شناسایی عوامل قارچی همراه با بیماری لکه برگی درختان صنوبر(*Populus* spp.) در استان آذربایجان‌شرقی و بخشی از استان‌های آذربایجان غربی و اردبیل

اسدالله بابای اهری [1*]، روژین گل‌محمدی[2] و مهدی ارزنلو[1]

۱- به ترتیب استاد و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

*مسئول مکاتبه: ababaeahari@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۲۲

چکیده

بیماری‌های لکه برگی جزو بیماری‌های مهم اندام‌های هوایی درختان صنوبر به شمار می‌روند که باعث ایجاد خسارت اقتصادی در این میزبان می‌شوند. گونه‌های متعلق به جنس‌های *Septoria* و *Marssonina* از عمده قارچ هائی هستند که در ایجاد این بیماری ها نقش دارند. در استان آذربایجان‌شرقی علی رغم خسارت قابل توجهی که لکه برگی‌ها به درختان صنوبر وارد می‌سازند عوامل قارچی دخیل در ایجاد این بیماری ها هنوز ناشناخته باقی مانده‌اند. پژوهش حاضر با هدف شناسایی و بررسی بیماری‌زایی قارچ‌های همراه با بیماری لکه برگی درختان صنوبر در استان آذربایجان‌شرقی و بخشی از استان های آذربایجان‌غربی و اردبیل انجام پذیرفت. در این تحقیق ۱۳٤ جدایه قارچی از ۲۲۰ نمونه دارای علائم لکه برگی جداسازی، خالص‌سازی و مورد مطالعه قرار گرفتند. بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی گونه‌های *Septoria populi*، *Bipolaris spicifera*، *B. sorokinia*، *Exserohilum cf. protrudens*، *Stemphylium* sp.، *Sporormiella minimoides*، *Nigrospora oryzae*، *Epicocum nigrum*، *Marssonina castagnei* و *Arthrinium sacchari* به عنوان گونه‌های قارچی همراه با بیماری لکه برگی درختان صنوبر در مناطق مورد بررسی شناسایی شدند. در این بین گونه *Se. populi* با فراوانی ۸۸٪ به عنوان گونه غالب معرفی گردید. آزمون بیماریزایی به روش برگ بریده برای جدایه‌های فوق انجام پذیرفت و گونه های *Se. populi*، *B. spicifera*، *B. sorokiniana*، *Stemphylium* sp.، *N. oryzae*، *Ep.nigrum*، *M. castagnei* و *A. sacchari* علائم بیماری را در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند. این نخستین گزارش از بیماری‌زایی گونه‌های *A. sacchari*، *Sp. minimoides* و *Ex.cf protrudens* بر روی صنوبر است.

واژه‌های کلیدی: صنوبر، بیماری لکه‌برگی، استان آذربایجان‌شرقی.

مقدمه

انواع درختان متعلق به جنس صنوبر (*Populous* L.) به خانواده بید (Salicaceae) تعلق دارند. این خانواده دارای دو جنس *Salix* L. و *Populus* می‌باشد. در ایران تحقیق و پژوهش در زمینه صنوبر به سال ۱۳۳٤ همزمان با عضویت ایران در کمیسیون بین‌المللی صنوبر آغاز شد و مطالعاتی در خصوص انتخاب کلون و دورگ‌گیری، پیوند، اصلاح ژنتیکی، شناخت و کنترل آفات و بیماری‌ها و روش‌های بهره‌برداری سرلوحه تحقیقات قرار گرفت (حمزه‌پور و همکاران ۱۳۸۵).

امروزه در ایران کشت چهارگونه صنوبر شامل تبریزی (*P. s nigra* L.)، سپیدار (*P. alba* L.) سفید

پلت *P. caspica* (Bronm) و پده (*P. euphratica* Olivier) رایج می‌باشد. با این حال گونه‌های متعدد دیگری از صنوبرهای غیربومی مانند *P. deltoids* Bartram ex Marshall و دورگ *P. xeuramericana* در سطح وسیعی از شمال کشور کشت و تولید می‌گردد (باب مراد و همکاران ۱۳۸۳).

متاسفانه انواع صنوبرها مستعد ابتلا به انواع بیماری‌ها و تنش‌های فیزیولوژیکی هستند. انواع ریز سازواره‌ها و بسیاری موارد دیگر قادرند بیماری‌های مختلف در ریشه، تنه و شاخسار و برگ‌های آنها ایجاد نمایند که از مهمترین آن‌ها می‌توان به زنگ، شانکر تنه، پوسیدگی ریشه و لکه برگی‌ها اشاره کرد (سلرینو، ۱۹۹۹). لکه برگی‌ها باعث کاهش فتوسنتز و رشد درخت گردیده و حتی ممکن است موجبات مرگ را نیز فراهم آورند (ماکسول و همکاران ۱۹۹۷)، بطوری که کاهش بیوماس تا حد ٦٣٪ در اثر بیماری‌های لکه برگی برای کلون‌های هیبرید با حساسیت زیاد نیز گزارش شده است (کردوکرد ۱۳۸۹). از لکه برگی‌های بسیار مهم که از عوامل محدود کننده‌ی تولید انواع صنوبر نیز شناخته شده‌اند، می‌توان به لکه برگی و شانکر سپتوریایی، آنتراکنوز، اسکب و بلایت برگی اشاره کرد.

لکه برگی و شانکر سپتوریایی که توسط *Se. musiva* peck با تلئومورف *Mycosphaerella populorum* Thomps ایجاد می شود، تاکنون از مناطق مختلف جهان مانند کانادا (لانگ و همکاران ۱۹۸٦)، ایالات متحده آمریکا (لولی و مکانا ۱۹۸۹) گزارش شده است. گونه‌های دیگر از جنس *Septoria* مانند گونه *Se. populicola* Peck با تلئومورف *M. populicola* Thomps از اکثر کشورهای اروپایی، آسیایی و آمریکایی گزارش شده است.

بالاخره گونه *Se. populi* با تلئومورف Schrot *M. populi* (Auersw) که از آمریکا و اروپا بویژه فرانسه و روسیه گزارش شده و در آسیا بصورت نامنظم در ترکیه و ایران مشاهده گردیده است (سلرینو ۱۹۹۹). گونه اخیر در ایران از خوزستان، ارومیه و اردبیل گزارش شده است (ارشاد ۱۳۸۸). بیماری آنتراکنوز صنوبر توسط گونه‌های متعلق به جنس *Marssonina* ایجاد می‌شود. پنج گونه *M.* شامل *M. balsami ferae* Hirats، *M. populi* (Lib.) Magnus، *M. brunnea* (Ellis andEverh.) Magnus، *M. castagnei* (Desm.And Mant) Magnus و *M. populina* (Schnab) magnus قادر به آلوده کردن درختان صنوبر می‌باشند. نشانه‌های آلودگی بصورت زخم‌های نکروتیک روی پهنک برگ و پیری و ریزش قبل از موعد آنها تظاهر می‌کند (اریکسون و همکاران، ۲۰۰۳). اسکب و بلایت برگی صنوبرتوسط گونه‌های جنس *Pollaccina* Bald and cif مانند گونه *P. elegans* Labor، *P. populi* Morelet، *P. radiosa* Morelet، *P. borealis* Funk و *P. mandshurica* Morelet در مناطق مختلف دنیا ایجاد می‌شود. نشانه‌های آلودگی هر چند بسته به گونه‌ی قارچی متفاوت است ولی در کل بصورت لکه‌های قهوه‌ای روشن با حاشیه نامنظم در طول رگبرگها (*P. elegans*) و یا گرد و نامنظم به رنگ زیتونی تا قهوه‌ای با حاشیه تیره‌تر (*P. radiosa* , *P. populi*) تظاهر می‌کنند (سلرینو ۱۹۹۹). از دیگر بیماری های لکه برگی صنوبر که از درجه‌ی اهمیت کمتری برخوردار هستند، می توان به لکه برگی کلادوسپوریومی با عامل *Cladosporium subsesside* Ellis and Barthol، لکه برگی سرکوسپورایی با عامل *Cercospora populina* Fresen و بلاچ سپتوتینیائی با عامل *Septotinia populiperda* Waterman and Cash اشاره کرد (تارپ ۱۹۱۷واترمن کش ۱۹۵۰،ساتون ۱۹۷۰).

در ایران تحقیقات و بررسی های نسبتا محدودتری در مورد شناسائی عوامل لکه برگی درختان صنوبر انجام پذیرفته بطوریکه گونه های *Se. candia* ، *Se. davatchi* و *Se. populi* از جنس *Septoria* و گونه

M. castagni از جنس *Marssonina* گزارش گردیده است (ارشاد ۱۳۸۸)

در این تحقیق تلاش گردید عوامل قارچی مولد لکه برگی درختان صنوبر در استان آذربایجان‌شرقی، بخشی از استان آذربایجان‌غربی (خوی و بوکان) و شهرستان مشکین شهر از استان اردبیل جداسازی شده و با استفاده از مشخصات ریخت شناختی مورد شناسایی قرار گیرند و بعد از محاسبه فراوانی هر کدام از گونه های قارچی، بیماریزا بودن آن ها با اجرای اصول کخ ارزیابی گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری طی بازدیدهایی که از اطراف باغات و صنوبر کاری های شهرستان‌های مختلف آذربایجان‌شرقی و شهرستان خوی و بوکان واقع در آذربایجان‌غربی و نیز اطراف مشکین شهر از استان اردبیل طی مرداد و شهریورماه سال ۱۳۹۲ انجام پذیرفت و طی آن برگهای مشکوک به آلودگی‌های قارچی بصورت تصادفی از صنوبرکاری‌ها و صنوبرهای کاشته شده در اطراف باغات جمع‌آوری و ضمن درج تاریخ، محل جمع‌آوری و کدگذاری، نمونه‌ها درون پاکت‌های کاغذی جداگانه به آزمایشگاه قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی تبریز منتقل گردیدند.

جداسازی و خالص‌سازی عوامل قارچی

بلافاصله بعد از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، بخش‌های آلوده برگها در زیر بینوکلر بررسی شده و در صورتیکه علائم با اسپورهای قارچی همراه بود جداسازی و خالص‌سازی به روش تک اسپور انجام پذیرفت. برگ‌های مشکوک به آلودگی و فاقد اسپور ابتدا به صورت ٤-٣ دقیقه با آب آبیاری شسته شدند و سپس قطعات کوچک از بافت حد فاصل بخش آلوده و سالم تهیه و بعد از ضدعفونی به مدت ۲۰ ثانیه با اتانول ۷۰٪ و دوبار شستشو با آب مقطر استریل، بر روی کاغذ صافی استریل آب‌گیری و به محیط کشت PDA[1] منتقل شدند. بعد از رشد پرگنه ها و آغاز اسپورزایی، خالص‌سازی به روش تک اسپور انجام پذیرفت. در مرحله‌ی آخر جدایه‌های قارچی خالص‌سازی شده درون لوله‌های استریل دو میلی‌لیتری حاوی محیط کشت[1] در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد همچنین گلیسرول ۵۰٪ در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شناسایی جدایه‌ها بر اساس صفات ریخت‌شناختی

به منظور شناسایی جدایه‌ها در سطح جنس، بر اساس گروه قارچی از محیط‌های کشت و شرایط ویژه نگهداری کشت‌های تهیه شده، برای شناسایی هویت آنها استفاده شد. در این پژوهش جهت توصیف و شناسایی جدایه‌های قارچی بسته به جنس و گونه‌ی قارچ، شرایط پیشنهاد شده توسط ورکلی و همکاران (۲۰۱۳)، کراوس و خرونوالد (۲۰۱۳) ونگ و همکاران (۲۰۱۰)، احمد و کین (۱۹۷۱)، کاستاندا و همکاران (۱۹۹۵)، اسپیرس (۱۹۸۹)، عباس و همکاران (۲۰۱۳)، ارنبرگ (۱۸۱۸) و احمدپور و همکاران (۱۳۹۰) به همراه بررسی مشخصات ریخت‌شناختی ماکروسکوپیک پرگنه ها و مشخصات میکروسکوپیک کنیدفورها و کنیدی‌ها مورد استفاده قرار گرفت. قطر پرگنه درسه پتری اندازه‌گیری و نتیجه بصورت میانگین بیان شد، برای تعیین ابعاد ساختارهای میکروسکوپی، از هر ساختار قارچی تعداد ۳۰ مورد اندازه‌گیری شد.

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماریزایی جدایه‌های قارچی تهیه شده از لکه برگی‌ها از روش برگ بریده و با استفاده از روش آریانو و همکاران (۲۰۰۱) با اندکی تغییرانجام گرفت. برای این منظور برگ‌های جوان و سالم از درختان رقم نیگرا جمع‌آوری و بعد از ضدعفونی سطحی با اتانول

[1]PDA

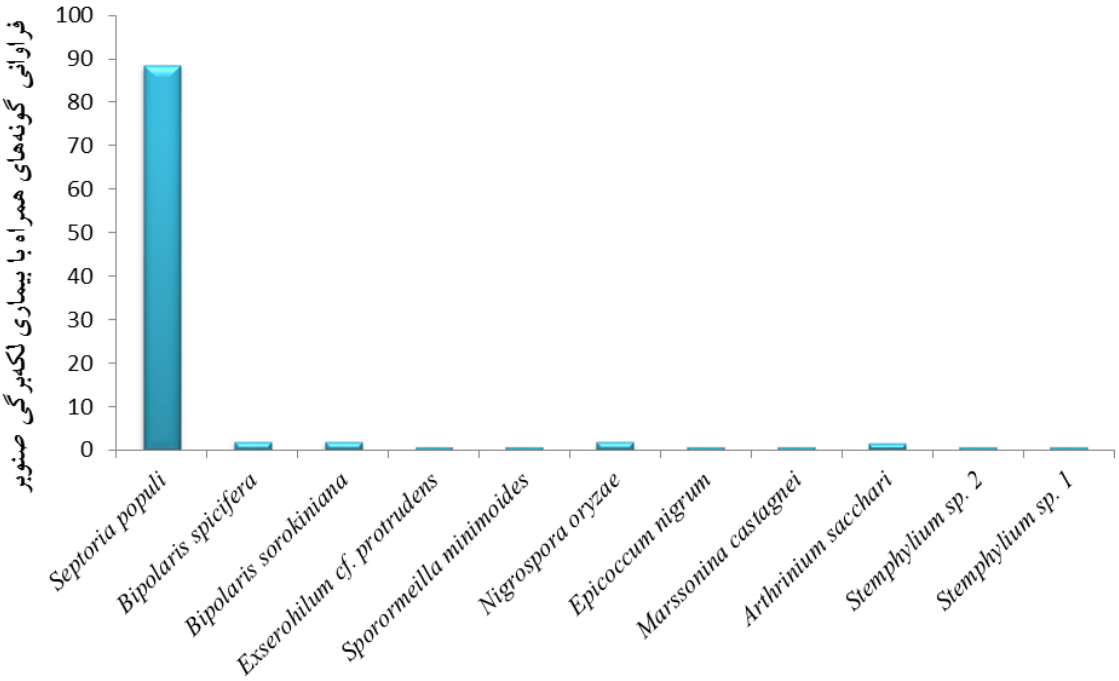
۷۰٪ بـه مـدت ۳۰ ثانیـه، دوبـار بـا آب مقطـر اسـتریل شسته شدند. سپس با استفاده از کاغذ صـافی اسـتریل خشک شده و در داخل پتری‌های حاوی آب آگـار ۰/۱٦ درصـد و ۲۵ میکروگـرم در میلـی‌لیتـر قـارچکش کـار بندازیم (به منظـور جلـوگیری از پیـری زود رس) قـرار گرفتند. در این مرحله از کشت‌های جوان متعلق بـه هـر کدام از گونه‌های شناسایی شـده بـا اسـتفاده از چـوب پنبه سوراخ‌کن مقدار سه بلوک به قطر پنج میلـی‌متـر از محـیط کشـت PDA حـاوی ریسـه قـارچی بـا فواصـل مساوی از هم بر روی برگ‌های داخل پتـری قـرار داده شد و بعـد از نگهـداری بـه مـدت ۱۰ روز در دمـای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، علائم بیماری بررسی و گونه‌هـای قـارچی از برگهـای دارای علائـم آلـودگی مجـددا جـدا سازی گردیدند.در تیمـار شـاهد از بلـوک هـای محـیط کشت فاقد ریسه استفاده گردید.

نتایج

نتایج این پژوهش نشان داد که ۱۳٤ جدایـه قـارچی جدا سازی شده از تعداد ۲۲۰ نمونه برگی تهیه شده از درختان صنوبر بیمار، بر اسـاس ویژگـی هـای ریخـت شـناختی متعلـق بـه گونـه هـای *Se. populi* (٪۸۸) ، *Bipolari spicifera* (٪۲/۹۸)،*Bipolaris sorokiniana*، (٪۲/۲۳) *Exserohilum cf .protrudens*، (٪۰/۷٤٦) *Stemphylium* spp. (٪۱/٤۹۲)، *Nigrospora oryzae* (٪۲/۲۳)، *Epicoccum nigrum* (٪./۷٤٦)، *M. castagnei* (٪./۷٤٦)، *Sporomiella minimoides* (۰/۷٤٦) و *Arthrinum sacchari* (٪۱/٤۹) بـه عنـوان قارچ های همراه با لکه برگی درختان تبریزی در مناطق مورد بررسی شناسائی شـدند در ایـن بـین گونـه *Se. populi* با ۸۸٪ بیشترین فراوانی را به خود اختصـاص داد (شکل ۱). با این حال گونـه‌هـای شناسـائی شـده از مناطق و شهرهای مختلف متفاوت بودند (جدول ۱).

جدول ۱- گونه‌های قارچی جداسازی و شناسائی شده از درختان تبریزی شهرستان‌های مورد مطالعه.

ردیف	نام شهرستان	گونه قارچی
۱	اهر	***Septoria populi***
۲	بستان آباد	***Se. populi***
۳	کلیبر	***Epicoccum nigrum***
٤	مرند	***Se. populi, Marssonina catagnei, Stemphylium* sp.**
۵	میانه	***Se. populi***
٦	هریس	***Bipolaris sorokiniana, Nigrospora oryzae***
۷	مشکین شهر(استان اردبیل)	***Se. populi***
۸	بوکان (استان آ-غ)	***Arthrinium sacchari, Stemphylium* sp.**
۹	خوی (استان آ-غ)	***Se. populi, B. spicifera, Exserohilium cf. protrudens, Sporomiella minimohdes***



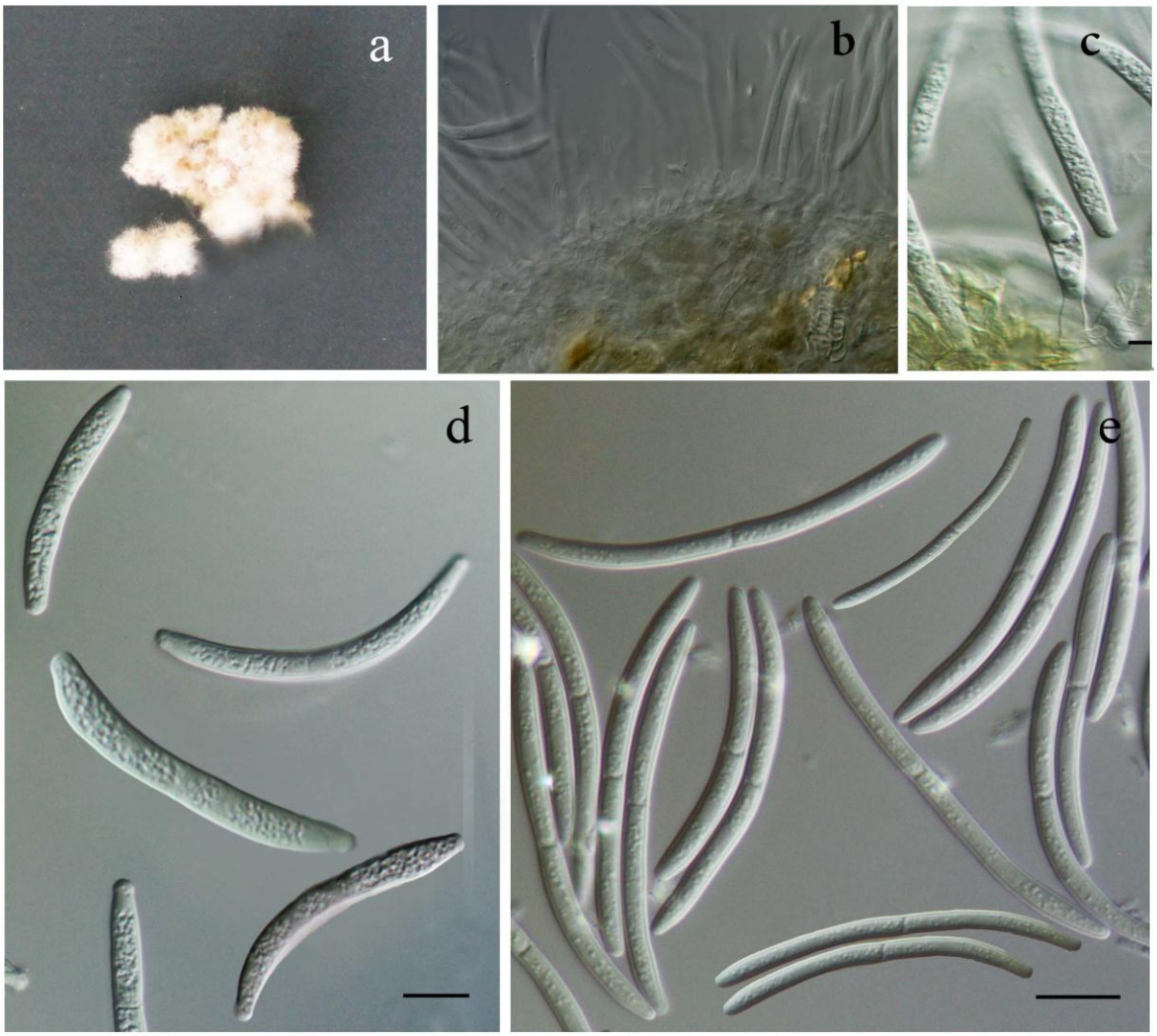
شکل ۱- نمودار فراوانی گونه‌های همراه با بیماری لکه برگی صنوبر.

توصیف گونه‌ی غالب

***Septoria populi* Desm. 1843. Annales des Sciences NaturellesBotanique. 19: 345.**

ویژگی‌های ریخت‌شناختی

توصیف و شناسایی جدایه‌های این گونه بر اساس صفات ریخت‌شناختی روی برگ های آلوده جمع آوری شده انجام شد. در روی برگ‌ها لکه‌ها زاویه‌دار نامنظم، پراکنده، به رنگ قهوه‌ای روشن در حاشیه و سفید در مرکز، به عرض ۳-۱ میلی‌متر بودند. پیکنیدها، تک حفره‌ای، کروی تا نیمه‌کروی، به عرض ۲۵۰-۲۰۰ میکرومتر، به طور کامل در داخل بافت گیاهی قرار داشتند و تنها استیول از سطح رویی برگ مشخص بود. منفذ پیکنید از بالا دایره‌ای شکل و به عرض ۵۰-۳۰ میکرومتر بود. در هر لکه تعداد ۱۰-۳ عدد پیکنید وجود داشت. کنیدیوفورها کاهش یافته و تبدیل به سلول کنیدی‌زا شده بودند. سلول‌های کنیدی‌زا کل سطح داخلی حفره پیکنید را پوشانده بودند. سلول‌های کنیدی‌زا یک تا دو سلولی، فلاسکی شکل تا استوانه‌ای پهن، بی‌رنگ، دارای سطحی صاف و به ابعاد ۸-۳ × ۱۲-۵ میکرومتر بوده و یک کنیدی در انتهای خود تولید می‌کردند. کنیدی‌ها دارای ۲-۱ دیواره عرضی، بی‌رنگ، صاف، به ابعاد ٤-۳ × ٥٥-٤٠ میکرومتر، دوکی شکل، خمیده و به ندرت راست، در پایه مسطح و به سمت انتها باریک‌تر می‌شدند. در سطح محیط کشت PDAدر دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در شرایط تاریکی پیکنید تمایز یافته ایجاد نمی‌شد. کنیدی‌ها در داخل تجمعات ریسه‌ای سست و تمایز نیافته ایجاد می‌شدند و کوتاه‌تر از کنیدی‌های تشکیل شده در شرایط طبیعی بودند. همچنین، این کنیدی‌ها گرانوله شده و شکل معمول خود را از دست داده بودند (شکل ۲) مشخصات فوق با توصیف ارائه شده برای گونه *S. populi* ورکلی و همکاران (۲۰۱۳) همخوانی داشت.



شکل ۲- *Septoria populi*: پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA.b-c: کنیدی ها و کنیدیوفورها، b- بر روی گیاه میزبان. c: بر روی محیط کشت PDA d-e .: کنیدی ها، بر روی محیط کشت PDA. بر روی میزبان. مقیاس=۱۰ میکرومتر.

***Sporormiella minimoides* Ahmed & Cain. 1972. Canadian Journal of Botany. 50 (3): 450.**

ویژگی‌های ریخت‌شناختی

پرگنه روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط تاریکی مسطح، دارای حاشیه منظم، در حاشیه به رنگ کرم و به سمت مرکز زرد کمرنگ بود. قطر پرگنه بعد از هفت روز به ۳۰ میلی‌متر می‌رسید. میسلیوم‌ها متشکل از ریسه‌های سطحی و غوطه‌ور در آگار و فاقد ریسه‌های هوایی بودند. ریسه-های سطحی شفاف، منشعب، دارای دیواره‌ی عرضی، دیواره صاف و به قطر ۲-۱ میکرومتر بودند. ریسه‌ها شفاف تا نیمه‌شفاف، منشعب، دیواره‌دار، دارای تورم-های ریسه‌ای متعدد و به قطر ٤-۲ میکرومتر بودند. پریتیس‌ها پراکنده در سطح محیط غذایی، در برخی موارد به صورت مجتمع، به طور نسبی فرورفته در آگار، کروی، نیمه کروی یا بیضوی، فاقد گردن یا دارای گردن کوتاه، به رنگ قهوه‌ای تیره و به قطر حداکثر ۱۳۵ میکرومتر بودند. دیواره آسکوکارپ متشکل از پنج لایه سلول سودوپارانشیمی به رنگ قهوه‌ای تیره بود. آسک‌ها حاوی هشت عدد آسکوسپور استوانه‌ای، با انتهای گرد، دارای پایه کوتاه و به ابعاد

۱۴۰-۸۰ × ۵-۳ میکرومتر بودند. آسکوسپورها استوانه‌ای شکل، چهار سلولی و به ابعاد ۳۵-۲۹ × ۷-۵ میکرومتر بودند. هر آسکوسپور را یک ماده زمینه ژلاتینی مجزا احاطه کرده بود.

ویژگی‌های سایر گونه‌های جداسازی شده از لکه برگی‌های درختان صنوبر در جدول شماره ۲ آورده شده است.

جدول ۲- خصوصیات ریخت شناختی عوامل قارچی همراه با لکه برگی صنوبر در استان آذربایجان شرقی و بخش هائی از استان های آذربایجاغربی و اردبیل.

نام جدابه قارچی	مشخصات پرگنه	مشخصات کنیدیوفور	مشخصات کنیدی
***Arthrinum sacchari* (Speg)**	روی محیط کشت **OA** مسطح، نمدی، دارای میسلیوم هوایی متراکم و به رنگ خاکستری تیره با قطر روز به ۹۰ میلی‌متر پس از هفت .	سلول‌های کنیدی‌زا به صورت خوشه‌ای بر روی میسلیوم تشکیل شده و شفاف تا قهوه-ای کمرنگ، دارای سطح صاف، به اشکال متنوع (بشکه‌ای شکل تا گرزی) و به ابعاد ۵-۴ × ۵-۴ .	کنیدی‌ها قهوه‌ای، دارای سطح صاف، از سطح فوقانی به شکل گرد تا نیمه گرد، از سطح جانبی عدسی شکل، با شیار کمرنگ استوایی، به قطر ۸-۶ میکرومتر و به ضخامت ۵-۴ میکرومتر و دارای **scar** مشخص به قطر ۲-۱ میکرومتر.
***Bipolaris spicifera* (Bainer) Subram**	روی**PDA** مخملی برنگ خاکستری مایل به قهوه‌ای و با حاشیه سبز زیتونی با قطر ۶۵ میلی‌متر پس از هفت روز.	کنیدیوفورها منفرد، چندسلولی،با سطح صاف،فاقد انشعاب یا به ندرت دارای یک انشعاب، دیواره‌دار،در بخش عقیم راست و در نواحی کنیدی‌زا دارای خمیدگی‌های زانومانند و به طول حداکثر ۲۴۲ میکرومتر	کنیدی‌ها استوانه‌ای شکل، قهوه‌ای تیره،فاقد **cutoff**، دارای ۱۰-۸ دیواره‌ی عرضی کاذب و به ابعاد ۱۳-۱۰×۳۳-۲۵ میکرومتر.
***Bipolaris sorokiniana*(Sacc.)**	روی محیط کشت **PDA** خاکستری مایل به قهوه‌ای و با حاشیه سبز زیتونی،قطر پرگنه‌ی هفت روزه ۲۵ میلی-متر.	کنیدیوفورها منفرد،چند سلولی،با سطح صاف،فاقد انشعاب یا به ندرت دارای انشعاب،دیواره‌دار،در بخش عقیم راست و در نواحی کنیدی‌زا دارای خمیدگی‌های زانومانند بودند.اندازه عرض کنیدیوفور ها۸-۵ میکرومتر و طول آن ها۱۵۰-۹۵ میکرومتر	کنیدی‌ها دوکی شکل،قهوه-ای روشن،فاقد **cut off** ، دارای ۸-۶ دیواره‌ی کاذب و به ابعاد ۲۲-۱۲ ×۶۸-۲۲ میکرومتر بودند.

Epicoccum nigrum Link	رویPDA برنگ قهوه ای مایل به قرمز و سبز زیتونی با ریسه های هوائی فراوان.قطر پرگنه بعد از هفت روز ۳۰ میلی متر توام با اسپورودوکیوم های پودری به رنگ تیره	کنیدیوفور ها کاهش یافته و تبدیل به سلول های کنیدیزای بیرنگ و چماقی شکل با ۲-۰ دیواره عرضی و به اندازه۹-۶ میکرومتر	کنیدی ها به اشکال کروی تا گلابی با دیواره های نا منظم ، برنگ قهوه ای به ابعاد ۱۹-۱۲ *۱۶-۱۰ میکرومتر
Exserohilum cf. protrudens Alcorn	روی محیط کشت PDA مخملی،خاکستری مایل به قهوه‌ای و حاشیه‌ی آن سبز زیتونی، قطر پرگنه هفت روزه۸۰ میلی‌متر.	کنیدیوفورها استوانه‌ای، به رنگ قهوه‌ای زیتونی، دیواره-دار، راست تا کمی خمیده و به ابعاد ۲۸۰-۱۰۰ میکرومتر	کنیدی به رنگ قهوه‌ای زیتونی،دوکی شکل، بعضی مواقع کوتاهتر و پهن‌تر ، منقاردار،صاف، راست یا انحنا دار، دارای ۱۰-۵ دیواره‌ی کاذب و ابعاد کنیدی ۲۰-۱۵×۱۰۰-۶۰ میکرومتر
Marssonina castagnei (Desm.and Mont) Magnus	توصیف این گونه بر اساس صفات ریخت شناختی بر روی میزبان انجام گرفت. آسرول ها ی گرد تا نیمه گرد به قطر ۱میلی متر بصورت پراکنده در زیر اپیدرم محل لکه هادیده شدند.	.سلول های کنیدیزا فیالیدیک،بشکه یا فلاسکی، بیرنگ و با سطح صاف	کنیدی ها شفاف تخم مرغی تا گلابی شکل به ابعاد۹-۶×۲۱-۱۶ با یک دیواره عرضی که کنیدی را به دو سلول نا مساوی تقسیم کرده است.
Nigrospora oryzae Berk and Broom	رویOA فاقد ریسه های هوائی، برنگ سفید مایل به خاکستری به سطح مسطح،قطر پرگنه هفت روزه ۹۰ میلی متر	سلول های کنیدی زا بی رنگ با سطح صاف،امپولی شکل و به ابعاد۱۱-۷×۹-۷ میکرومتر	کنیدیها قهوه ای مایل به سیاه،مسطح به شکل گرد و به قطر ۱۵-۱۰ میکرومتر و ضخامت ۱۰ میکرومتر
Stemphylium sp.Wallr	بر روی محیط کشت PCA خاکستری تا خاکستری مایل به قهوه‌ای،مسطح و باحاشیه‌ی صاف.قطر پرگنه‌های هفت روزه ۶۰ میلی‌متر با دوایر متحدالمرکز به طور نیمه واضح.توام با تورم های هیفی	کنیدیوفورها منفرد،۵-۴×۸۴-۴۰ میکرومتر،صاف، دارای دیواره‌ی عرضی، فاقد انشعاب، استوانه‌ای، راست یا اندکی خمیده و قهوه‌ای کمرنگ. کنیدیوفورها در برخی موارد کاهش یافته و تبدیل به سلول کنیدی‌زا	کنیدی‌های بالغ ۲۲-۱۵ ×۲۷- ۱۹میکرومتر، صاف، دارای سطح منقوط، بیضوی پهن، قسمت قاعده‌ای نیمه تخت، قسمت انتهایی گرد یا نیمه تخت، قهوه‌ای مایل به سبز زیتونی، دارای ۳ دیواره‌ی عرضی و ۷ دیواره‌ی

آزمون بیماریزائی

نتیجه آزمون بیماریزائی جدایه های منتخب هر کدام از گونه‌های قارچی بعد از ۱۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ارزیابی و به قرار جدول شماره ۳ ثبت گردید. گونه هائی که موفق به ایجاد بیماری شده بودند مجددا از برگ های دارای نشانه-های آلودگی جدا سازی گردیدند (جدول ۳).

جدول ۳- نتیجه آزمون بیماریزائی گونه‌های جداسازی شده از لکه برگی‌های درختان صنوبر.

ردیف	نام گونه قارچی	نتیجه آزمون بیماریزائی
۱	***Bipolaris spicifera***	ایجاد لکه‌های سیاه بزرگ با حاشیه نامنظم.در مرحله بعد لکه ها بهم پیوسته و قسمت اعظم برک را فرا می گیرند.
۲	***Bipolaris sorokiniana***	ایجاد لکه‌های سیاه بزرگ با حاشیه نامنظم.
۳	***Exserohilum cf. protrudens***	فاقد نشانه‌های آلودگی.
٤	***Marssonina castagnei***	ایجاد لکه‌های گرد با حاشیه نا منظم و واضح.مرکز لکه ها زرد مایل به قهوه‌ای توام با آسرول.
٤	***Septoria populi***	ایجاد لکه‌های قهوه‌ای روشن با حاشیه منظم.
٥	***Sporormiella minimoides***	فاقد نشانه‌های الودگی
٦	***Stemphylium* sp.**	ایجاد لکه‌های بزرگ تیره رنگ با حاشیه نامنظم.
۷	***Nigrospora oryzae***	فاقد نشانه‌های آلودگی
۸	***Epicoccum nigrum***	فاقد نشانه‌های آلودگی

بحث

در این بررسی گروه‌های قارچی متفاوت از برگ-های درختان تبریزی دارا ی لکه برگی جدا سازی گردیدند.در بین ۱۳٤ جدایه‌ی جداسازی شده، گونه *Se. populi* با فراوانی ۸۸٪ به عنوان گونه‌ی قارچی غالب همراه بیماری لکه برگی درختان تبریزی از شهرستان های اهر،بستان آباد، مرند، مشکین شهر و خوی به تنهائی و یا به همراه سایر گونه ها شناسائی گردید. گونه‌های *Septoria* از جمله بیمارگرهای مهم گیاهی بوده و خسارات قابل توجهی را به گیاهان زراعی، زینتی و درختان میوه وارد می سازند (کوادولیگ و همکاران،۲۰۱۳ ورکلی و همکاران ۲۰۱۳). گونه های *S. musiva*، *Se .populicola* و *S. populi* از این جنس بر روی درختان تبریزی بیماری زا بوده و بعنوان عامل لکه برگی درختان صنوبر شناخته شده اند. گونه *S.musiva* با داشتن ٤-۱ دیواره عرضی در کنیدیوم های خود از گونه *Se. populi* قابل تفکیک است (کالان و همکاران،۲۰۰۷) در مقابل دو گونه *Se. populicola* و *Se. populi* باداشتن تعداد مشابه دیواره عرضی از نظر اندازه و ابعاد کنیدیوم از یکدیگر قابل تفکیک هستند. بطوریکه مطالعات ریخت شناختی تعلق جدایه-های تهیه شده را به گونه*Se. populi* تائید کرد. با این حال با توجه به اینکه ویژگی های ریخت شناختی می تواند تحت تاثیر شرایط محیطی و غیره نیز قرار گیرد بنا براین برای تعیین صد در صدی هویت گونه مذکور بررسی های مولکولی نیز توصیه می گردد.

در ایران گونه *Se. candida* از دامغان و از روی *P. alba* توسط خبیری در سال ۱۹۵۲، گونه *Se. populi* از اهواز، مهران و رامین از روی *P. euphratica* توسط اسفندیاری، گونه *Se. davatchi*

از روی *P. caspica* توسط اسفندیاری و پتراک در سال ۱۹۵۰ گزارش گردیده است (به نقل از ارشاد۱۳۸۸). در تحقیق حاضر با توجه به ویژگی های ریخت شناختی و توصیفی که بعمل آمد گونه *Se. populi* به عنوان عامل لکه برگی سپتوریائی شناسائی گردید.

برای شناسائی جدایه‌های جنس*Bipolaris* از کلید توصیف شده توسط احمد پور و همکاران (۱۳۹۰) استفاده شد. مطابق کلید مذکور صفات ریخت شناختی شامل شکل کنیدیوم، تعداد دیواره‌های عرضی کاذب، میزان یاخته‌های میانی و ضعیت آن‌ها نسبت به یاخته-های انتهائی و نیز ابعاد کنیدیوم و کنیدیوفور گونه های موجود در این بررسی *B. spicifera* و *B. sorokiniana* شناخته شدند. برخی از گونه‌های این جنس مانند *B. sorkiniana*، *B. maydis* و *B. oryzae* خسارت شدیدی بر روی گندم، ذرت و برنج وارد می سازند. *B. sorokiniana* دارای دامنه‌ی میزبانی وسیع بوده و به عنوان عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گندم شناخته شده است (احمدپور و همکاران۱۳۹۰). گونه *B. spicifera* از بیش از ۷۷ گونه گیاهی مختلف مانند گندم، چمن، مرغ، چاودار و درختچه‌های مو گزارش شده است اما گزارش این دو گونه از روی درختان صنوبر برای دنیا جدید می‌باشد.

گونه‌های جنس*Epicoccum* دارای توزیع جهانی بوده و از خاک و گیاهان مختلف گزارش شده اند. اعضای این جنس ساپروفیت، اندوفیت و یا بیمارگر ضعیف روی بعضی گیاهان هستند (فاوارو و همکاران ۲۰۱۱). در شناسائی جدایه های این جنس ابعاد سلول های کنیدیزا و کنیدیوم ها و مشخصات اسپورو دوخیوم مورد استفاده قرار گرفت، بر این اساس جدایه‌های موجود تحت عنوان گونه*Ep. nigrum* شناسائی گردید

جنس *Exserohilum* از خاک، گیاهان و نیزبعنوان مایکوپارازیت از قارچ های دیگر جدا سازی شده اند (گیراود و همکاران ۱۹۹۷، سان و همکاران۲۰۰۵).جهت شناسائی گونه جدایه های این جنس از شرایط توصیف احمدپور و همکاران(۱۳۹۰) استفاده شد و جدایه های متعلق به این جنس گونه *E. cf. protrudens* تشخیص داده شدند. گزارش این گونه برای ایران و گزارش آن از روی درختان تبریزی برای دنیا جدید می‌باشد (http//nt.ars-grin.gov/) .

گونه‌های *Marssonina* به عنوان عامل آنتراکنوز درختان تبریزی شناخته شده است (سلرینو ۱۹۹۹). برای شناسائی این گونه از ویژگی های ساختار های قارچ (آسرول،کنیدیوفور و کنیدیوم) بر روی میزبان استفاده شد.بر اساس این صفات گونه حاضر *M. castagnei* شناسایی گردید که ۷٤٦/.٪ از جدایه‌های قارچی موجود در این بررسی را تشکیل می‌داد. این گونه بیشترین شباهت را با گونه های *M. populi* و *M. brunnea* دارد با این تفاوت که *M. populi* دارای کنیدیوم های خمیده است در حالی که در *M. castagnei* دارای کنیدیوم های راست تا کمی خمیده است. همچنین ابعاد کنیدیوم در *M. populi* بزرگتر از *M. castagnei* و کنیدیوم های *M. castagnei* نیز بزرگتر از *M. brunnea* می‌باشد.

گونه های جنس *Sporomiella* غالبا بر روی فضولات جانوران خون گرم بسر می برند (هانلین۲۰۰۱، پارکر و ویلیامز،۲۰۱۱). از لحاظ ریخت شناختی این جنس شباهت زیادی به جنس *Sporomia* دارد اما در *Sporomia* همه آسکوسپور ها درون یک ماده ژلاتینی مشترک قرار دارند در صورتیکه در*Sporomiella* هر آسکوسپور دارای ماده ژلاتین جداگانه می‌باشد (هانلین۲۰۰۱). برای شناسائی گونه-های این جنس از کلید شناسائی احمد و کین (۱۹۷۱) استفاده شد و گونه حاضر *Sp. minimoides* شناسائی گردید.

از جنس*Stemphylium* بیشتر از ۳۳ گونه تا کنون شناسائی شده است که تعدادی از آن ها مانند *Ste botryosum*، *St. solani* و*St. vesicarium* بر روی

گیاهان بیماری‌زا می باشند (ونگ و همکاران ۲۰۱۰) با توجه به عدم امکان اسپورزائی در جدایه‌های این جنس شناسائی دقیق گونه‌های این جنس میسر نگردید.

اعضای جنس *Nigrospora* بیمار گر یا اندوفیت گیاهان مختلف بوده واز درختان میوه، گیاهان زینتی و زراعی جداسازی شده اند به عنوان مثال گونه *N. sphaerica* از روی انواع گیاهان مانند تمشک (Wright و همکاران ۲۰۰۸) و گیاهان داروئی مانند شیرین بیان (Verma و همکاران ۲۰۰۷) و میزبان‌های متعدد دیگر به عنوان اندوفیت و بیمارگر گزارش شده است. شناسائی گونه های این جنس بر پایه صفات ریخت شناختی و ویژگی های کنیدیوم و کنیدیوفور انجام پذیرفته و گونه‌ی موجود به عنوان *N. oryzae* شناسائی گردید. این گونه عموما بیمارگر گیاهان مختلف مانند برنج، ریشه ذرت و عامل لکه برگی موز شناخته شده است (عباس و همکاران ۲۰۱۳) این گونه هرچند قبلا از ایران گزارش شده اما گزارش آن از روی درختان تبریزی برای دنیا جدید می باشد.

منابع

احمدپور ع، دنیادوست چلان م، حیدریان ز و نیکخواه م، ۱۳۹۰ .معرفی گونه‌های جدیدی از جنس‌های Bypolaris و Curvularia روی گندمیان در ایران. رستنیها،۱۲ (۱):۴۹-۳۹

ارشادج، ۱۳۸۸. قارچ‌های ایران، ویراست سوم. انتشارات موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران.

باب مراد م. باقری‌زنوز الف و یارمند ح. ۱۳۸۳. بررسی بیولوژی سنک صنوبر *Monosteiraunicostata*(Muls.&Rey) روی کلن‌های صنوبر درکرج. فصلنامه علمی – پژوهشی تحقیقات جنگل وصنوبرایران، ۲۰ (٤): ٦٧٨-٦٦٩.

حمزه پور م. مدیررحمتی ع، جوکار ل و عباسی ع. ۱۳۸۵. جمع‌آوری ارقام بومی و غیربومی صنوبر در استان فارس و بررسی آنها در خزانه سلکسیون. فصلنامهٔ علمی – پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ١٤ (١): ٩١-٨٠.

کرد ب، کرد ب. ۱۳۸۹. تاثیرسن درختان صنوبردلتوئیدس برخواص بیومتری،فیزیکیوشیمیایی چوب آن (مطالعه موردی دراستان گلستان). فصلنامه علوم وفنون منابع طبیعی،٥ (١): ٨٢-٧٥.

Abass MH, Hameed, MA and Ahmed AN, 2013. First report of *Nigrosporasphaerica* (Sacc.) Mason as a potential pathogen on date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Canadian Journal of Plant Pathology, 35 (1): 75-80.

Ahmed SI and Cain RF, 1971. Revision of the genera *Spororrnia*and*Sporormiella*.Canadian Journal of Botany, 50: 419-477.

Arraino LS., Brading PA, and BRO JK.2001, A detached seedling leaf technique to study resistance to *Mycosphaerellagraminicola* () in wheat. Plant Pathol, 50: 339-346.

Callan BE, Leal I, Foord B, Dennis J and Van Oosten C, 2007.*Septoriamusiva* isolated from cankered stems in hybrid poplar stool beds, Fraser Valley, British Columbia. Pacific Notthwest Fungi, 2 (7): 1-9.

Castaneda-Ruiz RF, Guarro J and Cano J, 1995.A new species of *Exserohilum* from Cuba.Mycological Research, 99 (7): 825-826.

Cellerino GP, 1999. Review of fungal diseases in poplar. FAO, Rome.

Crous PW and Groenewald JZ, 2013. A phylogenetic re-evaluation of Arthrinium. IMA Fungus. 4(1): 133-154.

Ehrenberg CG, 1818. Sylvaemycologicae Berolinenses. Bruschke, Berlin.

Erickson JE, Stanosz GR and Kruger EL. 2003. Photosynthetic consequences of *Marssonina* leaf spot differ between two poplar hybrids. New Phytologist, 161: 577-583.

Favaro LC, De Melo FL, Aguilar-Vildoso CI and Araujo WL, 2011. Polyphasic Analysis of Intraspecific Diversity in *Epicoccumnigrum* Warrants Reclassification into Separate Species. PLOS ONE, 6 (8): 1-18.

Guiraud P, Steiman R, Seigle-Murandi F and Sage l, 1997.*Exserohilumsodomii*, a new species isolated from soil near the Dead Sea (Israel). Antonie van Leeuwenhoek, 72: 317-325.

Hanlin RT, 2001.Illustrated genera of Ascomycetes, volume 1. APS Press, St. Paul.

Long R, Bowersox TW, and Merrill W, 1986.Artificial inoculation of populous hybrids with Septoriamusiva. Canadian Journal of Forest research, 16: 405-407.

Luly CJ, McNabb HSJ, 1989. Ascospore production, release, germination and infection of *Populus* by *Mycosphearella populorum*. Phytopathology.79:1013-1018.

Maxwell DL, Kruger EL, and Stanosz GR, 1997. Effects of water stress on colonization of poplar stems and excised leaf disks by *Septoriamusiva*. Phytopathology, 87: 381-388.

Quaedvlieg W, Verkley GJM, Shin HD, Barreto RW, Alfenas AC, Swart WJ, Groenewald JZ, and Crous PW, 2013. Sizing up *Septoria* Studies in Mycology,75: 307-390.

Parker NE and Williams JW, 2011. Influence of climate, cattle density and lake morphology on Sporomiella abundance in modern lake sediments in the US Great plains.The Holocene, 22(4): 475-483.

SpiersAG, 2011.Comparative studies of conidium morphology of *Marssonina* species pathogenic to poplars on agar and host tissue.New Zealand Journal of Botany, 27 (4): 503-511.

Sun G, Zhang R, Zhou W, and Zhu M, 2005.*Exserohilum*heteromorphum sp. Nov., a new helminsosporoid fungus from *Echinochloa* in china.Mycotaxon, 92:173-176.

Sutton BC, 1970. Forest microfungi. IV. A leaf spot of *Populus* caused by *Cladosporiumsubsessile*. Canadian Journal of Botany, 48: 471-477.

Tharp BC, 1917. Texas Parasitic Fungi.Mycologia, 9 (2): 105-124.

Verkley GJM, Quaedvlieg W, Shin HD and Crous PW, 2013.A new approach to species delimitation in *Septoria*.Studies in Mycology, 75: 213-305.

Verma OP, and Gupta RBL, 2007.A new host for Nigrospora spharrica causing leaf spot on Glycyrrhiza glabra. New Disease Reports.

Wang Y, Geng Y, Pei YF and Zhang XG, 2010.Molecular and morphological description of two new species of *Stemphylium* from China and France.Mycologia. 102 (3): 708-717.

Waterman A, Mand Cash EK, 1950. Leaf Blotch of Poplar Caused by a New Species of *Septotinia*.Mycologia, 42 (3): 374-384.

Wright ER, Flogado M, Rivera MC,Crelier A, and Vasquez P, 2008. Nigrospora sphaerica causing leaf Spot and Twig and shoot Blight on Bluberry :Anew host of pathogen. Plant Disease 92(1): 171

Identification of Fungal Species Associated with Leaf Spot Disease on Poplar Trees (*Populus* spp.) in East Azarbaijan Province and Some Parts of west Azarbaijan and Ardabil provinces

A Babai-Ahari[1], R Golmohammadi[2] and M Arzanlou[1*]

[1]Respectively, Professor and Associate Professor of Plant Pathology and Mycology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[2]Former MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Received:7 Jul 2015 Accepted:10 Apr 2016

Abstract

Leaf spot diseases are among the important foliar diseases of poplar trees, causing economic crop loss on this host. Species in the genera *Septoria* and *Marssonina* are the main fungal groups causing leaf spot disease on poplar trees, worldwide. Even though leaf spot diseases cause considerable damage on poplar trees in East Azarbaijan province, very little attention has been paid on the identification of the causal agents of disease in this region. The present study was aimed to characterize the causal agents of leaf spot diseases on poplar trees in East Azarbaijan, part of West Azarbaijan and Ardabil provinces and to further evaluate their pathogenicity on poplar trees. A total number of 134 fungal isolates were recovered from 220 samples with leaf spot symptoms on poplar trees during 2013 growing season. Morphological and cultural characterization of isolates revealed *Septoria populi*, *Bipolaris spicifera*, *B. sorokiniana*, *Exserohilum cf. protrudens*, *Stemphylium* sp. *Sporormiella minimoides*, *Nigrospora oryzae*, *Epicoccum nigrum*, *Marssonina castagnei* and *Arthrinium sacchari* as fungal species associated with leaf spot disease of poplar. *Septoria populi* was the most dominant species with isolation frequency of 88%. The pathogenicity assay using detached leaf method revealed *Se. populi*, *B. spicifera*, *B. sorokiniana*, *Stemphylium* sp., *N. oryzae*, *M. castagnei* and *A. sacchari* being pathogenic on poplar leaves under laboratory conditions. This is the first report on the occurrence and pathogenicity of *A. sacchari*, *Sp. minimoides* and *Ex. cf. protrudens* on poplars trees.

Keywords: East Azarbaijan province, Leaf spot disease, Poplar trees.