



Scientific article

Determination of morphological, biological, and molecular characteristics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* causal agent of gladiolus wilt and yellow disease in Mahallat**HOSSEIN BAYAT¹✉, MOHAMMAD HOSSEIN AZIMI²**

1,2-Assistant Professor and Associated Professor of Ornamental Plant Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, (AREEO) Mahallat, Iran

(Received: Sep 2025; Accepted: Apr 2026)

Abstract

Corm rot and Fusarium yellowing are the major disease of gladiolus with widespread prevalence. The causal agent is the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, which causes corm rot, leaf yellowing, and eventual plant death of gladiolus. Fusarium yellowing and wilt is a severe and highly destructive disease, causing 30–70% yield losses in gladiolus. Disease management relies on integrated strategies, including cultural, chemical, and biological methods, as well as using resistant cultivars. The morphological and biological characteristics of the fungal isolates isolated from the infected plant tissues studied in this research project. Additionally, four pairs of universal and specific primers used to determine species identification, forma specialis and the race of selected isolates. Results demonstrated that all isolates were pathogen on gladiolus cv. Oscar. Universal primers ITS and Tef enabled fungal identification at the subspecies level. Application of primer pairs FOGA/B and FOGF/F revealed that all examined isolates belonged to race 2 of the fungus. This study represents the first molecular characterization and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (FOG) isolates from Iran.

Key words: *Fusarium oxysporum* f.sp *gladioli*, gladiolus, molecular, PCR

✉ bayat_new@yahoo.com



مقاله پژوهشی

تعیین برخی خصوصیات مورفولوژیکی، بیولوژیکی و ملکولی *Fusarium oxysporum f.sp. gladioli* عامل پژمردگی و زردی گلابول از منطقه محلات

حسین بیات[✉]، محمد حسین عظیمی^۱

به ترتیب استادیار پژوهش و دانشیار پژوهش، پژوهشکده گل و گیاهان زینتی، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، محلات، ایران

(تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۴؛ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۴۰۵)

چکیده

پوسیدگی کورم و زردی فوزاریومی از بیماری های مهم گلابول است که گسترش زیادی دارد. عامل بیماری قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. gladioli* می باشد که باعث باعث پوسیدگی در کورم و زردی برگ و نهایتاً مرگ گیاه گلابول می شود. زردی و پژمردگی فوزاریومی یک بیماری جدی و بسیار ویرانگر محسوب می شود که باعث ۳۰-۷۰ درصد خسارت در گلابول می شود. مدیریت بیماری بر اساس روش های زراعی، شیمیایی، بیولوژیکی و استفاده از ارقام مقاوم استوار است. در این بررسی برخی از خصوصیات مورفولوژیکی و بیولوژیکی جدایه های مختلف این قارچ بررسی شد، همچنین با استفاده از چهار جفت آغازگر عمومی و اختصاصی نسبت به تعیین گونه، فرم اختصاصی و نیز نژاد جدایه های منتخب اقدام شد. نتایج نشان داد که همه جدایه ها قادر به ایجاد بیماری روی گلابول رقم اسکار بودند. استفاده از آغازگرهای عمومی ITS و Tef سبب شناسایی جدایه های قارچ تا سطح زیر گونه شد. استفاده از جفت آغازگرهای FOGA/B و FOGF/F نشان داد که همه جدایه های مورد بررسی به نژاد ۲ قارچ تعلق دارند. این نخستین بررسی و تعیین خصوصیات ملکولی جدایه های FOG از ایران می باشد.

کلمات کلیدی: شناسایی ملکولی، گلابول، PCR، *Fusarium oxysporum f.sp. gladioli*

✉ bayat_new@yahoo.com

©2026, The Author(s). Published by Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP). This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

مقدمه

پوسیدگی فوزاریومی گلابول یکی از بیماری‌های مهم گلابول است. عامل بیماری قارچی است به نام *Fusarium oxysporum* Schlecht. Fr. f.sp. *gladioli* (FOG) که علائم متفاوتی را در گلابول سبب می‌شود. پوسیدگی کورم، پوسیدگی ریشه، پژمردگی آوندی و ایجاد زخم‌های متعدد روی ریشه جزء این علایم می‌باشند (Partridge, 2003). بیماری پژمردگی آوندی به نام زردی هم شناخته می‌شود و به صورت قهوه‌ای شدن مرکز کورم و توسعه آن به قسمت‌های فوقانی طوقه بروز پیدا می‌کند. در گیاهان آلوده، برگ‌ها به تدریج از قسمت نوک به طرف پایین به رنگ زرد تغییر می‌یابد. در آلودگی‌های شدید تمام برگ‌های گیاه زرد شده و گیاه از پا می‌افتد (Heimann and Wafr, 1997). پوسیدگی قهوه‌ای که به پوسیدگی خشک هم معروف است، آلودگی غیر آوندی کورم می‌باشد که معمولاً به صورت بروز زخم‌های کوچک قهوه‌ای مایل به سیاه در قسمت نزدیک قاعده کورم و یا همه سطح کورم دیده می‌شود (Partridge, 2003). بافت کورم‌های آلوده معمولاً سفت باقی می‌مانند، اما ممکن است چروک و پوسته پوسته شوند (Heimann and Wafr, 1997). قارچ *F. oxysporum f.sp. gladioli* از کشورهای مختلف مانند هند، مکزیک، هلند و ایران از روی گلابول گزارش شده است (González-Pérez ; Singh, 1969 ; Boerema and Hamers, 18989). مطالعات مختلف نشان دادند که *F. oxysporum f. sp. gladioli* دارای دو نژاد و سه گروه سازگار رویشی می‌باشد. نژاد ۲ تنها به گونه‌های ریزگل گلابول حمله می‌کند در حالیکه نژاد ۱ هم به گونه‌های ریزگل و هم درشت-گل حمله می‌کند (Mes et al., 1994 ; Roebroek and Mes, 1992). علاوه بر گلابول، این بیمارگر از سایر گیاهان خانواده Iridaceae از جمله زنبق، زعفران و فرزیا از اروپا و ایران گزارش شده است (Mes et al., 1994 ; Khaledi et al., 2024 ; Mazaheri Tehrani et al., 2020). شناسایی این دو نژاد از یکدیگر برای انجام آزمون‌های غربالگری ژنوتیپ‌ها و ارقام گلابول در واکنش به این عامل

بیماری بسیار مهم است. در مواردی مشاهده شده است که *F. oxysporum f.sp. gladioli* نژاد ۲ روی گلابول‌های درشت‌گل به صورت فرم غیربیماریزا به سر می‌برد در این حالت تفکیک آن از نژاد ۱ به صورت مورفولوژیکی امکان‌پذیر نمی‌باشد. (Haan and Doeren, 2000; Loffler et al., 1997). روش‌هایی مانند آزمون بیماریزایی روی گیاهان میزبان افتراقی، گروه‌های سازگار رویشی (vegetative compatibility groups)، روش‌های سرولوژیکی و روش‌های ملکولی از روش‌هایی هستند که به منظور تفکیک و شناسایی گونه‌ها، فرم‌های اختصاصی و نژادهای قارچ فوزاریوم استفاده شده‌اند (Haan and Doorn, 2000; Saikia and Kadoo, 2010; Naroei and Salari, 2015). برای اولین بار de Haan و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی توانستند دو نژاد ۱ و ۲ FOG را از یکدیگر تفکیک کنند. در این مطالعه برای نخستین بار با استفاده از PCR و استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی برخی از جدایه‌های FOG از منطقه محلات، استان مرکزی مورد شناسایی و تعیین خصوصیت قرار گرفتند و با یکدیگر مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

جداسازی قارچ عامل بیماری

طی بازدید از مناطق پرورش گلابول در منطقه محلات و همچنین ژنوتیپ‌های کشت شده در محل پژوهشگاه گل و گیاهان زینتی، از گیاهانی که علایم شاخص بیماری (زردی و نکروز برگ‌ها و مرگ کامل گیاه) را نشان می‌دادند، نمونه‌برداری شد. قسمت‌های هوایی نمونه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه حذف شده و پس از برداشتن پوسته کورم‌های گیاهان دارای علائم بیماری و شستشوی سطحی با آب شیر، برای کشت روی محیط کشت سیب زمینی - دکستروز - آگار (potato dextrose agar, PDA) آماده شدند. نمونه‌ها از مرز بین نواحی آلوده و سالم کورم‌ها و همچنین قسمت‌هایی از بافت ساقه که نشانه‌های نکروز را نشان می‌دادند انتخاب شده و پس از ضد عفونی در محلول ۰/۵٪ هیپوکلریت سدیم به مدت یک

به هر نمونه ۶۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم/ایزواکیل الکل (نسبت ۱:۲) افزوده شد، ۲۰ ثانیه ورتکس شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و ۴°C سانتریفیوژ شدند. فاز بالایی (۶۰۰ میکرولیتر) به میکروتیوپ-RNase Free DNase منتقل و با ۷۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد رسوب داده شد. پس از سانتریفیوژ مجدد، رسوب با ۷۵٪ اتانول شستشو داده شد (۸۰۰۰ دور در دقیقه، ۵ دقیقه، ۴°C) و خشک گردید. در نهایت، رسوب در ۲۵-۳۰ میکرولیتر آب DEPC و ۲ میکرولیتر RNase A حل شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس در فریزر -۲۰ درجه سلسیوس ذخیره شد. کیفیت DNA استخراج شده با روش الکتروفورز ارزیابی گردید.

آزمون PCR

به منظور شناسایی فرم اختصاصی و نژاد جدایه‌های *F. oxysporum* جدا شده از گلابول از دو جفت آغازگر عمومی ITS4/ITS5 (تکثیر کننده قطعاتی از ITS1، ITS2 و 5.8 rRNA) و EF-1-986/ EF-728 (تکثیر کننده قسمتی از ژن TEF-1) و دو جفت آغازگر اختصاصی (FOG A/FOG B) و (FOG E/FOG F) استفاده شد (جدول-۱).

و نیم دقیقه، روی محیط کشت PDA کشت و به مدت یک هفته در شرایط تاریک در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند پرگنه‌های قارچ رشد یافته در محیط کشت مجدداً روی محیط کشت PDA زیرکشت شده و پس از تک اسپور کردن آنها، با استفاده از کشت روی محیط برگ میخک آگار (CLA) خصوصیات مورفولوژیکی، شامل رنگ و شکل پرگنه، شکل و فرم ماکروکنیدیوم و میکروکنیدیوم جدایه‌های فوزاریومی جداسازی شده ثبت و با استفاده از کلید Burgess و همکاران (۱۹۸۸) گونه آنها شناسایی شدند.

استخراج DNA

به منظور شناسایی فرم اختصاصی و نژاد قارچ *F. oxysporum* جدا شده از گلابول، اقدام به استخراج DNA کل از جدایه‌های منتخب شد به این منظور از روش استخراج DNA مبتنی بر CTAB (Masoomi-Aladizgeh et al., 2016) استفاده شد. جدایه‌های قارچی پس از ۱۰ روز رشد در محیط PDA، با تیغه اسکالپل سترون برداشت شده و پس از خشک‌سازی با کاغذ صافی، به میکروتیوپ منتقل شدند. با افزودن نیتروژن مایع، توده میسلیمی پودر شد. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به نمونه‌ها اضافه و پس از همگن‌سازی، به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵°C نگهداری شدند و هر ۲-۳ دقیقه سرو ته شدند.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در آزمون PCR

Table 1. Specific primers used in the PCR tests

Primers name	5'-3' Sequence	Reference
FOG A	CATCTCACGACAACATTAGGG	Haan et al., 2000
FOG B	AAGCTCACGAAAGTTGGTGGG	
FOG E	CAGCTCACGACCTGTAGT	White et al., 1990
FOG F	CAGCTCACGATGGGAATC	
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Jimenez-Fernandez et al., 2010
EF-1-986	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	
EF-728	TACTTGAAGAACCCTTACC	

به منظور تعیین دمای بهینه اتصال آغازگرهای مورد استفاده از یک برنامه Gradient PCR استفاده شد. پس از بهینه یابی دمای اتصال هر چهار جفت آغازگر، نسبت به انجام PCR با شرایط ذیل اقدام شد. دمای واسرشتی ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۵ چرخه با دمای واسرشتی ۹۵ درجه سلسیوس، دمای اتصال ۵۲-۴۵ درجه سلسیوس برای جفت آغازگرهای متفاوت و دمای بسط ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه برای هر مرحله و در انتها دمای بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه اعمال شد. محصول PCR به دست آمده بر روی ژل TAE الکتروفورز شدند و با استفاده از دستگاه ژل داک (Major Sciences, Taiwan) اقدام به مشاهده و عکسبرداری از ژل شد.

تعیین توالی قطعات به دست آمده در آزمون PCR

قطعات حاصل از تکثیر DNA هفت جدایه‌ی منتخب فوزاریوم گلابیول با استفاده از جفت آغازگر FOG A/FOG B و همین‌طور دو جدایه منتخب از بین این هفت جدایه با جفت آغازگرهای ITS4/ITS5 و EF-1-986/ EF-728 با استفاده از کیت استخراج شرکت سینا کلون، استخراج شد و جهت تعیین توالی به روش سانجر به شرکت بیوتکنولوژی پیشگام ارسال شد.

اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های منتخب

به منظور اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های فوزاریوم جدا شده از گیاه گلابیول، سوسپانسیون اسپور هفت جدایه منتخب با کدهای (FG01-06، FG01-18، FG02-01، FG02-05، FG02-06، FG02-08 و FG02-09) به میزان ۱۰^۴ اسپور در هر میلی لیتر تهیه شد. روش تهیه سوسپانسیون اسپور به این صورت بود که جدایه‌های منتخب روی محیط کشت Sucrose Nutrient Agar (SNA) کشت و پس از رشد کامل قارچ و ظهور اسپور، ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون روی سطح محیط کشت پاشیده شده و سطح محیط کشت به همراه توده‌های هیف و اسپورهای قارچ با استفاده از اسکالپل خراشیده شد. به منظور جداسازی قطعات هیف، محلول به دست آمده از پارچه ململ عبور داده شد. پس از محاسبه میزان غلظت سوسپانسیون اسپور به دست آمده با

استفاده از لام هموسایتومتر، میزان تراکم اسپور در آن با استفاده از آب مقطر سترون به ۱۰^۴ اسپور در هر میلی لیتر سوسپانسیون رسانده شد. کورم‌های گلابیول رقم اسکار (Oscar) حساس به نژاد ۱ پاتوژن (Straathof et al., 1998) به منظور انجام آزمون بیماری‌زایی انتخاب شد و پس از اطمینان از سلامت آنها، سطح کورم‌ها با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ ماده تجاری، ضد عفونی سطحی شدند. سپس کورم‌ها در داخل سوسپانسیون اسپور غوطه‌ور و بلافاصله در داخل گلدان‌هایی با قطر دهانه ۲۰ سانتی متر که از قبل با ترکیب کوکویت / پرلیت دو بار سترون با نسبت وزنی ۱/۱ پر شده بودند، کشت شد. در هر گلدان دو کورم گلابیول کاشته شد. از دو کورم گلابیول سالم که در آب مقطر سترون غوطه‌ور شده بود به عنوان شاهد استفاده شد. سه ماه بعد از کشت کورم‌ها، طول نسبی (Relative Length, RL) و میانگین نرخ بیماری (Average Diseases Rating, ADR) ارزیابی شد. جهت محاسبه طول نسبی، نسبت طول بلندترین شاخه در گلدان آلوده به گلدان سالم محاسبه شد. جهت برآورد ADR بعد از حذف بوته‌ها از گلدان، کورم‌های گیاه با استفاده از سیستم رتبه‌بندی به صورت چشمی ارزیابی و در دامنه‌ای از نرخ بیماری ۱-۶ به شرح: ۱: کورم سالم و ۲-۵ به ترتیب ۵-۰، ۶-۱۵، ۱۶-۵۰ و ۵۱-۱۰۰ درصد آلودگی و ۶ عدم بازیابی کور امتیازدهی شد (Loffler et al., 1997).

آزمون بیماری‌زایی روی عضو دیگر خانواده Iridaceae

به این منظور، ۱۶ قطعه ریزوم گل زنبق ریزومی (Iris germanica) پس از ضد عفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ ماده تجاری در دو گروه هشت تایی در خاک سالم و خاک مایه زنی شده با زاد مایه تهیه شده به روش فوق در گلدان‌هایی به قطر ۲۰ سانتی متر کشت شدند. طول شاخساره و بروز علائم زردی و کلروز روی برگ‌های گیاهان مایه زنی شده در مقایسه با گیاهان شاهد شش هفته بعد از مایه زنی مورد ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

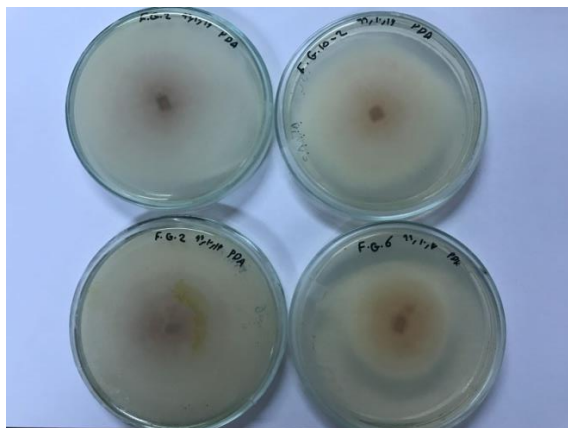
قطعات تکثیر شده در PCR جهت تعیین توالی به شرکت زیست فن‌آوری پیشگام ارسال شدند. ترادف‌های به دست آمده با استفاده از برنامه BLAST با توالی‌های قابل دسترس در بانک ژن (GenBank) مقایسه شدند. مجموعه نرم افزاری DNASTAR (DNASTar Inc., Madison, WI, USA) 5 جهت ادیت داده‌های توالی مورد استفاده قرار گرفت. انجام هم‌ردیف سازی چندگانه ترادف‌های نوکلئوتیدی با سایر ترادف‌های موجود در بانک ژن با برنامه Clustal W انجام و درخت‌واره‌های فیلوژنتیکی مورد نظر با استفاده از روش neighbor joining با اعتبارسنجی (bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار در نرم افزار MEGAX (Kumar et al., 2018) ترسیم شد.

نتایج

مشخصات مورفولوژیکی جدایه‌های فوزاریوم گلابول

مشخصات مورفولوژیکی جدایه‌های فوزاریوم جداسازی شده از گیاهان گلابول بعد از کشت روی محیط CLA در جدول ۲ ذکر شده است. بر اساس این خصوصیات و همچنین رنگ

پرگنه در محیط کشت PDA (شکل ۱) همگی جدایه‌های به دست آمده، بر اساس کلید شناسایی Burgess، *F. oxysporum* شناسایی شد. رنگ پرگنه‌های رشد یافته بر روی محیط کشت PDA از صورتی کم رنگ تا صورتی پررنگ و گاهی ارغوانی متغییر بود (شکل ۱).



شکل ۱- پرگنه برخی از جدایه‌های فوزاریوم جدا شده از گلابول روی محیط کشت PDA

Figure 1. The Colonies of some Fusarium isolates obtained from gladiolus on PDA culture medium

جدول ۲- خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌های مختلف فوزاریوم جدا شده از گیاهان گلابول

Table 2. Morphological characteristics of different Fusarium isolates obtained from gladiolus plants

Isolate name	The Presence or absence of chlamydospores	The presence and macroconidia form	Microconidia form	Phialid form
FG01-6	Abundant	4 cells	One or two-celled , spore ball formation	Short monofialid
FG01-18	Very abundant - sometimes double	4 cells	One or two-celled	Short monofialid
FG02-01	very little	4 cells	One or two-celled , spore ball formation	Short monofialid
FG02-05	Yes	4 cells	One or two-celled , spore ball formation	Short monofialid
FG02-06	Yes	4 cells	One or two-celled , spore ball formation	Short monofialid
FG02-08	Abundant	4 cells	One or two-celled , spore ball formation	Short monofialid
FG02-09	Yes	4 cells	One or two-celled , spore ball formation	Short monofialid

آزمون بیماری‌زایی

گیاهان گلابول رقم اسکار که با هفت جدایه قارچ *F. oxysporum* مایه زنی شده بودند، در مقایسه با شاهد واکنش‌های متفاوتی را از نظر طول نسبی شاخساره و میزان توسعه علایم

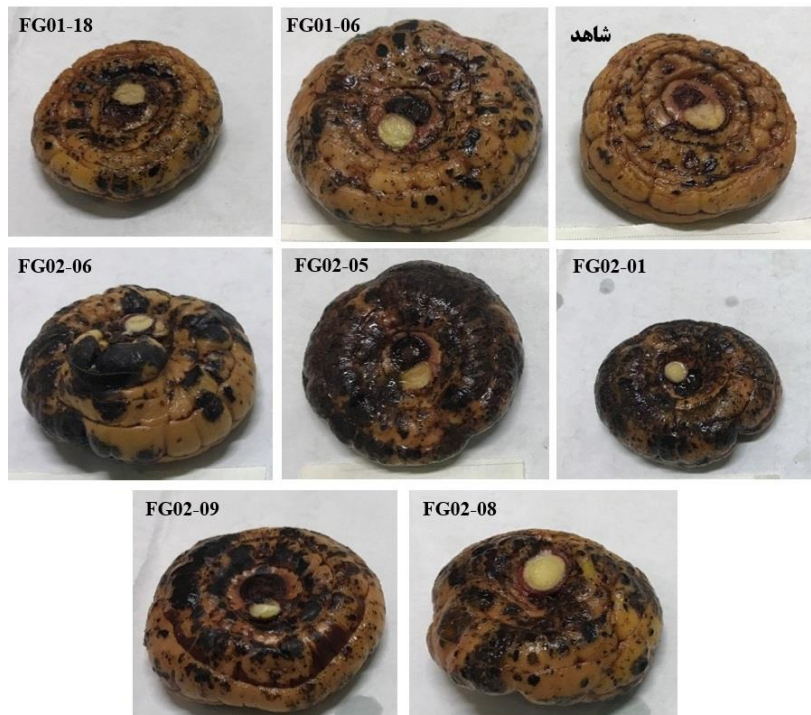
روی کورم‌ها نشان دادند. کمترین میزان طول نسبی شاخساره توسط جدایه FG02-09 و بیشترین طول نسبی شاخساره در جدایه FG02-06 مشاهده شد (شکل ۲)



شکل ۲- مقایسه طول شاخساره در واکنش به مایه‌زنی با جدایه‌های مختلف قارسه ماه بعد از مایه زنی. بیشترین طول نسبی شاخساره در جدایه

FG02-06 و کمترین طول نسبی شاخساره در جدایه FG02-09.

Figure 2. Comparison of shoot length in response to inoculation with different fungal isolates three months after inoculation. The highest relative shoot length in isolate FG02-06 and the lowest relative shoot length in isolate FG02-09



شکل ۳- مقایسه میزان توسعه بیماری روی کورم گلابول رقم اسکار توسط جدایه‌های مختلف قارچ *Fusarium oxysporum f.sp. gladioli*

Figure 3. Comparison of the rate of disease development on gladiolus corms of Oscar cultivar inoculated by different isolates of *Fusarium oxysporum f.sp. gladioli*

۵ در رتبه اول قرار گرفتند (شکل ۳). بررسی‌ها نشان داد که جدایه FG02-09 کمترین میزان طول نسبی شاخساره را در مقایسه با سایر جدایه‌ها ایجاد کرد. ارزیابی میزان شدت علائم بیماری روی سطح کورم‌ها نشان داد که جدایه‌های FG02-01 و

بررسی‌ها نشان داد که جدایه FG02-09 کمترین میزان طول نسبی شاخساره را در مقایسه با سایر جدایه‌ها ایجاد کرد. ارزیابی میزان شدت علائم بیماری روی سطح کورم‌ها نشان داد که جدایه‌های FG02-05 و FG02-01 با میانگین نرخ بیماری

دو جدایه فوق در گیاهان مایه زنی شده نسبت به گیاهان شاهد مایه زنی نشده سبب کاهش رشد و بروز علایم زردی و نکروز برگ‌گی شد (شکل ۴).

با میانگین نرخ بیماری ۵ در رتبه اول قرار گرفتند (شکل ۳). نتایج حاصل از مایه زنی گل زنبق ریزومی با استفاده از مخلوط دو جدایه FG02-01 و FG02-05، نشان داد که مخلوط



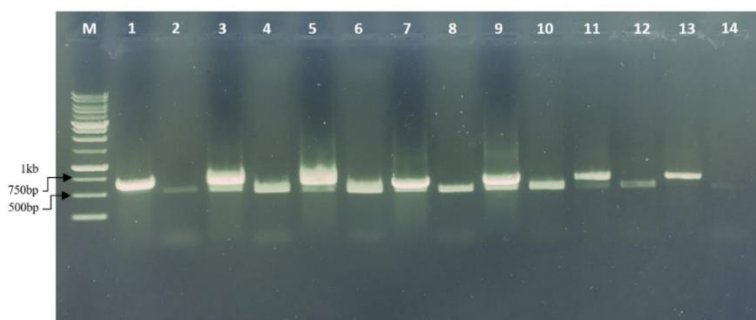
شکل ۴- نتایج مایه زنی گل زنبق ریزومی (*Iris germanica*) با استفاده از مخلوط دو جدایه FG02-01 و FG02-05 قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* کاهش رشد (سمت چپ) و کلروز و نکروز برگ های بوته (سمت راست) در مقایسه با شاهد مایه زنی نشده.

Figure 4. Results of inoculation of rhizomatous iris (*Iris germanica*) using a mixture of two isolates FG02-01 and FG02-05 of the fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* : growth reduction (left) and chlorosis and necrosis of plant leaves (right) compared to the un inoculated control.

آزمون PCR

چه باند غیر اختصاصی در محدوده ۶۰۰ جفت بازی تشکیل شد (شکل ۵). تعیین توالی قطعه حدود ۶۵۰ جفت بازی در هر هفت جدایه‌ی قارچ نشان داد که همه جدایه‌ها متعلق به گونه *F. oxysporum* هستند و بیشترین شباهت را با یکدیگر دارند.

نتایج آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگرهای FOG A/FOG B نشان داد که یک باند مشخص در محدوده مورد انتظار ۶۵۰ جفت بازی در همه جدایه‌ها تکثیر شد (شکل ۵). در حالیکه با جفت آغازگر FOG E/FOG F در هیچکدام از جدایه‌ها در محدوده مورد انتظار (۱۲۰۰ جفت بازی)، باندی تکثیر نشد اگر

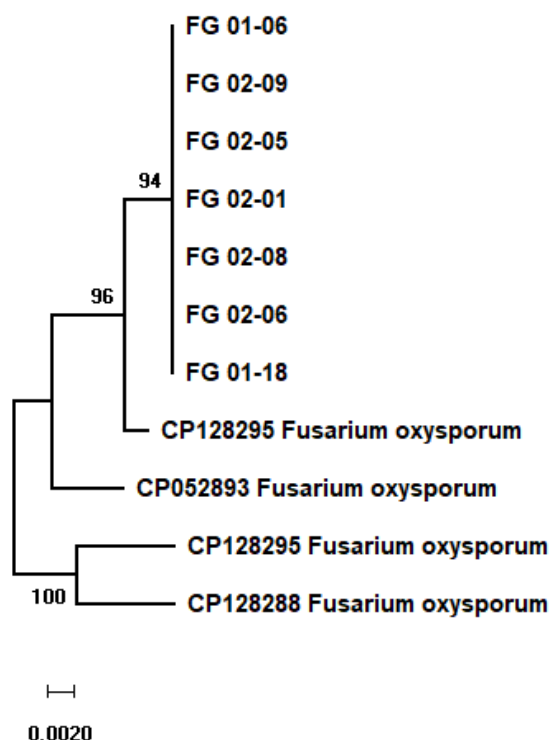


شکل ۵) نتایج آزمون PCR با استفاده از دو جفت آغازگر (FOGA/FOGB) و (FOGE/FOGF) برای هفت جدایه فوزاریوم گلائیول. راهک های ۱، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱ و ۱۳ مربوط به جفت آغازگر (FOGA/FOGB) و راهک های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴ مربوط به جفت آغازگر (FOGE/FOGF). M نشانگر وزن مولکولی (1kb Ladder).

Figure 5) Results of PCR test using two primer pairs (FOGA/FOGB) and (FOGE/FOGF) on seven different *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* isolates. Lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 correspond to the primer pair (FOGA/FOGB) and lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 correspond to the primer pair (FOGE/FOGF). M indicates molecular weight (1kb Ladder).

متاسفانه براساس این قطعه تکثیرشده، اطلاعات توالی مربوط به جدایه‌های *F. oxysporum* f.sp. *gladioli* در پایگاه داده‌های NCBI وجود نداشت. لذا مقایسه صورت گرفته با چهار جدایه *F.oxysporum* انجام شد. نتایج نشان داد که هفت جدایه‌ی

منتخب، بسیار به هم نزدیک و با یکدیگر گروه‌بندی می‌شوند. همان‌طور که در شکل ۶ نشان داده شده است این جدایه‌ها رابطه بسیار نزدیکی با قارچ *F. oxysporum* دارند.



شکل ۶ - رابطه فیلوژنتیکی هفت جدایه منتخب *Fusarium oxysporum* گلابول با جدایه‌های مختلف *Fusarium oxysporum* مبتنی بر قطعه ۶۵۰ جفت بازی تکثیر شده با جفت آغازگر FOGA/FOGB. درختواره بر اساس روش neighbor-joining و با استفاده از نرم افزار MEGA X و با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap رسم شده است.

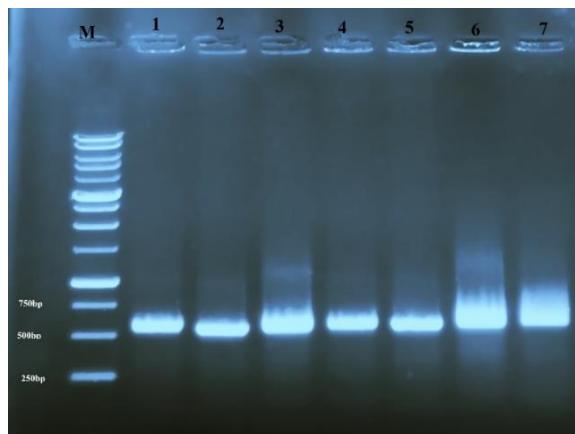
Figure 6) - Phylogenetic relationship of seven selected isolates of *Fusarium oxysporum* gladiolus with different isolates of *Fusarium oxysporum* based on a 650 bp fragment amplified with the primer pair FOGA/FOGB. The tree was drawn based on the neighbor-joining method using MEGA X software and 1000 bootstrap replicates

آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگر ITS4/ITS5 در همه جدایه‌های منتخب، منجر به تکثیر یک باند در محدوده مورد انتظار (۶۰۰ جفت بازی) شد (شکل ۷). با توجه به قدرت بیماری‌زایی نسبی بالاتر دو جدایه FG 02-01 و FG 02-05، داده‌های توالی این دو جدایه‌ی قارچی براساس جفت آغازگر

ITS4/ITS5 به‌دست‌آمد و به ترتیب با رس شماره‌های PV658981 و PV558982 در پایگاه داده‌های NCBI ثبت شدند. نتایج نشان داد که این دو جدایه ارتباط بسیار نزدیکی با جدایه‌های *F. oxysporum* دارند (شکل ۸). استفاده از جفت آغازگر (EF-1-986/ EF-728) در تمامی جدایه‌ها منجر به تکثیر یک قطعه حدود ۳۰۰ جفت بازی شد. تعیین توالی قطعه به

نزدیکی با یکدیگر و با جدایه قارچ FOG از کشور هلند (رس
شماره FJ664916) دارند. (شکل ۹)

دست آمده از دو جدایه FG02-01 و FG02-05 با استفاده از این
جفت آغازگر نشان داد که جدایه‌های ایرانی ارتباط بسیار

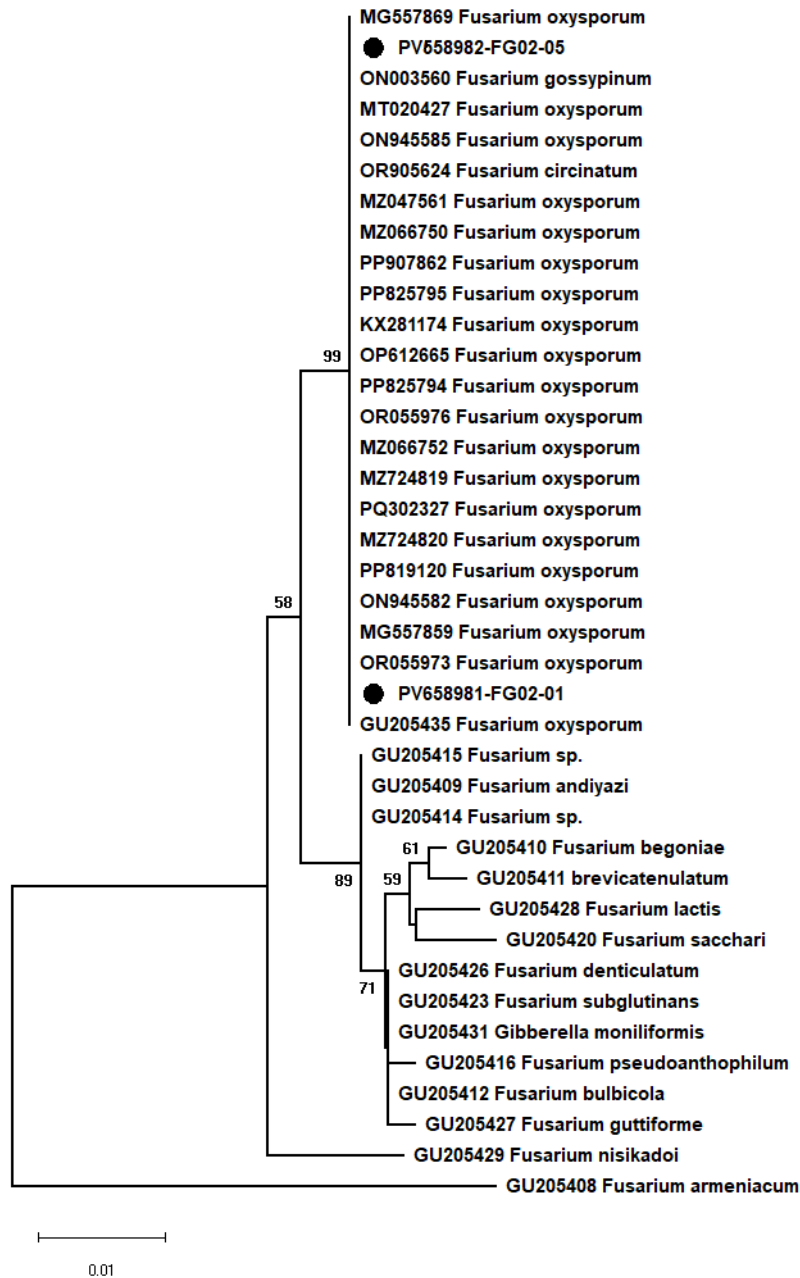


شکل ۷- نتایج آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگر (ITS4/ITS5) برای هفت جدایه مختلف
فوزاریوم گلایول. راهک‌های ۱ تا ۷ مربوط به هفت جدایه قارچ مورد مطالعه می‌باشد M نشانگر وزن مولکولی
(1kb Ladder).

Figure 7) Results of PCR test using primer pair (ITS4/ITS5) for seven different *Fusarium gladioli* isolates.
Lanes 1 to 7 correspond to the seven fungal isolates studied. M, marker indicates molecular weight (1kb Ladder).

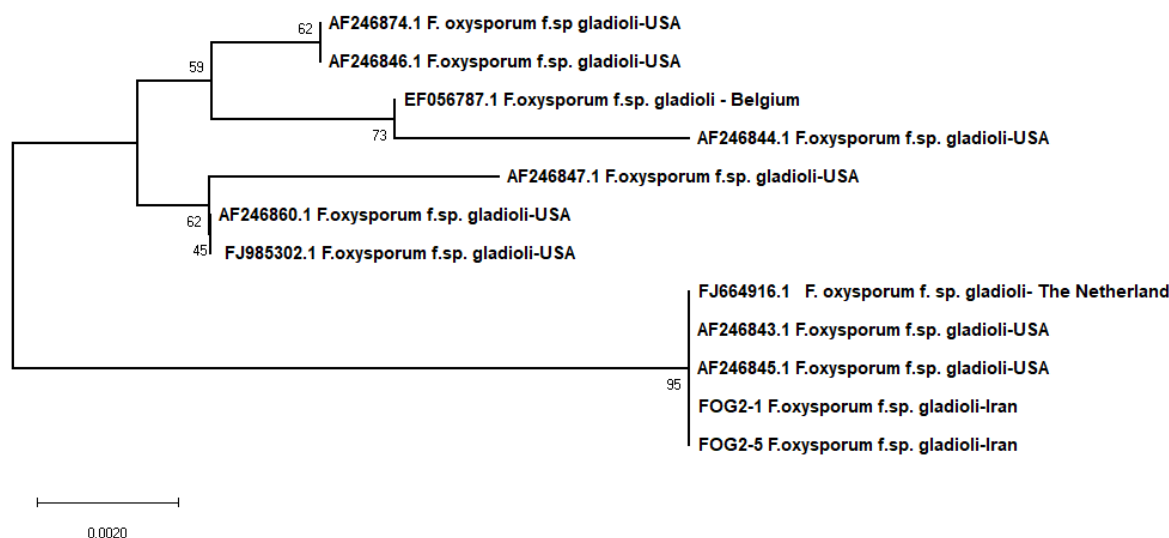
PCR با جفت آغازگر ITS4/ITS5 و جفت آغازگر (EF-1-986/
EF-728) (شکل ۹) جدایه‌های FG02-01 و FG02-05 متعلق به
نژاد ۲ قارچ *F. oxysporum* f.sp. *gladioli* تشخیص داده شدند.
این مطالعه نخستین بررسی مورفولوژیکی و ملکولی جدایه‌های
مختلف این بیمارگر از ایران و نخستین گزارش وقوع نژاد ۲
این قارچ از ایران می‌باشد.

با توجه به نتایج مقایسه توالی هفت جدایه قارچی منتخب با
سایر جدایه‌های گونه *F. oxysporum* (شکل ۶)، نتایج آزمون
بیماری‌زایی (شکل ۳ و ۴)، مطالعات مورفولوژیکی (جدول ۲)
و عدم تشکیل باندها در محدوده ۱۲۰۰ جفت بازی با جفت آغازگر
FOG E/FOG F و تشکیل باندها در محدوده ۶۰۹ جفت بازی با
جفت آغازگر FOG A/FOG B، همچنین نتایج حاصل از آزمون



شکل ۸- رابطه فیلوژنتیکی دو جدایه منتخب *Fusarium oxysporum* گلابول FG02-01 و FG02-05 به ترتیب با رس شماره‌های PV658981 و PV658982 با جدایه‌های گونه‌های مختلف *Fusarium* مبتنی بر قطعه ۶۰۰ جفت بازی تکثیر شده با جفت آغازگر ITS 4/ITS 5. درخت‌واره براساس روش neighbor-joining و با استفاده از نرم‌افزار MEGA X و با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap رسم شده است. از گونه *Fusarium armeniacum* به عنوان گروه خارجی استفاده شده است.

Figure 8. Phylogenetic relationship of two selected isolates of *Fusarium oxysporum* gladiolus (FG02-01 and FG02-05) with isolates of different *Fusarium* species based on a 600 bp fragment amplified with the ITS 4/ITS 5 primer pair. The tree was drawn based on the neighbor-joining method using MEGA X software and 1000 bootstrap replicates. The species *Fusarium armeniacum* was used as an outgroup.



شکل ۹- رابطه فیلوژنتیکی ۲ جدایه منتخب *Fusarium oxysporum* گلابیول (FG02-01 و FG02-05) با جدایه های مختلف *F. oxysporum f.sp. gladioli* مبتنی بر قطعه ۳۰۰ جفت بازی تکثیر شده با جفت آغازگر EF-1-986/ EF-728 درختواره بر اساس روش neighbor-joining و با استفاده از نرم افزار MEGA X و با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap رسم شده است.

Figure 9- Phylogenetic relationship of two selected isolates of *Fusarium oxysporum gladioli* (FG02-01 and FG02-05) with different isolates of *F. oxysporum f.sp. gladioli* based on a 300 bp fragment amplified with primer pair EF-1-986/EF-728. The tree was drawn based on the neighbor-joining method using MEGA X software and 1000 bootstrap replicates

بحث

دو جفت آغازگر ITS4/ITS5 و EF-1-986/ EF-728 از آغازگرهای عمومی هستند که امکان تایید تعلق جدایه های قارچ به گونه *F. oxysporum* را فراهم کردند اگر چه توالی های به دست آمده با جفت آغازگر EF-1-986/ EF-728 امکان تفکیک در حد فرم مخصوص را هم فراهم می آورد (Gupta *et al.*, 2016). نتایج مطالعه ما نیز نشان داد که این توالی های حاصل از استفاده از این جفت آغازگر امکان گروه بندی جدایه های مختلف *F. oxysporum f.sp. gladioli* را فراهم می نماید (شکل ۹).

بررسی های صورت گرفته در سایر مناطق دنیا نشان داده اند که این قارچ دارای دو نژاد ۱ و ۲ است (Roebroek and Mes, 1992؛ Straathof *et al.*, 1997؛ Löffler *et al.*, 1994؛ Mes *et al.*, 1994). براساس مطالعات انجام شده نژاد ۱ این قارچ به گلابیول های ریزگل و درشت گل حمله می کند؛ در حالی که نژاد

گل گلابیول نسبت به بیماری های مختلف حساس است. اما مهم ترین و خسارت بارترین بیماری این گیاه بیماری زردی و پژمردگی فوزاریومی است که بوسیله قارچ *F. oxysporum f.sp. gladioli* ایجاد می شود. یکی از محدودیت هایی که در این مطالعه وجود داشت عدم دسترسی به جدایه استاندارد FOG بود که علی رغم پیگیری های صورت گرفته امکان دسترسی به این جدایه استاندارد برای تیم تحقیقاتی میسر نشد. با این حال داده های حاصل از تعیین توالی قطعات به دست آمده با جفت آغازگر FOG A/FOG B و همچنین جفت آغازگرهای ITS4/ITS5 و EF-1-986/ EF-728 به خوبی ارتباط نزدیک جدایه های مورد مطالعه در این تحقیق را با جدایه های *F. oxysporum* نشان داد.

۲ قارچ تنها به گلابول‌های ریزگل حمله می‌کند (de Haan et al., 2000). اگر چه در سال‌های اخیر برخی از شواهد نشان دادند که نژاد ۲ این پاتوژن هم از گلابول‌های درشت گل جدا شده‌اند از جمله گزارش‌هایی که از ایتالیا وجود دارد و نژاد ۲ به گلابول‌های گل درشت حمله کرده است (Roebroek and Mes, 2000). ارزیابی‌های مورفولوژیکی، ملکولی و بیماری‌زایی در آزمایش ما نشان دادند که جدایه‌های به دست آمده همگی در گروه *F. oxysporum* قرار دارند. دی هان و همکاران دو جفت آغازگر جهت تفکیک دو نژاد ۱ و ۲ قارچ *F. oxysporum f.sp. gladioli* معرفی کردند (de Haan et al., 2000). آنها نشان دادند که در جدایه‌هایی که با هر دو جفت آغازگر FOG A/FOG B و FOG E/ FOG F واکنش مثبت نشان داده و هر دو قطعه ۱۲۰۰ و ۶۰۹ جفت بازی تکثیر می‌شود متعلق به نژاد یک قارچ هستند و جدایه‌هایی که فقط با آغازگر FOG A/FOG B یا با آغازگر FOG E/ FOG F واکنش مثبت نشان می‌دهند و یا با هیچکدام از دو جفت آغازگر واکنش مثبت نشان نمی‌دهند، متعلق به نژاد ۲ قارچ هستند. با توجه به نتایج آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگر FOG A/FOG B که منجر به تکثیر قطعه مورد انتظار ۶۰۹ جفت بازی شد و عدم تکثیر قطعه مورد انتظار ۱۲۰۰ جفت بازی با جفت آغازگر FOG E/ FOG F و تشکیل باند غیر اختصاصی به اندازه حدود ۶۰۰ جفت باز که می‌تواند ناشی از اتصال آغازگرها به مناطق غیر هدف باشد، در هر هفت جدایه مورد بررسی، احتمال تعلق این جدایه‌ها به نژاد ۲ قارچ *F. oxysporum f.sp. gladioli* وجود دارد. در مطالعه صورت گرفته توسط de Haan و همکاران (2000) نشان داده شد که حداقل ۱۲ جدایه قارچ FOG جدا شده از اعضای خانواده Iridaceae، به دلیل عدم تکثیر باند اختصاصی با جفت آغازگر FOG E/FOG F و تکثیر باند اختصاصی با جفت آغازگر FOG A/FOG B در آزمون PCR، متعلق به نژاد ۲ قارچ FOG تشخیص داده شدند. در همین مطالعه، تمامی جدایه‌هایی که از سایر اعضای خانواده Iridaceae به جز گلابول جدا شده بودند به استثنای یک جدایه، همگی متعلق به نژاد ۲ قارچ بودند. نتایج آزمون

بیماری‌زایی دو جدایه FG02-01 و FG02-05 روی گیاه زنبق ریزومی در مطالعه ما سبب کاهش رشد گیاه و پوسیدگی ریزوم در این گیاه شد مطالعه صورت گرفته قبلی در ایران هم نشان داد که جدایه‌هایی از *F. oxysporum f.sp. gladioli* سبب بروز بیماری‌زایی روی ژنوتیپ‌های مختلف زنبق ریزومی (Mazaheri et al., 2020) و زعفران (Khaledi et al., 2024) شده بود. در مطالعه de Haan و همکاران نشان داده شده است که هر دو نژاد قارچ *F. oxysporum f.sp. gladioli* می‌توانند روی زنبق ایجاد بیماری نمایند و از این گیاه جدا شده‌اند. با توجه به اینکه گلابول‌های دو رقم افتراقی کوچک گل Nymph و درشت گل Peter Pear (de Haan et al., 2000) در اختیار ما نبود، لذا ارزیابی‌های صورت گرفته جهت تعیین نژاد تنها متکی به داده‌های ملکولی بود. (de Haan et al., 2000). مطالعه de Haan و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که استفاده از دو جفت آغازگر FOG A/FOG B و FOG E/FOG F جهت تفکیک دو نژاد قارچ *F. oxysporum f.sp. gladioli* می‌تواند جایگزین روش‌های وقت‌گیری مانند ارقام افتراقی باشد و در مطالعات بررسی آلودگی‌های کورم گلابول به قارچ مورد اشاره نقش مهمی ایفا نماید. در مطالعه ما نشان داده شد که همه جدایه‌ها قادر به ایجاد بیماری روی رقم درشت گل اسکار بودند که مطالعات قبلی نشان داده بود که حساس به نژاد ۱ می‌باشد (Straathof et al., 1998). جداسازی جدایه‌های نژاد ۲ قارچ *F. oxysporum f.sp. gladioli* از ارقام درشت گل گلابول در مطالعه de Haan و همکاران (۲۰۰۰) نیز گزارش شده است. با این حال در مطالعه آنها جدایه‌هایی که از این ارقام درشت گل جدا شده بودند غیر بیماری‌زا تشخیص داده شدند اما مطالعه ما نشان داد که هر هفت جدایه با درجات متفاوت قادر به ایجاد علایم بر روی کورم و همچنین تاثیر بر میزان رشد بوته هستند. مجموعه دلایل ذکر شده در بالا به استثنای بیماری‌زایی روی رقم درشت گل اسکار، شواهدی هستند که تعلق جدایه‌های مورد مطالعه را به نژاد ۲ قارچ نشان می‌دهند. با این حال در صورت استفاده از ارقام افتراقی و یا در اختیار بودن جدایه‌های رفرنس نژادهای ۱ و ۲ به منظور استفاده

سپاسگزاری

این مقاله به عنوان قسمتی از پروژه تحقیقاتی « بررسی واکنش برخی از ژنوتیپ‌های امید بخش گلایول به بیماری پژمردگی فوزاریومی» با حمایت مالی پژوهشکده گل و گیاهان زینتی، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی انجام شده است.

References

- BOEREMA, G. H., and HAMERS, M. E. 1989. Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Series 3b: Fungi on bulbs: Amaryllidaceae and Iridaceae. Netherlands Journal of Plant Pathology, 95, 1–29. <https://doi.org/10.1007/BF02001882>
- BURGESS, L. W., SUMMERELL, B. A., BULLOCK, S., GOTT, K. P. and BACKHOUSE, D. 1994. Laboratory Manual for Fusarium Research (Thierd Ed.). Sydney: University of Sydney.
- CHANDEL, S., and DEEPIKA, R. 2010. Recent advances in management and control of Fusarium yellows in Gladiolus species. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 18, 361–380.
- DALLAVALLE, E., D'AULERIO, A. Z., VERARDI, E. and BERTACCINI, A. 2002. Detection of RAPD polymorphisms in Gladiolus cultivars with differing sensitivities to *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. Plant Molecular Biology Reporter, 20, 305–306. <https://doi.org/10.1007/BF02782468>
- ERSHAD, D. 2009. Fungi of Iran. Tehran: Iranian Research Institute of Plant Protection.
- GONZÁLEZ-PÉREZ, E., YÁÑEZ-MORALES, M. D. J., ORTEGA-ESCOBAR, H. M. and VELÁZQUEZ-MENDOZA, J. 2009. Comparative analysis among pathogenic fungal species that cause gladiolus (Hort.) corm rot in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología, 27(1), 45–52.
- HAAN, D. and DOORN, V. 2000. PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* race 1, causal agent of Gladiolus yellows disease, from infected corms. Plant Pathology, 49, 89–100 <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00421.x>
- HEIMANN, M. F. and WARF, G. L. 1997. Gladiolus Disorder Yellows and Bulb Rot. Wisconsin: University of Wisconsin Cooperative Extension.
- KHALEDI, N., REZAEI, M. and ALIZADEH FARDDARABAD, M. 2024. Investigation into the Prevalence of Fusarium Corm Rot Disease in Saffron Fields of Iran. Saffron Agronomy and Technology, 11(4), 393–412. DOI: [10.22048/jsat.2024.410910.1501](https://doi.org/10.22048/jsat.2024.410910.1501)
- KUMARI, P., MANJUNATHA, R. T., SANE, A., KUMAR, R. and DHANANJAYA, M. 2016. Characterization of Fusarium wilt in resistant and susceptible gladiolus (*Gladiolus* spp) genotypes using DNA markers. The Indian Journal of Agricultural Sciences, 86.
- LECOMTE, C., ALABOUVETTE, C., EDEL-HERMANN, V., ROBERT, F. and STEINBERG, C. 2016. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. Biological Control, 101, 17–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.004>
- OFFLER, H., STRAATHOF, T. P., VAN RUBROEK, P. and ROEBROECK, E. 1997. Fusarium resistance in gladiolus: the development of a screening assay. Journal of Phytopathology, 145, 465–468. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1997.tb00351.x>
- MASOOMI-ALADIZGEH, F., L. JABBARI, R. KHAYAM NEKOEI, and A. AALAMI, 2016. A Simple and Rapid System for DNA and RNA Isolation from Diverse Plants Using Handmade Kit. Protocol Exchange. <https://doi.org/10.21203/rs.2.1347/v2>

- MES, J., VAN DOORN, J., ROEBROECK, E., VAN EGMOND, E., VAN AARTRIJK, J. and BOONEKAMP, P. 1994. Restriction fragment length polymorphisms, races and vegetative compatibility groups within a worldwide collection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. Plant Pathology, 43, 362–370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1994.tb02697.x>
- NAROEI, K., and SALARI, M. 2015. Reliable Detection of the Fungal Pathogen, Molecular Detection and Identification *Fusarium oxysporum*. Biological Forum, 7, 473.
- NASIR, I. A., JAMAL, A., RAHMAN, Z. and HUSNAIN, T. 2012. Molecular analyses of Gladiolus lines with improved resistance against fusarium wilt. Pakistan Journal of Botany, 44, 73–79.
- PARTRIDGE, J. E. 2003. Fusarium Rot and Yellows of Gladiolus. Lincoln: University of Nebraska.
- RIAZ, T., KHAN, S. N. and JAVAID, A. 2010. Screening of Gladiolus germplasm for agronomic performance and resistance against corm rot disease. African Journal of Biotechnology, 9, 6701–6707.
- ROEBROECK, E. and MES, J. 1992. Physiological races and vegetative compatibility groups within *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. Netherlands Journal of Plant Pathology, 98, 57–64. <https://doi.org/10.1007/BF01998078>
- SAIKIA, R. and KADDOO, N. 2010. Molecular detection and identification of *Fusarium oxysporum*. In: Molecular Identification of Fungi (pp. 131–157). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-05042-8_7
- SINGH, R. N. 1969. A vascular disease of gladiolus caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* in India. Indian Phytopathology, 22, 402–403.
- SINGH, N., PAL, A. K., ROY, R., TAMTA, S., and RANA, T. 2017. Development of cpSSR markers for analysis of genetic diversity in Gladiolus cultivars. Plant Gene, 10, 31–36. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plgene.2017.05.003>
- SINGH, N., PAL, A. K., ROY, R., TEWARI, S., TAMTA, S. and RANA, T. 2016. Assessment of genetic variation and population structure in Indian Gladiolus cultivars inferred from molecular markers. The Nucleus, 59, 235–244. <https://doi.org/10.1007/s13237-016-0181-4>
- STRAATHOF, T. P., JANSEN, J., ROEBROECK, E. and LÖFFLER, H. 1997. Fusarium resistance in Gladiolus: Selection in seedling populations. Plant Breeding, 116, 283–286. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1997.tb00997.x>
- STRAATHOF, T. P., LÖFFLER, H., ROEBROECK, E. and LINFIELD, C. 1996. Breeding for resistance to *Fusarium oxysporum* in flower bulbs. In: VII International Symposium on Flowerbulbs (Vol. 430, pp. 477–486). DOI: [10.17660/ActaHortic.1997.430.77](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.430.77)
- STRAATHOF, T. P., ROEBROECK, E. and LÖFFLER, H. 1998. Studies on Fusarium-Gladiolus Interactions. Journal of Phytopathology, 146, 83–88. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1998.tb04662.x>
- TEHRANI, M. M., ESFAHANI, M. N., MOUSAVI, A., MORTEZAIINEZHAD, F. and AZIMI, M. H. 2020. Regulation of related genes promoting resistance in Iris against root rot disease, *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. Genomics, 112(5), 3013–3020. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.05.013>