

تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی قارچ *Mauginiella scaettae* عامل پوسیدگی گل آذین خرما

حمید علوانی پور^۱، حشمت اله امینیان^۱، خلیل عالمی سعید^۲، کریم سرخه^۳، رضا فرخی نژاد^۴، محمد جوان نیکخواه^{۵*}

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، دانشکده‌گان ابوریحان، دانشگاه تهران
 ۲. استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران
 ۳. دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
 ۴. استادیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
 ۵. استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
- (تاریخ دریافت: ۹۹/۰۹/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۶)

چکیده

خامج (Khamedj) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی نخل به شمار می‌آید که در سال‌های با شرایط محیطی مساعد، اپیدمی‌های خطرناک ایجاد می‌کند و تا ۸۰ درصد خسارت اقتصادی به بار می‌آورد. تعداد ۲۷ جدایه قارچ *Mauginiella scaettae* عامل بیماری خامج، از نقاط مختلف خرماخیز کشور، دو جدایه از کشور عراق و یک جدایه از کشور کویت از روی ارقام مختلف نخل طی سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۷ جمع‌آوری و در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. هفت نشانگر EST-SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی این جدایه‌ها انتخاب شد که از بین آن‌ها تعداد پنج لوکوس (SNOD1، SNOD26، SNOD22، SNOD17، SNOD21) دارای چندشکلی بوده و در مجموع از آن‌ها شانزده الل به‌دست آمد. دو نشانگر (SNOD5 و SNOD16) نیز تکثیر نشدند. دندروگرام روابط خویشاوندی با استفاده از تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر ضریب تشابه جاکارد ترسیم شد و جدایه‌ها در پنج کلاسه قرار گرفتند. دو کلاسه (IV، V) به تعدادی زیرکلاسه تقسیم شدند. بیشترین ضریب تشابه، بین جدایه‌های Ilam-sa (استان ایلام-سرنی) و Behb-kh2 (استان خوزستان-بهبهان) (۰/۷۵) و بیشترین فاصله ژنتیکی با سایر جدایه‌ها مربوط به جدایه‌های Khesbid-za (استان فارس-خشت) و Abad-sa1 (استان خوزستان-آبادان) بود. سیزده جدایه از بین کلاسه‌های ژنتیکی شناسایی شده برای بررسی گروه‌های بیماری‌زایی روی رقم استعمران (سایر) انتخاب شدند. جدایه‌ها از نظر درصد شدت بیماری‌زایی در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری داشتند. بیشترین و کمترین شدت بیماری‌زایی به ترتیب مربوط به جدایه‌های Behb-ma1 (استان خوزستان-بهبهان) و Mehr-sa (استان ایلام-مهران) بود.

واژه‌های کلیدی: انگشت‌نگاری، چندشکلی DNA EST-SSR، رقم استعمران.

Genetic diversity and pathogenicity of *Mauginiella scaettae* the causal agent of date palm

Hamid Alvanipourpour¹, Heshmatollah Aminian¹, Khalil Alami-Saeid², Karim Sorkheh³, Reza Farrokhinejad⁴, Mohammad Javan-Nikkhah^{5*}

1. Respectively, Ph.D. student and Associate Professor, Department of Agricultural Entomology and Plant Pathology, Abouraihan Campus, University of Tehran, Pakdasht, Iran.
2. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
3. Associate Professor, Department of Production engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Production engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.
5. Professor, Department of Plant protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.

(Received: December 20 2020 - Accepted: September 7 2021)

ABSTRACT

Khamedj is one of the most important fungal diseases of date palm that in a favorable condition can lead to severe outbreaks and causing about 80% loss of the annual harvest. Thirty isolates of *Mauginiella scaettae*, the causal agent of this disease including 27 isolates from different locations of Iran, two isolates from Iraq and one isolate from Kuwait were collected from different palm cultivars during 2018-2019 and investigated in the present study. Seven EST-SSRs markers were applied to show the genetic diversity among these isolates. Five loci including, SNOD1, SNOD26, SNOD22, SNOD17, and SNOD21 were polymorphic among the species and revealed a total of 16 alleles. Also, two microsatellite markers, including SNOD5 and SNOD16 did not amplify. The dendrogram constructed based on the similarity index resulted in five major clusters so that two clusters were divided into sub-clusters. The highest similarity value was observed between isolates Ilam-sa (Ilam province-Sarney) and Behb-kh2 (Khuzestan province-Behbahan) (0.75). On the other hand, two isolates Khesbid-za (Fars province-Khesht) and Abad-sa1 (Khuzestan province-Abadan) had the highest genetic distances with other isolates. Thirteen isolates were selected from the identified genetic groups to study pathogenic groups on the Sayer cultivar. The results indicated that there were significant differences among the isolates. The results revealed that isolates Behb-ma1 (Khuzestan province-Behbahan) and Mehr-sa (Ilam province-Mehran) had the lowest and highest pathogenicity, respectively.

Keywords: Fingerprint, DNA polymorphism, EST-SSR, Sayer cultivar.

* Corresponding author E-mail: jnikkhah@ut.ac.ir

مقدمه

خرما (*Phoenix dactylifera* L.) گیاهی دو پایه، گرمسیری و نیمه گرمسیری از خانواده *Arecaceae* است که دارای بیش از ۳۰۰۰ رقم می‌باشد (Dowson, 1991). علاوه بر ارزش غذایی خرما و اهمیت آن در امنیت غذایی، فرآورده‌های جانبی و صنایع تبدیلی متعددی نظیر نئوپان و ام دی اف از نخل به دست می‌آید. همچنین از نخل در صنعت کاغذسازی و به عنوان خوراک دام نیز استفاده می‌شود (Jonoobi et al., 2019). از آنجایی که نخل درخت چندساله است، افزایش میزان تولید و عملکرد روی تک تک نفرات (واحد شمارش نخل) نخل باید اعمال شود. در مناطق با آلودگی شدید به بیماری خامج به طور میانگین ۴۰-۳۰ کیلوگرم از محصول میوه هر درخت نخل در سال از بین می‌رود و این بیماری در سال‌های با شرایط آب و هوایی مساعد ۸۰-۷۰ درصد به محصول خرما خسارت وارد می‌کند (Djerbi, 1998). خامج، اصطلاح عمومی برای بیماری‌های پوسیدگی گل‌آذین نخل است اما عمدتاً به بیماری ناشی از قارچ *Mauginiella scaettae* اطلاق می‌شود که اولین بار در سال ۱۹۲۵ توسط کاوارا در استان بنگازی لیبی شناسایی و توصیف گردید (von Arx et al., 1982). این قارچ توانایی زیادی در ترشح آنزیم کتیناز و سلولاز دارد که سبب پوسیدگی و گندیدگی می‌شود (Hameed, 2005)، و در خوزستان و به زبان محلی به آن خیاس (گندیدگی) می‌گویند. به طور کلی، واژه خامج از مصدر عربی "خمج" به معنای ضعیف و مریض شدن یا پوسیدگی و گندیدگی گرفته شده است (Qayem, 2015). این بیماری اسپات‌ها را آلوده می‌کند. اولین علامت بیماری ظهور لکه‌های قهوه‌ای زنگاری روی غلاف اسپات است. قارچ گل‌ها را آلوده کرده و در آلودگی شدید، بیماری به محور گل‌آذین هم می‌رسد و کل اسپات باز نشده و خشک شده و از بین می‌رود و در صورت باز شدن نیز قسمت‌های آلوده به رنگ قهوه‌ای و سوخته درمی‌آیند و با پوشش سفید رنگ کنیدیوم‌های قارچ پوشیده می‌شوند (Fawcett and Klotz, 1932). این بیماری از عراق، کشورهای حوزه

خلیج فارس، فلسطین اشغالی، کشورهای شمال آفریقا (موریتانی، مصر، لیبی، تونس، الجزایر، مغرب و سودان) ایتالیا و اخیراً از اسپانیا گزارش شده است (Fawcett and Klotz, 1932; Abdollah et al., 2005). خامج در سال‌هایی با شرایط آب و هوایی مناسب (سرماي طولانی و رطوبت هوا در زمستان) به حالت اپیدمی درآمده و خسارت زیادی را به نخیلات در ایران و سایر کشورها وارد می‌کند. یکی از اپیدمی‌های معروف تاریخی این بیماری در سال‌های ۱۹۴۷-۱۹۴۸ و ۱۹۷۷-۱۹۷۸ در کشور عراق اتفاق افتاد و باعث خسارت هشتاد درصدی به محصول خرماي این کشور شد. ادامه بارندگی‌های سنگین دو تا سه ماه قبل از ظهور اسپات‌ها باعث خسارت شدید بیماری خامج می‌شود (Djerbi, 1998; Al-Ahmar, 2009). یقیناً دانش سیستماتیک بسیاری از قارچ‌ها به دلیل عدم کفایت صفات ریخت‌شناختی یا فقدان صفات قابل اطمینان ریخت‌شناختی با چالش‌های عمیقی روبرو است. برای حل این معضل بسیاری از پژوهشگران از داده‌های حاصل از توالی DNA، فیزیولوژی، متابولیت‌های ثانویه و اطلاعات بیماری‌زایی (Pathogenicity) به عنوان رویکردهای چندجانبه استفاده می‌کنند (Alizadeh et al., 2015). نشانگرهای ریخت‌شناختی غالباً تحت تاثیر محیط قرار گرفته و از سن موجود زنده متاثر می‌شوند و گاهی برای مشاهده آن‌ها باید منتظر ظهورشان ماند و علی‌رغم وسعت کاربرد این نشانگرها در علوم زیستی، دارای محدودیت‌های زیادی هستند. لیکن در حال حاضر، نشانگرهای مولکولی مطمئن‌ترین روش برای تشخیص تنوع می‌باشند و ویژگی اختصاصی بودن لوکوس، دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها را امکان‌پذیر می‌کند (Galehdari et al., 2005). در این میان، نشانگرهای مبتنی بر DNA با روش PCR ابزار مناسبی برای بررسی تنوع در موجودات هستند. توالی‌های ساده تکراری یا میکروستلایت‌ها (SSR)، موتیف‌های کوتاه ۶-۱ جفت بازی DNA هستند که از دو طرف توسط توالی‌های خاص احاطه می‌گردند و از تنوع زیادی برخوردار بوده که این تنوع در آن‌ها در اثر جهش ناشی از لغزش

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی جدایه‌های

قارچ

در این پژوهش، از مناطق گوناگون استان‌های خرماخیز کشور و از ارقام مختلف نخل طی سال‌های ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸ نمونه‌برداری به عمل آمد. همچنین، نمونه‌هایی از کشورهای عراق و کویت نیز تهیه شد (جدول ۱).

اسپات‌هایی که علائم پوسیدگی گل‌آذین را نشان می‌دادند از نخل جدا و به آزمایشگاه منتقل شدند. شاخص‌ترین و بهترین علائم بیماری خامج، تشکیل آرتروسپورهای فراوان و سفیدرنگ است که سطح محل پوسیدگی اسپات را فرا می‌گیرند. به منظور جداسازی قارچ، مقداری از توده آرتروسپورهای سفید را از محل آلودگی برداشته و به محیط‌کشت سیب-زمینی-آگار (مرک، المان) یا هویج-آگار غنی شده با سولفات استرپتومایسین (۴۰۰ ppm) منتقل شد. در صورت عدم وجود توده سفیدرنگ آرتروسپور روی بافت گیاه، قطعاتی به طول هفت تا هشت میلی‌متر از اسپات‌های آلوده جدا و به مدت سه تا پنج دقیقه در هیپوکلریت سدیم رقیق شده (دارای ۳٪ ماده موثر) ضدعفونی سطحی شده و سه بار با آب مقطر استریل شستشو و سپس به محیط‌های ذکر شده منتقل شدند. همچنین، در روش دیگر و به منظور القاء و تحریک قارچ به تولید آرتروسپور قطعاتی به طول هفت تا هشت میلی‌متر از اسپات آلوده جدا و پس از سترون نمودن سطحی به روش ذکر شده، قطعات به ظروف کشت حاوی کاغذ صافی مرطوب و سترون منتقل و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در چنین شرایطی، پس از گذشت چهار تا هفت روز، آرتروسپورهای سفیدرنگ قارچ روی قسمت‌های آلوده تولید می‌شدند که این آرتروسپورها مستقیماً به محیط‌کشت جدید منتقل گردید. قارچ‌های جدا شده به روش تک اسپور خالص‌سازی و ظروف کشت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. جدایه‌های خالص شده در میکروتیوپ‌های دو میلی‌لیتری روی محیط کشت PDA و دمای چهار درجه سلسیوس

آنزیم DNA پلیمرز در حین همانندسازی و ترمیم و یا در اثر بروز نوترکیبی است (Rossetto, 2001; Karaoglu *et al.*, 2005). ریزماهوره‌ها به عنوان منابع بسیار مفید و کارآمدی در بررسی جنبه‌های مختلف ژنتیک نظیر بررسی تنوع ژنتیک جمعیت‌ها و تعیین روابط تکاملی بین افراد تلقی شده که توانایی بسیار بالایی در تمایز بین افراد داشته و از آن‌ها می‌توان در مطالعات جریان ژنی استفاده کرد (Galehdari *et al.*, 2005). با این وجود، تحقیقات نشان داده که فراوانی SSRها در ژنوم قارچ‌ها در مقایسه با سایر ارگانسیم‌ها کم می‌باشد (Karaoglu *et al.*, 2005). در این میان ریزماهوره‌های موجود در قسمت بیانی ژنوم (-EST SSR) دارای یک مزیت کلیدی در مقایسه با ریزماهوره‌های موجود در توالی غیرکدکننده هستند و آن ویژگی انتقال‌پذیری بین گونه‌ای بالای آن‌ها که به وفور در قارچ‌ها، گیاهان و حیوانات گزارش شده است. لذا به فراوانی در مطالعات ژنتیکی موجودات مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Kumar *et al.*, 2013, Singh *et al.*, 2014). علی‌رغم اینکه مدیریت موفق بیماری خامج مستلزم تعیین میزان تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی بیمارگر است. لیکن تاکنون پژوهشی در ارتباط با این موضوع روی قارچ *M. scaettae* انجام نشده است. با این وجود، پیشتر Bensaci و همکاران (۲۰۱۵) عنوان کرده بودند که در ده جدایه قارچ *M. scaettae* که از شرق الجزایر جمع‌آوری شده بودند از نظر شدت بیماری‌زایی روی گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. تفاوت وجود دارد. بنابراین، با توجه به مطالب گفته شده هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *M. scaettae* به دست آمده از نقاط مختلف کشور و دو کشور همسایه (عراق و کویت) با استفاده از نشانگر EST-SSR (شناسایی شده در قارچ *Phaeosphaeria nodorum* (Müller) Hedjar. (Stukenbrock *et al.*, 2005) و انتخاب جدایه‌های نماینده گروه‌های ژنتیکی و بررسی بیماری‌زایی این جدایه‌های نماینده در شرایط مزرعه است.

برای مطالعات بعدی نگهداری شدند.

ارسال (<http://nargeslab.ir/Main/MainPage.aspx>) شدند.

شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی

شناسایی جدایه‌های قارچ بر اساس خصوصیات ریخت-شناختی (رنگ پرگنه و خصوصیات آن، مشخصات آرتروسپورها و نحوه تشکیل آن‌ها و مشخصات میسلیموم) در محیط PDA و دمای ۲۵ درجه سلسیوس با چرخه نور ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، بعد از ۱۰ روز بر اساس مقالات پژوهشی صورت پذیرفت (Abdollah et al., 2005, Sigler and Carmichael 1976, von Arx et al., 1982). برای تأیید شناسایی ریخت‌شناختی، ناحیه ITS تکثیر شد که برای این کار از جفت آغازگر ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) استفاده شد (White et al., 1990). بدین منظور، برای استخراج DNA، پوشش میسلیمومی قارچ از روی سطح محیط کشت PDA ده روزه با اسکالپل جمع‌آوری شد و با استفاده از ازت مایع با کوبیدن به پودر نرم تبدیل شد و به روش ژانگ و استفان (Zhong and Stephenson 2001) استخراج DNA انجام گردید. غلظت DNA کلیه جدایه‌ها با استفاده از نانودراپ به ۵۰ نانوگرم تعدیل شد. جهت تکثیر ناحیه ITS، مخلوط نهایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر با به کارگیری سه میکرولیتر DNA (۵۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ میکرومولار)، ۱۱ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر و ۱۵ میکرولیتر مسترمیکس آمپلیکون (۱/۵) آماده و در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی شامل هشت دقیقه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۳۵ چرخه، در هر چرخه ۳۰ ثانیه، واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سلسیوس؛ ۲۰ ثانیه، پیوستن آغازگر به رشته الگو در ۵۸ درجه سلسیوس؛ ۶۰ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس و ۵ دقیقه گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از ارزیابی روی ژل آگارز، محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت توالی‌یابی به آزمایشگاه پاتوبیولوژی و ژنتیک نرگس اهواز

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ

بررسی توالی ناحیه ITS قارچ *M. scaettae* نشان از نزدیکی این قارچ به قارچ *Phaeosphaeria* دارد (Abdollah et al., 2005). بنابراین، در این پژوهش از هفت جفت آغازگر ریزماهوره که قبلاً در قارچ *Phaeosphaeria nodorum* شناسایی (Stukenbrock et al., 2005) و قابلیت انتقال‌پذیری بعضی از آنها در قارچ *M. scaettae* تایید شده بود (Alvanipour et al., 2020) استفاده شد (جدول ۲). همچنین از قارچ *Trichoderma sp.* به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل سه میکرولیتر DNA الگو (۵۰ نانوگرم)، ۰/۵ میکرولیتر از هر جفت آغازگر (۱۰ μM)، شش میکرولیتر آب دو بار تقطیر و ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس (آمپلیکون 1.5x) آماده شد. برنامه دمایی ترموسایکلر برای هر جفت آغازگر ریزماهوره شامل دو دقیقه و ۳۰ ثانیه دمای واسرشتی اولیه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس و ۳۵ چرخه که در هر چرخه، ۳۰ ثانیه واسرشتی در ۹۶ درجه سلسیوس، یک دقیقه اتصال (که دمای اتصال بر حسب نوع میکروستالات متفاوت بود و در جدول (۲) ارائه شده است)، یک دقیقه گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت پنج دقیقه گسترش پایانی در ۷۲ درجه سلسیوس بود. تفکیک محصول واکنش با استفاده از الکتروفورز عمودی و به وسیله ژل پلی‌اکریل آمید چهار درصد و در بافر 1X TBE و ولتاژ ۲۵۰ به مدت دو و نیم ساعت انجام شد. به منظور آشکارسازی باندهای روی ژل پلی‌اکریل آمید از روش نترات نقره استفاده به عمل آمد (Hung et al., 2018).

آزمون بیماریزایی

علی‌رغم مشکلات بررسی بیماریزایی قارچ *M. scaettae* در سطح نخلستان و عدم استقبال نخلکاران از این موضوع، جهت آزمون بیماریزایی، ۱۳ جدایه از بین ۳۰ جدایه مورد بررسی در چندشکلی DNA به

آذین) و با دو تکرار برای هر جدایه (تیمار) انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌های این متغیر شامل: تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD و با نرم‌افزار SAS نسخه ۹.۱.۳ انجام شد.

نتایج

تعداد ۳۰ جدایه از شهرستان‌های مختلف استان خوزستان و شش استان خرماخیز کشور (ایلام، بوشهر، فارس، کرمانشاه، هرمزگان و خراسان جنوبی) و کشورهای عراق و کویت طی سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۷ و از روی ۱۲ رقم نخل جمع‌آوری (جدول ۱) و بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی شناسایی شدند. پرگنه قارچ روی محیط‌کشت PDA رشد کندی داشته و قطر آن پس از ۱۰ روز در ۲۵ درجه سلسیوس به نه سانتی‌متر رسید. رنگ پرگنه از نمای بالا سفید مایل به کرم و از نمای زیرین ظروف کشت کرمی یا کمی زرد و در برخی جدایه‌ها قهوه‌ای مایل به سیاه بود. هیف‌ها بسیار منشعب شده و آرتروسپوره‌های فراوان در اثر تقسیم و بند بند شدن هیف‌های هوایی تولید می‌شوند. آرتروسپورها عمدتاً ۶-۱ سلولی (در مواردی به ۱۴ سلول هم می‌رسند) بی‌رنگ، استوانه‌ای یا بیضوی و به ندرت گرد هستند. شناسایی مولکولی با تعیین توالی ناحیه ۶۰۶-۵۶۴ جفت بازی ناحیه ITS و مقایسه توالی‌های حاصل با توالی‌های موجود در بانک ژن تأیید شد. توالی‌یابی برای هشت جدایه Gena-ma, Shab-ka4, Mehr-sa, Haji-mal, Kuwa-mal, Karb-za و Ilam-sa انجام گردید و توالی‌ها به ترتیب با شماره‌های دسترسی MZ093068، MZ093081، MZ093110، MZ093133، MZ093138 و MZ093140 و MZ097341 در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت گردید.

بررسی چندشکلی DNA جدایه‌ها بر اساس نشانگرهای ریزماهوره

از هفت نشانگر EST-SSR مورد استفاده، پنج نشانگر (SNOD1)، (SNOD17)، (SNOD26)، (SNOD22) و (SNOD21) با موفقیت تکثیر و باندهای مورد انتظار

عنوان نماینده گروه‌های ژنتیکی انتخاب شدند. برای این کار از کناره در حال رشد پرگنه هفت روزه جدایه‌های گزینشی روی محیط‌کشت PDA با استفاده از چوب پنبه سوراخ‌کن دیسک‌هایی به قطر نه میلی‌متر برداشته شد و با بریدن و بلند کردن قسمت کوچکی از غلاف. گل آذین‌رقم استعمران (یک نخلستان همسن واقع در اهواز که با واریسی دقیق از سال زراعی ۱۳۹۷ از عدم وجود آلودگی در نخل‌ها اطمینان حاصل شده بود) یک دیسک قارچ در هر گل آذین‌جاگذاری شد. بعد از مایه‌زنی، قسمت برداشته شده اسپات به محل خود برگردانده شد. گل آذین‌ها بعد از مایه‌زنی با پلاستیک پوشانده شدند. با توجه به اینکه محور خوشه (Peduncle) در ابتدا برافراشته و با رشد بیشتر به صورت قوس درمی‌آید و باعث گسترده و افشان شدن خوشه می‌شود؛ بعد از باز شدن غلاف. گل آذین و خروج خوشه برای جلوگیری از افشان شدن سنبلک‌ها (Spikelet) و سهولت و دقت در ارزیابی درصد شدت بیماری، گل آذین و سنبلک‌ها با بند پلاستیکی بسته شدند. برای تیمار شاهد نیز از محیط‌کشت PDA استفاده شد. درصد بیماری بعد از ۱۵ روز از زمان مایه‌زنی و بر اساس درصد پوسیدگی گل آذین‌ها از صفر تا صد ارزیابی گردید.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

برای بررسی تنوع ژنتیکی، باندهای ژل پلی‌اکریل آمید به صورت مشاهده‌ای و به صورت صفر (حضور) و یک (عدم حضور باند) امتیازدهی شدند. داده‌های حاصل وارد نرم‌افزار اکسل (۲۰۱۰) شده و میانگین‌ها در هر لوکوس و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)، با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc نسخه 2.2 محاسبه و بین EST-SSR مقایسه شدند (Botstein *et al.*, 1980). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از نرم‌افزار مذکور انجام گرفت. رسم دندروگرام مربوط نیز با استفاده از روش UPGMA و Sahn clustering انجام شد. آزمایش‌های گروه‌های بیماری‌زا در قالب طرح کاملاً تصادفی برای متغیر درصد شدت بیماری (درصد آلودگی گل-

مربوط به خود را ایجاد کردند. دو نشانگر دیگر (SNOD16 و SNOD5) تکثیر نشدند. بنابراین، از پنج جفت آغازگر برای تکثیر نواحی ژنومی جدایه‌ها، جهت بررسی تنوع ژنتیکی قارچ استفاده شد. در مجموع، ۱۶

الل برای پنج نشانگر EST-SSR (میانگین ۳/۲ الل برای هر لوکوس) بدست آمد. دمای اتصال آغازگرها، طول قطعات، درصد چندشکلی و محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های *Mauginiella scaettae* جمع‌آوری شده از مناطق خرماکاری ایران و برخی کشورهای منطقه که برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شدند.

Table 1. Isolates of *Mauginiella scaettae* collected from date-cultivating areas of Iran and some countries around Iran, used for analysis of genetic diversity.

Sampling area	Variety	Sampling date	Isolate
Ilam (Sarney)	Sayer	2019	Ilam-sa
Ilam (Mehran)	Sayer	2019	Mehr-sa
Bushehr (Shabankareh)	Kabkab	2019	Shab-ka4
Bushehr (Deylam)	Dalaki	2019	Deyla-da
Bushehr (Ganaveh)	Male	2019	Gena-ma
South Khorasan (Tabas)	Mazafati	2019	Tabas-maz2
Abadan (Abobarim)	Sayer	2018	Abad-sa1
Abadan (Shalhe Thawamer)	Male	2018	Abad-ma1
Ahvaz (Center)	Male	2019	Ahva-ma1
Ahvaz (Am Altamir)	Medjool	2019	Ahva-maj
Behbahan (Shahrui)	Khasi	2018	Behb-Kh-1
Behbahan (Shahrui)	Khasi	2018	Behb-kh-2
Behbahan (Garacheshmeh)	Male	2018	Behb-ma1
Shadegan (Oshad)	Sayer	2018	Shad-sa1
Ramhormoz (Sadat Bayman)	Sayer	2018	Ramh-sa1
Khozestan (Karun County)	Sayer	2018	Karo-sa1
Khozestan (Karun County)	Khadrawy	2018	Karo-khad1
Khozestan (Hendijan)	Bream	2019	Hend-br1
Khozestan (Hoveyzeh)	Gheibani	2019	Hove-gh
Fars (Jahrom)	Male	2019	Jahr-ma5
Fars (Khesht)	Zahedi	2019	Kheshbid-za
Fars (Kazerun)	Zahedi	2018	Fa-za
Fars (Kazerun)	Kabkab	2019	Kazer-za2
Fars (Farashband)	Zahedi	2019	Farash-za3
Fars (Firuzabad)	Kabkab	2019	Firoz-ka
Kermanshah (Qasr-e Shirin)	Ashrasi	2019	Ghasr-ash
Hormozgan (Hajjiabad)	Male	2019	Haji-ma1
Iraq – Karbala (Tuwairij)	Zahedi	2019	Karb-za
Iraq – Karbala (Tuwairij)	Male	2019	Karb-ma
Kuwait (Al Jahra)	Male	2019	Kuwa-ma

جدول ۲. هفت نشانگر EST-SSR به کار رفته برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Mauginiella scaettae*

Table 2. Seven EST-SSR markers used for analysis of genetic diversity of *Mauginiella scaettae* isolates

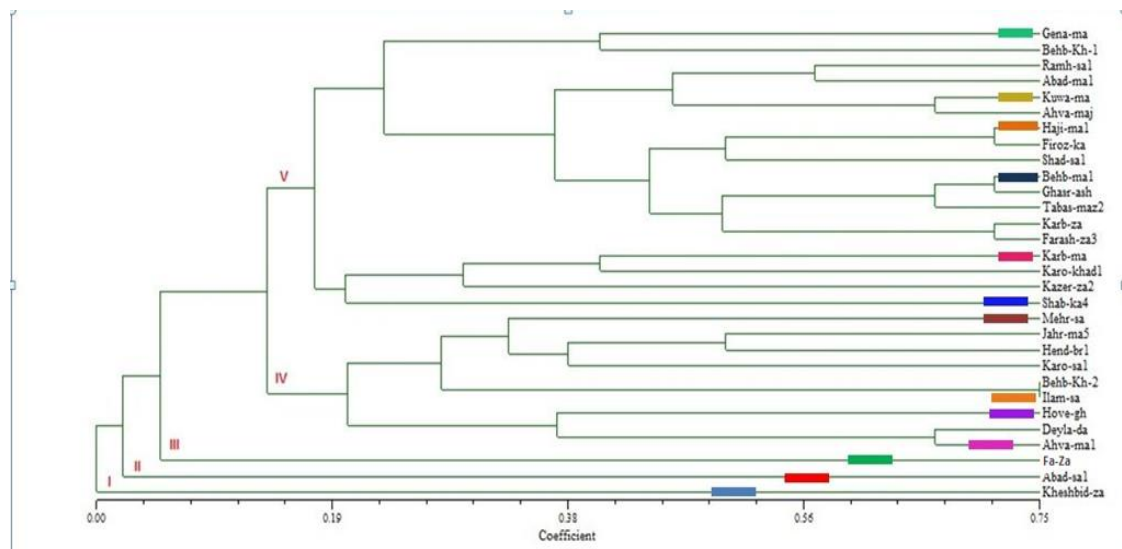
Locus	Primer sequence (5'-3')	Annealing (°C)	No. of alleles	Size (bp)	Polymorphism (%)	Motif	PIC
SNOD1	F:CCATCATGTTGTCACGCTTAGC	58	4	342-252	30.83	TGT	0.84
DR046161	R:CGGTTACGGCAACAACAAGCC						
SNOD26	F:CGTCATCGGCACCACCAGCCAT	62	4	208-242	40	CAC	0.65
DR045700	R:CATTGTGCATCGTGCATCA						
SNOD5	F:GGACCTTGAGTAAAGGCTGGC	-	-			GTC	
DR045205	R:GAATGGACAATTTCCAGCTATGC						
SNOD16	F:TCTGTCGTCTGTGTCATTCTG	-	-			CT	
DR045916	R:GTAAACGGATCCTCCCACC						
SNOD17	F:CAACGGCCAGAAT	60	3	92-182	21.11	GTT	0.94
DR045078	R:GTGGCAACAACAACGCT						
SNOD22	F:GCACTTTCGAGAACACCTTC	52	4	231-235	10.83	CAC	0.98
DR045164	R:CAAATGGATAGTCTGCGCA						
SNOD21	F:CCGCAAACATACAAATCATC	44	1	191-218	20	ACC	0.88
DR074925	R:CACATCCCATTACACAAT						

می‌باشند. گروه IV نیز دارای زیرکلاد و چند عضوی (دو جدایه‌ی استان ایلام، پنج جدایه از استان خوزستان و دو استان فارس و بوشهر نیز هر کدام دارای یک جدایه بودند) بود. گروه‌های انگشت‌نگاری I (شامل یک جدایه از استان فارس-منطقه خشت)، II (شامل یک جدایه از استان خوزستان-آبادان) و III (شامل یک جدایه از استان فارس-کازرون) بدون زیرکلاد و تک عضوی بودند. اطلاعات حاصل از دندروگرام رسم شده نشان داد که فاصله ژنتیکی جدایه‌ها ۰/۹۸۱-۰/۲۵ بود و دو جدایه Khashbid-za (استان فارس-خشت) و Abad-sa1 (استان خوزستان-آبادان) بیشترین فاصله ژنتیکی را با دیگر جدایه‌ها دارند. کمترین تشابه و بیشترین فاصله ژنتیکی مربوط به دو جدایه Ilam-sa (استان ایلام-سرنی) و Behb-kh-2 (استان خوزستان-بهبهان) با جدایه Khashbid-za (استان فارس-خشت) بود. در دندوگرام رسم شده هر سه جدایه خارجی در کلاد V قرار گرفتند؛ به طوری که نزدیک‌ترین جدایه به جدایه کویت، جدایه Ahva-maj از اهواز بوده و نزدیک‌ترین جدایه‌ها به جدایه‌های Karb-za و Karb-ma (که از استان کر بلا

ضریب تشابه بین جدایه‌ها ۰/۷۵-۰ بود و بیشترین ضریب تشابه ۰/۷۵۰ بود که به جدایه‌های Ilam-sa (استان ایلام-سرنی) و Behb-kh2 (استان خوزستان-بهبهان) تعلق داشت. همچنین دو جدایه Haji-mal (استان هرمزگان-حاجی‌آباد) و Firoz-ka (استان فارس-فیروزآباد)، دو جدایه Gasr-ash (استان کرمانشاه-قصر شیرین) و Behb-ma1 (استان خوزستان-بهبهان) و دو جدایه Karb-za (عراق-کربلا) و Farash-za3 (استان فارس-فراشبند) با ضریب تشابه ۰/۷۱۴ در رتبه بعدی قرار گرفتند. رسم دندوگرام بر اساس ضریب تشابه نیز نشان داد که ۳۰ جدایه به کار رفته در نقطه تشابه ۰/۱۵۲ در پنج گروه انگشت‌نگاری مجزا (I-V) قرار گرفتند (شکل ۱). به طوری که گروه انگشت‌نگاری V دارای زیرکلاد و چند عضوی بوده و با دارا بودن ۱۸ جدایه بزرگ‌ترین گروه ژنتیکی محسوب می‌شود. اعضاء این گروه شامل تمام جدایه‌های کشورهای خارجی، دو جدایه از استان بوشهر، هفت جدایه از استان خوزستان، سه جدایه از استان فارس، یک جدایه از استان کرمانشاه، یک جدایه از استان هرمزگان و یک جدایه از استان خراسان جنوبی

گروه‌های ژنوتیپی وجود ندارد و گروه‌ها دارای جدایه‌هایی با منشا متفاوت بودند.

در عراق جمع‌آوری شده بودند) به ترتیب Farash-za3 از فراشبند فارس و Karo-khad1 از شهرستان کارون استان خوزستان بودند. ارتباط چندانی بین منشا و



شکل ۱. دندروگرام UPGMA حاصل از ضریب تشابه جاکارد بر اساس پنج نشانگر EST-SSR برای ۳۰ جدایه *Mauginiella scaettae* مورد استفاده در آزمون بیماریزایی به عنوان نماینده گروه و یا زیرگروه با رنگ‌های مختلف در شکل نشان داده شده است.

Figure 1. UPGMA dendrogram generated based on Jaccard's Coefficient using five EST-SSR markers for 30 *Mauginiella scaettae* isolates. The isolates used for pathogenicity test have been shown as representative of each group by different colors.

بیماریزایی جدایه‌های قارچی

در مجموع تعداد ۱۳ جدایه از بین گروه‌ها و زیرگروه‌های حاصل از چندشکلی DNA به عنوان جدایه نماینده، انتخاب و در آزمون‌های بیماریزایی مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱). تا قبل از باز شدن غلاف اسپات، توسعه بیماری به صورت درونی بوده و علائم خاصی دیده نمی‌شد. با این وجود، برداشتن مقدار کوچکی از اسپات در حین عمل مایه‌زنی (علی-رغم برگرداندن آن)، باعث تسریع در باز شدن اسپات‌ها شد. بعد از باز شدن اسپات‌ها (چهار الی پنج روز بعد از مایه‌زنی) علائم پوسیدگی به صورت سوختگی و کلروز سنبلک‌ها، گل‌ها و میوه‌ها ظاهر شد؛ همچنین پوشش سفید رنگ قارچ روی اسپات و سنبلک‌ها ظاهر گردید (شکل ۲). این پوشش سفید رنگ قارچ با رشد محور خوسه و خروج آن از غلاف کمتر شده و در بعضی جدایه‌ها به طور کامل از بین رفت. آلودگی باعث ریزش گل‌ها و میوه‌ها شده و با خروج خوسه از اسپات

که با افزایش دما همراه شد، روند گسترش بیماری کاهش پیدا کرده و اندازه ناحیه سوختگی سنبلک‌ها توسعه پیدا نکرد و میزان پودر سفید رنگ آرتروسپوره‌های قارچ کاهش یافته یا از بین رفت. نتایج تجزیه واریانس درصد شدت بیماری نشان داد که جدایه‌های عامل بیماری از نظر درصد شدت بیماری در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی‌داری هستند (جدول ۳). گروه‌بندی جدایه‌ها از نظر درصد شدت بیماری با استفاده از آزمون LSD نشان داد که جدایه‌ها در گروه‌های بیماریزایی متفاوتی قرار می‌گیرند (جدول ۴). جدایه Behb-ma1 جمع‌آوری شده از شهرستان بهبهان بیشترین (۲۶/۵) و جدایه Kheshbid-za جمع‌آوری شده از شهرستان خست استان فارس کمترین میزان درصد شدت بیماری (۲/۷۵) را به خود اختصاص دادند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مناطق مختلف نشان داد که مناطق نمونه‌برداری از نظر درصد شدت بیماری در سطح

جمع‌آوری شده از استان بوشهر و کشورهای خارجی در یک گروه (a) قرار گرفتند و دارای بیشترین درصد شدت بیماری بودند و جدایه‌های استان فارس نیز در یک گروه مجزا (c) قرار گرفتند و کمترین شدت بیماری را دارا بودند (جدول ۶).

احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری دارند (جدول ۵). و این امر بیانگر این است که مناطق نمونه‌برداری که شامل پنج استان ایران و دو کشور همجوار خارجی (عراق و کویت) بودند از نظر درصد شدت بیماری در گروه‌های مختلف قرار می‌گیرند به طوری که نمونه‌های



شکل ۲. علائم و آثار ۱۳ جدایه قارچ *Mauginiella scaettae* روی رقم نخل استعمران. اعداد ۱-۱۳ نشان داده شده در شکل نمایانگر جدایه‌های قارچ *Mauginiella scaettae* به کار رفته جهت ارزیابی آزمون شدت بیماری می‌باشد.
 ۱- F a-za ، ۲- Ilam-sa ، ۳- Abad-sa1 ، ۴- Behb-ma1 ، ۵- Haji-ma1 ، ۶- Kheshbid-za ، ۷- Shab-ka4 ، ۸- Karb-ma ، ۹- Kuwa-ma1 ، ۱۰- Gena-ma ، ۱۱- Mehr-sa ، ۱۲- Ahva-ma1 ، ۱۳- Hove-gh

Figure 2. Symptoms of 13 *Mauginiella scaettae* isolates on Sayer variety. Number on each shape represents the isolate was used for disease severity analysis.
 1. F a-za, 2. Ilam-sa, 3. Abad-sa1, 4. Behb-ma1, 5. Haji-ma1, 6. Kheshbid-za, 7. Shab-ka4, 8. Karb-ma, 9. Kuwa-ma1, 10. Gena-ma, 11. Mehr-sa, 12. Ahva-ma1, 13. Hove-gh

جدول ۳. تجزیه واریانس شدت بیماری ۱۳ جدایه قارچ *Mauginiella scaettae* به کار رفته روی رقم نخل استعمران

Table 3. Variance analysis of disease severity for 13 *Mauginiella scaettae* isolates tested on Sayer variety.

Sources of variation	df	Mean square	F	P value
Treatment (Disease severity)	12	175.74	14.36	<.0001
error	13	12.24		
Total	25			

جدول ۴. گروه‌بندی بر اساس میانگین شدت بیماری برای ۱۳ جدایه قارچ *Mauginiella scaettae* با استفاده از آزمون LSD.

Table 4. Grouping of 13 *Mauginiella scaettae* isolates based on average of disease severity, using LSD test.

Isolates	Mean of disease severity	Groups
Abad-sal	10	cde
Mehr-sa	17.5	bc
Behb-mal	26.5	ab
Kuwa-mal	25	ab
Hove-gh	25	b
Gena-ma	25	ab
Shab-ka4	22.5	ab
Kheshbid-za	2.75	e
Ilam-sa	8.5	de
Ahva-mal	3.5	e
Fa-za	4	e
Karb-ma	14	cd
Haji-mal	5.5	e

جدول ۵. تجزیه واریانس شدت بیماری خامج نخل در مناطق مختلف شامل پنج استان ایران (ایلام، بوشهر، خوزستان، فارس و

هرمزگان) و نمونه‌های خارجی (دو کشور عراق (کربلا) و کویت (الجهراء))

Table 5. Variance analysis of disease severity of date khamedj disease in different regions including five provinces of Iran (Ilam, Bushehr, Khuzestan, Fars and Hormozgan) and foreign samples (Iraq (Karbala) and Kuwait (Al jahra)).

Sources of variation	df	Mean square	F	P value
Treatment (Disease severity)	5	226.51	99.3	0.011
error	20	56.77		
Total	25			

جدول ۶. گروه‌بندی میانگین شدت بیماری خامج نخل در استان‌های مختلف و کشورهای همجوار بر اساس آزمون LSD

Table 4. Grouping of disease severity of date khamedj disease in different provinces and neighboring countries using LSD test.

Regions	Grouping	Mean of disease severity
Ilam	abc	13
Bushehr	a	23.75
Fars	c	3.37
Khuzestan	ab	16.25
Hormozgan	bc	5.5
Foreign	a	19.5

ریزماهوره‌های شناخته شده یک گونه برای بررسی چندشکلی در مکان‌های همولوگ در گونه‌های نزدیک به آن است. برای تحقق این مهم توالی‌های تکراری و توالی‌های حاشیه‌ای (Flanking regions) بین دو گونه مورد مطالعه می‌بایست کاملاً حفاظت شده باشند (Rossetto, 2001). با اینکه مطالعات نشان داده که انتقال‌پذیری SSRها بین گونه‌های قارچی نزدیک به هم، ۳۴ درصد می‌باشد (Dutech et al., 2007) لیکن با توجه به هزینه‌های زیاد و زمانبر بودن توسعه و

بحث

علی‌رغم اینکه نشانگرهای مولکولی در بررسی تنوع ژنتیکی انواع عوامل بیماریزای نخل مورد استفاده قرار گرفته‌اند لیکن تاکنون هیچ تحقیقی در رابطه با بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *Mauginiella* با استفاده از نشانگرهای مولکولی در جهان انجام نشده است. در این میان نشانگرهای ریزماهوره تکرارپذیر بوده و جزء نشانگرهای ژنتیکی مناسب به شمار می‌آیند. از مزیت‌های دیگر این نشانگرها امکان استفاده از آغازگرهای

یک گروه ژنوتیپی قرار گرفتند. به طوریکه دو جدایه Behb-Kh-2 و Ilam-sa که دارای بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/۷۵) هستند از نظر محل، رقم و سال جمع‌آوری با هم متفاوت هستند (شکل ۱ و جدول ۱). تولید اسپورهای غیرجنسی فراوان و در نتیجه امکان بروز جهش، گستردگی قارچ در پهنه وسیع جغرافیایی و فشار اقلیم و محیط و تنوع ارقام میزبان می‌توانند از عوامل تاثیرگذار در ایجاد تنوع زیاد در این قارچ باشند. از طرف دیگر با توجه به اینکه هیچ رقم مصنوعی برای این قارچ وجود ندارد و تمام ارقام خرما کمابیش به بیماری خامج دچار می‌شوند؛ بنابراین هیچ‌گونه اعمال فشار انتخاب که بتواند بخشی از جمعیت بیمارگر را کاهش و سبب کاهش تنوع بیمارگر شود وجود نخواهد داشت. یکی از راه‌های موثر در کنترل بیماری‌ها یافتن ارقام مقاوم است. اما بدیهی است که موفقیت در تهیه ارقام مقاوم به شناخت کافی از ژنتیک بیمارگر و میزبان و تعامل آن‌ها بستگی دارد (Sheykh Aleslami *et al.*, 2005). بررسی نتایج محققین نشان داده که ارقام مختلف خرما واکنش‌های مختلفی نسبت به قارچ *Mauginiella* نشان داده‌اند که گاهی این نتایج متناقض هستند. Mohagery (۱۹۹۵) در بررسی واکنش چند رقم نخل به قارچ *Mauginiella*، رقم "استعمران" را بسیار حساس عنوان کرد در حالیکه Al-Yaseri و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی‌های خود واکنش رقم استعمران به این قارچ را متعادل دانستند؛ همچنین این محققین رقم "بریم" را با کمترین حساسیت معرفی کردند (Al-Yaseri *et al.*, 2011) در حالیکه Abbas و همکاران (۲۰۰۸) بریم را جزء ارقام حساس عنوان کردند. علاوه بر این، بررسی‌های این پژوهشگران نشان داده که ارقام در مناطق مختلف واکنش‌های مختلفی نسبت به بیماری خامج از خود نشان می‌دهند که بعضاً این مناطق فاصله چندانی از هم ندارند و آن‌ها همچنین نتیجه گرفته‌اند که رابطه معکوسی بین دوری و نزدیکی به آب و شدت آلودگی وجود دارد (Abbas *et al.*, 2008). به طور کلی اکثر مطالعات پیشین انجام شده در زمینه مقاومت ارقام معطوف به میزبان و واکنش آن به بیمارگر بوده و

شناسایی نشانگرهای SSR جدید در ژنوم موجودات، بنابراین، استفاده از قابلیت انتقال بین گونه‌ای (-Cross Transferability) نشانگرهایی که قبلاً شناسایی شده‌اند رویکرد بسیار مناسبی بوده که سریع، ارزان و کارآمد است و باعث صرفه‌جویی در زمان می‌شود (Baird *et al.*, 2010, Alvanipour *et al.*, 2020). از طرف دیگر علی‌رغم اینکه تلوومرف این قارچ ناشناخته است لیکن Abdullah و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که توالی نواحی (ITS) این قارچ دارای ۹۳-۹۴ درصد همولوژی با قارچ آسکومیست *Phaeosphaeria* است و این دو جنس به هم نزدیک هستند. بنابراین، در پژوهش حاضر از هفت جفت آغازگر EST-SSR مربوط به *Phaeosphaeria* که پیش از این قابلیت انتقال برخی از آن‌ها به قارچ *M. scaettae* توسط Alvanipour و همکاران (۲۰۲۰) مورد تایید واقع شده بود برای بررسی تنوع در ۳۰ جدایه *M. scaettae* که از نقاط مختلف کشور و دو کشور عراق و کویت جمع‌آوری شده بودند استفاده شد (جدول ۱ و ۲). از هفت جفت آغازگر به کار رفته، پنج جفت آغازگر قابلیت تکثیر و انتقال پذیری داشته (۷۱/۴ درصد) و در دو جفت آغازگر دیگر (۲۸/۵۷ درصد) تکثیری حاصل نشد (جدول ۲). از پنج جفت آغازگر تکثیر شده برای بررسی تنوع ژنتیکی در قارچ *M. scaettae* استفاده شد. محققین معتقدند موفقیت در تکثیر، مرهون فاصله تکاملی بین گونه منبع و گونه هدف می‌باشد (Rossetto, 2001). در این تحقیق مشخص شد که بیشترین میزان (۹۸ درصد) و کمترین میزان تکثیر (۶۵ درصد) جفت آغازگرها در ۳۰ جدایه به کار رفته به ترتیب مربوط به جفت آغازگرهای SNOD22 و SNOD26 می‌باشد. در این پژوهش مشخص شد که تنوع ژنتیکی قارچ *M. scaettae* زیاد است و در شباهت ۰/۱۵۲ جدایه‌ها در پنج گروه قرار می‌گیرند. با این وجود همانطور که در شکل (۱) مشاهده می‌شود ۶۰ درصد جدایه‌ها در یک گروه (V) قرار می‌گیرند. فاصله یا شباهت ژنتیکی جدایه‌ها ارتباط چندانی به رقم، منطقه جغرافیایی و یا سال زراعی ندارد و جدایه‌هایی با منشا و رقم و سال جمع‌آوری متفاوت با هم در

عامل یا عوامل بیمارگر و قدرت بیمارگری آن مورد غفلت واقع شده است. به عبارتی در این تحقیقات فرض بر این نهاده شده که عامل بیمارگر تنها یک موجود یا یک نژاد با قدرت بیمارگری مشخص بوده و هر آنچه که در مورد حساسیت، تحمل یا مقاومت وجود دارد مربوط به گیاه میزبان یعنی نخل است و نقشی برای بیمارگر در نظر گرفته نشده است. بنابراین شاید کلید فهم این دوگانگی‌ها در اختیار بیمارگر باشد با بررسی تنوع ژنتیکی *M. scaettae* و با شناخت کامل بیمارگر و عکس العمل گیاه نسبت به آن بهتر می‌توان راه‌های مبارزه با آن را توصیه کرد. علاوه بر این، استفاده از آزمون‌های بیماریزایی که به اثر متقابل بیمارگر و میزبان می‌پردازد یکی از روش‌های متداول در دسته‌بندی قارچ‌ها می‌باشد (Motallebi et al., 2002). در آزمایش مربوط به بررسی بیماریزایی ۱۳ جدایه *M. scaettae* حاصل از گروه‌ها و زیرگروه‌های ژنتیکی مشخص شد که تمام جدایه‌های به کار رفته علائم بیماری خامج را ایجاد کرده و بعد از باز شدن اسپات علائم بارز سوختگی و رشد قارچ روی اندام‌های مختلف اسپات ظاهر شد. همچنین مشخص شد که تمام جدایه‌های مربوط به گروه‌های تک‌عضوی که بیشترین فاصله ژنتیکی را از بقیه جدایه‌ها دارا می‌باشند در یک گروه (e) که کمترین بیماریزایی را داشت قرار می‌گیرند و تمام جدایه‌های به کار رفته از کلاد ژنتیکی V در گروه بیماریزای a که بیشترین درصد شدت بیماری را داشت؛ قرار می‌گیرند. به طور کلی همبستگی مشخصی بین شدت بیماریزایی و گروه‌های ژنتیکی قابل استنباط نبود و نمی‌توان به طور مشخص گروه‌های ژنتیکی را ملاک درصد شدت بیماری و گروه‌های بیماریزایی آن قلمداد کرد چرا که جدایه‌های گروه‌های ژنتیکی متفاوت می‌توانند در گروه‌های بیماریزایی مشابه قرار بگیرند و یا برعکس آن نیز حادث شود. با توجه به اینکه راه‌های عدیده‌ای برای انتقال قارچ وجود دارد قرار گرفتن جدایه‌هایی با موقعیت جغرافیایی دور از هم در یک گروه ژنتیکی یا بیماریزایی می‌تواند ناشی از انتقال بیمارگر از نقطه‌ای به نقطه دیگر باشد. انتقال این بیماری در خلال فصل

می‌تواند از طریق گرده‌افشانی با گرده‌های آلوده و انتقال با حشرات آلوده و یا به صورت هوابرد صورت بگیرد (Fawcett and Klotz, 1932). در نهایت به نظر می‌رسد انتقال اسپات‌های نر مرغوب از نقاط دوردست به منظور گرده‌افشانی و یا طرق دیگر انتقال از قبیل انتقال خوشه‌ها و میوه‌ها به مناطق دوردست در اختلاط گروه‌ها بی‌تاثیر نیست، چرا که در سال ۱۹۵۷ آنسلم و بالتزاکیس گزارش نمودند که قارچ *M. scaettae* را از میوه‌های بسته‌بندی شده‌ای که از الجزایر به فرانسه صادر شده و دارای قطعه‌ای از سنبلك‌های آلوده بودند جداسازی کرده‌اند (Farrokhinejad, 1994; Dowson, 1991). همچنین فاوست و کلودز علت عدم وجود قارچ عامل بیماری در کالیفرنیا و آریزونا را مربوط به این واقعیت می‌داند که قارچ عامل بیماری خامج، گل‌آذین نخل را آلوده می‌کند و احتمال انتقال آن توسط پاجوش‌های نخل چنانچه در بیماری‌های برگی وجود دارد محتمل نیست (Fawcett and Klotz, 1932). بنابراین و بر اساس آنچه گفته شد این نکته قابل تأمل است که نظر به اینکه قارچ *Mauginiella* از بین گونه‌های جنس *Phoenix* تنها گونه *P. dactylifera* را آلوده کرده و گزارشی دال بر آلوده کردن سایر گونه‌های جنس *Phoenix* توسط این قارچ وجود ندارد و قارچ غیر از این گونه هیچ گونه گیاهی دیگری را به صورت طبیعی آلوده نمی‌کند و در حقیقت نوعی اختصاصیت میزبانی دارد. لذا بی‌گمان تنوع ژنتیکی و تاریخ تکاملی و حتی سایر جنبه‌های مرتبط با حیات نظیر پراکنش جغرافیایی این دو موجود می‌تواند ارتباط تنگاتنگی با هم داشته باشد و اگر بحثی نظیر مقاومت در ارقام متنوع خرما نسبت به این قارچ در پی باشد مسلماً به موازات آن بحث تنوع در بیماریزایی قارچ نیز با توجه به تک میزبانه بودن آن مطرح خواهد شد.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج حاصل از این پژوهش نشان‌دهنده این واقعیت است که جدایه‌های قارچ *M. scaettae* از نظر ژنتیکی و بیماریزایی از تنوع بالایی برخوردار

کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان صمیمانه قدردانی می‌شود. همچنین از مدیریت حفظ نباتات استان فارس و ایستگاه تحقیقات کشاورزی جهرم، مدیریت جهاد کشاورزی شهرستان طبرس، مدیریت حفظ نباتات ایلام، سازمان جهاد کشاورزی بوشهر و ایستگاه تحقیقات خرما و میوه‌های گرمسیری این استان، مدیریت جهاد کشاورزی قصر شیرین، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان و ایستگاه تحقیقات کشاورزی شهرستان حاجی‌آباد، کارشناسان مدیریت جهاد کشاورزی آبادان و خرمشهر که برای نمونه‌برداری همکاری‌های بی‌شائبه مبذول داشتند کمال تشکر و امتنان به عمل می‌آید. نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از دانشجویان کشور عراق که در نمونه‌برداری از کربلا مساعدت نمودند اعلام می‌دارند.

هستند و مقاومت یا حساسیت مشاهده و گزارش شده در ارقام خرما نمی‌تواند تنها مربوط به گیاه خرما باشد؛ بلکه بر اساس مطالعه حاضر و با توجه به تنوعی که به لحاظ ژنتیکی و بیماری‌زایی در این قارچ مشاهده شد؛ به نظر می‌رسد ژنتیک و توانایی بیماری‌زایی قارچ می‌تواند سرنوشت این واکنش حساسیت یا مقاومت گیاه را تعیین کند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مدیریت موفق بیماری خامج مرهون مطالعات بیشتر و شناخت هر چه بیشتر و کامل‌تر قارچ عامل این بیماری است.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پژوهش رساله دکتری نویسنده اول می‌باشد. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و فناوی دانشگاه تهران و دانشگاه علوم

REFERENCES

1. Abbas, K. I., Hameed, A. M and Jameel, M. S. 2008. Susceptibility of different cultivars of date palm *Phoenix dactylifera* L. to casualty of inflorescence rot in some Basrah regions. *Basrah Journal of Date Palm Research*, 7 (1), 61-70. (In Arabic).
2. Abdullah, S.K., Asensio, L., Monfort, E., Gomez-Vidal, S., Palma-Guerrero, J., Salinas, J., Lopez-Llorca, L.V., Jansson, H. B. and Guarro, J. 2005. Occurrence in Elx, SE Spain of inflorescence rot disease of date palms caused by *Mauginiella scaettae*. *Phytopathology*, 153(7-8), 417-422.
3. Al- Ahmar, M.A. 2009. An object-oriented expert system for diagnosis fungal disease of date palm. *International Journal of Soft Computing*, 4(5), 201-207.
4. Alizadeh, A., Javan-Nikkhah, M., Zare, R., Fotouhifar, K. B., Damm, U. and Stukenbrock, E. H. 2015. New records of *Colletotrichum* species for the mycobiota of Iran. *Mycologia Iranica*, 2(2), 94-108.
5. Alvanipour, H., Aminian, H., Alami-Saeid, K., Sorkheh, K., Farrokhinejad, R., Ali Nejati, A., and Javan-Nikkhah, M. (2020). Cross-transferability of SSR loci of *Phaeosphaeria nodorum* to *Mauginiella scaettae*. *Mycologia Iranica*, 7(1), 135-142.
6. Al-Yaseri, I. I. and Ismail, A. Z. 2011. Efficacy of some fungicides to controlling date palm inflorescence rot caused by *Mauginiella scaettae* Cav. <http://www.uokufa.edu.iq>. (In Arabic).
7. Baird, R. E., Phillip, A., Allen, T. W., McNeill, D., Wang, Z., Moulton, J. K., Rinehart, T. A., Abbas, H. K., Shier, T. and Trigiano, R. B. 2010. Variability of United States isolates of *Macrophomina phaseolina* based on simple sequence repeats and cross genus transferability to related genera within *Botryosphaeriaceae*. *Mycopathologia*, 170(3), 169-180.
8. Bensaci, M. B., Rahmania, F. and Luis, A. J. M. 2015. The date palm inflorescence rot fungus *Mauginiella scaettae* can infects the model host *Arabidopsis thaliana*. *18th International Plant Protection Congress*, 3-6 April., Berlin, pp. 299.
9. Botstein D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32:314-331
10. Dowson, V. H. W. 1991. *Date Production and Protection*. (1st ed). Tehran. Ministry of Agriculture Extension Organization. (In Farsi).
11. Djerbi, M. 1998. Disease of date palm: present status and future prospects. *Journal of Agricultural and Marine Science*, 3(1), 103-114.
12. Dutech, C., Enjalbert, J., Fournier, E., Delmotte, F., Barre`s, B., Carlier, J., Tharreau, D. and Giraud, T. 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 44(10), 933-

949.

13. Farrokhinejad, R. 1994. Investigation on the inflorescence rot of the date palm in Khuzestan. M.Sc. dissertation. Shahid Chamran University of Ahvaz. Khuzestan. (In Farsi).
14. Fawcett, H. S. and Klotz, L. J. 1932. Diseases of the date palm, *Phoenix dactylifera*. Bulletin 522. University of California, Berkeley, College of agriculture. 47 PP.
15. Galehdari, H., Foroughmand, A. M., Roshanfekr, H. and Nazari, M. 2005. *Exhaustive Genetic Engineering*. (1st ed). Qom. Golhayeh Behesht. (In Farsi).
16. Hameed, A. M. 2005. Susceptibility of different cultivars of Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) to *Mauginiella scaettae* the causal agent of inflorescence rot. *Basrah Journal for Date Palm Research*, 4(1-2), 37-53. (In Arabic).
17. Huang, L., Deng, Z., Li, R., Xia, Y., Bai, G., Siddique, K. H. M. and Guo, P. 2018. A fast silver staining protocol enabling simple and efficient detection of SSR markers using a non-denaturing polyacrylamide gel. *Journal of Visualized Experiments*, 134, 1-7.
18. Jonoobi, M., Shafie, M., Shirmohammadli, Y., Ashori, A., Hosseinabadi, H. Z. and Mekonnen, T. 2019. A review on date palm tree: properties, characterization and its potential applications. *Journal of Renewable Materials*, 7(11), 1055-1075.
19. Karaoglu, H., Lee, C. M. Y. and Meyer, W. 2005. Survey of simple sequence repeats in completed fungal genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 22(3), 639-649.
20. Kumar, S., Rai, S., Maurya, D. K., Kashyap, P. L., Srivastava, A. K. and Anandaraj, M. 2013. Cross-species transferability of microsatellite markers from *Fusarium oxysporum* for the assessment of genetic diversity in *Fusarium udum*. *Phytoparasitica*, 41(5), 615-622.
21. Motallebi, M., Zamani, M. R. and Hoseinzadeh Kargar, A. 2002. Evaluation of the relationship between polygalacturonase activity and pathogenicity of Iranian isolates of *Ascochyta rabiei*, *Journal of Hydrology and Soil Science*, 6(4), 159-168. (In Farsi).
22. Mohagery, A. R. 1995. Evaluation of reaction and persistency of date palm cultivars to inflorescence rot disease and yield loss in Khuzestan province. *12th Iranian Plant Protection Congress*, September. Karaj, Iran. pp. 251. (In Farsi).
23. Qayem, A. A. 2015. *Middle Arabic - Persian Contemporary Culture* (4th ed). Tehran. Farhang Moaser. (In Farsi).
24. Rossetto, M. 2001. Sourcing of SSR markers from related plant species (Chap. 14). (pp. 211-224). *Plant genotyping the DNA fingerprinting of plants*. New York. CABI.
25. Sheikholeslami, M., Okhovat, S. M., Hejaroude, Gh., Sharifi Tehrani, A., Javan Nikkhah, M. and Najafi Mirak, T. 2005. Investigation on interaction of isolate-genotype between *Erysiphe betae* and *Beta vulgaris* under greenhouse condition. *Journal of sugar beet*, 21(2), 123-135. (In Farsi).
26. Sigler, L. and Carmichael, J. W. 1976. Taxonomy of *Malbranchea* and some other *hyphomycetes* with arthroconidia. *Mycotaxon*, 4, 349-488.
27. Singh, R., Kumar, S., Lalkashyap, P., Kumar Srivastava, A., Mishra, S. and Kumar Sharma, A. 2014. Identification and characterization of microsatellite from *Alternaria brassicicola* to assess cross-species transferability and utility as a diagnostic marker. *Molecular Biotechnology*, 56(11), 1049-1059.
28. Stukenbrock, E. H., banke, S., Zala, M., Mcdonald, B. A. and Oliver, R. P. 2006. Isolation and characterization of EST-derived microsatellite loci from the fungal wheat pathogen *Phaeosphaeria nodorum*. *Molecular Ecology Notes*, 5(4), 931-933.
29. von Arx, J. A., van der Walt, J. and Liebenberg N. V. D. W. 1982. On *Mauginiella scaettae*. *Sydowia*, 34, 42-45.
30. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innes, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds) PCR protocols. Academic Press, London, pp 315-322.
31. Zhong, S. and Steffenson, B. J. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Genetics and Resistance*, 91(5), 469-476.