

DOI: 10.22092/BOTANY.2020.127939.1175

تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *Athelia rolfsii* در شمال کشور*

دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۷ / پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۲۰

زهرا مهری✉: دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران (zmehrii@gmail.com)
 سید اکبر خداپرست: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
 علی اعلمی: دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
 صدیقه موسی‌نژاد: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده

گونه *Athelia rolfsii*، یک قارچ بیماری‌زای خاک‌زی با پراکنش جهانی است که به عنوان عامل بیماری پوسیدگی سفید ریشه در بسیاری از گیاهان زراعی و باغی شناخته می‌شود. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی این قارچ، تعداد ۹۰ جدایه، از سه استان گیلان، مازندران و گلستان جمع‌آوری و جداسازی شدند و سپس با استفاده از گروه‌های سازگار میسلومی (MCG) و دو نشانگر مولکولی ISSR و SCoT مورد مطالعه قرار گرفتند. در این بررسی، نه گروه سازگار میسلومی شناسایی شد. گروه سازگار میسلومی MCG3 (با ۳۶ عضو) دارای بیش‌ترین فراوانی از نظر تعداد جدایه و متنوع‌ترین گروه از لحاظ دامنه میزبانی (با آلودگی هشت گونه گیاهی میزبان) بود. همچنین، این گروه تنها گروهی بود که از نمونه‌های هر سه استان جداسازی شده است. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای آغازگرهای ISSR، جدایه‌ها را در سطح تشابه ۵۷٪ به چهار گروه تقسیم کرد. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای آغازگرهای SCoT، جدایه‌ها را در سطح تشابه ۵۹٪ در سه گروه قرار داد. نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نیز این گروه‌بندی‌ها را تایید کرد. براساس نتایج هر دو نشانگر، جدایه‌های استان گلستان (به جز دو جدایه) از جدایه‌های گیلان و مازندران تفکیک شدند. قرار گرفتن این دو جدایه در یک کلاستر جداگانه در کنار جدایه‌های گیلان و مازندران، با نتایج حاصل از گروه‌بندی MCG مطابقت داشت. نتایج این بررسی نشان داد که این دو نوع نشانگر، توانایی تفکیک جدایه‌ها را براساس مناطق جغرافیایی دارا می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی سفید، نشانگر مولکولی، ISSR، MCG، SCoT

Genetic diversity of *Athelia rolfsii* populations in the north of Iran

Received: 07.01.2020 / Accepted: 08.04.2020

Zahra Mehri✉: PhD Student, Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Seyed Akbar Khodaparast: Associate Prof., Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Ali Aalami: Associate Prof., Department of Biotechnology, College of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Sedigheh Mousanejad: Assistant Prof., Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Summary

Athelia rolfsii is a globally distributed soil-borne fungal pathogen causing root rot disease in many crops. In order to study the genetic diversity of this fungus, 90 isolates were collected and isolated from Guilan, Mazandaran and Golestan provinces (North of Iran). Genetic diversity of these isolates was investigated using Mycelial Compatibility Groups tests (MCG) and ISSR and SCoT markers. In this study, nine MCG groups were identified. The MCG3 group (with 36 members) was the most frequent in terms of the number of isolates and the most diverse group in terms of host domain (due to infection of eight host species). This group (MCG3) was also the only group that isolated from specimens in all three provinces. The dendrogram derived from cluster analysis of ISSR primers divided the isolates into four groups at a similarity level of 57%. The dendrogram obtained from cluster analysis of SCoT primers placed the isolates in a similarity level of 59% in three groups. Based on the results of both markers, Golestan isolates (except two isolates) were separated from Guilan and Mazandaran isolates. However, the presence of these two isolates in a separate cluster along with the isolates of Guilan and Mazandaran provinces was consistent with the results of MCG grouping. The results of this study showed that, these two types of markers are useful to differentiate isolates based on geographic regions.

Keywords: ISSR, MCG, molecular marker, SCoT, white rot

* مستخرج از رساله دکترای نگارنده نخست به راهنمایی دکتر سید اکبر خداپرست ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

مقدمه

(Kausrud & Schumacher 2003, George *et al.* 2009, Wang *et al.* 2012). از مزایای عمده این روش، سادگی، تکرارپذیری و تنوع بالای آن می‌باشد (Zhang *et al.* 2007). از آنجا که یک سیستم نشانگر مولکولی معمولاً منطقه خاصی از ژنوم را مورد هدف قرار می‌دهد، ممکن است سطح تنوع ژنتیکی با استفاده از یک سیستم نشانگر به خوبی مشخص نباشد. SCoT (Start Codon Targeted) یک سیستم نشانگر مولکولی ساده و جدید است که می‌تواند تنوع یا چندشکلی بیش‌تری را در مقایسه با چندین نشانگر مولکولی دیگر شناسایی کند (Collard & Mackill 2009, Xiong *et al.* 2011). زیونگ و همکاران (Xiong *et al.* 2009) اظهار داشتند که نشانگر SCoT می‌تواند به عنوان یک مکمل مؤثر برای ISSR و RAPD مورد استفاده قرار گیرد.

تاکنون نشانگرهای مولکولی AFLP، RFLP، RAPD و ISSR جهت تعیین تنوع ژنتیکی این قارچ مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Harlton *et al.* 1995, Okabe *et al.* 1998, Punja & Sun 2001, Gawande *et al.* 2013, Jebaraj *et al.* 2017). اما نشانگر SCoT در این قارچ، تاکنون استفاده نشده است. در مطالعه حاضر، تنوع ژنتیکی جدایه‌های *A. rolfsii* از سه استان گیلان، مازندران و گلستان با استفاده از MCG و دو نشانگر مولکولی ISSR و SCoT مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

- نمونه‌برداری و خالص‌سازی قارچ

گیاهان دارای علائم شاخص پوسیدگی سفید ریشه ناشی از قارچ *A. rolfsii* شامل پوسیدگی‌های طوقه و ریشه، شانکر ساقه و بوته‌میری طی فصول زراعی سال‌های ۹۵-۱۳۹۰ از سه استان گیلان، مازندران و گلستان جمع‌آوری شدند. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است. جهت جداسازی قارچ، با تیغ اسکالپل سترون از مرز نواحی سالم و آلوده قطعات کوچکی در حد چند میلی‌متر جدا و زیر جریان ملایم آب شسته شدند. این قطعات به مدت یک دقیقه در محلول ۰/۵٪ هیپوکلریت سدیم تجاری قرار گرفتند. سپس سه بار و هر بار به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. نمونه‌های ضدعفونی شده با کاغذ صافی سترون خشک و با پنس سترون به تشتک پتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز-آگار (Potato Dextrose Agar: PDA) منتقل شدند. تشتک‌های پتری به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای 27 ± 1 درجه سلسیوس تحت شرایط تاریکی نگهداری شدند. بعد از

قارچ *Athelia rolfsii* (Curzi) C.C. Tu & Kimber (syn.: *Sclerotium rolfsii* Sacc.) یک بیمارگر با پراکنش جهانی می‌باشد که فاقد هر گونه مرحله کنیدیومی است. این قارچ دامنه میزبانی وسیعی دارد، به طوری که بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی مختلف را آلوده می‌کند (Harlton *et al.* 1995, Okabe *et al.* 2000, Cilliers *et al.* 1998). کنترل بیماری پوسیدگی اسکروتیومی ریشه به دلیل رشد زیاد میسلیوم، بقا در خاک، تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ و دامنه میزبانی وسیع آن مشکل می‌باشد. شناخت تنوع ژنتیکی این قارچ و توزیع آن در مناطق آلوده به عنوان یک بیمارگر با گسترش جهانی برای مدیریت بیماری پوسیدگی اسکروتیومی ریشه مفید خواهد بود. گروه‌های سازگار میسلیومی (Mycelial Compatibility Groups) به طور گسترده جهت ارزیابی غیرمستقیم تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های قارچی گیاهان استفاده شده (Leslie 1993) و نقش مهمی در تعریف جمعیت‌های قارچی و تسهیل تبادلات ژنتیکی ایفا می‌کنند (به ویژه در رابطه با قارچ‌هایی که تولید مثل جنسی در آن‌ها تاثیر کمی بر چرخه بیماری دارد). ناسازگاری میسلیومی منجر به ایجاد استخرهای ژنی جداگانه می‌شود که ممکن است از لحاظ صفات اکولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیماری‌زایی متفاوت باشند (Remesal 2012). جهت بررسی تنوع ژنتیکی در این قارچ علاوه بر MCG، روش‌های مختلفی مبتنی بر تکنیک‌های انگشت‌نگاری مولکولی و تجزیه و تحلیل توالی استفاده شده است (Harlton *et al.* 1995, Nalim *et al.* 1995, Cilliers *et al.* 2000, Punja & Sun 2001, Sarma *et al.* 2002, Remesal *et al.* 2012, Xie *et al.* 2014, Gawande *et al.* 2013, Jebaraj *et al.* 2017). نشانگرهای مولکولی برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی نسبت به طبقه‌بندی‌های سنتی براساس صفات ریخت‌شناختی و ایزوآنزیم‌ها از لحاظ عدم وابستگی به پارامترهای محیطی و سطح بالای چندشکلی قابل ردیابی، برتری دارند (Zervakis *et al.* 2001). ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) یک روش انگشت‌نگاری DNA است که در آن، ناحیه مجاور دو ریزماهوره یکسان که در جهت مخالف هم قرار دارند تکثیر می‌شود (Weising *et al.* 1994). ریزماهوره‌ها یا توالی‌های تکراری ساده در نواحی کدشونده و غیرکدشونده ژنوم وجود دارند، ولی در قسمت‌های غیرکدشونده بیش‌تر هستند (Katti *et al.* 2001). نشانگرهای مولکولی ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت به طور گسترده در بسیاری از موجودات مورد استفاده قرار گرفته‌اند

یک جدایه آزمایشگر در مرکز و شش جدایه به فاصله مساوی از یکدیگر در اطراف قرار گرفتند. از این شش جدایه، یک جدایه به عنوان شاهد مثبت (تکرار جدایه آزمایشگر) و پنج جدایه ناشناخته بودند. هر تلاقی بین جدایه‌ها در دو تکرار انجام شد. تست‌های پتری در اتاقک رشد تاریک تحت دمای 27 ± 1 درجه سلسیوس قرار گرفتند. بعد از شش تا هفت روز، نتایج تلاقی‌های انجام شده به صورت ماکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. سازگاری یا ناسازگاری رویشی براساس وجود یا عدم وجود ناحیه ممانعت از رشد در محل برخورد پرگنه‌های دو جدایه ارزیابی شد (Mehri et al. 2013).

خالص‌سازی جدایه‌ها به روش نوک ریشه، سختینه‌های بالغ قارچ از سطح محیط‌کشت جمع‌آوری و در زیر هود میکروبیولوژی به مدت حدود دو ساعت خشک شدند و پس از جمع‌آوری درون میکروتیوب در دمای -20 درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. - گروه‌های سازگار میسلیومی

برای تعیین سازگاری میسلیومی، ابتدا جدایه‌ها به محیط‌کشت PDA منتقل شدند. سپس از حاشیه در حال رشد پرگنه قارچ، قرص‌های میسلیومی از هر جدایه مورد نظر برداشته شدند و طبق روش جوهاسا و همکاران (Juhásová et al. 2004) یک جدایه انتخاب (جدایه آزمایشگر) و سازگاری سایر جدایه‌های منطقه با آن بررسی گردید، به طوری که برای هر تستک پتری،

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *Athelia rolfsii* مورد استفاده در این پژوهش

ردیف	کد جدایه	نام میزبان	محل جمع‌آوری	ردیف	کد جدایه	نام میزبان	محل جمع‌آوری	ردیف	کد جدایه	نام میزبان	محل جمع‌آوری
۱	G1B1	لوبیا	گیلان: رشت	۳۱	O1T8	گوجه‌فرنگی	گرگان: دلند	۶۱	M1B3	لوبیا	مازندران: بابل
۲	G2P1	فلفل	گیلان: رشت	۳۲	O2T8	گوجه‌فرنگی	گرگان: دلند	۶۲	M2B3	لوبیا	مازندران: بابل
۳	G3T3	گوجه‌فرنگی	گیلان: رشت	۳۳	O3T8	گوجه‌فرنگی	گرگان: دلند	۶۳	M3B3	لوبیا	مازندران: بابل
۴	G4B3	لوبیا	گیلان: رشت	۳۴	O4T7	گوجه‌فرنگی	گرگان: دلند	۶۴	M4B3	لوبیا	مازندران: بابل
۵	G5P1	فلفل	گیلان: رشت	۳۵	O5T7	گوجه‌فرنگی	گرگان: دلند	۶۵	M5B3	لوبیا	مازندران: بابل
۶	G6E3	بادمجان	گیلان: لاهیجان	۳۶	O6T8	گوجه‌فرنگی	گرگان: دلند	۶۶	M6B3	لوبیا	مازندران: بابل
۷	G7B3	لوبیا	گیلان: لاهیجان	۳۷	O7T8	گوجه‌فرنگی	گرگان: دلند	۶۷	M7B3	لوبیا	مازندران: بابل
۸	G8B4	لوبیا	گیلان: رشت	۳۸	O8T7	گوجه‌فرنگی	گرگان: دلند	۶۸	M8B3	لوبیا	مازندران: بابل
۹	G9B1	لوبیا	گیلان: رشت	۳۹	O9T8	گوجه‌فرنگی	گرگان: دلند	۶۹	M9B3	لوبیا	مازندران: بابل
۱۰	G10W1	تاج‌خروس وحشی	گیلان: آستانه	۴۰	O10W7	علف‌هرز زنگوله	گرگان: دلند	۷۰	M10B3	لوبیا	مازندران: بابل
۱۱	G11B1	لوبیا	گیلان: کوچصفهان	۴۱	O11T7	گوجه‌فرنگی	گرگان: دلند	۷۱	M11B3	لوبیا	مازندران: بابل
۱۲	G12P1	فلفل	گیلان: فومن	۴۲	O12T7	گوجه‌فرنگی	گرگان: دلند	۷۲	M12B3	لوبیا	مازندران: بابل
۱۳	G13P1	فلفل	گیلان: فومن	۴۳	O13T7	گوجه‌فرنگی	گرگان: دلند	۷۳	M13B3	لوبیا	مازندران: بابل
۱۴	G14P1	فلفل	گیلان: فومن	۴۴	O14T7	گوجه‌فرنگی	گرگان: دلند	۷۴	M14B3	لوبیا	مازندران: بابل

جدول ۱ (ادامه)

مازندران: بابل	لوبیا	M15B3	۷۵	گرگان: دلند	گوجه‌فرنگی	O15T7	۴۵	گیلان: فومن	G15B1	۱۵
مازندران: بابل	لوبیا	M16B3	۷۶	گرگان: دلند	گوجه‌فرنگی	O16T7	۴۶	گیلان: فومن	G16B1	۱۶
مازندران: رامسر	لفل	M17P3	۷۷	گرگان: دلند	گوجه‌فرنگی	O17T7	۴۷	گیلان: فومن	G17P5	۱۷
مازندران: رامسر	لفل	M18P3	۷۸	گرگان: دلند	علف‌هرز سلمه	O18W7	۴۸	گیلان: فومن	G18P3	۱۸
مازندران: رامسر	علف‌هرز فرفیون	M19W3	۷۹	گرگان: دلند	گوجه‌فرنگی	O19T8	۴۹	گیلان: رشت	G19B1	۱۹
مازندران: کتری	گوجه‌فرنگی	M20T3	۸۰	گرگان: مینودشت	بادام‌زمینی	O20G3	۵۰	گیلان: لشت‌نشاء	G20G3	۲۰
مازندران: کتری	گوجه‌فرنگی	M21T3	۸۱	گرگان: سنگستان	آفتابگردان	O21F3	۵۱	گیلان: لشت‌نشاء	G21G1	۲۱
مازندران: کتری	گوجه‌فرنگی	M22T3	۸۲	گرگان: سنگستان	آفتابگردان	O22F7	۵۲	گیلان: لشت‌نشاء	G22G3	۲۲
مازندران: کتری	گوجه‌فرنگی	M23T3	۸۳	گرگان: سنگستان	آفتابگردان	O23F7	۵۳	گیلان: لشت‌نشاء	G23G3	۲۳
مازندران: کتری	گوجه‌فرنگی	M24T3	۸۴	گرگان: سنگستان	آفتابگردان	O24F7	۵۴	گیلان: آستانه	G24S3	۲۴
مازندران: رامسر	لفل	M25P1	۸۵	گرگان: سنگستان	آفتابگردان	O25F8	۵۵	گیلان: رشت	G25O9	۲۵
مازندران: رامسر	لفل	M26P1	۸۶	گرگان: سنگستان	آفتابگردان	O26F8	۵۶	گیلان: رشت	G26B2	۲۶
مازندران: رامسر	لوبیا	M27B1	۸۷	گرگان: سنگستان	گوجه‌فرنگی	O27T7	۵۷	گیلان: شفت	G27T1	۲۷
مازندران: رامسر	گوجه‌فرنگی	M28T1	۸۸	گرگان: سنگستان	گوجه‌فرنگی	O28T8	۵۸	گیلان: لنگرود	G28B6	۲۸
مازندران: رامسر	گوجه‌فرنگی	M29T1	۸۹	گرگان: سنگستان	گوجه‌فرنگی	O29T8	۵۹	گیلان: رشت	G29H4	۲۹
مازندران: رامسر	لوبیا	M30B1	۹۰	گرگان: سنگستان	تاج‌خروس وحشی	O30W8	۶۰	گیلان: رشت	G30H3	۳۰

- استخراج DNA

محتویات میکروتیوب به مدت ۱۲-۱۰ ثانیه توسط دستگاه ورتکس هم زده شد. این مرحله دو بار تکرار شد. ماده چلکس و بقایای دیواره و محتویات سلولی با سانتریفیوژ در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و ۱۴۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شدند. محلول لایه فوقانی که حاوی DNA استخراج شده بود، به میکروتیوب‌های جدید منتقل و تا انجام PCR تکثیر DNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

- بررسی‌های ISSR: PCR و SCoT: PCR

برای استخراج DNA ژنومی از روش Chelex استفاده شد (Hirata & Takamatsu 1996). به این ترتیب که با سوزن سترون مقدار کمی ریس (یک برداشت با نوک سوزن) از پرگنه جوان و در حال رشد هر یک از جدایه‌های کشت شده روی محیط‌کشت PDA برداشته و به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری سترون حاوی ۱۵۰ میکرولیتر محلول چلکس ۵٪ منتقل شد. میکروتیوب‌ها به مدت حداقل دو ساعت در دمای ۵۶ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس به مدت هشت دقیقه در آب در حال جوشیدن (۱۰۰ درجه سلسیوس) قرار گرفته و پس از آن

استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc Ver. 2.02 به روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد انجام شد (Rohlf 1998). همچنین، برای مشاهده فواصل بین جدایه‌ها به صورت دو بعدی، آنالیز تجزیه به مختصات اصلی PCA به عنوان مکمل روش خوشه‌بندی انجام شد. محتویات اطلاعات هر نشانگر تحت عنوان PIC (Polymorphic Information Content) در نظر گرفته شد که قدرت تفکیک یک نشانگر را در جمعیت مورد مطالعه نشان می‌دهد. به منظور به دست آوردن PIC برای هر آغازگر از رابطه $PIC=2(f_i)(1-f_i)$ استفاده شد که f_i فراوانی وجود باند و $1-f_i$ فراوانی عدم وجود باند در هر جایگاه است. با میانگین‌گیری از مقادیر PIC به دست آمده برای تمامی جایگاه‌های یک آغازگر، PIC آن آغازگر به دست آمد (Roldan-Ruiz et al. 2000).

نتیجه

- جداسازی بیمارگر و تعیین گروه‌های سازگار میسلیمی در نمونه‌برداری از مزارع مختلف سه استان گیلان، گلستان و مازندران در مجموع، ۹۰ جدایه به دست آمد و نه گروه سازگار میسلیمی به اسامی MCG1 تا MCG9 در جمعیت‌های مورد مطالعه قارچ تشخیص داده شد. بیست جدایه در MCG1، ۳۶ جدایه در MCG3، دو جدایه در MCG4، ۱۶ جدایه در MCG7 و ۱۲ جدایه در MCG8 قرار گرفتند و گروه‌های سازگار میسلیمی ۲، ۵، ۶ و ۹ هر کدام یک عضو داشتند. گروه سازگار میسلیمی MCG3 (با ۳۶ عضو) دارای بیش‌ترین فراوانی از نظر تعداد جدایه و متنوع‌ترین گروه از لحاظ دامنه میزبانی (با آلودگی هشت گونه گیاهی میزبان) بود. همچنین این گروه، تنها گروه دارای جدایه‌هایی از نمونه‌های هر سه استان مذکور بود.

- تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از ISSR

یازده آغازگر استفاده شده در مجموع، ۱۸۴ باند ایجاد کردند که از بین آن‌ها، ۱۵۳ باند چندشکل بودند. بخشی از الگوی باندهای حاصل از آغازگر ISSR1 در شکل ۱ نشان داده شده است. نشانگرهای ISSR2 و ISSR10 با ۰/۱۵ و ۰/۳۶ به ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین محتوای اطلاعات چندشکلی را داشتند (جدول ۲). دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای آغازگرهای ISSR، جدایه‌ها را در سطح تشابه ۵۷٪ در چهار گروه (I-IV) قرار داد. گروه نخست، شامل ۳۰ جدایه از مازندران، ۲۸ جدایه از گیلان و دو جدایه از گلستان بود. دو جدایه G17P5 و G28B6 از گیلان، هر کدام در یک گروه جداگانه (گروه دو و سه) قرار گرفتند. گروه چهارم، تمام جدایه‌های گلستان (به جز دو جدایه) را دربر گرفت

از بین ۱۵ آغازگر ISSR که مورد بررسی اولیه قرار گرفتند، ۱۱ آغازگر (جدول ۲) از لحاظ تعداد، تنوع باندی و تکرارپذیری انتخاب شدند و برای تکثیر کلیه جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

برای تکثیر نواحی ISSR، واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر برای هر جدایه شامل ۱۰ میکرولیتر Master mix (Ampliqon دانمارک)، یک میکرولیتر از هر آغازگر، ۶ میکرولیتر آب دیونیزه و ۲ میکرولیتر از DNA نمونه انجام شد. شرایط PCR براساس روش ژائو و همکاران (Zhao et al. 2013) با اندکی تغییر به صورت زیر تنظیم شد:

تکثیر قطعات DNA جدایه‌های مورد مطالعه پس از تک‌رشته کردن DNA الگو با انجام عمل واسرشته‌سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵-۴۳ درجه سلسیوس (بسته به نوع آغازگر) به مدت ۴۵ ثانیه، بسط آغازگرها در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد.

برای انجام SCoT، از بین هشت آغازگر، چهار آغازگر (جدول ۲) که باندهای واضح و تکرارپذیری ایجاد می‌کردند، انتخاب و برای تکثیر کلیه جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر برای هر جدایه شامل ۱۰ میکرولیتر Master mix (Ampliqon دانمارک)، یک میکرولیتر از هر آغازگر، ۶ میکرولیتر آب دیونیزه و ۲ میکرولیتر از DNA در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی به صورت واسرشته‌سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۷-۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، بسط آغازگرها در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. مقدار ۵ میکرولیتر از محصول واکنش PCR روی ژل آگارز با غلظت ۲٪ برای تعیین وجود باندهای تکثیر شده، الکتروفورز شدند. عملیات الکتروفورز به مدت دو ساعت در ولتاژ ۹۰ ولت انجام شد و سپس نمونه‌ها روی ژل با استفاده از دستگاه ژل داک عکس‌برداری شدند.

- تجزیه و تحلیل داده‌ها

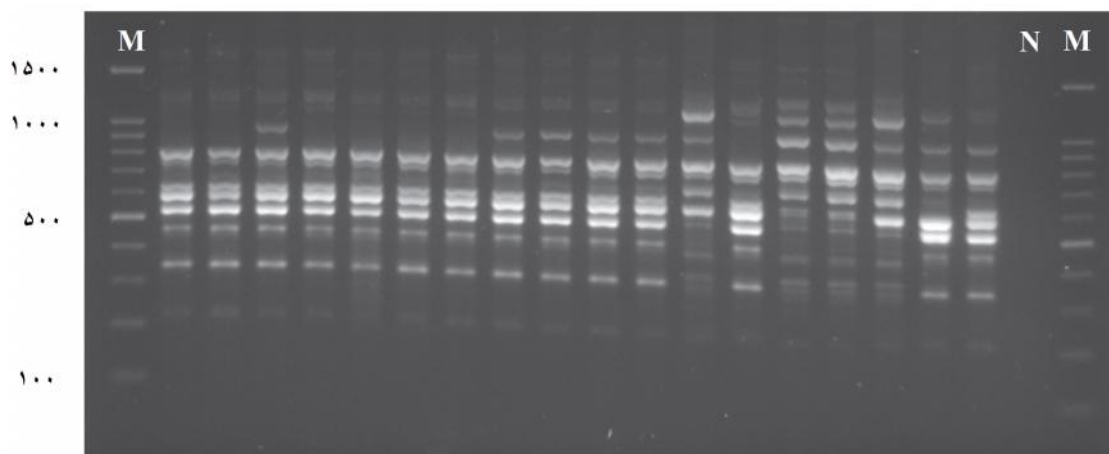
در تفسیر ژل، جدایه‌ها براساس وجود (۱) یا عدم وجود باند (۰) امتیازدهی شدند. هر باند به عنوان یک لوکوس با دو آلل تناوبی در نظر گرفته شد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی با

(شکل ۲). پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نیز UPGMA قرار گرفتند (شکل ۳). این مطلب را تایید کرد و جدایه‌ها در چهار گروه مشابه گروه‌های

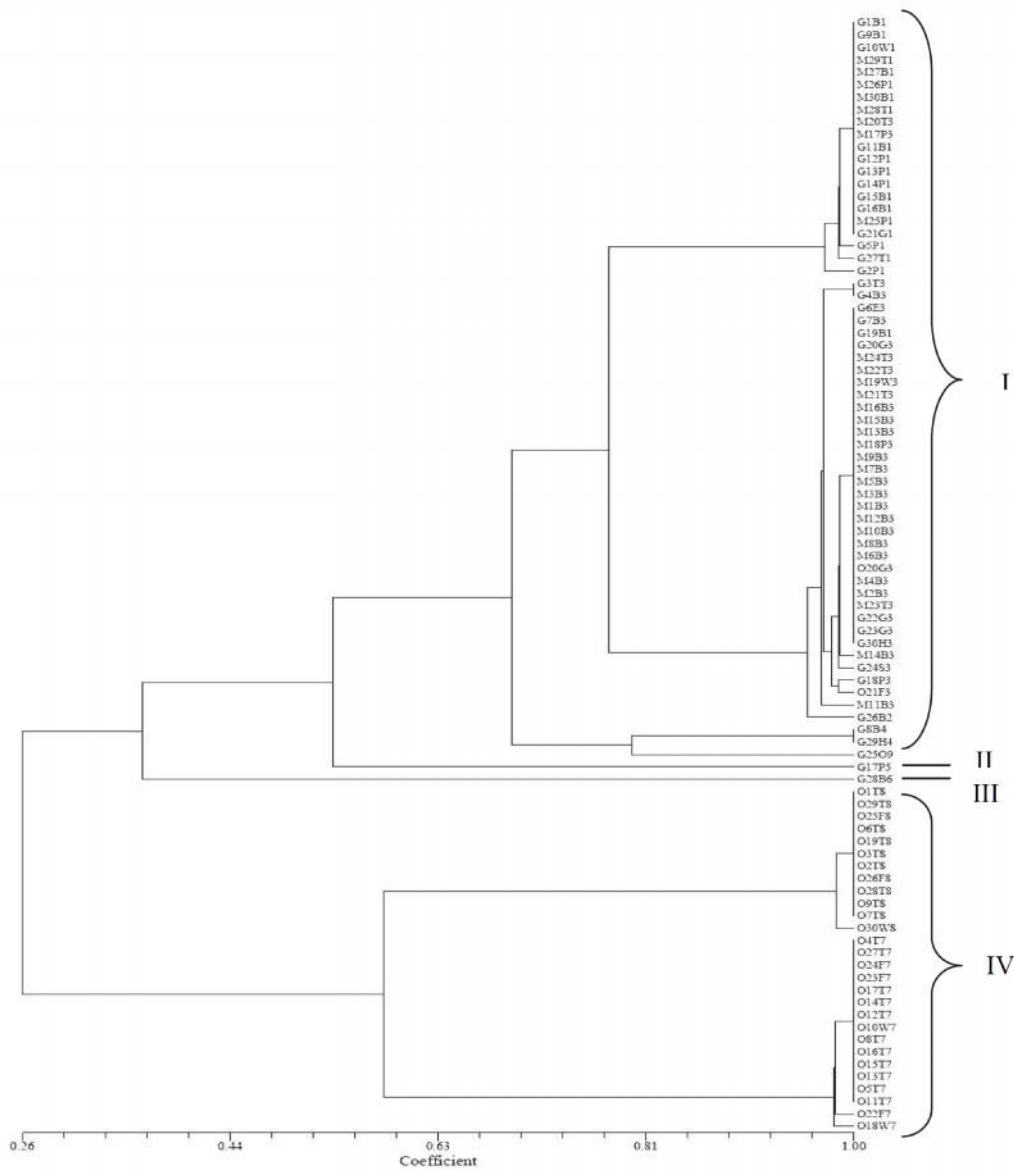
جدول ۲- توالی آغازگرهای ISSR و SCoT برای قارچ *Athelia rolfsii* و تعداد کل باندهای ایجادشده، تعداد باندهای چندشکل و PIC محاسبه شده برای هر آغازگر

Primer	Sequence 5'-3'	Total bands	Polymorphic bands	PIC	Reference
ISSR1	AGAGAGAGAGAGAGAGT	۲۰	۱۹	۰/۲۷	Tang <i>et al.</i> 2010
ISSR2	AGAGAGAGAGAGAGAGC	۱۳	۸	۰/۱۵	Tang <i>et al.</i> 2010
ISSR3	GAGAGAGAGAGAGAGAT	۱۶	۱۲	۰/۲۹	Tang <i>et al.</i> 2010
ISSR4	GAGAGAGAGAGAGAGAC	۱۶	۱۴	۰/۲۷	Tang <i>et al.</i> 2010
ISSR5	ACACACACACACACACG	۱۵	۹	۰/۲۸	Yin <i>et al.</i> 2014
ISSR6	TCTCTCTCTCTCTCC	۲۱	۱۹	۰/۲۹	Yin <i>et al.</i> 2014
ISSR7	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	۱۳	۹	۰/۲۵	Yin <i>et al.</i> 2014
ISSR8	GAGAGAGAGAGAGAGAA	۲۱	۲۰	۰/۲۲	Tang <i>et al.</i> 2010
ISSR9	TGCACACACACACAC	۲۴	۲۰	۰/۳۵	Zhao <i>et al.</i> 2013
ISSR10	GTGACACACACACAC	۱۳	۱۲	۰/۳۶	Zhao <i>et al.</i> 2013
ISSR11	GGATGCAAACACACACACAC	۱۲	۱۱	۰/۲۹	Zhao <i>et al.</i> 2013
SCoT1	ACGACATGGCGACCATCG	۱۱	۷	۰/۲۹	Zhao <i>et al.</i> 2013
SCoT2	ACCATGGCTACCACCGTG	۱۴	۱۳	۰/۱۲	Zhao <i>et al.</i> 2013
SCoT3	CCATGGCTACCACCGCCA	۲۴	۲۰	۰/۲۵	Zhao <i>et al.</i> 2013
SCoT4	CCATGGCTACCACCGGCG	۱۲	۱۰	۰/۲	Zhao <i>et al.</i> 2013

PIC: Polymorphic information content

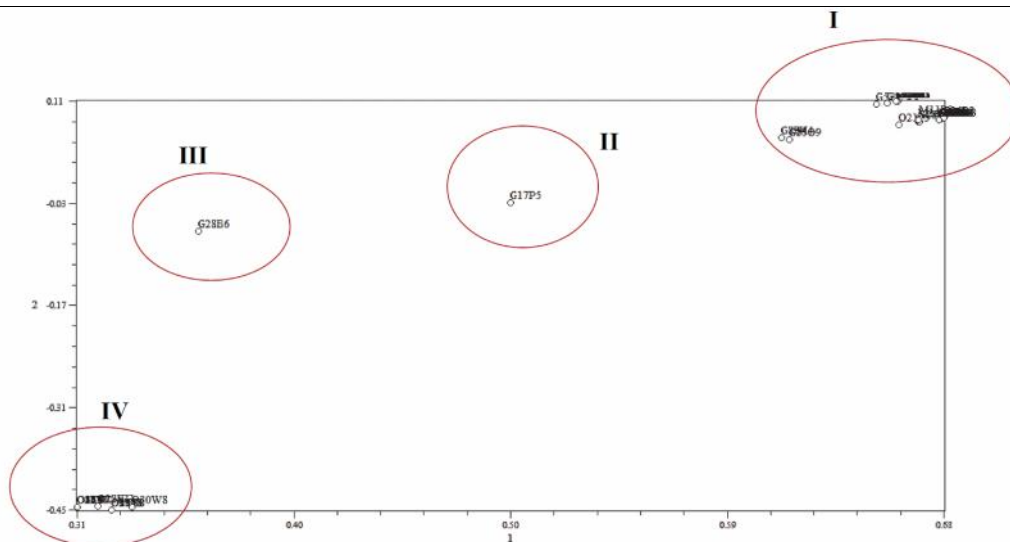


شکل ۱- الگوی باندهای ایجاد شده توسط آغازگر ISSR1 برای ۱۸ جدایه *Athelia rolfsii*: M. نشانگر اندازه، N. شاهد.
Fig. 1. ISSR amplification profile using ISSR1 primer in the 18 tested isolates of *Athelia rolfsii*: M. DNA ladder, N. Control.



شکل ۲- دندروگرام رسم شده براساس روش UPGMA برای ۹۰ جدایه *Athelia rolfsii* براساس انگشتنگاری آغازگرهای ISSR: حرف نخست جدایه‌ها نشان‌دهنده محل جمع‌آوری (G. گیلان، O. گلستان، M. مازندران)، نخستین عدد بعد از آن نشان‌دهنده شماره جدایه، حرف بعدی نشان‌دهنده میزبان و عدد آخر نشان‌دهنده گروه MCG است.

Fig. 2. UPGMA dendrogram of 90 *Athelia rolfsii* isolates constructed using genetic similarity analysis based on ISSR markers fingerprinting: First letter indicates the origin of each isolate (G. Guilan, O. Golestan, M. Mazandaran), first number indicates the number of isolates, second letter indicates host, and last number indicates MCGs.

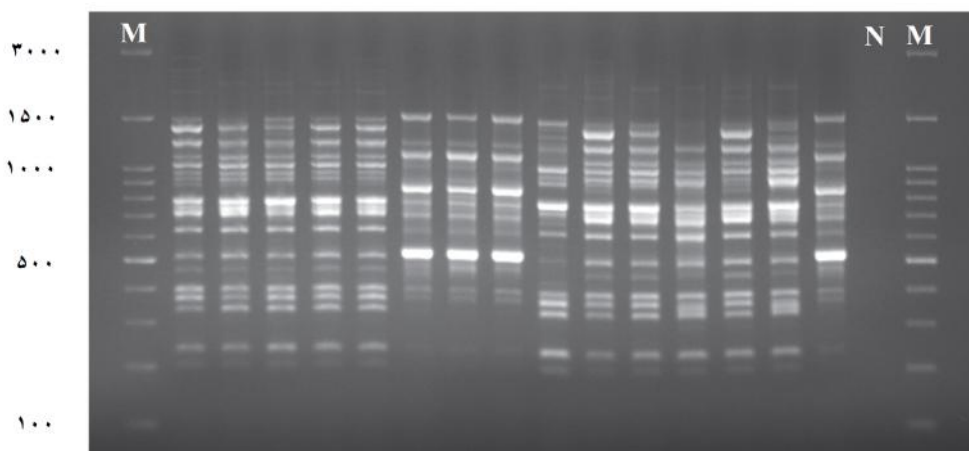


شکل ۳- پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی به روش ماتریس تشابه جاکارد با استفاده از داده‌های ISSR برای ۹۰ جدایه *Athelia rolfsii*

Fig. 3. Two-dimensional plot derived from the principal coordinate analysis by Jaccard's similarity matrix method of ISSR data for 90 isolates of *Athelia rolfsii*.

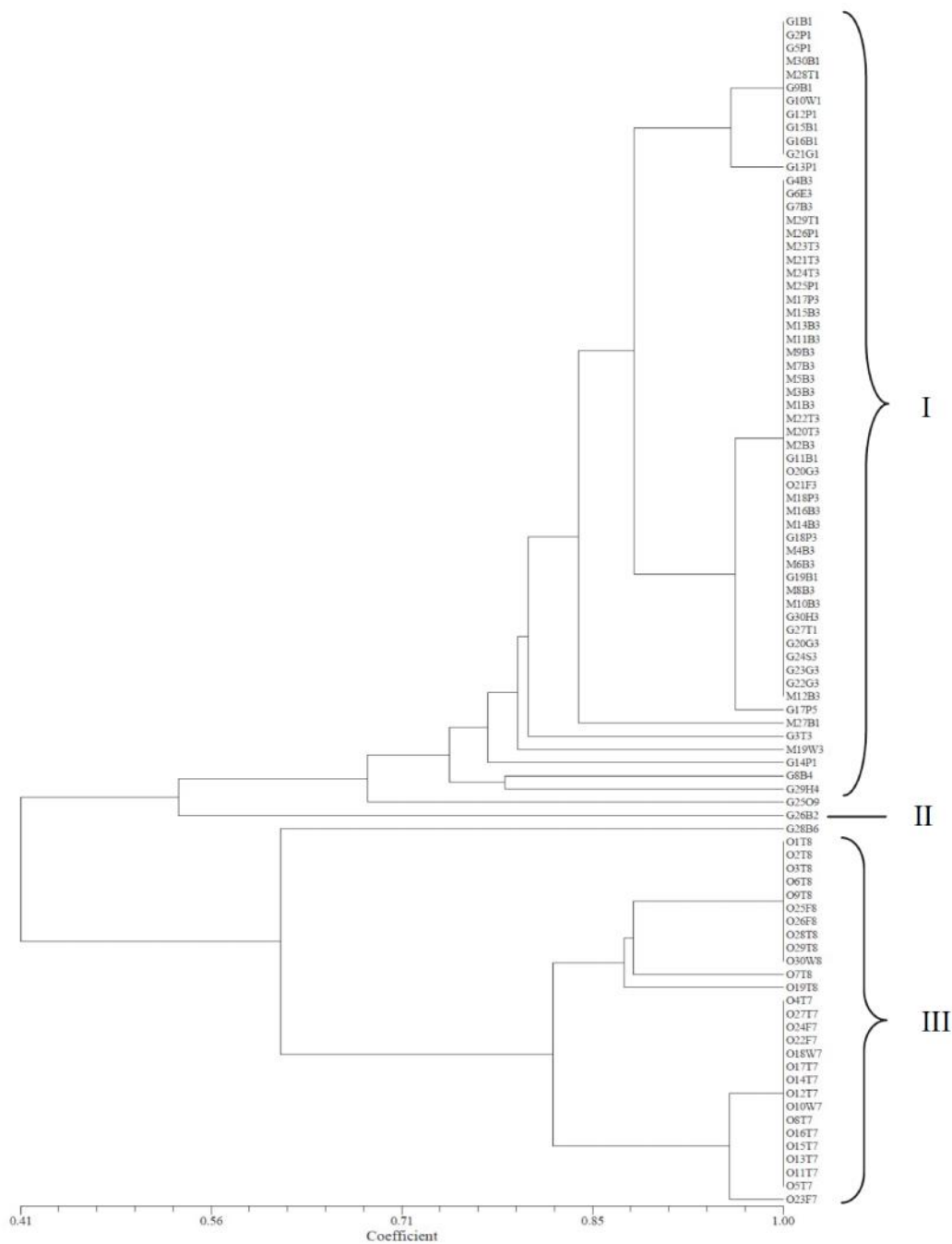
(۳۰ جدایه)، ۲۸ جدایه از گیلان و دو جدایه از گلستان می‌باشد. گروه دوم شامل یک عضو از گیلان (G26B2) و گروه سوم شامل ۲۸ جدایه از گلستان و یک جدایه از گیلان (G28B6) بود. تشابه ژنتیکی بین ۹۰ جدایه از ۰/۴۱ تا ۱ متغیر بود. ضریب کوفنتیک بالا برای نشانگر SCoT (r ۰/۹) نشان داد دندروگرام حاصل، برآورد خوبی از ماتریس ضرایب تشابه می‌باشد و با دقت زیادی ژنوتیپ‌ها را گروه‌بندی کرده است. پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (شکل ۶) گروه‌بندی مشابهی با UPGMA نشان داد.

- تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از SCoT از بخشی از الگوی باندهی حاصل از آغازگر SCoT در شکل ۴ نشان داده شده است. در مجموع، ۵۰ باند چندشکل از ۶۱ باند ایجاد شده با استفاده از چهار آغازگر SCoT به دست آمد. نشانگر SCoT2 با ۰/۱۲، کم‌ترین و SCoT1 با ۰/۲۹، بیش‌ترین محتوای اطلاعات چندشکلی را به خود اختصاص دادند (جدول ۲). دندروگرام داده‌های حاصل از آغازگرهای SCoT به روش UPGMA جدایه‌ها را در سطح تشابه ۵۹٪ در سه گروه (I-III) قرار داد (شکل ۵). گروه نخست شامل تمام جدایه‌های مازندران



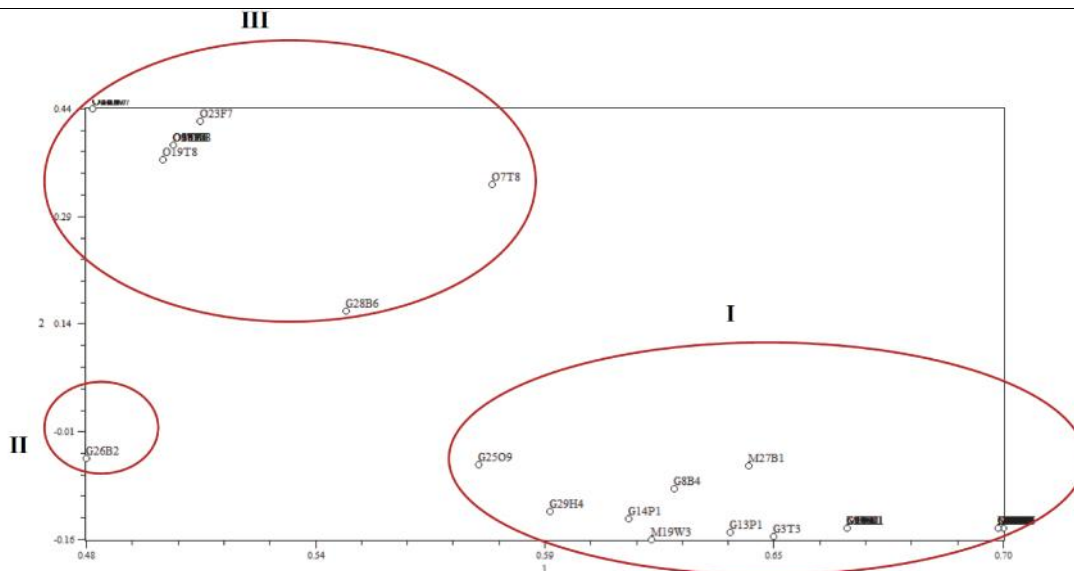
شکل ۴- الگوی باندهای ایجاد شده توسط آغازگر SCoT3 برای ۱۸ جدایه *Athelia rolfsii*: M. نشانگر اندازه، N. شاهد.

Fig. 4. SCoT amplification profile using SCoT3 primer in the 18 tested isolates of *Athelia rolfsii*: M. DNA ladder, N. Control.



شکل ۵- دندروگرام رسم شده براساس روش UPGMA برای ۹۰ جدایه *Athelia rolfsii* براساس انگشت‌نگاری آغازگرهای SCoT. حرف نخست جدایه‌ها نشان‌دهنده محل جمع‌آوری (G. گیلان، O. گلستان، M. مازندران)، نخستین عدد بعد از آن نشان‌دهنده شماره جدایه، حرف بعدی نشان‌دهنده میزبان و عدد آخر نشان‌دهنده گروه MCG است.

Fig. 5. UPGMA dendrogram of 90 *Athelia rolfsii* isolates constructed using genetic similarity analysis based on SCoT markers fingerprinting: First letter indicates the origin of each isolate (G. Guilan, O. Golestan, M. Mazandaran), first number indicate the number of isolate, second letter indicate host and last number indicate MCGs.



شکل ۶- پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی به روش ماتریس تشابه جاکارد با استفاده از داده‌های SCoT.

Fig. 6. Two-dimensional plot derived from the principal coordinate analysis by Jaccard's similarity matrix method of SCoT data.

که احتمالاً قارچ تولید مثل جنسی در منطقه ندارد و هاگ‌هایی که باعث پراکنش قارچ شوند تولید نمی‌شود و لذا آمیختگی جمعیت شانس کم‌تری دارد. همچنین، مشخص شد که MCG3 شایع‌ترین گروه است و در تمام استان‌ها وجود دارد. همان‌طور که ریمسال و همکاران (۲۰۱۲) اشاره کرده‌اند، حضور یک MCG خاص در مناطق مختلف می‌تواند ناشی از انتشار MCGs از طریق پخش مواد گیاهی، خاک یا بذر باشد.

تاکنون از نشانگرهای مختلفی برای بررسی جمعیت‌های این قارچ استفاده شده و ارتباط میان نتایج حاصل از این نشانگرها با گروه‌های سازگار میسلیمیومی، میزبان و حتی مناطق جغرافیایی مورد بحث قرار گرفته است.

سیلیرز و همکاران (Cilliers *et al.* 2000) از تجزیه و تحلیل AFLP به عنوان یک روش مناسب برای ارزیابی تنوع ژنتیکی میان جدایه‌ها و گروه‌های سازگار میسلیمیومی به دست آمده از بادام زمینی در آفریقای جنوبی استفاده کردند. با استفاده از این روش، این محققان به وضوح گروه‌های سازگار میسلیمیومی *A. rolfsii* را از یکدیگر تفکیک نمودند. با این وجود، تفاوت‌هایی بین جدایه‌های داخل یک MCG دیده شد.

نتایج هارلتون و همکاران (Harlton *et al.* 1995) نشان داد که جدایه‌های متعلق به یک MCG، الگوهای ITS-RFLP یکسانی نشان می‌دهند، اگرچه جدایه‌های یک MCG می‌توانند الگوهای ITS-RFLP متفاوتی نیز داشته و همچنین الگوهای خاصی بین MCGهای مختلف مشترک باشند. در همین ارتباط،

تجزیه و تحلیل ترکیب داده‌های SCoT و ISSR - براساس ترکیب داده‌های SCoT و ISSR تشابه ژنتیکی ۹۰ جدایه از ۰/۲۹ تا ۱ متغیر بود. گروه‌بندی به روش UPGMA، جدایه‌ها را در سطح تشابه ۵۷٪ در چهار گروه قرار داد. همچنین، ضریب همبستگی کوفنتیک ۰/۹۹ دقت زیاد گروه‌بندی را به روش UPGMA برای دو نشانگر نشان داد. پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی با گروه‌بندی حاصل از UPGMA مشابه بود. نتایج ترکیب داده‌های SCoT و ISSR مشابه نتایج ISSR بود و شکل دندروگرام و پلات آن نیز تقریباً مشابه بود و به همین دلیل نشان داده نشده است.

بحث

گروه‌های سازگار میسلیمیومی و همچنین نشانگرهای مولکولی برای ارزیابی تنوع *A. rolfsii* در میزبان‌های مختلف و در بسیاری از مناطق در سراسر جهان استفاده شده است (Harlton *et al.* 1995, Nalim *et al.* 1995, Cilliers *et al.* 2000, Punja & Sun 2001, Sarma *et al.* 2002, Remesal *et al.* 2012, Xie *et al.* 2014, Gawande *et al.* 2013, Jebaraj *et al.* 2017). در مطالعه پیشین مهری و همکاران (۲۰۱۳)، از تلاقی جدایه‌های جمع‌آوری شده از استان گیلان، شش گروه سازگار میسلیمیومی شناسایی شد. در مطالعه حاضر، با جمع‌آوری تعداد جدایه‌های بیش‌تر از سه استان گیلان، مازندران و گلستان نه گروه سازگار میسلیمیومی به دست آمد که MCG7 و MCG8 تنها در استان گلستان وجود داشتند. لذا، می‌توان نتیجه گرفت

سازگار میسلیومی ممکن است دارای منشأ کلونال باشند. (Punja & Sun 2001, 1998) پیشنهاد می‌شود برخی از گروه‌های

اطلاعات حاصل نشان داد که بین منطقه جغرافیایی و MCG در ۹۰ جدایه مورد بررسی ارتباط وجود دارد و ارتباطی بین میزبان و نشانگر مشاهده نشد. لذا براساس نتایج هر دو نشانگر، جدایه‌های استان گلستان (به جز دو جدایه با MCG متفاوت) از جدایه‌های استان گیلان و استان مازندران تفکیک شدند و این یافته‌ها با نتایج به دست آمده از میزان آمیختگی گروه‌های سازگار میسلیومی مطابقت دارد و مؤید کلونال بودن جمعیت این قارچ در استان گلستان است. نتایج مشابهی نیز در چندین گونه بازیدیومیست به دست آمده است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط ژائو و همکاران (Zhao et al. 2013) با استفاده از هفت آغازگر ISSR و هشت آغازگر SCoT انجام شد، ارتباط نزدیکی بین تنوع ژنتیکی قارچ *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* و توزیع جغرافیایی آن مشاهده شد. همچنین، در تحقیق تنگ و همکاران (Tang et al. 2010) تنوع ژنتیکی ۳۴ جدایه *Auricularia auricula* با استفاده از نشانگرهای ISSR و SRAP مورد بررسی قرار گرفت و بین این جدایه‌ها و منشأ جغرافیایی آن‌ها ارتباط مشاهده شد.

تحقیق حاضر، اطلاعات قابل توجهی در رابطه با تنوع ژنتیکی قارچ *A. rolfsii* فراهم آورد. با توجه به این که قارچ مذکور فاقد تولید مثل جنسی می‌باشد، لذا جریان ژنی کمی بین جمعیت‌ها وجود دارد و به همین دلیل، تفکیک جدایه‌های گلستان از جدایه‌های گیلان و مازندران قابل توجیه می‌باشد. مطالعه ساختار جمعیت این قارچ که تغییرات ژنتیکی در جمعیت آن به میزان بسیار زیادی محدود به فرآیند سازگاری رویشی است، در کنترل این بیمارگر اهمیت فراوانی دارد. به بیان دیگر، با تعیین گروه سازگار میسلیومی غالب در هر منطقه و به دنبال آن بررسی دامنه میزبانی و حساسیت ارقام زراعی به هر یک از این گروه‌ها، می‌توان بهترین محصولات را جهت کشت در هر منطقه شناسایی و توصیه نمود.

نتایج مشابهی توسط نالیم و همکاران (Nalim et al. 1995) و اوکابه و همکاران (Okabe et al. 1998) به دست آمده است.

تجزیه و تحلیل RAPD نیز برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در جدایه‌های *A. rolfsii* استفاده شده است. پونجا و سان (Punja & Sun 2001) توانستند جدایه‌های به دست آمده از یک دامنه میزبانی وسیع و منشأ جغرافیایی مختلف متعلق به گروه‌های سازگار میسلیومی مختلف را توسط الگوهای بانندی منحصر به فردشان از یکدیگر مجزا کنند. در مطالعات آن‌ها جدایه‌های مربوط به یک گروه سازگار میسلیومی با وجود تنوع ژنتیکی، تعداد زیادی باند مشابه با یکدیگر به اشتراک گذاشتند و تنها تعداد کمی از اعضای برخی گروه‌های سازگار میسلیومی، الگوی RAPD کاملاً یکسانی داشتند. همچنین، اوکابه و ماتسوماتو (Okabe & Matsumoto 2000) و آلمیدا و همکاران (Almeida et al. 2001) به ترتیب از ژاپن و برزیل پیوستگی و ارتباطی بین گروه‌های RAPD و برخی گروه‌های سازگار میسلیومی در جدایه‌های به دست آمده مشاهده کردند.

مطالعات جباراج و همکاران (Jebaraj et al. 2017) نشان داد که در محبت تنوع ژنتیکی، نشانگر ISSR نسبت به RAPD برتری کاملاً آشکاری وجود دارد و همچنین ارتباطی بین شدت بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی جدایه‌ها مشاهده نشد.

در این مطالعه، نشانگرهای مولکولی ISSR و SCoT جهت تعیین مشخصات ژنتیکی جدایه‌های *A. rolfsii* استفاده شدند و ارتباط آن‌ها با گروه‌های سازگار میسلیومی مورد بررسی قرار گرفت. الگوهای بانندی حاصل از هر دو نشانگر ISSR و SCoT نشان داد که به طور کلی جدایه‌های متعلق به یک MCG خاص الگوهای بانندی یکسانی از خود نشان می‌دهند، اگرچه مشاهده شد که برخی جدایه‌های متعلق به یک MCG، الگوی بانندی متفاوتی از یکدیگر دارند و باندهای خاصی در بین MCGهای مختلف مشترک بود. به علت وجود نتایجی مشابه در مورد رابطه MCG و الگوهای بانندی نشانگرهای ITS-RFLP و RAPD در این قارچ (Hartlon et al. 1995, Nalim et al. 1995, Okabe et al.)

References

Almeida, A.M.R., Abdelnoor, R.V., Calvo, E.S., Tessman, D. & Yorinori, J.T. 2001. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Sclerotium rolfsii*. Journal of Phytopathology 149(9): 493–502.

Cilliers, A.J., Herselman, L. & Pretorius, Z.A. 2000. Genetic variability within and among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* in South Africa. Phytopathology 90(9): 1026–1031.

Collard, B.C. & Mackill, D.J. 2009. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA

- marker technique for generating gene: targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 27(1): 86.
- Gawande, S.P., Borkar, S.G., Chimote, V.P. & Sharma, A.K. 2013. Determination of genetic diversity in *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotium delphinii* by using RAPD and ISSR markers. *Vegetos: An International Journal of Plant Research* 26(2): 39–44.
- George, S., Sharma, J. & Yadon, V.L. 2009. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *American Journal of Botany* 96(11): 2022–2030.
- Harlton, C.E., Levesque, C.A. & Punja, Z.K. 1995. Genetic diversity in *Sclerotium (Athelia) rolfsii* and related species. *Phytopathology* 85(10): 1269–1281.
- Hirata, T. & Takamatsu, S. 1996. Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi. *Mycoscience* 37(3): 283–288.
- Jebaraj, M.D., Aiyathanan, K.E.A. & Nakkeeran, S. 2017. Virulence and genetic diversity of *Sclerotium rolfsii* Sacc., infecting groundnut using nuclear (RAPD & ISSR) markers. *Journal of Environmental Biology* 38(1): 147–159.
- Juhássová, G., Kobza, M. & Adamcikova, K. 2004. Diversity of *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr vegetative compatibility (vc) types in Slovakia. III International Chestnut Congress 693: 635–640.
- Katti, M.V., Ranjekar, P.K. & Gupta, V.S. 2001. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Molecular Biology and Evolution* 18(7): 1161–1167.
- Kausserud, H. & Schumacher, T. 2003. Genetic structure of Fennoscandian populations of the threatened wood: decay fungus *Fomitopsis rosea* (Basidiomycota). *Mycological Research* 107(2): 155–163.
- Leslie, J.F. 1993. Vegetative compatibility in fungi. *Annual Review of Phytopathology* 31: 127–151.
- Mehri, Z., Khodaparast, S.A. & Mousanejad, S. 2013. Genetic diversity in *sclerotium rolfsii* populations based on mycelial compatibility groups in Guilan province, Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 49(3): 317–324 (In Persian with English Abstract).
- Nalim, F.A., Starr, J.L., Woodard, K.E., Segner, S. & Keller, N.P. 1995. Mycelial compatibility groups in Texas peanut field populations of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 85(12): 1507–1512.
- Okabe, I. & Matsumoto, N. 2000. Population structure of *Sclerotium rolfsii* in peanut fields. *Mycoscience* 41(2): 145–148.
- Okabe, I., Morikawa, C., Matsumoto, N. & Yokoyama, K. 1998. Variation in *Sclerotium rolfsii* isolates in Japan. *Mycoscience* 39(4): 399–407.
- province, Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 49(3): 317–324 (In Persian with English Abstract).
- Punja, Z.K. & Li: Juan, S.U.N. 2001. Genetic diversity among mycelial compatibility groups of *Sclerotium rolfsii* (teleomorph *Athelia rolfsii*) and *S. delphinii*. *Mycological Research* 105(5): 537–546.
- Remesal, E., Jordán: Ramírez, R., Jiménez: Díaz, R.M. & Navas: Cortés, J.A. 2012. Mycelial compatibility groups and pathogenic diversity in *Sclerotium rolfsii* populations from sugar beet crops in Mediterranean: type climate regions. *Plant Pathology* 61(4): 739–753.
- Rohlf, F.J. 1998. NTSYS: pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.01. Setauket, New York.
- Roldán-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A. & De Loose, M.A.F.L.P. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in

- ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding* 6(2): 125–134.
- Sarma, B.K., Singh, U.P. & Singh, K.P. 2002. Variability in Indian isolates of *Sclerotium rolfsii*. *Mycologia* 94(6): 1051–1058.
- Tang, L., Xiao, Y., Li, L., Guo, Q. & Bian, Y. 2010. Analysis of genetic diversity among Chinese *Auricularia auricula* cultivars using combined ISSR and SRAP markers. *Current Microbiology* 61(2): 132–140.
- Wang, X., Yang, R., Feng, S., Hou, X., Zhang, Y., Li, Y. & Ren, Y. 2012. Genetic variation in *Rheum palmatum* and *Rheum tanguticum* (Polygonaceae), two medicinally and endemic species in China using ISSR markers. *PLoS ONE* 7(12): 51667.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K. & Meyer, W. 1994. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press.
- Xie, C., Huang, C.H. & Vallad, G.E. 2014. Mycelial compatibility and pathogenic diversity among *Sclerotium rolfsii* isolates in the southern United States. *Plant Disease* 98(12): 1685–1694.
- Xiong, F., Zhong, R., Han, Z., Jiang, J., He, L., Zhuang, W. & Tang, R. 2011. Start codon targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes. *Molecular Biology Reports* 38(5): 3487–3494.
- Xiong, F.Q., Tang, R.H., Chen, Z.L., Pan, L.H. & Zhuang, W.J. 2009. SCoT: a novel gene targeted marker technique based on the translation start codon. *Molecular Plant Breeding* 7: 635–638.
- Yin, Y., Liu, Y., Li, H., Zhao, S., Wang, S., Liu, Y., Wu, D. & Xu, F. 2014. Genetic diversity of *Pleurotus pulmonarius* revealed by RAPD, ISSR, and SRAP fingerprinting. *Current Microbiology* 68(3): 397–403.
- Zervakis, G.I., Venturella, G. & Papadopoulou, K. 2001. Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species: complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. *Microbiology* 147(11): 3183–3194.
- Zhang, R., Huang, C., Zheng, S., Zhang, J., Ng, T.B., Jiang, R., Zuo, X. & Wang, H. 2007. Strain: typing of *Lentinula edodes* in China with inter simple sequence repeat markers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74(1): 140–145.
- Zhao, M., Huang, C., Chen, Q., Wu, X., Qu, J. & Zhang, J. 2013. Genetic variability and population structure of the mushroom *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis*. *PLoS ONE* 8(12): 83253.