

ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *Rhizoctonia zea* در خاک‌های زراعی

استان‌های مازندران و گلستان

تلمه تلماده ای^{۱*}، محمدعلی تاجیک قنبری^۲ و حشمت اله رحیمان^۳^{۱*} - نویسنده مسوول: کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری (ttelmah@gmail.com)^۲ - استادیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری^۳ - استادیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۲۴

چکیده

قارچ *Rhizoctonia zea* عامل پوسیدگی ریشه و سوختگی غلاف ذرت و برخی از گیاهان گرامینه است. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *R. zea*، از خاک‌های زراعی استان مازندران و گلستان در طی سال‌های ۱۳۸۹-۱۳۹۰ نمونه برداری انجام گرفت. تکثیر و توالی یابی نواحی ۱۸S و ۲۸S DNA ریبوزومی تعلق پنج جدایه منتخب را به گونه *R. zea* تأیید نمود. تنوع ژنتیکی ۲۰ جدایه با پراکنش جغرافیایی متفاوت با مقایسه توالی‌های حاصله از تکثیر ناحیه ITS با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS5 انجام شد. توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS نشان داد که در سطح تشابه بالا جدایه‌ها به چهار گروه تقسیم شده و از نظر تنوع ژنتیکی متنوع می‌باشند. در این بررسی مشخص شد رابطه مستقیمی بین تنوع مورفولوژیک و پلی مورفیسم ناحیه ITS وجود دارد.

کلید واژه‌ها: تنوع ژنتیکی، *Rhizoctonia zea* ITS5، ITS4

مقدمه

جنس *Rhizoctonia* یکی از بزرگترین و متنوع‌ترین قارچ‌های بازیدیومیستی است که کنیدی تولید نمی‌کند و به لحاظ رویشی نیز از سایر قارچ‌های ناقص متمایز است (اووگوشی^۱، ۱۹۸۷). بر اساس مفهوم بازنگری شده جنس، گونه‌های رایزوکتونیا با توجه به رنگ هیف، تعداد هسته در سلول ریشه‌های جوان و ریخت‌شناسی مرحله جنسی از یکدیگر قابل تفکیک هستند (اسنه و همکاران^۲، ۱۹۹۱؛ بورپی و مارتین^۳، ۱۹۹۲؛ کارلینگ و سامنر^۴، ۱۹۹۲). طبقه بندی رایج گونه‌ی کمپلکس *Rhizoctonia solani* متکی بر واکنش آناستوموزی هیف‌ها است. همچنین روش‌های مولکولی مبتنی بر آنالیز توالی‌های DNA ریبوزومی

(rDNA) به سیستم طبقه بندی AG اضافه شده است و اجازه تفحص در روابط تکاملی آنها را می‌دهد (استراسباغ و همکاران^۵، ۲۰۱۱). رنگ اصلی کلونی در *R. zea* نارنجی بوده و اسکلوته‌ها از صورتی تا نارنجی متغیر است. بر اساس معیارهای ریخت‌شناسی سلولی *R. zea* از گروه رایزوکتونیا چند هسته‌ای است (اسنه و همکاران، ۱۹۹۱). گونه *R. zea* نخستین بار در دنیا توسط ورهیس به عنوان عامل پوسیدگی سختینه‌ای ذرت گزارش شده است (ورهیز^۶، ۱۹۳۴). شکل جنسی این گونه متعلق به *Waitea circinata* است که گانل سه واریته *W. circinata* var. *circinata* و *W. circinata* var. *oryzae* را بر اساس تفاوت مورفولوژیکی کلونی در مرحله رویشی برای آن توصیف کرده است (لینر و

- 1- Ogoshi
- 2- Sneh et al.
- 3- Burpee & Martin
- 4- Carling & Sumner

- 5- Strausbaugh et al.
- 6- Voorhees

solani نامناسب و برای شناسایی جدایه های AG4 با ارزش می باشند (ژو و همکاران^۸، ۲۰۰۹). ارزیابی ۶۸ جدایه قارچ *Rhizoctonia* براساس توالی ناحیه ITS، تفاوت بین AG های مختلف از *R. solani* و جدایه های *Ceratobasidium*، CAG6 و *W. circinata* var. *zeae* را به خوبی نشان داد (اکرا و همکاران^۹، ۲۰۰۹). تنوع ژنتیکی جدایه های ایرانی *R. solani* جدا شده از ریشه چغندر قند به وسیله ی آنالیز ITS-rDNA و RAPD-PCR توسط محمودی و همکاران (۱۳۸۴) گزارش شد. تاجیک و قبری (۱۳۸۴) به منظور تعیین چندشکلی نواحی حد فاصل ژنهای ۱۸S و ۲۸S در ژنوم قارچ *R. solani* AG-1-IA با استفاده از نشانگر rDNA RFLP جمعیت قارچ عامل سوختگی غلاف برنج را مورد ارزیابی قرار دادند. روشهای مولکولی چندی برای مطالعه ژنهای ریوزومی *R. solani* مورد استفاده قرار گرفته است. تکثیر قطعات فاصله ساز داخلی و برش آنها با آنزیمهای محدودالاکثر و بررسی الگوی حاصل یکی از روشهایی است که عمدتاً در مطالعه ژنتیکی در سطح گونه و گروه آناستوموزی مورد استفاده قرار گرفته است (لیو و سینکلر^{۱۰}، ۱۹۹۲؛ کوبتا و ویلگالیز^{۱۱}، ۱۹۹۷). هدف از بررسی حاضر شناسایی مولکولی و ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیتهای *Rhizoctonia zeae* در خاک های زراعی استانهای مازندران و گلستان بر پایه توالی ژنهای ریوزومی (rDNA) است.

مواد و روش‌ها

-تهیه جدایه:

نمونه برداری بصورت تصادفی از خاک مزارع و باغات استان مازندران و گلستان در طول شش ماه انجام شد. جداسازی و خالص سازی آنها روی محیط کشت

کارلینگ^۱، ۱۹۹۴). وجود تنوع مورفولوژیکی در جمعیت های *R. solani* این امر را تداعی کرد که این گونه نیز بایستی از تنوع ژنتیکی برخوردار باشد (لونگ و همکاران^۲، ۱۹۹۳). مطالعه تنوع ژنتیکی رایزوکتونیا ها ابتدا با روشهای بیوشیمیایی نظیر الکتروفورز پروتئینهای محلول سلولی، آیزوزایمها، زایموگرام پکتین و آنالیز اسیدهای چرب بیشتر در سطح گونه و یا گروه آناستوموزی شروع شد و روشهای مولکولی مختلف توانست اختلافات درون جمعیت را آشکار سازد (سالازار و همکاران^۳، b ۲۰۰۰؛ لوبک و پالسن^۴، ۲۰۰۱؛ کارلینگ و همکاران، ۲۰۰۲). هنگامی که خصوصیات مورفولوژیکی کارایی لازم را برای تشخیص ندارند، گروه بندی بر اساس rDNA یک روش قابل اعتماد برای تعیین جایگاه صحیح جدایه های قارچ است. علاوه بر آن روشهای متنوعی بر پایه PCR جهت تشخیص و طبقه بندی قارچها، ابداع گردیده است (بولات و همکاران^۵، ۱۹۹۸). توالیهایی از DNA که RNA های ریوزومی را کد می کنند نواحی مناسبی جهت بررسی روابط فیلوژنیک و تاکسونومیک و همچنین قرابت ژنتیکی بین قارچها به حساب می آیند (برنز و همکاران^۶، ۱۹۹۱). کونیناگا و همکاران^۷ (۱۹۹۷) با مقایسه توالی نوکلئوتیدی نواحی کد کننده RNA در ۴۵ جدایه از AG ها و زیرگروههای مختلف نشان دادند که توالی های rDNA ۵/۸S شدیداً حفاظت شده اند، اما تفاوتهای قابل توجهی در حد فاصل قطعات ۱۸S و ۲۸S فیلوژنی در ناحیه ITS، بین جدایه ها وجود دارد. آنالیز توالیهای ITS جدایه های *R. solani* از Lupin و دیگر محصولات در آلبرتا کانادا نشان داد که این قطعه برای تفکیک جدایه های AG2-1 و AG2-2 *R.*

1- Carling & Leiner

2- Leung *et al.*

3- Salazar *et al.*

4- Lubeck & Poulsen

5- Bulta *et al.*

6- Bruns *et al.*

7- Kuninaga *et al.*

8- Zhou *et al.*

9- Ohkura *et al.*

10- Liu & Sinclair

11- Cubeta & Vilgalys

نتایج و بحث

از مجموع ۷۰ جدایه ی جمع آوری شده از دو استان مازندران و گلستان با در نظر گرفتن پراکنش جغرافیایی، ۲۰ جدایه بصورت تصادفی برای بررسی مولکولی انتخاب شدند (جدول ۲) که ۱۷ جدایه به *Rhizoctonia zeae*، یک جدایه به *R. oryzae* و دو جدایه به *Waitea circinata* var *circinata* تعلق داشتند. از میان چهار جفت آغازگر آزمون شده (جدول ۱) محصول PCR جفت آغازگر ITS4 و ITS5 روی ژل آگارز ۱/۵٪ برای کلیه جدایه ها تک باندی با وزن مولکولی ۶۷۰ جفت باز را نشان داد (شکل ۱). آنالیز خوشه ای نتایج به دست آمده با آغازگرهای ITS نشان داد که جدایه های مورد مطالعه با تشابه ۸۸ درصد در چهار گروه قرار می گیرند. بطوریکه جدایه های گروه اول مربوط به گونه *R. zeae*، گروه دوم *R. oryzae*، سومین گروه *Waitea circinata* var. *circinata* و گروه چهارم متعلق به گروه خارجی *Rhizoctonia solani* (out group) می باشند. جدایه های گروه اول به دو زیر گروه تقسیم شدند که در زیر گروه (۱) ۳۰٪ جدایه ها به استان گلستان و ۷۰٪ آن به استان مازندران متعلق بود همچنین زیر گروه (۲) پراکنشی مشابه با زیر گروه ۱ داشت.

DNA ژنومی تکثیر شده با آغازگر NS1&8 18S rDNA برای تمام جدایه های *R. zeae* تک باندی با وزن تقریبی ۱۸۰۰ جفت باز بود (شکل ۲) و نیز ارزیابی محصول تکثیر شده از دو جفت آغازگر LR7&LR12 و LROR&LR7 در ژل آگارز ۱/۵٪ به ترتیب متشکل از یک باند به وزن ۱۴۹۰ و ۱۶۰۰ جفت باز بود (شکل ۳). بررسی دندروگرام توالی های تکثیر شده ناحیه ITS و ۱۸S پنج جدایه منتخب نشان داد در سطح بالا، تنوعی بین جدایه ها مشاهده نمی شود که

آب آگار (water agar, WA) و PDA (عصاره ۲۰۰ گرم سیب زمینی با ۱۲ گرم دکستروز و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب، Potato Dextrose Agar) انجام شد (پولیتز و اشرودر^۱، ۲۰۰۵).

-استخراج DNA و واکنش زنجیره پلیمرز (PCR):

توده ی میسلیومی جدایه ها در محیط کشت مایع PDB (عصاره ی ۵۰ گرم سیب زمینی همراه ۵ گرم دکستروز در یک لیتر آب) به دست آمد. استخراج DNA با تخریب دیواره سلولی به وسیله ازت مایع و به روش ریپلی^۲ (۲۰۰۰) انجام شد. همچنین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به روش اسپکتوفوتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش زنجیره پلیمرز برای تکثیر ناحیه ITS، ۱۸S و ۲۸S در نمونه های *R. zeae* مورد بررسی با روش اشنایدر و همکاران (۱۹۹۷) و سلازار و همکاران (۲۰۰۰ a) انجام شد. برای تکثیر DNA از ترموسایکلر مدل MJ Mini (Bio-Rad) PTC-1148C استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده و دماهای اتصال آنها در جدول ۱ ذکر شده است.

محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ در بافر 90 mM Tris, 90 mM Boric acid, 2 mM EDTA (TBE) به مدت ۴۵ دقیقه در ۶۰ ولت تفکیک شدند. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (۰/۵ μg/mL) از نقوش حاصل عکس برداری شد (کوالچاک و همکاران^۳، ۱۹۹۷).

-ترسیم دندروگرام:

به منظور بررسی ارتباط فیلوژنتیکی جدایه های شناسایی شده، توالی نواحی ITS، ۱۸S و ۲۸S آنها با استفاده از نرم افزار Edit Sequence ویرایش و دندروگرام روابط فیلوژنتیکی با نرم افزار MEGA5 (تمورا و همکاران^۴، ۲۰۱۱) به روش Maximum Parsimony Tree ترسیم شد.

- 1- Paulitz & Schroeder
- 2- Rapley
- 3- Kowalchuk et al.
- 4- Tamura et al.

تلماده ای و همکاران: ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های...

جدول ۱- توالی و دماهای اتصال جفت آغازگرهای استفاده شده در PCR برای تکثیر نواحی مختلف اپران DNA ریوزمی جدایه های *Rhizoctonia zae*

جفت آغازگر	توالی	دمای اتصال
ITS5&4	ITS5(22-mer): 5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3' ITS4(20-mer): 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	۶۰°C
NS1&8	NS1(19-mer): 5' GTAGTCATATGCTTGTCTC 3' NS8(20-mer): 5' TCCGCAGGTTACCTACGGA 3'	۵۷°C
LROR&LR7	LROR(17-mer): 5' ACCCGCTGAACCTAAGC 3' LR7(17-mer): 5' TACTACCACCAAGATCT 3'	۴۶°C
LR7R&LR12	LR7R(17-mer): 5' GCAGATCTTGGTGGTAG 3' LR12(17-mer): 5' GACTTAGAGGCGTTTCAG 3'	۵۰°C

جدول ۲- جدایه های مورد استفاده در بررسی به همراه منبع و شماره دسترسی در بانک ژن برای ژن های ناحیه rDNA

Isolate	Species	Source	GenBank accession
			ITS
112	<i>Rhizoctonia zae</i> .	Mazandaran	JQ350862
435	<i>Rhizoctonia zae</i>	Golestan	JQ350858
599	<i>Rhizoctonia zae</i>	Golestan	JQ35086
448	<i>Rhizoctonia zae</i>	Golestan	JQ350866
276	<i>Rhizoctonia zae</i>	Mazandaran	JQ350854
522	<i>Rhizoctonia zae</i>	Mazandaran	JQ350869
542	<i>Rhizoctonia zae</i>	Mazandaran	JQ350860
296	<i>Rhizoctonia zae</i>	Mazandaran	JQ350855
208	<i>Rhizoctonia zae</i>	Mazandaran	JQ350864
217	<i>Rhizoctonia zae</i>	Mazandaran	JQ350865
520	<i>Rhizoctonia zae</i>	Mazandaran	JQ350868
572	<i>Rhizoctonia zae</i>	Golestan	JQ350870
400	<i>Rhizoctonia zae</i>	Golestan	JQ350856
236	<i>Rhizoctonia zae</i>	Mazandaran	JQ350863
415	<i>Rhizoctonia zae</i>	Golestan	JQ350857
450	<i>Rhizoctonia zae</i>	Mazandaran	JQ350859
502	<i>Rhizoctonia zae</i>	Mazandaran	JQ350867
476	<i>Rizoctonia oryzae</i>	Golestan	JQ350872
445	<i>Waitea circinata</i> var. <i>circinata</i>	Golestan	JQ350873
571	<i>Waitea circinata</i> var. <i>circinata</i>	Golestan	JQ350874
CBS 384.34	<i>Rhizoctonia zae</i>		JQ350871

نیتو^۱، ۱۹۹۵؛ اشنایدر و همکاران^۲، ۱۹۹۷؛ کارلینگ و همکاران، (۲۰۰۲). اما ژنهای ۱۸S، ۵/۸S و ۲۸S مناطقی با حفاظت بالا می باشند و از آنها در مطالعه تکاملی طبقه

با توجه به میزان حفاظت شونده گی این مناطق در سطح گونه طبیعی است اگر چه توالی های مربوط به نواحی کد کننده اجزا ریوزوم به عنوان یک نشانگر قابل اعتماد جهت تشخیص و بررسی فیلوژنتیکی جمعیتها و زیر گروههای رایزوکتونیا استفاده شده است (کانمتسو و

1- Kanematsu & Naito
2- Schneider *et al.*

گرفتند (شکل ۴). بطور کلی لگوی خاصی از نظر پراکنش جغرافیایی در دو زیر گروه *R. zae* مشاهده نشد و حضور جدایه های مشابه در دو استان می تواند نشانه ی فاصله ی کم این مناطق، جابه جایی بذور گیاهان، انتقال کاه و کلش، استفاده از ارقام مشابه و گذشت زمانی نسبتاً کوتاه در طول تکامل این قارچ باشد. زیر گروه اول از لحاظ شکل شناسی پرگنه، قطر میسلیم (حدود ۹-۳ میکرومتر) و ابعاد سختینه اندکی از زیر گروه دوم کوچکتر است. در این میان اندازه سختینه های جدایه CBS۳۸۴/۳۴ از تمام جدایه های *R. zae* در دو زیر گروه کوچکتر بود. نتایج بررسی اخیر وجود تنوع قابل ملاحظه ای در جمعیت های *R. zae* در استانهای مازندران و گلستان را منعکس نمود. از آنجا که بررسی جامعی در خصوص تنوع جدایه های *R. zae* در دنیا صورت نگرفته است، مقایسه یافته های حاضر با سایر مناطق پراکنش *R. zae* امکان پذیر نبود. طبقه بندی براساس rDNA ۱۸S ممکن است همیشه برای شناسایی گونه ها و نژادهای قارچی کافی نباشد. به هر حال rDNA ۱۸S به اندازه کافی متنوع نیست که بتواند در تمام موارد گونه های نزدیک به هم را متمایز کند و به کارگیری ژن های تنوع پذیرتر یا قطعات تغییر پذیرتری از rDNA برای تفکیک جدایه ها در سطوح پایین تر تاکسونومیک می تواند تنوع را توصیف کند (هانت و همکاران^۵، ۲۰۰۴). برای قارچ های معین هر یک از نواحی ITS و ۲۸S، DNA ریبوزومی تشخیص بین گونه های نزدیک و وابسته را امکان پذیر می سازد. مشاهده ی سطح بالای تنوع قارچ *R. zae* به دست آمده از خاک و نمونه های گیاهی، ممکن است به دلیل سابقه طولانی کشت گیاهان ذرت، سورگوم جارویی، برنج، گندم، جو، کلزا و آفتابگردان در دو استان گلستان و مازندران باشد بطوریکه احتمالاً قارچ با گذشت زمان با میزبانهای مختلف سازگار شده است. مقایسه توالی ITS

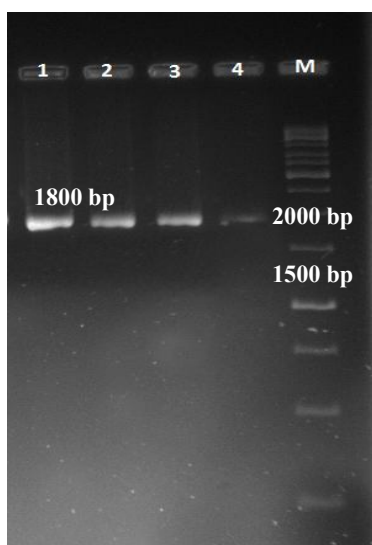
بندی در سطوح بالاتر میتوان استفاده کرد (دسیلوا و همکاران^۱، ۱۹۹۵). بررسی پروفیلی قطعات بریده شده با آنزیمهای برشگر ناحیه ITS یک روش ساده برای مشخص کردن تنوع بین و درون گونه ها می باشد (کوربکنا^۲، ۲۰۰۷). مطالعه ی فیلوژنی بر مبنای مقایسه توالی ناحیه ITS ثابت کرده که رابطه این مناطق در AG های مختلف *R. solani* متفاوت است (لیتونن و همکاران^۳، ۲۰۰۸). جدایه های *W. circinata* var. *zeae* جمع آوری شده از دو وارته *W. circinata* var. *oryzae* و *W. circinata* بوسیله ی رنگ پرگنه و توالیهای ناحیه ITS rDNA همواره متمایز می شوند. مقایسه رنگ پرگنه و اندازه اسکروتوها برای مجزا کردن این سه وارته، مهم عنوان شده است (لینر و کارلینگ، ۱۹۹۴؛ تودا و همکاران^۴، ۲۰۰۵). در مطالعه حاضر توالی ناحیه ITS rDNA *W. circinata* برای طبقه بندی وارته های *W. zae* بوده است. شباهت در داخل وارته *W. circinata* var. *zeae* خیلی نزدیک و بین ۹۹-۹۴ بود اما شباهت بین وارته ها کمتر بوده و حدود ۸۷-۸۵ محاسبه شد. این نتایج تا حدی مشابه نتایج تودا و همکاران (۲۰۰۵) بود. در بررسی تودا و همکاران شباهت بین جدایه های *W. circinata* var. *zeae* حدود ۹۹/۷-۹۷/۷ برآورد شده بود. آنالیز خوشه ای نتایج به دست آمده از توالی ITS جدایه ها نشان داد در سطح تشابه ۸٪ تمام جدایه های *R. zae* در یک شاخه قرار گرفتند. با استفاده از روش Maximum Likelihood Tree با نرم افزار MEGA5 هم دندروگرام مشابهی به دست آمد، که با دندروگرام این بررسی مطابقت داشت.

از لحاظ پراکنش جغرافیایی جدایه های استان گلستان در یک زیر مجموعه در زیر گروه اول قرار

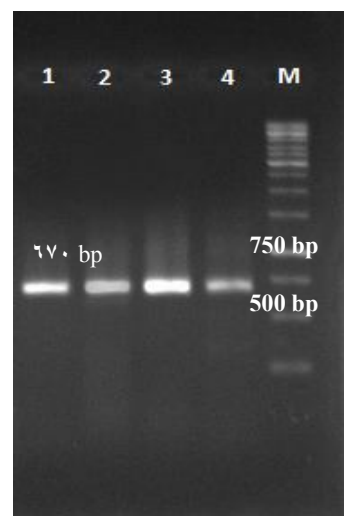
- 1- De Silva *et al.*
- 2- Korabecna
- 3- Lehtonen *et al.*
- 4- Toda *et al.*

5- Hunt *et al.*

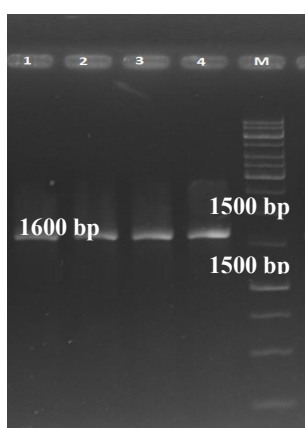
تلماده ای و همکاران: ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های...



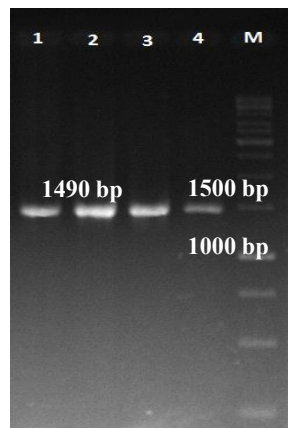
شکل ۲- نقوش بانندی محصولات PCR ناحیه ۱۸S جدایه های *R. zae* از استان گلستان و مازندران، ستون M شاخص وزن مولکولی (1kb DNA Ladder)، ستون ۱ شامل جدایه استاندارد CBS۳۸۴/۳۴.



شکل ۱- نقوش الکتروفورزی محصولات PCR ناحیه ITS جدایه های *Rhizoctonia zae* ستون M شاخص وزن مولکولی (1kb DNA Ladder)، ۱، جدایه استاندارد *R. zae* CBS 384.34، ۲، جدایه ۱۱۲، ۳، جدایه ۲۳۶ و ۴، جدایه ۴۱۵.



شکل (3B)



شکل (3A)

شکل ۳- باندهای حاصل از تکثیر PCR جدایه های *Rhizoctonia zae* با استفاده از جفت آغازگر های LROR&LR7 و LR7R&LR12.

ستون M شاخص وزن مولکولی (1kb DNA Ladder)، شکل (A) ۱، جدایه CBS ۳۸۴/۳۴، ۲، جدایه ۹۸، ۳، جدایه ۲۷۶، ۴، جدایه ۱۰۷ و شکل (B) ۱، جدایه ۴۰۲، ۲، جدایه ۴۱۴، ۳، جدایه ۴۱۶ و ۴، جدایه ۵۴۲.

تلماده ای و همکاران: ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های...

کمترین تنوع و یا بیشترین سطح تشابه توسط نشانگرهای مولکولی فوق منعکس می‌شود. مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای *R. solani* با آغازگر ITS و TEF-1 α توانسته است ساختار جمعیت‌های این گونه را که در استراتژی کنترل پاتوژن مهم هستند مشخص سازد، هرچند رابطه‌ای بین خاستگاه جغرافیایی و تنوع نژادی در جمعیت‌های *R. solani* غده سیب زمینی در کشور فرانسه وجود نداشته است (فی‌ارز و همکاران^۱، ۲۰۱۱). براساس نتایج این تحقیق خصوصیات مورفولوژیکی، بیماری‌زایی و پلی‌مورفیسم ناحیه ITS مکمل یکدیگر می‌باشند و نتایج حاصل از ارزیابی تنوع ناحیه ITS می‌تواند در مطالعات اکولوژیکی و اپیدمیولوژیکی و اتخاذ استراتژی مناسب در مدیریت بیماری ناشی از این گروه از قارچ‌ها قابل استفاده باشد.

منابع

۱. تاجیک قنبری، م.ع.، رحیمیان، ح.ا. و علیزاده، ع.ا. ۱۳۸۴. مطالعه جمعیت‌های *Rhizoctonia solani* AG-1-IA جدا شده از برنج در استان مازندران به کمک rDNA RFLP. مجله بیماری‌های گیاهی ایران، ۴۱(۴): ۹-۱۵.
۲. محمودی، س.ب.، مصباح، م.، رحیمیان، ح.ا. و نوروزی، پ. ۱۳۸۴. تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Rhizoctonia solani* از چغندر قند با استفاده از RAPD-PCR و آنالیز ITS-rDNA. مجله بیماری‌های گیاهی ایران، ۴۱(۴): ۹-۱۵.
3. Bruns, T.D., White, T.J., and Taylor, J.W. 1991. Fungal molecular systematic. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, 22: 525-564.
4. Bulat, S.A., Lubeck, M., Mironenko, N., Jensen, D.F., and Lubeck, P.S. 1998. UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of strains of *Trichoderma* and *Gliocladium*. Mycological Research, 102: 933-943.
5. Burpee, L., and Martin, B. 1992. Biology of *Rhizoctonia* species associated with turfgrasses. Plant Disease, 76: 112-117.
6. Carling, D.E., and Sumner, D.R. 1992. *Rhizoctonia*. In Singleton, L.L., Mihail, J.D., and Rush, C.M. (eds.), Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. St Paul, MN, USA, American Phytopathological Society Press: pp: 157-165.
7. Carling, D.E., Kuminaga, S., and Brainard, A. 2002. Hyphal anastomosis reactions, rDNA- internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. Phytopathology, 92: 43-50.
8. Cubeta, M.A., and Vilgalys, R. 1997. Population biology of *Rhizoctonia solani* complex. Phytopathology, 87: 480-484.
9. De Silva, L.A.F., Moreira, M.A. M., Bezerra, J.P., Tovar, F.J., Almeida, C.A.S., Menezes, R.A., and Leoncini, O. 1995. Analysis genus *Didelphis* (Marsupialia). Brazil Journal of Genetics, 18: 37-42.

1. Fiers et al.

10. Fiers, M., Edel-Hermann, V., Heraud, C., and Gautheron, N. 2011. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* associated with potato tubers in France. *Mycologia*, 103: 1230-1244.
11. Hunt, J., Boddy, L., Randerson, P.F., and Rogers, H.J. 2004. An evaluation of 18S rDNA approaches for the study of fungal diversity in grassland soils. *Microbial Ecology*, 47: 385-395.
12. Kanematsu, S., and Naito, S. 1995. Genetic characterization of *Rhizoctonia solani* AG2-3 by analyzing restriction fragment length polymorphisms of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 61: 18-21.
13. Korabecna, M. 2007. The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8S rRNA gene): its biological meaning and application in medical mycology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*: 783-787.
14. Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., Boer, W. De, Prosser, J.I., Embley, T.M., and Woldendorp, J.W. 1997. Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the b Subdivision of the Class Proteobacteria in Coastal Sand Dunes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Sequencing of PCR-Amplified 16S Ribosomal DNA Fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(4): 1489-1497.
15. Kuninaga, S., Natsuaki, T., Takeuchi, T., and Yokosawa, R. 1997. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. *Current Genetics*, 32 : 237-243.
16. Lehtonen, M.J., Ahvenniemi, P., Wilson, P.S., German-Kinnari, M., and Valkonen, J.P.T. 2008. Biological diversity of *Rhizoctonia solani* (AG-3) in a northern potato-cultivation environment in Finland. *Plant Pathology*, 57: 141-151.
17. Leiner, R.H., and Carling, D.E. 1994. Characterization of *Waitea circinata* (*Rhizoctonia*) isolated from agricultural soils in Alaska. *Plant Disease*, 78: 385-388.
18. Liu, Z.L., and Sinclair, J.B. 1992. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. *Phytopathology*, 82:778-787.
19. Leung, H., Nelson, R.J., and Leach, G.E. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria, In Andrews, J.H., and Tommercup, I.C. (eds.), *Advances: in plant pathology*. Academic Press, London, pp: 157-205.
20. Lubeck, M., and Poulsen, H. 2001. UP-PCR cross blot hybridization as a tool for identification of anastomosis groups in the *Rhizoctonia solani* complex. *FEMS Microbiology Letters*, 201: 778-787.
21. Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Annual Review of Phytopathology*, 25 : 125-143.

22. Ohkura, M., Abawi, G.S., and Smart, C.D. 2009. Diversity and aggressiveness of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia* – like fungi on vegetables in New York. *Plant Disease*, 93: 615-624.
23. Paulitz, T.C., and Schroeder, K.L. 2005. A new method for the quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* from soil. *Plant Disease*, 89:767-772.
24. Rapley, R. 2000. *The Nucleic Acid Protocols HandBook*. Humana Press : 705P.
25. Salazar, O., Julian, M.C., Hyakumachi, M., and Rubio, V. 2000a. Phylogenetic grouping of cultural types of *Rhizoctonia solani* AG 2-2 based on specific rDNA-ITS sequences. *Mycologia*, 92: 505–509.
26. Salazar, O., Julian, M. C., and Rubio, V. 2000b. Primers based on specific rDNA-ITS sequence for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG-2 subgroups and ecological types, and binucleate *Rhizoctonia*. *Mycological Research*, 104: 281-285.
27. Schneider, J.H. M., Salazar, O., Rubio, V., and Keijer, J. 1997. Identification of *Rhizoctonia solani* associated with field grown tulips using ITS rDNA polymorphism and pectic zymograms. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 607-622.
28. Sneh, B., Burpee, L., and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. St Paul, MN, USA, American Phytopathological Society Press: 133 p.
29. Strausbaugh, C.A., Eujayl, I.A., Panella, L.W., and Hanson, L.E. 2011. Virulence, distribution and diversity of *Rhizoctonia solani* from sugar beet in Idaho and Oregon. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33: 210–226.
30. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.
31. Toda, T., Mushika, T., Hayakawa, T., Tanaka, A., Tani, T., and Hyakumachi, M. 2005. Brown ring patch: A new disease on bentgrass caused by *Waitea circinata* var. *circinata*. *Plant Disease*, 89: 536-542.
32. Voorhees, R.K. 1934. Sclerotial rot of corn caused by *Rhizoctonia zaeae*. *Phytopathology*, 24: 1290- 1303.
33. Zhou, Q.X., Chang, K.F., Hwang, S.F., Strelkov, S.E., Gossen, B.D., and Chen, Y.Y. 2009. Pathogenicity and genetic diversity of *Rhizoctonia solani* isolates from lupin and other crops in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 31: 340-347.