

각종 작물로부터 분리한 *Rhizoctonia solani* 균주의 RFLP 및 PCR-RFLP를 이용한 분자계통학 특성 구명

최혜선 · 신환성 · 김희종 · 김경수 · 우수진 · 이윤수*

강원대학교 농업생명과학대 식물응용과학부

Rhizoctonia solani 분류를 위해 균사의 anastomosis group과 group간의 유전적 차이의 분석을 위해 rDNA의 PCR-RFLP와 RFLP를 실시하였다. rDNA의 PCR-RFLP 결과 *R. solani*는 크게 5 group으로 나뉘어졌다. 균주 번호 1번과 3번은 AG-5그룹과 0.976의 높은 상동성을 보였고, 12번, 13번은 AG-2-(III B)와 1.00로 나타났으며 11번도 AG1과 1.00로 나타났다. 균주번호 10번은 AG-2-2와 0.976의 상동성을 보였다. 균주번호 7, 8, 11, 13, 15는 AG-1에 속하였다. 제한효소 *Hae*III로 절단하였을 때 균주번호 4, 5, 7, 8은 700 bp에서 하나의 밴드가 나타나 AG-1에 속하였고, 균주번호 9는 AG-2-1과 517 bp에서 하나의 밴드가 나타났다. 또한 제한효소 *Msp* I 을 사용하여 southern blotting을 한 결과 더 다양한 절단양상을 보이며 AG간의 차이가 나타났다. AG-2-1과 균주번호 9는 200 bp에서 하나의 밴드가 나타났다. 균주 3, 4, 5, 10, 11, 13은 AG-1과 1 kb에서 하나의 밴드로 나타났다.

Key words □ PCR-RFLP, RFLP, *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani Kuhn[*Thanatephorus cucumeris*(Frank) Donk]는 전세계적으로 넓은 기주 범위를 가지는 토양식물 병원균으로 모잘록병, 잔디류의 갈색잎마름병, 피경, 구근, 인경에서의 갈색썩음병, 감자의 덩이줄기, 오이, 토마토, 가지, 콩들의 열매 및 꼬투리썩음병, 벼에서의 가장 중요한 잎집마름병 등을 일으키는 담자균아부에 속하는 균이다(1, 2, 4, 6, 16). *R. solani*는 4종 또는 그 이상의 다소 유연관계가 있는 곰팡이들의 집합종(collective species) 또는 종 복합체(species complex)로 다양한 종내그룹을 가지며 종내그룹의 분류에는 균사융합(anastomosis system)과 배양형태(culture type)가 많이 이용되고 있다(26-29). 현재까지 세계적으로 12개의 균사융합군(AG-1, AG-2-1, AG-2-2, AG-3, AG-4, AG-5, AG-6, AG-7, AG-8, AG-B1, AG-9, AG-10)이 보고되어져 있으며(10, 11, 13, 15, 19), 이들은 배양형태에 따라 AG-1은 IA, IB 그리고 IC로 AG-2-2는 III B, IV의 아그룹(subgroup)으로 나뉘어졌다(3, 12, 20).

Hyphal anastomosis는 *R. solani*가 연구되어진 이래 중요한 분류학적 방법을 제공하였으며 species안에서의 다양성을 이해하고 여러식물의 *R. solani*에 대한 저항성 육종을 위한 균주의 AG를 결정하는데 있어서(13, 15, 28), 그리고 여러작물의 *R. solani*병 발생을 예측하는데 있어서 매우 중요한 역할을 해왔다. 하지만 *R. solani* 중 몇 개는 tester strains을 가지고 anastomosis되지 않고 어떤 특별한 group에도 속하지 않으며 많은 시간과 노력이 요구되어진다(12, 13, 20, 29).

rRNA 유전자를 암호화하는 DNA sequence는 곰팡이류의 다양한 유전적 특성과 분류학적관계, 병원성을 이해하는데 유용하

다(8, 9, 18, 19, 21). 곰팡이류 안에서 rDNA는 mitochondria 또는 핵안에 위치하고 그것의 전체길이는 다양하고 높게 보존된 염기서열을 유지하며 18S, 5.8S, 28S rRNA를 포함한 unit로 반복되고 반수체 genome당 59 copies를 이룬다(14, 22, 23, 24). *R. solani*의 rRNA 유전자의 분자적 방법은 분류학적, 계통발생학적, 그리고 진단과정의 발전을 가져왔으며 *R. solani*의 AG(anastomosis group)와 subgroup 사이의 유전적 차이는 southern hybridization(5, 6)과 RAPD방법(7, 25), rDNA PCR-RFLP(17, 30, 32) 방법으로 증명되어져 왔다. 본 연구에서는 *R. solani*를 분자생물학적 방법인 PCR-RFLP와 RFLP 기법을 사용하여 유연특성을 분석하였다.

재료 및 방법

Rhizoctonia solani 균주배양

한국화학연구소와 농업과학기술원에서 *R. solani* 균주(AG tester)를 분양받아 본실험을 수행하였다(Table 1). 분양받은 균주를 *R. solani* 선택배지(gallic acid)상에서 배양하였으며(10), 선택배지에서 자란 *R. solani*를 PDA 배지상에 옮겨 계대 배양하였다. PDA배지에서 7일간 자란 균주를 PDB 배지에 cork borer를 이용하여 접종하여 25°C에서 15일간 120 rpm으로 진탕배양 하였다.

Genomic DNA의 분리

*R. solani*의 genomic DNA를 추출하기 위해서 PDB 배지에서 15일간 자란 균사를 사용하였다. 광목천으로 PDB에서 자란 균사를 거른후 균사의 배지 성분을 제거하기 위해 멸균수로 2~3회 세척하여 균사를 동결건조하였다. 동결건조된 균사를 액

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 82-0361-250-6417, Fax : 82-0361-243-3314
E-mail : younslee@cc.kangwon.ac.kr

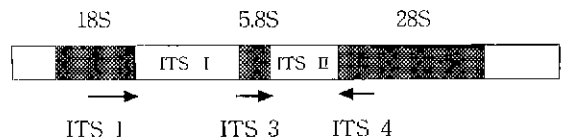
Table 1. Isolates of *Rhizoctonia solani* used in this study

Isolate No.	<i>Rhizoctonia solani</i>	Sources
1	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Zea mays</i> L.
2	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Oryza sativa</i> L.
3	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Oryza sativa</i> L.
4	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Oryza sativa</i> L.
5	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Oryza sativa</i> L.
6	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Solanum tuberosum</i> L.
7	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Lactuca sativa</i> L.
8	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Capsicum annuum</i> L.
9	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.
10	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Cucurbita</i> spp.
11	<i>Rhizoctonia solani</i>	unknown
12	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Monochoria vaginalis</i> var. <i>plantaginea</i>
13	<i>Rhizoctonia solani</i>	unknown
14	<i>Rhizoctonia solani</i>	unknown
15	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1	unknown
16	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1	unknown
17	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 (IA)	<i>Cyperus exaltatus</i> var. <i>iwasakii</i> T. Koyama(Sheath blight)
18	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1(IB)	<i>Codonopsis lanceolata</i> (S. & Z.) Trautv.
19	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1(IC)	<i>Brassica campestris</i> ssp. <i>pekinensis</i> (Lour.) Oiss.
20	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-2-1	unknown
21	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-2-2	unknown
22	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-2-2(IIIB)	unknown
23	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-2-2(IV)	<i>Daucus carota</i> var. <i>sativa</i> DC. (Crown rot)
24	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-3	<i>Solanum tuberosum</i> L. (Black scurf, Stem canker)
25	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-3	unknown
26	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-4	<i>Raphanus sativus</i> L.(Damping-off)
27	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-4	unknown
28	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-5	unknown
29	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-5	<i>Allium fistulosum</i> L. (Damping-off)

체질소를 이용하여 마쇄하여 멸균된 50 ml tube에 넣어 -70°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다. DNA의 추출은 마쇄된 균사 5 g에 Lysis buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 3% sodium dodecyl sulfate; 1% 2-mercaptoethanol) 10 ml(w/v)을 넣고 68°C 항온수조에서 1시간 동안 반응 시킨 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)과 chloroform/isoamylalcohol(24:1)처리과정을 순차적으로 1회씩 처리한 후, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 12시간 이상 -20°C 냉동고에 보관하였다. 보관된 상층액을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 70% ethanol 500 ml에 넣고 세척한 다음 실온에서 완전히 건조시키고 RNase(50 µl/ml)가 첨가된 TE buffer(10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.4) 1 ml에 충분히 녹인후 37°C에서 1시간 보관하였다. DNA를 0.8% agarose gel을 사용하여 0.5X buffer상에서 100 v/cm²의 전원으로 60분간 전기 영동 후 UV상자 상에서 이미 농도를 알고 있는 lambda DNA를 기준하여 농도를 확인하였고, 확인된 DNA는 -20°C 냉동고에 보관하여 사용하였다.

rDNA의 ITS, ITS II 영역의 PCR-RFLP

rDNA의 ITS, ITS II 영역의 PCR 반응 rDNA의 noncoding region ITS(I+II), ITS II영역을 증폭하기 위하여 White (31)의 방법에 따라 실시하였으며, ITS II지역의 증폭은 specific primer ITS 1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS 3: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'와 ITS 4:5'-TC-CTCCGCTT ATTGATATGCTGC-3'를 이용하였다(Fig. 1). PCR반응은 1X reaction buffer, 200 µM dNTPs, 1 unit *Taq* polymerase, 1.5



- Ⓢ Primer ITS 1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
- ITS 3: 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'
- ITS 4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Fig. 1. rRNA gene structure in the repeat unit of a portion of the rDNA repeat showing the location of oligonucleotide primer site used to amplify rDNAs from *R. solani*.

mM MgCl₂, 0.5 μM primers를 첨가하여 전체량을 100 μl로 수행하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 5분간 초기 변성 시킨후, 95°C에서 1분, 57°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1 cycle로 최종 35 cycle을 반복하고 72°C에서 10분간 반응시킨 후 반응을 종료하였다. 증폭된 PCR산물은 0.5×TBE(0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA) buffer를 사용하여 1% agarose gel에서 2시간 동안 전기 영동한 후 UV 상자에서 전개된 DNA 단편들의 양상을 관찰하였다.

rDNA ITS, ITS II 영역의 PCR-RFLP ITS(I+II), ITS II 영역의 증폭을 확인한 후, 이 지역의 염기서열 차이를 확인하기 위해 제한효소로 절단 양상을 관찰하였다. ITS II 영역의 절단 인식 부위를 갖고 있는 제한효소를 선별하기 위하여 4 bases를 인식하는 *Msp* I, *Hha* I, *Taq* I, *Hae* III, 5 bases를 인식하는 *Hinf* I, *Ava* II, 그리고 6 bases를 인식하는 *Bam*HI, *Kpn* I, *Xho* I, *Hind* III, *Eco*RI 등 총 11개의 제한효소를 이용하여 최종 20 μl(PCR product 9 μl, 10X enzyme buffer 2 μl, Enzyme 1 μl, dH₂O 8 μl)로 하여 각 제한효소의 최적 반응온도에서 반응 시킨후 3% MetaPhor™ agarose gel(FMC Bioproducts, USA)에 전기영동하여 각 균주간에 다형화현상을 비교하였다. 각 균주간의 다형화현상을 수치화하기 위해 전기영동상에서 확인된 DNA 단편들을 binominal matrix code(0, 또는 1)로 작성하고 이를 자료로 하여 유사도 지수를 선출하였다. 각 균주간의 유사도 matrix를 가지고 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic means)법을 이용하여 각 균주간의 군집화(clustering)를 하고 이를 토대로 계층도(dendrogram)를 작성하였다. 이러한 작업은 수리분류분석용 프로그램인 NTSYS-pc를 이용하였다.

RFLP

***R. solani* 제한 단편의 Southern transfer** 29개 *R. solani*의 DNA를 *Hae* III, *Msp* I 제한효소로 12시간 동안 제한효소의 최적반응온도에서 반응시켜 절단한 후, 절단된 DNA를 1% agarose gel에 loading하여 30 voltage로 12시간 전기영동시킨 후 UV아래에서 완전히 절단 되었는지 확인하였다. 전기영동한 agarose gel을 0.25N HCl에 담궈서 10분 정도 흔들여 준 후 증류수로 세척하고, 다시 denaturing buffer(0.5N NaOH, 1.5 M NaCl)에 30분 동안 보관한 후 증류수로 다시 세척하고, transfer직전까지 0.4 N NaOH용액에 보관하였다. 0.4 N NaOH를 transfer용액으로 하여 16시간 동안 membrane에 transfer하였다. Transfer가 끝난 membrane을 6X SSC를 사용하여 세척하였으며, 다시 3M paper사이에 넣고 실온에서 1시간 동안 건조하였다.

Probe labelling *R. solani*의 RS-10번 균주의 ITS영역을 pGEM^(R)-T Easy Vector(Promega, USA)에 cloning하였으며, vector에 존재하는 pUC/M13 forward primer(5'-CGCCAGGGT-TTTCCCAGTCACGAC-3')와 reverse primer(5'-TCACACAGG-AAACAG CTATGAC-3')를 사용하여 PCR labeling법으로 probe를 제작하였다. PCR labelling 반응 조성은 plasmid DNA 10 ng, M13/pUC forward, reverse primer 0.5 μM, 10X buffer;

5 unit *Taq* polymerase, 0.1 mM dGTP, dCTP, dATP, 0.09 mM dTTP, 1 mM digoxigenin-dUTP(Boehringer Mannheim, Germany)로 최종 100 μl양으로 하였으며, 94°C에서 1분 30초, 50°C에서 1분 30초, 72°C에서 2분을 한 과정으로 하여 25번 반복한 후, 72°C에서 4분 동안 반응시켰다. PCR 반응 종료후 PCR 산물 10 μl를 취하여 1.5% agarose gel에 전기영동하였으며, 예상되는 크기와 동일한 크기의 DNA가 증폭되었는지 확인하였다.

Hybridization Transfer된 membrane을 60°C로 미리 가열된 standard hybridization solution(5X SSC, 0.02% SDS, 0.1% N-lauroylsarcosine, 1% blocking reagent) 20 ml를 첨가하고 1시간 동안 prehybridization시킨 다음 기존의 buffer를 제거하고, 완전변성된 probe 30 μl와 standard hybridization solution이 혼합된 용액 5 ml를 다시 첨가한 후 60°C에서 12시간 hybridization 하였다.

Probe detection Hybridization이 끝난 뒤 membrane에 붙지 않은 probe를 제거하기 위하여, 2X SSC, 0.1%(w/v) SDS 용액과 0.1X SSC, 0.1%(w/v) SDS 용액에 각각 20분씩 최종 2회에 걸쳐 membrane을 세척하였다. 세척된 membrane은 blocking stock solution을 maleic acid buffer로 1:10 희석시킨 용액에 실온에서 30분 동안 incubation시켰으며, 다시 anti-dig-AP conjugate를 전 과정에서 사용된 buffer로 1:5,000 희석시킨 용액에 실온에서 30분 동안 incubation 시켰다. 그후 붙지 못한 conjugate를 제거하기 위하여 0.3%(w/v) tween 20이 함유된 maleic acid buffer로 실온에서 15분씩 2회에 걸쳐 세척하였으며, 전과정이 끝난 membrane은 CSPD를 이용해 X-ray film에 30분 동안 발광시킨 후 결과를 관찰하였다.

결과 및 고찰

PCR-RFLP

*R. solani*의 rDNA분석을 위해서 ITS II, ITS(I+II)부위를 증폭하였다. ITS II 부위의 증폭은 primer ITS 3과 primer ITS 4, ITS(I+II)의 증폭에는 primer ITS 1과 primer ITS 4를 각각 사용하였다. PCR 증폭 후 1% agarose gel에서 전기영동 후 관찰한 결과 ITS II부위에서는 500 bp정도로 나타났다. ITS 지역은 700 bp 정도로 나타났으나 균주 번호 9, 21은 다른 균주와는 다르게 100 bp 정도 작은 크기를 나타내었다(Fig. 2).

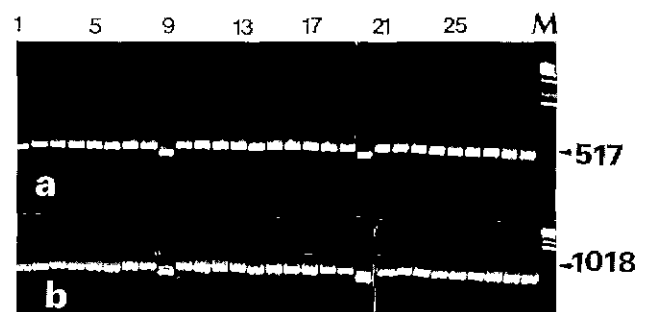


Fig. 2. PCR amplified portion of ITS II and ITS region in *R. solani* (a: ITS II, b: ITS).

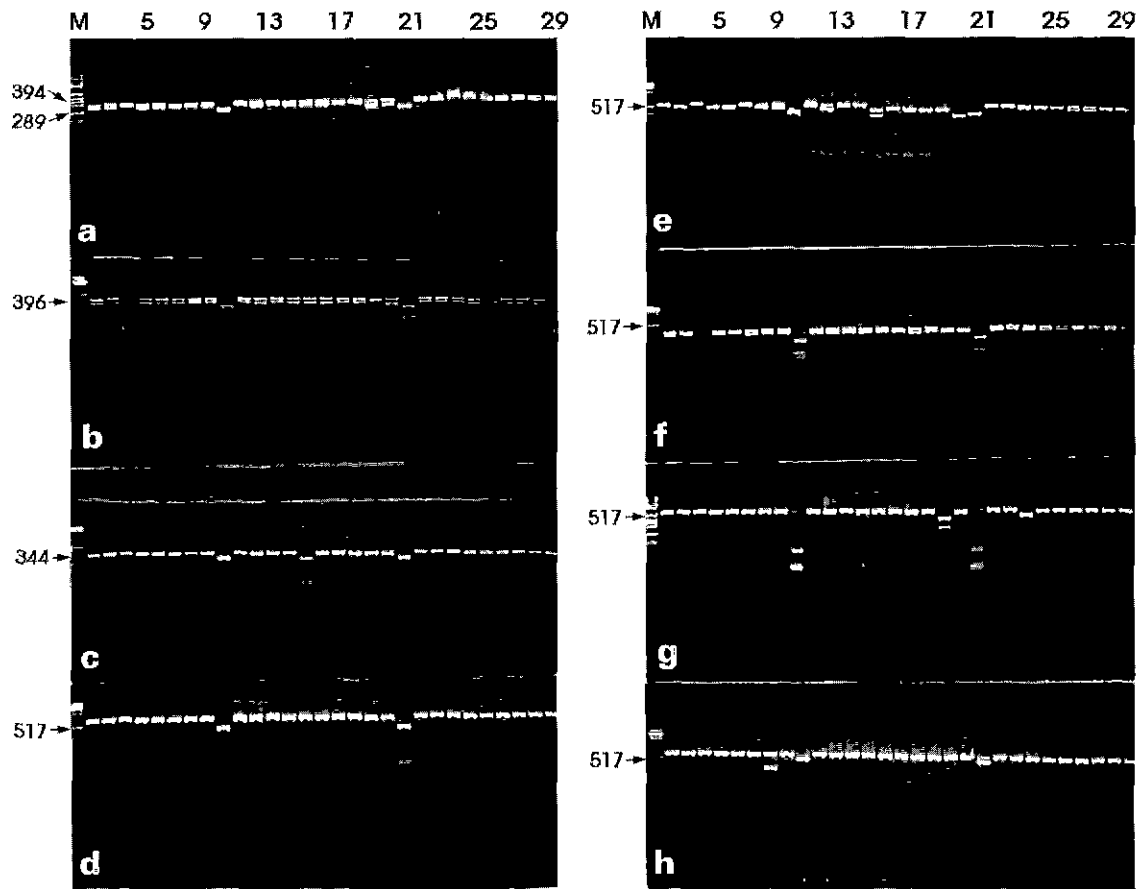


Fig. 3. Restriction fragment length polymorphism of *R. solani*. rDNA-ITS(I+II) amplification products digested with a: *EcoR* I, b: *Tag* I, c: *Hinf* I, d: *Kpn* I, e: *Hae* III, f: *Hha* I, g: *Msp* I, and h: *Bam*HI, respectively.

rDNA에서 증폭된 ITS(I+II), ITS부위를 4 bp의 *Hha* I, *Tag* I, *Hae* III, *Msp* I, 5 bp의 *Hinf* I, 6 bp의 *Bam*HI, *Kpn* I, *Xho* I, *EcoR* I, *Hind* III의 제한효소를 이용하여 절단하여 다형성을 비교한 결과 *Xho* I, *Hind* III를 제외한 모든 제한효소에서 절단되었다(Fig. 3, 4).

ITS, ITS II지역의 제한효소의 절단 결과 *Hae* III, *Msp* I 제한효소만이 그룹내 균주들의 다양성이 관찰되었다. 제한효소 *Hae* III는 AG-4에서 유일한 밴드형태를 보였고, AG-2-2에서 그룹간의 밴드의 차이를 보였다. ITS II 지역에서 제한효소 *Kpn* I, *Hha* I, *Tag* I, *Bam*HI는 균주 9, 21번만 절단 양상을 보였다. 제한효소 *Msp* I에서는 균주 9번에서 200 bp 아래의 밴드를 보이고 균주 19번에서는 300 bp 아래의 밴드 절단 양상을 보였으며, *EcoR* I은 9, 19, 21에서 절단 양상을 보였다. *Hae* III는 균주 7, 8, 17에서 200 bp의 상하의 두 밴드가 존재하였고, AG-4에서 150 bp 아래의 밴드를 나타내었다. ITS지역에서는 ITS II지역보다 다양한 절단 양상을 보였다. 제한효소 *Kpn* I, *Hha* I에서는 ITS지역과 함께 균주 9, 21에서만 절단양상을 보였고, *Bam*HI에서는 균주 7, 제한효소 *Hinf* I은 14번이 균주 9와 21과 함께 절단되었다. *Msp* I에서는 균주 9에서 다양한 밴드를 가지는 현상이 나타났고, *Tag* I에서도 균주 19에서 다른

종들과는 다른 밴드 양상을 보였다. ITS지역이 ITS II 지역보다 염기서열의 삽입 또는 결실이 많은 것으로 나타났고, 제한효소 *Hae* III만 그룹간의 차이를 나타냈다. 또한 이들 10가지 제한효소를 가지고 각 균주간의 ITS지역의 RFLP의 현상을 비교하기 위해 전기영동상에서 확인된 band들의 유무에 따라 유연관계를 분석하였다(Fig. 5). 균주 1과 3은 AG-5그룹과 0.976로 높은 상동성을 보였고, 균주 12, 13은 AG-2-2(IIIb)와 1.000로 나타내며 균주 9와 AG-2-2(IIIb)에 속하였다. 균주 7, 8, 11, 12, 13, 15는 AG-1에 속하였다. rDNA의 PCR-RFLP 결과 subgroup의 구분이 어려워 종내 그룹의 유연관계 분석은 한계가 나타났고, ITSII영역의 제한효소 절단 결과 밴드의 다양성은 찾기 어려웠다. *R. solani*의 유연관계 분석에는 ITS영역이 ITS II영역보다는 더 적합한 것으로 나타났다.

RFLP

rDNA의 ITS(I+II)와 ITS II영역의 PCR-RFLP결과 *Hae* III와 *Msp* I에서 많은 제한 단편 현상이 나타나서 제한효소 *Hae* III, *Msp* I를 genomic DNA의 절단에 사용하였고, 균주 8의 ITS영역을 clonig하여 PCR-labelling과정을 통해 probe로 사용하였다. Southern hybridization을 통한 RFLP 결과 *R. solani*에서 200-

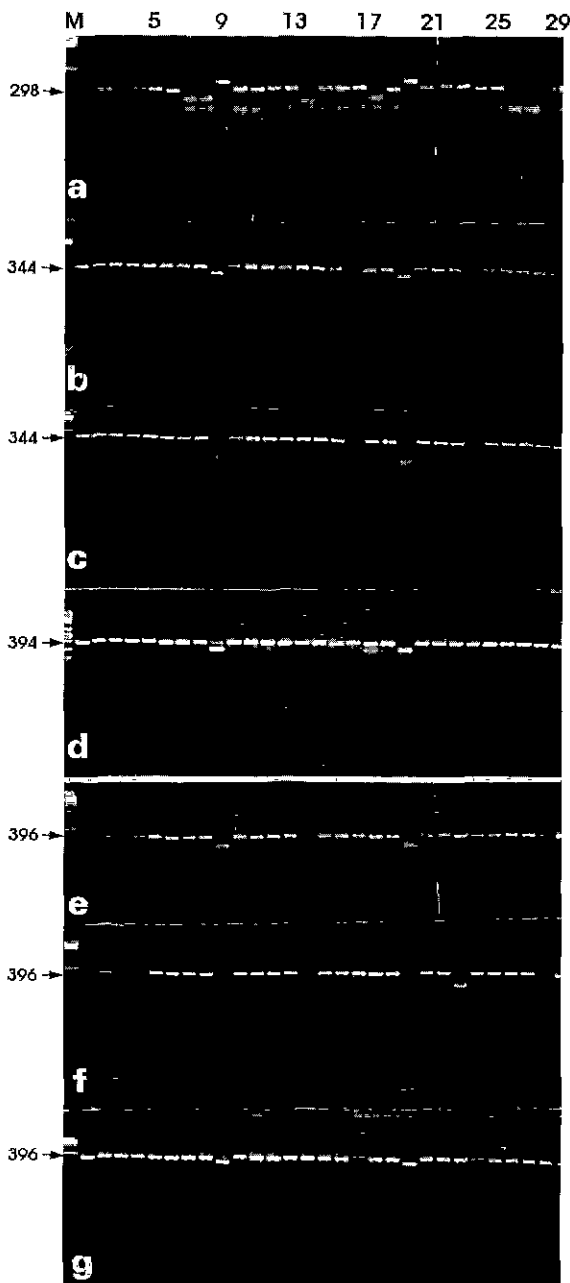


Fig. 4. Restriction fragment length polymorphism of *R. solani*. rDNA-ITS II amplification products digested with a: *Hae* III, b: *Hha* I, c: *Taq* I, d: *EcoR* I, e: *Hinf* I, f: *Msp* I, and g: *Bam*HI, respectively.

1,600 bp사이에서 밴드가 나타났다. 제한효소 *Hae* III를 사용하여 southern blotting을 한 결과, 제한효소 *Hae* III로 절단하였을 때 AG-5, AG-4, AG-3은 500, 750 bp에서 두 밴드가 나타났고, AG-1은 500 bp에서 하나의 밴드가 나타나 AG-1 간의 차이는 없었다. 균주 4, 5, 10, 11, 13은 700 bp에서 하나의 밴드가 나타나 AG-1에 속하였고, 균주 9는 AG-2-1과 517 bp에서 하나의 밴드가 나타났다(Fig. 6a).

또한 제한효소 *Msp* I을 사용하여 southern blotting을 한 결

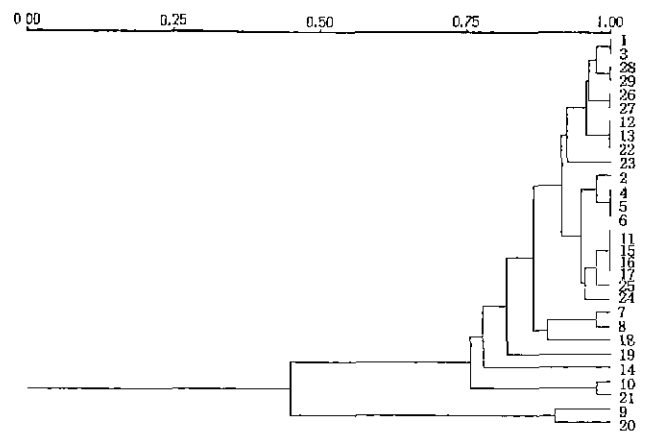


Fig. 5. UPGMA dendrogram among the twenty-nine *R. solani* based on the bands on 3% agarose gel in PCR-RFLP analysis.

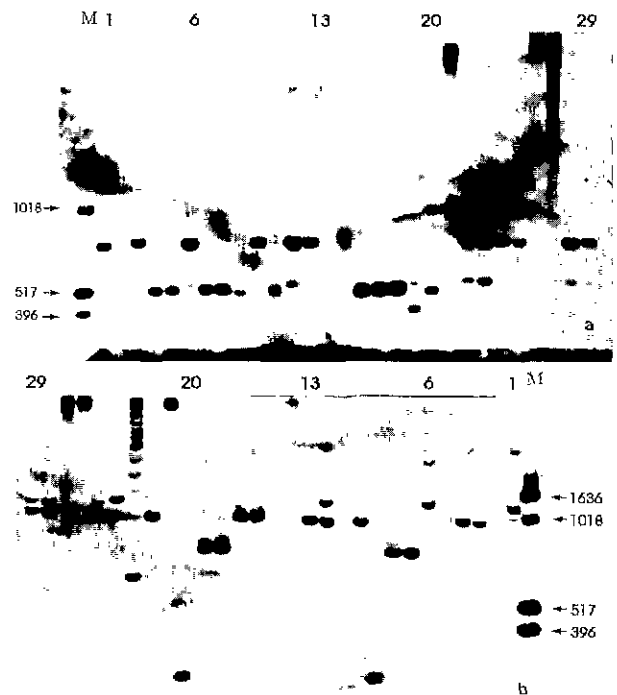


Fig. 6. The result of southern hybridization using RS-10 ITS region probe digested with a: *Hae* III, and b: *Msp* I, respectively.

과 더 다양한 절단양상을 보이며 AG간의 차이가 나타났다. AG-2-1과 균주 9는 200 bp에서 하나의 밴드가 나타났고, 균주 3, 4, 5, 10, 11, 13은 AG-1과 1 kb에서 하나의 밴드로 나타났다(Fig. 6b). Southern hybridization을 이용한 *R. solani*의 종내 구분은 적은 제한효소를 사용하여 AG안의 구분이 어려웠지만, AG의 유전적 분석에 가장 확실한 방법으로 좀더 많은 제한효소를 사용하면 확실한 AG구분이 이루어질 것으로 생각되며 rDNA의 PCR-RFLP의 제한단편 결과와도 많은 유사성이 나타났다.

감사의 말

본 연구 수행을 위해 균주를 분양해준 농진청과 한국화학연
구소 관계자 여러분께 감사의 말을 드립니다.

참고문헌

- Adams, G.C.Jr. 1988. *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*) a species complex of wide host range. *Adv. Plant Pathology* 6, 535-552.
- Adams, G.C. and E.E. Butler. 1982. A re-interpretation of the sexuality of *Thanatephorus cucumeris* anastomosis group four. *Mycologia* 74, 793-800.
- Adams, G.S.Jr. and E.E. Butler. 1979. Serological relationships among anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 69, 629-33.
- Akasaka, Y. and T. Ozawa. 1979. On the pathogenicity of *Rhizoctonia* sp. causing damping-off of buckwheat. *Ann. Rep. Soc. Plant Prot. N. Jpn.* 30, 77.
- Anderson, N.A. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Annu. Rev. Phytopathology* 20, 329-347.
- Anderson, N.A. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia* diseases and their occurrence, pp. 125-148. In Parmeter J. R. Fr. (ed.), *Rhizoctonia solani: Biology and Pathology*. Univ. of California Press, Berkeley.
- Bruns, T.D., R. Vilgalys, S.M. Barns, D. Gonzalez, D.S. Hibbett, D.J. Lane, L. Simon, S. Stickel, T.M. Szaro, W.G. Weisburg, and M.L. Sogin. 1992. Evolutionary relationships within fungi: Analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. *Mol. Physiology* 1, 231-241.
- Carling, D.E. and S. Kuminaga. 1990. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn: Inter and intragroup relatedness of anastomosis group-9. *Phytopathology* 80, 1362-1364.
- Carling, D.E., S. Kuminaga, and R.H. Leiner. 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. 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by haphal anastomosis reaction, pp. 37-47. In Snech, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. M. and Dijst, G. (eds.), *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht: Kluwer.
- Carling, D.E., C.S. Rothrock, G.C. MacNish, M.W. Sweetingham, and K.A. Brainard. 1994. Characterization of anastomosis group 11(AG 11) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 84, 1287-1393.
- Carling, D.E., R.H. Leiner, and K.M. Kebler. 1987. Characterization of a new anastomosis group (AG 9) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 77, 1609-1612.
- Castro, C. 1982. Methods for the quantitative estimation of *Rhizoctonia solani* in soil. 68pp. Ph. D. Thesis. University of Idaho. Moscow.
- Cubeta, M.A., E. Echandi, T. Abernethy, and R. Vilgalys. 1991. Characterization of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* spp. using restriction analysis of an amplified ribosomal RNA gene. *Phytopathology* 81, 1395-1400.
- Homma, Y., Y. Yamashita, and M. Ishii. 1983. A new anastomosis group (AG 7) of *Rhizoctonia solani* Kuhn from Japanese fields. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 49, 184-190.
- Ito, K., S. Kontani, and H. Kondo. 1995. Web-blight fungus of Japanese larch seedlings. *Bull. Forestry Experiment Station (Japan)* 79, 43-70.
- Jabaji-Hare, S.H., Y. Meller, S. Gill, and R.M. Charest. 1990. Investigation of genetic relatedness among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* using cloned DNA probes. *Can. J. Plant Pathology* 12, 393-404.
- Johnk, J. S. and R.K. Jones. 1992. Determination of whole-cell fatty acids in isolates of *Rhizoctonia solani* AG-1. *Phytopathology* 69, 629-633.
- Kuminaga, S., R. Yokosawa, and A. Ogoshi. 1978. Anastomosis grouping of *Rhizoctonia solani* Kuhn isolated from non-cultivated soils. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 44, 591-598.
- Kuminaga, S., R. Yokosawa, and A. Ogoshi. 1979. Some properties of anastomosis group 6 and BI in *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 45, 207-217.
- Kuminaga, S. and R. Yokosawa, R. 1980. A comparison of DNA compositions among anastomosis groups in *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 46, 150-158.
- Kuminaga, S. and R. Yokosawa, R. 1982. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn. I. Genetic relatedness within anastomosis group 1. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 48, 659-667.
- Kuminaga, S. and R. Yokosawa. 1982. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn. II. Genetic relatedness within anastomosis group 2. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 48, 668-673.
- Kuminaga, S. and R. Yokosawa. 1984. DNA base sequence homology in *Rhizoctonia solani* Kuhn. IV. Genetic relatedness within AG 4. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 50, 322-330.
- Liu, Z.L., D.L. Nicksrent, and J.B. Sinclair. 1990. Genetic relationships among isolates of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 based on isozyme analysis. *Can. J. Plant Pathol.* 12, 376-382.
- MacNish, G.C. and D.E. Carling. 1995. Use of vegetatively compatible populations (VCP) to determine field distribution of *R. solani* AG 8. *Phytopathology* 85, 1040.
- Neate, S.M. and J.H. Warcup. 1985. Anastomosis grouping of some isolates of *Thanatephorus cucumeris* from agricultural soils in South Australia. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 85, 615-620.
- Ogoshi, A., M. Onki, R. Sakai, and T. Ui. 1979. Anastomosis grouping among isolates of binucleate *Rhizoctonia*. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* 203, 147-158.
- Parmeter, J.R., R.T. Sherwood, and W.D. Platt. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 59, 1270-1278.
- Vilgalys, R. and D. Gonzalez. 1990. Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. *Curr. Genet.* 18, 277-280.
- White, T.J., T.D. Bruns, S. Lee, and J.W. Taylor. 1990. Amplification and directed sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. In Gelfand M., Sninsky, J. J., and White, T. J. (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. New York.
- Yang, H.A. and P.A. O'Brien. 1994. Genetic variability in peptic enzymes of *Rhizoctonia solani*. isolates causing hare-patch diseases of cereals. *Phytopathology* 141, 259-266.

(Received July 8, 1999/Accepted August 10, 1999)

ABSTRACT: Molecular Systematics of *Rhizoctonia solani* Isolates from Various Crops with RFLP and PCR-RFLP

Hae-Sun Choi, Whan-Sung Shin, Hee-Jong Kim, Kyoung Su Kim, Su Jin Woo, and Youn Su Lee* (Division of Applied Plant Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea)

As a result of PCR-RFLP, the isolates used in this study were classified into five groups. Isolates 1 and 3 were included in AG-5 with 97% genetic similarity. Isolates 12 and 13 were included in AG-1 with 100% genetic similarity. Isolates 10 and AG-2-2 showed 97% similarity. Isolates 7, 8, 11, 13, and 15 were included in AG-1. When isolates of 4, 5, 7 and 8 were restricted with *Hae* I, there was a single 700 bp fragment matched with AG-1. A 517 bp restriction fragment of isolate 9 was matched with AG-2-1. Based on the result of southern hybridization of genomic DNAs, all isolates restricted with *Msp* I showed more variable restriction differences than those restricted with *Hae* III. Isolates AG-2-1 and 9 showed 200 bp restriction fragment, and isolates 3 and AG-1 showed 1 kb restriction fragments.