

شناسایی گروه های مختلف تاکسونومیک قارچ های *Rhizoctonia spp.* مربوط به پوسیدگی ریشه و طوقه چغندر قند با آنالیز rDNA-ITS و PCR-RFLP

ماهرخ فلاحتی رستگار^۱ - پریسا طاهری^{۲*} - بهروز جعفر پور^۳ - حمید روحانی^۴ - عصمت مهدیخانی مقدم^۵

تاریخ دریافت: ۸۸/۳/۱۹

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۰/۹

چکیده

جدایه های *Rhizoctonia spp.* بدست آمده از ریشه و طوقه چغندر قند با علائم بیماری پوسیدگی خشک که از نواحی مختلف تولید چغندر قند در استان خراسان رضوی در سالهای ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ جمع آوری شده بودند، در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. تشخیص و تمایز این جدایه ها به روش های معمول مورفولوژیکی و همچنین با استفاده از روشهای مولکولی و کاربرد آغازگرهای اختصاصی برای هر گونه انجام گرفت. نتایج نشان داد که از ۳۶ جدایه مورد بررسی، ۳۱ جدایه متعلق به گونه *R. solani* و ۵ جدایه از گونه *R. cerealis* بودند. در آنالیز PCR-RFLP مربوط به ناحیه ژنومی rDNA-ITS در گروه تاکسونومیک *R. solani*، جدایه های مربوط به زیر گروه IC از گروه آناستوموزی یک (AG1)، شناسایی گردیدند. از ۳۱ جدایه *R. solani*، ۱۷ جدایه متعلق به زیر گروه AG2-2 IIIB، ۱۲ جدایه در زیر گروه AG2-2 IV، و ۲ جدایه متعلق به زیر گروه AG1-1C شناسایی شد. آزمایشات بیماریزایی بر روی چغندر قند کولتیوار FD0432 نشان داد که جدایه های AG2-2 IIIB و AG2-2 IV در مقایسه با AG1-1C و *R. cerealis* از بیماریزایی بیشتری بر روی ریشه و طوقه گیاهان چغندر قند برخوردار می باشند. در حالیکه جدایه های *R. cerealis* دارای بیشترین بیماریزایی بر روی گیاهچه ها بودند. این اولین گزارش شناسایی و بررسی بیماریزایی زیر گروه های مختلف مربوط به گروه های آناستوموزی AG1 و AG2-2 از قارچ *R. solani* و همچنین گونه دو هسته ای *R. cerealis* جدا شده از چغندر قند در ایران می باشد.

واژه های کلیدی: پوسیدگی ریشه و طوقه، چغندر قند، گروه های تاکسونومیک، rDNA-ITS، *Ceratobasidium*، *Thanatephorus cucumeris*، PCR-RFLP، *cereale*

مقدمه

۵۰ درصد موجب کاهش تولید این محصول می گردد. این بیماری توسط قارچ خاکزاد چند هسته ای *R. solani* Kuhn با فرم جنسی *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk ایجاد می شود. این قارچ بیمارگر دارای دامنه میزبانی وسیعی است و قادر به آلوده سازی بیش از ۱۴۲ گونه گیاهی متعلق به ۲۷ خانواده شامل گیاهان تک لپه ای و دو لپه ای می باشد. *R. solani* یک گونه پیچیده با جمعیت های متنوع است و بر اساس پدیده ترکیب هیفها به گروه های یکنواخت متعددی موسوم به گروه های آناستوموزی تقسیم بندی شده است. تا کنون ۱۴ گروه آناستوموزی (AG) برای *R. solani* شناسایی شده اند (۶ و ۸). بسیاری از گروه های آناستوموزی به زیر گروه هایی تقسیم بندی شده اند که موسوم به گروه های ویژه داخلی یا Intraspecific groups (ISGs) می باشند. تقسیم بندی گروه های آناستوموزی به ISGs پایه دامنه میزبانی، علائم ایجاد شده بر روی میزبان، خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی انجام شده است (۱۴). در چغندر قند، گونه

بیماریهای ریزوکتونیایی چغندر قند شامل پوسیدگی ریشه و طوقه، مرگ گیاهچه قبل و بعد از سبز شدن، و سوختگی اندام های هوایی همه ساله خسارات عمده ای را در بسیاری از نواحی کشت چغندر قند در دنیا وارد می سازند (۲، ۵، ۱۰ و ۱۶). عوامل مختلفی نظیر عدم استفاده متعادل از کودها و کشت در خاک سنگین با زهکشی کم موجب افزایش حساسیت بافتهای گیاه در برابر قارچ بیمارگر و مساعد شدن شرایط برای افزایش شدت بیماری های ریزوکتونیایی این محصول گردیده است. پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه و طوقه، یکی از مخرب ترین و شایع ترین بیماریهای چغندر قند می باشد که تا حدود

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵- به ترتیب استاد، استادیار، دانشیار و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*) نویسنده مسئول: (Email: p-taheri@um.ac.ir)
نویسندگان اول و دوم مشارکت مساوی در انجام این پژوهش داشته اند.

جریان آب انجام شد. سپس قطعاتی از حدفاصل ناحیه سالم و آلوده از بافت ریشه، طوقه و یا دمبرگ به اندازه ۳-۴ میلیمتر با قرار دادن در محلول هیپوکلریت سدیم ۵/۰ درصد به مدت ۲ دقیقه ضد عفونی سطحی شد. این قطعات گیاهی ۳ بار با قرار دادن در آب مقطر استریل شستشو داده شدند. هر قطعه پس از خشک شدن بر روی کاغذ صافی استریل، بر روی محیط کشت آب آگار اسیدی با $\text{PH} = 5/4$ حاوی ۱۰ درصد اسید لاکتیک (Acidified Water) (Agar; AWA) قرار داده شد و در انکوباتور تاریک با دمای 28°C نگهداری شد. پس از ۲ تا ۳ روز، محیط کشت ها مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند و مشخصات ویژه میسلیم مربوط به گونه‌های ریزوکتونیا در آنها ارزیابی گردید. سپس عمل نوک هیف کردن برای جدایه های ریزوکتونیا انجام شد و نوک هیف ها به محیط کشت AWA برای خالص سازی بیشتر انتقال یافتند. سپس هر جدایه به منظور نگهداری کوتاه مدت به لوله های آزمایش حاوی محیط کشت سیب زمینی - دکستروز - آگار (Potato-Dextrose-Agar; PDA) انتقال یافت و در دمای 28°C نگهداری شد. پس از رشد کامل و تولید اسکروت ها، لوله های آزمایش حاوی محیط کشت به یخچال (با دمای 4°C) منتقل شدند. برای نگهداری طولانی مدت جدایه ها از روش نگهداری اسکروت های لیوفیلیزه شده در دمای 4°C استفاده شد.

استرین های استاندارد گونه چند هسته ای *R. solani* مورد استفاده در تعیین گروه آناتوموزی جدایه ها شامل AG1-IA (Cs-), AG2-1, AG1-IC (BV17), AG1-IB (B19), (Ka), (PS4), AG3, AG2-2 IV (RI64), AG2-2 IIIB (C96), (PH-1), AG4-HG II (Rh.165), AG4-HG I (AH-1), AG7 (1535), AG6 HGI (OHT 1-1), AG5 (SH-4) و AG8 (W2966) بودند. همچنین استرین های استاندارد دو هسته ای شامل AG C, AG Ba (C-484), AG A (C-538), AG E (RH-155), AG D (BrG-WP-1), (55D25), AG I (55D21) و AG K (AC-1) در این پژوهش بکار برده شدند. تمام استرین های استاندارد از ژاپن (Lab. of Plant Pathology, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Japan) دریافت شدند.

بررسی مشخصات مورفولوژیکی

ابتدا جدایه های قارچ ها از نظر تعداد هسته در سلول های جوان میسلیم و دو یا چند هسته ای بودن با استفاده از روش رنگ آمیزی با تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور، قطعه ای میسلیمی از پرگنه جدایه های ریزوکتونیا دو تا سه روز پس از کشت بر روی محیط PDA با تریپان بلو رنگ آمیزی شد و از نظر تعداد هسته در سلول های میسلیم، وجود دیواره عرضی دولیپور و قطر هیف اصلی ارزیابی گردید.

R. solani عامل بیماریهای متنوعی است. جدایه های AG2-2 IIIB بیشتر موجب بروز پوسیدگی ریشه و طوقه می گردند، و جدایه های AG2-2 IV عامل بیماریهای پوسیدگی ریشه و طوقه و سوختگی اندامهای هوایی می باشند. در حالیکه جدایه های AG4-HG II و گونه دو هسته ای *R. cerealis* بعنوان عوامل ایجاد مرگ گیاهچه در چغندر قند معرفی شده اند (۹، ۱۳ و ۱۴). وجود سایر گروه های آناتوموزی قارچ *R. solani* نیز در گیاهچه های چغندر قند و یا خاک مزارع آلوده گزارش شده است (۸ و ۱۴).

استراتژی های مدیریت بیماریها باید بر اساس اکولوژی بیمارگر طرح ریزی گردند و این مورد نیازمند داشتن اطلاعات کامل و دقیق در مورد گروه های تاکسونومیک و تنوع جمعیت های *R. solani* در نواحی دارا و فاقد آلودگی و بررسی عوامل عمده تاثیر گذار بر روی ساختار ژنتیکی جمعیت های این قارچ می باشد. علاوه بر تشابه علایم بیماریهای ناشی از گروه های مختلف تاکسونومیک ریزوکتونیا بر روی چغندر قند، تشخیص گونه های مختلف این قارچ تنها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، بدلیل عدم ثبات این خصوصیات در محیط کشت، دقیق و قابل اعتماد نمی باشد. همچنین تشخیص زیر گروه های مختلف AG1 تنها بر اساس روش های متداول مورفولوژیکی بررسی گروه آناتوموزی دقیق نمی باشد زیرا ریشه های جدایه های سه زیر گروه AG1-1A، AG1-1B و AG1-1C می توانند با یکدیگر ترکیب شوند (۱۴ و ۱۵). بنابراین، هدف از این تحقیق، تمایز قارچ های ریزوکتونیا بیمارزا در چغندر قند در سطوح مختلف تاکسونومیک شامل گونه، گروه آناتوموزی و زیر گروه های آن بر پایه روشهای مورفولوژیکی و مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای هر گونه و با کاربرد روش-PCR RFLP برای ناحیه ژنومی rDNA-ITS بود. همچنین بیماریزایی جدایه ها بر روی چغندر قند رقم FD0432 در دو مرحله رشد شامل گیاهچه و گیاه کامل مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جدایه های قارچ های مورد بررسی

در این تحقیق، جدایه های *Rhizoctonia spp.* جمع آوری شده از نواحی مختلف کشت چغندر قند در استان خراسان رضوی (جدول ۱) به همراه استرین های استاندارد مربوط به گروه های آناتوموزی مختلف دریافتی از ژاپن (Lab. of Plant Pathology, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Japan) مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه های مربوط به هر مزرعه با حرکت بر روی اقطار مزرعه از گیاهان دارای علایم بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه جمع آوری شده بودند. به منظور جداسازی قارچ از بافت گیاهی، پس از حذف برگهای نمونه چغندر قند، شستشوی ریشه و طوقه و بخش پایه دمبرگها در زیر

جدول ۱ - جدایه های ریزوکتونیا بدست آمده از گیاهان بالغ چغندر قند با علائم بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه در نواحی مختلف استان خراسان رضوی

شهرستان محل نمونه برداری	سال	جدایه
تربت حیدریه	1386	TH-1.4, TH-1.5, TH-1.7, TH-1.8, TH-1.11
	1387	TH-2.1, TH-2.4, TH-2.5, TH-2.8
چناران	1386	CH-1.1, CH-1.2, CH-1.3, CH-1.4
	1387	CH-2.1, CH-2.2, CH-2.3, CH-2.7, CH-2.9
فریمان	1386	F-1.4, F-1.5, F-1.6, F-1.9, F-1.12
	1387	F-2.1, F-2.2, F-2.5, F-2.10, F-2.12
مشهد	1386	M-1.3, M-1.4, M-1.6, M-1.11
	1387	M-2.1, M-2.2, M-2.7, M-2.14

برای RS1/RS4 برای شناسایی *R. solani*، و Rc2 F/Rc2 R و *R. cerealis* بودند (جدول ۲).

بررسی گروه های آناستوموزی و آنالیز PCR-RFLP برای ناحیه ITS در rDNA

به منظور بررسی اولیه گروه آناستوموزی جدایه های *R. solani* از روش متداول تعیین گروه آناستوموزی بر روی اسلاید (۱۴) با کاربرد استرین های استاندارد استفاده شد. برای تعیین زیر گروه های مربوط به جدایه های *R. AG1* *solani* بدست آمده از مزارع چغندر قند، جدایه های استاندارد AG1-IA موسوم به Cs-Ka، بدست آمده از مزارع برنج، AG1-IB موسوم به B19 و AG1-IC موسوم به BV17 که هر دو از چغندر قند جداسازی شده بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. DNA ژنومی استخراج شده از جدایه ها برای واکنش PCR با استفاده از آغازگر های طراحی شده برای ناحیه ITS گونه *R. solani* (شامل آغازگر های RS1 و RS4 مذکور در جدول ۲) مورد استفاده قرار گرفت و از شرایط PCR شرح داده شده توسط گیل موت و همکاران (۹) استفاده شد.

جدول ۲- آغازگر های مورد استفاده در تشخیص گونه و گروه

آناستوموزی جدایه های <i>Rhizoctonia spp.</i>	
Primer name	Sequence (5' to 3')
RS1	CCTGTGCACCTGTGAGACAG
RS4	TGTCCAAGTCAATGGACTAT
Rc2 F	AAAACCTGGCAACCTTGGTG
Rc2 R	TAACTCACCCTCCAGCCGTT

هر جدایه بر روی سه عدد پتری حاوی PDA کشت و به مدت سه هفته در انکوباتور با دمای ۲۸°C نگهداری شد و سپس جدایه ها از نظر مورفولوژی پرگنه و شکل و سایز سلول های مونولوئید و اسکروت ها بررسی شدند.

استخراج DNA

پرگنه قارچ ها در پتری های استریل یکبار مصرف به قطر ۹۰ میلیمتر و حاوی ۴۰ میلی لیتر محیط کشت مایع (Potato-Dextrose-Broth) PDB در دمای اتاق و بدون استفاده از شیکر رشد داده شدند. میسلیم پس از گذشت ۵ روز از کشت قارچ و قبل از تشکیل اسکروت ها با استفاده از کاغذ صافی استریل، برداشت گردید. توده میسلیم لیوفیلیزه شده در نیتروژن مایع کاملاً پودر شد و DNA ژنومی با روش hexadecyl-CTAB (trimethylammonium bromide) استخراج گردید (۱۵ و ۱۷). نهایتاً رسوب DNA استخراج شده بسته به حجم رسوب، در ۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر از بافر Tris-EDTA (حاوی 10 mM Tris، 1 mM EDTA با PH=8) حل شد و کیفیت و کمیت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر و ژل آگارز یک درصد ارزیابی گردید و DNA تا هنگام استفاده در فریزر (-۲۰°C) نگهداری شد.

تشخیص گونه های ریزوکتونیا بر پایه PCR

برای تعیین گونه جدایه های *Rhizoctonia spp.* مورد بررسی در این تحقیق، از روش PCR با استفاده از آغازگر های اختصاصی طراحی شده برای هر یک از گونه های ریزوکتونیایی بیماریزا در چغندر قند استفاده شد (۹ و ۱۱). بین ترکیبات آغازگر شامل

بذرها، تعداد ۴ گیاهچه که رشد یکسان داشتند در هر گلدان نگهداری شده و بقیه گیاهچه ها حذف گردیدند. در هر بار تکرار آزمایش، ۳ گلدان برای هر جدایه مورد استفاده قرار گرفت. تهیه مایه تلقیح هر یک از جدایه های قارچ ریزوکتونیا با استفاده از بذرهای ارزن سترون که با قرار گرفتن در سطح محیط کشت (Corn Meal Agar) حاوی هر جدایه به مدت ۴ روز، توسط جدایه های مورد بررسی کلونیزه شده بودند، انجام گرفت (۱۰). از بذرهای ارزن سترون قرار داده شده بر روی محیط کشت فاقد قارچ، بعنوان کنترل برای آزمایشات بیماریزایی استفاده گردید. گیاهچه ها در مرحله ۴ برگی با قرار دادن ۱۰ بذر ارزن کلونیزه شده توسط هر جدایه در سطح خاک اطراف گیاهچه (در فاصله ۲ سانتیمتری از گیاهچه) مایه زنی شدند. بلافاصله پس از مایه زنی، گیاهان به اتاقک مرطوب با رطوبت نسبی ۹۲ تا ۱۰۰ درصد در داخل گلخانه منتقل شدند. بررسی پیشرفت بیماری بر روی گیاهچه ها پس از گذشت سه هفته از مایه زنی انجام شد و گیاهچه ها با دادن نمره از صفر تا چهار براساس روش شرح داده شده توسط ناچندران و همکاران (۱۰) با تغییرات مختصر بصورت زیر ارزیابی شدند:

۰۰: گیاهچه سالم

۱: زخمهای نکروزه سطحی در ناحیه ریشه یا هیپوکوتیل

۲: زخمهای عمیق با حاشیه قهوه ای تا سیاه رنگ

۳: زخمهای عمیق توسعه یافته که هیپوکوتیل را محاصره کرده اند.

۴: مرگ گیاهچه

در نهایت، شاخص بیماری با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{Disease Index (DI)} = [(n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / 4N] \times 100$$

n_1 : تعداد گیاهچه های دارای نمره ۱، n_2 : تعداد گیاهچه های

دارای نمره ۲، n_3 : تعداد گیاهچه های دارای نمره ۳، n_4 : تعداد

گیاهچه های دارای نمره ۴، N : تعداد کل گیاهچه ها

در آزمایشات مربوط به بررسی بیماریزایی جدایه ها در مرحله گیاه کامل، از گلدان های حاوی یک گیاه ۱۰ هفته ای استفاده شد. در هر بار تکرار آزمایش، ۱۲ گیاه برای هر جدایه مورد استفاده قرار گرفت. مایه زنی به روش ذکر شده برای گیاهچه ها انجام گردید. ارزیابی بیماری بر روی ریشه و طوقه پس از گذشت سه هفته از مایه زنی با دادن نمره از صفر تا شش براساس روش شرح داده شده توسط باهر و همکاران (۲) با تغییرات مختصر بصورت زیر انجام گردید:

۰۰: ریشه و طوقه فاقد زخم

۱: زخمهای سطحی در ناحیه مایه زنی شده طوقه

۲: کمتر از ۵ درصد از سطح ریشه دارای زخمهای سطحی

۳: ۵ تا ۲۵ درصد از سطح ریشه دارای زخمهای عمیق

۴: ۲۶ تا ۵۰ درصد از سطح ریشه دارای زخمهای عمیق و توسعه یافته

نهایتاً از محصول PCR برای تمایز زیرگروه های تاکسونومیکی جدایه های AG1 با بکار بردن دو آنزیم محدود کننده *MunI* و *MseI* و با کاربرد استرین های استاندارد مربوط به این زیر گروه ها استفاده شد. هر یک از واکنش های PCR-RFLP شامل ۷ میکرولیتر از محصول PCR، ۱۰ واحد آنزیم محدود کننده، ۲ میکرولیتر بافر واکنش، ۲/۰ میکرولیتر بووین سرم آلبومین و آب دو بار تقطیر استریل تا رسیدن به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود. سپس تیوب ها در حمام آب گرم با دمای 37°C به مدت ۳ ساعت قرار داده شدند و بمنظور پایان دادن به واکنش بمدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم 70°C قرار گرفتند و تا زمان بررسی در ژل آگارز، در فریزر -20°C نگهداری شدند.

با توجه به اینکه زیر گروه های مربوط به جدایه های AG2-2 از قارچ *R. solani* در روش PCR-RFLP طرح بانندی مشابهی می دهند (۹)، استفاده از این روش برای متمایز کردن جدایه های مربوط به AG2-2 IIB و AG2-2 IV از یکدیگر امکان پذیر نمی باشد. همچنین بدلیل اینکه ریشه های جدایه های این دو زیرگروه قادر به ترکیب با یکدیگر می باشند، تشخیص جدایه های این دو زیرگروه علاوه بر اساس تعیین گروه آناستوموزی بر روی اسلاید قابل اعتماد نمی باشد (۱۴). بنابراین، برای تشخیص جدایه های این دو زیر گروه، از روش بررسی امکان رشد جدایه ها در دمای 35°C بر روی محیط کشت PDA استفاده شد (۷ و ۱۴). آزمایش سه بار تکرار شد و در هر بار انجام آزمایش، برای هر جدایه ۴ پتری (تکرار) در نظر گرفته شد.

بررسی بیماریزایی

بیماریزایی تمام جدایه های *R. solani* متعلق به زیر گروه های AG1-IC و AG2-2 IV، AG2-2 IIB و همچنین جدایه های مربوط به گونه *R. cerealis* بر روی چغندر قند رقم FD0432 در دو مرحله رشد شامل گیاهچه و گیاهان کامل ۱۰ هفته ای مورد بررسی قرار گرفت. بذور این واریته از موسسه تحقیقات چغندر قند استان خراسان رضوی دریافت شدند. بذرها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در محلول پراکسید هیدروژن ۳٪ درصد خیسانده شدند و بمنظور جوانه زدن، در پتری های حاوی کاغذ صافی استریل مرطوب به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای 28°C قرار داده شدند. سپس بذرها در گلدان های پلاستیکی حاوی مخلوطی از خاک بکر و ماسه بادی (۱:۲) سترون در عمق ۲ سانتیمتری خاک کشت شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و تحت شرایط گلخانه شامل دمای $30 \pm 3^{\circ}\text{C}$ و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در شبانه روز، انجام گردید.

در آزمایشات مربوط به بررسی بیماریزایی جدایه ها در مرحله گیاهچه ای، ابتدا در هر گلدان ۶ بذر کشت شد و پس از سبز شدن

رنگ سفید بود که در طی ۳ هفته بتدریج به قهوه ای روشن تغییر رنگ دادند. این جدایه ها اسکروت های ریز کروی متعددی به قطر ۲/۰ تا ۵/۰ میلیمتر بر روی PDA ایجاد کردند. این اسکروت ها در ابتدا سفید رنگ بودند و با افزایش سن و بلوغ برنگ قهوه ای در آمدند. در این جدایه های دو هسته ای علاوه بر اسکروت ها، تولید سلول های مونیلوئید طویل به ابعاد ۳۰-۲۱ × ۱۲-۸ میکرومتر در محیط کشت مشاهده گردید.

تمایز گونه های ریزوکتونیا بر پایه PCR

ناحیه rDNA-ITS برای تمام جدایه های *R. solani* مورد بررسی با استفاده از ترکیب آغازگر اختصاصی این گونه (RS1/RS4) تکثیر شد. محصول PCR یک باند به سائز ۰/۵۵ کیلو باز (kb) برای تمام جدایه های این گونه بود (شکل ۱). این نتایج، با نتایج بدست آمده توسط سایر محققان در استفاده از این آغازگرها برای تکثیر ناحیه ژنومی rDNA-ITS برای جدایه های *R. solani* بدست آمده از گیاهان مختلف مطابقت دارد (۹ و ۱۵).

آغازگرهای Rc2 F/Rc2 R که بر اساس توالی های حفاظت شده موجود در ژنوم جدایه های مختلف گونه *R. cerealis* بدست آمده از گیاهان گندم طراحی شده اند، توسط سایر محققان نیز برای شناسایی جدایه های این گونه مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۱). نیکلسون و پری گزارش کردند که این ترکیب آغازگر، فقط در جدایه های گونه *R. cerealis* قادر به همانند سازی قطعه ای از DNA به اندازه ۰/۸ کیلوباز می باشد. بنابراین، تشخیص گونه *R. cerealis* جدا شده از گندم به کمک این آغازگرها را روشی سریع و دقیق برای شناسایی این گونه معرفی کردند (۱۱). در این پژوهش، با کاربرد آغازگرهای Rc2 F/Rc2 R نتایج مشابهی در شناسایی جدایه های *R. cerealis* بیماریزا در چغندر قند بدست آمد. بنابراین، آغازگرهای مذکور نه تنها برای شناسایی جدایه های *R. cerealis* بدست آمده از گندم، بلکه همچنین برای شناسایی جدایه های این گونه بیماریزا در چغندر قند نیز می توانند بکار برده شوند.

بطور کلی، روش شناسایی مولکولی گونه های ریزوکتونیای بیماریزا در چغندر قند با استفاده از آغازگرهای طراحی شده براساس نواحی حفاظت شده DNA و توالی های rDNA-ITS، روش دقیقی برای شناسایی و تمایز دو گونه *R. solani* و *R. cerealis* جدا شده از چغندر قند بود و نتایج بررسی های اولیه مورفولوژیکی برای تشخیص این گونه ها را تایید نمود.

۵۱ تا ۷۵ درصد از سطح ریشه دارای زخمهای عمیق که در بافتهای داخلی ریشه پیشرفت کرده اند.

۶: ۷۶ تا ۱۰۰ درصد از سطح ریشه دارای پوسیدگی خشک و مرگ اندامهای هوایی گیاه

در نهایت، شاخص بیماری با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{Disease Index (DI)} = \frac{(n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4 + 5n_5 + 6n_6)}{6N} \times 100$$

n_1 : تعداد گیاهان دارای نمره ۱، n_2 : تعداد گیاهان دارای نمره ۲، n_3 : تعداد گیاهان دارای نمره ۳، n_4 : تعداد گیاهان دارای نمره ۴، n_5 : تعداد گیاهان دارای نمره ۵، n_6 : تعداد گیاهان دارای نمره ۶، N: تعداد کل گیاهان

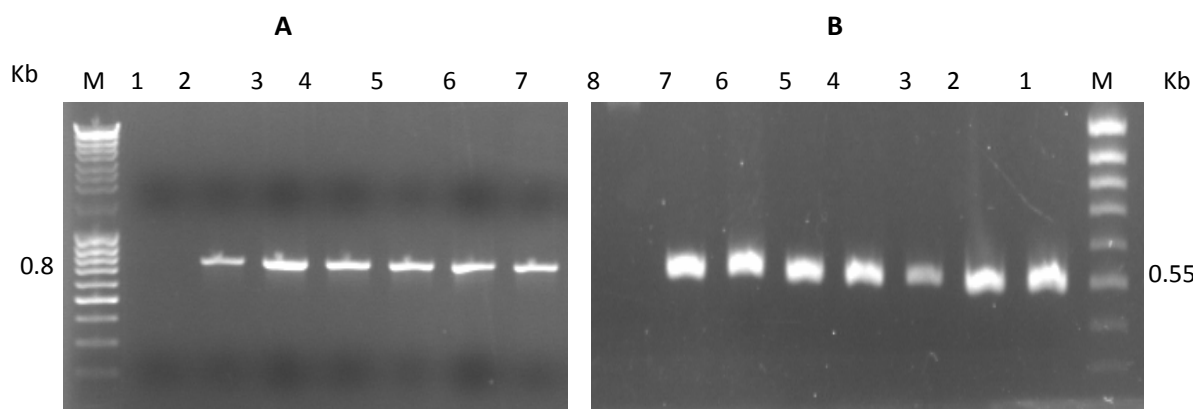
آنالیز آماری داده ها با استفاده از آزمونهای مقایسه ای Kruskal-Wallis تکمیل شده با آزمون Mann-Whitney با استفاده از نرم افزار SPSS 1.12 و در سطح $P=0.05$ انجام گردید. هر یک از جدایه ها از گیاهان مایه زنی شده مجدداً جداسازی گردیدند.

نتایج و بحث

مشخصات مورفولوژیکی

از ۳۶ جدایه بدست آمده از گیاهان چغندر قند در نواحی مختلف کشت این محصول در استان خراسان رضوی، ۳۱ جدایه چند هسته ای و ۵ جدایه دو هسته ای بودند. تعداد هسته در هر سلول میسلیم در جدایه های چند هسته ای از ۴ تا ۱۴ و عرض میسلیم اصلی از ۷ تا ۱۲ میکرومتر متغیر بود. جدایه های دو هسته ای فقط دارای دو هسته در هر سلول میسلیم بودند. در آنها عرض میسلیم اصلی بین ۴ تا ۷ میکرومتر متغیر بود و تولید میسلیم هوایی در محیط کشت PDA مشاهده شد. در تمام جدایه های چند هسته ای، رنگ میسلیم در این محیط کشت در ابتدا سفید بود که بتدریج به رنگ قهوه ای در آمد. تولید سلول های مونیلوئید بشکه ای شکل به ابعاد ۹-۱۷ × ۳۰-۲۰ میکرومتر در جدایه های چند هسته ای مشاهده شد. از ۳۱ جدایه ریزوکتونیای چند هسته ای، ۱۷ جدایه دارای خصوصیات مورفولوژیکی (مورفولوژی کلونی و شکل و سائز اسکروت ها) مشابه زیر گروه AG2-2 IIIB از گونه *R. solani*، ۱۲ جدایه با خصوصیات مشابه AG2-2 IV، و ۲ جدایه دارای خصوصیات مورفولوژیکی شبیه به AG1-IC (۱۴ و ۱۵) بودند.

پرگنه جدایه های دو هسته ای در محیط PDA از جدایه های چند هسته ای متمایز بود. در جدایه های دو هسته ای، پرگنه ابتدا به



شکل ۱- نتایج PCR مربوط به DNA ژنومی جدایه های *R. cerealis* (شماره های ۱ تا ۷ در شکل A)، و *R. solani* (۱ تا ۷ در شکل B) به ترتیب با استفاده از آغازگرهای اختصاصی **RS1/RS4** و **Rc2 F/Rc2 R**. شماره های ۱ و ۷ در شکل A به ترتیب جدایه های CH-1.2 (متعلق به گونه *R. solani*) و Brg- WP-1 (استرین استاندارد گونه *R. cerealis*) هستند. شماره های ۱ و ۸ در شکل B به ترتیب جدایه های C96 (استرین استاندارد گونه *R. solani*) و M-1.4 (متعلق به گونه *R. cerealis*) می باشند. M نشانگر مولکولی سایز باندها می باشد.

محصول PCR با این آنزیم شامل باندهایی به اندازه ۰/۱۲ کیلوباز برای استرین استاندارد AG1-IB و ۰/۶ کیلوباز برای استرین استاندارد AG1-IC و جدایه های F-1.12 و CH-1.4 بودند (شکل A). قطعات برش خورده مربوط به هضم بوسیله *MunI* برای استرین استاندارد AG1-IA به اندازه های ۰/۳۱ و ۲/۰ کیلوباز بودند، در حالیکه استرین های استاندارد AG1-IB و AG1-IC و همچنین دو جدایه متعلق به AG1 بدست آمده در این پژوهش (F-1.12 و CH-1.4) محل برشی برای این آنزیم نداشتند و محصول PCR برش نخورده به سایز ۰/۵۵ کیلوباز در ژل پس از کاربرد *MunI* مشاهده گردید (شکل B).

در مورد هضم با هر یک از آنزیم های *MseI* و *MunI*، باندهای با سایز کمتر از ۰/۵ کیلوباز در نظر گرفته نشدند زیرا این باندها به آسانی در ژل آگارز قابل مشاهده نمی باشند. واکنش PCR-RFLP دوبار با نتایج مشابه تکرار گردید.

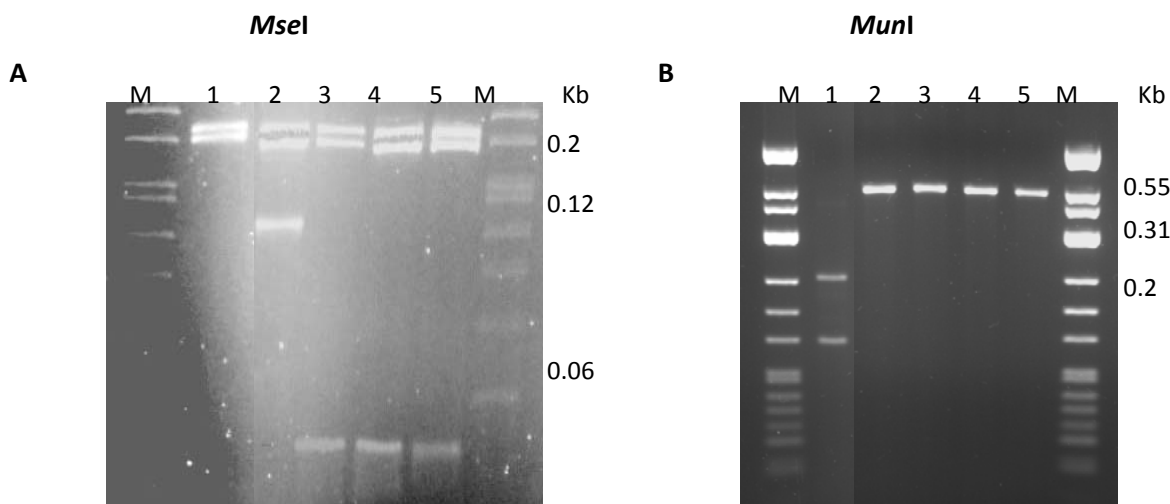
با استفاده از این دو آنزیم محدود کننده، سایز قطعات حاصل از برش ناحیه rDNA-ITS در جدایه های هر یک از زیر گروه های گروه آناستوموزی یک، کاملاً مانند سایز قطعات بدست آمده برای جدایه های این زیر گروه ها در سایر تحقیقات انجام شده بود (۹ و ۱۵). بدین ترتیب، طرح باندی مشابهی برای جدایه های F-1.12 و CH-1.4 حاصل از این پژوهش، و استرین استاندارد زیر گروه AG1-IC با استفاده از آنزیم های برشی *MseI* و *MunI* بدست آمد (شکل ۲). این نتایج نشان دهنده متعلق بودن دو جدایه مذکور به زیر گروه تاکسونومیک AG1-IC و تایید کننده نتایج بررسی مشخصات مورفولوژیکی این جدایه ها می باشد.

بررسی گروه آناستوموزی و آنالیز PCR-RFLP

در آزمایشات تعیین گروه آناستوموزی جدایه های *R. solani* بر روی اسلاید میکروسکوپی مشاهده شد که دو جدایه CH-1.4 و F-1.12 (جدول ۱) قادر به آناستوموز با استرین استاندارد مربوط به AG1-IA، همچنین با استرین های استاندارد AG1-IB و AG1-IC بودند. بدین ترتیب، تعیین زیر گروه آناستوموزی این دو جدایه با استفاده از روش معمول بررسی آناستوموز هیفها بر روی اسلاید امکان پذیر نبود. این نتایج با گزارش آگوشی (۱۲) درباره توان آناستوموز جدایه های سه زیر گروه مربوط به AG1 با یکدیگر مطابقت دارد (۱۴). همچنین اخیراً نتایج مشابهی در مورد آناستوموز جدایه های این سه زیر گروه بدست آمده از گیاهان برنج مشاهده شده است (۱۵).

روش PCR-RFLP توصیف شده توسط گیلوت و همکاران (۹) روشی مفید برای تمایز سریع و دقیق جدایه های هر یک از سه زیر گروه AG1 از یکدیگر بود. در این روش، ابتدا ناحیه rDNA-ITS شامل ITS1 و 5.8S و ITS2 برای جدایه های CH-1.4، F-1.12 و جدایه های استاندارد زیر گروه های AG1-IA و AG1-IB و واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای RS1/RS4 (که در مرحله قبل برای شناسایی جدایه های گونه *R. solani* بکار رفته بودند) همانند سازی گردید. سپس محصول این واکنش با استفاده از دو آنزیم محدود کننده *MseI* و *MunI* هضم گردید.

قطعات برش خورده حاصل از کاربرد آنزیم محدود کننده *MseI* شامل دو باند بزرگتر با سایز مشابه در حدود ۲/۰ کیلوباز برای جدایه های F-1.12 و CH-1.4 و همچنین برای استرین های استاندارد هر سه زیر گروه بودند. باندهای کوچکتر حاصل از هضم



شکل ۲- باندهای بدست آمده در روش PCR-RFLP پس از هضم محصول PCR با استفاده از آنزیم محدود کننده *MseI* (A) و یا *MnlI* (B)، جدایه های مربوط به هر یک از شماره های ذکر شده در بالای هر ژل عبارتند از: ۱ = CSKA (استرین استاندارد زیر گروه AG1-IA)، ۲ = B19 (استرین استاندارد زیر گروه AG1-IB)، و جدایه های AG1-IC شامل: ۱ = CH-1.4، ۲ = F-1.12 و 3 = BV17 (استرین استاندارد زیر گروه AG1-IC). M نشانگر مولکولی سایز باندها است.

استرین استاندارد BrG-WP-1 مربوط به AG-D از قارچ های ریزوکتونیایی دو هسته ای که معرف گونه *R. cerealis* می باشد (۸ و ۱۴) مشاهده گردید.

بررسی بیماریزایی

تمام جدایه های مورد بررسی بر روی گیاهان کامل چغندر قند بیمارزا بودند. گیاهان کنترل که با بذره های ارزن کلونیزه نشده مایه زنی شده بودند، هیچگونه علائمی نشان ندادند. جدایه های *R. solani* متعلق به زیر گروه های AG2-2 IIB و AG2-2 IV و علائم بارز بیماری پوسیدگی خشک را بر روی ریشه و طوقه ایجاد نمودند. این علائم شامل زخم های قهوه ای تیره تا خاکستری رنگ در ناحیه طوقه بود که بتدریج در سطح ریشه توسعه یافته و گاهی اوقات، توسط شیاری احاطه می شد. در برخی موارد، در ناحیه زخم های خشک و تیره رنگ ایجاد شده در سطح ریشه، تولید اسکروت های قارچ عامل بیماری نیز مشاهده می گردید. در این گیاهان، علائم در اندام های هوایی شامل زردی و پژمردگی برگها بود. آنالیز آماری داده های آزمایشات بیماریزایی نشان داد که جدایه های AG2-2 IIB دارای بیشترین شدت بیماریزایی بر روی ریشه و طوقه گیاهان کامل چغندر قند بودند و شاخص بیماری ناشی از جدایه های این زیر گروه، دارای تفاوت معنی داری با شاخص بیماری بدست آمده برای جدایه های AG2-2 IV در این پژوهش بود. جدایه های AG1-IC و *R. cerealis* کمترین بیماریزایی را بر روی ریشه و طوقه گیاهان

بررسی گروه آناستوموزی سایر جدایه های *R. solani* بر روی اسلاید نشان داد که ۲۹ جدایه این گونه بدست آمده از چغندر قند، قادر به آناستوموز با استرین های استاندارد زیر گروه های AG2-2 IIB و AG2-2 IV می باشند. بنابراین، تمایز جدایه های این دو زیر گروه بر اساس تعیین گروه آناستوموزی به روش معمول میکروسکوپی عملی نمی باشد. قابلیت آناستوموز جدایه های دو زیر گروه AG2-2 IIB و AG2-2 IV با یکدیگر و همچنین در برخی موارد با جدایه های AG2-1 توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (۷ و ۱۴). بررسی توان رشد جدایه ها بر روی محیط کشت PDA پس از ۶ روز در دمای ۳۵°C نشان داد که تعداد ۱۷ جدایه که با استرین های استاندارد دو زیر گروه مربوط به AG2-2 قادر به آناستوموز بودند، در دمای ۳۵°C رشد کردند. در حالیکه ۱۲ جدایه فاقد توان رشد در دمای ۳۵°C بودند (نتایج نشان داده نشده اند). در منابع مختلف، جدایه های قادر به آناستوموز با زیر گروه های AG2 که دارای توان رشد در دمای ۳۵°C می باشند بعنوان AG2-2 IIB، و جدایه های فاقد توان رشد در ۳۵°C بعنوان AG2-2 IV شناخته شده اند (۷ و ۱۴). بنابراین، نتایج این پژوهش نشان دهنده وجود ۱۷ جدایه متعلق به AG2-2 IIB و ۱۲ جدایه از زیر گروه AG2-2 IV در بین جدایه های بدست آمده از مزارع چغندر قند استان خراسان رضوی می باشد.

در آزمایشات تعیین گروه آناستوموزی جدایه های دو هسته ای ریزوکتونیا، واکنش آناستوموز تنها بین ریشه رویشی این جدایه ها و

جدول ۳ - نتایج آزمون بیماریزایی جدایه ها بر روی چغندر قند در مرحله گیاهچه و گیاه کامل

جدایه	گروه تاکسونومیکی	DI _{rc}	DI _s
CH-2.3	AG 2-2 IIIB	95.2 a	55.2 b
CH-1.2	AG 2-2 IIIB	93.0 a	42.7c
F-2.5	AG 2-2 IIIB	92.4 a	24.7 d
F-1.6	AG 2-2 IIIB	88.3 a	30.2 d
F-1.5	AG 2-2 IIIB	86.5 ab	17.9 e
F-2.10	AG 2-2 IIIB	81.3 b	18.7 e
M-2.1	AG 2-2 IIIB	78.2 b	21.0 e
F-2.12	AG 2-2 IIIB	73.5 b	9.2 f
M-1.11	AG 2-2 IIIB	72.2 bc	11.8 e
CH-2.2	AG 2-2 IIIB	67.9 c	24.1 d
TH-2.1	AG 2-2 IIIB	67.5 c	6.2 f
M-2.14	AG 2-2 IIIB	66.2 c	7.4 f
F-1.9	AG 2-2 IIIB	58.9 cd	39.3 c
CH-1.3	AG 2-2 IIIB	58.4 cd	4.1 f
CH-2.7	AG 2-2 IIIB	57.2 d	32.2 d
TH-1.11	AG 2-2 IIIB	55.9 d	7.1 f
TH-2.8	AG 2-2 IIIB	55.0 d	16.3 e
M-2.7	AG 2-2 IV	38.2 e	41.0 c
F-1.4	AG 2-2 IV	36.1 e	18.2 e
F-2.1	AG 2-2 IV	33.9 e	10.5 ef
TH-1.5	AG 2-2 IV	33.5 e	16.8 e
M-2.2	AG 2-2 IV	33.2 e	6.8 f
M-1.6	AG 2-2 IV	29.8 e	10.3 ef
M-1.3	AG 2-2 IV	26.2 f	2.2 f
TH-1.4	AG 2-2 IV	24.8 f	57.4 ab
CH-1.1	AG 2-2 IV	24.0 f	55.4 b
F-2.2	AG 2-2 IV	23.1 f	57.8 b
TH-2.4	AG 2-2 IV	22.7 f	32.5 cd
TH-2.5	AG 2-2 IV	22.3 f	31.7 d
CH-1.4	AG 1-IC	9.1 g	3.9 f
F-1.12	AG 1-IC	7.4 g	0.0 f
M-1.4	<i>R. cerealis</i>	5.2 g	92.4 a
TH-1.8	<i>R. cerealis</i>	4.5 g	87.3 a
CH-2.1	<i>R. cerealis</i>	4.0 g	97.2 a
TH-1.7	<i>R. cerealis</i>	2.5 g	55.7 b
CH-2.9	<i>R. cerealis</i>	0.8 g	96.4 a

DI_{rc}: بیماری بر روی ریشه و طوقه در گیاهان کامل

DI_s: شاخص بیماری در گیاهچه ها

بطور کلی تنوع زیادی در توان بیماریزایی جدایه‌های مربوط به زیر گروه‌های مختلف AG1 در گیاهان گوناگون به اثبات رسیده

کامل نشان دادند (جدول ۳). بطور کلی، جدایه‌های AG2-2 IIIB و AG2-2 IV بعنوان مهمترین گروه‌های تاکسونومیکی قارچ خاکزاد *R. solani* بیماریزا در ریشه و طوقه چغندر قند در نواحی مختلف دنیا شناخته شده اند (۱۴، ۵، ۲ و ۱۶). بررسی‌های انجام شده توسط سایر محققان نشانگر بیماریزایی بیشتر جدایه‌های AG2-2 IIIB در مقایسه با AG2-2 IV بر روی ریشه و طوقه چغندر قند است (۷) که دارای مطابقت با یافته‌های حاصل از این پژوهش می‌باشد.

جدایه های *R. solani* متعلق به AG1-IC تاکنون از گیاهان چغندر قند و همچنین از خاک مزارع کشت این گیاه جداسازی شده اند (۸ و ۱۴). اما در مورد بیماریزایی جدایه‌های متعلق به این زیر گروه تاکسونومیکی در گیاهچه و یا گیاه کامل چغندر قند گزارشی داده نشده است. در این پژوهش، بیماریزایی خفیف جدایه‌های این زیر گروه بر روی ریشه و طوقه گیاهان چغندر قند مشاهده شد.

بررسی بیماریزایی جدایه ها بر روی چغندر قند در مرحله گیاهچه ای نشان داد که جدایه‌های *R. cerealis* از بیشترین بیماریزایی بر روی گیاهچه ها برخوردارند. جدایه‌های زیر گروه‌های AG2-2 IIIB و AG2-2 IV از گونه *R. solani* نیز بر روی گیاهچه ها بیماریزا بودند اما بیماریزایی اغلب جدایه‌های مربوط به این دو زیر گروه بطور معنی داری کمتر از بیماریزایی جدایه‌های *R. cerealis* در این مرحله از رشد گیاه بود. شاخص بیماری بدست آمده برای دو جدایه CH-1.4 و F-1.12 متعلق به AG1-IC به ترتیب برابر با ۳/۹ و صفر بود که از نظر آماری فاقد اختلاف معنی دار با یکدیگر بودند (جدول ۳). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که این دو جدایه فاقد توان بیماریزایی در گیاهچه‌های چغندر قند می‌باشند. برای تعمیم این نتیجه به زیر گروه AG1-IC بررسی‌های تکمیلی با بکار بردن تعداد بیشتری جدایه از این زیر گروه (بدست آمده از چغندر قند) ضروری به نظر می‌رسد. تاکنون، ایجاد مرگ گیاهچه در چغندر قند در اثر گونه *R. cerealis* و همچنین گروه‌های تاکسونومیکی AG2-2 IIIB ، AG4 HGII ، AG5 و همچنین AG1 (بدون ذکر زیر گروه آناتوموزی) به اثبات رسیده است (۱، ۱۰، ۱۳ و ۱۴).

در بررسی انجام شده توسط مومنی و همکاران بر روی سه جدایه‌های متعلق به AG1، این جدایه ها بعنوان عامل مرگ گیاهچه و فاقد توان ایجاد پوسیدگی ریشه و طوقه چغندر قند معرفی شدند. اما آنها زیر گروه تاکسونومیکی جدایه‌های مورد بررسی خود را شناسایی نکرده بودند (۱). در این پژوهش، نتایج آزمایشات مورفولوژیکی و مولکولی انجام شده نشان داد که جدایه‌های AG1 بدست آمده از گیاهان بالغ چغندر قند مزارع استان خراسان رضوی مربوط به زیر گروه IC بوده و فاقد توان بیماریزایی در گیاهچه‌های چغندر قند می‌باشند. عدم مطابقت نتایج حاصل از این پژوهش با یافته‌های مومنی و همکاران می‌تواند بیانگر احتمال متعلق بودن جدایه‌های مورد بررسی آنان به سایر زیر گروه‌های AG1 باشد.

است (۸ و ۱۵). بنابراین با توجه به اینکه تاکسون بیماریزایی جدایه های مربوط به سه زیر گروه IA، IB و IC از این گروه آناستوموزی در مراحل مختلف رشد گیاه چغندر قند مورد بررسی قرار نگرفته است، این مورد می تواند در بررسی های آینده مدنظر قرار گیرد.

منابع

- ۱- مومنی ح.، فلاحتی رستگار م.، و جعفرپور ب. ۱۳۸۵. تعیین گروه های ریشه پیوند جدایه های بیماریزای قارچ ریزوکتونیا سولانی در مزارع چغندر قند استان خراسان. مجله علوم و صنایع کشاورزی ۲۰ (۱): ۴۷-۵۶.
- 2- Buhre C., Kluth C., Burkcky K., Marlander B., and Varrelmann M. 2009. Integrated control of root and crown rot in sugar beet: Combined effects of cultivar, crop rotation, and soil tillage. *Plant Dis.* 93:155-161.
- 3- Buhre C., Wagner G., Kluth S., Kluth C., Apfelbeck R., and Varrelmann M. 2007. Resistance of sugar beet varieties as basis for the integrated control of root and crown rot (*Rhizoctonia solani*). *Zuckerindus.* 132:50-55.
- 4- Buttner G., Ithurrart M.E.F., and Buddemeyer J. 2002. Root and crown rot *Rhizoctonia solani*-distribution, economic importance and concepts of integrated control. *Zuckerindus.* 127:856-866.
- 5- Buttner G., Pfaller B., and Marlander B. 2004. Greenhouse and field techniques for testing sugar beet for resistance to *Rhizoctonia* root and crown rot. *Plant Breed.* 123:158-166.
- 6- Carling D.E. 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis. Pages 37-47 in: *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. B. Sneh, S. Jabaji-Hare, S. Neate, and G. Dijst, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- 7- Engelkes C.A., and Windels C.E. 1996. Susceptibility of sugar beet and beans to *Rhizoctonia solani* AG2-2 IIIB and AG2-2 IV. *Plant Dis.* 80:1413-1417.
- 8- González García1 V., Portal Onco M.A., and Rubio Susan V. 2006. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish J. Agric. Res.* 4:55-79.
- 9- Guillemaut C., Herman V.E., Camporota P., Alabouvette C., Molard M.R., and Steinberg C. 2003. Typing of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by restriction analysis of ribosomal DNA. *Can. J. Microbiol.* 49:556-568.
- 10- Nagendran S., Hammerschmidt R., and McGrath J.M. 2009. Identification of beet germplasm EL51 as a source of resistance to post-emergence *Rhizoctonia* damping-off. *Eur. J. Plant Pathol.* 123:461-471.
- 11- Nicholson P., and Parry D.W. 1996. Development and use of a PCR assay to detect *Rhizoctonia cerealis*, the cause of sharp eyespot in wheat. *Plant Pathol.* 45:872-883.
- 12- Ogoshi A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:125-143.
- 13- Osullivan E., and Kavanagh J.A. 1991. Characteristics and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia* spp. associated with damping-off of sugar beet. *Plant Pathol.* 40:128-135.
- 14- Sneh B., Burpee L., and Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. Pages: 69-88.
- 15- Taheri P., Gnanamanickam S., and Höfte M. 2007. Characterization, genetic structure, and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with rice sheath diseases. *Phytopathology* 97:373-383.
- 16- Weiland J.J., and Sundsbak J.L. 2000. differentiation and detection of sugar beet fungal pathogens using PCR amplification of actin coding sequences and the ITS region of the rRNA gene. *Plant Dis.* 84:475-482.
- 17- Zolan M., and Pukkila P. 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol. Cell. Biol.* 6:195-200.