

بررسی چند شکلی DNA در جمعیت‌های *Rhizoctonia solani* AG-4 با استفاده از نشانگر مولکولی

rDNA RFLP

فرزانه بادپا^{1*}، غلامرضا بلالی²، بهرام شریف نبی³

تاریخ دریافت: 95/2/24 تاریخ پذیرش: 95/7/16

چکیده

توالی‌های DNA ریپوزومی به دلیل اینکه دارای کپی‌های زیادی از ژن‌های rRNA و نیز درجه بالایی از تغییر می‌باشند، به منظور بررسی روابط فیلوژنی در محدوده وسیعی از سطوح تاکسونومی مورد استفاده قرار می‌گیرند. نواحی ITS و فواصل داخل ژنی DNA ریپوزومی هسته‌ای، واحدهای تکراری تکامل یافته ثابت می‌باشند و ممکن است در بین گونه‌های داخل یک جنس یا در بین افراد یک جمعیت متغیر باشند. به منظور ارزیابی چند شکلی نواحی حد فاصل ژن‌های 28s و 18s در ژنوم قارچ *Rhizoctonia solani* گروه آناستوموزی 4 (AG-4)، 28 جدایه از میزبان‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند. از جدایه‌ها DNA استخراج و از آن‌ها به عنوان الگو در واکنش‌های PCR استفاده شد. در تکثیر نواحی فاصله‌ساز داخلی بین ژن‌های ریپوزومی با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 یک قطعه DNA به اندازه 700 جفت باز ردیابی شد. قطعه مذکور با آنزیم‌های برشی *Xba* I, *Hae* III, *Bam* HI, *Hind* III, *Sac* I, *Pst* I, *Nde* I, *Xho* I, *Hinc* II, *Hinf* I, *Eco* Taq I با آنزیم‌های برشی RI، هضم شد. ولی آنزیم‌های *Xba* I, *Bam* HI, *Hind* III, *Sac* I, *Pst* I, *Nde* I, *Xho* I فاقد محل برش بودند. نتایج حاصله نشان داد که جدایه‌های *Rhizoctonia solani* AG4 هتروژن بوده و ITS-RFLP با استفاده از آنزیم *Hinc* II تفاوت بین زیرگروه‌های AG4-HG I و AG4-HG II را از نظر الگوی برش آنزیمی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، نواحی فاصله‌ساز داخلی (ITS)، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، *Rhizoctonia solani* گروه آناستوموزی 4.

¹ - دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

² - دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران.

³ - استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

* - نویسنده مسئول مقاله: badpafarzaneh@yahoo.com

مقدمه

جنس *Rhizoctonia* به معنی کشنده ریشه، اولین بار توسط دکاندول¹ در سال 1815 شرح داده شد و نام گونه *Rhizoctonia crocorum* انتخاب گردید (Menzies, 1970). بیش از یک قرن بعد، این مفهوم توسط Parmeter و Whitney در سال 1970 مورد بازبینی واقع شد و به این نتیجه رسیدند که این نویسنده سوئیدی بر اساس ویژگی‌های اصلی این جنس که می‌تواند ریشه‌های یک شکل از اسکروت‌های قارچ ایجاد کند و این میسلیوم‌ها می‌توانند به ریشه گیاهان زنده چسبیده و موجب بیماری آن‌ها شوند، این جنس را نام‌گذاری کرده است. اعضای شبه جنس *Rhizoctonia* ترکیب پیچیده‌ای از قارچ‌های رشته‌ای هستند و فرم غیرجنسی آن‌ها، اسپور تولید نمی‌کنند. گونه‌های پیچیده *Rhizoctoni* دارای صفات مشترکی می‌باشند؛ از جمله این که خاک‌زی بوده، معمولاً بیمارگر ریشه و گاهی دارای تاکسون‌های ساپروفیت و همزیست هستند. قارچ‌های این شبه‌جنس در سراسر جهان یافت می‌شوند و از مخرب‌ترین بیمارگرهای گیاهی با دامنه میزبانی وسیع بوده و در بسیاری از گیاهان مانند گونه‌های کشاورزی، زیتنی و جنگلی ایجاد بیماری می‌کنند (Anderson, 1982; Sneh et al., 1991). این گونه‌ها، علاوه بر خسارت کمی، از نظر کیفی نیز محصول را تحت تأثیر قرار داده و ارزش بازاری آن‌ها را کاهش می‌دهند. به طور کلی میزان پراکنش تغییرات ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها، ساختار ژنتیکی جمعیت را مشخص می‌کند. گونه رایزوکتونیا سولانی به لحاظ تنوع بالای ژنتیکی به گونه مرکب (*R. solani* complex) مشهور است (Moore, 1996). به علت نداشتن دانش ژنتیکی بنیادی درباره تغییرات ژنتیکی رایزوکتونیا سولانی درک ساختار جمعیتی آن بسیار مشکل است. دانستن این ژنتیک نیازمند درک جریان اطلاعات ژنتیکی درون و بین جمعیت‌هاست. نتایج به دست آمده از تفسیر DNA گونه پیچیده رایزوکتونیا سولانی به علت وجود گروه‌های آناستوموزی و بعضی از زیرگروه‌های گروه آناستوموزی واحدهای تکاملی مجزایی را نشان می‌دهد که به گونه‌های مجزا شباهت دارد که (Kuniniga 1996) واژه «گونه‌های ژنومیک» را برای آن به کار برده است. اگرچه *R. solani* به لحاظ اقتصادی، بیمارگر بسیار مهمی است ولی بررسی کمی روی ژن و ارتباط آن با شدت بیماری‌زایی صورت گرفته است (Lübeck, 2004). بیشترین مطالعات بیماری‌زایی رایزوکتونیا سولانی با نمونه‌های AG 1، AG 2، AG 3 و AG 4 انجام شده است (Marcus et al., 1986). گروه آناستوموزی چهار (AG 4) بسیاری از گونه‌های گیاهی مانند لوبیا، چغندر قند، سیب زمینی، یونجه، جو و کتان را آلوده می‌کند (Banville, 1989; Pitt, 1964, Sneh et al., 1991). *Rhizoctonia solani* برای اولین بار در ایران با جداسازی گروه آناستوموزی AG4² از میوه‌های پوسیده گوجه‌فرنگی گزارش شد (Rahimian, 1989). چهارده گروه آناستوموزی (AGs) شامل AG 1- AG 13 و AG-BI گزارش شده است (Carling et al., 1994). هفت گروه آناستوموزی (AG 1, AG 2, AG 3, AG 4, AG 6, AG 8, AG 9) بر اساس ظاهر کشت، مورفولوژی، دامنه میزبانی، شدت بیماری‌زایی، نیازمندی به تیامین و شدت ادغام هیف‌ها به زیرگروه‌هایی تقسیم می‌شوند (Ogoshi, 1987). زیر تقسیمات AG4، AG6 و AG9 بیش‌تر بر اساس هیبریداسیون DNA/DNA است در حالی که AG8 بر اساس پکتیک زایموگرام به زیر گروه بیشتر تقسیم بندی می‌شود. تعیین گروه آناستوموزی بیش از نیم قرن برای تشخیص

¹ De Candol² Anastomosis group

رایزوکتونیا سولانی به‌کار رفته است با این وجود مکانیسم آن هنوز به طور کامل شناخته نشده است (Lübeck, 2004). هیبریداسیون DNA-DNA که توسط کونیناگا و یوکوساوا (1984 a, 1984b) و ویلگالیس (1988) انجام گرفت میزان هتروژنی درون AG4 و AG6 که سابقاً مشخص نبود را معلوم کرد. میزان هیبریداسیون میان زیرگروه‌های G4 HGI و AG4 HGII، 30-47 درصد بود در حالی که میان زیرگروه‌های AG6 HGI و AG6 GV، 55-66 درصد بود (Kuninaga, 1996). AG4 نسبت به تیمین اتوتروف¹ است و بر اساس تفاوت در همولوژی DNA و تشکیل اسکروت به دو زیر گروه AG4-HG I و AG4-HG II تقسیم می‌گردد. AG4- HG I روی محیط کشت PDA² اسکروت‌هایی با رنگ قهوه‌ای تیره تولید کرده و همولوژی توالی DNA در آن 89-93% است، در حالی که اسکروت‌های AG4- HG II به رنگ قهوه‌ای روشن بوده و همولوژی DNA در آن بالاست و در حدود 93-100% است (Sneh et al., 1991). اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی، اساسی‌ترین جنبه علوم زیستی از قبیل اکولوژی، زیست‌شناسی تکاملی، رده‌بندی، زراعت، اصلاح و حفظ نباتات گیاهی به شمار می‌رود. در طول چند سال گذشته توسعه روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی برای اهداف سیستماتیکی به طور چشمگیری افزایش یافته است. این روش‌ها نظریه‌های تکاملی مربوط به روابط فیلوژنتیکی گونه‌های جنس پیچیده *Rhizoctonia* را دقیق‌تر و معمول‌تر می‌سازند. بنابراین سیستماتیک پیچیده *Rhizoctonia* در طول چند دهه گذشته روی مطالعات بیوشیمیایی (Jabaji-Hare, 1996) و مولکولی (Cubeta et al., 1996; González et al., 2001, 2002) متمرکز شده است. Jabaji-Hare (1996) از تکنیک‌های بیوشیمیایی مانند الگوهای پروتئین محلول³، ایزوآنزیم‌ها⁴، پکتیک زایموگرام‌ها⁵، آنالیزهای اسید چرب⁶، لکتین‌ها⁷ و آزمون‌های سرولوژیکی با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال و پلی‌کلونال⁸ به منظور هدف‌دهی سیستماتیکی و تعیین ارتباط فیلوژنتیکی در گونه‌های پیچیده رایزوکتونیا استفاده کرد. در میان این روش‌ها، آنالیزهای پکتیک زایموگرام و ایزوآنزیم‌ها برای شناسایی گروه‌های آناستوموزی یا بررسی ارتباطات ژنتیکی میان اعضای شبه جنس *Rhizoctonia* به خصوص گونه *R. solani* و گونه‌های دو هسته‌ای به‌کار رفته است. تکنیک‌های مولکولی، چند شکلی‌های درون ژنوم را مشخص و آن را در سطوح مختلف طبقه‌بندی می‌کند. توالی‌هایی از DNA که RNAهای ریپوزومی را کد می‌کنند نواحی مناسبی جهت بررسی روابط فیلوژنتیک و تاکسونومیک بین قارچ‌ها به حساب می‌آیند (Bruns et al., 1991). در قارچ‌ها ژن‌های ریپوزومی (rDNA) در داخل هسته و روی DNA میتوکندریایی قرار گرفته‌اند (White et al., 1990). ژن‌های ریپوزومی هسته‌ای در دو گروه 18s ویژه زیر واحد ریپوزومی کوچک (SSU)⁹ و 5.8s و 28s ویژه زیر واحد بزرگ ریپوزوم (LSU)¹⁰ قرار می‌گیرند. فاصله بین قطعات

¹ Autotroph

² Potato Dextrose Agar

³ soluble protein patterns

⁴ isoenzymes

⁵ pectic zymograms

⁶ fatty acids profiles

⁷ lectins

⁸ Monoclonal and polyclonal antibody

⁹ Small subunit

¹⁰ Large subunit

قطعات 18s و 28s را دو قطعه فاصله ساز داخلی¹ (ITS1 و ITS2) و یک قطعه 5.8s پرکرده است (Cubeta *et al.*, 1996). به نظر می‌رسد مناسب‌ترین روش برای طبقه‌بندی گونه‌های *Rhizoctonia* استفاده از آنالیز توالی‌یابی rDNA-ITS باشد.

5.8s rDNA در تمام گروه‌های آناستوموزی ثابت است در حالی‌که توالی ITS rDNA در میان تمام جدایه‌ها متغیر است. همولوژی توالی نواحی ITS در میان جدایه‌هایی که متعلق به یک زیرگروه مشابه باشند بالای 96% بوده و در میان جدایه‌های زیرگروه‌های مختلف یک گروه آناستوموزی 66-100% و برای گروه‌های آناستوموزی مختلف 55-96% است (Lübeck, 2004). کیلی کگلو و ازکوک² (2010) با بررسی ناحیه rDNA-ITS مربوط به 114 جدایه *R. solani* AG4 جدا شده از ریشه لوبیاهای استان‌های سواحل دریای سیاه تنوع ژنتیکی را در این گروه نشان دادند. *Rhizoctonia* فاقد صفات مورفولوژیک اختصاصی است و اندام بارده جنسی آن هم به ندرت در طبیعت تشکیل می‌گردد بنابراین تاکسونومی آن همواره با مشکلاتی رو به رو بوده است و استفاده از روش‌های مولکولی در کنار سایر روش‌ها به حل مشکلات تاکسونومی این قارچ تا حدودی کمک می‌کند. گاهی آناستوموز جدایه‌ها به علت تغییرات ژنتیکی، محیطی یا وضعیت غذایی ناموفق است و همچنین به علت وجود گروه‌های پل‌زننده³ تفسیر نتایج مشکل می‌شود بنابراین همیشه تعیین گروه آناستوموز بهترین روش بررسی ارتباط ژنتیکی نیست و استفاده از روش‌های مولکولی در کنار این روش توصیه می‌گردد. مطالعه ژنتیک جمعیت از نظر درک صحیح از چگونگی تکامل در پاسخ به روش‌های مختلف مبارزه و اتخاذ روش‌های مؤثر مدیریت بیمارگرها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (McDonald and Rovira, 1985). این تحقیق اطلاعات ژنتیکی پایه برای ایجاد چارچوبی مشخص از وضعیت تنوع ژنتیکی قارچ *R. solani* در استان اصفهان را فراهم ساخته است. با بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از مارکر مولکولی مناسب تا حدودی می‌تواند به حل مشکلات تاکسونومیکی این قارچ کمک کند. در این تحقیق با انتخاب نشانگر مناسب به مطالعه تنوع ژنتیکی در میان زیرگروه‌های یک جمعیت اختصاصی بیماری‌زا (*R. solani* AG4) با نشانگر rDNA RFLP پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

آماده سازی جدایه‌های قارچ و استخراج DNA

در این بررسی ابتدا 18 جدایه مزرعه‌ای از قارچ *R. solani* AG4 از ریشه و طوقه میزبان‌های متفاوت و در مناطق مختلف استان اصفهان جمع‌آوری شده و همچنین 10 جدایه استاندارد از دانشگاه صنعتی اصفهان دریافت شد.

¹ Internal transcribed spacer

² Kiliçoğlu and Özkoç

³ گاهی گروه‌های آناستوموزی متفاوت مانند AG-BI با جدایه‌های معین AG6، AG3، AG2 و AG8 واکنش می‌دهد که آن‌ها را گروه‌های پل‌زننده می‌نامند.

ویژگی‌های جدایه‌های مورد بررسی در جدول 1 آورده شده است. بعد از جمع‌آوری و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه تعیین گروه آناستوموزی جدایه‌ها، نیز انجام گرفت (Parmeter *et al.*, 1969).

جدول 1- جدایه‌های *Rhizoctonia solani* مورد استفاده در آنالیز rDNA

کد جدایه	گروه آناستوموزی	نام میزبان	بافت	محل جمع‌آوری
bean1	AG 4/HG II	لوبیا	ریشه و طوقه	فلاورجان
bean2	AG 4/HG II	لوبیا	ریشه و طوقه	فلاورجان
bean3	AG 4/HG II	لوبیا	ریشه و طوقه	فلاورجان
bean6	AG 4/HG II	لوبیا	ریشه و طوقه	فلاورجان
bean9	AG 4/HG II	لوبیا	ریشه و طوقه	فلاورجان
bean11	AG 4/HG II	لوبیا	ریشه و طوقه	فلاورجان
bean12	AG 4/HG II	لوبیا	ریشه و طوقه	فلاورجان
bean13	AG 4/HG II	لوبیا	ریشه و طوقه	فلاورجان
white-bean	AG 4/HG II	لوبیای سفید (چشم بلبلی)	ریشه و طوقه	اصفهان
tomato	AG 4/HG II	گوجه فرنگی	ریشه و طوقه	فلاورجان
alfalfa1	AG 4/HG II	یونجه	ریشه و طوقه	کرون و خوانسار
alfalfa2	AG 4/HG II	یونجه	ریشه و طوقه	کرون و خوانسار
alfalfa4	AG 4/HG II	یونجه	ریشه و طوقه	کرون و خوانسار
potato4	AG 4/HG II	سیب زمینی	ریشه و غده	کرون و چادگان
potato2-6	AG 4/ HG I	سیب زمینی	ریشه و غده	کرون و چادگان
sunflower	AG 4/HG II	آفتابگردان	ریشه و طوقه	کرون
radish	AG 4/HG II	تربچه	ریشه و طوقه	اصفهان
pepper	AG 4/HG II	لفل	ریشه و طوقه	اصفهان
137	AG 4/HG I	چغندر قند	-	مغان
168	AG 4/HG II	چغندر قند	-	خراسان
243	AG 4/HG I	چغندر قند	-	پیرانشهر
260	AG 4/HG I	چغندر قند	-	کرج
134H	AG 4/HG II	باقلا	ریشه	لرستان
CB2	AG 4/HG II	کدو	طوقه	لرستان - برن آباد
LR7	AG 4/HG II	لوبیا قرمز	غلاف	لرستان
E-K-R-14	AG 4/HG II	خیار	ریشه	دستگرد اصفهان
KH-3-S-6	AG 4/HG II	خیار	ریشه	جاده شوشتر
M-KH-S-3	AG 4/HG II	خریزه	خاک	گوهر باران (مازندران)

تهیه توده میسلیم

ابتدا از جدایه‌های مورد مطالعه، یک کشت جدید در محیط کشت PDA تهیه شده و ظروف پتری در دمای 25 درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور قرار گرفت. با تکمیل رشد از حاشیه فعال هر کلونی چند حلقه به قطر پنج میلی‌متر داخل فلاسک 250 میلی‌متری محتوی 100 میلی‌متر محیط کشت مایع سترون (سیب‌زمینی-دکستروز) منتقل شد. فلاسک‌ها با فویل پوشانده شده و به مدت پنج روز در دمای 25 درجه سانتی‌گراد در محیط ساکن و استریل در آزمایشگاه قرار داده شد. سپس توده میسلیمی حاصل از هر جدایه با بکارگیری کاغذ واتمن شماره یک و پمپ خلأ جمع‌آوری و با آب مقطر سترون شست و شو شد تا باقیمانده محیط غذایی از روی میسلیم شسته شود. با بکارگیری کاغذ صافی و دستمال کاغذی، میسلیم‌ها آگیری و درپوشش آلومینیومی قرار داده شده و تا مرحله استخراج DNA به فریزر با دمای -70 درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند.

استخراج DNA

مقدار 0/3 گرم از توده میسلیمی هر یک از جدایه‌های مورد مطالعه با ازت مایع پودر شده و سپس به پودر قارچ حدود پنج برابر وزن توده میسلیم (1/5ml) بافر استخراج¹ 50 ml Tris Hcl(1M) PH=8.5, 25 ml Nacl(5M), 25 ml EDTA(0.5M), 1.25gr SDS, add dd H₂O to 250 ml) به هر ظرف 2 میکرو لیتر مرکاپتواتانول برای شکستن پیوندهای دی سولفیدی اضافه و کاملاً مخلوط گردید. توده میسلیمی حدود یک دقیقه در هاون نرم شد تا حالت خمیری پیدا کند. نصف مخلوط حاصل (750μl) به میکرو تیوب اپندورف 1/5 میلی لیتری منتقل شد و نصف دیگر هر میکرو تیوب اپندورف (750μl) فنول کلروفرم به نسبت مساوی اضافه گردید. سپس به مدت پانزده دقیقه در دمای اتاق کاملاً مخلوط شد. میکرو تیوب‌ها به مدت 60 دقیقه در 14000 دور در دقیقه و در دمای اتاق، سانتریفیوژ شدند. محلول رویی به یک میکرو تیوب جدید انتقال یافته و هم حجم محتویات هر میکرو تیوب، مخلوط کلروفرم-ایزوامیل الکل (به نسبت 1:24) اضافه گردیده و به مدت پنج دقیقه کاملاً مخلوط شد. میکرو تیوب‌ها به مدت 10 دقیقه در 14000 دور در دقیقه، سانتریفیوژ شدند. محلول رویی به یک میکرو تیوب جدید انتقال یافته و معادل 0/54 حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه و به خوبی مخلوط گردید. در این هنگام کلاف‌های DNA به خوبی مشاهده شده و میکرو تیوب‌ها به مدت 10 دقیقه در دمای -20 درجه سانتی-گراد قرار گرفته و پس از آن به مدت چند ثانیه در 14000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل با 700

¹ SDS buffer

میکرو لیتر اتانول 70 درصد و منیزیم استات شستشو داده و به مدت 2 دقیقه در 14000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس این رسوب در 50 تا 100 میکرو لیتر بافر (1M Tris HCl PH=8, TE 200µl Na₂-EDTA pH=8) حل شد. نمونه‌ها به مدت 30 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار گرفت. سپس میکرو تیوب‌ها در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. خلوص و غلظت DNA استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

مواد مورد استفاده در PCR و نسبت‌های آن‌ها در حجم کلی 25 میکرو لیتر که پس از بهینه‌سازی‌های متعدد به دست آمده در جدول 2 آورده شده است. از آغازگر بالادست (ITS1) با توالی 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG (G-3' و آغازگر پائین دست (ITS4) با توالی 3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) در این آزمایش استفاده شد. چرخه‌های دمایی به کار رفته در PCR شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 دقیقه و سی و سه چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، اتصال در دمای 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه و بسط در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 50 ثانیه و در خاتمه یک چرخه بسط نهایی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 7 دقیقه بود.

جدول 2- مواد و نسبت‌های بهینه آن‌ها در جهت انجام PCR در حجم 25 میکرو لیتر

ماده	غلظت اولیه	حجم لازم	غلظت نهایی
بافر PCR	10X	2/5µl	1 X
MgCl ₂	50 mM	1/5 µl	3mM
dNTP mix	10 mM	0/5 µl	0/2mM
آغازگر رفت	10pmol	3 µl	1/2 pmol
آغازگر برگشت	10pmol	3 µl	1/2 pmol
DNA الگو	40-20ng/µl	3 µl	3/6 ng
Taq DNA polymerase	µl/ u5	0/ 3 µl	1/5 u
آب تزریقی	-	تا حجم 25 µl	-

ارزیابی محصول PCR

برای ارزیابی محصول PCR، این محصول روی ژل آگارز دو درصد بارگذاری شد. پنج میکرو لیتر از محصول هر یک از واکنش‌ها به همراه دو و نیم میکرو لیتر بافر بارگذاری به چاهک‌های ژل منتقل و الکتروفورز در بافر TBE و ولتاژ 90 ولت به مدت یک و نیم ساعت انجام شد. از نشانگر وزن مولکولی 100bp جهت تعیین اندازه قطعات

استفاده شد. ژل در محلول اتیدیوم بروماید ($0/5 \mu\text{g}/\text{ml}$) به مدت 20 دقیقه رنگ‌آمیزی و پس از شستشو با آب مقطر، با استفاده از دستگاه Gel Document و در معرض اشعه ^{1}UV مشاهده و از آن‌ها عکس برداری گردید.

هضم محصول PCR

از آنزیم‌های برش‌گر *Eco RI*, *Hinf I*, *Xho I*, *Hae III*, *Hinc II*, *Taq I*, *Bam HI*, *Hind III*, *Sac I* *Pst I*, *Nde I*, *Xba I* برای هضم قطعات DNA تکثیر شده استفاده شد. هر واکنش هضم شامل 4 میکرو لیتر محصول PCR، 4 میکرو لیتر آب مقطر سترون دو بار تقطیر، 2 میکرو لیتر بافر واکنش 10 X مخصوص هر آنزیم برشی و یک واحد آنزیم برشی (با غلظت $1\text{u}/\mu\text{l}$) بود. برای تمام آنزیم‌ها، هضم به مدت یک ساعت در دمای 37°C انجام شد (بجز واکنش‌های *Taq I* که در 65°C صورت گرفت). نمونه‌های هضم شده تا زمان الکتروفورز در 20°C نگهداری شدند.

ارزیابی و مقایسه محصولات هضم

ده میکرو لیتر از محصول هضم به همراه $2 \mu\text{l}$ بافر بارگذاری در چاهک ژل آگارز 2% ریخته شده و الکتروفورز در ولتاژ 75 ولت برای 2 ساعت انجام گردید. از نشانگر وزن مولکولی 100 bp برای تعیین اندازه قطعات استفاده شد. رنگ آمیزی و مشاهده قطعات مانند قبل انجام گرفت.

ترسیم دندروگرام

دو جدایه استاندارد 137 و CB2 که متعلق به زیرگروه‌های متفاوتی بودند، تعیین توالی و به ترتیب با کدهای JX965000 و JX965001 در Gene Bank ثبت و سپس با تعدادی از توالی‌های موجود در Gene Bank, NCBI مقایسه شدند (جدول 3). دندروگرام روابط فیلوژنتیکی با نرم افزار MEGA4 به روش نزدیک‌ترین همسایه² ترسیم شد.

جدول 3- توالی‌های گرفته شده از GenBank و استفاده شده برای آنالیزهای ژنتیکی در این تحقیق

تعداد جفت بازی	کد در GenBank	گروه آناستوموزی
697 bp	HQ629873.1	AG4-HGII ND13
678 bp	HQ629872.1	AG4-HGII ND12
684 bp	HQ629868.1	AG4-HGII ND8
684 bp	HQ629866.1	AG4-HGII ND6
679 bp	JX965001	AG4-HGII FB1(CB2)
656 bp	JX965000	AG4-HGI FB2(137)
654 bp	AY154307.1	AG4-HGI
665 bp	JQ343830.1	AG4-HG-1

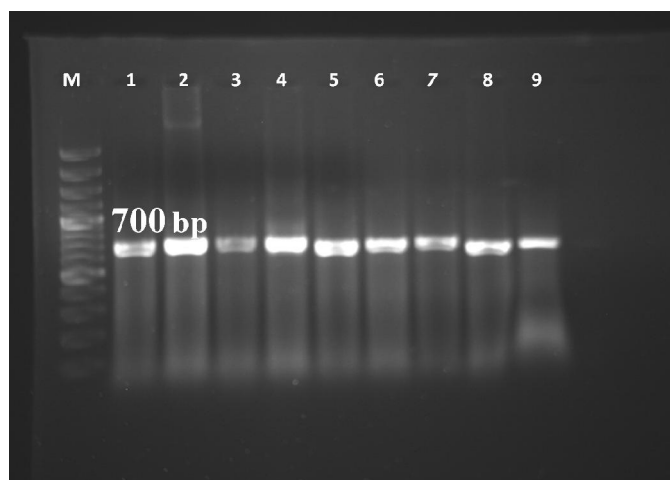
¹ Ultra Violet

² Nearest Neighbor

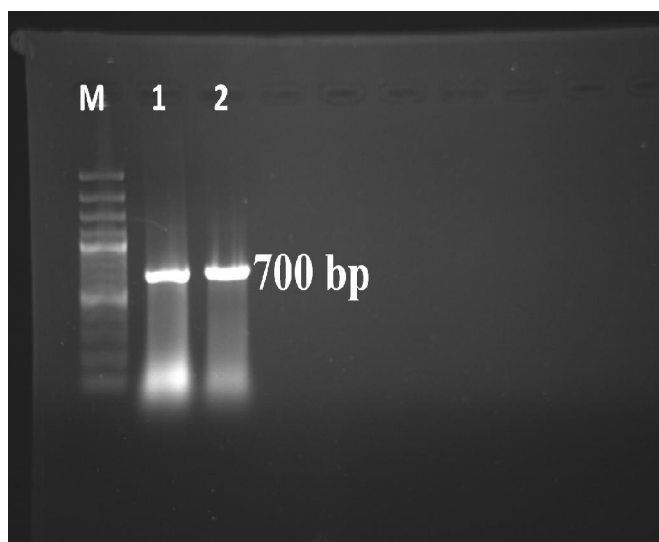
نتایج

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

با الکتروفورز محصول تکثیر شده از DNA جدایه‌های مختلف با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 روی ژل آگارز دو درصد یک قطعه DNA با اندازه یکسان و بزرگی تقریبی 700 جفت بازی دیده شد (شکل 1).



شکل 1a- محصولات PCR به دست آمده از تکثیر نواحی ITS rDNA. چاهک‌های 1 تا 9 به ترتیب مربوط به جدایه‌های alfalfa1، bean2، bean3، alfalfa2، alfalfa4، alfalfa2، bean6، bean13، alfalfa2 و ستون M شاخص وزن مولکولی (100 bp DNA Ladder) هستند.



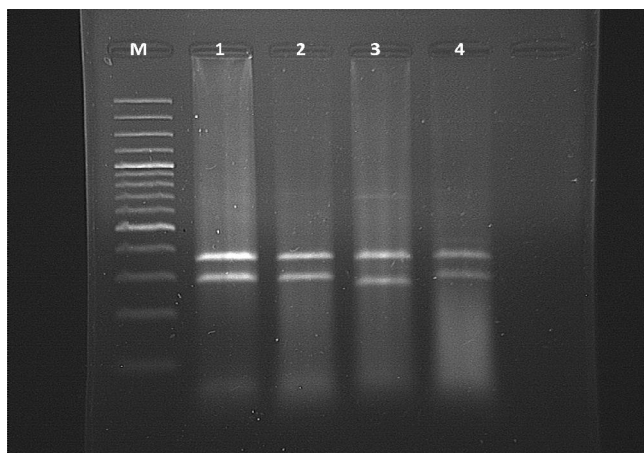
شکل 1b- نقوش بانندی محصولات PCR. ستون M شاخص وزن مولکولی (100 bp DNA Ladder)، 1، جدایه استاندارد 137، 2، جدایه استاندارد CB2.

مقایسه اثر آنزیم‌های برشگر روی محصول DNA

در تیمار محصولات PCR با آنزیم‌های برشگر، آنزیم‌های *HaeIII* و *HinfI*، *TaqI*، *HincII*، *EcoRI*، *PstI*، *SacI*، *XhoI*، *HindIII*، *BamHI* و *NdeI* فاقد محل شناسایی و برش بودند. نتایج به دست آمده از تیمار محصول با آنزیم‌های هضم‌کننده به شرح زیر می‌باشد:

محصول برش با آنزیم *Taq I*

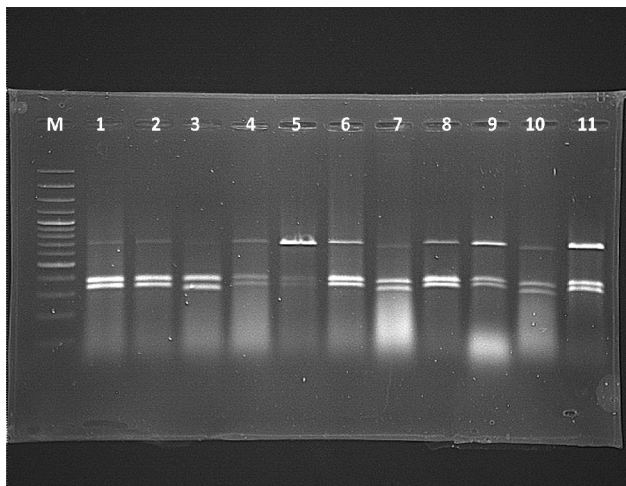
در هضم DNA تکثیر شده، جدایه‌های مختلف با *Taq I* محصول PCR به دو قطعه شکسته شد. این دو قطعه در تمامی جدایه‌ها مشابه بود. نقوش باندهای به دست آمده بین جدایه‌ها یکسان بوده و تفاوتی بین جدایه‌ها مشهود نبود (شکل 2).



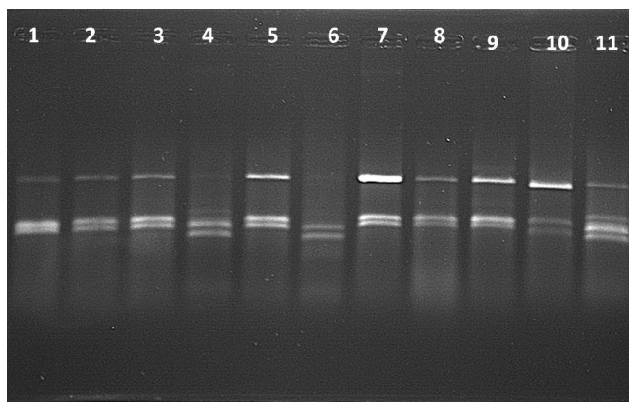
شکل 2- نقوش باندهای محصولات PCR هضم شده با آنزیم برشگر *TaqI* روی ژل آگارز 2% رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. چاهک‌های 1 تا 4 به ترتیب مربوط به جدایه‌های 243، 260، M-KH-S-3، 137 و M شاخص وزن مولکولی 100bp هستند.

محصول برش با آنزیم *EcoRI*

در نتیجه هضم آنزیمی محصول PCR، دو قطعه با طول متفاوت به دست آمد (شکل 3).



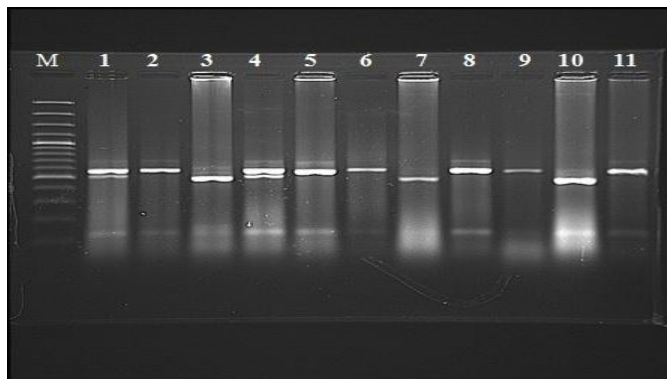
شکل 3a- نقوش باندهای محصولات PCR هضم شده با آنزیم برشگر *EcoRI* روی ژل آگارز 2% رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. چاهک‌های 1 تا 11 به ترتیب مربوط به جدایه‌های 168, E-K-R-14, CB2, 134 H, 137, M-KH-s-3, 260, 243, bean12, KH-3-S-6, LR7 و M شاخص وزن مولکولی (100 bp DNA Ladder) هستند.



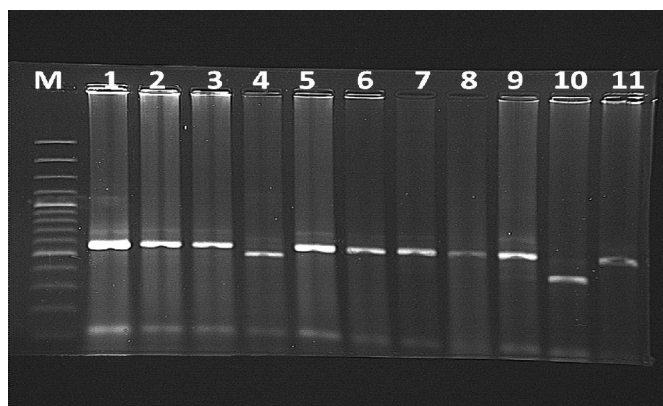
شکل 3b- چاهک‌های 1 تا 11 به ترتیب مربوط به جدایه‌های bean11, alfalfa1, bean9, radish, potato4, bean3, potato2-6, alfalfa2 و alfalfa4 هستند.

محصول برش با آنزیم *HaeIII*

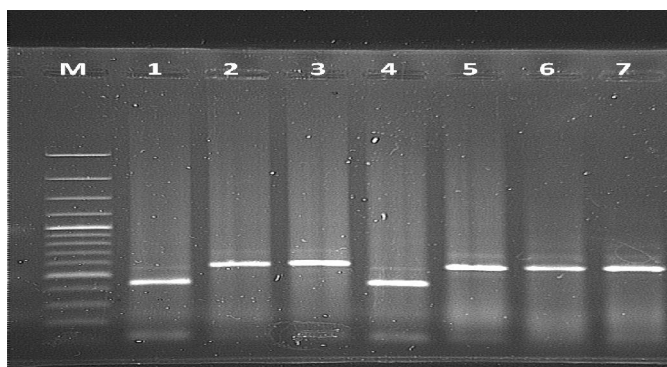
در هضم محصول PCR با آنزیم *Hae III* قطعاتی با اندازه متفاوت تولید شد و طول قطعات حاصله در تمامی جدایه‌ها متفاوت بود (شکل 4).



شکل 4a- نقوش باندهای محصولات PCR هضم شده با آنزیم برشگر *HaeIII* روی ژل آگارز 2% رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. چاهک‌های 1 تا 11 به ترتیب مربوط به جدایه‌های 243، 260، M-KH-s-3، 137، 134 H، CB2، E-K-R-14، bean12، KH-3-s-6، 10، LR7، 168 و ستون M شاخص وزن مولکولی (100 bp DNA Ladder) هستند.



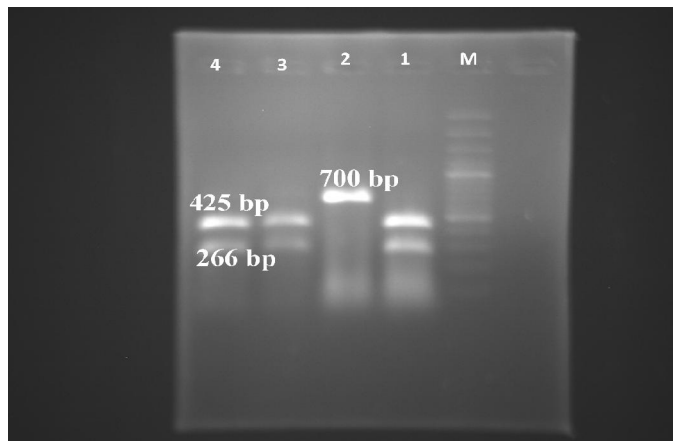
شکل 4b- چاهک‌های 1 تا 11 به ترتیب مربوط به جدایه‌های potato2-6، bean3، potato4، radish، bean9، alfalfa، alfalfa2، alfalfa4، bean1، bean2، bean11 و ستون M شاخص وزن مولکولی (100 bp DNA Ladder) هستند.



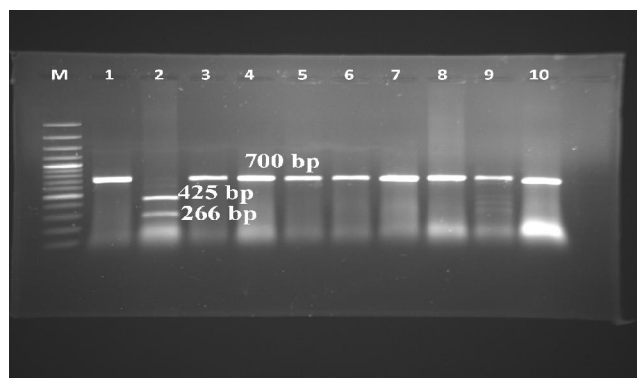
شکل 4c- چاهک‌های 1 تا 7 به ترتیب مربوط به جدایه‌های alfalfa2، alfalfa4، bean6، bean13، white، tomato، pepper، bean و ستون M نشان‌گر وزن مولکولی (100 جفت باز) هستند.

محصول برش با آنزیم *HincII*

در هضم محصول PCR با آنزیم *HincII* تنها یک نقطه برش در میان جدایه‌های AG4 HGI تشخیص داده شد. طول قطعات حاصله 425 و 266 جفت بازی بود. جدایه‌های AG4 HGII توسط این آنزیم هضم نشدند (شکل 5).



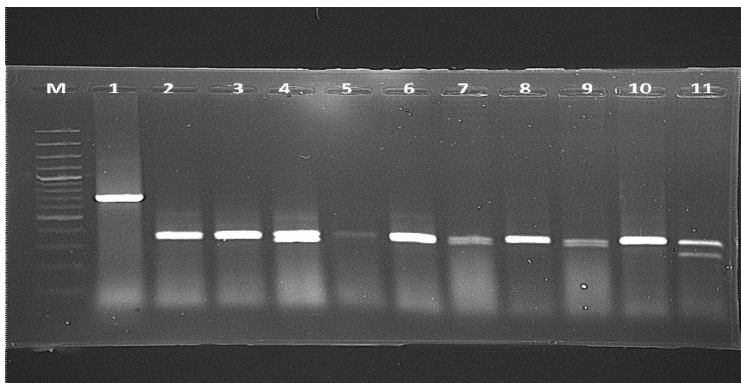
شکل 5a- نقوش باندهای محصولات PCR هضم شده با آنزیم برشگر *HincII* روی ژل آگارز 2% رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. چاهک‌های 1 تا 4 به ترتیب مربوط به جدایه‌های 137، CB2، 260، 243 و ستون M شاخص وزن مولکولی (100 bp DNA Ladder) هستند.



شکل 5b- چاهک‌های 1 تا 10 به ترتیب مربوط به جدایه‌های bean12، potato2-6، bean3، potato4، radish، bean9، alfalfa، bean11، bean2، KH-3-S-6 و ستون M شاخص وزن مولکولی (100 bp DNA Ladder) هستند.

محصول برش با آنزیم *HinfI*

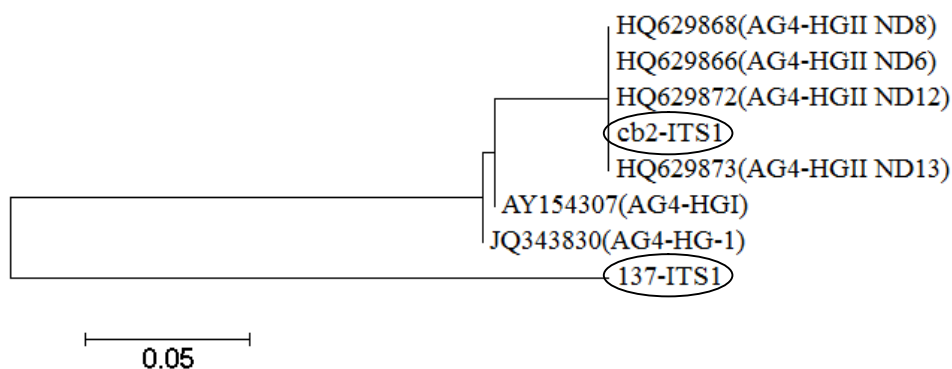
محصول در شکل 6 نشان داده شده است.



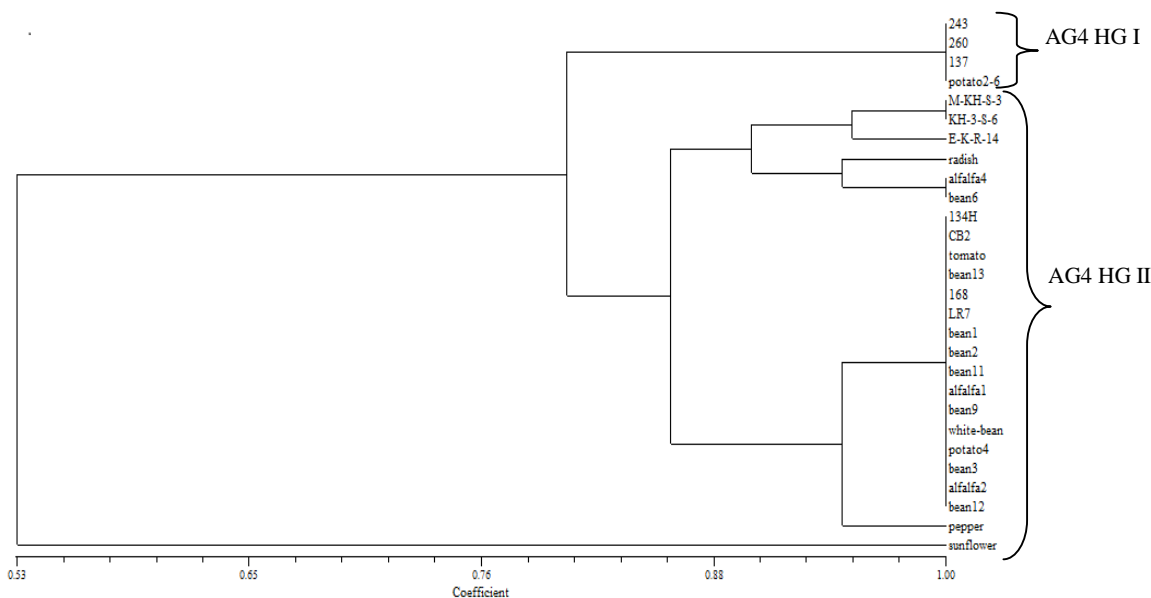
شکل 6- نقوش باندهای محصولات PCR هضم شده با آنزیم *HinfI* روی ژل آگارز 2% رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. چاهک‌های 1 تا 11 به ترتیب مربوط به جدایه‌های شاهد (فاقد آنزیم) CB2، 243، 260، M-KH-S-3، 137، E-K-14، R-14، 168، 8، LR7، KH-3-S-6، bean12، potato2-6، وستون M شاخص وزن مولکولی (100 bp DNA Ladder) هستند.

آنزیم‌های *NdeI*، *XbaI*، *BamHI*، *XhoI*، *HindIII*، *SacI*، *PstI* فاقد محل شناسایی و برش بودند.

درخت فیلوژنی قارچ *R. solani* AG4 بر اساس آنالیزهای توالی‌یابی rDNA ITS با استفاده از روش نزدیک‌ترین همسایه و نرم افزار مگا 4 در شکل 7 نشان داده شده است. تنوع ژنتیکی میان ایزوله‌های *R. solani* AG4 بر اساس آنالیزهای rDNA ITS-RFLP با استفاده از ضریب تشابه Simple matching (SM) در شکل 8 مشخص شده است.



شکل 7- رسم درخت فیلوژنی قارچ *R. solani* AG4 بر اساس آنالیزهای توالی‌یابی rDNA ITS با استفاده از روش نزدیک‌ترین همسایه و نرم افزار مگا 4. دو نمونه 137 و CB2 که برش‌های آنزیمی بوسیله آنزیم *Hinc II* تعلق آن‌ها را به زیرگروه‌های AG4 HGII و AG4 HGI نشان داده بود تعیین توالی و با تعدادی از توالی‌های موجود در Gene Bank, NCBI مقایسه شدند.



شکل 8 روش UPGMA جهت بررسی تنوع ژنتیکی میان ایزوله‌های *R. solani* AG4 بر اساس آنالیزهای rDNA ITS- RFLP با استفاده از ضریب تشابه Simple matching (SM) و نرم افزار NTSYS. نخستین کلاد جدایه‌های متعلق به زیر گروه AG4 HGI و سایر کلادها AG4 HGII را نشان می‌دهد.

بحث

با مقایسه آنالیز توالی‌های ITS می‌توان به زیر گروه‌های بیشتری بر اساس تنوع ژنتیکی برای *R. solani* AG4 دست یافت (Kiliçoğlu and Özkoç, 2010). بوینسن و همکاران (1996)¹ بر اساس آنالیز توالی ITS جدایه‌های AG4 را به سه زیر گروه (HG I, HG II, HG III) طبقه‌بندی نمودند (Kuninaga, 1997). آنالیز فیلوژنتیکی نیز نشان داد که جدایه‌های AG 4 بسته به شرایط اکولوژیکی² و بیماری‌زایی³ به سه زیرگروه تقسیم می‌شوند (Kuninaga, 1997). مطالعات بیماری‌زایی نشان داده که جدایه‌های *R. solani* AG4 باعث بیماری در گیاهان مختلف می‌شوند و بسته به نوع گیاه شدت بیماری‌زایی متفاوتی دارند (Kiliçoğlu and Özkoç, 2010). تمامی نمونه‌های به دست آمده از میزبان‌های مختلف قادر به آلودگی سایر میزبان‌ها از همان نوع حتی با شدت بالاتر از میزبان اصلی خود هستند که با اختصاصی شدن میزبان مطابقت دارد (هراتیان⁴ و همکاران 2012). گروه آناستوموزی 4 در ایران نسبت به سایر گروه‌های آناستوموزی دامنه میزبانی، تنوع ژنتیکی و شدت بیماری‌زایی بالایی دارد به طوری که در اکثر نقاط مورد مطالعه آلودگی ریشه و طوقه محصولات زراعی مختلف به خصوص لوبیا و سیب زمینی و یونجه مشاهده شد. در بررسی‌های متعدد انجام شده روی جدایه‌های لوبیا مشخص شد که تمامی جدایه‌ها مربوط

¹ Boysen

² Ecological habitat

³ Virulence

⁴ Haratian

به گروه آناستوموزی چهار هستند (Meinhardt *et al.*, 2002; Balali and Kowsari, 2004; Kiliçoğlu and Özkoç, 2010). بر اساس نتایج Kiliçoğlu and Özkoç (2010) در نواحی سواحل دریای سیاه در ترکیه هر دو زیر گروه *R. solani* AG4 می‌تواند باعث بیماری در لوبیا شود ولی بیشتر توسط AG4HG I آلوده می‌شوند. مینهاردت و همکاران 2002 نیز در برزیل نشان دادند که تمامی جدایه‌های به دست آمده از لوبیا متعلق به AG4HG I بودند. در چغندر قند نیز هر دو زیر گروه *R. solani* AG4 می‌تواند باعث بیماری شود ولی بر اساس نتایج کونیناگا 1997 بیشتر جدایه‌ها مربوط به AG4 HG II بودند. پانکوک¹ و همکاران (2008) جدایه‌های رایزوکتونیا سولانی مختلف را جداسازی کردند و مشخص شد که تمامی جدایه‌ها AG4 متعلق به زیرگروه AG4 HGII هستند. در جدایه‌های AG4 هتروکاریونی توسط یک لوکوس ژنی چند آلی به نام H-فاکتور کنترل می‌شود که هتروکاریونی می‌تواند به طور مستقیم یا غیرمستقیم با بیماری‌زایی جدایه‌های AG4 در ارتباط باشد (Puhalla and Carter, 1976). رنگ کلونی‌ها روی محیط کشت PDA قهوه‌ای تیره (HG I) و قهوه‌ای روشن (HG II) را نشان می‌دهد (Kiliçoğlu and Özkoç, 2010). شدت ادغام هیف‌ها در تمامی جدایه‌های متعلق به AG4 و زیرگروه‌های آن (HG I, HG II) کم و نوع آن C2 با میزان ادغام شدگی 30-50 درصد است و زیرگروه‌های *R. solani* AG4 با واکنش آناستوموز متمایز نمی‌شوند (Kiliçoğlu and Özkoç, 2010). AG4 دارای تولید مثل جنسی و سیستم آمیزشی هتروتالی است (Lübeck, 2004). نسل ایجاد شده از طریق آمیزش جنسی هتروتالیک به علت رخ دادن نوترکیبی، هسته متفاوت از والدین دارند و می‌تواند باعث تنوع ژنتیکی شود (Tylor *et al.*, 1999). ژنوتیپ‌های جدید ظاهراً به وسیله نوترکیبی جنسی ایجاد می‌شوند. یک ترکیب ژنی مطلوب ایجاد می‌شود سپس انتخاب طبیعی روی آن عمل کرده و با تولیدمثل غیر جنسی افزایش می‌یابد و فراوانی آن بالا می‌رود (Rosewich *et al.*, 1999). بنابراین فاصله بین این زیرگروه‌ها به مرور زمان افزایش یافته و امکان تبدیل آن‌ها به گروه‌های جدید و مستقل وجود دارد چنان‌که *R. solani* AG4 به عنوان یک گونه مجزا شناخته می‌شود (Anderson, 1982). تکنیک RFLP برای آنالیز ITS نواحی DNA ریپوزومی تعداد زیادی جدایه رایزوکتونیا سولانی روشی سریع و دقیق است (Guillemaut *et al.*, 2003). آنزیم *Hinc* II به تنهایی می‌تواند جدایه‌های AG4 را از یکدیگر متمایز کند (Guillemaut *et al.*, 2003). آنزیم *Mse* I می‌تواند بین جدایه‌های AG4HG I و AG4HG II تمایز قائل شود و همچنین الگوهای RFLP ناهمگنی برای AG4HG I ایجاد می‌کند که نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی در این زیرگروه است که نیاز به بررسی با آنالیز توالی‌یابی دارد (Meinhardt *et al.*, 2002). علاوه بر دو آنزیم فوق، *Ava* II نیز می‌تواند بین زیرگروه‌های AG4 تمایز قائل شود (Kiliçoğlu and Özkoç, 2010). در این تحقیق ناحیه rDNA-ITS مربوط به 28 جدایه *R. solani* AG4 جداسازی شده از میزبان و مکان‌های مختلف به‌وسیله تکنیک PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند. از پرایمرهای ITS1 و ITS4 برای تکثیر نواحی ITS1-5.8S-ITS2 استفاده شد و باندهایی به طول تقریبی 700 جفت بازی به دست آمد. از آنزیم‌های اندونوکلازای مانند *Taq* I, *Xba* I, *Hae* III, *Bam* HI, *Hind* III, *Sac* I, *Pst* I, *Nde* I, *Xho* I, *Hinc* II, *Hinf* I, *Eco* RI استفاده شد و مشخص شد که آنزیم‌های *Taq* I, *Hinc* II, *Hinf* I, *Hae* III, *Eco* R I برای جدایه-

¹ Pannecouque

های AG4 جایگاه برش داشتند و آنزیم *Hinc II* به تنهایی قادر به جداسازی جدایه‌های AG4 HGI و AG4 HGII از یکدیگر است. آنزیم *Hinc II* تنها برای جدایه‌های AG4 HGI *Rhizoctonia solani* جایگاه برش دارد و قطعاتی به طول‌های 266 و 425 جفت بازی ایجاد می‌کند ولی برای AG4 HG II فاقد برش است. نتایج به دست آمده از آنزیم *Hinc II* با نتایج گیلومت¹ و همکاران 2003 کاملاً مطابقت داشت. آنزیم‌های اندونکلئازی *Xba I*, *Bam HI*, *Hind III*, *Sac I*, *Pst I*, *Nde I*, *Xho I* برای جدایه‌های AG4 فاقد محل شناسایی و برش بودند. از تعیین توالی دو نمونه متعلق به زیرگروه‌های متفاوت نیز برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده از این تحقیق اگرچه آنزیم‌های *Eco RI* و *Hinf I*, *Hae III*, *Taq I* برای *R. solani* AG4 جایگاه برش داشتند (نتایج در بالا آورده شده است) ولی تنها آنزیم *Hinc II* قادر به جداسازی جدایه‌ها از همدیگر است. در کنار این آنزیم استفاده از سایر آنزیم‌هایی که قادر به تمایز بین زیرگروه‌ها هستند از جمله *Mse I* و *Ava II* برای بررسی و جدا سازی زیرگروه‌ها از یکدیگر و بررسی تنوع ژنتیکی توصیه می‌شود. این تحقیق نشان می‌دهد که می‌توان به جای آزمایش پیوند ریشه‌های رویشی که نیاز به تکرار و زمان دارد از روش مولکولی که منجر به تفکیک سریع و مطمئن این گروه‌ها می‌گردد، استفاده نمود. در انطباق توالی‌های نمونه‌های CB2 و 137 می‌توان تغییرات ژنتیکی را مشاهده کرد و نتایج حاصل از رسم درخت فیلوژنی حاصل از انطباق توالی و برش آنزیمی نشان می‌دهد که این دو نمونه در کلادهای مجزا قرار می‌گیرند. بنابراین باید از لحاظ ترتیب قرار گرفتن نوکلئوتیدها متفاوت باشند. گاهی تغییرات ژنتیکی در جایگاه برشی آنزیم‌های محدود کننده باعث می‌شود که یک آنزیم واحد برای یک زیر گروه دارای جایگاه برش باشد ولی برای زیرگروه دیگر فاقد جایگاه برش باشد. چنین آنزیمی می‌تواند دارای قدرت تفکیک برای زیرگروه‌ها باشد. در این بررسی آنزیم‌های برش‌گر *Hinf I* و *Hae III* در الگوهای هضم نایکنواختی نشان دادند که شناساگر و همکاران (Schneider et al., 1997) وجود نایکنواختی در الگوهای هضم را به طبیعت هتروکاریوتیک رازیوکتونیا سولانی مرتبط دانستند. وجود هسته‌ای که با سایر هسته‌های هیف قدری تفاوت داشته باشد. منشا هتروکاریون می‌تواند پدیده پل² بین جدایه‌ها و یا تنوع ژنتیکی حاصل از مرحله جنسی باشد که نیاز به بررسی بیشتر دارد. نکته قابل توجه دیگر که به این نایکنواختی دامن می‌زند، وجود کروموزوم‌های مختلف با توالی‌های ITS متفاوت است (Schneider et al., 1997). با توجه به نتایج هراتیان و همکاران (2012) تمایز جدایه‌ها در سطح ITS-rDNA با شدت بیماری‌زایی آن‌ها ارتباط ندارد بنابراین مطالعه ژنتیکی این گروه به وسیله مشخص نمودن ارتباط بین ژنوم و شدت بیماری‌زایی به کمک سایر متدهای مولکولی مانند بررسی توالی‌های بتا توبولین، فاکتور طولیل کنندگی آلفا-1، کالمودولین، کیتین سینتاز، اکتین) می‌تواند کمک زیادی به شناخت بهتر آن و به‌کارگیری استراتژی‌های بهتر برای ایجاد محصولات با آسیب‌های کمتر نسبت به این قارچ ایجاد نماید و اهمیت مطالعه‌های ژنتیکی و مولکولی آن را روشن‌تر سازد. به موضوع‌هایی از قبیل ارتباط ژنتیکی میان جمعیت‌ها، جریان ژنی و تقسیم‌بندی جمعیت‌های آن به بخش‌های کوچک‌تر بیشتر پرداخته شود و این اطلاعات جمعیتی را با داشتن اطلاعات روی گروه‌های

¹ Guillemaut² Bridging phenomenon

آناستوموزی یا مفاهیم زیست شناختی گونه تکمیل نمود. بررسی بیشتر با استفاده از توالی‌یابی rDNA ITS برای بررسی تنوع ژنتیکی بیشتر و دقیق‌تر در میان زیرگروه‌های این قارچ کمک می‌کند.

سپاسگزاری

از دوستان خوبم خانم‌ها مرضیه حمیدی وزهرا صادقی که در تمامی مراحل آزمایش همراهم بودند و راهنمایی خود را از من دریغ نداشتند مراتب قدردانی و تشکر را دارم.

References

1. Anderson NA. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Annual Review of Phytopathology 20: 329–347.
2. Balali G and Kowsari M, 2004. Pectic zymogram variation and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-4 to bean (*Phaseolus vulgaris*) isolates in Isfahan, Iran. Mycopathologia 158: 377–384.
3. Boysen M, Borja M, Del Moral C, Salazar O and Rubio V. 1996. Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG4 isolates by direct sequence of asymmetric PCR products of the ITS regions. Current Genetics 29: 174–181.
4. Bruns TD, White TJ and Taylor JW. 1991. Fungal molecular systematics. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 22: 525–564.
5. Cubeta MA, Vilgalys R and González D. 1996. Molecular analysis of ribosomal RNA genes in *Rhizoctonia* fungi. pp. 81–86, In B Sneh, S Jabaji-Hare, S Neate and G Dijst (eds). *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
6. González D, Carling DE, Kuninaga S, Vilgalys R and Cubeta MA. 2001. Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. Mycologia 93: 1138–1150.
7. González D, Cubeta MA and Vilgalys R. 2006. Phylogenetic utility of indels within ribosomal DNA and β -tubulin sequences from fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex. Molecular Phylogenetics and Evolution 40: 459–470.
8. González V, Salazar O, Julián MC, Acero J, Portal MA, Muñoz R, López-Córcoles H, Gómez-Acebo E, López-Fuster P and Rubio V. 2002. *Ceratobasidium albasitensis*, a new *Rhizoctonia*-like fungus isolated in Spain. Persoonia 17: 601–614.
9. Guillemaut C, Edel-Herman V, Comporota P, Alabouvette C, Richard-Molard M and Steinberg C. 2003. Typing of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by restriction analysis of ribosomal DNA. Canadian Journal of Microbiology 49: 556–568.
10. Haratian M. 2012. Evaluation genetic structure populations *Rhizoctonia solani* AG4 in Iran [PhD]. [Tehran]: Tarbiat Modares University.

11. Jabaji-Hare S. 1996. Biochemical methods. pp. 65–71, *In* B Sneh, S Jabaji-Hare, S Neate and G Dijst (eds). *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
12. Kiliçoğlu Mc and Özkoç I. 2010. Molecular characterization of *Rhizoctonia solani* AG4 using PCR-RFLP of the rDNA-ITS region. Turkish. Journal of Biology 34: 261–269.
13. Kuninaga S 1996. DNA base sequence relatedness. pp. 74–78, *In Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. (B Sneh, S Jabaji-Hare, S Neate and G Dijst (eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
14. Kuninaga S and Yokosawa R. 1984a. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Ktihn. IV. Genetic relatedness within AG4. Annals of the Phytopathological society of Japan 50: 322–330.
15. Kuninaga S and Yokosawa R. 1984b. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Ktihn. V. Genetic relatedness within AG6. Annals of the Phytopathological society of Japan 50: 346–352.
16. Lübeck M. 2004. Molecular characterization of *Rhizoctonia solani*. Applied Mycology and Biotechnology 4: 205–224.
17. McDonald HJ and Rovira AD. 1985. Development of inoculation technique for *Rhizoctonia solani* and its application to screening cereal cultivars for resistance. pp. 174–176, *In* CA Parker, AD Rovira, KJ Moore, PTW Wong and JF Kollmorgen (eds.). Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens. St. Paul (MN): American Phytopathological Society.
18. Meinhardt LW, Wulff NA, Bellato CM and Tsai SM. 2002. Genetic analyses of *Rhizoctonia solani* isolates from *Phaseolus vulgaris* grown in the Atlantic rainforest region of Sao Paulo, Brazil. Fitopatologia Brasileira 27: 259–267.
19. Menzies JD. 1970 Introduction: The first century of *Rhizoctonia solani*. pp. 3–5 *In* Parmeter JR (ed.). *Rhizoctonia solani*: Biology and Pathology. Berkeley (CA): University of California Press.
20. Moore RT. 1996. The dolipore/parenthesome septum in modern taxonomy. pp. 13–35, *In* B Sneh, S Jabaji-Hare, S Neate and G Dijst (eds). *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
21. Pannecoucq J, Van Beneden S and Hofte M. 2008. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* isolates associated with cauliflower in Belgium. Plant Pathology 57: 737–746.
22. Parmeter JR and Whitney HS. 1970. Taxonomy and nomenclature of the perfect state. pp. 7–19 *In* Parmeter JR (ed.). *Rhizoctonia solani*: Biology and Pathology. Berkeley (CA): University of California Press.
23. Parmeter JR, Sherwood, RT and Platt WD. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology 59: 1270–1278.
24. Puhalla J and Carter W. 1976. The role of the H locus in heterokaryosis in *Rhizoctonia solani* [from soil of a cotton field, fungal diseases]. Phytopathology 66: 1348–1353.
25. Rahimian H. 1986. *Rhizoctonia* soil rot of tomato. Paper presented at: 8th Iranian Plant Protection Congress; 30 August-4 September; Isfahan, Iran.

26. Rosewich UL, Pettway RE, McDonald BA and Kistler HC. 1999. High levels of gene flow and heterozygote excess characterize *Rhizoctonia solani* AG 1-1A (*Thanatephorus cucumeris*) from Texas. *Fungal Genetics Biology* 28: 148–159.
27. Schneider J, 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 I and Ogoshi A (eds). 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. St. Paul (Mn): American Phytopathology Society Press.
29. Taylor JW, Jacobsen DJ and Fisher MC. 1999. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. *Annual Review Phytopathology* 37: 197–246.
30. Vilgalys R and Cubeta M. 1994. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Annual Review of Phytopathology* 32: 135–155.
31. Vilgalys R and Gonzalez D. 1990. Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 80: 151–158.
32. Vilgalys R. 1988. Genetic relatedness among anastomosis groups in *Rhizoctonia* as measured by DNA/DNA hybridization. *Phytopathology* 78: 698–702.
33. Visscher H, Sephton MA and Looy CV. 2011. Fungal virulence at the time of the end-Permian biosphere crisis? *Geology* 39: 883–886.
34. White TJ, Burns T, Lee S and Talor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp 315–322, In MA Innis (ed). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego (CA): Academic Press.

Study on DNA polymorphism in populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 4 using rDNA RFLP

F. Badpa*¹, G.R. Balali², B. Sharifnabi³

Abstract

Ribosomal DNA (rDNA) sequences have been widely used to study the phylogenetic relationships in different fungi. Fungal nuclear rRNA genes are arranged as tandem repeats with several hundred copies per genome. These spacer regions are considerably more variable than the subunit sequences and have been widely used in studies on the relationships among species within a single genus or among intraspecific populations. To evaluate the polymorphism between 18S and 28S genes, 28 isolates of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 4 were examined. Genomic DNA was extracted from the isolates and prepared for PCR reaction. The amplification was performed using internal transcribed spacer (ITS) ITS1 and ITS4 primers. A DNA fragment of 700 bp in size was detected in PCR products of all tested isolates. To assess existence of any further polymorphism in the ITS region, the PCR products were digested with restriction endonucleases. Although there were restriction sites for *Xba*I, *Hae*III, *Bam*HI, *Hind*III, *Sac*I, *Pst*I, and *Taq*I endonucleases, there were no restriction sites for *Nde*I, *Xho*I, *Hinc*II, *Hinf*I, *Eco*RI and *Xho*I endonucleases. The endonuclease *Hinc*II recognized a restriction site on PCR products that discriminated the isolates belonging to AG4-HGII form isolates of AG4-HGI. Based on the results, it has been concluded that AG-4 isolates of *Rhizoctonia solani* were heterogenic.

Keywords: Genetic diversity, ITS-rDNA, PCR, *Rhizoctonia solani* AG4.

¹ - Former MSc student, Department of Biology, Isfahan University, Isfahan, Iran.

² - Associate professor, Department of Biology, Isfahan University, Isfahan, Iran.

³ - Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

*Corresponding author: badpafarzaneh@yahoo.com