تجزیه و تحلیل آللی جایگاه‌های ریزماهواره ای جمعیت‌های *Rhizoctonia solani* AG-1 IA در شالیزارهای برنج سه منطقه در شمال ایران*

Allele analysis of microsatellite loci in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA populations from paddy fields of three locations in northern Iran

فریدون پاداشت‌دهکایی[1**]، مارچلو زالا[2]، محمد جوان‌نیکخواه[3]، پالو سرزینی[4و2]، سیدمحمود اخوت[3] و بروس مک‌دونالد[2]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۱۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۹)

چکیده

شش جمعیت از *Rhizoctonia solani* AG-1 IA از سه مزرعه برنج با آلودگی طبیعی در مناطق رشت، تنکابن و آمل در شمال ایران نمونه برداری شد. تجزیه و تحلیل آللی با استفاده از آغازگرهای فلورسنت در نه جایگاه ریز ماهواره ای انجام شد. طیف فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها به ترتیب از ۰/۰۰۲ تا ۰/۹۶۲ و از ۰/۴۰ تا ۱۰/۳۲ درصد در ۲۵۲ جدایه بودند. فراوانی ۱۳، ۱۱ و ۹ آلل به ترتیب در پنج، شش و سه جایگاه در جمعیت‌های جغرافیایی رشت، آمل و تنکابن صفر بود و از این جایگاه‌ها دو جایگاه در هر جمعیت در Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) نبودند. در حالیکه آلل ۱۴۵ bp در جایگاه TC12 در جمعیت‌های آمل با فراوانی یک، تثبیت شد. همانطور که مشخص شد فراوانی آلل و ژنوتیپ در جمعیت‌ها دارای پراکنش یکنواختی نبودند. این وضعیت بیانگر تثبیت و حذف تدریجی بعضی آلل‌ها در جمعیت‌های این بیمارگر در شالیزارهای شمال ایران می باشد.

کلیدواژه: آغازگر ریزماهواره، برنج، بیماری سوختگی غلاف، رانش ژنتیکی، فراوانی آللی

---

* محل انجام تحقیق: موسسه تحقیقات برنج کشور، رشت، ایران، دانشگاه تهران، کرج، ایران و دانشگاه پلی‌تکنیک فدرال زوریخ، سویس

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: padashtf@yahoo.com

۱ - مؤسسه تحقیقات برنج کشور، بخش گیاهپزشکی، بزرگ راه رشت- تهران، ۱۳۴۷۵-۴۱۹۹۶، رشت، ایران

۲- دانشگاه پلی‌تکنیک فدرال زوریخ، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، LFW B28، ۸۰۹۲، زوریخ، سویس

۳- دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی ، گروه گیاهپزشکی، خیابان دانشکده، ۷۷۸۷۱-۳۱۵۸۷، کرج، ایران

۴- دانشگاه ایالتی سائوپائولو، برزیل

Allele analysis of microsatellite loci in *Rhizoctonia solani* AG-1 IA populations from paddy fields of three locations in north of Iran*

F. PADASHT-DEHKAEI[1], M. ZALA[2], M. JAVAN-NIKKHAH[3], P. C. CERESINI[2,4], S. M. OKHOVVAT[3] and B. A. MCDONALD[2]**

(Received: 4.4.2014; Accepted: 28.2.2015)

Abstract

Six populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA were sampled from three naturally infested rice fields in Rasht, Tonekabon and Amol counties, in north of Iran. Allele fragment analyses were performed using fluorescent-labeled primers from nine microsatellite (SSR) loci. The ranges of allele and genotype frequencies were from 0.002 to 0.962 and from 0.40 to10.32 percent respectively among 252 isolates. The frequency of 13, 11 and 9 alleles was zero on five, six and three loci across geographical populations of Rasht, Amol and Tonekabon respectively, so from them two loci weren't in Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) in each population. While the allele 145 bp at a locus TC12 was fixed in the Amol populations at a frequency of 1.0. As there was populations didn't show an even distribution of allele and genotype frequencies. This situation represents the gradual fixation and removal of some alleles in populations of the pathogen in the paddies of northern Iran.

Keywords: Allele frequency, genetic drift, rice, sheath blight disease, SSR primer

---

* Part of first author's PhD thesis, submitted to the Faculty of Agriculture, Tehran university

** Corresponding author's E-mail: padashtf@yahoo.com

1. Department of Plant Protection, Rice Research Institute of Iran, Rasht-Tehan High Way, 41996-13475, Rasht, Iran.
2. Plant Pathology, Institute of Integrative Biology, ETH Zurich, Universitaetstr. 2, LFW B28, 8092, Zurich, Switzerland.
3. Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Faculty Street, 31587-11167, Karaj, Iran.
4. Departamento de Fitossanidade Engenharia Rural e Solos, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Campus de Ilha Solteira, 15385-000 Ilha Solteira, Saõ Paulo, Brazil.

مقدمه

سوختگی غلاف برنج ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* AG-1 IA [*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk]، یکی از بیماری‌های مهم و خسارت‌زای برنج به شمار می‌رود. بروز بیماری مذکور در برنج به‌عنوان یک بیماری مهم و اقتصادی در نتیجه تداوم سیستم کشت برنج و توسعه واریته‌های جدید پاکوتاه، پرپنجه، پرمحصول، کشت متراکم و افزایش مصرف نیتروژن می‌باشد که به‌عنوان یک عامل محدود کننده کشت برنج مطرح شده است (Banniza *et al.* 1999).

از سال ۱۹۷۰ استفاده از واکنش آناستوموزی (Anastomosis) برای بدست آوردن بعضی شناخت‌های عمومی، و به عنوان یک روش مفید در تقسیم‌بندی استرین‌های *R. solani* به گروه‌هایی با هوموژنی بیشتر و همچنین قابل‌فهم‌تر به نام گروه‌های آناستوموزی (Anastomosis groups=AG) شروع شد (Carling 1996). ادامه این بررسی‌ها منجر به تشخیص ۱۴ گروه آناستوموزی (AG) در این گونه مرکب شده است. به علاوه اکثر گروه‌های آناستوموزی براساس میزان خویشاوندی در یک یا چند صفت از ویژگی‌های بیماریزایی، مرفولوژی پرگنه، دامنه میزبانی، نیازمندی‌های غذایی، صفات بیوشیمیایی و ملکولی و توالی DNA به زیرگروه‌هایی تقسیم شده‌اند (Carling *et al.* 2002). سه منبع برای وقوع تنوع در یک جمعیت وجود دارد که شامل جهش، نوترکیبی و مهاجرت ژن‌ها می‌باشد (Burnett 2003). هر چند که این بیمارگر (*R. solani*) عموماً به عنوان یک گونه غیرجنسی شناخته می‌شود اما گاهی بازیدیوسپورهای آن به فراوانی مشاهده شده است. برای مثال زیر گروه‌های AG-1 IA و AG-1 IB در مناطق جنوبی و مرطوب تگزاس روی برنج، و همچنین روی سویا، ذرت و سورگوم و سایر میزبان‌ها در دیگر نقاط دنیا تولید اسپور می‌کنند (Adams 1996). *لینده و همکاران* (Linde *et al.* 2005) بیان کردند که ریزش ژن در میان جمعیت AG-1 IA *R. solani* در هند در اثر پراکنش پرپاگول‌های غیرجنسی حاصل نشدند بلکه توسط پروپاگول‌های جنسی واقع شده‌اند که مهمترین توجیه برای آن، حرکت بازیدیوسپورها است. در ایران نیز فرم جنسی این بیمارگر از مزارع برنج در آمل گزارش شده است (Khosravi *et al.* 2011). اما در یک مخزن ژنی، در اثر فرایندهای جهش، مهاجرت یا جریان ژنی (migration / gene flow)، رانش ژنتیکی (genetic drift) و انتخاب (selection)، سیر تکاملی با کاهش و افزایش تنوع ژنتیکی، تسهیل می شود. مهاجرت نقش مهمی در ساختار ژنتیکی جمعیت قارچ‌ها دارد. مهاجرت در جابجایی ژن‌های پرآزار و ژن‌های مقاوم به قارچ‌کش‌ها در بیمارگرهای گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و می‌تواند عامل مشکلات جدید در منطقه پذیرنده شود (Endler 1977). البته این موضوع بستگی به چگونگی سرنوشت افراد مهاجر پس از پراکنده شدن دارد، چنانکه مهاجرت‌های بزرگ می‌تواند منجر به جریان ژنی کم و مهاجرت‌های محدود می‌تواند یک اثر بزرگی روی جریان ژنی داشته باشد. سرنوشت ژن‌های معرفی‌شده به داخل یک جمعیت از طریق جهش و مهاجرت، در بخش انتخاب تعیین می‌شود. گونه‌های با قابلیت (fitness) بالاتر، فراوانی‌شان افزایش می‌یابد و فراوانی گونه‌های با قابلیت کمتر کاهش می‌یابد و سرانجام حذف می‌شوند. وقتی تفاوت‌های قابلیت زیاد باشد، انتخاب می‌تواند عامل تغییرات سریع در جمعیت‌ها شود.

این تحقیق با هدف مشخص نمودن میزان تنوع آللی جایگاه‌های ریزماهواره ای در جمعیت‌های بیمارگر سوختگی غلاف برنج در شالیزارهای شمال ایران، فراوانی

آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها و نحوه پراکنش آن‌ها در جمعیت‌ها و تجزیه و تحلیل تاثیرپذیری آن‌ها از فرایندهای تحولی، انجام شد.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری، جداسازی و نگهداری جدایه‌های بیمارگر

در یک مزرعه در شهرستان رشت در استان گیلان، و دو مزرعه به ترتیب در شهرستان‌های تنکابن و آمل در استان مازندران واقع در شمال ایران، غلاف‌های برنج دارای علایم بیماری سوختگی غلاف طی دو مرحله، ابتدای مرحله شکم و ابتدای مرحله رسیدن برنج در یک فصل زراعی جمع‌آوری شدند. در هر مزرعه، تعداد ۱۰۰ سری نمونه در دو مرحله تهیه شد که پس از قرار دادن در پاکت‌های کاغذی و خشک کردن در شرایط اتاق، قطعاتی از حاشیه لکه‌ها را بریده و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری در دمای منهای ۲۰°C ذخیره‌سازی شدند. نمونه‌های منجمدشده به تدریج از فریزر خارج شده و پس از شستشو با آب جاری و سترون و خشک کردن در کاغذ صافی روی محیط آب آگار (Water Agar) ۱/۷ درصد حاوی ۵۰ میکروگرم از هر یک از دو آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین و پنی‌سیلین‌جی کشت شدند (Stevens-Johnk&Jones 1994). ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از نگهداری نمونه‌های کشت‌شده در دمای ۲۷°C، تک نوک ریسه‌های بیمارگر از محیط کشت برداشت شده و به محیط غذایی سیب‌زمینی دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar) منتقل شد. برای نگهداری طولانی مدت جدایه‌های قارچ بیمارگر، پس از ۱۰ الی ۱۴ روز، سختینه‌های تولیدشده از سطح محیط کشت در دمای ۲۷°C را جمع‌آوری نموده و پس از خشک شدن زیر هود بیولوژیک (حدود ۲ ساعت) در میکروتیوب‌ها و در دمای منهای ۲۰°C قرار داده شدند.

تهیه میسیلوم و انجماد خشک (Freeze-dry) میسلیوم‌ها

یک قرص از کشت تازه رویانده‌شده هریک از جدایه‌های بیمارگر را به لوله‌های فالکون ۵۰ میلی لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط مایع سیب‌زمینی دکستروز (Potato Dextrose broth = PDB) ، دارای یک میلی‌لیتر از محلول غلیظ ۵۰ میلی‌گرم در یک لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین، منتقل شد و به مدت ۴ روز روی شیکر با حرکت دورانی و با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه در شرایط دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. سپس، محیط مایع حاوی توده میسلیومی هر جدایه از دو لایه پارچه تنظیف سترون که روی دهانه یک ظرف ارلن قرار داشت عبور داده شد سپس پارچه تنظیف حاوی توده میسلیومی روی دو برگ دستمال کاغذی حوله‌ای قرار داده شد، و توده میسلیومی از قطعه PDA جامد اولیه جدا گردید و به یک میکروتیوب دو میلی‌لیتر منتقل شد. قبل از انجماد خشک کردن، به منظور ته‌نشین نمودن توده میسلیوم‌ها به ته میکروتیوب و جلوگیری از احتمال خروج توده میسلیومی از دهانه باز آن‌ها در اثر خلا ایجادشده توسط دستگاه فریزدرایر (Freeze dryer)، میکروتیوب‌های حاوی میسلیوم‌های هر جدایه ابتدا به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. میکروتیوب‌ها در حالیکه درب آن‌ها باز بود، حداقل به مدت نیم ساعت در فریزر با دمای منهای ۸۰°C قرار داده شدند و سپس به دستگاه فریزدرایر منتقل و در شرایط خلا و دمای منهای ۷۰ °C به مدت حداقل یک شبانه روز نگهداری و فریز درای شدند.

استخراج و خالص‌سازی DNA ژنومی

استخراج DNA با استفاده از کیت‌های ساخت شرکت QIAGEN تحت بسته‌ای به نام DNeasy Plant Minikit و براساس دستورالعمل ارایه‌شده توسط شرکت مربوطه انجام شد. پودر میسلیوم مورد نیاز برای عملیات استخراج با قراردادن میسلیوم فریزشده هر جدایه از بیمارگر در میکروتیوب‌های ml ۲ و اضافه کردن مقداری گرانول شیشه اتوکلاوشده به آن و سانتریفیوژ نمودن به مدت ۲۵ ثانیه انجام شد. در انتهای مرحله استخراج، همه DNA هر نمونه در بافر AE کیت مذکور جمع آوری شده و برای ذخیره‌سازی در دمای منهای ۲۰°C در فریزر نگه‌داری شدند. پس از این مرحله به منظور اطمینان از انجام صحیح استخراج و ارزیابی غلظت یا کمیت DNA استخراج شده، اقدام به الکتروفورز هر یک از نمونه DNA روی ژل آگاروز ۱٪ شد. سپس از DNA ذخیره برای تهیه محلول DNA رقیق تر برای مصرف در مراحل بعدی استفاده گردید.

تعیین گروه آناستوموزی جدایه‌ها با استفاده از آغازگر اختصاصی

آغازگر اختصاصی زیر گروه IA از گروه آناستوموزی AG-1 بیمارگر *R. solani* براساس توالی قطعه‌ای از محل DNA ریبوزومی 28S (rDNA) این قارچ که توسط ماتسوموتو (Matsumoto 2002) طراحی گردیده بودند استفاده شد. این آغازگرها شامل یک آغازگر عمومی گروه آناستوموزی *R. solani* (آغازگر پیش رو) با توالی 5'-TCAAACAGGCATGCTC-3' و آغازگر اختصاصی زیرگروه IA از گروه آناستوموزی AG1 از *R. solani* (عقب رو) با توالی 5'-CAGCAATAGTTGGTGGA-3' بودند. این جفت آغازگر یک باند bp ۲۶۵ را فقط از زیرگروه مذکور تکثیر می‌کند، و تولید دیگری در واکنش PCR با سایر زیرگروه‌های AG1 و گروه‌های آناستوموزی ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و BI ندارد.

تکثیر قطعه مورد نظر بوسیله آغازگر اختصاصی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل دو میکرولیتر از PCR buffer 10x (New England BioLabs)، یک میکرولیتر از مخلوط dNTP (هر کدام ۰/۱ میلی مول) (PeqGOLD dNTP-Set, PeQLab Biotechnologie GmbH)، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت 10 µM/µl (MicrosYnth)، یک دهم میکرولیتر از *Taq* DNA Polymerase 5u/µl (۰/۵ واحد در هر حجم ۲۰ میکرولیتری PCR) و هشت میکرولیتر از آب دو بار تقطیر سترون بودند. مخلوط نهایی با ورتکس (Vortex) مخلوط شد و پس از چرخش کوتاه (Short spin) با سانتریفیوژ، ۱۳ میکرولیتر از آن به هفت میکرولیتر از DNA رقیق‌شده از هر جدایه در هر چاهک پلیت محصول PCR افزوده شد. سپس با پوشش پلاستیکی چسبی (ویژه پلیت PCR) روی پلیت مذکور و روی چاهک‌های حاوی مخلوط واکنش PCR بخوبی پوشانده شد تا از تبخیر در ماشین PCR جلوگیری شود. پلیت مذکور پس از سانتریفیوژ کوتاه مدت به ماشین PCR (Biometra) منتقل شد. برنامه دمای PCR شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۲/۵ دقیقه در دمای ۹۶°C و ۳۵ چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای ۹۶°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۴°C به مدت ۳۰ ثانیه و بسط آغازگرها در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و یک چرخه برای بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت پنج دقیقه و یک مرحله پایانی در ۱۵°C تنظیم شد. جهت اطمینان از عملکرد آغازگرهای اختصاصی، محصول PCR حاصل

الکتروفورز و تصویربرداری شد.

تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره ای (Amplification of Microsatellite Loci) با استفاده از آغازگرهای SSR

برای تکثیر جایگاه‌های ریز ماهواره ای در ۲۵۲ جدایه *R. solani* AG-1 IA از ۹ جفت آغازگر اختصاصی که توسط *زالا و همکاران* (Zala *et al.* 2008) از این قارچ جداسازی و توصیف شده است، استفاده گردید. این آغازگرها براساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه جانبی (flanking) هر ریزماهواره طراحی شده است. آغازگرهای پیش رو از همه ۹ جفت آغازگرها بوسیله مجموعه رنگ G5 شامل 6-FAM، NED، VIC و PET نشان‌دار بودند (Applied Biosystems). بعد از PCR و تعیین توالی قطعات تکثیرشده، منحنی آلل‌ها به همان رنگ آغازگر دیده می شود. آغازگر TCO6 اختصاصی گونه (Species-specific) است چون قادر است دو گروه آناستوموزی دیگر (AG-10 و AG8) را نیز تکثیر نماید.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای هر جایگاه SSR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل هفت میکرولیتر DNA ژنومی رقیق‌شده (با توجه به غلظت DNA استخراج‌شده جدایه‌ها)، دو میکرولیتر از 10x PCR buffer (New England BioLabs)، یک میکرولیتر از dNTP (۰/۴ mM) (Biotechnologie GmbH PeQLab)، نیم میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای نشان‌دار (Fluorescent-Labeled Primer) (Applied Biosystems) و غیر نشان‌دار (MicrosYnth) با غلظت ۱۰ µM/µl و یک دهم میکرولیتر از *Taq* DNA Polymerase 5u/µl (۰/۵ واحد در هر حجم ۲۰ میکرولیتری PCR) (New England BioLabs) در یک ماشین PCR (مدل Biometra T-gradiant) انجام شد. برنامه حرارتی با یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۶°C به مدت دو دقیقه و ۳۵ چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای ۹۶°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای۵۰°C به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و یک چرخه برای بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت پنج دقیقه و با یک مرحله پایانی در ۱۵°C تنظیم گردید. به دلیل مشاهده نتایج نامناسب در محصول PCR حاصل از آغازگر TC10 دمای اتصال در برنامه PCR کلیه جدایه‌های با این آغازگر، به‌منظور بالا بردن واکنش اختصاصی آن، از ۵۰°C به ۵۵°C ارتقا داده شد. از محصول PCR همه آغازگرها با الکتروفورز و تصویربرداری به کمک دستگاه ژل داک اطمینان حاصل شد.

تعیین توالی برای آنالیز قطعات (Fragment analysis) محصول PCR

در این مرحله محصول آغازگرهای هر جدایه با ملاحظاتی از جمله رنگ آغازگر و دامنه‌ای از طول قطعات که تکثیر می‌کنند، به دو گروه ۵ (TC02، TC03، TC05 و TC06) و ۴ تایی (TC07، TC10، TC12 و TC17) تقسیم شدند و در هر گروه به نسبت‌های ۱ میکرولیتر از محصول PCR هر آغازگر در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر (مابقی آب دو بار تقطیر سترون) در چاهک‌های پلت‌های مخصوص با هم مخلوط شد. پلت‌های مذکور به مدت یک دقیقه با شیکر کوچک (Minishaker) با سرعت ۹۰ دور در دقیقه تکان داده شدند سپس ۴ میکرولیتر از هر یک از محتویات مخلوط‌شده هر چاهک را به وسیله پیپت برداشته و با همان نظم و ترتیب براساس شماره جدایه، در یک پلت جدید دیگر مخصوص دستگاه تعیین توالی، تخلیه گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از مخلوط فرمامید (Hi-Di^{TM}

Formamide) با ژن اسکن لیز (GeneScan^{TM}-500Liz Size Standard) (به نسبت ۲۵ میکرولیتر Liz در ۱۰۰۰ میکرولیتر فرمامید) به آن اضافه و با سانتریفیوژ کوتاه مدت (لحظه ای) شدند. پس از آن به منظور جداشدن دو رشته DNA کلیه قطعات، دو دقیقه در دمای ۹۵°C قرار داده و بلافاصله نیز روی یخ سرد شدند. هر پلت به همراه اطلاعات همان مجموعه (پلت) به صورت یک فایل تهیه‌شده با برنامه Platemaker و تعیین نوع آنالیز مورد درخواست، یعنی Fragment analysis به دستگاه تعیین توالی (مدل Applied Biosystems و AB 3730 DNA Analysis) منتقل شد. اطلاعات حاصله و به عبارت دیگر آلل یا آلل‌های تکثیرشده توسط هر آغازگر در هر جدایه هم به‌صورت منحنی و هم به صورت اندازه طول (bp) به کمک نرم‌افزار GeneMapper (Version 4 Supplied by Applied Biosystems) مرتب و قابل رویت شده و در نهایت به یک فایل اکسل جهت سایر تجزیه و تحلیل‌ها تبدیل گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تعیین اندازه آلل‌ها، طیف تکرارها (موتیف‌ها) در هر جایگاه، تعداد آلل‌ها، تعیین آلل‌های ویژه (آلل یا آلل‌هایی که فقط در یک جمعیت وجود دارند) و فراوانی‌های آللی با استفاده از برنامه CONVERT version 1.31 (Glaubitz 2004) انجام شد.

غنای آللی (Allelic Richness) براساس میانگین تعداد آلل در هر جایگاه تعیین شد (ElMousadik & Petit 1996). برای مشخص کردن اینکه آیا جمعیت‌های نمونه‌برداری‌شده از *R. solani* AG-1 IA در شمال کشور از نظر غنای آللی از هم متفاوت هستند، از نرم افزار FSTAT version 2.9.3.2 (Department of Ecology and Evolution, Lausan, Switzerland) استفاده گردید و مقایسه جمعیت‌ها به این شرح انجام شد:

۱. مقایسه غنای آللی بین جمعیت‌های ابتدای ظهور آلودگی در مزرعه (مرحله اول نمونه‌برداری و همزمان با مرحله رشدی ابتدای آبستنی برنج) و مرحله آخر دوره آلودگی در مزرعه (مرحله دوم نمونه‌برداری و مرحله ابتدای رسیدن دانه‌های برنج) در هر منطقه جغرافیایی.
۲. مقایسه غنای آللی جمعیت‌های بیمارگر در سه منطقه جغرافیایی در مرحله اول نمونه‌برداری.
۳. مقایسه غنای آللی جمعیت‌های بیمارگر در سه منطقه جغرافیایی در مرحله دوم نمونه‌برداری.
۴. مقایسه غنای آللی جمعیت بیمارگر بین مناطق جغرافیایی در هر دو مرحله نمونه‌برداری.

برای تعیین ژنوتیپ چند جایگاهی هر جدایه از داده‌های میکروساتلایتی با استفاده از برنامه GENOTYPE (Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, Universiteit van Amsterdam) (Meirmans &Van Tiendern. 2004) استفاده شد. جدایه‌هایی که دارای آلل‌های مشابه در نه جایگاه ریزماهواره ای بودند به‌عنوان یک ژنوتیپ (یا کلون) شناسایی شدند. به کمک این نرم افزار تعداد ژنوتیپ در هر جمعیت، ژنوتیپ‌های اختصاصی هر منطقه، فراوانی هر ژنوتیپ در هر جمعیت و فراوانی کلی آن در سه جمعیت (در ۲۵۲ جدایه) محاسبه گردید.

آزمون توازن هاردی وینبرگ (Hardy-Weinberg Equilibrium= HWE). آزمون توازن هاردی وینبرگ با استفاده از برنامه Arlequin version 3.11 انجام شد. ضریب خویش آمیزشی (Inbreeding coefficient (Fis)

جدول ۱. تعداد آلل شناسایی شده در هر جایگاه ریز ماهواره ای در شش جمعیت *Rhizoctonia solani* AG-1 IA شالیزارهای شمال ایران.

Table 1. Number of detected Alleles at each SSR locus of six populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from paddy fields of northern Iran.

Average	Total	Tonekabon 2	Rasht 2	Amol 2	Tonekabon 1	Rasht 1	Amol 1	locus
4.67	6	5	4	6	4	4	5	TC01
3.17	4	4	3	4	3	3	2	TC02
5.17	7	6	5	4	6	5	5	TC03
2.50	3	3	2	2	3	3	2	TC05
6.83	13	6	7	9	5	10	4	TC06
2.83	3	3	3	2	3	3	3	TC07
4.67	8	5	2	6	6	4	5	TC10
1.83	3	3	2	1	2	2	1	TC12
2.50	3	3	3	2	2	3	2	TC17
3.8	50	38	31	36	34	37	29	total

یک عامل انحراف از توازن هاردی وینبرگ) به منظور آزمون کاهش یا افزایش معنی‌دار هتروزیگوتی در مقایسه با توازن هاردی وینبرگ مورد انتظار به روش ویر و کوکرهام (Weir & Cockerman 1984) در هر جایگاه اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

تعیین گروه آناستوموزی به کمک آغازگر اختصاصی از جدایه‌های سواسازی‌شده از سه منطقه جغرافیایی نشان داد که ۲۵۲ جدایه به گروه آناستوموزی AG-1 IA اختصاص داشتند. آن‌ها متشکل از شش جمعیت بودند که هر منطقه شامل دو جمعیت (جمعیت اول در مرحله اول نمونه‌برداری و جمعیت دوم در مرحله دوم نمونه‌برداری) بود. اندازه جمعیت‌های رشت، شامل ۴۸ جدایه برای جمعیت مرحله اول نمونه‌برداری (رشت ۱) و ۴۸ جدایه برای جمعیت مرحله دوم (رشت ۲) بود. در آمل جمعیت‌های مرحله اول و دوم یعنی آمل ۱ و آمل ۲ به‌ترتیب شامل ۳۸ و ۴۵ جدایه بود. در تنکابن نیز جمعیت‌های مرحله اول و دوم نمونه‌برداری، یعنی تنکابن ۱ و تنکابن ۲ به‌ترتیب شامل ۴۰ و ۳۳ جدایه بود.

همه جایگاه‌ها تنوع قابل ملاحظه ای در بین جمعیت‌ها از نظر تعداد آلل‌های مختلف شناخته‌شده، نشان دادند. جایگاه‌های TC05، TC07، TC12 و TC17 کمترین تنوع آللی یعنی سه آلل را در شش جمعیت نشان دادند. درحالیکه TC06 با ۱۳ آلل، بیشترین تعداد آلل‌های مختلف را در بین جمعیت‌های مذکور مشخص کرد. بطورکلی ۵۰ آلل مختلف در ۲۵۲ جدایه از بیمارگر در سه منطقه جغرافیایی آمل، رشت و تنکابن شناسایی گردید. حداقل میانگین تعداد آلل در هر جایگاه ۱/۸۳ و حداکثر آن ۶/۸۳ به‌ترتیب در جایگاه‌های TC12 و TC06 و میانگین کلی آن ۳/۸ بود (جدول ۱). همه جایگاه‌ها در بین جمعیت‌ها پلی‌مورفیک بودند. بجز TC12 که در جمعیت آمل ۱ و آمل ۲ منومورفیک بود. آلل‌های اختصاصی (Private alleles)، آلل‌هایی که در یک جمعیت وجود دارند و در دیگر جمعیت‌ها حضور ندارند، نیز تعدادی در بعضی جمعیت‌ها و جایگاه‌ها وجود داشتند. آلل‌های با طول bp ۱۱۰ در جایگاه TC01، bp ۱۸۴ و bp ۱۹۳ در جایگاه TC06 و bp ۱۴۴ و bp ۱۵۶ در جایگاه TC10 ویژه

جمعیت آمل ۲ بودند. به عبارت دیگر می‌توان گفت که این آلل‌ها علاوه براینکه مختص منطقه آمل بودند، اختصاص به زمان دوم نمونه‌برداری از مزرعه برنج داشتند که نزدیک به برداشت محصول و مصادف با حداکثر توسعه بیماری و زمانی که معمولاً حداکثر شرایط مناسب برای توسعه بیماری نیز فراهم است، می‌باشند.

آلل‌های با طول ۲۰۲ bp و ۲۰۵ bp در جایگاه TC06 ویژه جمعیت منطقه رشت در مرحله اول نمونه‌برداری و آلل‌های با طول ۱۳۹ bp در جایگاه TC12 و ۱۸۶ bp در جایگاه TC10 به‌ترتیب ویژه مرحله اول و هر دو مرحله نمونه‌برداری منطقه تنکابن بودند. همچنین آلل‌های با طول ۱۲۵ bp در جایگاه TC01 و ۱۸۴ bp در جایگاه TC02، ۳۰۱ bp در جایگاه TC03 ویژه استان مازندران و در مناطق تنکابن و آمل بطور مشترک وجود داشت و آلل با طول ۱۹۸ bp در جایگاه TC10 فقط در مرحله اول نمونه‌برداری یعنی در ابتدای فصل آلودگی مشاهده شد. بیشترین تعداد آلل‌های اختصاصی مشاهده‌شده در منطقه جغرافیایی آمل و در مرحله دوم نمونه‌برداری وجود داشت (جدول ۲). هرچند که هر یک از جایگاه‌ها پلی‌مورفیک بودند و حداقل ۳ و حداکثر ۱۳ آلل را در بین ۲۵۲ جدایه دارا بودند، نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که اساساً در هر جایگاه یک آلل از فراوانی بسیار بالاتری در همه جمعیت‌ها نسبت به بقیه آلل‌ها برخوردار بود. برای مثال آلل شماره ۲ (با طول ۱۴۵ bp) در جایگاه ۱۲ با ۰/۹۶۲۳ بالاترین فراوانی را در کل آلل‌ها در شش جمعیت داشت بطوریکه در دو جمعیت آمل ۱ و آمل ۲ در ۱۰۰٪ جدایه‌ها وجود داشت. یعنی همه جدایه‌ها در این دو جمعیت فقط دارای همین آلل بودند و به عبارت دیگر جایگاه TC12 برای این دو جمعیت منومورفیک بود. درحالیکه آلل‌های شماره ۵ و ۶ در TCO6 و آلل شماره ۱ در TC12 با فراوانی ۰/۰۰۲۰ دارای کمترین فراوانی بودند (یک آلل از ۶۶ آلل جمعیت تنکابن ۲) و هر سه آلل مذکور به ترتیب آلل‌های اختصاصی مناطق رشت۱، رشت۱ و تنکابن۲ بودند. مشابه چنین فراوانی از آلل در این بیمارگر قبلاً گزارش شده است. *برناردز د آسیس و همکاران* (Bernardes-de-Assis *et al.* 2008) تعداد آلل‌های مشاهده‌شده در هر جایگاه را بین ۴ تا ۱۲ آلل، و فراوانی آن‌ها را در هر جایگاه غیریکنواخت گزارش کردند، بطوریکه هر جایگاه یک یا دو آلل با فراوانی بیش از ٪۲۰ داشت. اما در تحقیق حاضر آلل‌هایی که در هر جایگاه دارای بیشترین فراوانی بودند، فراوانی‌شان بین ۳۷ تا ۹۷ درصد بود. بنابراین غیریکنواختی پراکنش آلل‌ها در جمعیت‌های مورد مطالعه در این تحقیق بیشتر می باشد. آلل‌های اختصاصی مشاهده‌شده در جمعیت‌های این بیمارگر با استفاده از نشانگر SSR توسط محققین فوق در جمعیت‌های بیمارگر برنج در تگزاس و لوئیزیانا و سویا در لوئیزیانا گزارش شده است. به علاوه این گونه آلل‌ها از شش جمعیت *R. solani* AG-1 IA بیمارگر سویا در برزیل نیز تشخیص داده شده‌اند (Ciampi *et al.* 2008).

نتایج مقایسه غنای آللی در هر دو جمعیت از جمعیت‌های سه منطقه در مرحله اول نمونه‌برداری، جمعیت‌های سه منطقه در مرحله دوم نمونه‌برداری و هر شش جمعیت در سه منطقه رشت، آمل و تنکابن به‌ترتیب در جداول ۳، ۴ و ۵ آمده است. مقایسه غنای آللی دو جمعیت در هر منطقه نشان می‌دهد که فقط جمعیت آمل در مرحله دوم نمونه‌برداری (آمل ۲) با غنای آللی ۳/۶۶ تفاوت معنی‌داری با جمعیت مرحله اول همین منطقه با غنای آللی ۳/۰۷ دارد (*P.value* = ۰/۰۱۵). درحالیکه جمعیت‌های منطقه رشت و همچنین جمعیت‌های تنکابن از این نظر متفاوت از هم نیستند (*P.value*=۰/۰۵)

جدول۲. فراوانی آلل های ۹ مکان ریز ماهواره‌ای در شش جمعیت *Rhizoctonia solani* AG-1 IA عامل سوختگی غلاف برنج در شمال ایران.

Table 2. Allele frequency of 9 SSR loci in six populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, causal agent of rice sheath blight in north of Iran.

Locus	No. of alleles	Fragment (bp)	Amol1	Rasht1	Tonekabon1	Amol2	Rasht2	Tonekabon2	Overall	Private
TC01	1	110	0.0000	0.0000	0.0000	0.0222	0.0000	0.0000	0.0040	Amol 2
TC01	2	113	0.4342	0.2083	0.3625	0.3333	0.1979	0.3333	0.3036	
TC01	3	119	0.4474	0.2396	0.4375	0.4444	0.3021	0.3485	0.3651	
TC01	4	122	0.0921	0.3125	0.1125	0.1111	0.3021	0.1970	0.1944	
TC01	5	125	0.0132	0.0000	0.0875	0.0333	0.0000	0.1061	0.0357	
TC01	6	128	0.0132	0.2396	0.0000	0.0556	0.1979	0.0152	0.0972	
TC02	1	178	0.0000	0.0208	0.0500	0.0111	0.0312	0.0152	0.0218	
TC02	2	181	0.5132	0.6667	0.6000	0.5111	0.6250	0.6212	0.5913	
TC02	3	184	0.0000	0.0000	0.0000	0.556	0.0000	0.0152	0.0119	
TC02	4	187	0.4868	0.3125	0.3500	0.4222	0.3438	0.3485	0.3750	
TC03	1	268	0.0000	0.0208	0.0513	0.0000	0.0106	0.0323	0.0182	
TC03	2	271	0.0000	0.0729	0.0000	0.0000	0.0426	0.0161	0.0243	
TC03	3	277	0.8514	0.3542	0.6795	0.6667	0.4574	0.5968	0.5870	
TC03	4	280	0.0270	0.1146	0.0769	0.0444	0.1064	0.1452	0.0850	
TC03	5	283	0.0135	0.0000	0.0897	0.0333	0.0000	0.0968	0.0344	
TC03	6	286	0.0811	0.4375	0.0769	0.2556	0.3830	0.1129	0.2429	
TC03	7	301	0.0270	0.0000	0.0256	0.0000	0.0000	0.0000	0.0081	
TC05	1	239	0.8553	0.8854	0.9125	0.8333	0.8646	0.8485	0.8671	
TC05	2	245	0.0000	0.0104	0.0500	0.0000	0.0000	0.0303	0.0139	
TC05	3	251	0.1447	0.1042	0.0375	0.1667	0.1354	0.1212	0.1190	
TC06	1	181	0.0526	0.1667	0.0897	0.0889	0.1458	0.0152	0.0996	
TC06	2	184	0.0000	0.0000	0.0000	0.0333	0.0000	0.0000	0.0060	Amol 2
TC06	3	187	0.0000	0.0417	0.0000	0.0333	0.0833	0.0000	0.0299	
TC06	4	193	0.0000	0.0000	0.0000	0.0222	0.0000	0.0000	0.0040	Amol 2
TC06	5	202	0.0000	0.0104	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0020	Rasht 1
TC06	6	205	0.0000	0.0104	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0020	Rasht 1
TC06	7	220	0.0000	0.0625	0.1026	0.0000	0.0208	0.0606	0.0398	
TC06	8	223	0.0000	0.1146	0.0000	0.0000	0.1042	0.0303	0.0458	
TC06	9	229	0.8947	0.3125	0.7308	0.7222	0.3646	0.7576	0.6076	
TC06	10	232	0.0263	0.0521	0.0000	0.0111	0.0833	0.0758	0.0418	
TC06	11	235	0.0000	0.0000	0.0358	0.0222	0.0000	0.0606	0.0179	
TC06	12	238	0.0263	0.2188	0.0385	0.0556	0.1979	0.0000	0.0996	
TC06	13	241	0.0000	0.0104	0.0000	0.0111	0.0000	0.0000	0.0040	
TC07	1	142	0.7763	0.5417	0.8375	0.7222	0.6562	0.7727	0.7083	
TC07	2	145	0.0263	0.0833	0.0125	0.0000	0.0208	0.0758	0.0357	
TC07	3	148	0.1974	0.3750	0.1500	0.2778	0.3229	0.1515	0.2560	
TC10	1	144	0.0000	0.0000	0.0000	0.0222	0.0000	0.0000	0.0040	Amol 2
TC10	2	150	0.2895	0.3958	0.1250	0.3333	0.4479	0.1515	0.3036	
TC10	3	156	0.0000	0.0000	0.0000	0.0111	0.0000	0.0000	0.0020	Amol 2
TC10	4	168	0.4868	0.5625	0.5750	0.5000	0.5521	0.5606	0.5397	
TC10	5	177	0.0132	0.0000	0.0375	0.0556	0.0000	0.0909	0.0298	
TC10	6	183	0.1842	0.0208	0.2375	0.0778	0.0000	0.1212	0.0992	
TC10	7	186	0.0000	0.0000	0.0125	0.0000	0.0000	0.0758	0.0119	
TC10	8	198	0.0263	0.0208	0.0125	0.0000	0.0000	0.0000	0.0099	
TC012	1	139	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0152	0.0020	Tonekaboun2
TC012	2	145	1.0000	0.9062	0.9875	1.0000	0.9375	0.9545	0.9623	
TC012	3	149	0.0000	0.0938	0.0125	0.0000	0.625	0.0303	0.0357	
TC017	1	168	0.9474	0.6875	0.9875	0.9556	0.7292	0.9091	0.8591	
TC017	2	174	0.0000	0.0208	0.0000	0.0000	0.0104	0.0152	0.0079	
TC017	3	180	0.0526	0.2917	0.0125	0.0444	0.2604	0.0758	0.1329	
Samples			38	48	40	45	48	33	252	

جدول۳- مقایسه‌های غنای آللی[a] بین جمعیت‌های *Rhizoctonia solani* AG-1 IA در دو مرحله نمونه‌برداری در هر منطقه.

Table 3. Allelic richness[a] comparison between populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from two sampling stages of each county.

p-value	Tonekabon 1	*p-value*	Rasht 1	*p-value*	Amol 1	
				0.015*	3.07<3.66	Amol 2
		0.130	3.78>3.44			Rasht 2
0.168	3.66<3.95					Tonekabon 2

a- از نرم‌افزار FSTAT version 2.9.3.2 برای آزمون تفاوت غنای آللی درجفت نمونه ها استفاده شد.

[a] FSTAT version 2.9.3.2 was used to test whether pairwise samples differed for allelic richness.

جدول ۴- مقایسه‌های غنای آللی[a] بین جمعیت‌های *Rhizoctonia solani* AG-1 IA در مناطق جغرافیایی آمل، رشت و تنکابن در مرحله اول نمونه‌برداری.

Table 4. Allelic richness[a] comparison between populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from geographical counties of Amol, Rasht and Tonekaboon at first sampling stage.

p-value	Tonekabon 1	p-value	Amol 1	p-value	Amol 1	
				0.006*	3.06<3.78	Rasht 1
		0.024*	3.06<3.66			Tonekabon 1
0.330	3.66<3.78					Rasht 1

a- از نرم‌افزار FSTAT version 2.9.3.2 برای آزمون تفاوت غنای آللی درجفت نمونه ها استفاده شد.

[a] FSTAT version 2.9.3.2 was used to test whether pairwise samples differed for allelic richness.

(جدول۳). مقایسه غنای آللی جمعیت‌های مناطق رشت، آمل و تنکابن در مرحله اول نمونه‌برداری نشان می‌دهد که جمعیت‌های رشت ۱ با غنای آللی ۳/۷۸ و تنکابن ۱ با غنای آللی ۳/۶۶ تفاوت معنی‌داری با جمعیت آمل ۱ دارند (جدول۴). همین مقایسه برای سه جمعیت مرحله دوم نمونه‌برداری بیان کننده این موضوع است که فقط دو جمعیت تنکابن ۲ و رشت ۲ از نظر غنای آللی متفاوت از هم هستند (*P.value*=۰/۰۴۴) (جدول ۵). مقایسه شش جمعیت حکایت از این دارد که جمعیت تنکابن ۲ با غنای آللی ۳/۹۵ و آمل ۱ با ۳/۰۷ به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین غنای آللی هستند (جدول ۳). در این خصوص *برناردز د آسیس* و همکاران (2008) غنای آللی با میانگین ۴/۹۳ را برای جمعیت لوئیزیانا و میانگین ۴/۷۸ را برای جمعیت تگزاس گزارش کرده‌اند. درحالیکه نه جایگاه ریزماهواره ای استفاده‌شده در تحقیق فوق مشابه با جایگاه‌های به کار گرفته در تحقیق حاضر است اما غنای آللی در شش جمعیت این بیمارگر در شمال ایران با میانگین ۳/۴۳ کمتر از جمعیت لوئیزیانا و تگزاس بود. مقایسه تنوع ژنوتیپی جمعیت‌های این بیمارگر در شمال ایران (براساس نه جایگاه ریزماهواره ای مشابه) با میانگین ۹/۲ (Padasht Dehkaei *et al.* 2013) با جمعیت‌های لوئیزیانا با میانگین تنوع ژنوتیپی ۷۹/۴ و جمعیت تکزاس با میانگین ۱۷/۳(Bernardes-de-Assis *et al.* 2008) بیانگر تنوع ژنوتیپی کمتر در جمعیت این بیمارگر در شمال ایران است.

فراوانی ژنوتیپ‌ها در جدول ۶ به نوعی می تواند

جدول ۵- مقایسه‌های غنای آللی[a] بین جمعیت‌های *Rhizoctonia solani* AG-1 IA در مناطق جغرافیایی آمل، رشت و تنکابن در مرحله دوم نمونه‌برداری.

Table 5. Allelic richness[a] comparison between populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from geographical counties of Amol, Rasht and Tonekaboon at second sampling stage.

p-value	Rasht 2	p-value	Amol 2	p-value	Rasht 2	
				0.234	3.44<3.66	Amol 2
		0.170	3.66<3.95			Tonekabon 2
0.044*	3.44<3.95					Tonekabon 2

a- از نرم‌افزار FSTAT version 2.9.3.2 برای آزمون تفاوت غنای آللی درجفت نمونه ها استفاده شد.

[a]FSTAT version 2.9.3.2 was used to test whether pairwise samples differed for allelic richness.

تصویری از عدم یکنواختی در آل‌ها را ارایه نماید. همانطور که ملاحظه می شود ۶۷/۷ درصد از ۹۳ ژنوتیپ مختلف تعیین‌شده به کمک نه جایگاه ریزماهواره ای در ۲۵۲ جدایه از بیمارگر مذکور در سه منطقه در شمال کشور فقط ۲۵ درصد از کل جدایه‌ها را شامل شدند، یعنی هر یک دارای یک عضو بوده‌اند. درحالیکه ۷۵ درصد این جدایه‌ها اعضای ۳۲/۳ درصد از ژنوتایپ‌ها با فراوانی بین ۰/۷۹ درصد تا ۱۰/۳۲ درصد، بوده‌اند. به طوری که ۹۷ جدایه (۳۸/۵٪ از کل جدایه‌ها) در پنج ژنوتیپ G3، G6، G10، G20 و G21 متمرکز بودند و با وجود دارا بودن بالاترین فراوانی‌ها به ترتیب فقط در ۴، ۴، ۳، ۵ و ۵ جایگاه هتروزیگوت بوده‌اند (جدول ۶). بنابراین، فراوانی ژنوتایپ‌های *R.solani* AG-1 IA به شدت متفاوت از هم هستند. ژنوتیپ‌هایی که حداقل فراوانی را در جمعیت بیمارگر دارند بیشتر در معرض حذف شدن از جمعیت می باشند و به ویژه اگر دارای آل‌هایی با فراوانی و هتروزیگوتی کمتر باشند. تغییرات تصادفی در فراوانی آل‌ها و تثبیت آل‌ها و ژنوتایپ‌ها در جمعیت‌ها در پی حذف آل‌ها و ژنوتیپ‌ها از پیامدهای رانش ژنتیکی می باشد. رانش می تواند منجر به تثبیت و ازدست رفتن کامل ژنوتیپ‌ها در ارگانیسم با تکثیر غیر جنسی و افزایش ضریب خویش آمیزشی و افزایش هموزیگوتی در موجودات دیپلوییید شده و در نتیجه سبب ناپدید شدن آل‌ها شود (McDonald 2004). در جدول ۶ فراوانی ژنوتیپ‌های قارچ رایزوکتونیا به عنوان ارگانیسم غیرهاپلوییید و با تکثیر اساساً غیرجنسی، آمده است. تعداد نسبتاً زیادی از ژنوتیپ‌هایی که دارای فراوانی کمی هستند هتروزیگوتی آن‌ها هم در نه جایگاه مورد مطالعه در حداقل می باشد. به عبارت دیگر آن‌ها در بیشتر جایگاه‌ها دارای آل‌های مشابه می باشند (افزایش هموزیگوتی) به طوری که ژنوتایپ ۷۵ در جمعیت آمل۲ برای کلیه جایگاه‌ها هموزیگوت می باشد که به خوبی با نظریات مک دونالد (2004) در خصوص رانش ژنتیکی هماهنگی دارد.

نتایج آزمون توازن هاردی وینبرگ نشان داد که در شش جمعیت کاهش یا افزایش هتروزیگوتی در یک تا سه جایگاه معنی دار بوده و بنابراین از توازن هاردی وینبرگ خارج است (جدول ۷). از این رو، اثرات مختل‌کننده‌های خاصی وجود داشته است که این جایگاه‌ها در توازن هاردی وینبرگ نبودند این مختل‌کننده‌ها شامل آمیزش غیرتصادفی، جهش، انتخاب، اندازه کوچک جمعیت، رانش ژنتیکی تصادفی و جریان ژنی هستند (Lowe *et al.* 2004).

جدول۶- فراوانی ژنوتیپ‌ها در جمعیت‌های ***Rhizoctonia solani*** **AG-1 IA** از مزارع برنج در سه منطقه در شمال ایران.

Table 6. Genotype frequency of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA populations from rice fields of three counties in northern Iran.

Populations	Genotypes	No.of isolates	Frequency						Overall frequency	Hetrozegote loci
			A1*	R1	T1	A2	R2	T2		
A1	G1	1	0.40						0.40	4
A1	G2	7	0.79		0.79	1.19			2.78	5
A1	G3	26	5.16			5.16			10.32	4
A1	G4	3	1.19						1.19	2
A1	G5	1	0.40						0.40	1
A1	G6	23	0.79	2.38	0.40	0.79	4.37	0.40	9.12	4
A1	G7	1	0.40						0.70	3
A1	G8	1	0.40						0.40	4
A1	G9	7	1.19			1.59			2.78	3
A1	G10	19	0.40		5.56				7.54	3
A1	G11	1	0.40						0.40	5
A1	G12	1	0.40						0.40	3
A1	G13	2	0.40				0.40		0.79	3
A1	G14	2	0.79						0.79	4
A1	G15	2	0.40			0.40			0.71	3
A1	G16	1	0.40						0.40	4
A1	G17	2	0.40			0.40			0.79	3
A1	G18	2	0.79						0.79	5
A2	G56	1				0.40			0.40	4
A2	G57	1				0.40			0.40	2
A2	G58	1				0.40			0.40	4
A2	G59	1				0.40			0.40	4
A2	G60	1				0.40			0.40	3
A2	G61	1				0.40			0.40	4
A2	G62	1				0.40			0.40	6
A2	G63	1				0.40			0.40	4
A2	G64	1				0.40			0.40	4
A2	G65	1				0.40			0.40	3
A2	G66	1				0.40			0.40	6
A2	G67	1				0.40			0.40	6
A2	G68	1				0.40			0.40	5
A2	G69	1				0.40			0.40	3
A2	G70	1				0.40			0.40	4
A2	G71	1				0.40			0.40	5

ادامهٔ جدول ۶.

Table 6. Continued.

Populations	Genotypes	No.of isolates	Frequency						Overall frequency	Hetrozegote loci
			A1*	R1	T1	A2	R2	T2		
A2	G72	1				0.40			0.40	5
A2	G73	1				0.40			0.40	4
A2	G74	1				0.40			0.40	3
A2	G75	1				0.40			0.40	0
A2	G76	1				0.40			0.40	2
R1	G19	1		0.40					0.40	5
R1	G20	16		3.17			3.17		6.35	5
R1	G21	13		1.98			3.17		5.16	5
R1	G22	1		0.40					0.40	4
R1	G23	3		0.79			0.40		1.19	6
R1	G24	2		0.40			0.40		0.79	5
R1	G25	1		0.40					0.40	5
R1	G26	8		1.19			1.98		3.17	6
R1	G27	4		0.40			0.79	0.40	1.59	4
R1	G28	3		0.40			0.79		1.19	5
R1	G29	4		0.79			0.79		1.59	4
R1	G30	1		0.40					0.40	7
R1	G31	1		0.40					0.40	5
R1	G32	3		1.19					1.19	6
R1	G33	1		0.40					0.40	5
R1	G34	1		0.40					0.40	4
R1	G35	4		1.19			0.40		1.59	4
R1	G36	1		0.40					0.40	6
R1	G37	1		0.40					0.40	5
R1	G38	2		0.40	0.40				0.79	4
R1	G39	1		0.40					0.40	5
R1	G40	1		0.40					0.40	4
R1	G41	1		0.40					0.40	4
R2	G77	1					0.40		0.40	4
R2	G78	1					0.40		0.40	3
R2	G79	3					1.19		1.19	4
R2	G80	1					0.40		0.40	6
T1	G42	1			0.40				0.40	7
T1	G43	9			2.38			1.19	3.57	4

ادامهٔ جدول ۶.

Table 6. Continued.

Populations	Genotypes	No.of isolates	Frequency						Overall frequency	Hetrozegote loci
			A1*	R1	T1	A2	R2	T2		
T1	G44	1			0.40				0.40	5
T1	G45	6			1.19			1.19	2.38	2
T1	G46	1			0.40				0.40	4
T1	G47	3			0.79			0.40	1.19	6
T1	G48	2			0.40			0.40	0.79	5
T1	G49	1			0.40				0.40	2
T1	G50	1			0.40				0.40	3
T1	G51	2			0.40			0.40	0.79	3
T1	G52	1			0.40				0.40	3
T1	G53	1			0.40				0.40	3
T1	G54	1			0.40				0.40	5
T1	G55	1			0.40				0.40	3
T2	G81	1						0.40	0.40	4
T2	G82	1						0.40	0.40	6
T2	G83	1						0.40	0.40	3
T2	G84	4						1.59	1.59	1
T2	G85	1						0.40	0.40	7
T2	G86	1						0.40	0.40	4
T2	G87	3						1.19	1.19	5
T2	G88	1						0.40	0.40	2
T2	G89	1						0.40	0.40	4
T2	G90	1						0.40	0.40	3
T2	G91	1						0.40	0.40	2
T2	G92	1						0.40	0.40	4
T2	G93	1						0.40	0.40	3
Total	93	252							100	

*= A1، R1، T1، A2، R2 و T2 به‌ترتیب جمعیت‌های آمل۱، رشت۱، تنکابن۱ (مرحله اول نمونه‌برداری)، آمل۲، رشت۲ و تنکابن۲ (مرحله دوم نمونه‌برداری) هستند.

* A1, R1, T1, A2, R2 and T2 are Amol1, Rasht1, Tonekaboon, (from first sampling stage) Amol2, Rasht2 and Tonekaboon2 (from second sampling stage) respectively.

در جمعیت‌های طبیعی رانش ژنتیکی و انتخاب طبیعی به طور جداگانه عمل نمی‌کنند و فشار هر دو بر جمعیت همیشه در جریان است (Small *et al.* 2007) ولی وقتی فراوانی آلل در جمعیتی خیلی کم است رانش می‌تواند بر انتخاب حتی در جمعیت‌های بزرگ غالب آید (Cavalli-Sforza, *et al.* 1996). نتایج به دست آمده از این جهت

جدول ۷- نتایج آزمون HWE برای هر جایگاه در هر جمعیت قارچ *Rhizoctonia solani* AG-1 IA از سه منطقه در شمال ایران (*P. value*).

Table 7. Results of HWE test[a] for each locus in each population of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from three counties in northern Iran (*P. value*).

Tonekabon2		Rasht1		Amol2		Tonekabon1		Rasht1		Amol1		Locus
Fis-	Fis+	Fis-	Fis+	Fis-	Fis+	Fis-	Fis+	Fis-	Fis+	Fis-	Fis+	
0.053	0.983	0.019	1.000	0.278	0.875	0.011	0.997	0.003	1.000	0.014	1.000	TC01
0.736	0.431	0.267	0.908	0.908	0.158	0.400	0.786	0.200	0.908	0.575	0.772	TC02
0.939	0.158	0.872	0.306	0.997	0.006	0.942	0.222	0.975	0.061	0.989	0.036	TC03
0.433	1.000	0.970	1.000	0.319	1.000	0.572	1.000	0.678	1.000	0.542	1.000	TC05
1.000	0.003	1.000	0.003	1.000	0.003	1.000	0.006	1.000	0.003	1.000	0.003	TC06
0.981	0.056	0.839	0.339	0.542	0.833	0.469	1.000	0.053	0.992	0.719	1.000	TC07
0.806	0.408	0.264	0.942	0.144	0.942	0.289	0.914	0.047	0.986	0.244	0.925	TC10
0.903	1.000	0.639	1.000	-	-	1.000	1.000	0.797	1.000	-	-*	TC12
0.875	1.000	0.536	0.611	0.872	1.000	1.000	1.000	0.094	0.950	0.917	1.000	TC17

a= آزمون توازن هاردی وینبرگ با استفاده از برنامه Arlequin version 3.11 انجام شد.

*- این جایگاه در جمعیت‌های آمل ۱ و آمل ۲ منومورفیک بود.

[a] HWE test was implemented in ARLEQUIN v. 3.11.

* This locus was monomorphic in Amol1 and Amol2 populations.

مهم است که مهاجرت ژنوتیپ‌ها بین مناطق مختلف تولید کننده برنج در شمال ایران که عموماً به روش جابجایی بذر واقع می‌شود حداکثر از ۱۷٪ در آمل و تنکابن تا ۲۰٪ در رشت بوده است (Padasht-Dehkaei *et al.* 2013). مهاجرت نقش مهمی در ساختار ژنتیکی قارچ‌ها دارد، مخصوصاً در جابجایی ژن‌های پرآزار و ژن‌های مقاوم به قارچ‌کش‌ها در بیمارگرهای گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و می‌تواند عامل مشکلات جدید در منطقه پذیرنده شود. هر چند که هر مهاجرتی منجر به استقرار مهاجر در جمعیت جدید نمی‌شوند (Endler 1977). با توجه به اینکه مهاجرت در این بیمارگر در مناطق دور به شکل فرم غیرجنسی (ژنوتیپ) صورت می‌گیرد، مهاجران از شانس بیشتری برای استقرار در منطقه جدید بهره‌مند می‌باشند. این امکان وجود دارد که این مهاجران از طریق ادغام ژن‌ها یا آلل‌های جدید در مخزن ژنی جمعیت پذیرنده در منطقه جدید مستقر شوند. اما نتیجه ادغام تا چه حد فراوانی و یکنواختی پراکنش آلل‌های جدید را در منطقه به دنبال خواهد داشت تابع شرایط اثرگذار و حاکم بر جمعیت‌ها در منطقه می‌باشد. سرنوشت ژن‌های معرفی‌شده به داخل جمعیت در بخش انتخاب تعیین می‌شوند. چنانچه ژن‌های جدید دارای قابلیت (Fitness) بالاتری باشند فراوانی‌شان افزایش می‌یابد مانند ژن‌های سازگار با شرایط محیطی جدید، ژن‌های مقاوم به یک قارچکش خاص در صورتی که در منطقه جدید نیز در حال مصرف باشد و یا ژن‌های پرآزار، که در این صورت با برخورداری از قابلیت بوجود آمده از طریق انتخاب فراوانی آن‌ها افزایش می‌یابد. در این شرایط فراوانی ژن‌های با قابلیت کمتر کاهش می‌یابد و ممکن است سرانجام ناپدید شوند. وقتی تفاوت‌های قابلیت زیاد باشد، انتخاب می‌تواند عامل تغییرات سریع در جمعیت‌های بیمارگر در منطقه جدید شود. در این صورت این وضعیت می‌تواند منجر به بروز مشکلاتی در مدیریت این بیماری

شود. بنابراین جابجایی بذر بین کشاورزان در مناطق دور در شمال ایران می بایست حتماً پس از ضدعفونی انجام شود. چون انتقال بیمارگر از طریق بذر به شکل غیرجنسی صورت می‌گیرد و مهاجرت ژن ناشی از پروپاگول‌های غیرجنسی (مهاجرت ژنوتیپ) ریسک بالاتری نسبت به جابه‌جایی پروپاگول‌های جنسی (مهاجرت ژن) ایجاد می‌کند چون پروپاگول‌های جنسی ترکیب جدیدی از آلل‌ها را ارایه می‌نمایند که قبلاً در مقابل شرایط محیطی که در آن وارد می شوند، آزموده نشده‌اند ولی پروپاگول‌های غیرجنسی یک مجموعه وابسته از ژن‌های همسازگار (Coadapted) را ارائه می‌کند که برای یک سطح بالایی از قابلیت در محیط زراعی که از آن منشاء گرفته‌اند، از قبل انتخاب (Preselected) شده‌اند (McDonald 2004).

فراوانی تشکیل فرم جنسی می‌تواند نقش مهمی در پراکنش آلل‌ها و افزایش غنای ژنوتیپ‌ها در مزارع و نقاط نزدیک به هم داشته باشد. تشکیل فرم جنسی این بیمارگر از یک مزرعه در آمل گزارش شده است (Khosravi *et al.* 2011) اما از سایر مناطق استان مازندران و استان‌های گیلان و گلستان هرچند که تاکنون گزارش نگردیده است ولی تشکیل پودر سفید رنگ در اطراف لکه‌های روی غلاف برگ برنج که نشانه اولیه ماکروسکوپی تشکیل فرم جنسی این بیمارگر می‌باشد به طور مکرر خصوصاً در ارقام و مزارع شدیداً آلوده در استان گیلان مشاهده شده است (نتایج انتشار نیافته نگارنده اول). به علاوه گزارش شده است که سیستم آمیزشی در این گروه آناستوموزی، هتروتالیک است (Rosewich *et al.* 1999)، سیستمی که در گروه‌های آناستوموزی A6-1، AG-4 و AG-8 این گونه (*R. solani*) قبلاً نیز گزارش شده است (Adams 1988; Anderson 1984; Phillips 1993). بنابراین، آمیزش جنسی در مناطق نزدیک و سازگاری رویشی هم در مناطق و مزارع نزدیک و مجاور، و هم در مناطق دور می‌بایست نقش مهمی در یکنواختی پراکنش آلل‌ها در افراد و ژنوتیپ‌های جمعیت‌های بیمارگر مذکور در شمال کشور داشته باشد، به ویژه افزایش غنای ژنوتیپی و ادغام آلل‌های جدید مهاجر در مخزن ژنی جمعیت پذیرنده در مناطق دور از هم به شدت متأثر از میزان سازگاری رویشی بین اعضای جمعیت پذیرنده با افراد مهاجر می‌تواند باشد. چرا که تماس هیفی دو جدایه زمانی به واکنش سازگاری رویشی تلقی می‌شود که امتزاج دیواره‌ها و غشای سلولی در محل برخورد هیف‌های دو جدایه رخ دهد (Carling *et al.* 1988). بررسی سازگاری رویشی در جمعیت‌های این بیمارگر در شالیزارهای شمال کشور نشان داد که تلاقی‌های منجر به سازگاری رویشی موفق در افراد جمعیت‌های منطقه‌ای آمل، رشت و تنکابن به ترتیب ۱/۱۲۲، ۲/۷۴۸ و ۲/۹۸۲ درصد از کلیه تلاقی‌های ممکن در هر جمعیت بوده و هریک از جمعیت‌های رشت ۱، رشت ۲، آمل ۱، آمل ۲، تنکابن ۱ و تنکابن ۲ به ترتیب از ۲۸، ۲۰، ۳۰، ۳۴، ۲۲ و ۲۲ گروه مختلف متشکل بودند (Padasht-Dehkaei 2010). با توجه به اینکه بیمارگر *R. solani* از گروه آناستوموزی AG-1 IA، تقریبا در اکثر مناطق و مزارع برنج حاشیه جنوبی دریای خزر در شمال ایران وجود دارد، این عرصه وسیع جغرافیایی و اکوسیستم زراعی با میزبانی اصلی گیاه برنج می‌بایست جایگاه جمعیت‌های بسیار متنوع بزرگ و کوچک با خویشاوندی براساس ویژگی یا ویژگی‌های متفاوت باشد. خویشاوندی مبتنی بر ویژگی‌های سیستم آمیزشی هتروتالی و گروه‌های سازگاری رویشی متنوع می‌تواند گروه و جمعیت‌های کوچک متنوعی را تشکیل دهد که کاهش یا افزایش فراوانی بعضی ژن‌ها در اثر رانش ژنتیکی و انتخاب طبیعی و یا تنگنا منجر به حذف بعضی ژن‌ها و در عین حال

تثبیت بعضی ژن‌های دیگر شده و به دنبال آن تنوع ژنتیکی کاهش یابد. بعلاوه جریان رانش ژنتیکی و بروز انتخاب طبیعی، تنگنا و رویدادهای بنیان گذار در جمعیت‌های بزرگ تر نیز می تواند کوچک شدن جمعیت را به دنبال داشته باشد (McDonald 2004). تثبیت ژن یا آلل ۱۴۵bp در جایگاه TC12 در جمعیت آمل۱ و آمل۲ و همچنین فراوانی بسیار بالای (۰/۹۰۶۲ تا ۰/۹۵۴۵) آن در بقیه جمعیت‌ها و به همین ترتیب برای آلل ۱۶۸bp در جایگاه TC17، آلل ۱۴۲bp در جایگاه TC07 و آلل ۲۳۹bp در جایگاه TC05، که فراوانی بالای آن‌ها سبب کاهش فراوانی و یا حذف دیگر آلل‌ها در همان جایگاه شده است (جدول ۲). این یافته‌ها از وجود خویشاوندی‌های کوچک‌تر در جمعیت‌های بیمارگر در مناطق مذکور حمایت می‌نماید و این خویشاوندی‌های در محدوده جمعیتی کوچک با توجه به سیستم هتروتالیسم آمیزشی در این گونه و گروه (*R. solani* AG-1 IA) و درصد بالای ناسازگاری رویشی می‌بایست مشمول آمیزشی جنسی نیز باشد. هرچند که جایگاه‌هایی که سازگاری رویشی را در بازیدیومیست‌ها هدایت می‌کنند متفاوت از جایگاه‌های تیپ‌های آمیزشی هستند (Esser & Blaich 1994). به علاوه وجود آلل‌هایی با فراوانی بسیار پایین در یک جمعیت و عدم حضور آن‌ها در سایر جمعیت‌ها خود مستند دیگری از نقش رانش ژنتیکی و انتخاب طبیعی در ترکیب، فراوانی و نحوه پراکنش آللی در جمعیت‌های *R. solani* AG-1 IA بیمارگر سوختگی غلاف برنج در شالیزارهای شمال ایران می‌باشد چنانکه مک دونالد (2004) بیان کرده است که به علت ناپدید شدن تصادفی آلل‌ها در جمعیت‌های مختلف انتظار می رود که تعداد زیربخشهای جمعیت افزایش یافته، جمعیت‌ها از هم متمایز شوند و در جمعیت‌های با اندازه های کوچک موثر، احتمال وقایع آمیزشی بین افراد خویشاوند نزدیک افزایش یابد که انحراف از توازن هاردی وینبرگ در یک تا سه جایگاه در هر جمعیت که بیان کننده افزایش یا کاهش معنی دار ضریب خویش آمیزشی در این جایگاه‌ها می باشد نیز موید این موضوع هست. بنابراین، با ملحوظ داشتن همه مستندات ارایه‌شده، در نتیجه گیری نهایی می توان این طور تفسیر نمود که جمعیت‌های این بیمارگر در شمال ایران می بایست از زیر گروه‌های کوچک زیادی در هر منطقه و مزرعه متشکل باشد و فراوانی‌های متفاوت آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها، غیر یکنواختی در فراوانی آن‌ها، سازگاری رویشی کم و عدم فراوانی تشکیل فرم جنسی نیز هم تحت تاثیر این ویژه گی بیمارگر بوده و همچنین موید آن می باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله از همکاری‌ها و مساعدت‌های دانشگاه تهران، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، دانشگاه ETH زوریخ سویس، سازمان تحقیقات،آموزش و ترویج کشاورزی و مؤسسه تحقیقات برنج کشور در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

Adams G. C. Jr. 1988. *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*), a specific complex of wide host range, pp. 535-550. In: G. S. Sidhu (Ed.). Advances in Plant pathology, vol 6. Genetics of plant pathogenic fungi. Academic Press, New York.

Adams G. C. 1996. Genetics of *Rhizoctonia* species, pp. 101-116. In: B. Sneh, S. Jabaji-Hare, S. Neate and G.

Dijst (Eds.). *Rhizoctonia*: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease Control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Anderson N. A. 1984. Variation and heterokaryosis in *Rhizoctonia solani*, pp. 367-382. In: D. H. Jennings and A. D. M. Rayner (Eds.). The Ecology and Physiology of the fungal mycelium. Cambridge, Cambridge Univ. Press.

Banniza S., SY A. A., Bridge P. D., Simons S. A. and Holderness M. 1999. Characterization of population of *Rhizoctonia solani* in paddy rice fields in cote d'Ivoire. Phytopathology 89: 414-420.

Bernardes-de-Assis J., Peyr P., Zala M., Rush M., McDonald B. A. and Ceresini P. C. 2008. Divergence between sympatric rice- and soybean-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. Phytopathology 98: 1326-1333.

Burnett J. 2003. Fungal populations and species. Oxford University Press. 384 p.

Carling D. E. 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis reaction. pp. 37-47. In: B. Sneh, S. Jabaji-Hare, S. Neate and G. Dijst (Eds.). *Rhizoctonia*: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology, and disease control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Carling D. E., Kuninaga S. and Leiner R. H. 1988. Relatedness within and among intraspecific groups of *Rhizoctonia solani*: A comparison of grouping by anastomosis and by DNA hybridization. Phytoparasitica 16: 209-210.

Carling D. E., Kuninaga S. and Brainard K. 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.

Cavalli-Sforza L. L., Menozzi P. and Piazza A. 1996. The history and geography of human genes. Princeton, N.J.: Princeton University Press. 413 p.

Ciampi M. B., Meyer M. C., Costa M. J. N., Zala M., McDonald B. A. and Ceresini P. C. 2008. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA from soybean in Brazil. Phytopathology 98: 932-941.

Elmousadik A. and Petit R. J. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. Theoretical and Applied Genetics 92: 832-839.

Endler J. A. 1977. Geographic variation, speciation, and clines. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 255p.

Esser K. and Blaich R. 1994. Heterogenic incompatibility in fungi, pp. 211-232. In: J. G. H. Wessels and F. Meinhardt (Eds). The Mycota, I, growth, differentiation and sexuality. Springer-Verlag, Berlin.

Glaubitz J. C. 2004. Convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. Molecular Ecology Notes 4: 309-310.

Khosravi V., Naeimi S., Padasht-Dehkaei F., Rostami M. and Ceresini P. C. 2011. First report of naturally occurring *Thanatephorus cucumeris* (anamorph: *Rhizoctonia solani* AG-1 IA) on paddy-rice fields from Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 47: 27–8. (In Persian with English abstract).

Linde C. C., Zala M., Paulraj R. S. D., McDonald B. A. and Gnanamanickam S. S. 2005. Population structure of the rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from India. European Journal of Plant Pathology112: 113-121.

Lowe A. Harris S. Ashton P. 2004. Genetic diversity and differentiation, pp. 52-105. In: A. Lowe, S. Harris and P. Ashton (Eds). Ecological genetics: design, analysis, and application. b. Oxford: Blackwell Publishing.

McDonald B. A. 2004. Population genetics of plant pathogens. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-A-2004-0524-01.

Matsumoto M. 2002. Trials of direct detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG 1 and AG 2 subgroups using specifically primed PCR analysis. Mycoscience 43:185-189.

Meirmans P. G. and Van Tienderen P. H. 2004. GenoType and GenoDive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. Molecular Ecology Notes 4:792-794.

Padasht-Dehkaei F. 2010. Study on the population structure of *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani* AG-1 IA), causal agent of rice sheath blight disease from northern Iran. PhD. Thesis, submitted to University of Tehran College of Sciences and Agricultural Engineering Department of Plant Protection, Iran, 139 pp. (In

Persian with English abstract).
Padasht-Dehkaei F., Ceresini E. P. C., Zala M., Okhovvat S. M., Nikkhah M. J. and McDonald B.A. 2013. Population genetic evidence that basidiospores play an important role in the disease cycle of rice-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA in Iran. Plant Pathology 62: 49–58.
Phillips A. J. L. 1993. The use of protoplasts for the preparation of homokaryons from heterokaryotic isolates of *Rhizoctonia solani*. Mycological Research 97: 456-460.
Rosewich U. L., Pettway R. E., McDonald B. A. and Kistler H. C. 1999. High levels of gene flow and heterozygote excess characterize *Rhizoctonia solani* AG-1 IA (*Thanatephorus cucumeris*) from Texas. Fungal Genetics and Biology 28: 148-159.
Small K. S., Brudno M., Hill M. M. and Sidow A. 2007. Extreme genomic variation in a natural population. Proceedings of the National Academy of Sciences104 (13): 5698–703.
Stevens-Johnk J. and Jones R. K. 1994. Comparison of whole-cell fattyacid compositions in intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* AG-1. Phytopathology 84: 271-275.
Weir B. S. and Cockerman C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370.
Zala M., McDonald B. A., Bernardes-de-Assis J., Ciampi M. B., Storart M., Peyer P. and Ceresini P. C. 2008. Highly polymorphic microsatellite loci in the maize- and rice-infecting fungal pathogen *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1 IA. Molecular Ecology Resources 8: 686-689.