

شناسایی و بررسی بیماریزایی گونه‌های قارچی همراه با بیماری لکه برگی خیار در استان آذربایجان شرقی

فاطمه اقبالی^۱، اسدالله بابای اهری^{۲*} و مهدی ارزنلو^۳

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه تبریز.

- ^۲- به ترتیب استاد و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز.

ababaiahari@yahoo.com *مسئول مکاتبه

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۲۸ تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۵

چندھ

بیماری لکه‌برگی بعنوان یکی از بیماری‌های محدود کننده‌ی تولید محصول خیار در استان آذربایجان شرقی شناخته شده است و همه ساله خسارت زیادی به این محصول و جالیزکاران وارد می‌نماید. هدف تحقیق حاضر شناسائی عامل بیماری لکه‌برگی خیار *Cucumis sativus* L. در استان آذربایجان شرقی و شناسایی گونه‌های قارچی بیمارگر با استفاده از داده‌های مورفو‌لولژیکی می‌باشد. برای این منظور در طی تابستان سال ۱۳۹۲ از مزارع خیار دارای علایم در شهرستان‌های شبستر، اهر، میانه و باسمنج که از مراکز مهم تولید خیار در استان هستند، نمونه‌برداری به عمل آمد و از نمونه ۹۰ گیاهی تهیه شده که دارای علائم متنوع لکه‌برگی بودند، تعداد ۱۰۰ جدایه‌ی قارچی جدا سازی گردید. نتایج این تحقیق حضور انواع گونه‌های مختلف قارچی عامل لکه‌برگی را در مزارع استان تایید می‌کند. با مطالعات *Bipolaris Bipolaris spicifera Alternaria tenuissima* ریخت‌شناختی جدایه‌های بدست آمده، گونه‌های قارچی *Nigrospora oryzae Cladosporium sp.*, *Alternaria atrum*, *Stemphylium mali sorkiniana*, *Curvularia sp.*, *Phoma sp.*, *Pseudoprenospora cubensis* و *Pseudoprenospora cubensis* و *Alternaria tenuissima* شدن. در بین گونه‌های شناسایی شده، فراوانی جدایه‌های *Alternaria tenuissima* در بوته‌های بترتبی با ۴۸ درصد و ۱۳ درصد بیشتر از بقیه بود. تمام جدایه‌های مورد بررسی قادر به ایجاد بیماری در بوته‌های خیار مایه زنی شده بودند.

واژه‌های کلیدی: آذربایجان شرقی، لکه برگی قارچی خیار، *Pseudoprenospora Alternaria*

در سال یکی از مهمترین قطب‌های تولید خیار بشمار

مقدمة

می‌رود (آمار نامه کشاورزی ۱۳۹۰).

بیماری‌های زیادی همه‌ساله تولید این گیاه را تهدید

می‌کند. از جمله این بیماری‌ها می‌توان به موزاییک خیار،

سفیدک درونی و بوته میری، سفیدک سطحی و لکه-

برگی‌های خیار اشاره کرد (اعتباریان ۱۳۷۶).

در پی گسترش کشت خیار در مزارع و گلخانه‌ها

بیماری‌های لکه‌برگی نیز بعنوان یکی از فاکتورهای

محدودکننده‌ی تولید محصول خیار شناخته شده و همه

ساله خسارت زیادی به این محصول و جالیزکاران وارد

می‌نماید. گروه‌های قارچی متعددی در ایجاد بیماری لکه

برگی خیار دخیل هستند. بیماری لکه برگی که توسط

خیار (Cucumis sativus L.) گیاه زراعی با $2n=2X=2n=14$ کروموزوم، گیاهی یکساله دوجنسی، یکپایه و دولپه‌ای متعلق به تیره کدوییان می‌باشد. این گیاه جزو اقتصادی‌ترین گیاهان تیره کدوییان می‌باشد. خاستگاه خیار شبه قاره هند ذکر شده است. این صیفی بیش از ۵۰۰۰ سال تاریخ مکتوب دارد (آمارنامه زراعی، ۱۳۸۴) سطح زیر کشت خیار در جهان بیش از ۸۶۰۰۰ هکتار با تولید سالانه ۱۳۱۴۲۰۰۰ تن است که ۶۳۶۵۲ هکتار آن با ۱/۸ میلیون تن تولید مربوط به ایران است. استان آذربایجان شرقی با ۲۲۴۲ هکتار زیر کشت و ۵۰۷۹۶ تن

بوته خیار می‌شوند و از طریق کاهش سطح سبز و فتوستنتز باعث کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌گردند. با توجه به اهمیت تولید خیار در ایران به ویژه استان آذربایجان شرقی، شناسایی عوامل بیماریزای آن بویژه عوامل دخیل در بیماریهای لکه برگی به منظور توسعه‌ی روش‌های مناسب مدیریتی و افزایش عملکرد در واحد سطح از اهمیت بسیاری برخوردار است. در این تحقیق تلاش گردید تا قارچهای عامل لکه برگی در مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی جداسازی و با استفاده از روش‌های ریخت‌شناختی مورد شناسایی قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

در ماههای تیر و مرداد سال ۱۳۹۲ نمونه‌های برگی مشکوک به آلوگی قارچی از مزارع شهرستان‌هایی که تولید خیار در آنها بسیار رایج است، بصورت تصادفی از بیست و سه مزرعه شامل دوازده مزرعه در شهرستان شبستر، پنج مزرعه در شهرستان اهر، سه مزرعه در شهرستان باسمنج و سه مزرعه در شهرستان میانه جمع‌آوری گردید. سپس هرکدام از نمونه‌ها بطور جداگانه درون پاکت‌های کاغذی تازه به آزمایشگاه منتقل شد و برای جلوگیری از رشد عوامل ساپروفتی ثانوی، پس از انتقال به آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفتند. بدین صورت که بخش‌های آلووده در زیر بینوکولر بررسی و در صورتی که علایم با اسپورهای قارچ همراه بود، جداسازی و خالص‌سازی قارچ به روش تک اسپور انجام گرفت. برای این کار حدود ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به داخل تشتک پتروی حاوی محیط‌کشت سیب-زمینی دکستروز آگار (PDA) حاوی ۰/۲ درصد اسید‌لاكتیک اضافه شد. در زیر استریو میکروسکوپ، اسپورهای قارچ توسط سوزنی ظریف و سترون از روی لکه‌ها برداشته شدند و به طور کامل در داخل آب موجود در تشتک پتروی پخش گردیدند. تشتک‌های پتروی به مدت ۲۴ ساعت به حالت مورب در دمای اتاق ۲۰-۲۲°C نگه‌داری شدند. سپس تشتک‌ها زیر بینوکولر بررسی شده و اسپورهای جوانه‌زده همراه با قطعه کوچکی از محیط غذایی اطراف آن توسط سوزن سترون به محیط‌کشت جدید PDA منتقل شدند. نمونه‌های برگ مشکوک به آلوگی قارچی و فاقد اسپور قارچ، ابتدا

گونه *Pseudoperonospora cubensis* ایجاد می‌شود، جزء بیماری‌های مخرب خیار می‌باشد که از پراکنش وسیعی در مناطق تحت کشت خیار در جهان برخوردار است. این بیماری تحت عنوان سفیدک درونی یا سفیدک کرکی خیار شناخته شده است و در بیش از ۷۰ کشور و روی بیش از ۵۰ گونه متعلق به ۲۰ جنس گیاهی تیره کوییان فعالیت دارد (لبدا و اوربان ۲۰۰۷) و منجر به خسارت اقتصادی در کشورهای امریکایی، اروپائی و چین می‌گردد (توماس ۱۹۹۶). کاهش محصول در مزارع خیار آلووده به این بیماری بطور متوسط ۶۱٪ برآورد شده است (رنجبور و همکاران ۱۳۸۷). بیماری سفیدک کرکی در ایران در سال ۱۳۴۲ توسط اسکندری (۱۳۴۳) از مزارع شمالی کشور گزارش گردید و در سال ۱۳۵۹ در مزارع جالیز اصفهان مشاهده شده است (جالی و همکاران ۱۳۷۱).

از عوامل قارچی دیگر، گونه‌های *Alternaria* را می‌توان نام برد که روی گیاهان صیفی بسیار مخرب بوده (آسلان ۲۰۱۰) و منجر به نابودی عمدۀ سبزیجات و محصولات مهم اقتصادی می‌شود (مامگاین و همکاران ۲۰۱۳). دو گونه *A. cucumerina* و *A. alternata* نیز جزء گونه‌های رایج ایجاد کننده‌ی لکه برگی خیار هستند. آلوگی خیار به این گونه‌های قارچی از بیشتر کشورها گزارش شده است (کوهن و روتم ۱۹۸۷). خسارت وارد به اندام‌های هوایی توسط این بیماری بسته به نوع میزان متنوع است بطوریکه روی کدوتبل ۸۰ درصد و هندوانه و خیار ۸۸ درصد از هندوستان گزارش شده است (باها راگاوا و سینگ ۱۹۸۵).

از دیگر گروههای قارچی که باعث بیماری لکه برگی در خیار می‌شوند می‌توان به سایر گونه‌های *Cladosporium* *Alternaria* *Corynespora*، *Cercospora citrullina*، *cucumerinum*، *Colletotrichum orbiculare*، *Phoma* sp.، *cassicola* *Ulocladium*، *Stemphylium* *cucurbitacearum* *cucurbitacearum* اشاره کرد (ارشاد، ۲۰۰۹).

این گونه‌های قارچی باعث ایجاد لکه برگی بر روی برگ‌ها و نیز ایجاد بیماری در میوه و سایر اندام‌های

توسط قارچ شناسان مختلف در زمینه هر یک از جنس-های قارچی اعمال شد.

اجرای اصول کخ و اثبات بیماریزائی

اثبات بیماریزائی جدایه های تهیه شده در تابستان ۱۳۹۳ در یکی از واحد های گلخانه ای گروه گیاهپزشگی دانشکده کشاورزی تبریز با دمای ۲۵-۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و چرخه‌ی نوری: تاریکی ۸-۱۶ ساعت بر روی گیاهان دو تا سه برگه رقم MP73 خیار که با استفاده از سوسپانسیون اسپور حاوی 10^6 اسپور در میلی لیتر از هر کدام از گونه های قارچی مایه زنی شده بودند، در سه تکرار انجام پذیرفت. برای مایه زنی گیاهان شاهد از آب قطر استریل استفاده شد. عالیم الودگی ۴-۱۰ روز بعد از مایه زنی بررسی و قطعاتی از لکه برگی های تولید شده برای جدا سازی مجدد قارچ عامل بیماری بر روی محیط کشت PCA منتقل گردید.

نتایج

انواع مختلف لکه برگی ها از روی برگ های نمونه-برداری شده مشاهده گردید (شکل ۱). نتایج بررسی، نشانگر تنوع عوامل قارچی لکه برگی بود، طوری که در مجموع ۱۰۰ جدایه قارچی به عنوان عوامل لکه برگی روی خیار جداسازی و خالص سازی شدند که در بین قارچ های جداسازی شده گونه‌ی *Alternaria tenuissima* از فراوانی بالاتری برخوردار بود و در مجموع ۴۸ جدایه (۴۸ درصد) به این گونه تعلق داشتند (شکل ۲).

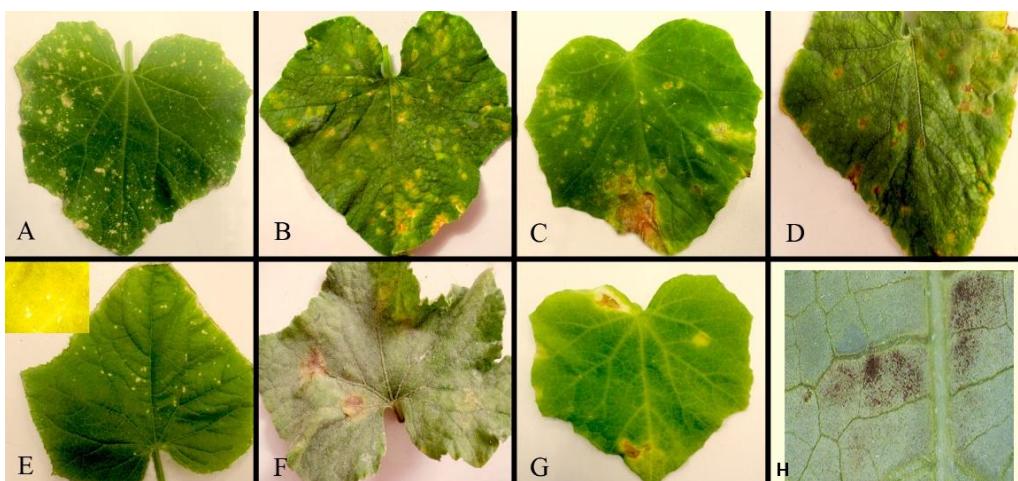
Alternaria tenuissima (Kunze) Wiltshire, Trans. Br. mycol. Soc. 18(2): 157 (1933)
این گونه با استفاده از کلید شناسایی گونه‌های *Alternaria* شناسایی و توصیف شد (سیمونس ۲۰۰۷).
پرگنه‌ی جدایه‌های مختلف *Alternaria tenuissima* در محیط غذایی PCA تنوع بالایی از نظر رنگ، سرعت رشد و تولید ریشه‌های هوایی و نحوه اسپورزایی از

بمدت ۳-۴ دقیقه توسط آب شسته شدند تا هرگونه آفت احتمالی موجود در روی برگ حذف گردد. سپس از حد فاصل بخش آلووده و سالم، قطعات کوچک به اندازه تقریبی 2×2 میلی‌متر برش داده شد. این قطعات توسط اتانول ۷۰ درصد بمدت ۲۰ ثانیه در شرایط سترون و زیر هود آزمایشگاهی، ضدغونی سطحی و بلافاصله دو بار با آب قطر سترون شستشو داده شدند. قطعات بر روی کاغذ صافی سترون آب گیری و به محیط غذایی PDA منتقل شدند. تشکلهای حاوی نمونه‌های برگی ضمن نگهداری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، بطور روزانه زیر بینوکولر بررسی شدند و پرگنه‌های رشد کرده در آنها به روش تکاسپور یا نوک ریسه، خالص سازی شدند. پس از خالص سازی برای نگهداری طولانی تر، جدایه ها به میکرولوله‌های حاوی محیط کشت ضعیف PCA^۱: (۲۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم هویج، ۲۰ گرم آگار، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب قطر) منتقال داده شدند و جهت جلوگیری از الودگی، درب میکرولوله ها با پارافیلم بطور دقیق مسدود و بعد از کد گذاری به یخچال چهار درجه منتقل گردیدند.

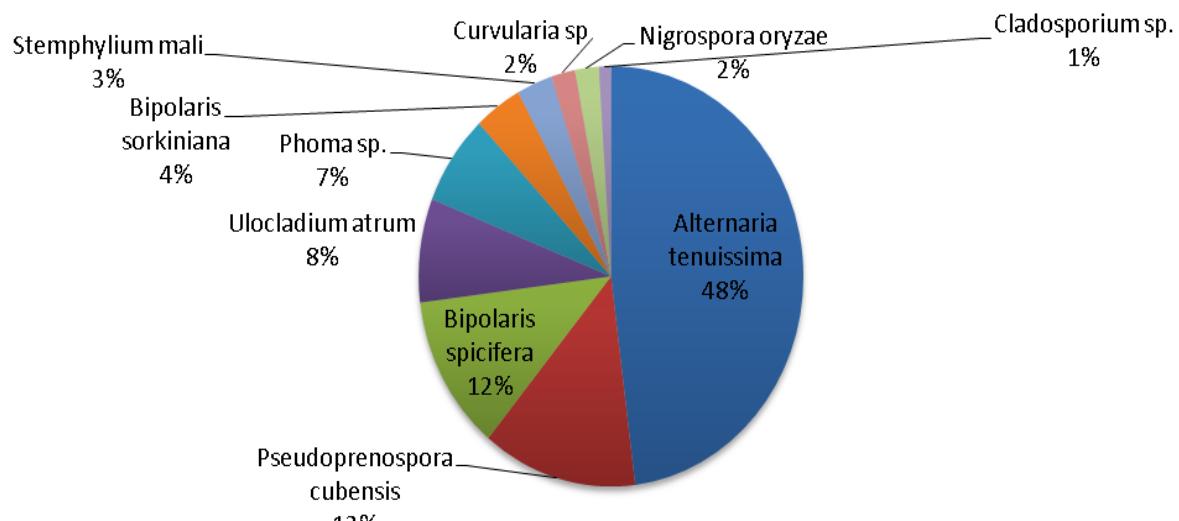
در مورد گونه *P.cubensis* که یک گونه پارازیت اجباری است از اپیدرم تحتانی برگ های آلووده با استفاده از یک سوزن نوک تیز، اسپرانژیوم های تیره رنگ که در زیر بینوکلر قابل رویت بودند، برداشته شد و اسلاید میکروسکوپی با استفاده از یک قطره محلول اسید لاکتیک برای مطالعه تهیه گردید. ضمناً بدليل محرز بودن بیماریزائی این گونه نیازی به آزمون بیماریزائی آن نیز تشخیص داده نشد.

شناسایی جدایه‌ها بر اساس صفات ریخت شناختی شناسایی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی ماکروسکوپی و میکروسکوپی با استفاده از کلیدهای شناسائی مربوط به هر کدام از جنس‌های قارچی انجام گرفت. برای این کار هر کدام از جدایه‌های قارچی بسته به گروه یا جنس قارچی در محیط‌های غذایی خاص کشت گردید و برای تعیین هویت در شرایط ویژه نگهداری شد به نحوی که برای توصیف و شناسایی جدایه‌های قارچی در این تحقیق شرایط پیشنهادی

^۱Potato carrot agar



شکل ۱- انواع لکه برگی‌های نمونه برداشته شده از مزارع خیار در شرایط طبیعی. A. علایم ناشی از *Stemphylium* E. علایم ناشی از *Alternaria atrum* D. *Bipolaris spicifera*. C. *Pseudoprenospora cubensis* Pseudoprenospora. H. *Cladosporium sp.* G. *Curvularia sp.* F. *mali* *cubensis* در قسمت تحتانی برگ.



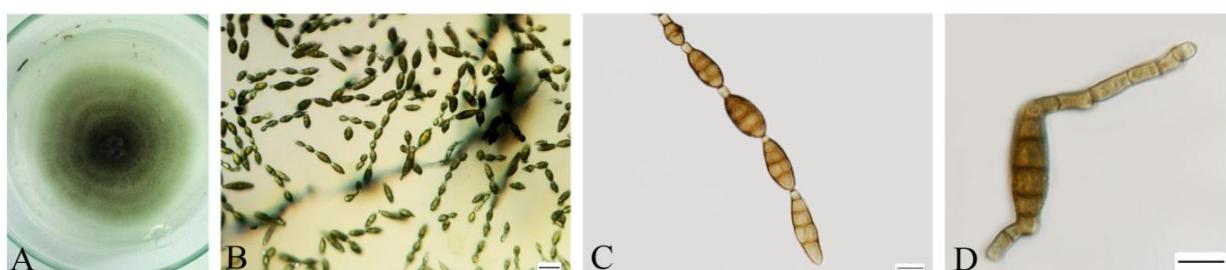
شکل ۲- درصد جذایه‌های جداسازی شده در این تحقیق.

عرضی و سطح آنها صاف تا زگیل دار بود. قطر ریسه‌های غوطه‌ور در محیط کشت ۴-۶ میکرومتر و قطر ریسه‌های هوایی ۳-۴ میکرومتر اندازه گیری شد. کنیدیومبرها ساده و اغلب در قسمت انتهایی فاقد انشعاب و بعضًا دارای خمیدگی‌های زانویی در انتهای بود. طول کنیدیومبرها تا ۱۲۰ میکرومتر و دارای ۳-۴ دیواره‌ی عرضی بودند. رنگ آنها، قهوه‌ای مایل به زرد تا قهوه‌ای تیره بود. کنیدیومها بصورت زنجیره‌های

خود نشان دادند. قطر پرگنهای ۷ روزه بین ۴ تا ۶ سانتی متر متغیر و حاشیه‌ی پرگنهای صاف بود. ریسه‌ها در سطح و درون محیط کشت نفوذ کرد و در اغلب جذایه‌ها ریسه‌های هوایی قابل رویت بودند. در بیشتر جذایه‌ها تعداد چهار دایره متحددالمرکز رویشی و اسپورژایی مشخص پس از هفت روز ایجاد شد. پرگنه این قارچ روی محیط کشت PCA به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه، ریسه‌ها منشعب، نیمه شفاف دارای دیواره‌ی

اندازه $10-12 \times 30-40$ میکرومتر، با دو تا هشت دیواره عرضی و به ندرت یک تا دو دیواره طولی بودند. نوک کنیدیومها به رنگ شفاف تا نیمه شفاف و به ابعاد $2-5 \times 3$ میکرومتر می شد (شکل ۳).

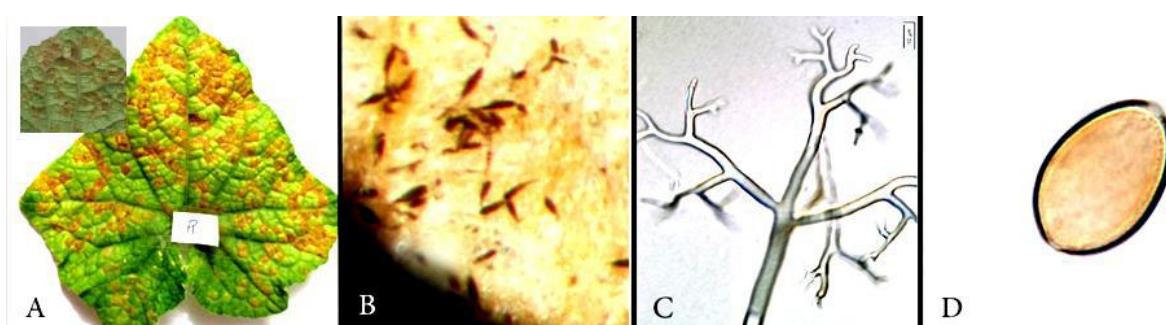
بلند غیرمنشعب روی کنیدیوم بر تشکیل شده و در هر زنجیره تعداد ۸-۱۲ کنیدیوم شمارش گردید. کنیدیوم بر ثانویه به ندرت تشکیل شد و طول آن تا $10-12$ میکرومتر اندازه گیری شد. کنیدیومها دارای سطح صاف یا منقوط اغلب تخمرغی تا بیضوی کشیده با



شکل ۳-۳. A. پرگنه هفت روزه گونه *Alternaria tenuissima*. B. PCA روى الگوي اسپورزايی. C. زنجيره کنیدیوم ثانویه. D. کنیدیوم بر ثانویه.

ابعاد $180-400 \times 5$ میکرومتر است. اسپورانژیوم های لیمویی شکل تا بیضی یا تخمرغی و در انتهای دارای پاپیل است. رنگ اسپورها قهوه ای روشن مایل به ارغوانی است. ابعاد آن $14-28 \times 20-39$ میکرومتر است (شکل ۴).

Pseudoperonospora cubensis (Berk. & M.A. Curtis) Rostovzev, Annals Inst. Agron. Moscow 9: 47 (1903) ویژگی های ریخت شناختی این گونه با استفاده از کلید شناسایی (او جیامبو، ۲۰۱۲) توصیف شد. اسپورانژیوم برها شفاف که در گروه های ۱-۵ تایی از استوماتا بیرون می آید و انشعابات دوشاخه و به



شکل ۴-۴. A. عالیم سفیدک درونی خیار. B. اسپورانژهای تیره در بخش تحتانی برگ. C. اسپورانژیوم بر منشعب و دوشاخه گونه D. اسپورانژیوم تخمرغی با بزرگنمایی $\times 10$.

جدول ۱- خصوصیات ریخت‌شناختی سایر عوامل قارچی دخیل در لکه برگی خیار در استان آذربایجان شرقی.

نام جدایه قارچی	مشخصات پرگنه	مشخصات کنیدیوم بر	کنیدی
<i>Bipolaris spicifera</i>	رنگ پرگنه سبز زیتونی مایل به قهوه‌ای تیره	کنیدیوم‌ها منفرد، چندیاخته‌ای، با سطح صاف، فاقد انشعاب یا بذرخوار دارای یک با سه بند کاذب	کنیدیوم‌ها راست، بیضوی به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای
<i>Alternaria atrum</i>	رنگ پرگنه زیتونی تیره با قابلیت تولید هاگ فراوان	کنیدیوم‌ها به رنگ روشن، در پایه روشن‌تر از قسمت بالایی، کوتاه، ساده تیره، صاف تا زگیل دار، شکل متغیر، کروی، تخم مرغی، یا بیضوی، دارای ۱-۲ دیواره طولی و یک دیواره عرضی	کنیدیوم‌ها منفرد، چندیاخته‌ای، با سطح صاف، فاقد انشعاب یا بذرخوار دارای یک با سه بند کاذب
<i>Phoma sp.</i>	رنگ پرگنه خاکستری مایل به سفید با میسلیوم‌های هوایی کم، پیکنیدیوم‌ها کروی تا نیم کروی به رنگ تیره مایل به سیاه و با یک استیول پاپیل مانند	کنیدیوم‌ها آمپولی یا گلابی شکل	کنیدیوم‌ها به رنگ سبز مخلملی، دارای حاشیه موج دار و به شکل دوازیر متعددالمرکز
<i>Bipolaris sorkiniana</i>	برگنه به رنگ سبز مخلملی، دارای حاشیه موج دار و به شکل دوازیر	کنیدیوم‌ها به شکل سیمپودیال، سطح آنها صاف، دارای دیواره عرضی و بعضی زانوبی‌شکل، رنگ آنها قهوه‌ای روشن، عرضی کاذب	کنیدیوم‌ها دوکی و بیضوی، به رنگ سبز زیتونی و قهوه‌ای کم رنگ، دارای ۳-۱۱ دیواره عرضی کاذب
<i>Stemphylium mali</i>	برگنه سفید مایل به کرم تا خاکستری، سطح پرگنه پنبه مانند، میسلیوم‌های سطحی مشخص	کنیدیوم‌ها بصورت منفرد، غیرمنشعب، کوتاه، استوانه‌ای، دارای دیواره عرضی	کنیدیوم‌ها بصورت منفرد
<i>Pleospora sp.</i>	پر تیسیوم‌ها سیاه، کروی تا نیمه- کروی	آسک‌ها استوانه‌ای، ۱۶۰×۳۵-۴۰ میکرومتر، دارای پایه کوتاه و حاوی ۸ آسکوپسپور توئی شکل با دو لایه دیواره کاملاً مشخص	آسکوپسپورهای بالغ کنیدیوم ها قهوه‌ای مایل به زرد، کنیدیوم‌ها توئی شکل یا بیضوی کشیده، در قسمت قاعده گرد و در انها گبدی کنیدیوم‌ها برنگ قهوه‌ای تا قوه‌ای زائی بصورت زیگزاگی روی مرغی که دیواره آن در قسمت میانه ضخیم‌تر از کناره‌ها
<i>Curvularia sp.</i>	رنگ پرگنه تیره مایل به خاکستری، و رشد منظم به طرف حاشیه‌ها	کنیدیوم‌ها شفاف، دارای دیواره عرضی و کنیدی زائی بصورت زیگزاگی روی کنیدیوم بر	کنیدیوم‌ها به رنگ شفاف، دارای دیواره عرضی و در رأس متورم، سلول کنیدی- زا به صورت مونوبلاستیک، شفاف و به شكل فلاش
<i>Nigrospora oryzae</i>	پرگنه خاکستری کم رنگ مایل به زیتونی، در قسمت سطحی مایل به کرم به صورت مخلملی	کنیدیوم‌ها به رنگ شفاف، دارای دیواره عرضی و در رأس متورم، سلول کنیدی- زا به صورت مونوبلاستیک، شفاف و به شكل فلاش	کنیدیوم‌ها ماکرو- و میکرونماتوس، انفرادی، به صورت انها وی و غیر زمینه‌های منشعب و جانبی. راموکنیدی شفاف تا نیمه شفاف، گاهی قوه‌ای مایل به زیتونی.
<i>Cladosporium sp.</i>	سبز زیتونی و در حاشیه خاکستری مایل به زیتونی، پشت سری، سطح پرگنه بصورت مخملی با حاشیه منظم	کنیدیوم‌ها زنجیری در انفرادی، به صورت انها وی و غیر زمینه‌های منشعب و جانبی. راموکنیدی شفاف تا نیمه شفاف، گاهی قوه‌ای مایل به زیتونی. سلول‌های کنیدی زا به صورت مجتمع میکرومتر، ضخیم و تیره رنگ	سازمانی و در حاشیه پشت سری، سطح پرگنه بصورت مخملی با حاشیه منظم

نموده و کشت مجدد قطعات برگ های گیاهان مایه زنی شده منجر به جدا سازی گونه های قارچی مایه زنی شده گردید. مضافا اینکه گونه های *B. spicifera* و *N. oryzae* برای اولین بار بعنوان عامل لکه برگی خیار معرفی می گردند.

آزمون بیماریزائی

نتایج حاصل از آزمون بیماریزائی جدایه منتخب از هرکدام از گونه های جداسازی شده در جدول ۲ درج گردیده است. همانطوریکه جدول مذکور نشان می دهد تمام گونه های جدا سازی شده از لکه برگی های گیاهان خیار بیماریزایی خود را در آزمون بیماریزائی ثابت

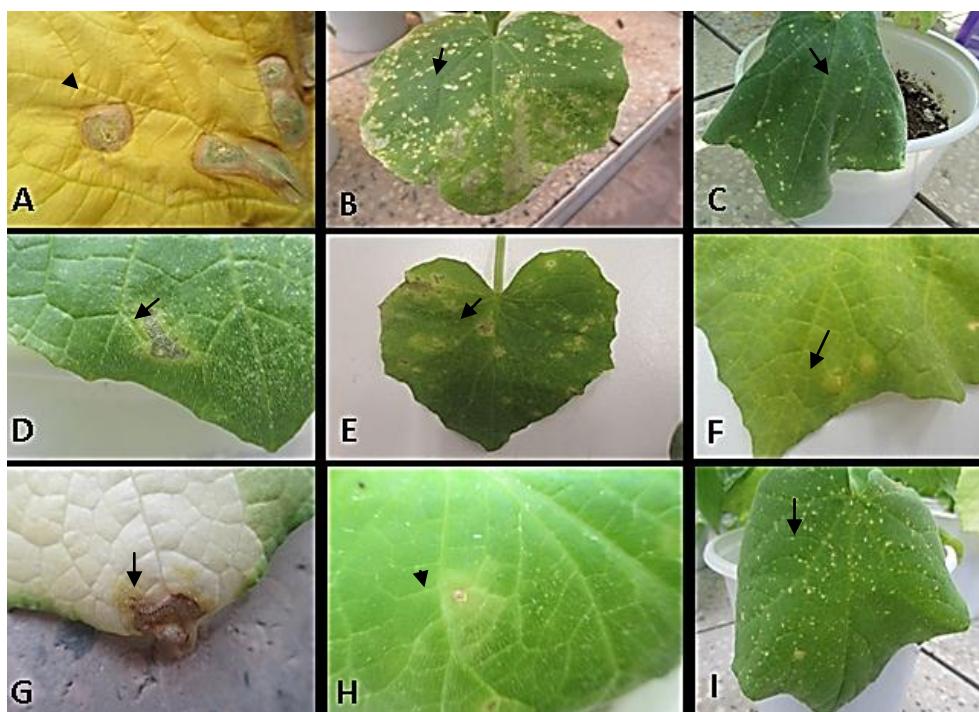
جدول ۲- نشانه های لکه برگی بر روی برگ های گیاهان مایه زنی شده در آزمون بیماریزائی.

نام گونه قارچی مایه زنی شده	نشانه های ظاهر شده
<i>Alternaria tenuissima</i>	ظهور لکه های سایه روشن بشکل دوایر متعدد مرکز ۱-۳ روز بعد از مایه زنی.
<i>Bipolaris spicifera</i>	ظهور لکه های کلروزه مایل به سفید هفت روز بعد از مایه زنی و بزرگ و نکروزه شدن لکه بعد از ۱۰ روز از مایه زنی.
<i>Bipolaris sorkiniana</i>	ظهور لکه های منفر زرد رنگ هفت روز بعد از مایه زنی بر روی برگ های پائینی، پیوستن لکه به همدیگر و تیره تر شدن رنگ ها توام با تولید حاشیه ای سبز در اطراف لکه ها روز بعد از مایه زنی
<i>Alternaria atrum</i>	ظهور لکه های کلرزه هفت روز بعد از مایه زنی و در نهایت بلاست و سوختگی برگ ها.
<i>Phoma sp.</i>	ظهور لکه های سفید نسبتاً وسیع ۱۰ روز بعد از مایه زنی و نکروز تدریجی بافت لکه ها.
<i>Stemphylium malii</i>	ظهور لکه های حلقوی زرد رنگ توام با حاشیه نسبتاً عریض برنگ لیموئی چهار روز بعد از مایه زنی و تیره نکروزه شدن تدریجی آن ها از روز دهم مایه زنی.
<i>Curvularia sp.</i>	ظهور لکه های حلقوی نکروزه با مرکز نسبتاً تیره هفت روز بعد از مایه زنی. پیوستن لکه به همدیگر و خشک شدن آن ها از روز دهم.
<i>Nigrospora oryzea</i>	ظهور لکه های زرد تاولی شکل ۱۰ روز بعد از آلوودگی در روی برگ های خیار بعنوان میزان جدید این گونه معرفی می گردد
<i>Cladosporium sp.</i>	ظهور لکه های سبز مایل به زرد چهار روز بعد از مایه زنی و بدنبال آن آب سوخته و خشک شدن بافت لکه ها ۱۰ روز بعد از مایه زنی

بحث

سaprofیت و پارازیت گیاهی است که از سراسر دنیا بعنوان آلوده کننده محصولات گیاهی گزارش شده است. گونه های آلترناریا دامنه میزانی وسیعی داشته و با ایجاد بیماری های مهم مانند شانکر ساقه، بلاست یا لکه برگی موجب وارد شدن خسارات قابل توجه روی اغلب گیاهان می شوند (زوما، ۲۰۰۳).

در این بررسی گروه های قارچی متعددی از برگ های با علایم لکه برگی جداسازی شد. گونه *Alternaria tenuissima* با ۴۸ درصد به عنوان غالب ترین عامل قارچی دخیل در لکه برگی خیار در استان آذربایجان-شرقی شناسایی شد. جنس آلترناریا شامل گونه های



شکل ۵- نشانه‌های لکه برگی ناشی از مایه‌زنی جدایه‌های قارچی در شرایط گلخانه‌ای: A. *Alternaria tenuissima* .B. *Nigrospora oryzae* .C. *Bipolaris sorkiniana* .D. *Bipolaris spicifera* .E. *Curvularia sp.* .F. *Cladosporium sp.* .G. *Alternaria atrum* .H. *Stemphylium mali* .I. *Phoma sp.* .J. *zae*

استان بعنوان عامل اصلی بیماری لکه برگی خیار جداسازی و شناسایی شد.

گونه *Pseudoperonospora cubensis* عامل بیماری سفیدک کرکی جالیزیان با فراوانی ۱۳ درصد به عنوان دومین گونه قارچی غالب دخیل در بیماری لکه برگی خیار در استان آذربایجان شرقی شناخته شد. این بیماری در همه مناطقی که گیاهان تیره کدوییان کاشته می‌شوند انتشار داشته و در شرایط مزرعه‌ای، گلخانه و یا کشت‌های زیر پوشش پلاستیکی ایجاد آلدگی می‌کند و در مناطق استوایی، بعضی از مناطق نیمه خشک مانند جنوب ایالات متحده، خاورمیانه، اروپا، ژاپن، استرالیا و جنوب افریقا انتشار دارد (پالتی و هرنث، ۱۹۸۰). این بیماری بر روی خیار، خربزه و هندوانه از تایوان نیز گزارش شده است (تسایی و لو ۱۹۹۲). در ایران در اکثر نقاط با آب و هوای مرطوب به ویژه روی خیار شیوع دارد و امروزه با گسترش سطح کشت گلخانه‌ای و پیش‌رس کردن محصول خیار و نیز به واسطه قدرت بالای بیماری زایی و تولید میثلی، قارچ عامل بیماری به سرعت گسترش یافته و خسارت قابل توجهی به محصول در

در ایران گزارش‌های متعددی از گونه‌های آلترياریا ارائه شده است گونه‌ی *Alternaria tenuissima* از روی خیار گزارش شده است (ارشداد، ۲۰۰۹). این گونه که به عنوان عامل بیماری لکه موجی سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی از کانادا معروف شده است، دامنه‌ی میزبانی وسیعی داشته و در دنیا از روی گیاهان لوبیا، دانه برنج، سورگوم، ارزن، بنفشه، گردو، فندق، گندم، آنبه، نخود، مرکبات، سوختگی سرشاخه‌های سیب قرمز، تاج خروس، ذغال‌اخته، برگ برنج، برگ چای، برگ چغندر، برگ توتون، برگ سویا، برگ کاهو، زنبق، میوه کاج، فلفل، توت فرنگی، پسته، کاکتوس، سیب‌زمینی، چمن، گوجه‌فرنگی، یونجه، مرکبات، بادمجان و آمارانتوس گزارش شده است (طاهری اردستانی، ۱۳۸۸). همچنین این گونه به عنوان عامل پوسیدگی میوه سیب از امریکا و افریقای جنوبی گزارش شده است (کو و همکاران، ۲۰۱۴). در این تحقیق نیز با توجه به بررسی‌ها و توصیف انجام پذیرفته این گونه از روی برگ‌های خیار جمع‌آوری شده از مزارع خیار

sorghina از روی چسبک از استرالیا (لنی، ۱۹۹۰) و گونه *P. exigua* از روی گل گندم خاردار از روسیه (ویدمر، ۲۰۰۲) واز روی تلخه از ترکیه گزارش شده است (تanalی و همکاران، ۲۰۰۳). گونه هایی از جنس فوما به عنوان بیمارگر گیاهان تیره کدوییان نیز شناسایی شده اند. *P. cucurbitacearum* به عنوان عامل بلاست شاخ و برگ هندوانه، خیار و کدو گزارش شده است (کیناث و همکاران، ۱۹۹۵). در جنوب غربی ایالت متحده امریکا این گونه روی خیار بسیار مخرب است (آمند و فاتاک، ۱۹۹۱). گونه های *P. exigua* و *P. lagenaria* نیز از روی خیار گزارش شده اند (کیناث و همکاران، ۱۹۹۵). در این تحقیق هفت جدایه از جنس *Phoma* از روی لکه برگی های خیار شهرستان شبستر و میانه جداسازی شد. از جنس *Stemphylium* تاکنون تعداد ۳۳ گونه از جنس *Stemphylium* شناسایی شده است (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹). گونه های شناسایی شده اند (شوند، مانند پوسیدگی سیاه هویج که عامل آن *S. radicum* بیماری لکه برگی یونجه ناشی از *S. botryosum* و لکه خاکستری گوجه فرنگی که توسط *S. solani* ایجاد می شود. علاوه بر این، گونه های دیگری هم به عنوان بیمارگر درختان میوه شناسایی شده اند (شیشکوف و لوربیر، ۱۹۸۹). در سال های ۲۰۰۵ الی ۲۰۰۸ از کره جنوبی لکه برگی هایی از درختان سیب و گلابی جمع آوری شدند که عامل آنها دو گونه از جنس *S. pyrinum* و *S. mali* تشخیص داده شدند (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹). در این تحقیق نیز با توجه به ویژگی های صفات بررسی شده، گونه *S. mali* جداسازی شده از روی برگ های خیار از شهرستان شبستر مورد شناسایی قرار گرفت. قبل از گونه های دیگری از این جنس روی خیار گزارش شده بودند که در سال های ۲۰۱۱ و ۲۰۱۲ اولین گزارش از بیماری لکه برگی ناشی از *S. solani* روی خیار شناخته شد (واکالوناکیس و مارکاکیکس، ۲۰۱۳). تفاوت این دو گونه از نظر ریخت شناختی می باشد بطوریکه ابعاد کنیدیوم های گونه اخیر بزرگتر از گونه *S. mali* است. ابعاد کنیدیوم ها در گونه *S. solani* ۳۵-۵۵×۱۸-۲۸ میکرومتر و طول کنیدیوم بر

شرایط مزرعه و گلخانه در مراحل مختلف رشد گیاه وارد می کند (رنجبور و همکاران، ۱۳۸۷). سایر گونه های قارچی که با فراوانی کمتر از برگ های خیار با عالیم لکه برگی از مزارع استان آذربایجان شرقی جداسازی شدند بترتیب فراوانی؛ شامل *Phoma* sp.٪/۱۲ *spicifera* *Stemphylium*٪/۴ *sorkiniana* *Bipolaris*٪/۷ *Nigrospora*٪/۲ *Curvularia* sp.٪/۳ *mali* ٪/۱ *Cladosporium* sp.٪/۲ *Oryzae* ٪/۱ هستند. گونه های مختلف جنس *Bipolaris* در دو گروه مختلف قرار می گیرند. در گروه اول گونه هایی با کنیدیوم های واحد بیش از هفت بند کاذب که گروه بیمارگرهای مهم گیاهان زراعی را تشکیل می دهند و در گروه دوم کنیدیوم های با کمتر از هفت بند کاذب مانند *B. spicifera* به همراه گونه هایی از جنس *Curvularia* قرار می گیرند (احمدپور و همکاران، ۱۳۹۱). چندین گونه مختلف از جنس *Bipolaris* از روی گیاهان مختلف از ایران گزارش شده است (ارشاد، ۲۰۰۹). ۷۰ گیاه میزبان گزارش شده است. برحی گونه های مانند *B. sorkiniana* *B. maydis* و *B. oryzae* باعث خسارت اقتصادی به گیاهان مهم از قبیل جو، ذرت و برنج می شود (احمدپور و همکاران، ۱۳۹۱). در این تحقیق نیز گونه *B. spicifera* و *B. sorkiniana* از لکه برگی های خیار جداسازی و مورد شناسایی قرار گرفتند.

گونه های جنس *Alternari* نیز دامنه ای انتشار وسیع داشته و باعث بیماری های مهم گیاهان زراعی و درختان میوه می شوند (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹). در این تحقیق نیز گونه های از *Alternari* از روی خیار جداسازی شد که از نظر مشخصات ریخت شناختی مشابه با گونه *A. atrum* است و با توجه به تطابق ویژگی های آن با مشخصات توصیف شده توسط سیمونز (۲۰۰۷) می توان آن را به *A. atrum* نسبت داد. گونه های مختلف جنس *P. herbarum* از روی گیاهان مختلف در دنیا گزارش شده اند. *P. herbarum* از روی ترشک از امریکا (گرین، ۱۹۶۴) و از *P. solani* کاسنی از ارمنستان (سیمونیان، ۱۹۸۱).

مشخصات توصیف شده توسط وو و همکاران (۲۰۱۴) برای گونه *N. oryzae* مطابقت داشت و به همین جهت می‌توان گونه جدا شده را *N. oryzae* تلقی کرد.

گونه‌های قارچ *Cladosporium* در سراسر جهان انتشار دارند. اسپورهای آنها در خاک، آب و هوا پیدا می‌شوند. در گیاهان زراعی و غلات باعث ایجاد لکه‌های سیاه، و روی کدوییان باعث ایجاد اسکب، در گوجه‌فرنگی باعث لکه‌های قهوه‌ای روی برگها می‌شوند. همچنین گونه‌های جنس *Cladosporium* می‌توانند باعث بیماری‌هایی مانند آسم در انسان شوند (اوگورک و *Cladosporium* همکاران، ۲۰۱۲). گونه *cucumerinum* که عامل اسکب خیار می‌باشد انتشار جهانی دارد (به، ۱۹۴۸). در این تحقیق گونه‌ای از *Cladosporium* از روی لکه‌برگی خیار از شبستر جداسازی شد که شناسائی آن براساس داده‌های ریخت شناختی امکان‌پذیر نبود.

نتایج تحقیق حاضر، نقطه شروعی برای بررسی‌های بعدی درباره شناسایی عوامل قارچی دخیل در بیماری لکه‌برگی خیار در مناطق دیگر با توجه به متفاوت بودن شرایط آب و هوایی، بررسی دامنه میزبانی عوامل جداسازی شده و ارزیابی مقاومت ارقام خیار در برابر هر کدام از عوامل دخیل در ایجاد لکه‌برگی می‌باشد.

تا بیش از ۲۰۰ میکرومتر و عرض آن ۴-۷ میکرومتر و سلول کنیدیزا در رأس کنیدیومبر متورم، عرض آن ۸-۱۰ میکرومتر می‌باشد (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹، واکالوناکیس و مارکاکیکس، ۲۰۱۳)

جنس *Curvularia* از جنس‌های مهم خانواده *Peleosporaceae* (دارای اسپورهای تیره) و یک گروه بزرگ هتروژنوس می‌باشد که دامنه‌ی میزبانی وسیعی از انسان گرفته تا گیاه را شامل می‌گردد (کورشی و همکاران، ۲۰۰۶). گونه‌های این جنس همه‌جازی بوده و در روی گیاهان مناطقی با دمای معتدل و نواحی استوایی یافت می‌شوند (مودی و تشن، ۲۰۱۲). در این تحقیق گونه‌ای از جنس *Curvularia* از روی برگ‌های خیار جداسازی شد که از نظر ریخت شناختی اسپورها و تعداد دیواره کاذب بسیار شبیه گونه *C. inaequalis* است (سیوانسان، ۱۹۸۷)، اما نیاز به بررسی‌های بیشتری می‌باشد چون گونه به دست آمده از نظر ابعاد کنیدی‌ها با گونه مذکور متفاوت می‌باشد.

جنس *Nigrospora* به عنوان یک پاتوژن گیاهی اندوفیت شناسایی شده است (فوکوشیما و همکاران، ۱۹۹۸). گونه‌هایی از این جنس از روی خیار نیز گزارش شده‌اند از جمله *N. sphaerica* که دامنه‌ی میزبانی وسیعی داشته و روی خیار نیز باعث تولید لکه‌برگی می‌شود (ماسون، ۱۹۲۷). در این تحقیق مشخصات مورفولوژیکی جدایه شده از روی برگ‌های خیار با

منابع

آمارنامه زراعی. ۱۳۸۴. سازمان جهاد کشاورزی استان خوزستان، واحد آمار و اطلاعات.

آمارنامه کشاورزی. ۹۰-۹۹. جلد اول. محصولات زراعی.

احمدپور، حیدریان ز و کرمی س، ۱۳۹۱. معرفی گونه‌های جدید از جنسهای *Curvularia* و *Bipolaris* روی گندمیان ایران. رستنیها. (۱) ۸۲-۶۹.

اسکندری ف، ۱۳۴۳. بیماری‌های گیاهی در استان‌های شمالی. مجله بیماری‌های گیاهی، جلد اول، شماره پنجم، صفحات ۹-۱۵

اعتباریان ح، ۱۳۷۶. بیماری‌های صیفی و سبزی و روش مبارزه با آنها. انتشارات و چاپ دانشگاه تهران.

جلالی ص، نعمت‌اللهی م و فرهادی ع، ۱۳۷۱. تاثیر تاریخ کاشت و خاکپوش‌های پلی‌اتیلن در شرایط نیم توزل بر درصد و شدت آلودگی بیماری سفیدک داخلی خیار در اصفهان. مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان.

رنجبرع، شهریاری د و راضی ر. ۱۳۸۷. ارزیابی مقاومت ژرمپلاسم خیار به بیماری سفیدک درونی کدوییان .*Pseudoperonospora cubensis* مجله حفاظت گیاهان. جلد ۲۲. شماره ۲.

طاهری اردستانی س، شریف‌نی ب و زارع ر و عباسی مقدم الف. ۱۳۸۸. گونه‌های جدید *Alternaria* همراه با لکه برگی سیب‌زمینی در مناطق مختلف کشت سیب زمینی ایران. بیماری‌های گیاهی. جلد ۴۵ شماره ۴ صفحات ۳۰۸-۳۰۱.

Amand PC, and Phatak TC, 1991. Crop loss to 14 diseases of cucumber in North Carolina from 1983 to 1988. Cucurbit Genetics Cooperative.14: 15-17.

Aslan J, 2010. *Alternaria* diseases of vegetable crops and new approaches for its control. Biology 1(3): 681-69.

Beh L, 1948. Histologische unter suchungenankraetze krankengurken (*Cucumis sativus* L.) unter besondererberuchsichtigung des Kranksheitsverlaufes der Kraetze (*Cladosporium cucumerinum* Ell.EtArth.) anFruchten. Phytopathology 15: 92-123.

Bhargava AK, and Singh RD, 1985. Comparative study of *Alternaria* blight, losses and causal organisms of cucurbits in rajasthan. Plant Pathology 15: 150-154.

Cohen Y, and Rotem J, 1987. Sporulation of foliar pathogens.Pp: 314-333 In: Pegg, GF and Ayres, P G Fungal infection of Plants. (Eds) Cambridge University Press.

Ershad D. 2009. Fungi of Iran.3rd edition. Iranian Research Institution of Plant Protection, 531 pp.

Fukushima T, Tanaka M, Gohbara M and Fujimoiis, T. 1998. Phytotoxicity of three lactones from *Nigrospora sacchari*. Phytochemistry. 48: 625-630.

Greene HC. 1964. Notes on parasitic fungi XXX". Trans Wisconsin Academic Science. 53: 177-196.

Keinath AP, Farnham MW and Zitter TA, 1995. Morphological, pathological, and gentic differentiation of *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp. isolated from cucurbites. The American Phytopathological Society.

Kou LP, Gaskins VL, Luo Y G, and Jarick II, WM, 2014. First report of *Alternaria tenuissima* causing post harvest decay on apple fruit from cold storage in the United States. Plant diseases. 98: 5.

Lebeda A, and Urban J. 2007. Temporal changes in pathogenicity and fungicide resistance in *Pseudoperonospora cubensis* populations. ISHS Acta Horticulturae 731:327–336.

Lenne JM. 1990. World List of Fungal Diseases of Tropical Pasture species. Phytopathology. 31: 1-162

Mamgain A, Roychowdhury R, and Tah J, 2013. *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. Biology. 1: 1-9.

Mason E V, 1927. *Nigrospora sphaerica* .Transactions of the British Mycological Society.12: 158.

Moody MN, and Tschen J, 2012. Cutaneous *Curvularia* infection of the forearmCutis. 89:65-68.

Ogork R, Lejman A, and Pusz W, 2012. Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. Mycologia, 19 (2): 80-85.

Ojiambo S, 2012. Epidemiology of cucurbit Downy Mildew: effects of weather variables on infection parameters and disease severity and source strength relationships. North Carolina State University.

Palti J, and Hernneth R, 1980. Distribution of Downy Mildew Fungi Over the orders, Families and Genera of Higher Plants. Spencer, DM (ed). The Downy Mildew. Academic Press. London. Pp. 110-112.

Qureshi S, Wani SA, and Beg S, 2006. *Curvularia dermatomycosis* in jersey heifer: A Case Report Pakistan Veterinary Journal 26(3): 149-150.

Shishkoff N and Lorbeer JW, 1989. Etiology of *stemphylium* leg blight on onion. Phytopathology. 79: 301-304.

- Simmons EG, 2007. *Alternaria*. An identification manual. CBS Biodiversity Series 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.
- Simonyan SA. 1981. [Mycoflora of Botanical Gardens and Arboreta in Armenia.]. Hayka. 232 PP.
- Sivanesan A, 1987. Graminicoloous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their Telemorphs, p: 261. CAB International Mycological Institute, UK.
- Thomas CE, 1996. Downy mildew. In: pp. 25-27. Compendium of Cucurbit Diseases. Ithaca, NY: Cornell University Press.
- Thomma B, 2003. *Alternaria* spp.: From general saprophyte to specific parasite. Molecular Plant Pathology 4 (4): 226-236.
- Tsai WH and Lo CT, 1992. Ecology and control of downy mildew on cucurbits. Plant Protection Bulletin Taipei 34(2): 149-161.
- Tunali B, Eskandari FM, Berner DK, Farr DF and Castlebury LA. 2003. First report of leaf blight caused by *Phoma exigua* on *Acropiton repens* in Turkey. Plant Disease 87(12): 1540
- Vakalounakis DJ, and Markakis EA, 2013. First report of *Stemphylium solani* as the causal agent of a leaf spot on greenhouse cucumber. Plant Disease 2(97): 287-287.
- Wang Y, Hong-Bo FU and Nichole NR, 2009. Two new species of *Stemphylium* from Northwest China. Mycological Progress 8(4): 301-304.
- Widmer T. 2002. First report of *Phoma exigua* on *Centaurea solstitialis* (Asteraceae) in Russia. Plant Disease 86(8): 922.
- Wu J B, Zhang C L, Mao P P, Qian Y S and Wang H Z, 2014. First Report of Leaf Spot Caused by *Nigrospora oryzae* on *Dendrobium candidum* in China. Plant Disease 98 (7) 996 .

Identification and Pathogenicity of Fungi Causing Cucumber (*Cucumis sativus L.*) Leaf Spot Disease in East Azerbaijan Province

F Eghbali¹, A Babai-Ahari^{2*} and M Arzanloo³

¹Fomer MSc Student, Department of Plant Protection, University of Tabriz.

²Professor, Department of Plant Protection, University of Tabriz.

³Associate Professor, Department of Plant Protection, University of Tabriz.

*Corresponding author: ababaiahri@yahoo.com

Received: 27 Sep 2015

Accepted: 16 April 2016

Abstract

Leaf spot disease is known as one of the limiting factors in cucumber cultivation in east Azarbaijan province and causes major damages on the crop yield annually. Purpose of the current study was to monitor leaf spot disease of cucumber in East Azerbaijan province and identify the pathogenic fungal species using morphological data. To this purpose, sampling was carried out during summer 2013 from main cucumber production areas of Shabestar, Ahar, Myaneh and Basmenj regians. During this research, a total of 90 samples were collected and 100 fungal isolates were isolated from infected samples that had various symptoms of leaf spot. Results of the present study confirmed that the leaf spot symptoms were caused by different fungal species in the provincial farms. By morphological study and investigation of macroscopic and microscopic features, the fungal species of *Stemphylium mali*, *Ulocladium atrum*, *Cladosporium* sp., *Nigrospora oryzae*, *Bipolaris sorkiniana*, *Phoma* sp., *Pseudoprenospora cubensis*, *Bipolaris spicifera*, *Curvularia* sp., *Alternaria tenuissima* were identified as the causal agent of cucumber leaf spot disease. Among the identified species, isolates of *Alternaria tenuissima* and *Pseudoprenospora cubensis* were more frequent than others with 48% and 13% isolation frequencies, respectively.

Keywords: Cucumber fungal leaf spot, East Azarbaijan Province, *Alternaria*, *Pseudoperonospora*.