NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.12/47 , 2022

Scan online to view this article

Identification of Ganoderma lucidum reishi in herbal supplements by PCR using markers of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region

Seyed Mohammad Hassan Modarressi[1]*, Hoda Jahandar[2], Kimia Shankaie[3], Elahe Motevaseli[4]

1. Pharmaceutical Sciences Research Center, Tehran MedicalSciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciencesand Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. gene dorpham pars company,Tehran,iran
4. Department of Molecular Medicine, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences,Tehran,iran

Abstract

Aim and Background: Ganoderma lucidum is one of the most important therapeutic mushroom known in Iran and the world. In this study, due to the lack of standard and specific instructions for quality control of mushroom supplements, a molecular method based on Internal Transcribed Spacer (ITS) for detection of mushroom species in supplements has been presented.

Material and methods: Eight samples of two commercial brands of G. lucidium mushroom supplements were prepared from pharmacies. PCR test was performed using DNA extracted from capsules. Then, sequencing was performed from PCR product and the results of sequencing were compared with Genbank and their phylogenetic tree was plotted with all known sequences from Iran in Genebank.

Results: DNA extraction from the capsules for PCR were optimized and PCR products were observed on agarose gel coordinated to the expected sizes. Blast analysis and phylogenetic tree of the sequences showed that the mushroom in one of the commercial samples was in full accordance with its label which was (G. lucidum) and the other did not show this conformity and was G. resinaceum instead of G. lucidum.

Conclusion: Due to the large differences in the quantity and quality of effective compounds in the various mushroom supplements available in the market, if the ingredients cannot be morphologically or biochemically confirmed, the best successful and cast effective method would be molecular method based on mushroom DNA and phylogenetic analysis to specify it species.

Keywords: Ganoderma lucidum, polymerase chain reaction, ribosomal internal transcribed spacer, phylogenetic tree , Iau Science.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.9.6]

Corresponding author:
Pharmaceutical Sciences Research Center, Tehran MedicalSciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: hmodaresi1376@gmail.com

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۲ - شماره۴۷ - تابستان۱۴۰۱
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

شناسایی داروهای مکمل گانودرما لوسیدوم به روش PCR با استفاده از مارکرهای نواحی فاصله ساز داخلی ریبوزومی

سید محمد حسن مدرسی[۱]، هدی جهاندار[۲]،کیمیا شنکایی[۳]، الهه متوسلی[۴]

۱. گروه داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی آزاد تهران، تهران، ایران
۲. گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی آزاد تهران، تهران، ایران
۳. شرکت دانش بنیان ژن درفام پارس، تهران، ایران
۴. گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری های نوین، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: قارچ گانودرما لوسیدوم (G. lucidum) از مهم‌ترین قارچ‌های درمانی شناخته شده در ایران و جهان است. در این مطالعه با توجه‌به عدم وجود دستورالعمل ثابت و مشخص برای کنترل کیفی مکمل‌های قارچی در کشورمان، روشی بر پایه بررسی مولکولی برای استاندارد سازی و کنترل کیفی آن ارائه گردیده است.

مواد و روش‌ها: هشت نمونه از دو برند تجاری مکمل‌های قارچ لوسیدیوم از داروخانه‌ها تهیه گردید. آزمون PCR با استفاده از DNA استخراج شده از کپسول‌ها انجام پذیرفت. سپس از محصول PCR توالی‌یابی صورت گرفت و نتایج حاصل از توالی‌یابی با Genbank و پایگاه ژنی مورد مقایسه قرار گرفته و درخت فیلوژنی مبتنی‌بر ITS آن‌ها با تمامی توالی‌های شناخته شده از ایران رسم گردید.

یافته‌ها: استخراج DNA از کپسول‌ها برای تست PCR بهینه گردیدند و محصول‌های PCR در ژل آگاروز بر اساس اندازه-های مورد انتظار مشاهده شد. Blast و رسم درخت فیلوژنی توالی‌ها مشخص کرد قارچ موجود در یکی از نمونه‌های تجاری با برچسب آن تطابق کامل داشته و (G. lucidum) بود و برند دیگر این تطابق را نشان نداد و به‌جای (G. lucidum) از (G. resinaceum) استفاده شده بود.

نتیجه‌گیری: با توجه‌به تفاوت‌های کمی و کیفی مقادیر ترکیب‌های مؤثر در نمونه‌های مکمل‌های قارچی مختلف موجود در بازار هنگامی که مواد تشکیل دهنده را نمی‌توان از نظر مورفولوژیکی یا بیوشیمیایی تأیید کرد، بهترین روش موفق و مقرون به صرفه استفاده از روش‌های مولکولی ژنتیکی مبتنی‌بر DNA و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک برای احراز هویت گونه‌های قارچی هستند.

واژه‌های کلیدی: قارچ گانودرما لوسیدوم، واکنش زنجیرهای پلی‌مراز، نواحی فاصله ساز داخلی ریبوزومی، درخت فیلوژنی، Iau Science.

مقدمه

استفاده از روش‌های مولکولی و ژنوم گیاهان و قارچ‌ها ابزاری کارآمد برای شناسایی نمونه‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی موارد نامشخص هستند. از این روش‌ها در شناسایی بسیاری از مکمل‌های غذایی و دارویی می‌توان استفاده نمود (۱،۲) و به‌طور فزاینده‌ای در شناسایی منشاء محصولات غذایی غیرقابل شناسایی در Post Marketing Survey (PMS) توسط سازمان‌های غذا و داروی (FDA) کشورها مورد استفاده قرار می‌گیرد. DNA یک گونه می‌تواند مدت طولانی پس از دست دادن فعالیت بیولوژیکی خود وجود داشته باشد لذا استفاده از محتوای DNA موجودات زنده فرآوری شده که به‌جز به روش‌های مولکولی قابل شناسایی نیستند، چشم اندازهای زیادی برای کنترل کیفیت (Quality Control) دارد. به-خصوص برای احراز هویت مواد تشکیل دهنده و اجتناب از

نویسنده مسئول:
گروه داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی آزاد تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: hmodaresi1376@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۴

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.9.6]

آلاینده‌ها و افزودنی‌هایی که ممکن است باعث واکنش‌های آلرژیک برای مصرف کنندگان شوند (۳) ارزشمند هستند. این امر به‌ویژه مرتبط با صنعت مکمل‌های گیاهی بر اساس قوانین سازمان‌های غذا و داروی کشورهای مختلف و حتی ایران، به‌خصوص در بسیاری از موارد سازنده را ملزم به اطمینان از ایمنی و اثربخشی یک مکمل می‌کند، امری ضروری است (۴،۵). تولیدکنندگان و توزیع کنندگانی که مایل به بازاریابی مکمل‌های غذایی حاوی مواد غذایی و گیاهی جدید هستند موظف هستند که ایمنی این مواد را به سازمان غذا و دارو گزارش دهند لذا بر اساس این قوانین و دستورالعمل‌ها، این مسئولیت تولید کننده یا توزیع کننده است که ارزیابی کند ماده مؤثره مکمل‌های غذایی و گیاهی در محصول ارائه شده چیست و آیا به میزان مناسب و بی خطر وجود دارند یا خیر. تولید کنندگان باید از شناسایی دقیق تمام مواد تشکیل دهنده محصولات خود به جهت مزیت بازاریابی و هم برای نگرانی‌های اخلاقی، اطمینان حاصل کنند بنابراین شناسایی دقیق گونه‌ها، فهرست کامل مواد تشکیل دهنده و گزارش دقیق میزان اثر (Potency) مواد مؤثره از اهمیت بالایی برخوردار است.

تاکنون ۷ گونه شامل؛ ۳گونه بدون لاکتات؛ G. applanatum, G. adspersum, and G. colossus و ۴ گونه لاکتات؛ G. lucidum, G. resinaceum, G. tsugae and G. manoutchehrii در ایران گزارش شده (۶). گانودرما ریشی یا (Ganoderma lucidum) قارچی یک‌ساله از تیره (family) تابان‌پوستان (Ganodermataceae) است که در طب سنتی چینی مصرف دارویی داشته و از قدیمی‌ترین داروهای گیاهی ثبت شده در تاریخ است (۷) و تخمین زده می‌شود که در دنیا حدود ۲٪ از صنعت مکمل‌های گیاهی را شامل گردد (۸). به‌عنوان یک ضد التهاب و مهم‌ترین مزیت آن، برای تقویت سیستم ایمنی توصیه می‌شود (۹،۱۰). پس از کشت آن‌ها بر روی برنج، اکثر محصولات ریشی به‌صورت پودر در می‌آیند و در کپسول‌ها به‌عنوان مکمل‌های گیاهی قارچی فروخته می‌شوند. این قارچ اگرچه بدنه‌های میوه‌دهی براق، رنگی، چرمی و قفسه‌مانند پلی‌پوری قارچ تازه از گونه‌های لاکاتی گانودرما متمایز است، اما پس از پودر شدن به‌طور معمول همراه با محیط برنج (که اغلب بیش از ۵۰ درصد وزن خشک را برای فورمولاسیون نهایی تشکیل می‌دهد)، یا حتی مواد دیگر به‌عنوان نگهدارنده، شناسایی افتراقی آن‌ها از نظر ماکروسکوپی، میکروسکوپی یا بیوشیمیایی بسیار دشوار خواهد بود (۵،۱۱). در این راستا تجربیات قبلی نیز منتشر شده‌اند و به‌عنوان مثال، Wu و همکارانش (۱۲) با استفاده از روش‌های بیوشیمی، تنها توانستند ۲۶٪ از ۱۹ مکمل ریشی تهیه شده از بازار ایالات متحده آمریکا را به‌عنوان نمونه واقعی حاصل از قارچ ریشی (G. lucidum) تأیید کنند. یکی از مواردی که به دشواری شناسایی این قارچ فرآوری شده می‌افزاید، پیچیدگی طبقه‌بندی موجود در انواع گانودرما است (۱۳). بر این اساس برخی از تاکسونومیست‌ها، با توجه‌به ظرافت فنوتیپی بالای گونه‌های گانودرما، ارزش محدودی را برای ویژگی‌های ماکرومورفولوژیکی در شناسایی آن‌ها در نظر می‌گیرند و بیش‌تر بر روی خواص ژنوتایپی آن‌ها تکیه می‌نمایند. جنس(Genus) گانودرما کمابیش از حدود ۸۰ گونه (Species) تشکیل شده است یکی از آن‌ها شامل G. lucidum است (۱۳،۱۴). نتایج تحقیقات بر روی قارچ های گانودرمای ایرانی نشان می‌دهد که گونه‌های موجود در خاورمیانه به گونه‌های اروپایی شباهت‌های بیش‌تری دارد تا گونه‌های موجود در آسیای شرقی (۱۵) این کلاس‌ها شامل تفاوت‌های فیلوژنتیکی نیز هستند. چندین گونه این قارچ گانودرما به‌دلیل قابلیت تخریب چوب، برای خمیرسازی زیستی (۱۶) و زیست پالایی (۱۷) مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته‌اند. ولی به‌دلیل مزایای احتمالی تری‌ترپنوئیدها و پلی‌ساکاریدهای که بعضی از گونه‌های این قارچ آن‌ها را دارند برای ارتقای سلامتی، به‌عنوان «قارچ دارویی» ارزشمندتر قلمداد می‌شوند (۱۸،۱۹). این قارچ از پراکنش گسترده‌ای در مناطق جنگلی ایران برخوردار بوده و تاکنون از پوشش‌های جنگلی مختلفی در استان‌های گلستان، مازندران، گیلان، اردبیل و آذربایجان شرقی گزارش شده است (۲۰). G. lingzhi تازه دارای سطوح بالاتری از تری ترپنوئیدها نسبت‌به G. lucidum است که ممکن است مسئول اثرات فیزیولوژیکی پیشنهادی G. lingzhi در ارتقای سلامتی انسان باشد. به‌طور خاص، تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک مولکولی G. lucidum و نزدیک‌ترین خویشاوندان آن (G. oregonense، G. tsugae و G. carnosum و G. lingzhi) که اهمیت دارویی دارند گونه‌های بسیار نزدیک دیگر قرار می‌دهند (۲۱،۲۲).

نواحی فاصله‌ساز داخلی ریبوزومی هسته‌ای (ITS) یک منطقه DNA قابل استفاده برای بارکدگذاری و شناسایی گیاهان و قارچ‌ها است(۲۳،۲۴). این بخش متشکل از دو فاصله‌دهنده فوق متغیر کمابیش ۲۰۰-۲۵۰ جفت باز است که توسط زیر واحد S۱۸ (کوچک) و S۲۸ (بزرگ) rDNA احاطه شده‌اند و توسط rDNA S۵/۸ جدا شده‌اند (۲۵،۲۶). پرایمرهای طراحی شده برای اتصال به بخش-های بسیار حفاظت شده یا قسمت‌های مشترک DNA

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.9.6]

زیر واحدهای S۱۸ و S۲۸ به‌طور گسترده در شناسایی گیاهان و قارچ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۷). ولی به‌طور معمول برای تشخیص و شناسایی اختصاصی یک گونه قارچ اختصاصی از پرایمرهای خاصی که توالی DNA ژنومی آن‌ها تطابق با توالی دیگر گروه‌های قارچ ندارد و به‌طور اختصاصی با همان گونه خاص تطابق دارد استفاده می‌گردد. هم‌چنین در مواردی که DNA قارچ به‌دلایلی مانند قدیمی بودن یا حرارت یا مواد شیمیایی تخریب و شکسته شده باشند این پرایمرهای اختصاصی بهتر و مؤثرتر درفرایند تکثیر قطعات ژنومی یا PCR پاسخ می‌دهند. این پرایمرها براساس قارچ‌های اختصاصی مناطق و کشورها در مطالعه‌های قبلی برای شناسایی مولکولی نمونه‌های برداشته شده از داروخانه‌های مکمل‌های گیاهی قارچ ریشی به‌طور محدود در مطالعه‌های قبلی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۸،۲۷). البته تجزیه و تحلیل داده‌های توالی‌ها و روش‌های فیلوژنتیکی براساس داده‌های موجود در پایگاه داده توالی‌یابی قارچ‌های محلی به‌دست آمده در کشور ایران است و می‌تواند در ارتقای متدهای مولکولی گونه‌های مختلف این قارچ ارزشمند باشد و به‌طور اساسی برای استاندارد سازی این داده‌های مختلف به‌دست آمده از مناطق مختلف جهان استفاده از نواحی فاصله‌ساز داخلی ریبوزومی هسته‌ای (ITS) به‌عنوان یک زبان مشترک در ثبت و شناسایی قارچ‌های مذکور مورد توجه و استفاده قرار گرفته است.

در اینجا، ما یک روش کارآمد مولکولی برای شناسایی دقیق و قطعی مکمل گیاهی ریشی استخراج شده از مکمل‌های گیاهی خریداری شده از داروخانه را ارائه می‌کنیم. با طراحی پرایمرهای مشترک و اختصاصی گونه‌ای، هم‌چنین بهینه‌سازی استخراج DNA و انجام PCR به‌همراه تعیین سکانس DNA ناحیه ITS از نمونه‌های ریشی موجود در مکمل را انجام داده و نتایج حاصل از بهترین BLAST را با دو رویکرد فیلوژنتیک مولکولی مقایسه‌ای با توالی‌های گرفته شده از پایگاه داده‌های مختلف به‌لحاظ آنالیز و دسته‌بندی ایرانی توالی‌ها و رویکرد دقیق‌ترین روش شناسایی محصول و صحت برچسب‌گذاری آن ارائه می‌نماییم.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌های مکمل‌های گیاهی خریداری شده از داروخانه‌های تهران، مربوط به تولیدات دو تولیدکننده ایرانی متمایز هستند، تهیه گردید (جدول ۱). هر دو نمونه از پودر کپسوله شده بودند که همگی بر اساس برچسب محصول حاوی ریشی یا گانودرما بودند. مشخصات و محتویات مکمل‌های تهیه شده در (جدول ۲) به تفکیک ارائه گردیده اند.

استخراج DNA

برای هر مکمل، نمونه‌های کپسوله شده باز شده و پودر موجود در داخل آن مورد استفاده قرار گرفت. سپس برای استخراج DNA پودر در آورده شده، ۳۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم ماده خشک، در بافر استخراج کیت گیاهی کوچک محلول FG1[1] همگن شد. پس از همگن سازی، استخراج DNA با استفاده از کیت مینی گیاهی Fungi DNA Isolation Kit طبق پروتکل سازنده (دنازیست آسیا، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد) انجام شد.

طراحی پرایمرها و PCR و تعیین توالی

پرایمرها برای جلوگیری از تکثیر DNA گیاهی یا سایر قارچ‌ها به روش زیر طراحی گردیده اند. پرایمرهای ITS قارچی مشترک (ITS1F و ITS4B) و اختصاصی گانودرما (G-ITS-F1 و G-ITS-R2) برگرفته از مقالات قبلی (۲۸،۲۹) با جابه‌جایی و تغییرهای جزئی در توالی آن‌ها با مقایسه با توالی‌های به‌دست آمده از Databases موجود در NCBI به جهت بهینه‌سازی PCR طراحی گردید. توالی پرایمرها و مشخصات آن‌ها در جدول ۱ ارائه گردیده است.

جدول ۱. جدول پرایمرهای مورد استفاده در PCR (توالی پایه از رفرانس گرفته شده ولی چند باز برای بهینه سازی PCR تغییر داده شده است.)

نام پرایمر	جهت	توالی اصلاح شده	منابع
G-ITS-F1	F	ACCCTGTCGGTGAGAACTTGA	Cao et al. 2012 [26]
G-ITS-R2	R	TTG AGA GCG CAT CAC AAA GC	Cao et al. 2012 [26]
ITS1F	F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns 1993 [27]
ITS4B	R	CAG GAG ACT TGT ACA CGG TCC AG	Gardes & Bruns 1993 [27]

DNA استخراج شده به‌عنوان الگو در واکنش‌های PCR ۲۵ میکرولیتری مورد استفاده قرار گرفت. هر واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۲۵ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر Taq بافرB (بدون Mg؛ X۱۰) (SinaClon; Iran)، ۲/۵ میکرولیتر dNTPs (۲/۵ میلی‌مولار از هر باز)، ۲/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای فوق‌الذکر (۱۰ میکرومولار)، ۰/۲۵ میکرولیتر Taq پلی‌مراز (۵ U/µL) (SinaClon; Iran) و ۱،۱ µL DNA استخراج شده. تقویت تحت شرایط چرخه حرارتی زیر انجام شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه و

[1] ارای ترکیب خاص نمک و دترجنت بوده و باعث شکست دیواره سلولی شده و در اتصال DNA به ستون کمک می‌کند

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.9.6]

سپس ۵ سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه، ۶۸ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه و سپس ۳۰ سیکل ۹۴ درجه به‌مدت ۴۵ ثانیه ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۶۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ رنگ‌آمیزی شده با سایبرگرین در کنار نردبان ۱۰۰ جفت باز (شرکت سیناکلون) اجرا شدند.

تک باند واکنش‌های PCR پس از تمیز شدن با استفاده از کیت ستونی (شرکت ژن دفام پارس) با همان پرایمرهای مورد استفاده در PCR به‌طور مجزا در هر دو جهت قطعه DNA به روش سنگر توسط آزمایشگاه ژنوم با استفاده از دستگاه Applied Biosystems ۲۵۰۰ توالی‌یابی شدند.

کنترل توالی‌ها با داده‌ها

فایل fasta توالی به‌دست آمده در دو جهت قطعه‌های DNA توسط نرم‌افزار Chromas کنترل و نتایج حاصله پس از اصلاح و کوتاهی دو انتهای نتایج توالی قطعه DNA با استفاده از برنامه Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) به‌عنوان روش شناسایی در سایت- Genbank NCBI برای هر نمونه از الگوریتم مگابلاست برای جستجوی مجموعه نوکلئوتیدی برای یافتن نزدیک‌ترین تطابق با توالی های به‌دست آمده استفاده نمودیم.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک.

بر اساس مقالات منتشر شده در مورد توالی‌های حاصله از ITS انواع گونه‌های قارچ گانودرما از ایران و جستجوی در Genbank Database - Nucleotide مربوط به NCBI کلیه توالی‌های ثبت شده از ایران جمع‌آوری و با هم‌ترازی چندگانه توالی‌ها (Multiple Alignment) توسط نرم-افزار MEGA 11 فایل مربوطه برای آنالیز فیلوژنی تهیه و براساس دستورالعمل با استفاده از نرم‌افزار MEGA 11 درخت فیلوژنی مربوطه با مقایسه کلیه داده‌های ایرانی به-دست آمده از Genbank به‌عنوان توالی های خارج از خانواده (Outgroup) و قرار دادن نمونه‌های مکمل گیاهی (sampes) به‌عنوان خانواده ژنی (Ingroup) در درخت ترسیم شد. هم‌چنین تجزیه و تحلیل حداکثر درست‌نمایی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 11 انجام شد. در این مسیر از الگوریتم راه‌اندازی سریع با استفاده از ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap استفاده شد. مدل مورد استفاده TNM با نرخ یکنواخت بوده است. بنابراین، در طول نتایج و بحث، سعی شد تا نام‌های علمی گونه‌ها همان‌طور که در Genbank گزارش شده بود، ارائه شود، اگرچه برخی از آن‌ها به احتمال به اشتباه نام‌گذاری شده‌اند.

یافته‌ها

استخراج DNA

برای استخراج DNA از پودر حاصله از ۲ کپسول از ۲ نمونه مکمل‌های گیاهی از دو کارخانه تولید کننده تجاری تهیه شده از داروخانه‌های متفاوت تهران، چند روش معمول استخراج DNA مورد آزمایش قرار گرفت و پس از بهینه‌سازی همان‌طور که در قسمت روش‌ها توضیح داده شده است از پودرهایی حاصل میانگین غلظت DNA در ۲ نمونه به‌طور متوسط ۳۴/۱ نانوگرم در میکرولیتر (محدوده ۳/۹ تا ۱۷۵/۲) بود که برای انجام PCR کافی بودند.

PCR و تعیین سکانس

تکثیر موفقیت‌آمیز ناحیه ITS از DNA استخراج شده قارچی با دو جفت پرایمر مشترک عمومی و پرایمر اختصاصی انجام شد و نتایج محصولات PCR نمونه‌ها با الکتروفورز ژل کنترل، مشاهده و اندازه آن‌ها نشان داده شده اند. جفت پرایمرها از PCR نوارهای منفرد قابل مشاهده با اندازه مورد انتظار را برای منطقه ITS برای ۴ نمونه از ۸ نمونه پودر تولید کردند. البته در نمونه‌های DNA استخراج شده از ۴ نمونه مکمل قارچی که حاوی دو نوع گانودرما بودند بندهای اضافی هم مشاهده گردیدند. محصولات PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گانودرما بر اساس افزایش شدت باند آن‌ها نسبت‌به سایر پرایمرها، انتخاب و از ژل استخراج و سپس بر اساس انچه در قسمت مواد و روش‌ها ذکر گردید برای تعیین توالی‌یابی و آنالیزهای ارسال گردیدند. توالی‌های به‌دست آمده در شکل ۱ نشان داده شده اند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها و نتایج فیلوژنتیک

آنالیز توالی‌های به‌دست آمده از ۸ نمونه مکمل‌های خریداری شده از داروخانه‌ها نشان دهنده دو توالی ITS مجزا از نتایج بود که به‌عنوان sample1 و sample2 نامگذاری شدند که مربوط به دو نوع نام تجاری هستند. اولین اقدام برای شناسایی این دو نمونه این بود که با استفاده از توالی کامل ITS تریم شده BLASTدر Genbank برای بهترین نتیجه تطابق بر اساس آنچه در مواد و روش‌ها ذکر گردیده بود انجام شد و نتایج آن در جدول ۲ ارائه گردیده است.

با توجه‌به این‌که چند باز در نتایج BLAST فوق‌الذکر عدم تطابق نشان می‌دادند لذا برای ارزیابی بیش‌تر هویت نمونه‌های خریداری شده و جمع‌آوری شده از داروخانه‌ها و

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.9.6]

ارزیابی تکمیلی، از روش هم‌ترازی چندگانه توالی‌های حاصله از نمونه‌های ایرانی استفاده شده است.این توالی‌ها از مطالعه‌های روی انواع گونه‌های مختلف گانودرماهای ایرانی با استفاده از پرایمرهای ITS از ژن بانک به‌دست آمده. در مجموع ۴۷ توالی از انواع گونه‌های گانودرما در این مطالعه و مقایسه مورد استفاده قرار گرفته شده است. به جهت امکان تحلیل و مقایسه بهتر از نتایج تطابق و هم-ترازی حاصله در رسم درخت فیلوژنی براساس آنچه در روش اجرا ذکر شده استفاده گردید. تجزیه و تحلیل حداکثر درست‌نمایی درختی با جزئیات به‌نسبت کامل را برای شناسایی نمونه‌ها به‌همراه داشت. از ۴۹ شاخه متمایز در درخت حداکثر درست‌نمایی، دو کلاد G. lucidum با پشتوانه قابل قبول توسط نتایج وجود دارد که شامل به‌طور تقریبی همه نمونه‌های با برچسب G.lucidum است. البته یک نمونه G.applanatum که به‌احتمال اشتباه شناسایی شده است، وجود دارد و Sample-2 نمونه مکمل قارچی خریداری شده (عکس ۲). ما هم‌چنین یک کلاد دیگر با پشتوانه قوی توسط نتایج شامل G. resinaceum واقعی را بازسازی کردیم که Sample-1 در این کلاد قرار می‌گیرد و چند شاخه نیز با فاصله قرار می-گیرند که G.lucidum ذکر شده ولی تطابق با دیگر شاخه ها ندارند (شکل ۲).

بنابراین براساس نتایج آنالیز توالی‌های فوق که حاصل از BLAST، هم‌ترازی و درخت فیلوژنتیک بودند نشان داده شد که در کپسول‌های Sample-1 قارچ G. resinaceum وجود دارد که با برچسب تجاری نمونه مکمل قارچی خریداری شده از داروخانه تطابق نداشت. اما برای Sample-2 وجود G. lucidum درکپسول‌های نمونه‌های مکمل قارچی خریداری شده را نشان می‌دادند که با برچسب تجاری نمونه‌های خریداری شده برند مذکور تطابق داشتند.

بحث

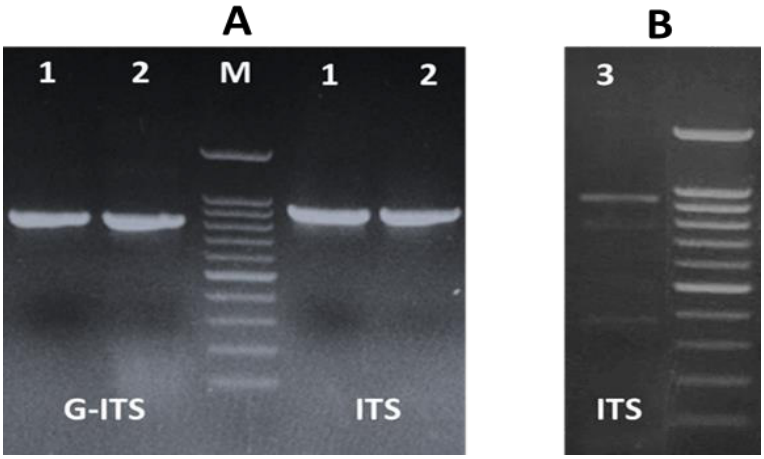
نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد که منطقه ITS یک بارکد حساس، اختصاصی و کارآمد برای مکمل‌های گیاهی ریشی که از داروخانه خریداری می‌شود ارائه می‌کند. هم-چنین از موارد مشابه بررسی‌های انجام شده بر روی مکمل‌های قارچ گانودرما لوسیدوم می‌توان به مطالعه Gunnels و همکارانشان که به بررسی مکمل‌های گانودرما در آمریکا پرداخته توسط بررسی منطقه ITS نشان دادند که گاهی برچسب‌گذاری اشتباه صورت می‌گیرد و G. lingzhi به‌جای G. lcidium به‌کار برده می‌شود (۲۷). در مطالعه دیگری که توسط Loyd صورت گرفته پس از بررسی ۴۰ مکمل قارچ رایشی توسط توالی‌یابی منطقه ITS نشان داده شده که G. lingzhi در اکثر محصولات شناسایی شد، اما گونه‌های دیگر گانودرما نیز وجود داشتند، از جمله آن‌ها به G. applanatum، G. australe، G. gibbosum، G. sessile و می توان اشاره کرد G. sinense (۱۶).

در این مطالعه DNA ژنومی قابل تکثیر با موفقیت از هر دو نمونه پودری استخراج شد. در نمونه ۲ که حاوی دو قارچ متمایز بود در ژل آگاروز باندهای غیر اختصاصی دیده می‌شد (شکل۱) توالی‌یابی به‌درستی صورت نپذیرفت اما با مقایسه توالی‌یابی صورت گرفته شده با Database و اصلاح توالی بر اساس نمودار به‌دست آمده از توالی‌یابی، می‌توان نتیجه گرفت که قارچ گانودرما موجود در نمونه۲ از نوع قارچ لوسیدوم است. در نمونه ۱ که ادعا داشت تنها قارچ G. lucidum مورد استفاده قرار گرفته در ژل آگاروز باند غیر اختصاصی دیده نمی شود (شکل۱) و توالی‌یابی به‌درستی صورت پذیرفت. در نتیجه آن مشاهده شد که قارچ مورد استفاده در نمونه۲ G. lucidum نبوده و به-جای آن از G. resinaceum استفاده شده است.

اگرچه G. resinaceum از بسیاری جهات از جمله باردهی آن شبیه G. lucidum است اما ترکیب و اثرات فارماکولوژیک G. resinaceum مشخص نیست (۳۱). در مطالعه‌ای که توسط S. Keypour و همکاران انجام شده وجود تنوع ژنتیکی بالا در دو نوع قارچ G. resinaceum و G. lucidum نشان داده شده و بر این اساس احتمال بروز صفات مورفولوژیک متفاوت پیشنهاد گردیده است (۳۲). در مطالعه Chen و همکاران مقدار کلی پلی-ساکاریدها و تری‌ترپنوئیدها در دو قارچ G. resinaceum و G. lucidium تفاوت اساسی ندارد (۳۱) با این وجود در مطالعه‌ای که سال ۲۰۰۸ منتشر شده (۳۳) به این موضوع اشاره دارد که G. resinaceum نسبت‌به G. lucidum پاتوژنیک‌تر است. مطالعه Newmaster و همکاران (۳) بر روی مکمل‌های گیاهی نشان داد که ۵۹٪ دارای گونه‌های جایگزین هستند و حدود ۳۳٪ از این محصولات دارای پرکننده‌ها یا آلاینده‌هایی،که برخی از آن‌ها می‌توانند خطراتی برای سلامتی مصرف کنندگان داشته باشند، هستند که بر روی برچسب محصول قرار نگرفته‌اند علاوه‌بر آن فقط سه گونه گانودرما (G. lucidum، G. sine nse و G. Tsugae) در فارماکوپه ملی طب چینی (۳۰) آورده شده. بارکدگذاری DNA محصولات تجاری گیاهی هم‌چنان ابزار ارزشمندی برای تولیدکنندگان خواهد بود، به‌ویژه برای مکمل‌های گیاهی مانند رایشی که در آن فقدان ویژگی‌های مورفولوژیکی و شیمیایی پودر با

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.9.6]



شکل ۱. محصول PCR توالی ژن ITS. A: ردیف Ladder 50bp،M (سیناکلون)؛ ردیف 1، Sample-1؛ ردیف 2،نمونه‌ی قارچ MZ506307.1

B: ردیف 3، Sample-2

جدول ۲. اطلاعات نمونه‌برداری برای نمونه های پودر از کپسول مکمل‌های قارچی دو برند تجاری خریداری شده.

نمونه برند تجاری	گونه (براساس برچسب تجاری روی محصول)	برترین نتایج بلاست	درصد شباهت BLAST به نمونه Genbank	طول توالی (bp)
Sample-1 (چهار نمونه خریداری شده از چهار داروخانه متفاوت)	*Ganoderma lucidum*	Ganoderma resinaceum (KT921215.1)	٪۱۰۰	۸۹۵ (تطابق از ۱۹ تا ۶۵۸)
Sample-2 (چهار نمونه خریداری شده از چهار داروخانه متفاوت)	*Ganoderma &Lucidum shiitake*	Ganoderma lucidum (MF476197.1)	٪۹۸	۸۶۷ (تطابق از ۲ تا ۷۵۲)

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.9.6]

شکل ۲: تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک درخت حداکثر احتمال فیلوژنی Bootstrip فوق شامل نمونه‌های خریداری شده از داروخانه‌ها (Sample-1 & Sample-2) و نمونه‌های توالی‌های ITS انواع گونه‌های قارچ گانودرما ثبت شده به نام ایران که از مجموعه NCBI Genbank - گرفته شده است. گونه‌ها و شاخه‌های تحت خط مشکی غیر منقطع کلاد و گرام با شاخه و احتمال در امتداد شاخه‌ها به‌عنوان شباهت نسبی به گونه اصلی Sample-1 یا مترادف با نمونه مکمل قارچ تجاری شماره ۱ را نشان داده است که شباهت اصلی گونه resinaceum قارچ گانودرما است. کلاد بعدی یعنی گونه‌ها و شاخه‌های تحت خط مشکی منقطع کلاد و گرام با شاخه و احتمال در امتداد شاخه‌ها به‌عنوان شباهت نسبی به گونه اصلی Sample-2 یا مترادف با نمونه مکمل قارچ تجاری شماره ۲ که گونه lucidium قارچ گانودرما است را نشان داده است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.9.6]

سردرگمی طبقه‌بندی زیربنایی ترکیب می‌شود.

نمونه‌هایی که ما بررسی کردیم دارای نتایج BLAST و فیلوژنتیک بودند که نشان می‌دهد که نمونه ۱ به وضوح از اعضای گروه ۱ و نمونه ۲ از اعضای گروه ۲ تعریف شده توسط S. Keypour و همکاران (۱۵) بودند. از نظر روش‌شناسی، تجزیه و تحلیل‌های BLAST و فیلوژنتیک در مورد منشاء همه نمونه‌های خریداری‌شده از داروخانه کارایی داشتند اما به‌نظر می‌رسد که زمانی که مکمل دارای چند نوع قارچ به‌صورت هم‌زمان باشد نتایج می‌تواند گمراه کننده باشد. نتایج ما به‌طور کلی چه هنگامی که از کل منطقه ITS استفاده کردیم و یا از ناحیه اصلاح شده هم‌پوشانی در هم‌ترازی سکانس‌های چندگانه و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک پس از آن قوی بود (همه نتایج به G. lucidum در گروه ۱ اشاره می‌کنند). با این حال، به‌دلیل موضوع نام‌گذاری مرتبط با بسیاری از نمونه‌های Genbank، به‌نظر می‌رسد که نتایج ما از G. lucidum و G. resinaceum جمع‌آوری شده در داخل کشور به اهمیت اصلاح طبقه‌بندی Genbank برای جلوگیری از شناسایی اشتباه در آینده با ثبت بیش‌تر نمونه از ایران اشاره می‌کند.

مطالعه ما برای طبقه‌بندی در میان تمام گونه‌های نزدیک به‌هم در جنس گانودرما که در داده‌های توالی ITS موجود در Genbank هستند (۱۵،۳۴)، نیست ولی برای مقایسه موارد ثبت شده بنام ایران مفید است. با این حال برخی از نام‌های Genbank در رابطه با گانودرما در Blast و فیلوژنتیک آن‌ها تطبیق ندارند و در مقالات دیگر هم گروه ۱ شامل G. subambionense G. pesinaceum، G. pfeifferi که گانودرما رسیناسیوم آن از ایران جمع‌آوری شده در گروه ۲ نیز شامل G. oregonense G. valesiacum (آمریکا و کانادا)، G. lucidum (ایران و اروپا) G. tsugae (چین) است (۱۵). در شکل ۲ نیز این تطابق با این مطالعه که G. resinaceum ایرانی بیش‌تر در یک گروه و G. lucidum که در ایران جمع‌آوری شده در یک گروه دیگر قرار می‌گیرند، دیده می‌شود.

تنوع ITS در کلاد G. lucidum به ما این امکان را می‌دهد که نمونه‌های خریداری شده در فروشگاه خود را بیش‌تر و دقیق‌تر مشخص نماییم. هرچند تنوع توالی‌های درون گونه‌ای در ITS می‌تواند برای ردیابی منشاء گونه‌های برخی مکمل‌های گیاهی و قارچی رایشی ارزشمند باشد، اما بنظر می رسد باید تاکید گردد که با استفاده از ژن‌های اختصاصی و جایگاه‌هایی که به‌طور نمونه توسط مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) نیز پیشنهاد شده است البته در صورت ثبت انبوه نتایج در Genbank می‌توان استانداردهای ثبتی ایران را ارتقا داده و تکمیل نماید.

نتیجه‌گیری

با توجه‌به تفاوت فراوان مقادیر ترکیب‌های مؤثر در نمونه‌های مکمل مختلف موجود در بازار هنگامی که مواد تشکیل دهنده را نمی‌توان از نظر مورفولوژیکی یا بیوشیمیایی تأیید کرد، بهترین روش استفاده از روش‌های مولکولی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک مبتنی‌بر سکانس ITS موجود در DNA قارچ، یک روش موفق و مقرون‌به صرفه برای احراز هویت گونه‌های قارچ به‌کار رفته در مکمل است. این روش می‌تواند در صنعت مکمل‌های گیاهی برای گونه‌های قارچی و گیاهی که شناسایی آن‌ها دشوار است، استفاده شود. نتایج این مطالعه برای اولین بار بر روی مکمل‌های تجاری موجود در بازار مشخص کرد جهت کنترل کیفی و تطابق قارچ‌های داخل مکمل‌ها با برچسب تجاری آن‌ها و اثبات نوع قارچ موجود در آن، استفاده از این روش مولکولی ارزشمند است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری مؤثر کارکنان شرکت ژن درفام پارس و آزمایشگاه ژنوم جهت راهنمایی در انجام این پروژه، کمال تشکر و قدردانی می‌گردد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.9.6]

منابع

1. H. A. Raja, T. R. Baker, J. G. Little, and N. H. Oberlies, “DNA barcoding for identification of consumer-relevant mushrooms: A partial solution for product certification?,” *Food Chem.*, vol. 214, pp. 383–392, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2016.07.052.

2. “Our Vision - International Barcode of Life.” https://ibol.org/about/our-vision/ (accessed Mar. 27, 2022).

3. S. G. Newmaster, M. Grguric, D. Shanmughanandhan, S. Ramalingam, and S. Ragupathy, “DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products,” *BMC Med.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–13, Oct. 2013, doi: 10.1186/1741-7015-11-222/COMMENTS.

4. D. Begerow, H. Nilsson, M. Unterseher, and W. Maier, “Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 87, no. 1, pp. 99–108, Jun. 2010, doi: 10.1007/S00253-010-2585-4.

5. T. Dodge, D. Litt, and A. Kaufman, “Influence of the dietary supplement health and education act on consumer beliefs about the safety and effectiveness of dietary supplements,” *J. Health Commun.*, vol. 16, no. 3, pp. 230–244, Mar. 2011, doi: 10.1080/10810730.2010.529493.

6. S. Keypour and M. R. Asef, “New reports on locality and host relationship of Ganoderma resinaceum from Iran,” *Australas. Plant Pathol.*, vol. 49, no. 2, pp. 175–178, Mar. 2020, doi: 10.1007/S13313-020-00688-7.

7. S.-T. Chang and P. Miles, “Ganoderma lucidum — A Leader of Medicinal Mushrooms,” in *Mushrooms*, CRC Press, 2004, pp. 357–372.

8. A. L. Loyd *et al.*, “Identifying the ‘Mushroom of immortality’: Assessing the Ganoderma species composition in commercial reishi products,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. JUL, Jul. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01557.

9. X. C. Wang, R. J. Xi, Y. Li, D. M. Wang, and Y. J. Yao, “The Species Identity of the Widely Cultivated Ganoderma, ‘G. lucidum’ (Ling-zhi), in China,” *PLoS One*, vol. 7, no. 7, p. e40857, Jul. 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0040857.

10. R. R. M. Paterson, “Ganoderma – A therapeutic fungal biofactory,” *Phytochemistry*, vol. 67, no. 18, pp. 1985–2001, Sep. 2006, doi: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2006.07.004.

11. F. Hennicke, Z. Cheikh-Ali, T. Liebisch, J. G. MacIá-Vicente, H. B. Bode, and M. Piepenbring, “Distinguishing commercially grown Ganoderma lucidum from Ganoderma lingzhi from Europe and East Asia on the basis of morphology, molecular phylogeny, and triterpenic acid profiles,” *Phytochemistry*, vol. 127, pp. 29–37, Jul. 2016, doi: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2016.03.012.

12. D. T. Wu, Y. Deng, L. X. Chen, J. Zhao, A. Bzhelyansky, and S. P. Li, “Evaluation on quality consistency of Ganoderma lucidum dietary supplements collected in the United States,” *Sci. Reports 2017 71*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, Aug. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-06336-3.

13. T. R. Kinge, A. M. Mih, M. P. A. Coetzee, T. R. Kinge, A. M. Mih, and M. P. A. Coetzee, “Phylogenetic relationships among species of Ganoderma (Ganodermataceae, Basidiomycota) from Cameroon,” *Aust. J. Bot.*, vol. 60, no. 6, pp. 526–538, Aug. 2012, doi: 10.1071/BT12011.

14. B. Liao *et al.*, “Identification of commercial Ganoderma (Lingzhi) species by ITS2 sequences,” *Chinese Med. (United Kingdom)*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, Aug. 2015, doi: 10.1186/S13020-015-0056-7/FIGURES/4.

15. S. Keypour, H. Riahi, M. R. Asef, J. Abdollahzadeh, A. borhani, and N. Safaie, “The true nature of Ganoderma in Iran: Taxonomy based on ITS and mtSSU rDNA,” *For. Pathol.*, vol. 50, no. 4, Aug. 2020, doi: 10.1111/EFP.12605.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.9.6]

16. A. L. Loyd *et al.*, "Identifying the 'Mushroom of Immortality': Assessing the Ganoderma Species Composition in Commercial Reishi Products," *Front. Microbiol.*, vol. 9, Jul. 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.01557.

17. A. J. F. S. Matos, R. M. F. Bezerra, and A. A. Dias, "Screening of fungal isolates and properties of Ganoderma applanatum intended for olive mill wastewater decolourization and dephenolization," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 45, no. 3, pp. 270–275, Sep. 2007, doi: 10.1111/J.1472-765X.2007.02181.X.

18. E. Seweryn, A. Ziała, and A. Gamian, "Health-Promoting of Polysaccharides Extracted from Ganoderma lucidum," *Nutr. 2021, Vol. 13, Page 2725*, vol. 13, no. 8, p. 2725, Aug. 2021, doi: 10.3390/NU13082725.

19. E. Seweryn, A. Ziała, and A. Gamian, "Health-promoting of polysaccharides extracted from ganoderma lucidum," *Nutrients*, vol. 13, no. 8. MDPI, Aug. 01, 2021, doi: 10.3390/nu13082725.

20. M. reza Asef, *Iranian medicinal fungi*, 1st ed. iranshenasi publisher, 2016.

21. L. W. Zhou *et al.*, "Global diversity of the Ganoderma lucidum complex (Ganodermataceae, Polyporales) inferred from morphology and multilocus phylogeny," *Phytochemistry*, vol. 114, pp. 7–15, May 2015, doi: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2014.09.023.

22. A. L. Loyd *et al.*, "Elucidating 'lucidum': Distinguishing the diverse laccate Ganoderma species of the United States," *PLoS One*, vol. 13, no. 7, p. e0199738, Jul. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0199738.

23. C. L. Schoch *et al.*, "Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 16, pp. 6241–6246, Apr. 2012, doi: 10.1073/PNAS.1117018109/SUPPL_FILE/SD01.XLS.

24. D. Z. Li *et al.*, "Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 49, pp. 19641–19646, Dec. 2011, doi: 10.1073/PNAS.1104551108.

25. B. G. Baldwin, "Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the compositae," *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 1, no. 1, pp. 3–16, Mar. 1992, doi: 10.1016/1055-7903(92)90030-K.

26. T. J. White, T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor, "AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS," *PCR Protoc.*, pp. 315–322, 1990, doi: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.

27. T. Gunnels, M. Creswell, J. McFerrin, and J. B. Whittall, "The ITS region provides a reliable DNA barcode for identifying reishi/lingzhi (Ganoderma) from herbal supplements," *PLoS One*, vol. 15, no. 11 November, Nov. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0236774.

28. Y. Cao, S.-H. Wu, and Y.-C. Dai, "Species clarification of the prize medicinal Ganoderma mushroom 'Lingzhi,'" *Fungal Divers.*, vol. 56, no. 1, Sep. 2012, doi: 10.1007/s13225-012-0178-5.

29. M. GARDES and T. D. BRUNS, "ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts," *Mol. Ecol.*, vol. 2, no. 2, Apr. 1993, doi: 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x.

30. C. P. Committee and 2010). 2010; National Pharmacopoeia Committee, *No Title*. .

31. B. Chen *et al.*, "Isolation and varietal characterization of Ganoderma resinaceum from areas of Ganoderma lucidum production in China," *Sci. Hortic. (Amsterdam).*, vol. 224, pp. 109–114, Oct. 2017, doi: 10.1016/J.SCIENTA.2017.06.002.

32. S. Keypour, H. Riahi, M. E. Nahari, M. R. Asef, A. Borhani, and N. Safaie, "The Study of the

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.9.6]

genetic diversity of two laccate species of Ganoderma lucidum and Ganoderma resinaceum using RAPD marker," 2019, doi: 10.29252/nbr.5.4.379.

33. F. Guglielmo, P. Gonthier, M. Garbelotto, and G. Nicolotti, "A PCR-based method for the identification of important wood rotting fungal taxa within Ganoderma, Inonotus s.l. and Phellinus s.l.," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 282, no. 2, pp. 228–237, May 2008, doi: 10.1111/J.1574-6968.2008.01132.X.

34. S. Jargalmaa, J. A. Eimes, M. S. Park, J. Y. Park, S. Y. Oh, and Y. W. Lim, "Taxonomic evaluation of selected Ganoderma species and database sequence validation," *PeerJ*, vol. 2017, no. 7, p. e3596, Jul. 2017, doi: 10.7717/PEERJ.3596/SUPP-3.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1401.12.47.9.6]