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

سمیه کی‌پور[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 گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

[۵] مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، بهشهر، ایران

[۶] گروه گیاهپزشکی، 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 موید وجود تنوع ژنتیکی وسیعی بین جمعیت های مورد مطالعه بود به طوری‌که تنوع درون گونه‌ای *G. lucidum* و *G. resinaceum* به ترتیب ۶۱/۴۸ و ۴۰/۱۶ برآورد گردید. نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای نشان داد که جدایه ها در سه خوشه قرار گرفتند و این گروه‌بندی جدایی جمعیت های 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 طوری‌که 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 Keypour[1], Hossein Riahi[2], Mostafa Ebadi Nahari[3*], Mohammad Reza Asef[4], Ali Borhani[5] and Naser Safaie[6]

Received 27.09.2017/ Revised 10.09.2018/ Accepted 25.09.2018/ Published 19.03.2019

[1]Department of Biology, Farhangian University, Tehran, Iran

[2]Department 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

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

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

[6] Department 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

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.8.2]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.379]

مقدمه

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 برروی 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 درسال ۱۹۹۶ اعلام کردند که سرده *Ganoderma* براساس ساختارهای موجود در قارچ به دو زیرسرده *Elfvingia* Karst. (گونه‌های غیر براق) و زیرسرده *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 دکسترنوئیدی 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 میسلیوم 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 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)، توالی یابی 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 & Sivasithamparam, 2000b) و RAPD (Zakaria *et al*., 2005) 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 ریخت شناختی بنا نهاده شده بود، را تائید 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).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.8.2]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.379]

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق.

Table 1. Characteristics of isolates used in this study.

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

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 میسلیوم، برای خالص‌سازی چندین بار واکشت انجام شد (Keypour *et al.*, 2014). ۲۱ جدایه از گونه‌های جمع‌آوری و خالص‌سازی شده که متعلق به دو گونه *G. lucidum* و *G. resinaceum* 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 نور، مازندارن)، افراد هر گونه به عنوان جمعیت‌های جدا در نظر گرفته شد.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA، از کشت تازه میسلیوم گونه‌های *G. lucidum* و *G. resinaceum* به قطر ۶ میلی‌متر برداشت کرده و به محیط پتیتو دکستروز براث(PDB) انتقال داده شدند. ظروف حاوی میسلیوم 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 میسلیوم 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).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.8.2]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.379]

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 واکنشRAPD	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

برای انجام این واکنش از ۱۰ آغازگر (۵ آغازگر متعلق به OPD و ۵ آغازگر متعلق به OPC) (سیناکلون) استفاده شد (جدول۲) (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،۱دقیقه 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 واکنش‌های 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 می‌شد، با استفاده از یک سیستم امتیاز دهی شامل تعداد باندهای RAPD، شدت درخشش باندها و تشکیل اسمیر انجام گرفت.

توانایی RAPD برای جداسازی جدایه‌های گونه مرکب *Ganoderma lucidum*

به‌منظور تعیین قدرت افتراق پروتکل RAPD بهینه‌سازی شده، پس از بررسی جدایه‌های گونه مرکب *G. lucidum*، آنالیز خوشه‌ای انجام گرفت. الگوهای RAPD حاصل به صورت چشمی بررسی شدند و امتیازدهی دوتایی (۰ برای عدم حضور باند و ۱ برای حضور باند) انجام شد. برای رسم دندروگرام از نرم‌افزار Past ver 2.17 (Hammer *et al*., 2012) ، ضریب جاکارد و روش UPGMA استفاده شد. میزان تنوع ژنتیکی توسط نرم‌افزار POPG-ENE 32 و محاسبه ضریب شانون مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر آن جهت ارزیابی ساختار جمعیت به‌منظور تجزیه موثر ساختار جمعیت، دسته بندی دقیق ژنوتیپ‌ها و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط از نرم افزار Structure 2.3.4 استفاده شد. برای این منظور از مدل ترکیبی Admixture و استقلال فراوانی آللی با ۵۰۰۰ تکرار آزمایش و MCMC ۵۰۰۰۰ (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

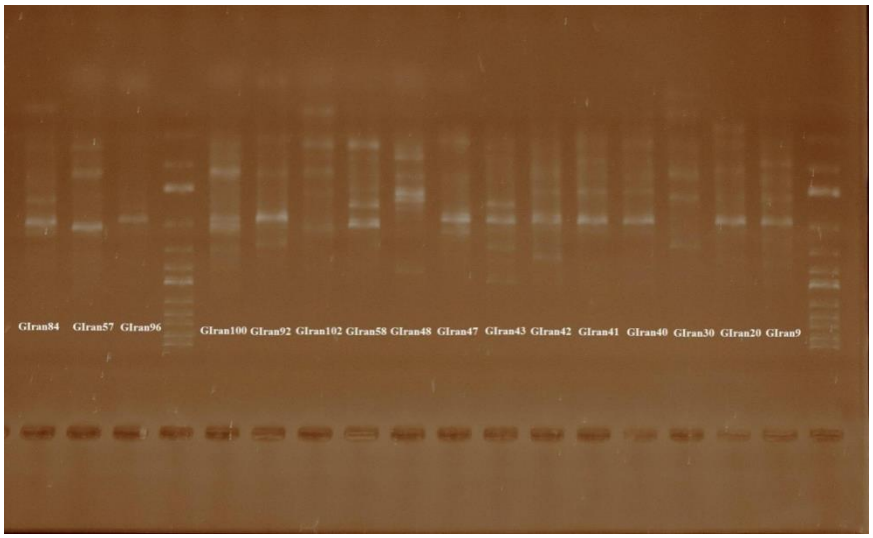
از بین ده آغازگر انتخاب شده برای انجام آزمایش، آغازگرهای OPC5,OPC10, OPC18, OPD5, OPD3, OPD8 و OPD 2-3 به عنوان مناسب‌ترین آغازگرها برای افتراق بین جدایه‌های مورد بررسی ارزیابی شدند. این انتخاب بر پایه تعداد باندهای RAPD، محدوده اندازه باندها، شدت درخشش باندها در مورد هر آغازگر انجام گرفت. آغازگرهایOPD8 و OPC18 با ۱۶ باند پلی‌مرف و آغازگرOPC5 با ۱۱ باند پلی‌مرف به ترتیب بیشترین و کمترین

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.8.2]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.379]

جدول ۳- پارامترهای تنوع ژنتیکی دو گونه *G. lucidum* و *G. resinaceum* بر اساس داده‌های حاصل از RAPD.

Table 3. Genetic diversity parameters of *G. lucidum* and *G. resinaceum* based on RAPD data.

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



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.

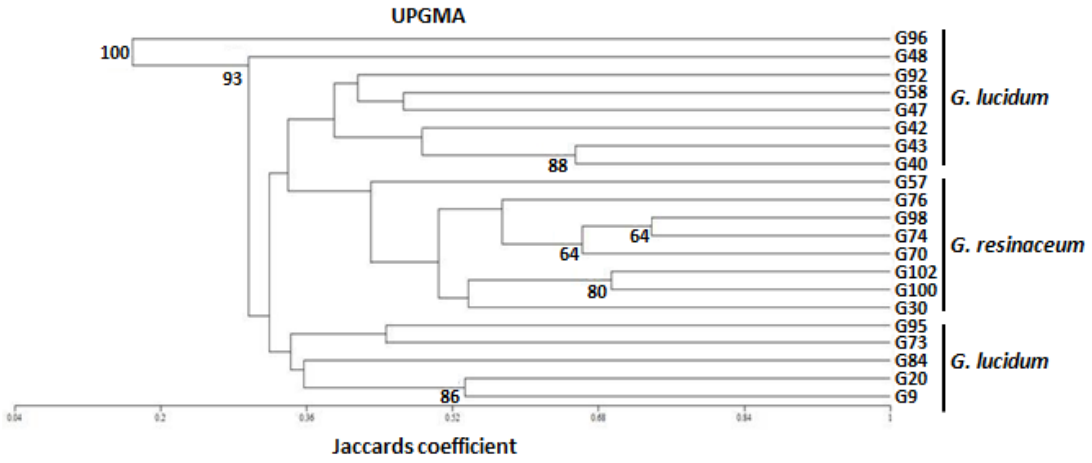
باند را نمایان ساختند. باندها بین ۳۰۰ تا ۴۰۰۰ bp وزن داشتند. ضریب تنوع شانون برای گونه *G. lucidum* و *G. resinaceum* به‌ترتیب ۰/۳۱و ۰/۲۱ بر آورد گردید. در این میان تعداد ۷۵ جایگاه ژنی پلی مورف و میزان پلی مورفیسم ۶۱/۴۸ درصد برای گونه *G. lucidem* و تعداد ۴۹ جایگاه ژنی پلی مورف و میزان پلی مورفیسم ۴۰/۱۶ 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 می‌شود. در اولین زیرخوشه *G. lucidum* (Eurasian) GIran98 با حمایت ضعیف (۶۴٪) به یکدیگر و GIran74 (*G. resinaceum*) نیز با حمایت ضعیف (۶۴٪) به آنها متصل شده است. دو جدایه GIran100 و GIran102 (*G. resinaceum*) نیز در زیرخوشه دیگر با حمایت خوب (۸۰٪) درکنار هم قرار گرفته‌اند. در دومین زیرخوشه کد-های GIran40 و GIran43 (Eurasian) *G. lucidum* 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 تائید 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).

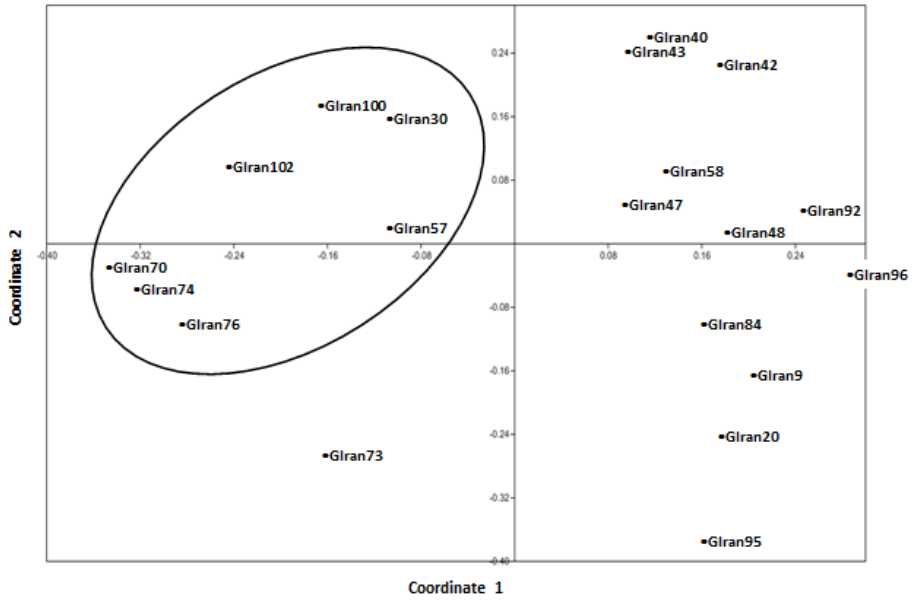
در این مطالعه که با استفاده از نشانگر RAPD انجام شد، اکثر جدایه‌های *G. lucidum* complex در دندروگرام حاصل، با ضرایب حمایت پایین تا متوسط و به ندرت با ضریب حمایت

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.8.2]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.379]



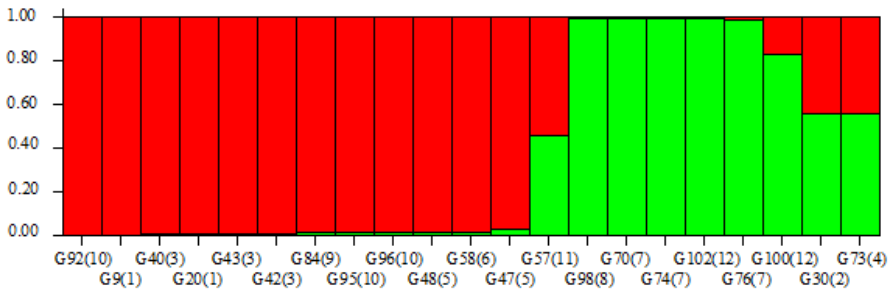
شکل ۲- دندروگرام حاصل از آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار Past.

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



شکل ۳- آنالیز رسته‌بندی جدایه‌های *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.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.8.2]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.379]

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 جدایه-های جمعیت ده (GIran92، GIran95 و GIran96) در سه خوشه متفاوت قرار گرفتند که این امر نشان دهنده نقش میزبان در تنوع بین جدایه ها 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. در۹۹٪ موارد دارای پایه (بجز GIran95) و اغلب پیلئوسیستیدیوم‌ها 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 پیلئوسیستیدیوم‌ها آمیلوئید هستند، ولی GIran92 دارای پیلئوسیستیدیوم‌های آمیلوئید-دکسترونوئید است. جدایه‌هایGIran30 تا GIran57 که در خوشه‌هاینهایی قرار گرفته‌اند و به لحاظ ریخت‌شناسی *G. resinaceum* شناخته شده-اند، 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 پیلئوسیستیدیوم‌ها از آمیلوئید، دکسترونوئید و آمیلوئید-دکسترونوئید متغیر هستند. جدایه‌هایGIran96 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، پیلئوسیستیدیوم‌ها آمیلوئید و آمیلوئید-دکسترونوئید هستند. بررسی الگوی باندهای تشکیل شده در جدایه‌های *G. lucidum* نشان داد که آخرین باند تشکیل شده توسط آغازگرOPD8 تا ۱۸۰۰ جفت باز و آخرین باند تشکیل شده توسط آغازگرOPC18 تا ۲۵۰۰ جفت باز است. تمامی جدایه‌های این گونه با آغازگرOPC18 باند ۹۰۰جفت 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 آخرین باند تشکیل شده توسط آغازگر OPC18 تا ۳۰۰۰ جفت باز است. تمامی‌جدایه‌های این گونه با آغازگرOPC18 باند ۱۳۰۰جفت 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. تمامی‌جدایه‌های این گونه با آغازگر OPD8 سه باند ۵۰۰، ۶۵۰ و ۱۸۰۰ جفت باز و با آغازگر OPC18 دو باند ۹۰۰ و ۱۵۰۰جفت باز تشکیل می‌دهند. جدایه GIran96 با آغازگرOPD8 هیچ باندی 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. جدایه های گونه *G. lucidum* با پرایمر OPD5 باندهای اختصاصی ۶۵۰، ۷۰۰ و ۱۵۰۰ تولید نمودند. جدایه های 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 نمونه ها 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 می کنند؛ 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 باندی 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

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.8.2]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.379]

حداکثر KΔ 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* به‌همرا 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. resinaceum* و *G. lucidum* از ایران استفاده شد. یافته‌های این مطالعه حاکی از وجود تنوع ژنتیکی زیاد در بین جدایه‌های *G. lucidum* complex جمع‌آوری شده از شمال ایران است؛ به‌طوری که 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 گونه های *G. resinaceum* قرار گرفته است. قرار گیری 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 روش های مولکولی دقیق تر برای تائید و یا رد شناسایی ریختی است. پستنوا و اسکالتنوا (Postnova & Skolotneva, 2010) با مطالعه جدایه‌های *G. lucidum* complex از کشورهای مختلف به نتایج متفاوتی دست یافتند. آن‌ها دریافتند که با وجود جدایی مکانی، جدایه‌های مورد بررسی 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 باندی میان جدایه‌ها شدند. به اعتقاد آن‌ها شاید این تنوع به علت توانایی سازگار نمودن جدایه‌های *Ganoderma* برای رشد برروی 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 باندی 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 مطالعه ای با استفاده از روش RAPD دریافتند که گونه‌های *Ganoderma* و حتی جدایه‌های *G. lucidum* تا میزان ٪۹۳ تنوع ژنتیکی از خود نشان می‌دهند. باتوجه به یافته‌های بدست آمده توسط محققین و نیز نتایج حاصل شده از این مطالعه در زمینه تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف *Ganoderma* می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که گونه‌های مختلف

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.8.2]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.379]

این سرده به علت دارا بودن خصوصیات ژنتیکی مختلف که در برخی موارد تحت تاثیر محیط قرار گیرد می‌توانند 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 گونه های مورد بررسی که از تنوع بالای ژنتیکی برخوردار هستند جهت بهره گیری از ذخایر ژنتیکی و بهینه سازی 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.

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 colossum* 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 Micromorph-ological Characteristics of Medicinal Species of Genus *Ganoderma* (Higher Basidiomycetes) from Iran. – Int. J. Med. Mushrooms. 16: 365-374.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.8.2]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.379]

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 Ryvarden 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.

Ryvarden, 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*s 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. – Rijksherbariam 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 صفایی، ن. ۱۳۹۷. بررسی تنوع ژنتیکی دو گونه براق *Ganoderma lucidum* و *Ganoderma resinaceum* به وسیله نشانگر RAPD. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۵: ۳۸۸-۳۷۹.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.8.2]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.379]