

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

اسدالله بابای اهری<sup>۱\*</sup>، روزین گل محمدی<sup>۲</sup> و مهدی ارزنلو<sup>۱</sup>

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 پذیرش: ۹۵/۱/۲۲

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۱۶

### چکیده

بیماری‌های لکه برگ 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 قارچ‌های هستند که در ایجاد این بیماری‌ها نقش دارند. در استان آذربایجان شرقی علی‌رغم خسارت قابل توجهی که لکه برگ‌ها به درختان صنوبر وارد می‌سازند عوامل قارچی دخیل در ایجاد این بیماری‌ها هنوز ناشناخته باقی مانده‌اند. پژوهش حاضر با هدف شناسایی و بررسی بیماری‌زایی قارچ‌های همراه با بیماری لکه برگ درختان صنوبر در استان آذربایجان شرقی و بخشی از استان‌های آذربایجان غربی و اردبیل انجام پذیرفت. در این تحقیق ۱۳۴ جدایه قارچی از ۲۲۰ نمونه دارای علائم لکه برگی جداسازی، خالص‌سازی و مورد مطالعه قرار گرفتند. بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی گونه‌های *Septoria populi*، *B. sorokinia*، *Bipolaris spicifera*، *Exserohilum cf.*، *Epicocum nigrum*، *Nigrospora oryzae*، *Sporormiella minimoides*، *Stemphylium sp. protrudens*، *Marssonina castagnei* و *Arthrinium sacchari* به عنوان گونه‌های قارچی همراه با بیماری لکه برگ 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 گونه‌های *Se. populi*، *A. sacchari*، *M. castagnei*، *Ep. nigrum*، *N. oryzae*، *Stemphylium sp.*، *B. sorokiniana*، *B. spicifera*، 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 لکه برگ، استان آذربایجان شرقی.

### مقدمه

صنوبر آغاز شد و مطالعاتی در خصوص انتخاب کلون و دورگیری، 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

انواع درختان متعلق به جنس صنوبر (*Populus 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 ۱۳۳۴ همزمان با عضویت ایران در کمیسیون بین‌المللی

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. populi* (Lib.) Magnus شامل *M. M. brunnea* (Ellis and Everh.) Magnus و *castagnei* (Desm. and Mant) Magnus 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 برگ صنوبر توسط گونه‌های جنس *Pollaccina* Bald and cif مانند گونه *P. radiosa* ، *P. populi* Morelet ، *elegans* Labor و *P. mandshurica* و *P. borealis* Funk 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 بیماری‌های لکه برگ صنوبر که از درجه‌ی اهمیت کمتری برخوردار هستند، می‌توان به لکه برگ کلاوسپوریومی با عامل *Cladosporium subsesside* Ellis and Barthol و لکه برگ سرکوسپوریایی با عامل *Cercospora populina* Fresen و بلاچ سپتوتینیایی با عامل *Septotinia populiperda* Waterman and Cash (تارپ ۱۹۱۷ و اترمن کش ۱۹۵۰، ساتون ۱۹۷۰). در ایران تحقیقات و بررسی‌های نسبتاً محدودتری در مورد شناسائی عوامل لکه برگ درختان صنوبر انجام پذیرفته بطوریکه گونه‌های *Se. Se. candia* ، *Se. Se. davatchi* و *Se. Se. populi* از جنس *Septoria* و گونه

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).

متأسفانه 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 برگ‌ها اشاره کرد (سلرینو، ۱۹۹۹). لکه برگ‌ها 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 ۶۳٪ در اثر بیماری‌های لکه برگ برای کلون‌های هیبرید با حساسیت زیاد نیز گزارش شده است (کردوکرد ۱۳۸۹). از لکه برگ‌های بسیار مهم که از عوامل محدود کننده‌ی تولید انواع صنوبر نیز شناخته شده‌اند، می‌توان به لکه برگ و شانکر سپتوریایی، آنتراکنوز، اسکب و بلایت برگ اشاره کرد.

لکه برگ و شانکر سپتوریایی که توسط *Se. musiva* peck با تلئومورف *Mycosphaerella populorum* Thomps مختلف جهان مانند کانادا (لانگ و همکاران ۱۹۸۶)، ایالات متحده آمریکا (لوی 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

اتانول ۷۰٪ و دوبار شستشو با آب مقطر استریل، بر روی کاغذ صافی استریل آبگیری و به محیط کشت PDA<sup>۱</sup> منتقل شدند. بعد از رشد پرگنه ها و آغاز اسپورزایی، خالص سازی به روش تک اسپور انجام پذیرفت. در مرحله‌ی آخر جدایه‌های قارچی خالص سازی شده درون لوله‌های استریل دو میلی لیتری حاوی محیط کشت<sup>۱</sup> 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) و 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 پرگنه‌ها 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 برگ‌ها از روش برگ بریده و با استفاده از روش آریانو و همکاران (۲۰۰۱) با اندکی تغییر انجام گرفت. برای این منظور برگ‌های جوان و سالم از درختان رقم نیگرا جمع‌آوری و بعد از ضدعفونی سطحی با اتانول

*M. castagni* از جنس *Marssonina* گزارش گردیده است (ارشاد ۱۳۸۸) در این تحقیق تلاش گردید عوامل قارچی مولد لکه برگ درختان صنوبر در استان آذربایجان شرقی، بخشی از استان آذربایجان غربی (خوی و بوکان) و شهرستان مشکین شهر از استان اردبیل جداسازی شده و با استفاده از مشخصات ریخت‌شناختی مورد شناسایی قرار گیرند و بعد از محاسبه فراوانی هر کدام از گونه‌های قارچی، بیماری‌زا بودن آن‌ها با اجرای اصول کخ ارزیابی گردد.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌برداری

نمونه‌برداری طی بازدیدهایی که از اطراف باغات و صنوبر کاری‌های شهرستان‌های مختلف آذربایجان شرقی و شهرستان خوی و بوکان واقع در آذربایجان غربی 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 ۳-۴ 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

<sup>۱</sup>PDA

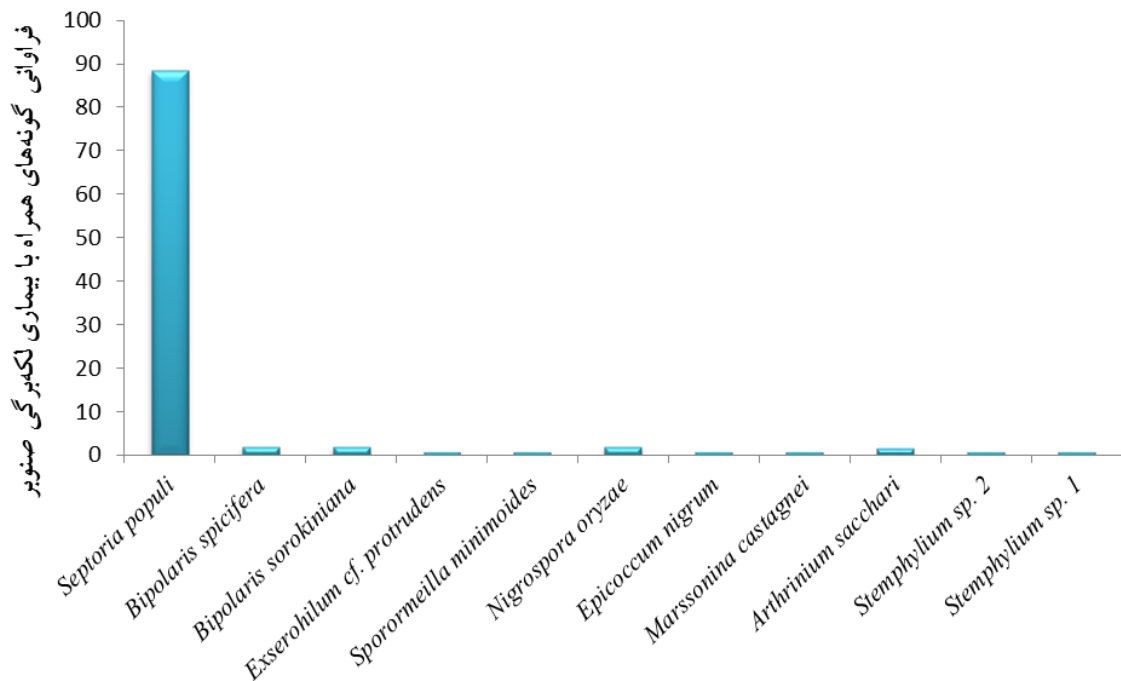
## نتایج

نتایج این پژوهش نشان داد که ۱۳۴ جدایه قارچی جدا سازی شده از تعداد ۲۲۰ نمونه برگ تهیه شده از درختان صنوبر بیمار، بر اساس ویژگی های ریخت شناختی متعلق به گونه های *Se. populi* (۸۸٪)، *Bipolaris spicifera* (۲/۹۸٪)، *Bipolaris Exserohilum cf. protrudens sorokiniana* (۰/۷۴۶٪)، *Stemphylium spp.* (۱/۴۹۲٪)، *Nigrospora oryzae* (۲/۲۳٪)، *M. castagnei* (۰/۷۴۶٪)، *Sporomiella minimoides* (۱/۴۹٪) و *Arthrinium sacchari* (۰/۷۴۶٪) به عنوان قارچ های همراه با لکه برگ درختان تبریزی در مناطق مورد بررسی شناسائی شدند در این بین گونه *Se. populi* با ۸۸٪ بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد (شکل ۱). با این حال گونه های شناسائی شده از مناطق و شهرهای مختلف متفاوت بودند (جدول ۱).

۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه، دوبار با آب مقطر استریل شسته شدند. سپس با استفاده از کاغذ صافی استریل خشک شده و در داخل پتری های حاوی آب آگار ۰/۱۶ درصد و ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر قارچکش کار بنزازیم (به منظور جلوگیری از پیری زود رس) قرار گرفتند. در این مرحله از کشت های جوان متعلق به هر کدام از گونه های شناسایی شده با استفاده از چوب پنبه سوراخ کن مقدار سه بلوک به قطر پنج میلی متر از محیط کشت PDA حاوی ریسه قارچی با فواصل مساوی از هم بر روی برگ های داخل پتری قرار داده شد و بعد از نگهداری به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، علائم بیماری بررسی و گونه های قارچی از برگ های دارای علائم آلودگی مجددا جدا سازی گردیدند. در تیمار شاهد از بلوک های محیط کشت فاقد ریسه استفاده گردید.

جدول ۱- گونه های قارچی جداسازی و شناسائی شده از درختان تبریزی شهرستان های مورد مطالعه.

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



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

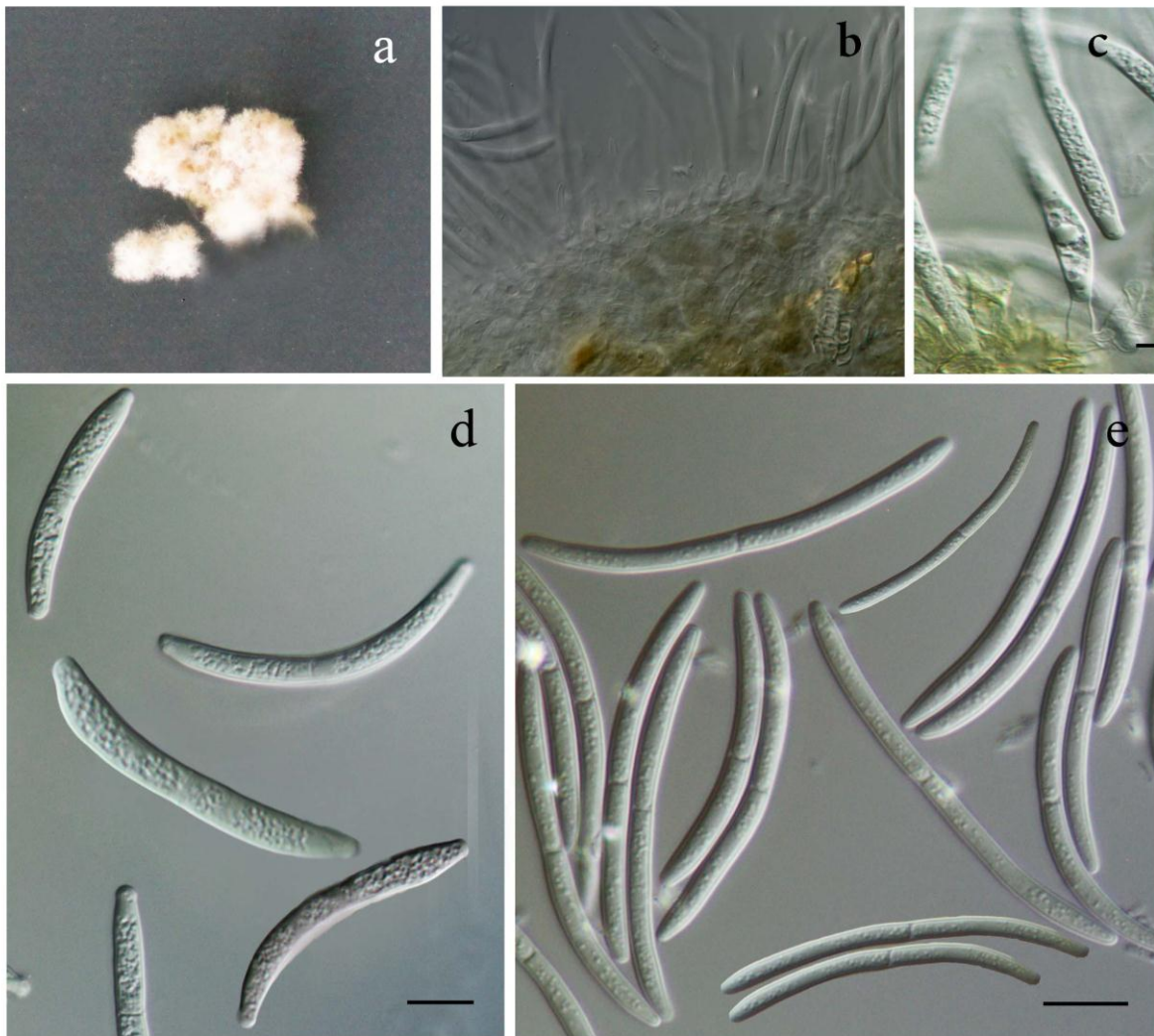
سطح داخلی حفره پیکنید را پوشانده بودند. سلول‌های کنیدی‌زا یک تا دو سلولی، فلاسکی شکل تا استوانه‌ای پهن، بی‌رنگ، دارای سطحی صاف و به ابعاد ۳-۸ × ۵-۱۲ میکرومتر بوده و یک کنیدی در انتهای خود تولید می‌کردند. کنیدی‌ها دارای ۲-۱ دیواره عرضی، بی‌رنگ، صاف، به ابعاد ۳-۴ × ۴۰-۵۵ میکرومتر، دوکی شکل، خمیده و به ندرت راست، در پایه مسطح و به سمت انتها باریک‌تر می‌شدند. در سطح محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در شرایط تاریکی پیکنید تمایز یافته ایجاد نمی‌شد. کنیدی‌ها در داخل تجمعات ریشه‌ای 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.

#### توصیف گونه‌ی غالب

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

#### ویژگی‌های ریخت‌شناختی

توصیف و شناسایی جدایه‌های این گونه بر اساس صفات ریخت‌شناختی روی برگ‌های آلوده جمع‌آوری 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. کنیدی‌فورها کاهش یافته و تبدیل به سلول کنیدی‌زا شده بودند. سلول‌های کنیدی‌زا کل



شکل ۲- *Septoria populi*: پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA: b-c: کنیدی ها و کنیدیفورها، 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.

دیواره صاف و به قطر ۲-۱ میکرومتر بودند. ریشه‌ها شفاف تا نیمه شفاف، منشعب، دیواره‌دار، دارای تورم-های ریشه‌ای متعدد و به قطر ۴-۲ 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 سودوپارانثیمی به رنگ قهوه‌ای تیره بود. آسک‌ها حاوی هشت عدد آسکوسپور استوانه‌ای، با انتهای گرد، دارای پایه کوتاه و به ابعاد

*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. میسلیم‌ها متشکل از ریشه‌های سطحی و غوطه‌ور در آگار و فاقد ریشه‌های هوایی بودند. ریشه‌های سطحی شفاف، منشعب، دارای دیواره‌ی عرضی،

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

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

نام جدابه قارچی	مشخصات پرگنه	مشخصات کنیدیوفور	مشخصات کنیدی
<i>Arthrinum sacchari</i> (Speg)	روی محیط کشت OA مسطح، نمدی، دارای میسلیم هوایی متراکم و به رنگ خاکستری تیره با قطر روز به ۹۰ میلی‌متر پس از هفت .	سلول‌های کنیدی‌زا به صورت خوشه‌ای بر روی میسلیم تشکیل شده و شفاف تا قهوه-ای کم‌رنگ، دارای سطح صاف، به اشکال متنوع (بشکله‌ای شکل تا گریزی) و به ابعاد ۴-۵ × ۴-۵ .	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.
<i>Bipolaris spicifera</i> (Bainier) Subram	روی PDA مخملی پرنگ 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 زانوماند و به طول حداکثر ۲۴۲ میکرومتر	کنیدی‌ها استوانه‌ای شکل، قهوه‌ای تیره، فاقد cutoff. دارای ۱۰-۸ دیواره‌ی عرضی کاذب و به ابعاد ۱۳-۱۰ × ۲۳-۲۵ میکرومتر.
<i>Bipolaris sorokiniana</i> (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 زانوماند بودند. اندازه عرض کنیدیوفور ها ۸-۵ میکرومتر و طول آن‌ها ۱۵۰-۹۵ میکرومتر	کنیدی‌ها دوکی شکل، قهوه-ای روشن، فاقد cut off ، دارای ۸-۶ دیواره‌ی کاذب و به ابعاد ۲۲-۱۲ × ۶۸-۲۲ میکرومتر بودند.

کنیدی ها به اشکال کروی تا گلابی با دیواره های نامنظم ، برنگ قهوه ای به ابعاد ۱۲-۱۹*۱۶-۱۰ میکرومتر	کنیدیوفور ها کاهش یافته و تبدیل به سلول های کنیدیزای بیرنگ و چماقی شکل با ۲-۰ دیواره عرضی و به اندازه ۹-۶ میکرومتر	روی <b>PDA</b> برنگ قهوه ای مایل به قرمز و سبز زیتونی با ریشه های هوایی فراوان. قطر پرگنه بعد از هفت روز ۳۰ میلی متر توام با اسپورودوکیوم های پودری به رنگ تیره	<i>Epicoccum nigrum</i> Link
کنیدی به رنگ قهوه ای زیتونی، دوکی شکل، بعضی مواقع کوتاhter و پهن تر ، منقاردار، صاف، راست یا انحنا دار، دارای ۱۰-۵ دیواره ی کاذب و ابعاد کنیدی ۲۰-۱۵×۱۰۰-۶۰ میکرومتر	کنیدیوفورها استوانه ای، به رنگ قهوه ای زیتونی، دیواره - دار، راست تا کمی خمیده و به ابعاد ۲۸۰-۱۰۰ میکرومتر	روی محیط کشت <b>PDA</b> مخملی، خاکستری مایل به قهوه ای و حاشیه ی آن سبز زیتونی، قطر پرگنه هفت روزه ۸۰ میلی متر.	<i>Exserohilum cf. protrudens</i> Alcorn
کنیدی ها شفاف تخم مرغی تا گلابی شکل به ابعاد ۶×۲۱-۱۶ با یک دیواره عرضی که کنیدی را به دو سلول نامساوی تقسیم کرده است.	سلول های کنیدیزا فیالیدیک، بشکه یا فلاسکی، بیرنگ و با سطح صاف	توصیف این گونه بر اساس صفات ریخت شناختی بر روی میزبان انجام گرفت. آسروول های گرد تا نیمه گرد به قطر ۱ میلی متر بصورت پراکنده در زیر اپیدرم محل لکه هادیده شدند.	<i>Marssonina castagnei</i> (Desm. and Mont) Magnus
کنیدیها قهوه ای مایل به سیاه، مسطح به شکل گرد و به قطر ۱۵-۱۰ میکرومتر و ضخامت ۱۰ میکرومتر	سلول های کنیدی زا بی رنگ با سطح صاف، امپولی شکل و به ابعاد ۱۱×۷-۹×۷-۷ میکرومتر	روی <b>OA</b> فاقد ریشه های هوایی، برنگ سفید مایل به خاکستری به سطح مسطح، قطر پرگنه هفت روزه ۹۰ میلی متر	<i>Nigrospora oryzae</i> Berk and Broom
کنیدی های بالغ ۲۲-۱۵×۲۷-۱۹ میکرومتر، صاف، دارای سطح منقوط، بیضوی پهن، قسمت قاعده ای نیمه تخت، قسمت انتهایی گرد یا نیمه تخت، قهوه ای مایل به سبز زیتونی، دارای ۳ دیواره ی عرضی و ۷ دیواره ی	کنیدیوفورها منفرد، ۵-۴×۸-۴۰ میکرومتر، صاف، دارای دیواره ی عرضی، فاقد انشعاب، استوانه ای، راست یا اندکی خمیده و قهوه ای کمرنگ. کنیدیوفورها در برخی موارد کاهش یافته و تبدیل به سلول کنیدی زا	بر روی محیط کشت <b>PCA</b> خاکستری تا خاکستری مایل به قهوه ای، مسطح و با حاشیه ی صاف. قطر پرگنه های هفت روزه ۶۰ میلی متر با دواير متحدالمرکز به طور نیمه واضح توام با تورم های هیفی	<i>Stemphylium</i> sp. Wallr



**آزمون بیماریزائی**

شماره ۳ ثبت گردید. گونه هائی که موفق به ایجاد بیماری شده بودند مجدداً از برگ‌های دارای نشانه‌های آلودگی جدا سازی گردیدند (جدول ۳).

نتیجه آزمون بیماریزائی جدایه‌های منتخب هر کدام از گونه‌های قارچی بعد از ۱۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ارزیابی و به قرار جدول

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

ردیف	نام گونه قارچی	نتیجه آزمون بیماریزائی
۱	<i>Bipolaris spicifera</i>	ایجاد لکه‌های سیاه بزرگ با حاشیه نامنظم. در مرحله بعد لکه‌ها به هم پیوسته و قسمت اعظم برگ را فرا می‌گیرند.
۲	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	ایجاد لکه‌های سیاه بزرگ با حاشیه نامنظم.
۳	<i>Exserohilum cf. protrudens</i>	فاقد نشانه‌های آلودگی.
۴	<i>Marssonina castagnei</i>	ایجاد لکه‌های گرد با حاشیه نامنظم و واضح. مرکز لکه‌ها زرد مایل به قهوه‌ای توام با آسرول.
۴	<i>Septoria populi</i>	ایجاد لکه‌های قهوه‌ای روشن با حاشیه نامنظم.
۵	<i>Sporormiella minimoides</i>	فاقد نشانه‌های آلودگی
۶	<i>Stemphylium sp.</i>	ایجاد لکه‌های بزرگ تیره رنگ با حاشیه نامنظم.
۷	<i>Nigrospora oryzae</i>	فاقد نشانه‌های آلودگی
۸	<i>Epicoccum nigrum</i>	فاقد نشانه‌های آلودگی

**بحث**

*S. musiva* با داشتن ۴-۱ دیواره عرضی در کنیدیوم‌های خود از گونه *Se. populi* قابل تفکیک است (کالان و همکاران، ۲۰۰۷) در مقابل دو گونه *Se. populicola* و *Se. populi* با داشتن تعداد مشابه دیواره عرضی از نظر اندازه و ابعاد کنیدیوم از یکدیگر قابل تفکیک هستند. بطوریکه مطالعات ریخت‌شناختی تعلق جدایه‌های تهیه شده را به گونه *Se. populi* تأیید کرد. با این حال با توجه به اینکه ویژگی‌های ریخت‌شناختی می‌تواند تحت تاثیر شرایط محیطی و غیره نیز قرار گیرد بنا براین برای تعیین صد در صدی هویت گونه مذکور بررسی‌های مولکولی نیز توصیه می‌گردد.

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*

در این بررسی گروه‌های قارچی متفاوت از برگ‌های درختان تبریزی دارای لکه‌برگی جدا سازی گردیدند. در بین ۱۳۴ جدایه‌ی جداسازی شده، گونه *Se. populi* با فراوانی ۸۸٪ به عنوان گونه‌ی قارچی غالب همراه بیماری لکه‌برگی درختان تبریزی از شهرستان‌های اهر، بستان آباد، مرنند، مشکین شهر و خوی به تنهایی و یا به همراه سایر گونه‌ها شناسائی گردید. گونه‌های *Septoria* از جمله بیمارگرهای مهم گیاهی بوده و خسارات قابل توجهی را به گیاهان زراعی، زینتی و درختان میوه وارد می‌سازند (کوادولینگ و همکاران، ۲۰۱۳ و ورکلی و همکاران ۲۰۱۳). گونه‌های *S. populi* و *Se. populicola* از این جنس بر روی درختان تبریزی بیماری‌زا بوده و بعنوان عامل لکه‌برگی درختان صنوبر شناخته شده‌اند. گونه

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 می باشد (<http://nt.ars-grin.gov/>).

گونه های *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 ۷۶٪ از جدایه های قارچی موجود در این بررسی را تشکیل می داد. 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* می باشد.

گونه های جنس *Sporomiella* غالباً بر روی فضولات جانوران خون گرم بسر می برند (هانلین ۲۰۰۱، 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 می باشد (هانلین ۲۰۰۱). 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 *St. vesicarium* و *St. solani botryosum* بر روی

از روی *P. caspica* توسط اسفندیاری و پتراک در سال ۱۹۵۰ گزارش گردیده است (به نقل از ارشاد ۱۳۸۸). 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 جدایه های جنس *Bipolaris* از کلید توصیف شده توسط احمد پور و همکاران (۱۳۹۰) استفاده شد. مطابق کلید مذکور صفات ریخت شناختی شامل شکل کنیدیوم، تعداد دیواره های عرضی کاذب، میزان یاخته های میانی و وضعیت آن ها نسبت به یاخته های انتهائی و نیز ابعاد کنیدیوم و کنیدیوفور گونه های موجود در این بررسی *B. sorokiniana* و *B. spicifera* شناخته شدند. برخی از گونه های این جنس مانند *B. B. oryzae*، *B. maydis*، *sorkiniana* خسارت شدیدی بر روی گندم، ذرت و برنج وارد می سازند. *B. sorokiniana* دارای دامنه میزبانی وسیع بوده و به عنوان عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گندم شناخته شده است (احمدپور و همکاران ۱۳۹۰). گونه *B. spicifera* از بیش از ۷۷ گونه گیاهی مختلف مانند گندم، چمن، مرغ، چاودار و درختچه های مو گزارش شده است اما گزارش این دو گونه از روی درختان صنوبر برای دنیا جدید می باشد.

گونه های 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 کنیدیوزا و کنیدیوم ها و مشخصات اسپورو دوخیوم مورد استفاده قرار گرفت، بر این اساس جدایه های موجود تحت عنوان گونه *Ep. nigrum* شناسائی گردید.

جنس *Exserohilum* از خاک، گیاهان و نیز بعنوان مایکوپارازیت از قارچ های دیگر جدا سازی شده اند (گیراود و همکاران ۱۹۹۷، سان و همکاران ۲۰۰۵). جهت

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 گونه ای موجود به عنوان *N. oryzae* شناسائی گردید. این گونه عموماً بیمارگر گیاهان مختلف مانند برنج، ریشه ذرت و عامل لکه برگ موز شناخته شده است (عباس و همکاران ۲۰۱۳) این گونه هرچند قبلاً از ایران گزارش شده اما گزارش آن از روی درختان تبریزی برای دنیا جدید می باشد.

گیاهان بیماری زا می باشند (ونگ و همکاران ۲۰۱۰) با توجه به عدم امکان اسپورزائی در جدایه های این جنس شناسائی دقیق گونه های این جنس میسر نگردید. اعضای جنس *Nigrospora* بیمار گر یا اندوفیت گیاهان مختلف بوده و از 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 میزبان های متعدد دیگر

#### منابع

- احمدپور ع، دنیادوست چلان م، حیدریان ز و نیکخواه م، ۱۳۹۰. معرفی گونه های جدیدی از جنس های *Curvularia* و *Bypolaris* روی گندمیان در ایران. رستنیها، ۱۲ (۱): ۴۹-۳۹
- ارشادج، ۱۳۸۸. قارچ های ایران، ویراست سوم. انتشارات موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران.
- باب مراد م. باقری زنوز الف و یارمند ح. ۱۳۸۳. بررسی بیولوژی سنک صنوبر *Monosteiraunicostata* (Muls.&Rey) روی کلن های صنوبر در کرچ. فصلنامه علمی - پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۲۰ (۴): ۶۷۸-۶۶۹.
- حمزه پور م. مدیررحمتی ع، جوکار ل و عباسی ع. ۱۳۸۵. جمع آوری ارقام بومی و غیربومی صنوبر در استان فارس و بررسی آنها در خزانه سلکسیون. فصلنامه علمی - پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۱۴ (۱): ۹۱-۸۰.
- کرد ب، کرد ب. ۱۳۸۹. تاثیر سن درختان صنوبر دلتوئیدس بر خواص بیومتری، فیزیکی و شیمیایی چوب آن (مطالعه موردی در استان گلستان). فصلنامه علوم و فنون منابع طبیعی، ۵ (۱): ۸۲-۷۵.
- 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 Northwest 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*. Brusckke, 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 I, 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 populus 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 *Mycosphaerella 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 *Sporormiella* abundance in modern lake sediments in the US Great plains. *The Holocene*, 22(4): 475-483.
- Spiers AG, 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. *Exserohilumheteromorphum* sp. Nov., a new helminthosporoid 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 sphaerica* 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 Blueberry : A new 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<sup>1</sup>, R Golmohammadi<sup>2</sup> and M Arzanlou<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Respectively, Professor and Associate Professor of Plant Pathology and Mycology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

<sup>2</sup>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.