Bakkeren, G., Sun, s., hood, ME., Giraud, T. 2017. Fungal sex: the basidiomycota. Microbiol. Spectr, 5: 147-175.
- Dwivedi, S., Singh, S., Chuhan, UK., Kumar Tiwari, M. 2018. Inter and interspecific genetic diversity (RAPD) among three most frequent species of macrofungi (*Ganoderma lucidum*, *leucoagricus* sp. And *Lentinus* sp.) of tropical forest of central india. J Genet Eng Biotechnol, 16:133-141.
- Ghanbari, A. Estaji A. 2018. ISSR analysis for determination of genetic diversity in 29 olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding, 7(1): 32-41.
- Gurjar, G., Barve, M., Giri, A., Gupta, V. 2009. Identification of Indian pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp *ciceris* with gene specific ITS and random markers. Mycologia, 101 (4): 484-495.

- 8- Hayati, R., Basyuni, M., Chalil, D. 2020. genetic diversity, Sequence and bioinformatics analysis of *Ganoderma boninense* Isolates. *Int J Agric Biol*, 23; 745-770.
- 9- Ho, V., ngoc, VT., Giao, LN. 2019. Classification of some commercial lingzhi (*Ganoderma* spp) accession in Vietnam by ITS-based and barcode. *Biodiversitas*, 128: 163-171.
- 10-Keypour. S., Riahi, H., Rafati, H. 2013. A Review on the Biological Active Compounds and Medicinal Properties of *Ganoderma lucidum*. *J. Med. Plant Res*, 12 (46) :13-24.
- 11-Lin, ZX., Zhang, XL., Nie, YC. 2004. Evaluation of application of a new molecular marker SRAP on analysis of F2 segregation population and genetic diversity in cotton. *Acta Genetica Sinica*, 31:622-626
- 12-Malekzadeh, K., Jalalzadeh Moghaddam Shahri, B., Mohsenifard, E. 2011. Use of ISSR markers for strain identification in the button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)*, France.
- 13-Mehri, N., Mohebodini, M., Behnamian, M. 2017. Evaluation of genetic diversity of Black Cumin (*Nigella Sativa* L.) accessions using ISSR markers. 1st international and 5th national conference on organic vs. conventional agriculture. 1-5.
- 14-Mei, Z., Yang, L., Khan, MA., Yang, M., Wei, C., Yang, W., Peng, X., Tania, M., Zhang, H., Li, X., Fu, S., Chunli, W. 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.
- 15-Mofid Bojnoordi, M., Fatemi, SM. Aghdasi, M. 2021. The morphological and genetic variation of a species of Lettuce (*Lactuca undulata* Ledeb.): geographically widespread but locally endangered. *J Genet Resour*, 8(1): 57-68
- 16-Nagy, S., Poczai, P., Cernák, I., Gorji, AM., Hegedűs, G., Taller, J. 2012. PIC calc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochem Genet*, 50: 670-672.
- 17-Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-59.
- 18-Paul, S., Wachira, FN., Powell, W., Waugh, R. 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* L.) revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet*, 94: 255-263.
- 19-Peay KG, Garbelotto M, Bruns TD. 2010. Evidence of dispersal limitation in soil microorganisms: isolation reduces species richness on mycorrhizal tree islands. *Ecology* 91:3631-3640 <http://dx.doi.org/10.1890/09-2237.1>
- 20-Ratnaningtyas, NI., Susanto, AH., Yullia, A. 2019. Raandom amplified DNA (RAPD) Profiles of several isolates of *Ganoderma* spp. From banyumas, central java, Indonesia. *Trop. Plant Biol*, 26: 15 p
- 21-Rolim, LDN., Cavalcante, MADQ., Urben, AF., Buso, GSC. 2011. Use of RAPD molecular markers on differentiation of Brazilian and Chinese *Ganoderma lucidum* strains. *Braz Arch Biol Technol*, 2: 273-281.
- 22-Russel, R., Paterson, M. 2006. *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, 67: 1985-2001.
- 23-Shekhawat, VS, Tomar, RS., Sahadev, RR., Patel, N., Kumar, R. 2018. Genetic diversity analysis of garlic (*Allium sativum* L.) genotypes using ISSR markers. *Int. J. Chem*, 6(5): 2394-2399.
- 24-Su, H., Wang, L., Ge, Y., Feng, E., Sun, J., Liu, L. 2008. Development of strain-specific SCAR markers for authentication of *Ganoderma lucidum*. *World J. Microbiol. Biotechnology*, 24, 1223e1226.
- 25-Sun, SJ., Gao, W., Lin, SQ., Zhu, J., Xie, BG., Lin, ZB. 2006. Analysis of genetic diversity in *Ganoderma* population with a novel molecular marker SRAP. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 72: 537-543.
- 26-Templeton, AR. 1996. Biodiversity at molecular genetic level; Experience from disparate macroorganism. *Biodiversity measurements and estimations*. 345: 59-63.
- 27-Yousefzadeh, H., Khodadost, A., Amirchakhmaghi, N., Abdollahi, H. and A. Hosseinzadeh Colagar, 2017. Genetic diversity of *Malus orientalis* in Hyrcanian forest using ISSR-PCR markers. *Journal of Molecular and Cellular Research (Iranian Journal of Biology)*, 29(4):384-392.
- 28-Zheng, L., Jia, D., Fei, X., Luo, X., Yang, Z. 2009. An assessment of the genetic diversity within *Ganoderma* strains with AFLP and ITS PCR-RFLP. *Microbiological Research*, 164: 312-321.

Evaluation of genetic diversity among wild isolates of *Ganoderma lucidum* using ISSR marker

Lotfi Sh.¹, Behnamian M.^{1*}, Dezhsetan S.², Estaji A.¹ and Pour Beirami Y.¹

¹Dept. of Horticultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabil, Ardabil, I.R. of Iran.

²Dept. of of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran.

Abstract

Iran is a country with a very diverse climate and rich in wild medicinal plants and mushrooms. Therefore, in order to use this diversity in breeding programs and also to preserve these natural resources, the study of genetic diversity is very important. In this study, the genetic diversity of 32 strains of *Ganoderma lucidum* collected from the northern strip of the country was investigated using 21 ISSR markers. According to the results, the polymorphic information content of markers ranged from 0.294 to 0.469 with a mean of 0.407. Also, Nei's genetic diversity, Shannon index and mean genetic distance were 0.214, 0.317 and 0.278, respectively. Based on principal components analysis, the first three components determined 63% of total variation. Based on cluster analysis, the investigated strains were divided into eight main groups. Sturcture analysis also revealed the presence of nine distinct genetic groups. In general, the results indicated that there was a favorable genetic diversity between the investigated strains of *G. lucidum* that can be considered in breeding programs.

Key words: *Ganoderma*, Cluster analysis, Polymorphism, Sturcture analysis