



مقاله پژوهشی

بررسی بیماری زردی سیر در مزارع استان زنجان

ندا زند^۱، حسین جعفری^۲، مونس بخشی^۲، شمس‌اله نجفی^۱

۱- محقق، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران؛ ۲- استاد، استادیار، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران (تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۲؛ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۲)

چکیده

سیر گیاهی علفی از تیره پیازیان (*Alliaceae*) است که از نظر تولید جهانی در بین گیاهان پیازی پس از پیاز رتبه دوم را به خود اختصاص داده است. این محصول در منطقه طارم استان زنجان یکی از محصولات زراعی مهم می‌باشد. در سال‌های گذشته بیماری جدیدی در منطقه با علائم زردی شدید و خشکیدگی انتهایی برگ‌ها شایع شد که با عنوان بیماری عارضه زردی سیر در منطقه شناخته می‌شود. به منظور شناسایی و بررسی میزان شیوع عامل بیماری در منطقه طارم، نمونه برداری از مزارع سیر در طی سه سال زراعی انجام و پس از کشت نمونه‌های برگ‌دارای علائم، شناسایی جدایه‌های قارچی با روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی انجام شد. بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و توالی‌یابی ناحیه ITS از DNA ریپوزومی و بخشی از نواحی ژنی گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز، کالمودولین و همچنین نتایج آزمون بیماری‌زایی، گونه *Stemphylium vesicarium* به عنوان عامل بیماری شناسایی شد. قارچ عامل بیماری از کلیه مزارع سیر شهرستان طارم جداسازی شد که نتایج حاصل بیان‌گر وسعت پراکنش و همه‌گیری بیماری در سراسر منطقه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیماری عارضه زردی، سیر، *Stemphylium vesicarium*

Garlic yellowing disease in Zanjan Province

N. ZAND¹, H. JAFARY², M. BAKHSHI², SH. NAJAFI¹

1. Researcher, Plant Protection Research Department, Zanjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zanjan, Iran; 2. Professor, Assistant Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization, AREEO, Tehran, Iran

Abstract

Garlic is an herbaceous plant from the *Alliaceae*, which ranks second among *Allium* species after onions in terms of global production. Garlic is one of the most widely grown crops in Tarom County, Zanjan Province, Iran. Recently, a new disease with symptoms of severe yellowing and terminal drying of the leaves, known as garlic yellowing disease, was observed in many fields of Tarom County of Zanjan province. To identify the causal agent and assess the prevalence of garlic yellowing disease in Tarom, symptomatic leaves were collected from fields for three years. After isolation, the cause of garlic yellowing disease was identified as *Stemphylium vesicarium*, based on both morphological characteristics and sequencing of the rDNA-ITS, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) and calmodulin (*cmdA*) genomic regions. A severe epidemic of yellowing disease on garlic caused by *S. vesicarium* was found in all garlic fields in Tarom.

Keywords: *Allium sativum*, garlic yellowing disease, *Stemphylium vesicarium*

مقدمه

سیر (*Allium sativum*) متعلق به تیره *Alliaceae* است و سایر محصولات این تیره، پیاز (*A. cepa*)، تره‌فرنگی (*A. ameloprisum*)، موسیر (*A. asaconcum*) و پیاز کوهی (*A. schoenoprasum*) می‌باشند. سیر از نظر تولید در رتبه دوم بعد از پیاز قرار دارد. گیاه سیر یک ساله و با ارتفاع به ۷۵ تا ۹۰ سانتی متر است که از اواسط پاییز تا زمستان کشت می‌شود (Brewster 1994)، منشأ این گیاه آسیای مرکزی است که به سایر نقاط جهان گسترش یافته است (Brewster 2008). این گیاه در چین و هند از ۵۰۰۰ سال قبل و در مصر از ۲۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح کشت و استفاده می‌شده است (Kamenetsky & Rabinowitch 2001). سیر یکی از محصولات مهم سبزی و صیفی است که در سراسر جهان به دلیل خواص ارزشمند دارویی و غذایی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است، متابولیت‌های ثانویه این محصول از طریق خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی خود اثرات بسیار خوبی برای ارتقاء سلامت و پیشگیری از بیماری‌های مختلف نشان داده‌اند (Ansary et al. 2020). تولید این محصول در طی ۲۰ سال گذشته در سراسر جهان در حال افزایش است به طوری که در سال ۲۰۲۰، از حدود ۱/۶ میلیون هکتار مزارع سیر که عمدتاً در مناطق گرمسیری و معتدل واقع هستند، بیش از ۲۸ میلیون تن محصول برداشت شده است (Chretien et al. 2021). سیر در شرایط آب و هوایی متنوعی قابل کشت می‌باشد، اما در مناطق جغرافیایی با آب و هوای خنک و ارتفاعات بالا (۹۰۰ تا ۱۲۰۰ متر بالاتر از سطح دریا) با میانگین دمای رشد ۱۲ تا ۲۴ درجه سلسیوس بهترین رشد را دارد (Nuskiya 2019). سیر قابلیت بالایی برای کاشت در بیشتر مناطق معتدل و خنک ایران را نیز دارد (Abyaneh et al. 2011).

طبق آمار سازمان خوار و بار جهانی میزان سطح زیر کشت سیر را در سال زراعی ۲۰۲۱-۲۰۲۰ در ایران، حدود ۴۸۵۹ هکتار و میزان تولید ۵۹۸۶۰ تن بوده است (FAO, 2021). سطح زیر کشت سیر در استان زنجان، بر اساس آمار جهاد کشاورزی استان در سال زراعی ۱۴۰۱ - ۱۴۰۰ نزدیک به ۱۳۰۰ هکتار

برآورد شده است و میزان تولید این محصول ۵۲ هزار تن و عملکرد آن ۴۳ تن سیر تر در هکتار است (بی نام، ۱۴۰۱). ایران در گذشته یکی از بزرگترین صادرکنندگان این گیاه بوده، اما امروزه دیگر کشورهای جهان با عملکرد بالا و ارائه به‌هنگام این محصول به بازار، جزء صادرکنندگان مهم آن در جهان به‌شمار می‌آیند (Omidbaigi et al. 2010).

تولید و بهره‌وری سیر تحت تأثیر عوامل زنده و غیرزنده بسیاری از جمله آفات و بیماری‌های گیاهی، کمبود ارقام پر محصول، در دسترس نبودن بذر با کیفیت، استفاده نادرست از کودها، آبیاری نامناسب، شرایط نامناسب نگهداری محصول قرار می‌گیرد (Tabor & Zeleke 2000; Zeray & Mohammed 2016; Diriba-Shiferaw 2013). عوامل بیماری‌زای متعددی باعث خسارت به سیر می‌شوند که قارچ‌ها از مهمترین عوامل خسارت‌زا می‌باشند (Gálvez et al. 2016). در بین بیماری‌های قارچی، بیماری‌های برگ که توسط قارچ‌ها ایجاد می‌شوند، از مخرب‌ترین بیماری‌های گیاهی در سراسر جهان می‌باشند (Agrios 2005). در مورد بیماری‌هایی اندام‌های هوایی و برگ سیر دو عامل زنگ سیر که توسط بیمارگر *Puccinia allii* ایجاد می‌شود (Mengesha et al. 2016) و بلایت برگ سیر ناشی از *Stemphylium spp.* از مهمترین عوامل ایجاد خسارت می‌باشند (Zheng et al. 2008; Polat et al. 2012). یکی از عواملی که عملکرد این محصول در استان زنجان را در سال‌های اخیر تهدید کرده، عارضه زردی برگ سیر است که تولید این محصول را با چالش جدی روبرو کرده است. با توجه به بازدیدها و نمونه برداری‌ها و مطالعات اولیه که در سال‌های گذشته انجام شده است، عوامل قارچی از دلایل اصلی این بیماری می‌باشند به همین منظور هدف از انجام این تحقیق شناسایی عامل قارچی اصلی عامل زردی برگ سیر بود.

روش بررسی

به‌منظور بررسی وضعیت آلودگی عارضه زردی سیر و شناسایی عامل بیماری، مزارع سیر واقع در مناطق کشت آن، در طی

جدایه‌های قارچی خالص‌سازی شده برای مطالعه‌های بعدی در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت PDA نگهداری شدند.

ریخت‌شناسی

جدایه‌های انتخابی روی محیط کشت PCA (سیب زمینی هویج آگار) کشت و به مدت یک هفته در شرایط دمایی ۲۲ درجه سلسیوس تا ۲۵ درجه سلسیوس زیر نور سفید فلورسنت با دوره تاریکی/روشنایی ۸/۱۶ ساعت نگهداری شد (Simmons 1969)، سپس ویژگی‌های کلی کلنی‌ها، الگوی کنیدیوم‌زایی، ویژگی کنیدیوم‌ها و کنیدیوفورها بررسی شد، به این منظور از میکروسکوپ Olympus BX50 استفاده شد. لام‌های میکروسکوپی به روش نوارچسب شفاف تهیه شدند (Schubert *et al.* 2007). ویژگی‌های ثبت شده جدایه‌های انتخابی با توصیف‌ها و کلیدهای معتبر قارچ‌شناسی مقایسه و ریخت‌شناسی جدایه‌ها انجام شد.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

به منظور تأیید مولکولی خصوصیات ریخت‌شناسی جدایه‌ها، از پنج جدایه، استخراج DNA ژنومی انجام شد، به این ترتیب که ابتدا جدایه‌های قارچی در ظروف پتری حاوی محیط کشت PDA کشت شده و در تاریکی و دمای ۲۴ درجه سلسیوس به مدت هفت روز نگهداری و سپس استخراج DNA با روش CTAB پیشنهاد شده توسط (Novaes *et al.* 2009) انجام شد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از سیستم الکتروفورز افقی روی ژل آگارز و کمیت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ و تعیین نسبت جذب در ناحیه طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر تعیین گردید.

برای شناسایی دقیق‌تر گونه قارچ‌های جداسازی شده، تکثیر ناحیه ITS-rDNA با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 (White *et al.* 1990)، تکثیر بخشی از ناحیه ژنی گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (*gapdh*) با استفاده از آغازگرهای *gpd1* و *gpd2* (Berbee *et al.* 1999) و تکثیر بخشی از ناحیه ژنی کالمودولین (*cmdA*) با استفاده از آغازگرهای CALDR2 و CALDF1 (Lawrence *et al.* 2013) انجام شد. هر واکنش

سالهای زراعی ۱۳۹۹-۱۳۹۸، ۱۴۰۰-۱۳۹۹ و ۱۴۰۱-۱۴۰۰ بازدید شد. با ظهور اولین علائم بیماری در منطقه، بازدیدهای منظم هفتگی از مزارع صورت گرفت و با بررسی و نمونه برداری از بوته‌ها در مزارع، میزان آلودگی به بیماری در مراحل مختلف بررسی و ثبت گردید (جدول ۱).

جدول ۱- مزارع مورد نمونه برداری سیر شهرستان طارم استان زنجان
Table 1. Sampling of garlic farms in Tarom County of Zanjan Province

Sampling area	Sampling date/ Number of farms visited		
	2020 –2019	2021 –2020	2022 –2021
Shaqaqi	4	3	3
Chavarzaq	5	4	3
Kohkan-e Sofla	5	4	4
Kohkan-e Olya	4	3	3
Vanisar	21	20	18
Dohneh	5	5	3
Dast Jerdeh	10	10	8
Qalat	1	5	2
Sansiz	6	3	4
Alzin	1	3	2

جداسازی عامل بیماری از برگ‌های دارای علائم عارضه زردی سیر پس از انتقال برگ‌های دارای علائم به آزمایشگاه، برگ‌ها زیر جریان ملایم آب شسته شده، سپس قطعاتی به طول نیم تا یک سانتی‌متر از قسمت‌های بین بافت‌های آلوده و سالم برگ جدا و به مدت یک دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم رقیق شده با یک درصد ماده مؤثر ضد عفونی سطحی شد. پس از دوبار شست و شو با آب مقطر سترون برای جذب آب سطحی در بین دو لایه کاغذ صافی سترون قرار داده شدند. سپس قطعات ضد عفونی شده به تشتک‌های حاوی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (potato dextrose agar: PDA) حاوی اسیدلاکتیک انتقال داده شد و در دمای ۲۴ درجه سلسیوس در داخل انکوباتور نگهداری شدند. سپس از هریک از کلنی‌های قارچی رشد کرده، یک زیر کشت در تشتک‌های جداگانه حاوی محیط کشت PDA تهیه شد. پس از رشد کلنی‌های قارچی کشت‌های تک اسپور انجام و جدایه‌های قارچی خالص تهیه شد و برای مطالعات ریخت‌شناسی و مولکولی استفاده شد.

نور طبیعی قرار گرفت. برای تهیه سوسپانسیون اسپور، جدایه‌های قارچی روی محیط کشت PDA و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس رشد نمودند. جهت مایه‌زنی از گیاهچه‌های جوان سیر یک ماهه، در مرحله ظهور برگ‌های اولیه استفاده شد به این ترتیب که سوسپانسیون اسپور با غلظت تقریبی 10^5 اسپور در میلی‌لیتر با کمک لام هموسایتومتر در آب مقطر سترون با 0.01 توئین 20 تهیه شد و با فشار به سطح گیاهچه‌ها پاشیده شد. گلدان‌ها در شرایط رطوبت 90 درصد و دمای 25 درجه سلسیوس در شرایط گلخانه قرار گرفتند. تمام مراحل بدون سوسپانسیون اسپور و با آب مقطر سترون برای گیاهان کنترل تکرار شد (Köhl et al. 2009; Zheng et al. 2009).

نتایج

علائم و پراکنش بیماری

بیماری زردی سیر در کلیه مزارع شهرستان طارم استان زنجان مشاهده شد (شکل ۱). علائم اولیه بیماری لکه‌های سفید کوچک بود که در اوایل اسفند ماه و همزمان با افزایش رطوبت و دما در منطقه روی برگ‌ها ظاهر شدند، سپس با مناسب شدن شرایط در بهار لکه‌ها گسترش پیدا نموده و به هم متصل و موجب زرد شدن و در نهایت خشکیدگی انتهایی برگ‌ها شدند (شکل ۲). قارچ عامل بیماری از کلیه مزارع سیر شهرستان طارم جداسازی شد که نتایج حاصل بیانگر وسعت پراکنش و همه‌گیری بیماری در سراسر مناطق مورد کشت سیر می‌باشد (شکل ۳).

پایش بیماری به صورت هفتگی و منظم در منطقه نشان داد هر ساله با افزایش رطوبت و بارندگی و گرم شدن هوا در فصل رشد، علائم بیماری در کلیه مزارع منطقه ظاهر و باعث ایجاد عارضه زردی سیر در مزارع می‌شود، که همین امر نشان‌دهنده اهمیت بیماری و شیوع عامل بیمارگر در منطقه می‌باشد.

زنجیره‌ای پلیمرز (PCR: polymerase chain reaction) در حجم 20 میکرولیتر شامل 10 میکرولیتر از مخلوط آماده (master mix) شرکت تکاپوزیست، 2 میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت 10 میکرومولار و 3 میکرولیتر از DNA (100 نانوگرم) قارچ بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت 2 دقیقه در دمای 95 درجه سلسیوس و یک برنامه 35 چرخه‌ای شامل واسرشت‌سازی در دمای 95 درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه، اتصال آغازگرهای ITS1 و ITS4 در دمای 57 درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه، اتصال آغازگرهای gpd1 و gpd2 در دمای 52 درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه و اتصال آغازگرهای CALDF1 و CALDR2 در دمای 58 درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه و مرحله گسترش در دمای 72 درجه سلسیوس به مدت 60 ثانیه بود. پس از آخرین چرخه مخلوط به مدت 7 دقیقه در دمای 72 درجه سلسیوس به منظور گسترش نهایی نگهداری شد. برای اطمینان از درستی انجام واکنش، فراورده‌های واکنش PCR بر روی ژل آگارز (1 درصد) بارگذاری شدند. الکتروفورز با شدت ولتاژ $80 V$ در مدت زمان یک ساعت انجام شد. قطعات تکثیر شده به طول تقریبی 600 ، 700 و 800 نوکلئوتیدی برای تعیین توالی به شرکت Microsynth سوئیس ارسال شدند.

آزمون بیماری‌زایی

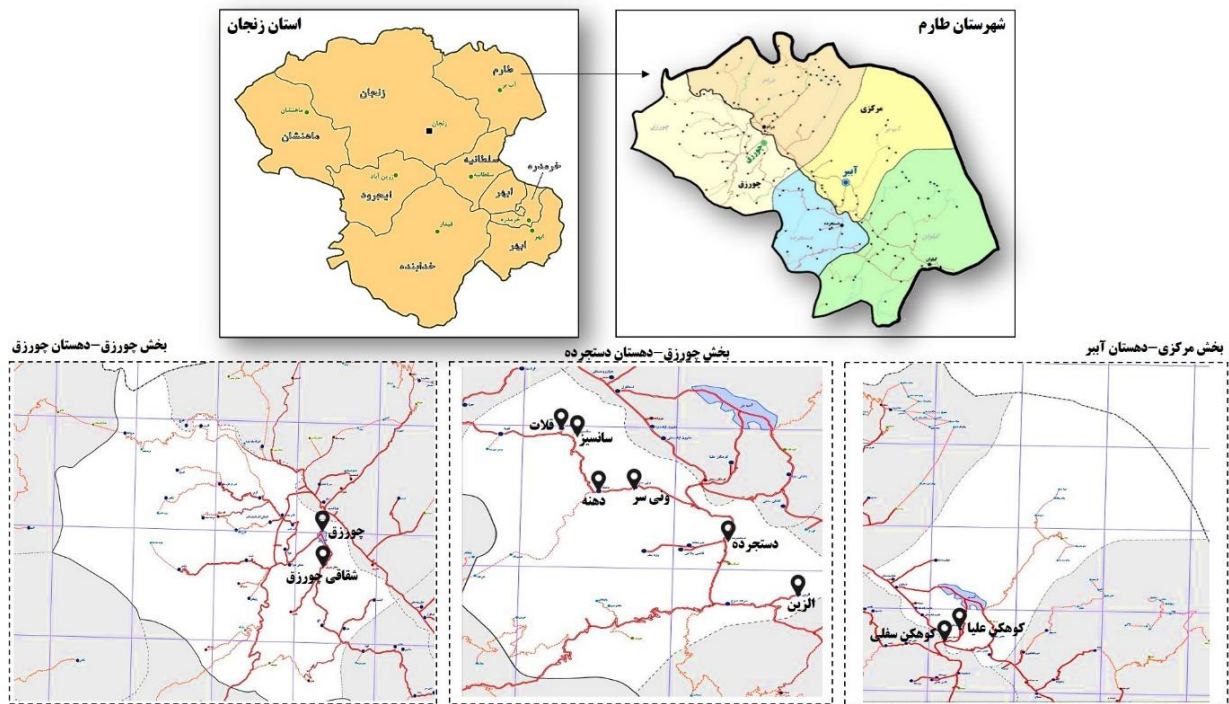
جدایه‌هایی که بر اساس مطالعات ریخت‌شناسی و مولکولی به عنوان عامل بیمارگر عارضه زردی سیر شناسایی شده بودند، برای ارزیابی بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های سیر بررسی شدند. ابتدا سیرها به مدت یک دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم رقیق شده با یک درصد ماده مؤثر ضدعفونی و در گلدان‌هایی با حجم یک لیتر به نسبت (۲:۱) از خاک مزرعه (سترون) و پرلیت و پیت کشت شدند. در هر گلدان دو حبه سیر در عمق یک سانتی‌متری از سطح خاک کشت شد. گلدان‌ها در گلخانه با دامنه دمایی $14-25$ درجه سلسیوس و



شکل ۱- علائم بیماری زردی سیر در مزارع شهرستان طارم استان زنجان
Fig 1. Symptoms of garlic yellowing disease in Tarom County of Zanjan Province



شکل ۲- مراحل پیشرفت علائم بیماری در طی فصل زراعی
Fig 2. Phases of disease progression during the season



شکل ۳- نقشه پراکنش *Stemphylium vesicarium* در شهرستان طارم استان زنجان.

Fig 3. The current distribution map of *Stemphylium vesicarium* in Tarom of Zanjan province.

منشعب با عرض ۷-۵ میکرومتر بودند. کنیدیفورها ساده یا دارای خمیدگی، قهوه‌ای کم‌رنگ، دیواره‌دار، کوتاه تا متوسط با اندازه ۷۳-۱۹ × ۷-۵ میکرومتر بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا در راس متورم به‌رنگ قهوه‌ای تیره به عرض ۶-۸ میکرومتر با تکثیر انتهایی بودند. کنیدیوم‌های بالغ قهوه‌ای تیره، کروی تا مخروطی و یا استوانه‌ای تا مستطیلی در پایه گرد و در راس مخروطی و زاویه‌دار همراه با دیواره می‌باشد. کنیدی‌ها با اندازه ۲۴-۴۵ × ۱۰-۱۹ میکرومتر دارای ۷-۶ دیواره عرضی، ۱-۵ دیواره طولی و ۴-۱ دیواره مورب می‌باشند (شکل ۴).

ترسیم تبارنما برای گونه‌های جنس *Stemphylium*: تبارنمای فیلوژنتیکی آرایه‌های جنس *Stemphylium* با استفاده از داده‌های توالی نواحی ژنی ITS، *gapdh* و *cmdA* ترسیم شد. رج‌بندی چندگانه شامل ۱۵ آرایه داخلی مربوط به جنس *Stemphylium* (۱۰ آرایه از NCBI و ۵ آرایه از این تحقیق) بود (جدول ۲). گونه *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl (جدایه CBS 916.96) به‌عنوان گروه خارجی مورد استفاده قرار گرفت.

شناسایی عامل بیماری

در مدت سه سال زراعی از نمونه‌های برگ‌های دارای علائم، ۱۶۷ جدایه قارچی جداسازی شد که اکثراً بر اساس ویژگی‌های ظاهری کلنی و شکل اولیه اسپور مشابه هم بودند و در نهایت از جدایه‌های با بیشترین فراوانی ۱۰ جدایه به‌طور تصادفی انتخاب و برای مطالعات تخصصی مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس بررسی ویژگی‌های ظاهری کلنی‌ها و ویژگی‌های میکروسکوپی کنیدیوم‌ها و با کمک منابع و کلیدهای در دسترس، جدایه‌ها متعلق به جنس *Stemphylium* sp. شناسایی شدند (Simmons 1969). کلنی‌های جدایه‌های قارچی در سطح پتری و محیط کشت PDA گسترده و به رنگ قهوه‌ای زیتونی تا سیاه و تا حدودی مخملی شکل بودند. کلنی قارچ در محیط کشت PCA پس از ۷ روز رشد حدوداً ۶۲ میلی‌متر به رنگ سبز زیتونی تا قهوه‌ای روشن با مناطق متحدالمرکز کنیدیوم‌زایی بود. کنیدیوم‌زایی بیشتر از هیف‌های سطحی و به‌میزان کمتر از هیف‌های عمقی بود. هیف‌ها قهوه‌ای کم‌رنگ، دیواره‌دار،

فیلوژنتیکی، جدایه‌های این پژوهش تحت عنوان گونه *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E.G. Simmons شناسایی شدند.

آزمون بیماری‌زایی

علائم اولیه بیماری عارضه زردی سیر در طی مدت یک هفته روی گیاهان سیر در گلخانه ظاهر شد. نتایج حاصل نشان داد همه جدایه‌ها طیفی از علائم بیماری شامل لکه‌های سفید را در سطح برگ نشان داد که با مرور زمان لکه‌ها به هم متصل و باعث خشکیدگی انتهای برگ شدند (شکل ۶). برگ‌های مایه‌زنی شده دارای علائم جهت تایید بیمارگری جدایه‌های مایه‌زنی شده به آزمایشگاه منتقل شد و قارچ *S. vesicarium* دوباره جداسازی شد که تأییدی بر بیمارگر بودن این گونه قارچی در سیر بود. هیچ کدام از گیاهان کنترل که با شرایط کاملاً مشابه و بدوم سوسپانسیون اسپور مایه‌زنی شده بودند علائمی نشان ندادند.

ماتریس رج‌بندی نهایی شامل ۱۷۷۵ کاراکتر شامل شکاف‌های رج‌بندی (gap) بود و مرز ژن‌ها به ترتیب ۱-۵۱۴ کاراکتر برای ITS، ۵۱۵-۱۰۸۲ کاراکتر برای *gapdh* و ۱۰۸۳-۱۷۷۵ کاراکتر برای *cmdA* بود. با توجه به نتایج نرم‌افزار تست مدل، مدل GTR+I+G با نرخ توزیع گامای معکوس برای هر سه ناحیه ژنی استفاده شدند. هر سه ناحیه ژنی فراوانی *dirichlet base* داشتند. از بین ۱۷۷۵ کاراکتری که برای استنتاج بیزیان استفاده شد، ۳۲۷ الگوی مکانی منحصر به فرد وجود داشت که به ترتیب ۶۰، ۱۲۰ و ۱۴۷ نوکلئوتید مربوط به نواحی ژنی ITS، *gapdh* و *cmdA* بود. تجزیه و تحلیل بیزیان منتهی به ۹۷۵۰۰۰ نسل و ۱۹۵۲ تبارنما شد. بعد از حذف ۲۵ درصد اولیه تبارنماهای جمع‌آوری شده برای مرحله burn-in، تبارنمای برآیند و توزیع احتمال پسین خوشه‌ها از ۱۴۶۴ تبارنمای باقی‌مانده محاسبه شد (شکل ۴). بر اساس نتایج حاصل از مطالعات ریخت‌شناسی و ترسیم تبارنمای

جدول ۲- آرایه‌های استفاده شده در ترسیم تبارنما و راس شمارهای بانک ژن آن‌ها (توالی‌های این تحقیق به صورت پررنگ نمایش داده شده‌اند).

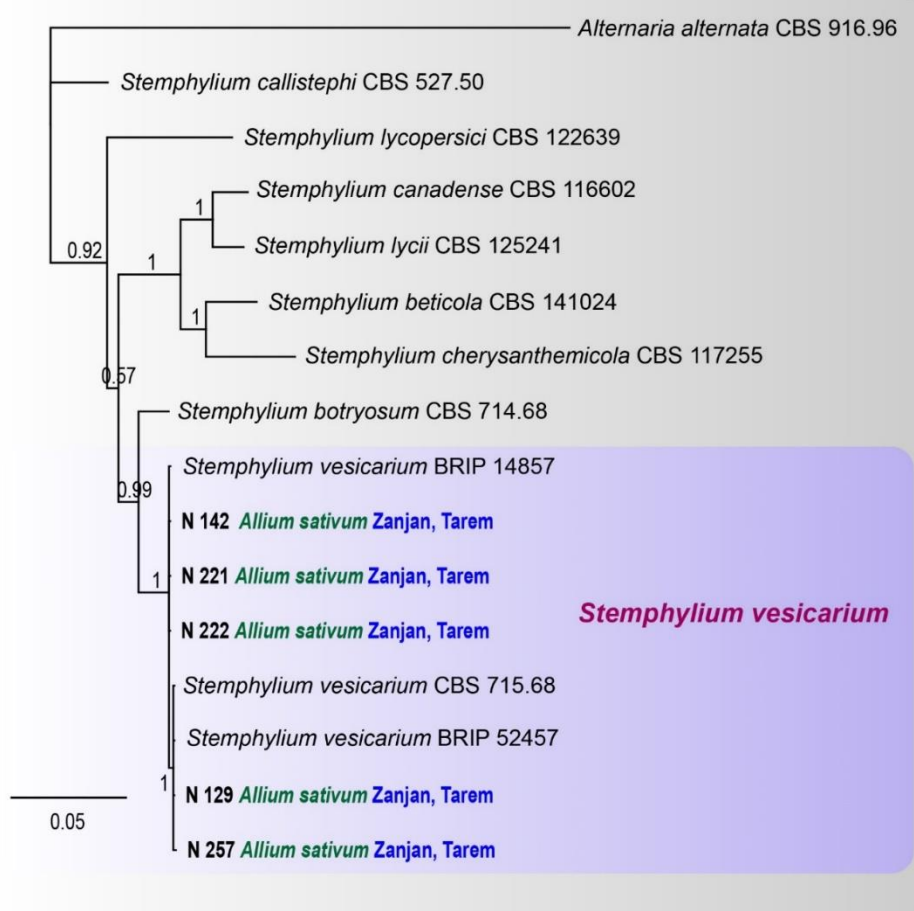
Table 2. Taxa used in the phylogenetic analysis and Genbank accession numbers (the newly generated sequences are highlighted in black bold).

Taxa	Isolate	GeneBank accession numbers			References
		ITS	<i>gapdh</i>	<i>cmdA</i>	
<i>Alternaria alternata</i>	CBS 916.96	AF347031	AY278808	-	Woudenberg <i>et al.</i> 2013
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 122639	KU850611	KU850756	KU850902	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
<i>S. callistephi</i>	CBS 527.50	KU850539	KU850686	KU850828	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
<i>S. canadense</i>	CBS 116602	KU850641	KU850782	KU850932	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
<i>S. chrysanthemicola</i>	CBS 117255	KU850640	KU850781	KU850931	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
<i>S. beticola</i>	CBS 141024	KU850520	KU850667	KU850808	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
<i>S. botryosum</i>	CBS 714.68	KC584238	AF443881	KU850826	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
<i>S. lycii</i>	CBS 125241	KU850602	KU850748	KU850893	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
<i>S. vesicarium</i>	CBS 715.68	KU850565	KU850712	KU850855	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
	BRIP 14857	MK336816	MK336862	MK336839	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
	BRIP 52457	MK336824	MK336870	MK336847	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
	N129	OR802144	OR830248	OR830243	This study
	N142	OR802145	OR830249	OR830244	This study
	N221	OR802146	OR830250	OR830245	This study
	N222	OR802147	OR830251	OR830246	This study
	N257	OR802148	OR830252	OR830247	This study



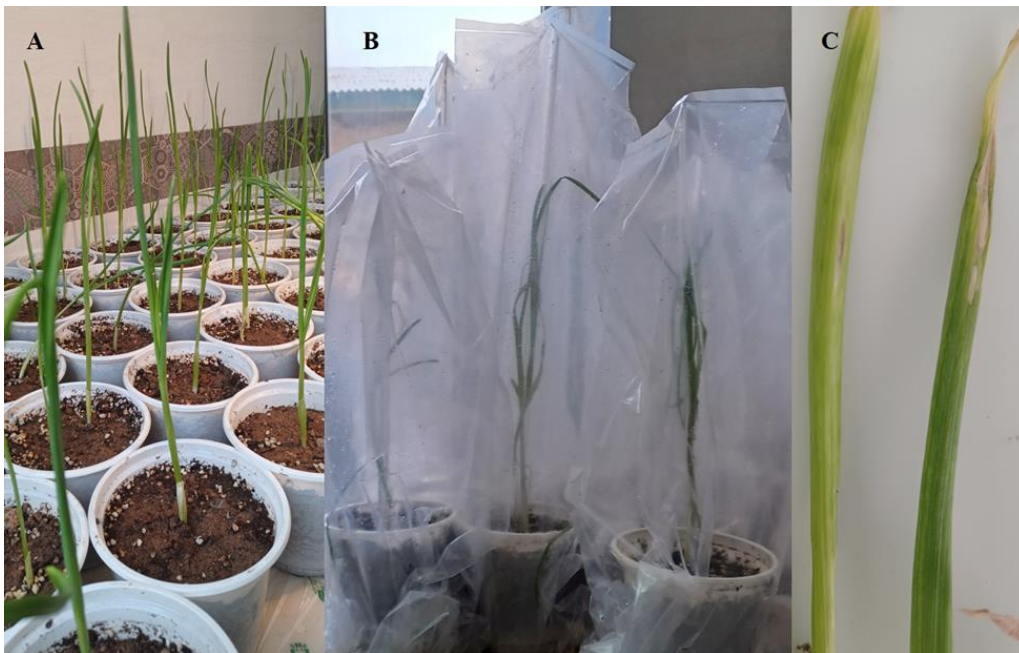
شکل ۴- *Stemphylium vesicarium* - A پرگنه در محیط کشت MEA، B-F کنیدیوم برها و کنیدیوم‌ها، (مقیاس برابر با ۱۰ میکرومتر).

Fig 4. *Stemphylium vesicarium* : A. colony on MEA, B-F. conidiophores and conidia, (Bars = 10 μ m).



شکل ۵- تبارنمای فیلوژنتیکی رسم شده بر مبنای آنالیز بی‌زیان برای آرایه‌های جنس *Stemphylium* با استفاده از نواحی ژنی ITS، *gapdh* و *cmdA*.

Fig 5. Phylogenetic tree inferred by Bayesian analysis of the combined three-locus (ITS, *gapdh* and *cmdA*) for *Stemphylium* species.



شکل ۶- A گیاهچه‌های سالم سیر قبل از مایه‌زنی. B گیاهچه‌های سیر بعد از مایه‌زنی. C علائم اولیه بیماری ناشی از *S. vesicarium* گیاه سیر هفت روز پس از مایه‌زنی

Fig 6. A, garlic seedlings before inoculation. B, garlic seedlings after inoculation. C, leaf blight symptoms on inoculated by *A. sativum* under greenhouse conditions seven days after inoculation.

گونه عامل بلایت برگ‌گی سیر ناشی از *Stemphylium* spp. به‌نظر می‌رسد در مناطق مختلف متفاوت می‌باشد مثلاً در اسپانیا و استرالیا، گونه *S. vesicarium* و در چین گونه *S. solani* گزارش شده است (Basallote Ureba & Prados Ligerero 2004; Zheng *et al.* 2008). آرایه‌بندی جنس *Stemphylium* پیچیده می‌باشد و طبقه‌بندی و شناسایی گونه‌های این جنس بر اساس ترکیب روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی انجام می‌شود (Simmons 1969; Inderbitzin *et al.* 2009)، به‌همین منظور شناسایی دقیق گونه بیمارگر با بررسی مطالعات گذشته و با کمک کلیدهای شناسایی جنس و توالی‌یابی ناحیه ITS از DNA ریبوزومی، بخشی از نواحی ژنی گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز و کالمودولین انجام شده است (Graf *et al.* 2016; Brahmanage *et al.* 2019; Vaghefi *et al.* 2020). نتایج این تحقیق نشان داد که قارچ مهم عامل ایجاد بیماری زردی سیر در منطقه طارم استان زنجان گونه *S. vesicarium* می‌باشد. نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج به‌دست آمده از سایر تحقیق‌ها مانند نتایج به‌دست آمده از

بحث

وقوع لکه برگ‌گی‌های سیر باعث کاهش ۷۰ درصد محصول سیر می‌شود و جز بیماری‌های مهم در کاهش عملکرد سیر در دنیا می‌باشد (Zheng *et al.* 2010). مطالعاتی که در دنیا روی بیماری بلایت برگ‌گی سیر انجام شده است نشان داده بیمارگرهای *S. botryosum* و *S. vesicarium* (Boiteux *et al.* 1994)، *Alternaria porri* (Suheri & Price 2000a) و *Cladosporium echinulatum* (Pal & Basuchaudhary 1976) می‌توانند موجب ایجاد لکه برگ‌گی در گیاه سیر شوند. بلایت برگ‌گی سیر ناشی از *Stemphylium* spp. یکی از مهمترین بیماری‌های سیر در مزارع کشت سیر می‌باشد (Zheng *et al.* 2008). بلایت برگ‌گی پیاز ناشی از *Stemphylium* spp. برای اولین بار از هند (Raghavendra Rao & Pavgi 1975)، سپس از کشورهای آفریقای جنوبی (Aveling *et al.* 1993)، اسپانیا (Basallote *et al.* 1993)، استرالیا (Suheri & Price 2000b)، ترکیه (Polat *et al.* 2012)، چین (Zheng *et al.* 2008) و مصر (Hassan *et al.* 2007) گزارش شده است.

که ۴.۵ تا ۱۰.۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی بستگی دارد. آسکوسپورها هم‌زمان با بلوغ سودوتسیوم‌ها و در شرایطی که رطوبت هوا بالا و یا همراه بارندگی باشد آزاد شده و منجر به شروع آلودگی می‌شود (Prados-Ligero *et al.* 1998). مشاهدات میدانی این مطالعه نشان داد که توسعه و شدت همه‌گیری این بیماری در منطقه طارم تحت تأثیر زیاد شرایط محیطی می‌باشد و افزایش دمای هوا و بارندگی در زمستان موجب گسترش بیشتر این بیماری و خسارت شدید آن به محصول می‌شود. مطالعه اپیدمیولوژی *S. vesicarium* در مناطق کشت سیر برای توسعه روش‌های مدیریتی صحیح و کارآمد و مناسب شرایط آب و هوایی منطقه به‌منظور کاهش اثرات مخرب بیماری بسیار مهم می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از سازمان جهاد کشاورزی استان زنجان و مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان برای پشتیبانی مالی و تدارکاتی انجام شده در اجرای پروژه تصویب شده ۰۰۰۰۴۰-۰۰۰۶-۱۶-۴۷-۲ سپاس‌گزاری می‌شود.

References

- ABYANEH, H. Z., M. B. VARKESHI, A. GHASEMI, S. MAROFI, and R. A. CHAYJAN, 2011. Determination of water requirement, single and dual crop coefficient of garlic (*Allium sativum*) in the cold semi-arid climate. Australian Journal of Crop Science, 5(8): 1050-1054.
- AGRIOS, G. N, 2005. Plant pathology: Elsevier 922 pp.
- ANONYMOUS. 2021. Agricultural Production Report. The Iranian Ministry of Agriculture, Tehran, Iran.
- ANSARY, J., T. Y. FORBES-HERNANDEZ, E. GIL, D. CIANCIOSI, J. ZHANG, M. ELEXPURU-ZABALETA, J. SIMAL-GANDARA, F. GIAMPIERI, and M. BATTINO, 2020. Potential health benefit of garlic based on human intervention studies: A brief overview. Antioxidants, 9(7): 619 .DOI :10.3390/antiox9070619

مطالعه‌ای که اخیراً روی بیماری بلایت برگ‌ی سیر در استان اردبیل انجام شد، مشابه بود (Sharifi *et al.* 2021). علائمی که قارچ *S. vesicarium* در سیرهای منطقه طارم داشت بسیار شدید و متفاوت از علائمی بود که در مقالات مشابه اشاره شده بود که می‌توان دلیل این اتفاق را شرایط آب و هوایی مناسب و کشت پاییزه سیر در منطقه دانست که منجر به گسترش سریع و همه‌گیری بیماری در منطقه شده است. آلودگی بوته‌ها با اسپوره‌های قارچ و کلونیزاسیون برگ‌ها توسط این قارچ در شرایط مناسب محیطی شامل دما و رطوبت مناسب رشد قارچ، موجب زردی و سپس نکروز گسترده در برگ‌ها، خشکی زودرس گیاه و نهایتاً منجر به کاهش قابل توجه عملکرد محصول شد.

سودوتسیوم قارچ در مرحله تلومورف و درون بقایای گیاهی آلوده تشکیل می‌شود که منبع اینوکولوم اولیه بیماری برای شروع همه‌گیری می‌باشد (Prados-Ligero *et al.* 1998; Basallote-Ureba *et al.* 1999). زمان لازم برای بلوغ سودوتسیوم‌ها بسته به شرایط آب و هوایی بین ۱-۴ ماه متفاوت می‌باشد که این دوره به بارندگی تجمعی، دمای هوای مناسب

- AVELING, T., H. SNYMAN, and S. NAUDE, 1993. Evaluation of seed treatments for reducing *Alternaria porri* and *Stemphylium vesicarium* on onion seed. Plant disease, 77(10): 1009-101. DOI : 10.1094/PD-77-1009
- BASALLOTE-UREBA, M., A. PRADOS-LIGERO, and J. MELERO-VARA, 1999. Aetiology of leaf spot of garlic and onion caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. Plant Pathology, 48(1): 139-145. DOI:10.1046/j.1365-3059.1999.00313.x.
- BASALLOTE, M., A. PRADOS, A. PEREZ DE ALGABA, and J. MELERO-VARA, 1993. First report in Spain of two leaf spots of garlic caused by *Stemphylium vesicarium*. Plant Disease, 77(9). DOI : 10.1094/PD77-0952A

- BASALLOTE-UREBA, M., A. PRADOS-LIGERO, 2004. The garlic leaf spots caused by *Stemphylium vesicarium* in Andalusia [Spain]. Agricultura. Serie Sanidad Vegetal-Junta de Andalucía (Spain). 70 pp.
- BERBEE, M., M. PIRSEYEDI, and S. HUBBARD, 1999. Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. Mycologia, 91(6): 964-977.
DOI :10.1080/00275514.1999.12061106.
- BOITEUX, I., M. LIMA, J. M. SOBRINHO, and C. LOPES, 1994. A garlic (*Allium sativum*) leaf blight caused by *Stemphylium vesicarium* in Brazil. *Plant Pathology*, 43(2): 412-414.
DOI :10.1111/j.1365-3059.1994.tb02704.x
- BRAHMANAGE, R.S., D.N. WANASINGHE, M.C. DAYARATHNE, R., JEEWON, J. YAN, T.S. BULGAKOV, E. CAMPORESI, P. KAKUMYAN, K. D. HYDE, and X. LI, 2019. Morphology and phylogeny reveal *Stemphylium dianthi* sp. nov. and new host records for the sexual morphs of *S. beticola*, *S. gracilariae*, *S. simmonsii* and *S. vesicarium* from Italy and Russia. *Phytotaxa*, 411(4): 243–263.
DOI : 10.11646/phytotaxa.411.4.1.
- BREWSTER, J. 1994. Weed competition and bulb yield of garlic. *Onion and Other Vegetable Alliums*, 3: 406.
- BREWSTER, J. L. 2008. Onions and other vegetable alliums: CABI .Crop Production Science in Horticulture, 15.
- CHRETIEN, P.L., C.E. MORRIS, M. DUFFAUD and C. LEYRONAS, 2021. Aetiology of garlic rot, an emerging disease in France. *Plant Pathology*, 70(6): 1276-1291. DOI : 10.1111/ppa.13394
DOI :10.1080/14620316.1996.11515380
- DIRIBA-SHIFERAW, G. 2016. Review of management strategies of constraints in garlic (*Allium sativum* L.) production .*Journal of Agricultural Sciences- Sri Lanka*, 11(3): 186-207.
- FAO. 2021. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Available in: <http://faostat.fao.org/country/profiles/>.
- GALVEZ, L., J., GIL-SERNA M., I GARCIA, C., GLESIAS, and D. PALMERO, 2016. *Stemphylium* leaf blight of garlic (*Allium sativum*) in Spain: taxonomy and in vitro fungicide response. *The Plant Pathology Journal*, 32(5): 388.
- GRAF, S., H., BOHLEN-JANSSEN, S. MIESSNER, A. WICHURA, and G. STAMMLER, 2016. Differentiation of *Stemphylium vesicarium* from *Stemphylium botryosum* as causal agent of the purple spot disease on asparagus in Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 144: 411-418.
DOI : 10.1007/s10658-015-0777-6
- HASSAN, M., A. ALLAM, K. ABO-ELYOUSR, and M. HUSSEIN ,2007. First report of *Stemphylium* leaf blight of onion caused by *Stemphylium vesicarium* in Egypt. *Plant Pathology*, 56(4): 724-724.
Doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01596.x.
- INDERBITZIN, P., Y. R. MEHTA, and M. L. BERBEE, 2009. *Pleospora* species with *Stemphylium* anamorphs: a four locus phylogeny resolves new lineages yet does not distinguish among species in the *Pleospora* herbarum clade. *Mycologia*, 101(3): 329-339.
Doi:10.3852/08-071
- KAMENETSKY, R., and H. D. RABINOWITCH, 2001. Floral development in bolting garlic. *Sexual plant reproduction*, 13: 235-241.
Doi:10.1007/s004970000061.
- KOHL, J., B. GROENENBOOM-DE HAAS, H. GOOSSEN-VAN DE GEIJN, A. SPEKSNIJDER, P. KASTELEIN, S. DE HOOG and B. GERRITS VAN DEN ENDE, 2009. Pathogenicity of *Stemphylium vesicarium* from different hosts causing brown spot in pear. *European Journal of Plant Pathology* 124: 151- 162.
Doi:10.1007/s10658-008-9402-2.
- LAWRENCE, D. P., P. B. GANNIBAL, T. L. PEEVER, and B. M. PRYOR, 2013. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. *Mycologia*, 105(3): 530-546. Doi:10.3852/12-249
- MENGESHA, W., A. TESFAYE, and M. Djene, 2016. Evaluation of fungicides on the control of garlic rust (*Puccinia allii*) in Eastern Ethiopia. *International*

- Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering, 6(1): 27-33.
- NOVAES, R., J. RODRIGUES, and M. LOVATO, 2009. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. *Genetics and Molecular Research*, 8(1): 86-96.
- NUSKIYA, F. 2019. Up-country vegetable production and marketing: challenges and opportunities .SEUSL *Journal of Marketing*, Vol. 4, No.2, 2019.
- OMIDBAIGI, R. 2010. Approaches for Production and Processing of Medicinal Plants. Vol. 4. Behnashr Publication, Iran 424 pp. (in Farsi)
- PAL, A. K., and K. BASUCHAUDHARY, 1976. new leaf blight of garlic caused by *Cladosporium echinulatum* (Berk) de Vries, from Varanasi, Uttar Pradesh. *Current Science*.
- POLAT, Z., G. BESIRLI, I. SONMEZ, and B. YAVUZ, 2012. First report of *Stemphylium* leaf blight of garlic (*Allium sativum*) caused by *Stemphylium vesicarium* in Turkey. *New Disease Reports*, 25: 29. Doi:10.5197/j.2044-0588.2012.025.029.
- PRADOS-LIGERO, A., J. GONZALEZ-ANDUJAR, J. MELERO-VARA, and M. BASALLOTE-UREBA, 1998. Development of *Pleospora allii* on garlic debris infected by *Stemphylium vesicarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 861-870 Doi:10.1023/A:1008619604684
- RAGHAVENDRA RAO, N., and M. PAVGI, 1975. *Stemphylium* leaf blight of onion. *Mycopathologia*, 56(2): 113-118. Doi: 10.1007/BF00472582
- SCHUBERT, K., J. GROENEWALD, U. BRAUN, J. DIJKSTERHUIS, M. STARINK, C. HILL, P. ZALAR, G. DE HOOG, and P. CROUS, 2007. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology*, 58: 105-156. Doi: 10.3114/sim.2007.58.05
- SHARIFI, K., S. SHEIKHI, and E. MAGAMI, 2021. First report of garlic leaf blight caused by *Stemphylium vesicarium* in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 103(3): 1007-1007.
- SIMMONS, E. G. 1969. Perfect states of *Stemphylium*. *Mycologia*, 61(1): 1-26.
- SUHERI, H., and T. PRICE, 2000a. Infection of onion leaves by *Alternaria porri* and *Stemphylium vesicarium* and disease development in controlled environments. *Plant pathology*, 49(3): 375-382. Doi: 10.1071/AP00034
- SUHERI, H., and T. PRICE, 2000b. *Stemphylium* leaf blight of garlic (*Allium sativum*) in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 29: 192-199.
- TABOR, G., and A. ZELEKE, 2000. Achievements in shallot and garlic research. *EARO Research Report (Ethiopia)*, No.36.
- VAGHEFI, N., S. M. THOMPSON, R. B. KIMBER, G. J. THOMAS, P. KANT, M. J. BARBETII, and J. A. VAN LEUR, 2020. Multi-locus phylogeny and pathogenicity of *Stemphylium* species associated with legumes in Australia. *Mycological Progress*, 19: 381-396. Doi:10.1007/s11557-020-01566-8
- WHITE, T.J., T. BRUNS, S. LEE, and J. TAYLOR, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1): 315- 322.
- WOUDEBERG J.H.C., J.Z. GROENEWALD M. BINDER and P.W. CROUS, 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75(1): 171-212.
- WOUDEBERG J.H.C., B. HANSE, G.C.M. Van LEEUWEN , J.Z. GROENEWALD and P.W. CROUS, 2017. *Stemphylium revisited*. *Studies in Mycology*, 87(1): 77-103.
- ZERAY, S. and Y. MOHAMMED, 2013. Searching and evaluating of cost effective management options of garlic white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) in Tigray, northern Ethiopia. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 4(7).
- ZHENG, L., J. HUANG, and T. HSIANG, 2008. First report of leaf blight of garlic (*Allium sativum*) caused by

- Stemphylium solani in China .Plant Pathology, 57(2): 380. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01724.x.
- ZHENG, L., T. HSIANG, and J. HUANG, 2009. Host range and phytotoxicity of *Stemphylium solani*, causing leaf blight of garlic (*Allium sativum*) in China. *European Journal of Plant Pathology*, 124: 21-30. Doi:10.1007/s10658-008-9387-x
- ZHENG, L., J., HUANG, D., JIANG, X., LIU, and T. HSIANG, 2010. Integrated control of garlic leaf blight caused by *Stemphylium solani* in China. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32 (2): 135- 145. Doi: 10.1080/0706066102010.484233