

اولین گزارش گونه‌های *Fusarium subglutinans* و *Fusarium culmorum* جدا شده از رقم‌های پیاز استان‌های آذربایجان شرقی و غربی

اکبر جاهدی^۱، ابراهیم محمدی گل‌تپه^۲ و ناصر صفایی^{۳*}

۱، ۲ و ۳. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۲)

چکیده

گونه‌های مختلف فوزاریوم یک گروه از بیمارگرها هستند که سبب خسارت اقتصادی کمی و کیفی به پیاز می‌شوند. آلودگی‌های فوزاریومی معمولاً از کشتزار شروع و تا مرحله انبارداری ادامه می‌یابد. بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طبق پیاز در سراسر جهان وجود دارد و در چند سال اخیر در مناطق عمده کشت پیاز و به‌خصوص در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی گسترش زیادی پیدا کرده است و در حال حاضر مهم‌ترین بیماری پیاز در کشور است. به‌منظور شناسایی تکمیلی عامل بیماری در مناطق عمده کشت این محصول از آذربایجان شرقی (ایلخچی، آذرشهر، عجب‌شیر، بناب، ملکان، مرند، مراغه) و آذربایجان غربی (میاندوآب، خوی، سلماس) در تابستان ۱۳۹۱ از مزارع متعددی نمونه برداری به عمل آمد. پس از انجام جداسازی و خالص‌سازی، در مجموع ۱۴۰ جدایه خالص‌سازی گردید. از جدایه‌های خالص شده ۸۰ جدایه جهت انجام آزمون بیماری‌زایی روی غده پیاز انتخاب شدند که ۴۲ تا از جدایه‌ها بیماری‌زا بودند. بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) و داده‌های مولکولی ناشی از تکثیر قطعه موردنظر بر اساس آغازگرهای اختصاصی گونه‌های در مجموع ۹ گونه، *F. oxysporum*، *F. solani*، *F. nygamai*، *F. crookwellens*، *F. avenaceum*، *F. culmorum*، *F. subglutinans*، *F. redolens*، *F. proliferatum* شدند. از بین ۴۲ جدایه مورد بررسی ۱۴/۲۸ درصد جدایه‌ها پرآزاری شدید (بالای ۶۰٪)، ۲۶/۱۹ درصد پرآزاری به‌نسبت شدید (بین ۶۰-۵۰٪)، ۴۰/۴۸٪ پرآزاری متوسط (۵۰-۴۰٪) و در نهایت ۱۹/۰۵ درصد جدایه‌ها پرآزاری ضعیف (۳۰-۴۰٪) از خود نشان دادند. از ۴۲ جدایه مورد مطالعه گونه *Fusarium subglutinans* با فراوانی ۲/۳۸ درصد و پرآزاری درصد ۴۳ در گروه C، گونه *F. culmorum* با فراوانی ۷/۱۴ درصد و پرآزاری ۵۰ درصد در گروه B قرار گرفتند که برای اولین بار از روی پیاز از این مناطق گزارش می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: پرایمر اختصاصی، پژمردگی فوزاریومی، پیاز، ریشه و طبق.

The first report of *Fusarium culmorum* and *Fusarium subglutinans* in onion from West and East Azarbaijan provinces

Akbar Jahedi¹, Ebrahim Mohammadi Goltapeh² and Naser Safaie^{3*}

1, 2, 3. Former M.Sc. Student, Professor and Associate Professor, Department of Plant Pathology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: Jun. 29, 2015 - Accepted: May 12, 2018)

ABSTRACT

Various *Fusarium* species are pathogenic groups that cause economic loss (quantitatively and qualitatively) in *Allium cepa* L., *Fusarium* species including *F. culmorum* and *F. subglutinans* are of great importance in all onion growing areas. *Fusarium* infection usually starts from the farm and continue throughout the storage and marketing. *Fusarium* and basal rots of onion are important around the world. In recent years, they had a large spread in the major onion growing areas in West and East Azarbaijan provinces, and now are the most important disease of onions in Iran. Therefore, in order to identify and study this disease in major areas of cultivation, samples were taken from several fields in East Azarbaijan (Ilkhchi, Azarshahr, Ajabshir, Bonab, Malekan, Marand, Maraghe) and West Azarbaijan (Miandoab, Khoy, Salmas) in summer 2012. After isolation and purification, 140 isolates were obtained. Eighty isolates were selected for pathogenicity test on onion bulbs of which 42 were pathogenic. Among the 42 studied isolates, they categorized as extremely (14.28%), highly (26.19%), moderately (40.48%) and weakly (19.05%) virulent. Based on morphological characteristics and molecular identification using species-specific primers, eight species were confirmed. Out of the 42 isolates studied, *F. subglutinans*, with a frequency of 2.38% and 43% disease severity and *F. culmorum*, with a frequency of 7.14% and 50% disease severity are reported for the first time on onion in these areas.

Keywords: *Fusarium* wilt, onion, root and basal, species-specific primers.

* Corresponding author E-mail: nsafaie@modares.ac.ir

مقدمه

آذربایجان شرقی با سطح زیرکشت ۴۹۶۲ هکتار پیازکاری رتبه پنجم را بعد از هرمزگان، کرمان، خوزستان و بلوچستان و با تولید ۲۳۰۷۹۴ تن رتبه چهارم را بعد از هرمزگان، کرمان و اصفهان به خود اختصاص داده است (Agricultural statistics, 2014). انواع پیازهای ایرانی که در کشور هستند، شامل: پیازهای قرمز (آذرشهر، اصفهان، ری و طارم)، پیازهای سفید (قم و کاشان)، پیاز بنفش کهریزک و پیاز صورتی نوشهر است (Mirkazemi, 2011).

گونه‌های مختلف فوزاریوم بیماری پوسیدگی طبق و ریشه پیاز خوراکی (*Allium cepa* L.) را ایجاد می‌کند که بیمارگر خاکزی بوده و در کشتزار و انبار به محصول خسارت وارد می‌کند. علائم اولیه ناشی از بیماری پوسیدگی طبق فوزاریومی عمدتاً روی نوک انتهایی برگ‌ها ظاهر می‌شود که به صورت زردی بوده و در مرحله رسیدگی، بوته پیاز شروع به پژمردگی و خشک شدن می‌کند. پس از پیشرفت علائم در اندام‌های هوایی گیاه، ریشه‌ها پوسیده و توده کپکی سفیدرنگی روی آن‌ها ایجاد می‌شود. پیازهای آلوده نرم بوده و به هنگام ایجاد برش در ناحیه طبق، پوسیدگی نیمه آبکی در این قسمت‌ها ظاهر می‌شود. پوسیدگی به تدریج توسعه پیدا کرده به طوری که معمولاً آلودگی اولیه بیماری غیرقابل تشخیص است (Stevenson et al., 2002). به مرور ممکن است در مراحل بعدی در انبار غده‌های پیاز پوسیده شوند (Cramer, 2000; Lager, 2011; Brayford, 1996).

گونه *Fusarium oxysporum* به عنوان عامل اصلی پوسیدگی ریشه و طبق پیاز از مناطق مختلف جهان مانند آمریکا (Walker & times, 1924; Marlatt, 1958; Handerson, 1937) گزارش شده است، همچنین علاوه بر گونه فوق، دو گونه *F. solani* و *F. acuminatum* نیز از آمریکا گزارش شده است (Marlatt, 1958). عامل بیماری در سال ۱۹۶۲ از مصر (El-Helay et al., 1962) و در سال ۱۹۷۱ از ژاپن (Abawi & Lorbeer, 1971) به عنوان *Fusarium oxysporum* و در هندوستان (Gour and Acnihorti, 1981) و فلوریدا (Alfieri et al., 1984) گزارش شده است. همچنین گونه‌های

F. proliferatum، *F. solani*، *F. oxysporum*، *F. culmorum*، *F. graminearum*، *F. subglutinans*، *F. equiseti* و *F. sambucinum* به عنوان عوامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز از مناطق مختلف کاشت پیاز گزارش شده‌اند (Lorbeer, 1971; Bayraktar & Dolar, 2011) گونه‌های رایج فوزاریوم بیماری‌زا روی پیاز در آذربایجان شرقی عبارت‌اند از: *F. solani*، *F. equiseti*، *F. oxysporum* و *F. acuminatum* (Peyghami, 2001)، *F. redolens* و *F. proliferatum* (Ghanbarzadeh et al., 2013). سه گونه *F. solani*، *F. oxysporum* f. sp. *cepa* و *F. proliferatum* به عنوان عوامل پوسیدگی قاعده پیاز در مناطق شمال ایران و دو گونه *F. oxysporum* و *F. proliferatum* را به عنوان عوامل بذرزاد پیاز توسط ربیعی مطلق (Rabiei Motlagh et al., 2010) گزارش شدند. همچنین گونه‌های *F. semitectum*، *F. culmorum*، *F. graminearum*، *F. subglutinans* و *F. proliferatum* از اصفهان و گونه *F. sambucinum* از اصفهان و جیرفت گزارش شده‌اند (Ershad, 2009). فراوانی و توان بیماری‌زایی هر یک از این گونه‌ها در مناطق مختلف متفاوت است، ولیکن در اغلب گزارش‌ها دو گونه *F. solani* و *F. oxysporum* به ترتیب فراوانی و توان بیماری‌زایی بیشتری نسبت به سایر گونه‌ها داشتند (Du Toit & Inglis, 2003; Galvan et al., 2008; Stankovic et al., 2007; Behroozin & Assadi, 1994). تمامی گونه‌های فوق به همراه سه گونه *F. acuminatum*، *F. tricinatum* و *F. moniliforme* به عنوان فوزاریوم‌های همراه بذر از کشورهای سودان، ترکیه و ایتالیا معرفی شده‌اند (Koyku Abdalla, 2004; Ozer, 1997; EL-Nagerabi, 1987). لذا این پژوهش با هدف شناسایی و بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف و معرفی گونه یا گونه‌های غالب عامل بیماری در این دو استان انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی قارچ و خالص‌سازی

برای جداسازی قارچ از بوته‌های مشکوک به آلودگی از

اجازه دادیم تا دوباره کامل خشک شوند. از جدایه‌های خالص‌شده زیر میکروسکوپ به کمک لام هموسایتومتر (لام اسپورشمار) غلظت سوسپانسیون (دروایه) اسپورها بررسی شد. برای تهیه غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌متر، از عامل رقت (غلظت موردنظر/غلظت موجود- عامل رقت) استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کنیدیوم قارچی تهیه‌شده در هر سوراخ از طبق پیاز تزیق و درون اتاقک‌های مرطوب در دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس به مدت سه هفته نگهداری شدند، برای تیمار شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با شش تکرار برای هر جدایه قارچی انجام گرفت.

ارزیابی پرآزاری (ویرولانسی) جدایه‌ها

غده‌های پیاز از محل سوراخ‌های مایه‌زنی شده با سوسپانسیون کنیدیوم قارچی برش خورده و میزان پیشرفت بیماری در طول غده طبق فرمول زیر اندازه‌گیری و ثبت شدند (Southwood, 2012; Toit, 2013).
(et al., 2013).

P = (درصد بیماری‌زایی) =

$$100 \times \frac{\text{طول پوسیدگی غده (برحسب میلی‌متر)}}{\text{طول غده پیاز (برحسب میلی‌متر)}}$$

مناطق مختلف نمونه‌برداری (جدول ۱) ابتدا اندام‌های گیاهی (طبق، ریشه و ساقه) را به قطعات ۱-۵ سانتی‌متری در آورده و با محلول هیپوکلریت سدیم (NaOCl) ۱ درصد به مدت ۳-۱ دقیقه (بسته به ظرافت بافت) ضدعفونی سطحی و سپس سه بار در آب مقطر سترون به مدت ۳-۱ دقیقه شستشو شد. پس از خشک‌کردن توسط کاغذ صافی سترون در شرایط سترون در هر تشتک چند قطعه از بافت آلوده روی محیط کشت عصاره سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) در اتاقک رشد (انکوباتور) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳-۵ روز قرار داده شد. برای خالص‌سازی جدایه‌ها از محیط کشت آب-آگار (WA) و PDA استفاده شد (Burgess et al., 1994) و نوک ریشه و تک اسپور به روش Nelson et al. (1983) صورت گرفت.

آزمون بیماری‌زایی

غده‌های پیاز هم‌اندازه بعد از جدا کردن فلس‌های خارجی به مدت ۱۲-۱۵ دقیقه با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی و سه بار و هر بار به مدت ۲ دقیقه با آب مقطر شسته شدند. بعد یک ساعت چهار تا سوراخ به عمق ۵ میلی‌متر در قسمت طبق ایجاد کرده مجدد

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های فوزاریوم عامل بیماری پوسیدگی طبق و ریشه پیاز استان‌های آذربایجان شرقی و غربی

Table 1. List of *Fusarium* isolates used in this study and their geographical origin

Geographical region	Species	Isolate code	Isolate number	Geographical region	Species	Isolate code	Isolate number
Ilkhchi	<i>F. oxysporum</i>	I43	22	Salmas	<i>F. solani</i>	S12	1
Ilkhchi	<i>F. oxysporum</i>	I12	23	Maraqeh	<i>F. solani</i>	MR51	2
Miandoab	<i>F. oxysporum</i>	MI21	24	Maragheh	<i>F. solani</i>	MR26	3
Khoy	<i>F. oxysporum</i>	KH22	25	Maragheh	<i>F. solani</i>	MR32	4
Miandoab	<i>F. proliferatum</i>	MI66	26	Maragheh	<i>F. solani</i>	MR22	5
Miandoab-Malekan	<i>F. proliferatum</i>	MIML12	27	Miandoab	<i>F. solani</i>	MI71	6
Maragheh	<i>F. proliferatum</i>	MR42	28	Miandoab	<i>F. solani</i>	MI44	7
Bonab	<i>F. proliferatum</i>	B41	29	Miandoab-Malekan	<i>F. solani</i>	MIML32	8
Miandoab	<i>F. proliferatum</i>	MI33	30	Ilkhchi	<i>F. solani</i>	I23	9
Malekan	<i>F. proliferatum</i>	ML43	31	Ilkhchi	<i>F. solani</i>	I26	10
Bonab	<i>F. redolens</i>	B52	32	Ilkhchi	<i>F. solani</i>	I44	11
Ilkhchi	<i>F. redolens</i>	I63	33	Bonab	<i>F. solani</i>	B34	12
Ilkhchi	<i>F. subglutinans</i>	I52	34	Malekan	<i>F. solani</i>	ML21	13
Salmas	<i>F. culmorum</i>	S14	35	Azarshahr	<i>F. solani</i>	A31	14
Ajabshir	<i>F. culmorum</i>	AJ13	36	Azarshahr	<i>F. solani</i>	A51	15
Malekan	<i>F. culmorum</i>	ML12	37	Azarshahr	<i>F. solani</i>	A23	16
Miandoab-Malekan	<i>F. avenaceum</i>	MIML31	38	Azarshahr	<i>F. solani</i>	AJ11	17
Malekan	<i>F. avenaceum</i>	ML54	39	Azarshahr	<i>F. oxysporum</i>	A54	18
Malekan	<i>F. crookwellens</i>	ML41	40	Azarshahr	<i>F. oxysporum</i>	A41	19
Miandoab	<i>F. nygamai</i>	MI62	41	Bonab	<i>F. oxysporum</i>	B12	20
Miandoab	<i>F. nygamai</i>	MI31	42	Maragheh	<i>F. oxysporum</i>	MR12	21

شناسایی مورفولوژیکی

برای تشخیص گونه‌های فوزاریوم، جدایه‌های تک‌اسپور یا نوک ریشه‌شده را روی محیط‌های کشت مختلف، از جمله محیط کشت سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA)، آب- آگار (WA) و برگ میخک-آگار (CLA) (Nelson *et al.*, 1983) کشت و پس از نگهداری در شرایط نوری و دمایی مناسب با استفاده از کلیدهای موجود و مقالات معتبر و چارت رنگ، شناسایی شدند (Rayner, 1970; Booth, 1971; Gerlach & Nirenberg, 1982; Nelson *et al.*, 1983; Pascoe, 1990; Burgess *et al.*, 1994; Seifert, 1996; 1996; Nirenberg & O'Donnell 1998; Summerell *et al.*, 2003; O'Donnell *et al.*, 2004; Leslie & Summerell, 2006).

شناسایی مولکولی

تهیه توده میسلیمی

در آغاز ۴۰ میلی‌لیتر از محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آب (PDB) در ظرف‌های ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و درپوش آن‌ها با پنبه بسته شد. پس از استریل نمودن محیط غذایی درون اتوکلاو، هر یک از ارلن‌ها توسط سه قرص به قطر ۵ میلی‌متر، که از حاشیه پُرگنه در حال رشد جدایه موردنظر تهیه شده بودند، مایه‌زنی شدند. ارلن‌های مایه‌زنی‌شده برحسب سرعت رشد جدایه‌ها، به مدت ۴ الی ۷ روز روی دستگاه لرزا (شیکر) با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از طی این مدت، زمان جداسازی میسلیوم‌ها از طریق ریختن محتویات هرکدام از ارلن‌ها روی قیف مخصوص (Sartorius SM 15510, Gottingen, Germany) متصل به پمپ خلأ (Vacuum brand, ME4R, GMBH-Co.KG) که دارای یک عدد کاغذ صافی (Membrane-Vacuum Pump) سترون بود، انجام شد. میسلیوم‌ها توسط آب دو بار تقطیر سترون به‌طور کامل شسته شده و با استفاده از کاغذ صافی واتمن سترون خشک شده و درون ریزلوله (میکروتیوب)‌های ۱/۵ میلی‌لیتر سترون قرار داده و در فریزر با دمای ۷۰- درجه سلسیوس برای استخراج DNA نگهداری شدند.

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA جدایه‌های بیماری‌زا با استفاده از روش Sfafe *et al.* (2005) انجام شد. کیفیت و کمیت DNA ژنگانی (ژنومی) استخراج شده، به ترتیب به روش طیف‌سنج نوری (اسپکتروفوتومتری) و با استفاده از ژل آگارز ارزیابی شد.

برنامه دمایی واکنش‌های PCR

به‌منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، مخلوط واکنش با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۸/۷ میکرولیتر آب مقطر، ۲/۵ میکرولیتر بافر پی‌سی آر X ۱۰، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر آغازگر ۱۰ میکرومولار، ۵ واحد بر میکرولیتر Taq Polymerase (ساخت شرکت سیناژن)، ۵۰ نانوگرم DNA قارچی آماده گردید. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Mastercycler,) طبق برنامه دمایی (جدول ۲) برای هر یک آغازگرهای اختصاصی بسته به نوع نشانگر مولکولی و آغازگر تنظیم گردید.

مشاهده محصول واکنش PCR

برای مشاهده محصولات واکنش‌های PCR، الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱/۴ درصد انجام شد. برای انجام عمل الکتروفورز، تانک الکتروفورز به دستگاه تأمین‌کننده جریان الکتریکی (Pharmacia, EPS- 500/400) متصل گردید. محصولات واکنش‌های PCR در ولتاژ ۹۵ ولت و شدت جریان ۸۵ آمپر به مدت یک ساعت، در ژل آگارز تفکیک شدند. درنهایت، باندهای حاصل از تکثیر قطعات DNA روی ژل مشخص گردیدند. درنهایت برای عکس‌برداری از ژل، از دستگاه عکس‌برداری (GelDoc, Vilber Lourmat, T-5 x 20-) استفاده گردید.

نتایج و بحث

نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی

۱۴۰ جدایه از مناطق مختلف و از گیاهان دارای علائم جداسازی شد. بعد از جداسازی عامل بیماری از قسمت‌های پوسیده درونی قاعده، طبق، ریشه‌ها و

قهوه‌ای شدن و پوسیدگی بافت پیاز قابل مشاهده بود، درحالی‌که غده‌های شاهد بدون علائم بودند. بر اساس تجزیه و تحلیل داده‌ها در سطح احتمال ۱ درصد، جدایه‌ها به ۱۸ گروه مجزا با بیماری‌زایی مختلف تفکیک شدند. مقایسه میانگین جدایه‌ها بر اساس طول پوسیدگی غده‌ها طبق فرمول *Toit et al.* (2013) محاسبه گردید.

ساقه‌های پیاز خالص‌سازی صورت گرفته در نهایت ۸۰ جدایه برای آزمون بیماری‌زایی انتخاب شدند.

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی روی غده پیاز قرمز رقم آذرشهر (رقم حساس) برای ۸۰ جدایه (به همراه شاهد) انجام شد. در این آزمون، علائم به صورت تغییر رنگ،

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در این تحقیق

Table 2. List of species-specific primers, sequences and sources of primers

Primers	Primer Sequence	Species- Specificity	Source & PCR program
Red-F Red-R	5'-ATCGATTTTCCCTTCGACTC-3' 5'-CAATGATGATTGTGATGAGAC-3'	<i>F. redolens</i>	(Bogale <i>et al.</i> , 2007) 94°C for 4 min, 10 (94°C for 30s, annealing temperature (62°C) reduce by 0.2°C per cycle, 72°C for 30s), 30 (94°C for 30s, 60°C for 30s, 72°C for 30s), 72°C for 10min
Clox1-F Clox2-R	5'-CAGCAAAGCATCAGACCACTATAACT-3' 5'-CTTGTCAGTAACTGGACGTTGGTACT-3'	<i>F. oxysporum</i>	(Mule <i>et al.</i> , 2004b) 94°C for 5min, 35 (94°C for 50s, 60°C for 50s, 72°C for 1min), 72°C for 7min
CLPRO1 CLPRO2	5'-TGCATCAGACCACTCAAATCCT-3' 5'-GCGAGACCGCCACTAGAT-3'	<i>F. proliferatum</i>	(Mule <i>et al.</i> , 2004b) 94°C for 5min, 35 (94°C for 50s, 60°C for 50s, 72°C for 1min), 72°C for 7min
FEF1 FER1	5'-CATACTATACGTTGCCTCG-3' 5'-TTACCAGTAACGAGGTGTATG-3'	<i>F. equiseti</i>	(Mule <i>et al.</i> , 2003) 94°C for 1min, 25 (94°C for 1min, 58°C for 30s, 72°C for 1min), 72°C for 7min
CIRC1 CIRC2	5'-CTTGGCTCGAGAAGGG-3' 5'-ACCTACCCTACACCTCTCACT-3'	<i>F. circinatum</i>	(Schweigkofler <i>et al.</i> , 2004) 94°C for 3min, 45 (94°C for 35s, 66°C for 55s, 72°C for 50s), 72°C for 12min
SUB1 SUB2	5'-CTGTGCCTAACCTCTTTATCCA-3' 5'-CAGTATGGACGTTGGTATTATATCTAA-3'	<i>F. subglutinans</i>	(Rahjoo <i>et al.</i> , 2008) 95°C for 5min, 35 (94°C for 50s, 56°C for 50s, 72°C for 1min), 72°C for 7min
TEF-Fs4f TEF-Fs4r	5'-ATCGGCCACGTCGACTCT-3' 5'-GGCGTCTGTTGATTGTTAGC-3'	<i>F. solani</i>	(Arif <i>et al.</i> , 2012) 94°C for 5min, 40 (94°C for 1min, 58°C for 1min, 72°C for 2min), 72°C for 7min
VER1 VER2	5'-CTTCTGCGATGTTTCTCC-3' 5'-AATTGGCCATGGTATTATATATCTA-3'	<i>F. verticillioides</i>	(Mule <i>et al.</i> , 2004b) 95°C for 5min, 35 (94°C for 50s, 56°C for 50s, 42°C for 1min), 72°C for 7min
Fc01F Fc01R	5'-ATGGTGAACCTGCTGTTGGC-3' 5'-CCCTTCTTACGCCAATCTCG-3'	<i>F. culmorum</i>	(Nicholson <i>et al.</i> , 1998) 95°C for 30s, (95°C for 30s 62°C for 20s, 72°C for 45s), 72°C for 5min
JIA-F JIA-R	5'-GCTAATTCTTAACCTACTAGGGGCC-3' 5'-CTGTAATAGGTTATTTACATGGGCG-3'	<i>F. avenaceum</i>	(Turner <i>et al.</i> , 1998) 95°C for 3min, 38 (95°C for 30, 62°C for 20s, 72°C for 45s), 72°C for 5min
FaF1 FaF2	5'-CAAGCATTGTCGCCACTCTC-3' 5'-GTTGGCTCTACCGGGACTG-3'	<i>F. avenaceum</i>	(Williams <i>et al.</i> , 2002) 95°C for 3min, 38 (95°C for 30, 56°C for 20s, 72 for 45s), 72°C for 5min
FACF FACR	5'-GGGATATCGGGCCTCA-3' 5'-GGGATATCGGCAAGATCG-3'	<i>F. acuminatum</i>	(Doohan <i>et al.</i> , 1998) 95°C for 3min, 38 (95°C for 30, 62°C for 20s, 72 for 45s), 72°C for 5min
CroAF CroAR	5'-CTCAGTGTCCACCGCGTTGCGTAG-3' 5'-CTCAGTGTCCCAATCAAATAGTCC-3'	<i>F. crookwellense</i>	(Turner <i>et al.</i> , 1998) 95°C for 3min, 38 (95°C for 30, 62°C for 20s, 72 for 45s), 72°C for 5min
AF330109CF AF330109CR	5'-AAAAGCCCAAATTGCTGATG-3' 5'-TGGCATGTTTCATTTGCACCT-3'	<i>F. sporotricoides</i>	(Demeke <i>et al.</i> , 2005) 94°C for 85s, 25 (95°C for 35s, 61°C for 30s, 72°C for 30s), 72°C for 5min

جدایه‌ها، غلظت DNA استخراج‌شده همه جدایه‌ها، ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر تنظیم و تأیید گونه‌های شناسایی‌شده با آغازگرهای اختصاصی گونه‌ای انجام شد (جدول ۱). بر اساس کارهای مولکولی گونه‌های *F. subglutinans* و *F. culmorum* به ترتیب قطعات ۵۷۰ (شکل ۲) و ۶۳۱ (شکل ۳) جفت بازی تکثیر کردند و شناسایی مورفولوژیکی را تأیید کرد.

جدایه‌های S14، AJ13، MI11 بر اساس برخی خصوصیات ریخت‌شناسی مانند میسلیم هوایی پرپشت به رنگ سفید مایل به زرد و اغلب زرد مایل به قهوه‌ای و گاهی قرمز و رنگ سطح زیرین پرگنه روی محیط کشت PDA قرمز تا قرمز جگری و داشتن کنیدیوفورهای به صورت منوفیالید ساده و منشعب و نداشتن میکروکنیدیوم و اغلب تولید ماکروکنیدیوم نابالغ با ۱-۲ دیواره‌ای نسبتاً کلفت، گونه *F. culmorum* تشخیص داده شدند به کمک روش مولکولی نیز تأیید شدند.

جدایه I52- که از نظر برخی خصوصیات ریخت‌شناسی مانند میسلیم هوایی فراوان، نمدی و به رنگ سفید تا ارغوانی کمرنگ، کنیدیوفورها دارای پلی‌فیالید و منوفیالید ساده و منشعب، میکروکنیدیوم‌های فراوان، تخم‌مرغی تا بیضوی به‌عنوان *F. subglutinans* تشخیص داده شد به کمک کارهای مولکولی با تکثیر تک باند ۶۳۱ جفت بازی نیز تأیید شد.

جدایه‌های AJ11، B34، MIML32، MI44، MI71 و A41 به ترتیب با درصد آلودگی ۶۰، ۶۰، ۶۵، ۶۶، ۶۳ و ۶۱ درصد به‌عنوان جدایه‌های با بیماری‌زایی بالا (گروه A)، جدایه‌های MR42، MI66، MR32، B41، MI31 و MIML31، ML41، AJ13، S14، I63، B52 با درصد آلودگی ۵۸، ۵۶، ۵۰، ۵۹، ۵۱، ۵۴، ۵۹، ۵۱، ۵۵، ۵۷ و ۵۱ به‌عنوان بیماری‌زایی متوسط (گروه B)، جدایه‌های A31، A23، A54، ML21، I26، I43، ML54، MR22، MIML12، I52، MR12، MR51، I12، ML12، I23، A23، B12 با درصد آلودگی ۴۹، ۴۸، ۴۸، ۴۶، ۴۶، ۴۵، ۴۴، ۴۴، ۴۴، ۴۳، ۴۲، ۴۲، ۴۲، ۴۱، ۴۱، ۴۱، ۴۱، ۴۱ با بیماری‌زایی پایین (گروه C) و درنهایت جدایه‌های S12، MR26، I44، A51، MI21 و ML43 با درصد آلودگی ۳۵، ۳۳، ۳۶، ۳۱ و ۳۷ به‌عنوان جدایه‌های با بیماری‌زایی ضعیف (گروه D) در نظر گرفته شدند (جدول ۳ و شکل ۱).

در این تحقیق، در مجموع ۹ گونه شناسایی ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) شده که از این‌ها ۸ گونه، *F. redolens*، *F. proliferatum*، *F. oxysporum*، *F. avenaceum*، *F. culmorum*، *F. subglutinans*، *F. solani* و *F. crookwellens* با کارهای مولکولی هم تأیید گردید.

ارزیابی مولکولی

پس از استخراج DNA و بررسی کمیت و کیفیت

جدول ۳. گروه‌بندی و مقایسه میانگین جدایه‌ها در آزمون بیماری‌زایی روی غده پیاز قرمز آذرشهر

Table 3. Pathogenicity tests of isolates according to their virulence on onion bulbs (pv. Azarshahr)

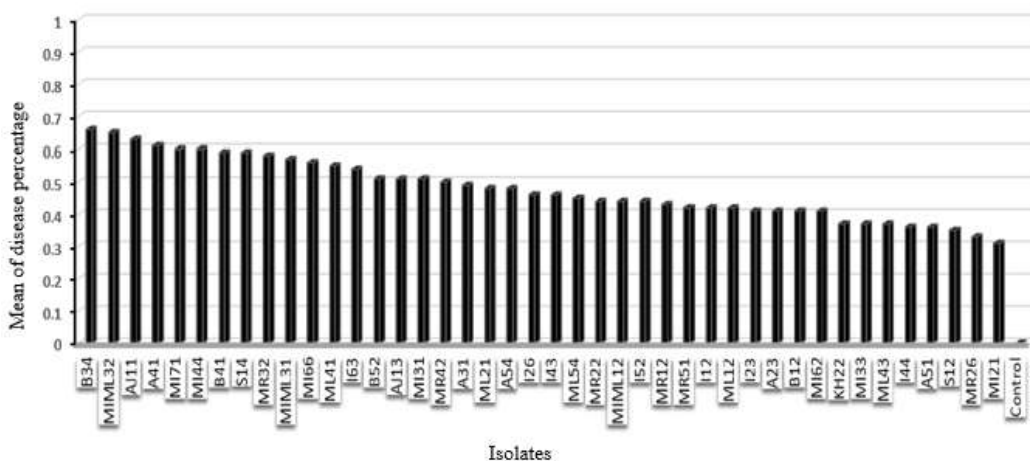
Isolates	Pathogenicity group	Pathogenicity average (%)	Isolates	Pathogenicity group	Pathogenicity average (%)
I43	C	46 ^{kl}	B34	A	66 ^a
ML54	C	45 ^{klm}	MIML32	A	65 ^{ab}
MR22	C	44 ^{klmn}	AJ11	A	63 ^{abc}
MIML12	C	44 ^{klmn}	A41	A	61 ^{abcd}
I52	C	44 ^{klmn}	MI71	A	60 ^{abcd}
MR12	C	43 ^{klmno}	MI44	A	60 ^{abcd}
MR51	C	42 ^{klmno}	B41	B	59 ^{abcde}
I12	C	42 ^{klmno}	S14	B	59 ^{abcde}
ML12	C	42 ^{klmno}	MR32	B	58 ^{abcde}
I23	C	41 ^{lmnop}	MIML31	B	57 ^{bcdefg}
A23	C	41 ^{lmnop}	MI66	B	56 ^{cdefgh}
B12	C	41 ^{lmnop}	ML41	B	55 ^{cdefgh}
MI62	C	41 ^{lmnop}	I63	B	54 ^{defghi}
KH22	D	37 ^{mno}	B52	B	51 ^{efghij}
MI33	D	37 ^{mno}	AJ13	B	51 ^{efghij}
ML43	D	37 ^{mno}	MI31	B	51 ^{efghij}
I44	D	36 ^{no}	MR42	B	50 ^{ghijkl}
A51	D	36 ^{no}	A31	C	49 ^{ghijkl}
S12	D	35 ^{op}	ML21	C	48 ^{ijkl}
MR26	D	33 ^p	A54	C	48 ^{ijkl}
MI21	D	31 ^q	I26	C	46 ^{kl}
Control	D	0 ^r			

* Numbers with the same letters are not statistically significant

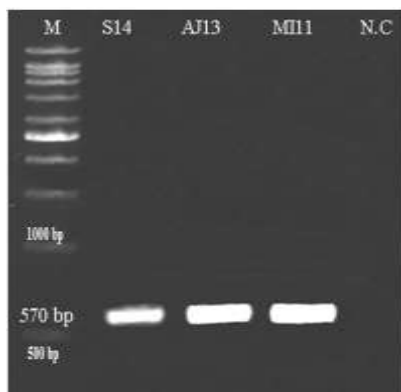
Group A (over 60%), Group B (50-60%), Group C (40-50%), Group D (30-40%)

* اعداد با حروف یکسان از نظر آماری اختلاف معنی‌دار ندارند.

(بالای ۶۰٪) A، (۵۰-۶۰٪) B، (۴۰-۵۰٪) C، (۳۰-۴۰٪) D

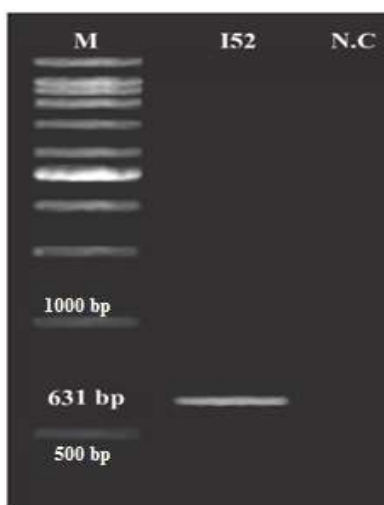


شکل ۱. مقایسه میانگین درصد بیماری‌زایی ۴۲ جدایه فوزاریوم روی غده پیاز قرمز رقم آذرشهر بر اساس طول پوسیدگی غده
Figure 1. Disease severity of 42 *Fusarium* species based on their pathogenicity



شکل ۲. تکثیر قطعه ۵۷۰ جفت بازی مربوط به گونه *Fusarium culmorum* با استفاده از آغازگرهای Fc01F/Fc01R
M: مارکر ۱ کیلو جفت بازی و N.C: شاهد منفی

Figure 2. Amplification of 570 bp fragment of *Fusarium culmorum* by using Fc01F/Fc01R primers.
M: 1 Kb DNA ladder, N.C: negative control



شکل ۳. تکثیر قطعه ۶۳۱ جفت بازی مربوط به گونه *F. subglutians* با استفاده از آغازگرهای SUB1/ SUB2
M: مارکر ۱ کیلو جفت بازی و N.C: شاهد منفی

Figure 3. Amplification of 631 bp fragment of *F. subglutians* by using SUB1/ SUB2 primers.
M: 1 Kb DNA ladder, N.C: negative control

گروه بیماری‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس برای انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

سپاسگزاری

از حمایت مالی و تأمین امکانات و تجهیزات مورد نیاز در

REFERENCES

1. Abawi, G. & Lorbeer, J. (1971). Reaction of selected onion varieties to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Phytopathology*, 52, 116-123.
2. Ministry of Jihad Agriculture. (2014). *Agricultural Statistics; Volume I Crop production 2013-2014*, from <http://amar.maj.ir>. (in Farsi)
3. Arif, M., Chawla, S., Zaidi, N., Rayar, J., Variar, M. & Singh, U. (2012). Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1 α) gene. *African Journal of Biotechnology*, 11, 444-447.
4. Bayraktar, H. & Dolar, F. S. (2011). Molecular identification and genetic diversity of *Fusarium* species associated with onion fields in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 159, 28-34.
5. Behroozin, M. & Assadi, P. (1994). Biological control of *Fusarium* root and basal rot of onion in East Azarbaijan. Paper presented at the 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union., Kuşadası-Aydın, Türkiye. (in Farsi)
6. Bogale, M., Wing, B. D., Wing, M. J. & Steenkamp, E. T. (2007). Species-specific primers for *Fusarium redolens* and a PCR-RFLP technique to distinguish among three clades *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiollett*, 271, 27-32.
7. Booth, C. (1971). The Genus *Fusarium*. *Commonwealth Mycological Institute*, Kew. UK 237 pp.
8. Brayford, D. (1996). *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Mycopathologia*, 133, 39-40.
9. Brayford, D. (1996). IMI description of fungi and bacteria set 127. *Mycopathologia*, 133, 35-63.
10. Brewster, J. L. (1994). *Onion and other vegetables Alliums*. University Press, Cambridge.
11. Burgess, L. W., Liddell, C. M. & Summerell, B. A. (1994). *Laboratory manual for Fusarium research*. Fusarium Research Laboratory Department of Crop Sciences University of Sydney. 133pp.
12. Cramer, C. S. (2000). Breeding and genetics of *Fusarium* basal rot resistance in onion. *Euphytica*, 115, 159-166.
13. Demeke, T., Clear, R. M., Patrick, S. K. & Gaba, D. (2005). Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 271-284.
14. Doohan, M., Parry, D. W., Jenkinson, P. & Nicholson, P. (1998). The use of species-specific PCR based assays to analyze earblight of wheat. *Plant Pathology*, 47, 197-205.
15. Du Toit, L. J. & Inglis D. A. (2003). *Fusarium proliferatum* pathogenic on onion bulbs in Washington. *Plant Disease*. 87, 750.
16. El-Helay, A., Elarosi, H., Assawash, M. & Kilani, A. (1962). Studies on fungi associated with onion crop in the field and during storage. *Phytopathologia Mediterranea*, 2, 37-45
17. EL-Nagerabi, S. A. F. & Abdalla, R. M. O. (2004). Survey of seedborne fungi of Sudanese cultivars of onion, with new record. *Phytoparasitica*, 32(4), 413-416.
18. Ershad, D. (2009). *Fungi of Iran*. (3rd ed.). Tehran: Iranian Research Institute of Plant Protection, 531p. (in Farsi)
19. Galván, G. A., Koning-Boucoiran, C. F. S., Koopman, W. J. M., Burger-Meijer, K., González, P. H., Waalwijk, C., Kik, C. & Scholten, O. E. (2008). Genetic variation among *Fusarium* isolates from onion and resistance to *Fusarium* basal rot in related *Allium* species. *European Journal of Plant Pathology*, 121, 499-512.
20. Gerlach, W. & Nirenberg, H. (1982). *The genus Fusarium, a pictorial atlas*. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-und Forstwirtschaft. Berlin Dahlem, 209, 1-406.
21. Ghanbarzadeh, B., Mohammadi, Goltapeh, E. & Safaie, N. (2013). Identification of *Fusarium* species causing basal rot of onion in east Azarbaijan province, Iran and evolutionary their virulence on onion bulbs and seedling. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47, 1050-1062.
22. Koyku, N. D. & Ozer, N. (1997). Determination of seed-borne fungi in onion their transmission to onion-set. *Phytoparasitica*, 25(1), 25-31.
23. Lager, S. (2011). *Survey of Fusarium species of yellow oion (Allium cepae) on Oland*. Master thesis, 43P.
24. Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell, 388 pp.
25. Mannerucci, G. F., Cristani, C., Marziano, O. & Gambogi, P. (1987). *Fusarium* species of onion seed of Italian origin. *Phytopathologia Mediterranea*, 26 (3), 156-164.
26. Marlat, R. (1958). Onion *Fusarium* basal rot in arizona. *Plant Disease*, Rptr, 42, 667-668.
27. Mishra, P. K., Fox, R. T. V. & Culham, A. (2003). Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. *FEMS Microbiollett*, 218, 329-332.

28. Mulè, G., Susca, A., Stea, G. & Moretti, A. (2004a). A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 495-502.
29. Nelson, P. E., Toussoun, T. A. & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium* species, *An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, University Park. 193 pp.
30. Nicholson, P., Simpson, D. R., Weston, G., Rezanoor, H. N., Lees, A. K., Parry, D. W. & Joyce, D. (1998). Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53, 17-37.
31. O'donnell, K., Sutton, D. A., Rinaldi, M. G., Magnon, K. C., COX, P. A., Vanburik, J. H., Padhye, A., Aniasse, E. J., Francesconi, A., Walsh, T. J. & Robinson, J. S. (2004). Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 5109-5120.
32. Özer, N. & Oemeroglu, M. (1995). Chemical control and determination of fungal causal agents of wilt disease of onion in Tekirdag Province. *Journal of Turkish Phytopathology*, 24, 47-55.
33. Pascoe, I. G. (1990b). *Fusarium* morphology II: Experiments on growing conditions and dispersal of mesoconidia. *Mycotaxon*, 37, 161-172.
34. Peyghami, E. (2001). Antagonistic effect of several isolates of *Trichoderma* on fungi causing onion root rot, East Azarbaijan province. *Iranian Journal of Sciences*, 32, 747-755. (in Farsi)
35. Rabiei Motlagh, E., Falahati Rastegar, M., Rouhani, H., Jafarpour, B. & Jahanbakhsh, V. (2010). Study of onion seed borne *Fusarium* in Razavi and Northern Khorasan provinces. *Journal of Plant Protection*, 24, 137-144.
36. Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, M., MirzadiGohari, A., Okhovvat, S., Bihamta, M., Razzaghian, J. & Klemsdal S. (2008). Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 90, 463-468.
37. Rayner, R. N. (1970). *Mycological Colour Chart*. *Common wealth Mycological Institute*, Kew, Surrey, UK.
38. Safaei, N., Alizadeh, A., Saidi, A. & Adam, G. (2005). Molecular-characterization and genetic diversity among Iranian population of *Fusarium graminearum*, the causal agent wheat head-blight. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 41(2), 171-189.
39. Schweigkofler, W., O'Donnell, K. & Garbelotto, M. (2004). Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from two California sites by using a real-time PCR approach combined with a simple spore trapping method. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3512-3520.
40. Seifert, K. (1996). *FusKey. Fusarium interactive key*. Agriculture and Agri-Food Canada. 65 pp.
41. Stankovic, S., Levic, J., Petrovic, T., Logrieco, A. & Amoretti, A. (2007). Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 118, 165-172.
42. Stevenson, W. R. & Heimann, M. F. (2002). *Onion (Allium cepae) disorder Fusarium basal rot*. Produced by Cooperative Extension Publications, University of Wisconsin.
43. Summerell, B. A., Salleh, B. & Leslie, J. F. (2003). A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease*, 87(2), 117-118.
44. Toit, L. J., Inglis, D. & Pelter, G. (2003). *Fusarium proliferatum* pathogenic on onion bulbs in Washington. *Plant Disease*, 87, 750-750.
45. Turner, A. S., Lees, A. K., Rezanoor, H. N. & Nicholson, P. (1998). Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. *Plant Pathology*, 47, 278-288.
46. Wacker, T. L., Safir, G. R. & Stephens, C. T. (1990). Effect of *Glomus fasciculatum* on the growth of asparagus and the incidence of *Fusarium* root rot. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115, 550-554.
47. Williams, K. J., Dennis, J. I., Smyl, C. & Wallwork, H. (2002). The application of species-specific assays based on the polymerase chain reaction to analyze *Fusarium* crown rot of durum wheat. *Australasian Plant Pathology*, 31, 119-129.