

## غربالگری برخی از رقم‌های پیاز خوراکی در برابر بیماری پوسیدگی فوزاریومی (*Fusarium oxyosporum* f.sp cepae) و بررسی بیان رونوشت ژن‌های COI1 و ERF1 در رقم‌های حساس و متحمل

بیبا خوانساری نژاد<sup>۱</sup>، فرشاد دشتی<sup>۲\*</sup>، دوستم‌راد ظفری<sup>۳</sup> و اصغر میرزایی اصل<sup>۲</sup>  
۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۸)

### چکیده

پیاز یک محصول مهم باغبانی است که هر ساله مقدار زیادی از آن در اثر بیماری پوسیدگی فوزاریومی از بین می‌رود. در این بررسی آزمون بیماری‌زایی هشت جدایه فوزاریوم بر سوخ‌های پیاز رقم نگزاس‌ارلی‌گرانو در آزمایشگاه انجام شد که چهار جدایه HR1، HR97، HR42، HR21 بیشترین میزان بیماری‌زایی را نشان دادند. همچنین آزمون دامنه میزبانی چهار جدایه بیماری‌زا در گلخانه انجام شد که جدایه‌های HR1، HR42، HR21 به جنس *Allium* محدود شدند. نواحی *tef* این جدایه‌ها توالی یابی و بر اساس مقایسه با توالی‌های بانک ژن صحت تشخیص *Fusarium oxyosporum* f.sp cepae تأیید شد. در گام بعدی آزمایش غربالگری برای برخی از رقم‌های مختلف پیاز ایرانی همراه با دو رقم خارجی نگزاس‌ارلی‌گرانو و یلو سویت اسپانیش برای بیماری پوسیدگی فوزاریومی انجام شد. نتایج نشان داد، رقم قرمز آذرشهر به این بیماری حساس و رقم سفید کاشان متحمل بود. میزان بیان رونوشت‌های COI1 (Coronatine Insensitive 1) و ERF1 (Ethylene Response Factor 1) در رقم‌های حساس و مقاوم پس از تلقیح با جدایه قارچ فوزاریوم بررسی شدند. نتایج نشان دادند میزان بیان COI1 در رقم‌های حساس و متحمل تفاوتی با یکدیگر نداشتند، اما بیان ERF1 در زمان ۲۴ ساعت پس از تلقیح در رقم قرمز آذرشهر افزایش بیان را نشان داد، درحالی‌که در رقم سفید کاشان میزان بیان این رونوشت کاهش یافت. بر اساس نتایج، به نظر می‌رسد ERF1 در مکانیسم مقاومت گیاهان پیاز آلوده به بیماری پوسیدگی فوزاریومی نقش کلیدی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آزمون بیماری‌زایی، جدایه فوزاریوم، دامنه میزبانی، جنس *Allium*، بیان ژن.

## Screening some common onion cultivars for resistance to fusarium basal rot (*Fusarium oxyosporum* f. sp cepae) and assaying expression levels of the COI1 and ERF1 genes in sensitive and tolerant cultivars

Bitra Khansarinejad<sup>1</sup>, Farshad Dashti<sup>2\*</sup>, Doustmorad Zafari<sup>3</sup> and Asghar Mirzaie-Asl<sup>2</sup>

1, 2, 3. Ph. D. Candidate, Associate Professor and Professor, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran  
(Received: Jul. 17, 2020 - Accepted: Nov. 28, 2020)

### ABSTRACT

Onion is a major horticultural crop, which is regularly affected by substantial yield loss due to fusarium basal rot. In this research, the pathogenicity tests of eight *Fusarium* isolates were performed on onion bulbs of the Early Grano cultivar *in vitro*. Four isolates, namely HR1, HR97, HR42, and HR21, showed the highest degree of pathogenicity. The host ranges of the four pathogenic isolates were determined in the greenhouse condition. The HR1, HR42, and HR21 were isolated from the genus *Allium*. The TEF regions were sequenced on these isolates and the diagnosis of *Fusarium oxyosporum* f. sp cepae was approved based on a comparison with the sequence data of the GenBank. The screening for fusarium basal rot was performed on some Iranian onion cultivars together with the two foreign cultivars, namely the Early Grano and Sweet Spanish. The results indicated that the Ghermeze-Azarshahr cultivar and Sefide-Kashan cultivar were, respectively, sensitive and tolerant to this disease. The expressions of the COI1 transcript (Coronatine-Insensitive 1) and the ERF1 transcript (Ethylene Response Factor 1) were measured in the sensitive and tolerant cultivars after inoculation with the *Fusarium* isolates. The results showed no difference in the COI1 expression between the sensitive and tolerant cultivars. The ERF1 expression was higher in the Ghermeze-Azarshahr cultivar 24 hours after inoculation; whereas, an ERF1 expression decline was observed in the Sefide-Kashan cultivar. According to the results, it seems that the ERF1 plays a key role in resistance mechanisms of onions infected with fusarium basal rot disease.

**Keywords:** *Fusarium* isolates, gene expression, genus *Allium*, host ranges, pathogenicity tests.

\* Corresponding author E-mail: dashti1350@yahoo.com

### مقدمه

پیاز (*Allium cepa* L.) با توجه به تولید و ارزش اقتصادی بالا، یکی از سبزی‌های مهم در سرتاسر جهان محسوب می‌شود (Rout *et al.*, 2016; Bazl *et al.*, 2017). همانند سایر محصولات گیاهی، پیاز نیز مستعد ابتلا به بسیاری از پاتوژن‌های قارچی است (Cramer, 2000). یکی از بیماری‌های مهم پیاز، بیماری پوسیدگی فوزاریومی است که توسط قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae* (FOC) ایجاد می‌شود. این قارچ در سرتاسر جهان شیوع دارد و برای رشد و تکثیر تمایل به محدوده دمایی بین ۲۸-۳۲ درجه سانتی‌گراد دارد (Galván *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2013). به علت وجود روش‌های مختلف انتقال این قارچ و همچنین تولید کلامیدوسپور که سال‌ها می‌تواند در خاک باقی بماند، مقابله با پوسیدگی فوزاریومی مشکل است (Cramer, 2000). در حال حاضر از قارچ‌کش‌هایی مانند مانکوزب و کاربندازیم جهت کنترل این بیماری استفاده می‌شود که علاوه بر هزینه بالا، ظهور نژادهای مقاوم بیماری به قارچ‌کش‌ها را باعث می‌شود. علاوه بر این، کنترل بیولوژیک مانند تلقیح گیاهان پیاز با قارچ‌ها و یا باکتری‌های آنتاگونیست مانند *Trichoderma* و *Pseudomonas* به‌عنوان روشی جایگزین بجای استفاده از مواد شیمیایی در نظر گرفته شده است، اما این روش‌ها نیز کنترل کامل بیماری را در پی ندارد (Rout *et al.*, 2016). بنابراین می‌توان گفت یکی از مناسب‌ترین روش‌ها برای کاهش میزان خسارت بیماری پوسیدگی فوزاریومی استفاده از رقم‌های مقاوم است. با توجه به اینکه فلات ایران به‌عنوان بخشی از آسیای مرکزی، مرکز تنوع و اهلی شدن پیاز خوراکی است (Shigyo *et al.*, 2015; Zanghue *et al.*, 2018)، از نظر اصلاح این گیاه دارای جایگاه ویژه‌ای است و از رقم‌های بومی به‌عنوان یک خزانه ژنی مهم می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی پیاز استفاده کرد (Baghban Sirous *et al.*, 2011). گیاهان از یک سیستم دفاعی پیچیده و پویا برای مقابله با پاتوژن‌ها استفاده می‌کنند (Onaga & Wydra, 2016). از این‌رو دانستن چگونگی عملکرد

ژن‌ها در بین انواع حساس و مقاوم در مواجهه با بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. واکنش‌های دفاعی گیاهان اغلب توسط هورمون‌های دفاعی مانند مسیره‌های سیگنالی اتیلن، اسید جاسمونیک و اسید سالسیلیک نشان داده می‌شود (Thaler *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2017). این مسیره‌ها به‌طور مستقل عمل نمی‌کنند، بلکه از طریق شبکه پیچیده‌ای از تعاملات بر یکدیگر اثر می‌گذارند. پاتوژن‌های گیاهی بر اساس نوع زندگی‌شان به نوع نکروتروف، بیوتروف و همی بیوتروف تقسیم می‌شوند. از آنجاکه *Fusarium oxysporum* چرخه ترکیبی از زندگی نکروتروفی و بیوتروفی (همی بیوتروف) دارد، واکنش‌های دفاعی گیاه از جمله مسیره‌های سیگنالی اسید جاسمونیک و اتیلن را فعال می‌کند (Lyons *et al.*, 2015; Pieterse *et al.*, 2012). اسید جاسمونیک، یک مولکول مشتق شده از اسیدچرب است که در جنبه‌های مختلف بیولوژی دخالت دارد که از جمله آن می‌توان دفاع علیه بیماری‌های قارچی، میکروبی و زخمی شدن گیاه اشاره کرد (Kunkel & Brooks, 2002). بدین‌صورت که در هنگام تنش زیستی، باعث افزایش سریع مقادیر JA-Ile (isoleucine (JA-Ile) (فرم فعال اسید جاسمونیک) در سلول‌های گیاهی می‌شود که در حضور پروتئین JAZMONE ZIM-domain (JAZ) به F-box (موتیف‌های پروتئینی) Coronatine Insensitive 1 (COI1) متصل می‌شوند (Sheard *et al.*, 2010). در حالت عادی، پروتئین JAZ تأثیری منفی بر بیان ژن پاسخ به اسید جاسمونیک دارند. اتصال JA-Ile منجر به تخریب پروتئین‌های JAZ می‌شوند. این تخریب باعث، فاکتورهای رونویسی پایین‌دست را فعال کند و سنتز اسید جاسمونیک ادامه یابد (Chini *et al.*, 2007). از این‌رو COI1 نقش کلیدی را در مسیر سیگنالی اسید جاسمونیک دارد (Mao *et al.*, 2017). از طرف دیگر اثر متقابل مسیر سیگنالی اسید جاسمونیک و اتیلن در فعال شدن پاسخ‌های دفاعی تعیین‌کننده است.

یک فاکتور رونویسی مهم ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 (ERF1) در مسیر

پیاز ضدعفونی شده (الکل ۷۰٪ و دوبار شستشو دهی با آب مقطر استریل) برداشته شد و با سه میلی‌مترمربع از محیط کشت PDA حاوی هر یک از جدایه‌های قارچ فوزاریوم جایگزین و سپس محل زخم با پارافیلیم پوشانده شدند. برای نمونه های شاهد، از محیط کشت PDA بدون قارچ فوزاریوم استفاده گردید. لازم به ذکر است، در این مرحله جدایه‌هایی که باعث پوسیدگی صفحه پایگاهی و رشد قارچ در روی سوخ‌های پیاز می‌شوند برای آزمایش مولکولی قارچ‌ها و آزمون دامنه میزبانی انتخاب شدند. جهت اطمینان از درستی نتایج آزمایش، سه تکرار در نظر گرفته شد.

#### تشخیص جدایه‌های قارچ فوزاریوم انتخاب شده از آزمون بیماری‌زایی با آزمایش مولکولی

پس از انجام آزمایش بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ فوزاریوم، جدایه‌هایی که بیشترین علائم بیماری‌زایی را نشان دادند، برای انجام آزمایش مولکولی انتخاب شدند. تکثیر میسلیوم‌های قارچ برای استخراج DNA در محیط PDB صورت گرفت و استخراج DNA به روش مولر ۱۹۹۲ با اندکی تغییر انجام شد (Abbasi *et al.*, 2017). تکثیر DNA با آغازگر tef1(F)(5-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3)

و

tcf(R) (5-CCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3) در حجم نهایی ۲۵ μl با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل TC-512 شرکت تکنو آلمان انجام شد. محصول PCR هر یک از جدایه‌ها توسط شرکت Bioneer کره جنوبی توالی‌یابی شدند. توالی‌ها با استفاده از داده‌های NCBI بلاست و در GeneBank ثبت شدند. رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار مگا ۷ و مطابق با مقاله Bagherabadi *et al.* (2018) بر اساس توالی‌های tef1 و توالی‌های معتبر مربوط به گونه‌های مختلف فوزاریوم و گونه اختصاصی *cepae* گرفته شده از GeneBank ترسیم شد.

#### آزمایش دامنه میزبانی

آزمایش دامنه میزبانی با چهار جدایه فوزاریوم

سیگنالی اتیلن است که بیان ژن‌های پاسخ پاتوژن را فعال می‌کند و از پیشرفت بیماری جلوگیری می‌کند (Lorenzo *et al.*, 2003). در مطالعات صورت گرفته توسط Lorenzo *et al.* (2003) مشخص شد ERF نه تنها یک جزء از مسیر سیگنالی اتیلن می‌باشد، بلکه در مسیر سیگنالی اسید جاسمونیک نیز نقش مهمی دارد. به طوری که ERF1 به عنوان یک عنصر کلیدی در ژن‌های پاسخ دفاعی در مسیر سیگنالی اتیلن / اسید جاسمونیک عمل می‌کند. در برخی از گزارش‌ها، افزایش بیان ERF1، COI1 در مسیر سیگنالی اسید جاسمونیک و اتیلن باعث ایجاد مقاومت در برابر پاتوژن‌های نکروتروفیک می‌شود (Glazebrook, 2002; Berrocal-Lobo *et al.*, 2005). بنابراین هدف از انجام این تحقیق در مرحله نخست، آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های فوزاریوم روی سوخ‌های پیاز تحت شرایط آزمایشگاهی، تأیید فرم اختصاصی *cepae* بر اساس توالی‌یابی جدایه‌های انتخاب شده، آزمون گلخانه‌ای آن‌ها و نهایتاً انتخاب بهترین جدایه برای غربالگری برخی دانه‌های رقم‌های بومی پیاز ایرانی به بیماری پوسیدگی فوزاریومی و معرفی رقم متحمل به این بیماری می‌باشد. سپس، میزان بیان رونوشت‌های ERF1 و COI1 در رقم‌های حساس و متحمل به بیماری پوسیدگی فوزاریومی مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

##### آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ فوزاریوم در شرایط آزمایشگاهی

در ابتدا هشت جدایه *Fusarium oxysperum* که شناسایی مورفولوژیکی و آزمون اولیه بیماری‌زایی آن‌ها انجام شده بود از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه بوعلی سینا تهیه شد. برای اطمینان از بیماری‌زا بودن این جدایه‌ها، آزمون بیماری‌زایی به روش Toit *et al.* (2003) روی سوخ‌های سالم پیاز رقم تگزاس‌ارلی گرانو با سه تکرار و هر تکرار حاوی دو سوخ صورت گرفت. در این آزمایش، با استفاده از اسکالپر استریل، به میزان پنج میلی‌مترمربع از صفحه پایگاهی سوخ‌های

آلودگی متوسط که بین ۲۰-۵۰ درصد و ۳ برای آلودگی زیاد که بیشتر از ۵۰ درصد علائم در برگ‌ها و سوخ به کار رفت (Rout et al., 2016; Galván et al., 2008). سپس ارزیابی شدت بیماری (Severity Desiasse Index) بر طبق فرمول زیر محاسبه شد (Rout et al., 2016). آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SAS و با روش توکی در سطح یک درصد انجام شد.

= ارزیابی شدت بیماری

(رتبه‌دهی گیاهان آلوده به بیماری پوسیدگی

فوزاریومی × تعداد گیاهان قرار گرفته در این رتبه‌دهی)

تعداد کل گیاهان

آماده‌سازی مواد گیاهی برای تلقیح *Fusariumoxy*

*sporum f. sp. Cepae* و استخراج RNA

بعد از نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش ارزیابی مقاومت دانه‌های پیاز نسبت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی و مشخص شدن رقم حساس و متحمل، این بخش برای بررسی نقش ژن‌های CO1 و ERF1 در مسیر سیگنالی اسید جاسمونیک و اتیلین در مکانیسم احتمالی مقاومت در برابر بیماری پوسیدگی فوزاریومی انجام شد. در ابتدا، بذر رقم پیاز حساس و متحمل نسبت به قارچ FOC، ضدعفونی و در سینی‌های نشاء ضدعفونی شده کشت داده شده و در گلخانه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از ۴۰ روز نشاءها به گلدان‌های حاوی خاک شنی لومی استریل شده منتقل شدند.

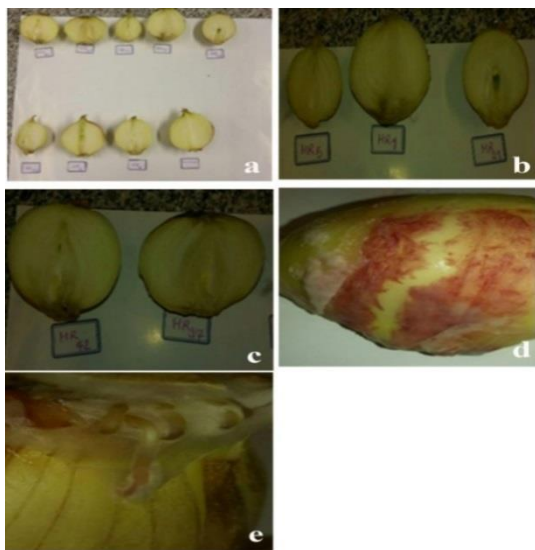
سوسپانسیون اسپوری قارچ با غلظت ۱۰<sup>۶</sup> تهیه شد. ۱۰ روز پس از انتقال نشاءها، گیاهان کشت شده با سوسپانسیون اسپوری و گیاهان شاهد با آب مقطر اتوکلاو شده تیمار شدند و نمونه‌برداری از برگ گیاهان شاهد و نمونه‌های تیمار شده بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت بعد از تیمار دهی انجام شد. نمونه‌های گیاهی به سرعت در نیتروژن مایع فریز شدند و پس از انتقال به آزمایشگاه در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای استخراج RNA قرار گرفتند. استخراج RNA کل با استفاده از کیت (SinaClon, Iran) RNX-Plus طبق روش (Ghaemizadeh et al., 2018) کمی تغییرات انجام شد.

انتخاب‌شده از مرحله اول، جهت اطمینان از اختصاصی بودن فرم *cepea* بر روی ۱۶ گونه گیاهی شامل یونجه، اسفناج، کلزا، خیار، شلغم، گوجه‌فرنگی، شاهی، پیاز، لوبیاسبز، خربزه، فلفل، کلم‌پیچ، کدو خورشی، کاهو، بادمجان و تربچه طبق روش *Dissanayake et al.* (2009) صورت گرفت و دانه‌ها از نظر بیماری زایی پس از ۴ هفته مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمایش عدم جوانه زنی بذر و رشد دانه‌های پیاز و رشد دیگر گونه‌های گیاهی، نشان از اختصاصی بودن جدایه‌ها، برای گیاهان پیاز می‌باشد.

ارزیابی مقاومت دانه‌های پیاز نسبت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی

پس از انتخاب جدایه قارچ فوزاریوم با فرم اختصاصی *cepea* برای آزمون اصلی که پیدا کردن رقم حساس و متحمل گیاهان پیاز نسبت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی می‌باشد، مقاومت دانه‌های هفت رقم از پیازهای ایرانی (سفید خمین، سفید کردستان، درچه اصفهان، قولی قصه زنجان، سفید کاشان، سفید قم و قرمز آذرشهر)، دو رقم خارجی (تگزاس ارلی گرانو و یلو سوئیت اسپانیش) نسبت به بیماری براساس روش انجام شده در پژوهش‌های قبلی (Ozer et al., 2004; Taylor et al., 2013; Rout et al., 2016; Galván et al., 2008) مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش بر اساس بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار (هر تکرار شامل ۱۰ گیاه) صورت گرفت. جهت تهیه سوسپانسیون اسپوری براساس نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش‌های قبلی از جدایه HRI استفاده شد. تهیه سوسپانسیون اسپوری و آلوده‌سازی گیاهان با سوسپانسیون اسپوری، طبق آزمایش‌های Taylor et al. (2013) و Rout et al. (2016) انجام شد. ارزیابی شدت و درصد بیماری، ۹۰ روز بعد از انتقال نشاء در گیاهان بالغ صورت گرفت. درصد بیماری با حضور ریشه‌های اولیه و ثانویه سالم مشخص شد. شاخص شدت بیماری با استفاده از رتبه دهی بین ۰-۳ با اعتبار صفر برای گیاهان بدون علائم یا کمتر از ۱۰ درصد آلودگی، ۱ برای آلودگی کم بین ۱۰-۲۰ درصد صفحه پایگاهی و ریشه‌ها آلوده‌شده باشند، ۲ برای

سوخ‌های شاهد مقایسه شدند. جدایه‌های HR1, HR17, HR42, HR97 بیشترین پوسیدگی طبق را از خود نشان دادند. علائم مشاهده شده در سوخ‌های پیاز با سوخ‌هایی که در مزرعه به صورت طبیعی به واسطه این قارچ آلوده می‌شوند، شباهت داشت، به طوری که پوسیدگی از صفحه پایگاهی سوخ شروع و به سمت غلاف‌های برگ‌ی پیش رفته بود و تغییر رنگ در غلاف‌های بیرونی و رشد میسیلیوم‌های جدایه‌ها در سطح سوخ قابل مشاهده بود (شکل ۱). نتایج به دست آمده از این آزمایش با نتایج آزمایش‌های Holz Knox-Davies & (1974) و Toit *et al.* (2003) مشابهت داشت که باعث گسترش بیماری از صفحه پایگاهی به سمت غلاف‌های برگ‌ی می‌شود و سرانجام میسیلیوم‌های قارچ در سطح بیرونی سوخ شروع به رشد می‌کنند.



شکل ۱. آزمون بیماری‌زایی هشت جدایه *Fusarium oxysporum* بر روی سوخ‌های پیاز و مقایسه با سوخ شاهد (a)، علائم بیماری‌زایی همه جدایه‌ها (b, c)، علائم *Fusarium oxysporum* (d, e) بر روی سوخ‌های پیاز. Figure 1. The pathogenicity test results of eight isolates of *Fusarium oxysporum* on onion bulbs and their comparison with control (a) sign of pathogenicity of all isolate, (b, c) sign of pathogenicity of four isolate that selected for another test (d, e) sign of *Fusarium oxysporum* on onion

تشخیص جدایه‌های قارچ فوزاریوم با آزمایش مولکولی پس از نتایج به دست آمده از توالی‌یابی جدایه‌های

طراحی آغازگر و انجام آزمایش‌های RT-qPCR توالی نوکلئوتیدی ژن‌های ERF1 (ID\_10633) و COI1 (ID-4256) از سایت <http://webtom.cabgrid.res.in/ogr> به دست آمد و پس از بررسی در پایگاه داده‌های NCBI مورد بررسی قرار گرفتند و برای طراحی آغازگرهای مورد استفاده از نرم افزار AlleleID7 استفاده شد و از آغازگر Beta-tubulin برای نرمال کردن داده‌ها استفاده شد (جدول ۱). آزمایش RT-qPCR با استفاده از دستگاه LightCycler ۹۶ (Bio-Rad, Germany) با سه بار تکرار صورت گرفت. مخلوط واکنش حاوی ۷/۵ میکرولیتر از 1x SYBR Green (Bio-Rad, Germany) PremixExRaq II، ۰/۴۵ آغازگر sense (با غلظت ۱۰ μM) و ۱۰ آغازگر antisense (غلظت ۱۰ μM)، ۵cDNA و ۴/۶ μl Water nuclease-free بود. شرایط سیکل حرارتی شامل ۱۵ دقیقه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل ۲۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۳۱ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد بیان نسبی داده‌ها براساس روش مقایسه Cq داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار (REST) و روش Pfaffl تجزیه و تحلیل (Pfaffl *et al.*, 2000) و داده‌های RT-qPCR با میانگین  $\pm SE$  (خطای استاندارد) بیان شدند.

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده برای ارزیابی RT-qPCR

برای ژن‌های ERF1 و COI1

Table 2. Primers used to evaluate RT-qPCR for the ERF1, and COI1 genes

Gens	Primer sequences (5' - 3')
COI1	F: 5'-ATCTGATGGCGATGGTTC-3'
	R: 5'-CTTGAGCAGGATGGTCTAC-3'
ERF1	F: 5'-AGTCCATCAATAACACAAGCATAG-3'
	R: 5'-ACACAACCTCGTCGTCATG-3'
Beta-Tubuli	F: 5'-TTAGAGAAGAGTATCCAGAT-3'
	R: 5'-TTCATTGTCAAGAACCAT-3'

## نتایج و بحث

آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ فوزاریوم در شرایط آزمایشگاهی

در آزمون بیماری‌زایی، سوخ‌های پیاز آلوده شده با هشت جدایه قارچ فوزاریوم بعد از گذشت دو هفته با

جدایه‌ها به میزان زیادی به تفاوت توالی‌ها در ژن‌هایی که در زمان آلودگی گیاه به میزان زیادی بیان می‌شود، مرتبط است و جدایه‌های فوزاریوم با میزان تهاجمی بالا دارای کپی‌های متعدد از ژن هستند که به نظر می‌رسد نقش مهمی را در آلوده کردن گیاه به عهده دارند.

#### ارزیابی مقاومت دانه‌های پیاز نسبت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی

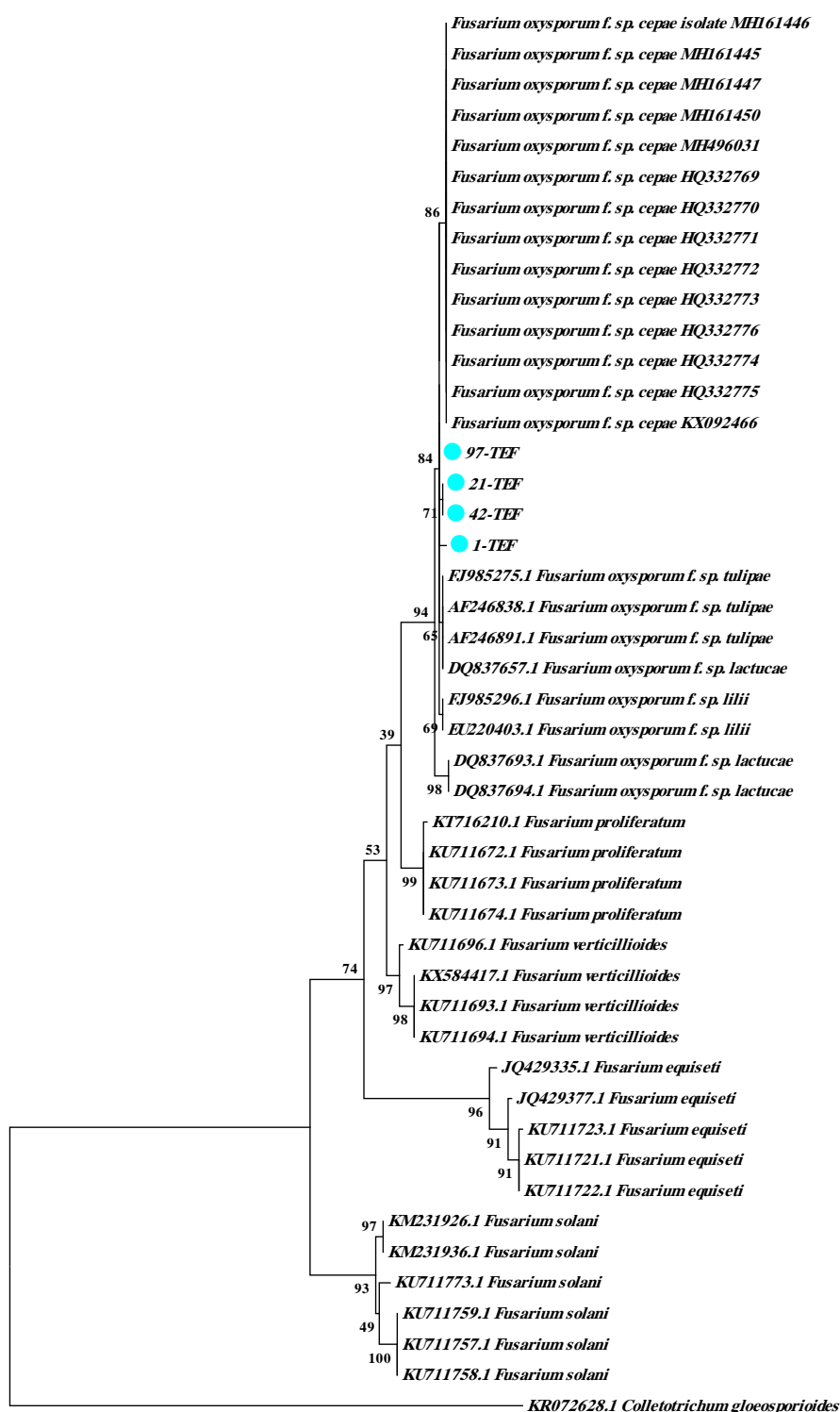
باتوجه به شباهت بالایی که جدایه‌های HR1، HR17 و HR42 در رابطه با بیماری‌زایی، آزمون دامنه بیماری‌زایی و توالی‌یابی داشتند که احتمالاً ناشی از جمع‌آوری آنها از یک مکان بوده است (Rout *et al.*, 2016) از یکی از جدایه‌ها (جدایه HR1)، برای ارزیابی مقاومت دانه‌های پیاز نسبت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی استفاده شد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد اثر رقم بر شدت بیماری و درصد بوته‌های آلوده در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). در بین رقم‌ها، رقم قرمز آذرشهر با شدت بیماری ۲/۳۴ بالاترین سطح شدت بیماری را دارا بود و بعد از آن رقم قوی‌ی قصه زنگان نیز شدت بیماری بالایی را داشت، اما به دلیل اهمیت پیاز قرمز آذرشهر در ایران برای کشت و کار این رقم برای مراحل بعدی نظر گرفته شد. در بین رقم‌های پیاز مورد بررسی، رقم سفیدکاشان با شاخص شدت بیماری به میزان ۰/۹۷ کمترین میزان شدت بیماری را در بین رقم‌های مورد آزمایش دارا بود و دارای تفاوت معنی‌دار با رقم قرمز آذر شهر بود (جدول ۳).

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده رقم سفید کاشان را می‌توان به عنوان گونه متحمل به بیماری پوسیدگی فوزاریومی در نظر گرفت. لازم به ذکر است، براساس جدول مقایسه میانگین اگرچه بین رقم‌های دیگر پیاز، تفاوتی مشاهده شد، اما از نظر شدت و درصد بوته آلوده در یک گروه آماری قرار گرفتند. لازم به ذکر است، نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق با نتایج پژوهش Hajianfar & Rostam Forodi (2005) هم راستا بود. نتایج آنها نشان داد، رقم قرمز آذرشهر نسبت به جدایه قارچ *Fusarium oxysporum* حساس می‌باشد. همچنین با نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق Peyghami *et al.* (2001) مطابقت داشت.

HR1، HR17، HR42، HR97 و همسانه‌سازی آنها در پایگاه NCBI این توالی‌ها به میزان ۱۰۰ درصد به توالی FOC (STEU 6686، STEU 6663) شباهت داشتند. درخت فیلوژنی براساس توالی‌یابی ژن *tefl* ترسیم شد (شکل ۲). جدایه‌های HR97، HR1، HR42 و HR17 با بوت استرپ ۸۴ در دسته خواهری قرار گرفتند. برای شناسایی گونه *Oxysporum* گزارش‌هایی مبنی بر استفاده از ژن *tef* و توالی‌یابی محصول PCR حاصل از این ژن و رسم درخت فیلوژنی برای شناسایی FOC استفاده شده است (Taylor *et al.*, 2013, Galván *et al.*, 2008). نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق با مطالعات پیشین هم راستا بود.

#### آزمایش دامنه میزبانی

در نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش، سه جدایه HR1، HR17 و HR42 به‌وضوح آلودگی مختص پیاز را نشان دادند. این جدایه‌ها به دلیل مرگ ناشی از گیاه‌چه مانع از جوانه‌زنی بذرها و رشد دانه‌های پیاز شدند، ولی در دیگر گونه‌های گیاهی کاشته شده هیچ علائمی از مرگ‌ومیر گیاهچه مشاهده نشد، برای جدایه HR97 تعدادی از بذور پیاز جوانه زدند (داده‌ها نشان داده نشد). براساس درخت فیلوژنی و آزمون دامنه میزبانی، این سه جدایه (HR1، HR17 و HR42) که بیشترین قدرت بیماری‌زایی را داشتند به‌عنوان گونه اختصاصی *cepea* در نظر گرفته شدند. لازم به ذکر است نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش با نتایج Dissanayake *et al.* (2009) مشابه بودند، آنها پنج جدایه *Fusarium oxysporum* را به‌عنوان فرم اختصاصی *cepae* گزارش کردند. اما جدایه HR97 در آزمون دامنه میزبانی، باعث مرگ گیاهچه در گیاهان پیاز نشد و بذور پیاز جوانه زدند، که می‌تواند به این دلیل باشد که این جدایه نسبت به سه جدایه دیگر از سطح تهاجمی پایین‌تری برخوردار بود که با گزارشات Ozer *et al.* (2004) و Taylor *et al.* (2013) مشابهت داشت که جدایه‌های مختلف قدرت بیماری‌زایی متفاوتی دارند. اگرچه، ارتباط واضحی بین سطح تهاجمی جدایه‌ها و توالی‌های *tef* پیدا نشده است، اما Taylor *et al.* (2013) معتقد هستند که تفاوت در سطح تهاجمی



شکل ۲. درخت فیلوژنی به دست آمده براساس توالی *tef1* از جدایه‌های HR1، HR42، HR17، HR97 و جدایه‌های

*Fusarium* به دست آمده از بانک ژن با شماره دسترسی با استفاده از نرم‌افزار مگا ۷ و با روش Neighbor Joining با ۱۰۰۰ بوت استرپ. *Colletotrichum gloeosporioides* با شماره دسترسی KR072628.1 به عنوان out group در نظر گرفته شد.

Figure 2. The phylogeny tree obtained from *tef1* sequence from HR1, HR42, HR21, and HR97 isolates and *Fusarium* isolates obtained from Gene Bank with access number with MEGA 7 software and Neighbor Joining method with 1000 Bootstrap. *Colletotrichum gloeosporioides* with accession number of KR072628.1 was considered as out group.

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس شدت بیماری و درصد بیماری پوسیدگی فوزاریومی در زمان ۹۰ روز پس از آلودگی با جدایه HR1 (IRAN 3741C) رقم‌های مختلف پیاز ایرانی

Table 2. Results of variance analysis of fusarium basal rot severity and percentage of infection at 90 days after inoculating with isolate HR1 (IRAN 3741C) on different cultivars of Iranian onion

Source of variance	df	Mean of squares	
		Percentage of infected	Severity Index
Replication	2	0.48 <sup>ns</sup>	0.07 <sup>ns</sup>
Cultivar	8	59.25 <sup>**</sup>	0.57 <sup>**</sup>
Error	16	1.68	0.06
C. V.	-	1.37	14.54

\*\* و ns: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار.

\*\*\*, ns: Significantly difference at 1% of probability levels and non-significantly difference, respectively.

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر رقم بر درصد بوته آلوده و شدت بیماری پوسیدگی فوزاریومی پیاز ایرانی.

Table 3. Mean comparison effect of cultivar on the percentage of infected plant and disease severity of fusarium basal rot disease.

Cultivars	Percentage of infected plant (%)	Severity index
GhermezeAzarshahr	100 <sup>a</sup>	2.34 <sup>a</sup>
Gholi-GhesehZanjan	100 <sup>a</sup>	2.17 <sup>ba</sup>
SefideKashan	86.667 <sup>d</sup>	0.97 <sup>c</sup>
SefideKhomein	96.667 <sup>ba</sup>	1.37 <sup>bc</sup>
SefideKurdistan	96.667 <sup>ba</sup>	1.77 <sup>abc</sup>
Sefide Qom	93.33 <sup>bc</sup>	1.77 <sup>abc</sup>
Dorche-Isfahan	96.667 <sup>ba</sup>	1.91 <sup>ab</sup>
Texas Early Grano	93.33 <sup>bc</sup>	2.14 <sup>ab</sup>
Yellow Sweet Spanish	90.01 <sup>cd</sup>	1.44 <sup>bac</sup>
HSD	4.6696	0.9241

در هر ستون میانگین‌هایی با حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

In each column means followed by at least a common letter, are not significantly difference at 5% probability level.

### میزان بیان COII و ERF1 در مسیر سیگنالی اسید جاسمونیک و اتیلن

بررسی مقایسه‌ای بیان ژن ERF1 در رقم حساس (قرمز آذرشهر) و متحمل (سفید کاشان) نشان می‌دهد که این ژن در رقم حساس دارای افزایش بیان در زمان ۲۴ ساعت پس از تلقیح با قارچ فوزاریوم می‌باشد (P=۰/۰۰۱)؛ اما سطح بیان این ژن در گیاه متحمل نسبت به گیاهان حساس دارای کاهش بیان بود (P=۰/۰۰۱)؛ در زمان ۴۸ ساعت، در هر دو رقم کاهش بیان دیده می‌شود، ولی مجدد در زمان ۷۲ ساعت بعد از آلودگی میزان بیان ERF1 در هر دو رقم حساس و متحمل افزایش می‌یابد. به طوری که در رقم حساس افزایش بیان چشمگیری به میزان ۷/۳۱ نسبت به نمونه‌های بدون تلقیح مشاهده شد (شکل ۳A). نتایج

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر رقم بر درصد بوته آلوده و شدت بیماری پوسیدگی فوزاریومی پیاز ایرانی.

Table 3. Mean comparison effect of cultivar on the percentage of infected plant and disease severity of fusarium basal rot disease.

Cultivars	Percentage of infected plant (%)	Severity index
GhermezeAzarshahr	100 <sup>a</sup>	2.34 <sup>a</sup>
Gholi-GhesehZanjan	100 <sup>a</sup>	2.17 <sup>ba</sup>
SefideKashan	86.667 <sup>d</sup>	0.97 <sup>c</sup>
SefideKhomein	96.667 <sup>ba</sup>	1.37 <sup>bc</sup>
SefideKurdistan	96.667 <sup>ba</sup>	1.77 <sup>abc</sup>
Sefide Qom	93.33 <sup>bc</sup>	1.77 <sup>abc</sup>
Dorche-Isfahan	96.667 <sup>ba</sup>	1.91 <sup>ab</sup>
Texas Early Grano	93.33 <sup>bc</sup>	2.14 <sup>ab</sup>
Yellow Sweet Spanish	90.01 <sup>cd</sup>	1.44 <sup>bac</sup>
HSD	4.6696	0.9241

\*\* و ns: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار.

\*\*\*, ns: Significantly difference at 1% of probability levels and non-significantly difference, respectively.

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر رقم بر درصد بوته آلوده و شدت بیماری پوسیدگی فوزاریومی پیاز ایرانی.

Table 3. Mean comparison effect of cultivar on the percentage of infected plant and disease severity of fusarium basal rot disease.

Cultivars	Percentage of infected plant (%)	Severity index
GhermezeAzarshahr	100 <sup>a</sup>	2.34 <sup>a</sup>
Gholi-GhesehZanjan	100 <sup>a</sup>	2.17 <sup>ba</sup>
SefideKashan	86.667 <sup>d</sup>	0.97 <sup>c</sup>
SefideKhomein	96.667 <sup>ba</sup>	1.37 <sup>bc</sup>
SefideKurdistan	96.667 <sup>ba</sup>	1.77 <sup>abc</sup>
Sefide Qom	93.33 <sup>bc</sup>	1.77 <sup>abc</sup>
Dorche-Isfahan	96.667 <sup>ba</sup>	1.91 <sup>ab</sup>
Texas Early Grano	93.33 <sup>bc</sup>	2.14 <sup>ab</sup>
Yellow Sweet Spanish	90.01 <sup>cd</sup>	1.44 <sup>bac</sup>
HSD	4.6696	0.9241

در هر ستون میانگین‌هایی با حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

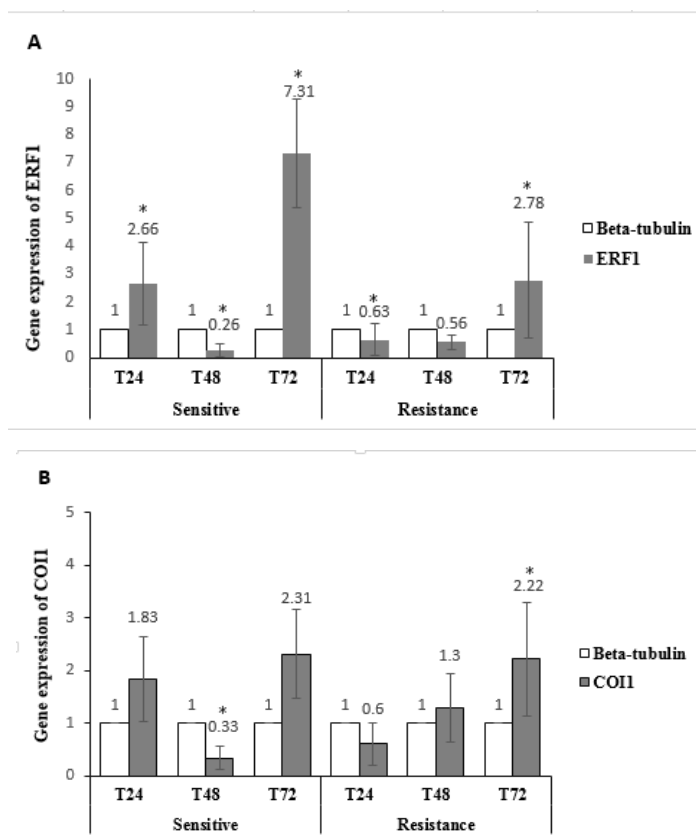
In each column means followed by at least a common letter, are not significantly difference at 5% probability level.

در آزمایش‌ها آنها نیز رقم‌های قرمز آذرشهر و قوی قاصه زنجان به این بیماری حساس بودند. آنها دلیل این حساسیت را تعداد کم ریشه در این دو رقم عنوان کردند. اما نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق با گزارشات Nasr-Esfahani & Hosseini Kohpayegani (2016) هم راستا نبود، در مطالعات آنها سوخ‌های برخی از رقم‌های ایرانی و دو رقم خارجی برای پیدا کردن رقم مقاوم به بیماری پوسیدگی فوزاریومی، غربالگری شدند. طبق گزارش‌ها آنها رقم قرمز آذرشهر در گروه نیمه‌مقاوم می‌باشد. این تفاوت در نتایج ممکن است به دلیل متفاوت بودن سن دانه‌های پیاز در هنگام غربالگری مرتبط باشد، زیرا سن دانه‌ها بر سطح مقاومت رقم‌ها تأثیرگذار هستند



به‌دست‌آمده از این تحقیق با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات Berrocal-Lobo *et al* (2002) هم راستا نبود. آنها گزارش کردند افزایش بیان ERF1 در آرابیدوپسیس باعث مقاومت به بیماری *Botrytis cinerea* می‌شود. همچنین در مطالعه Anderson *et al.* (2010) مشخص شد افزایش بیان بیش از حد MtERF1-1 در ریشه گیاهان تراریخت *Medicago truncatula* باعث ایجاد مقاومت به *Rhizoctonia solani* شد. که تفاوت در نتایج به‌دست‌آمده می‌تواند به دلیل نقش متغیر مسیر سیگنالی اتیلن باشد. به طوری در طی دهه گذشته نقش مسیر سیگنالی اتیلن در برابر دفاع پاتوزن بحث برانگیز بوده است و به نظر می‌رسد بسته به نوع پاتوزن و گونه‌های گیاهی، اتیلن نقش‌های متضادی در پیشرفت بیماری داشته باشد (EIKazzaz *et al.*, ).

(1983). علاوه بر این، در برخی از گونه‌های گیاهی مسیر سیگنالی اتیلن می‌تواند بر مقاومت به بیماری به صورت منفی عمل کند (Sugano *et al.*, 2013). به عنوان مثال در گیاهان آرابیدوپسیس و گوجه‌فرنگی افزایش بیان ERF1 باعث کاهش مقاومت این گیاهان در برابر عامل باکتریایی *Pseudomonas syringae* شد. بنابراین نتایج این تحقیق نشان داد که رونوشت ERF1 در زمان اولیه در رقم حساس و متحمل با یکدیگر متفاوت هستند و برخلاف نتایج قبلی، ممکن است کاهش بیان ERF1 در زمان‌های اولیه پس از تلقیح گیاهان پیاز با قارچ FOC اتفاق می‌افتد. با توجه به الفای سریع در رقم حساس و متحمل، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً این ژن در واکنش‌های مرتبط با مقاومت مؤثر باشد.



شکل ۳. تفاوت سطح بیان نسبی در ژن‌های ERF1 و COI1 در بین رقم‌های حساس و متحمل پیاز به بیماری پوسیدگی فوزاریومی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح با FOC. Error bar نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد، Beta-tubulin به عنوان ژن رفرنس در نظر گرفته شد. \* نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد با نمونه شاهد بدون تلقیح با قارچ است.

Figure 3. Differences in relative expression levels of the ERF1, and COI1 genes between the FOC-sensitive or tolerant cultivars of onion 24, 48 and 72 h after FOC inoculation. The error bar indicates standard error, and the beta-tubulin gene was considered the reference gene. \* Indicates a significant difference at the 1% level with the control sample not inoculated with the fungus

Anderson et al., 2004; Berrocal-Lobo Molina, 2004; McGrath et al., 2005). در این تحقیق تفاوت قابل توجهی از نظر بیان این رونوشت در رقم حساس و متحمل به بیماری پوسیدگی فوزاریومی مشاهده نشد که با گزارشات قبلی هم راستا نبود. بیشتر مطالعات پاسخ دفاعی علیه پاتوژن‌های قارچی که باعث نکروز می‌شود در مواردی مانند اندام‌های هوایی گیاهان متمرکز شده است و در مقابل مکانیسم مقاومت در برابر قارچ‌هایی مانند *F. oxysporum* که ریشه را آلوده می‌کنند، اطلاعات اندکی وجود دارد. برخی مطالعات نشان می‌دهد که در قارچ‌های همی بیوتروفیک مانند فوزاریوم، در مرحله بیوتروفیکی تحت تأثیر COI1 قرار نمی‌گیرند، اما در مرحله نکروتروفیکی که در آن مرگ سلول میزبان اتفاق می‌افتد، نیاز به COI1 کاربردی در سلول‌های میزبان دارد (Thatcher et al., 2009). لازم به ذکر است، علاوه بر مسیر سیگنالی اسید جاسمونیک، مولکول‌های سیگنالی دفاعی مانند اسید سالسیلیک و اتیلن نیز در پاسخ به پاتوژن و مقاومت نقش دارند که نیاز به بررسی‌های بیشتری برای دیگر رونوشت‌های درگیر در این مسیرها و اثرات متقابل آن‌ها می‌باشد.

#### نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد، برخی از جدایه‌های جنس فوزاریوم مانند HR1، HR42 و HR21 مختص جنس آلیوم می‌باشد که با ثبت در موسسه گیاه پزشکی کشور محققان می‌توانند از این جدایه‌ها در تحقیقات آتی استفاده کنند. همچنین با توجه به آزمایشات غربالگری در برابر بیماری پوسیدگی فوزاریومی این امید هست که بتوان از رقم سفید کاشان برای تولید رقم های هیبرید متحمل به بیماری پوسیدگی فوزاریومی در اصلاح گیاه پیاز استفاده کرد. همچنین بیان رونوشت ERF1 در زمان ۲۴ ساعت پس از تلقیح در رقم حساس و متحمل متفاوت بود که می‌تواند نشان‌دهنده نقش احتمالی این ژن در ایجاد مقاومت باشد.

سرعت پاسخ گیاه به عامل بیماری‌زا، از عوامل تأثیرگذار مقاومت یا حساسیت گیاه به پاتوژن می‌باشد. به طوری که برخی از محققین معتقد هستند پاسخ دفاعی که با سرعت کم و آهستگی در گیاهان اتفاق می‌افتد باعث افزایش حساسیت به عامل بیماری‌زا می‌شود و گیاه قادر به مقاومت نیست (-Hammond Kosack & Parker, 2003). بنابراین ERF1 احتمالاً در کنار دیگر ژن‌های ایجادکننده مقاومت، باعث حفظ و بهبود مقاومت گیاهان پیاز در مقابله با بیماری پوسیدگی فوزاریومی شود.

بررسی الگوی بیان ژن COI1 تحت تیمار بیماری پوسیدگی فوزاریومی (شکل ۳، B) نشان می‌دهد که در رقم قرمز آذرشهر در زمان ۲۴ ساعت بعد از تلقیح با قارچ فوزاریوم، افزایش بیان ژن نسبت به شاهد مشاهده می‌شود، درحالی که در رقم سفید کاشان کاهش بیان دیده شد، اگرچه این تفاوت‌ها با نمونه شاهد معنی‌دار نیستند. در زمان ۴۸ ساعت پس از تلقیح در رقم قرمز آذرشهر کاهش بیان مشاهده می‌شود (۰/۳۳) که این تفاوت در سطح یک درصد معنی‌دار بود، اما در رقم سفید کاشان اگرچه تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شد، ولی نسبت به رقم قرمز آذرشهر افزایش بیان کمی را نشان می‌دهد. در زمان ۷۲ ساعت پس از تلقیح به نظر می‌رسد میزان بیان COI1 در هر دو رقم حساس و متحمل افزایش بیان را نشان می‌دهد، اما در رقم متحمل این افزایش بیان دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشد (۰/۰۱؛ P=۰/۲۲). نتایج به‌دست‌آمده از بیان نسبی COI1 در رقم حساس در زمان‌های اندازه‌گیری بیان ژن، دارای نوسان بود که ممکن است به دلیل اثرات متقابل ژن‌های دیگر در مسیرهای سیگنالی اتیلن و اسید جاسمونیک و همچنین اثرات متقابل این دو مسیر اتفاق افتاده باشد (Moghadam et al., 2013; Pieterse et al., 2012).

افزایش بیان COI1 در مسیر سیگنالی اسید جاسمونیک باعث ایجاد مقاومت در برابر قارچ فوزاریوم در گیاه آرابیدوپسیس می‌شود (Epple et al., 1997; )

#### REFERENCES

1. Abbasi, K., Zafari, D., Wick, R. & Hamedan, I. (2017). Evaluation of chitinase enzyme in fungal isolates obtained from golden potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis*). *Zemdirbystė (Agriculture)*, 104(2), 179-184.

2. Anderson, J. P., Lichtenzveig, J., Gleason, C., Oliver, R. P. & Singh, K. B. (2010). The B-3 ethylene response factor MtERF1-1 mediates resistance to a subset of root pathogens in *Medicago truncatula* without adversely affecting symbiosis with rhizobia. *Plant Physiology*, 154(2), 861-873.
3. Baghban, S. S., Kashi, A., Khalighi, A., Pasban, E. B. & Alizadeh, O. P. (2011). Inspection of some morphological and physiological traits in twelve Iranian onion population (*Allium cepa* L.). *Journal of Plant Production*, 18 (1), 89-103. (In Farsi).
4. Bagherabadi, S., Zafari, D., Ghobadi Anvar, F. & Damm, U. (2018). *Colletotrichum gloeosporioides* sensu stricto, the causal agent of a leaf spot disease of *Schefflera arboricola* in Iran. *Mycologia Iranica*, 5(1), 29-34.
5. Bazl, S., Dashti, F. & Delshad, M. (2017). Effects of different levels of sulfur and selenium on some morphological and antioxidant properties of onion (*Allium cepa* L.) cv. Germez Azarshahr. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 48(3), 623-633. (In Farsi).
6. Berrocal-Lobo, M., Molina, A. & Solano, R. (2002). Constitutive expression of *Ethylene-Response-Factor1* in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal*, 29(1), 23-32.
7. Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R. & Micol, J.L. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448 (7154), 666-671.
8. Cramer, C.S. (2000). Breeding and genetics of fusarium basal rot resistance in onion. *Euphytica*, 115(3), 159-166.
9. Dissanayake, M.L.M.C., Kashima, R., Tanaka, S. & Ito, S.I. (2009). Pathogenic variation and molecular characterization of *Fusarium* species isolated from wilted Welsh onion in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 75(1), 37-45.
10. Epple, P., Apel, K. & Bohlmann, H. (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell*, 9(4), 509-520.
11. El-Kazzaz, M.K., Sommer, N.F. & Kader, A.A. (1983). Ethylene effects on *in vitro* and *in vivo* growth of certain postharvest fruit-infecting fungi. *Phytopathology*, 73(7), 998-1001.
12. Ghaemizadeh, F., Dashti, F. & Shafeinia, A. (2018). Expression analysis of gaLFY and AsFT during reproductive development in different organs of some Iranian Garlic (*Allium sativum* L.) Clones. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 49 (1), 269-278. (In Farsi).
13. Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-227.
14. Galván, G.A., Koning-Boucoiran, C.F., Koopman, W.J., 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(4), 499-512.
15. Hammond-Kosack, K. E. & Parker, J. E. (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(2), 177-193.
16. Hajianfar, R. & Rostam Foroudi, B. (2005). Evaluation of resistance of Iranian onion masses to *Fusarium* root rot disease in greenhouse conditions. In: *Proceedings of 4th Congress of Horticultural Sciences 6-7 Nov.*, Ferdowsi University of Mashhad, Khorasan Razavi province, Iran. (In Farsi).
17. Holz, O.S. (1969). Resistance of onion selections to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Phytophylactica*, 1(2), 153-156.
18. Kunkel, B. N. & Brooks, D. M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), 325-331.
19. Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J. J. & Solano, R. (2003). *Ethylene response factor1* integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *The Plant Cell*, 15(1), 165-178.
20. Lyons, R., Rusu, A., Stiller, J., Powell, J., Manners, J. M. & Kazan, K. (2015). Investigating the association between flowering time and defense in the *Arabidopsis Thaliana-Fusarium oxysporum* interaction. *PloS one*, 10(6), 1-24.
21. Mao, Y. B., Liu, Y. Q., Chen, D. Y., Chen, F. Y., Fang, X., Hong, G. J., Wang, L. J., Wang, J. W. & Chen, X.Y. (2017). Jasmonate response decay and defense metabolite accumulation contributes to age-regulated dynamics of plant insect resistance. *Nature Communications*, 8(1), 1-13.
22. McGrath, K. C., Dombrecht, B., Manners, J. M., Schenk, P. M., Edgar, C. I., Maclean, D. J., Scheible, W. R., Udvardi, M. K. & Kazan, K. (2005). Repressor-and activator-type *ethylene response factors* functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. *Plant Physiology*, 139(2), 949-959.
23. Moghadam, A. A., Ebrahimie, E., Taghavi, S. M., Niazi, A., Babgohari, M. Z., Deihimi, T., Djavaheri, M. & Ramezani, A. (2013). How the nucleus and mitochondria communicate in energy production during stress: nuclear MtATP6, an early-stress responsive gene, regulates the mitochondrial F1F0-ATP synthase complex. *Molecular Biotechnology*, 54(3), 756-769.

24. Nasrasfahani, M. & Hosseini Kopai, M. (2016). Physical components of resistance in onion genotypes resistant and susceptible to root rot and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Seed and Plant Journal*, 31(3), 547-564. (In Farsi).
25. Özer, N., Köycü, N. D., Chilosi, G. & Magro, P. (2004). Resistance to fusarium basal rot of onion in greenhouse and field and associated expression of antifungal compounds. *Phytoparasitica*, 32(4), 388-394.
26. Onaga, G. & Wydra, K. (2016). Advances in plant tolerance to abiotic stresses. *Plant Genomics*, 10, 229-272.
27. Peyghami, E., Messiah, S., Valizadeh, M. & Samadi, A. (2001). Evaluation of resistance of different onion cultivars (*Allium cepa* L.) to root rot and onion rot (*Fusarium* spp). *Agriculture Knowledge*, 11(3), 101-111. (In Farsi)
28. Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), 36-46.
29. Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A. & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489-521.
30. Rout, E., Tripathy, P., Nanda, S., Nayak, S. & Joshi, R. K. (2016). Evaluation of cultivated and wild allium accessions for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 86(3), 643-649.
31. Saxena, A. & Cramer, C. S. (2009). Screening of onion seedlings for resistance against New Mexico isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Journal of Plant Pathology*, 91(1), 199-202.
32. Sheard, L. B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T. R., Kobayashi, Y., Hsu, F. F., Sharon, M., Browse, J. & He, S. Y. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, 468(7322), 400-405.
33. Shigyo, M., Khar, A. & Abdelrahman, M. (Eds.). (2018). *The Allium genomes* (1th ed.). Cham: Springer.
34. Sugano, S., Sugimoto, T., Takatsuji, H. & Jiang, C. J. (2013). Induction of resistance to *Phytophthora sojae* in soyabean (*Glycine max*) by salicylic acid and ethylene. *Plant Pathology*, 62(5), 1048-1056.
35. Taylor, A., Vagany, V., Barbara, D. J., Thomas, B., Pink, D.A.C., Jones, J. E. & Clarkson, J. P. (2013). Identification of differential resistance to six *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* isolates in commercial onion cultivars through the development of a rapid seedling assay. *Plant Pathology*, 62(1), 103-111.
36. Thaler, J.S., Owen, B. & Higgins, V.J. (2004). The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology*, 135(1), 530-538.
37. Toit, L. D., Inglis, D. A. & Pelter, G. Q. (2003). *Fusarium proliferatum* pathogenic on onion bulbs in Washington. *Plant Disease*, 87(6), 750 -750.
38. Zanghue, Z., Hasandokht, M. R. & Kashi, A. (2015). Effect of spermidine on *in vitro* gynogenesis of six onion accessions from Khorasan province. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 46(2), 225-231. (In Farsi).
39. Zhang, W., Corwin, J.A., Copeland, D., Feusier, J., Eshbaugh, R., Chen, F., Atwell, S. & Kliebenstein, D.J. (2017). Plastic transcriptomes stabilize immunity to pathogen diversity: the jasmonic acid and salicylic acid networks within the Arabidopsis/Botrytis pathosystem. *The Plant Cell*, 29(11), 2727-2752.