

گزارش *Fusarium proliferatum* به عنوان عامل بیماری خشکیدگی برگ نخل خرما در استان خوزستان

حوری‌زاد قائدی^۱، فرحان کچیلی^{۲*}، مسعود لطیفیان^۳ و رضا فرخی‌نژاد^۴

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی حشره‌شناسی کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
 ۲- *نویسنده مسوول: دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران (f.kocheili@scu.ac.ir)
 ۳- دانشیار پژوهشی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، کرخ، ایران
 ۴- استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۰۲

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۲۰

چکیده

در سالیان اخیر بیماری خشکیدگی برگ به یکی از بیماری‌های مهم نخل خرما در مناطق وسیعی از نخلستان‌های خوزستان تبدیل شده است. هدف از این مطالعه، شناسایی عامل بیماری در استان خوزستان بوده است. عامل بیماری با استفاده از مشخصات ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی گردید. جهت شناسایی مولکولی عامل بیماری، یک جدایه در محیط کشت مایع سیب‌زمینی دکستروز مایه‌زنی و سپس دی‌ان‌ای کل از ریشه‌های سرما-خشک شده استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با جفت آغازگرهای TEF1997R و TEF171F جهت تکثیر قسمتی از ناحیه *tef1* انجام شد. براساس مقایسه ناحیه‌ی توالی‌یابی شده *tef1* گونه‌ی نزدیک به گونه‌ی مورد مطالعه، سویه تایید شده و مرجع *Fusarium proliferatum* strain TOR-55 با تشابه ۹۹/۵۵ درصدی تعیین شد. واکاوی‌های تبارشناسی جدایه مورد مطالعه با توالی‌های مربوط به سویه‌های تپ با استفاده از روش پیشینه‌ی درست‌نمایی، تعلق آن را به این گونه تأیید کرد. آزمون بیماری‌زایی انجام و جداسازی مجدد از گیاهان مایه‌زنی شده صورت گرفت. این اولین گزارش از بیماری‌زایی *F. proliferatum* به عنوان عامل خشکیدگی برگ نخل در ایران است.

کلیدواژه‌ها: خشکیدگی برگ خرما، روش‌های مولکولی، *Fusarium proliferatum* *tef1*

مقدمه

(El Shafie et al., 2017). ایران با تولید بیش از یک میلیون تن خرما در سال، دومین تولیدکننده بزرگ این محصول باغی در جهان می‌باشد (FAOSTATE, 2018). عمده‌ترین مناطق تولید محصول خرما در ایران شامل استان‌های خوزستان، بوشهر، فارس، هرمزگان، کرمان و سیستان و بلوچستان می‌باشند (Amani, 2016). حدود ۵۰ درصد صادرات خرما ایران از استان

نخل خرما با نام علمی *Phoenix dactylifera* L. نقش مهمی در اقتصاد کشورهای تولیدکننده این محصول دارد (Moussouni et al., 2017). حدود ۸۸ درصد خرما تولیدی دنیا، در شرق میانه و شمال آفریقا، ایران، عربستان سعودی، پاکستان، الجزایر، امارات متحده عربی، سودان، عمان و مغرب تولید می‌شود

دبیر تخصصی: دکتر زهرا میرسلیمانی

رابطه بین گونه‌های مختلف جنس *Fusarium*، از اکاوی‌های مولکولی داده‌های توالی ترکیبی مناطق ITS و Tef1a استفاده شده است (Alwahshi et al., 2019). همچنین در عربستان سعودی، پس از مطالعات مولکولی، *F. proliferatum* به عنوان یک بیمارگر خطرناک برای نخلستان‌ها معرفی گردید (Saleh et al., 2016). این بیمارگر زهرابه‌های قارچی نظیر اسید فوزاریک^۱، مونیلی فورمین^۲، فوزاپرولیفرین^۳، فومونیزین^۴، بیوریزین^۵ در قسمت‌های مختلف درخت نخل تولید می‌کند (Abdalla et al., 2000). با توجه به اهمیت نخل خرما در اقتصاد و معیشت مردم و نیز خسارت ناشی از این بیماری به نخلستان‌ها، مطالعه حاضر با هدف شناسایی عامل بیماری خشکیدگی برگ درختان نخل خرما در خوزستان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه‌برداری از اسفند ماه ۱۳۹۶ تا شهریور ماه ۱۳۹۷ و همچنین از آبان ماه تا آذر ماه ۱۳۹۷ انجام شد. سی نخلستان در شهرستان‌های آبادان، خرمشهر و شادگان انتخاب (جدول ۱) و از هر کدام از نخلستان‌ها بسته به وسعت آنها حداقل ۱۵ نخل به صورت تصادفی انتخاب گردید. نمونه‌ها شامل برگ، دمبرگ و دم‌خوشه‌های دارای علائم بیماری خشکیدگی برگ بودند. نمونه‌ها درون پاکت‌های کاغذی قرار داده و به آزمایشگاه منتقل و تا زمان جداسازی درون یخچال نگه‌داری شدند.

جداسازی عامل بیماری از گیاه

به منظور جداسازی بیمارگرهای احتمالی، بافت آلوده با دقت در زیر جریان ملایم آب شسته شد. سپس قطعات گیاهی به اندازه ۱-۰/۵ سانتی‌متر از حاشیه بافت آلوده و

خوزستان تأمین می‌شود (Shetab boushehri, 2017). افزایش کشت نخل خرما در سال‌های اخیر به صورت تک کشتی سبب بروز چالش‌های جدیدی از جمله ظهور آفات و بیماری‌ها شده است که می‌تواند بهره‌وری کشت را تا ۳۰٪ کاهش دهد (Gitau et al., 2009). از جمله بیماری‌های مهلک می‌توان بیماری بابود در مغرب و الجزایر و بیماری الویجام در کشورهای حاشیه خلیج فارس را نام برد (El Bouhssini and Faleiro, 2018). خشکیدگی برگ نخل از سال ۱۳۹۲ در استان خوزستان مشاهده شد و تا اردیبهشت ۱۳۹۳ در مناطق وسیعی از نخلستان‌های خوزستان گسترش یافت. در بسیاری از منابع علمی عوامل زنده قارچی و فیتوپلاسمایی به عنوان علل خشکیدگی برگ خرما معرفی شده‌اند. این بیماری در نخلستان‌های شادگان، دارخوین، آبادان، باوی، دشت آزادگان و بهبهان گزارش گردیده است (Shetab boushehri, 2017). قارچ *Fusarium proliferatum* Matsush. بیمارگر مهمی در سراسر جهان است و باعث بیماری در بسیاری از محصولات مهم مانند خرما، موز، انبه، ذرت، گندم، جو، سورگوم، مارچوبه، نخود، انجیر، پیاز و سیر می‌شود (Khudhair et al., 2014; Alberti et al., 2018). این عامل بیمارگر در عراق و عربستان سعودی به عنوان عامل پژمردگی فوزاریومی نخل خرما گزارش شده است (Latifian, 2016) و در منطقه قصیم و مدینه از برگ و ریشه درختان نخل جداسازی گردیده است (Abdalla et al., 2000). همچنین در بررسی‌هایی که در جنوب عراق انجام شد؛ این قارچ به عنوان عامل پوسیدگی گل آذین شناسایی گردید (Hameed, 2012). گونه *F. proliferatum* در مصر نیز به عنوان عامل لکه‌برگی در درختان خرما گزارش گردیده است (Farrag and Abo-Elyousr, 2011). در ایران نیز از روی میخک (Fattahi et al., 2014)، کنجد و سیکاس جداسازی شده است (Mirhosseini et al., 2016). در مدیریت بیماری‌های نخل در امارات متحده عربی، برای تعیین

- 1-Fusaric acid
- 2-Moniliformin
- 3-Fusaproliferin
- 4-Fumonisin B1
- 5-Beauvericin

جدول ۱- مناطق نمونه برداری و تعداد جدایه های فوزاریوم در هر منطقه

Sites	Geographic coordinates	Number of <i>Fusarium</i> isolates
Abadan- Savamer	48° 25' 12/28" E, 30° 16' 21/76" N	8
Abadan- Emam- Hasan	48° 24' 39" E, 30° 14' 26" N	12
Abadan- Maniohi	48° 24' 48" E, 30° 3' 41/27" N	7
Abadan- Naghshe hayer	48° 22' 96/1" E, 30° 13' 2/5" N	12
Abadan- Bahmanshir	48° 25' 56/76" E, 30° 16' 11/12" N	15
Shadegan- Geydari	48° 36' 1" E, 30° 39' 7" N	4
Shadegan- Khanafereh	48° 36' 27" E, 30° 38' 45" N	7
Khoramshahr- hafar	48° 12' 16/58" E, " N30° 20' 41/07"	4

Ghaedi et al.,) مطالعه قبلا گزارش شده است (2020).

به منظور شناسایی مولکولی گونه قارچ مورد مطالعه، از روش استخراج دی ان ای به روش ریدر و برودا (Raeder and Broda, 1985) با اندکی تغییر استفاده شد (Ahmadpour et al., 2017).

استخراج دی ان ای و تکثیر قسمتی از ناحیه *tef1*

زیست توده میسیلیومی یکی از جدایه ها به مدت ۱۰-۱۵ روز در محیط مایع سیب زمینی دکستروز^۳ (Larki et al., 2019) تهیه و در دستگاه فریز- درایر (Freeze Dryer, Alpha 1-2 LDplus, Christ) سرما-خشک شد. استخراج دی ان ای با استفاده از یک روش ارگانیک مبتنی بر فنل و کلروفرم انجام شد (Ahmadpour et al., 2017). برای تکثیر ۱۰۰۰ جفت باز از بخشی از ژن عامل تداوم ترجمه (*tef1*) از جفت آغازگرهای اختصاصی TEF171F و (AAAATGGGTAAGGAGGASAAGAC) و

TEF1997R

(CAGTACCGGCRGCRATRATSAG) استفاده گردید (Ozkale and Demirel, 2017). مخلوط واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم های ۵۰ میکرولیتر با استفاده از ۵ میکرولیتر بافر 10 x Taq buffer، غلظت ۳ میلی مول از $MgCl_2$ ، ۲ میکرولیتر از آغازگر مستقیم

سالم تهیه و پس از ضد عفونی سطحی به مدت ۲-۳ دقیقه با هیپوکلریت سدیم نیم درصد، سه بار با آب مقطر سترون شسته شدند. پس از خشک شدن نمونه ها به وسیله کاغذ صافی سترون، قطعه های گیاهی روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار^۱ محتوی ۳۰-۵۰ میلی گرم در لیتر سولفات استرپتومایسین قرار داده شدند (Heydari et al., 2018). تشک ها به مدت ۷-۱۰ روز در اتاقک کشت در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شدند. خلص سازی به روش تک اسپور کردن روی محیط کشت آب آگار^۲ و سیب زمینی دکستروز آگار انجام گرفت (Babaahmadi et al., 2018). جدایه های مورد مطالعه در کلکسیون قارچ های زنده گروه گیاه پزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز ذخیره شدند. برای نگهداری طولانی مدت قارچ ها از روش نگهداری قارچ روی کاغذ صافی سترون و ماسه بادی استفاده شد (Nelson et al., 1983; Leslie and Summerell, 2006).

شناسایی

به منظور شناسایی جنس قارچ از کلیدهای نلسون و همکاران (Nelson et al., 1983) و لزلی و سامرل (Leslie and Summerell, 2006) استفاده شد. جزئیات مربوط به شناسایی مرفولوژیکی جدایه مورد

1-Potato Dextrose Agar (PDA)
2-Water Agar (WA)

3-Potato Dextrose Broth (PDB)

برای ریشه‌دار کردن درخت فیلوژنتیک استفاده شد. فهرست گونه‌های *Fusarium* استفاده شده در واکاوی فیلوژنتیکی ژن *tefl* در این پژوهش به همراه رس‌شمار بانک ژن آن‌ها در جدول ۲ آمده است (جدول ۲). ارزیابی بهترین مدل برای رسم درخت با استفاده از همین نرم‌افزار انجام شد. انجام اعتبارسنجی (بوت استراپ) در ۱۰۰۰ تکرار سنجش و ارزش اعتبار بیشتر از ۵۰ درصد روی درخت فیلوژنی نشان داده شد.

آزمون بیماری‌زایی

بیماری‌زایی با دو روش اسپری کردن و تزریق سوسپانسیون اسپور انجام گرفت. دایره‌ای به قطر ۸ و عمق ۵ میلی‌متر در مرکز محور برگ نخل به وسیله یک سوزن سترون ایجاد شد (Farrag and Abo-Elyousr, 2011). سپس ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچ به آن قسمت تزریق گردید (Khudhair et al., 2014). در روش دیگر برای تلقیح نهال‌ها، از اسپری کردن سوسپانسیون اسپور و سپس پوشانیدن با کیسه‌های پلی‌اتیلنی استفاده شد (Khudhair et al., 2014).

جهت تهیه سوسپانسیون قارچ با غلظت 1×10^6 ابتدا جدایه‌ی مورد مطالعه SCUA-GHF روی محیط کشت آگار برگ میخک کشت شد. ظروف کشت به مدت پنج روز در دمای ۲۲-۲۳ درجه سلسیوس تحت شرایط نوری مداوم نگهداری شد. پس از گذشت پنج روز، جدایه به محیط کشتی که حاوی عصاره مخمر، پیتون، گلوکز، دینکو آگار و آب مقطر بود، منتقل شد. سپس سطح پتری با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون شسته شد و با کمک لام گلوبول‌شمار، سوسپانسیون اسپور با غلظت 1×10^6 تهیه شد (Azimi et al., 2005). تعیین بیماری‌زایی جدایه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. محاسبات آماری توسط نرم‌افزار SPSS ver. 22 (SPSS, 1998) و SAS ver. 9.1 (SAS, 2005) و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

(۱۰ میکرومول)، ۲ میکرولیتر از آغازگر معکوس (۱۰ میکرومول)، ۱ میکرولیتر از dNTP (از هر یک ۲/۵ میکرومول)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم (۵ واحد بر میکرولیتر) Taq DNA polymerase، ۲ میکرولیتر از DNA الگو (حدود ۲۰۰ نانوگرم) و آب مقطر ۲ بار تقطیر شده تا حجم ۵۰ میکرولیتر تهیه و تکثیر در دستگاه ترموسایکلر مدل MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler انجام شد.

توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل توالی‌ها با انجام عملیات جستجوی BLASTn^۱ و فیلوژنی مولکولی

برای ارزیابی محصول PCR، از ژل آگارز ۱ درصد با بافر TBE 1X در یک میدان الکتريکی با ولتاژ ۹۵ تا ۱۰۰ ولت در دستگاه الکتروفورز استفاده شد. باند هدف جداسازی و سپس با استفاده از کیت استخراج از ژل GF-1 AmbiClean Kit خالص‌سازی شد. توالی‌یابی توسط آزمایشگاه ژنتیک نرگس واقع در شهر اهواز صورت گرفت. توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار BioEdit ver. 4.0.6.2 (Hall, 1999) ویراستاری شدند.

خوانش‌های مستقیم و معکوس با استفاده از نرم‌افزار DNABaser ver 3. 5. 0 انجام و در بانک ژن ذخیره گردید. توالی به دست آمده از تکثیر قسمتی از ناحیه *tefl* با استفاده از ابزار جستجوی BLASTn (Altschul et al. 1997) با توالی‌های موجود در GenBank و پایگاه اطلاعاتی FUSARIUM-ID v. 1.0 مقایسه شدند (Geiser et al., 2004; O'Donnell et al., 2015). واکاوی تبارشناسی مبتنی بر ناحیه *tefl* با استفاده از روش بیشینه درست‌نمایی^۲ و با کمک نرم‌افزار ver6.0MEGA (Tamura et al., 2013) انجام شد. یک سویه از گونه *Fusarium incarnatum-equiseti* به عنوان آرایه گروه خارجی^۳

1-Biological Local Alignment Search Tool
2-Maximum likelihood
3-Out group

جدول ۲- فهرست گونه‌های *Fusarium* استفاده شده در واکاوی فیلوژنتیکی ژن *tef1* در این پژوهش به همراه رس شمار بانک ژن آن‌ها

Table 2. List of *Fusarium* species used in phylogenetic analysis of *tef1* gene in this study with their gene bank Accession number

Species	Isolate	Host	Accession number	Refrence
<i>F. proliferatum</i>	NRRL22944	Unknown	AF160280	O'Donnell <i>et al.</i> , 2000.
<i>F. globosum</i>	NRRL26131	Unknown	AF160285	O'Donnell <i>et al.</i> , 2000.
<i>F. fujikuroi</i>	NRRL13566	Unknown	AF160279	O'Donnell <i>et al.</i> , 2000.
<i>F. sacchari</i>	NRRL13999	Sugarcane	AF160278	O'Donnell <i>et al.</i> , 2000.
<i>F. concentricum</i>	NRRL25181	Unknown	AF160282	O'Donnell <i>et al.</i> , 2000.
<i>F. verticillioides</i>	NRRL22172	Unknown	AF160262	O'Donnell <i>et al.</i> , 2000.
<i>F. fractiflexum</i>	NRRL28854	<i>Cymbidium</i> sp.	AF333932	Aoki <i>et al.</i> , 2001
<i>F. fujikuroi</i>	Mo309	Rice (<i>Oryza sativa</i>)	JN695747	Suga <i>et al.</i> , 2014
<i>F. oxysporum</i> f. <i>cubense</i>	CAV794	Banana (<i>Musa spp.</i>)	FJ664922	Fourie <i>et al.</i> , 2009
<i>F. mangiferae</i>	UMAF_0924	Mango (<i>Mangifera</i>)	KP753402	Crespo <i>et al.</i> , 2016.
<i>F. mangiferae</i>	BTDF6	<i>Sansevieria trifasciata</i>	MN386751	Kee <i>et al.</i> , 2020
<i>F. fracticaudum</i>	CBS 137233	Unknown	MK639041	Wigmann <i>et al.</i> , 2019
<i>Gibberella moniliformis</i>	OS116	Rice (<i>Oryza sativa</i>)	JX867953	Kim <i>et al.</i> , 2012.
<i>F. incarnatum-equiseti</i>	BOLSUD	Unknown	MH392485	Ortega-Acosta <i>et al.</i> , 2018. Unpublished data
<i>F. sacchari</i>	KC8	<i>Rhynchosytilis orchids</i>	MH756646	Dekham and Kanchanawatee, 2018. Unpublished data
<i>F. proliferatum</i> *	SCUA-GHF	Date palm (<i>Phoenix dactylifera</i>)	MT062910	Ghaedi <i>et al.</i> , 2020

* جدایه بررسی شده در پژوهش حاضر

۹۹/۵۵ *proliferatum* strain TOR-55 تشابه درصدی دارد. واکاوی تبارشناسی جدایه‌ی حاصله در این مطالعه با توالی‌های مربوط به سویه‌های تیپ با استفاده از روش بیشینه‌ی درست‌نمایی، تعلق آن را به این گونه تایید کرد (شکل ۱). *F. proliferatum* اولین بار از برگ و ریشه درختان نخل در عربستان جداسازی و به عنوان عامل پژمردگی فوزاریومی و سرخشیدگی درختان نخل معرفی شد. این گونه در ایران نیز به عنوان عامل پوسیدگی گل‌آذین خرما معرفی شده است (Amani, 2018). گونه‌های مختلف *Fusarium* می‌توانند زمینه را برای حمله بیمارگرهای دیگری در نخلستان‌ها فراهم کنند (Al Yaseri et al., 2016). دیگر قارچ‌های جداسازی شده در این پژوهش شامل جنس‌های *Helminthosporium*، *Alternaria*، *Cylindrocarpon*، *Curvularia*، *Chaetomium* و *Stemphylium* بودند.

پس از حدود چهار هفته از آزمون بیماری‌زایی، علائم زردی برگ‌ها به صورت یک‌طرفه مشاهده گردید. در ابتدا لکه‌های کوچک ۲ میلی‌متری در اطراف محل آلوده شده دیده شد. علائم مشاهده شده در آزمون بیماری‌زایی، با آنچه که در شرایط نخلستان دیده شده بود کاملاً مطابقت داشت. جدا سازی مجدد قارچ عامل بیماری از گیاهان مایه‌زنی شده اثبات این فرضیه بود که قارچ *F. proliferatum* عامل بیماری خشکیدگی برگ درختان نخل خرما می‌باشد. ظهور علائم در تمام غلظت‌ها از هفته چهارم شروع شد. اما شدت بروز بیماری در غلظت‌های 5×10^5 و 5×10^6 بیشتر بود و به تدریج زردی به محور برگ هم گسترش یافت (شکل ۲).

علائم از هفته پنجم به صورت زرد شدن قسمت بیشتر برگچه‌های یک طرف ظاهر شد که در پایان هفته ششم در غلظت‌های 5×10^5 و 5×10^6 اسپور در میلی‌لیتر برگچه‌های یک طرف محور کاملاً خشک شدند (اشکال ۳ و ۴).

پاجوش‌های کشت بافتی دو ساله و سالم با شرایط رشدی یکسان از رقم استعمران انتخاب شدند. در تیمار شاهد آب مقطر سترون به هر دو روش استفاده شد. پاجوش‌ها و گلدان آن‌ها در گلخانه با دمای 24 ± 3 سلسیوس و رطوبت نسبی 60 ± 5 درصد نگهداری و به مدت شش هفته بازبینی شدند، مشاهدات به صورت هفتگی ثبت و با تیمار شاهد مقایسه گردید. همچنین طبق اصول کخ، جداسازی مجدد عامل بیمارگر از پاجوش‌های آلوده مورد بررسی قرار گرفت (Khudhair et al., 2014). برای انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای، چهار غلظت سوسپانسیون قارچ جدایه‌ی SCUA-GHF شامل 5×10^3 ، 5×10^4 ، 5×10^5 و 5×10^6 اسپور در میلی‌لیتر و هر کدام در چهار تکرار به کار برده شد.

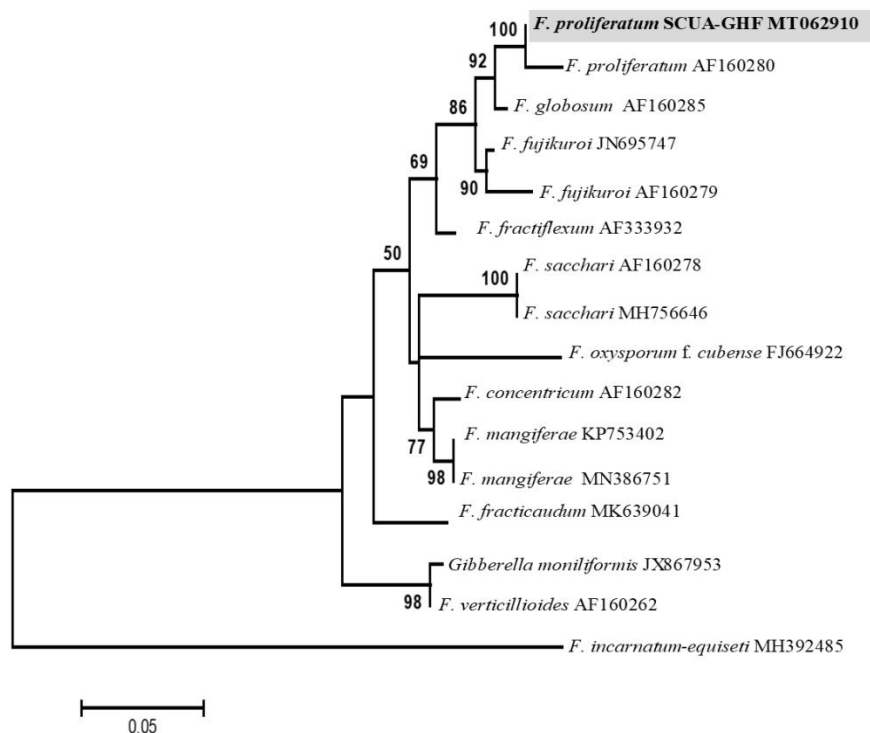
نتایج و بحث

شناسایی ریخت‌شناسی جدایه *Fusarium proliferatum* Matsush. (جدایه SCUA-GHF)

جدایه‌های به دست آمده از نقاط مختلف ذکر شده در جدول شماره ۱ از نظر ریخت‌شناسی مشابه هم بودند. میزان رشد پرگنه در محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار سریع بود. میسلیوم‌های هوایی ابتدا سفید رنگ بوده که با گذشت زمان به رنگ کرم تغییر رنگ داد. رنگ سطح زیرین پرگنه از کرم تا بنفش متغیر بود. میکروکنیدیوم‌ها بدون دیواره عرضی و تک سلولی؛ ماکروکنیدیوم‌ها نسبتاً راست با اندکی خمیدگی بودند. بالشتک اسپور به رنگ نارنجی روی تکه‌های برگ میخک مشاهده شد. در این گونه کلامیدوسپور تشکیل نشده. اطلاعات کامل‌تر قبلاً ارائه شده است (Ghaedi et al., 2020).

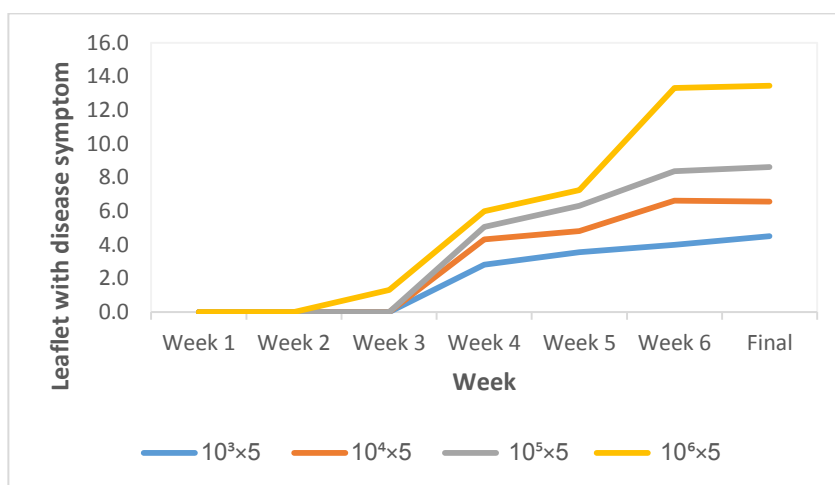
نتایج بررسی مولکولی جدایه‌ی مورد مطالعه

جستجوی بلاست نشان داد که توالی مربوط به جدایه‌ی مورد مطالعه با سویه‌های مرجع گونه *F.*



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده‌ی جدایه‌های *Fusarium* که در واکاوی بیشینه درست‌نمایی بر اساس هم‌ردیفی توالی قسمتی از ناحیه‌ی *Tef1a* با استفاده از مدل TN93+G به دست آمده است. اعداد روی محل انشعاب شاخه‌ها نشان‌دهنده‌ی درصد مقادیر بوت‌استرپ بزرگتر یا مساوی ۵۰ درصد است. درخت با استفاده از گونه *Fusarium incarnatum-equiseti* ریشه‌دار شده است.

Figure 1. Phylogenetic tree constructed from a maximum likelihood analysis based on a concatenated alignment from *Tef1a* sequences of *Fusarium* isolates under TN93+G model. Bootstrap values greater than 50% (expressed as percentages of 500 replications) are shown at the node. The tree was rooted with *Fusarium incarnatum-equiseti*.



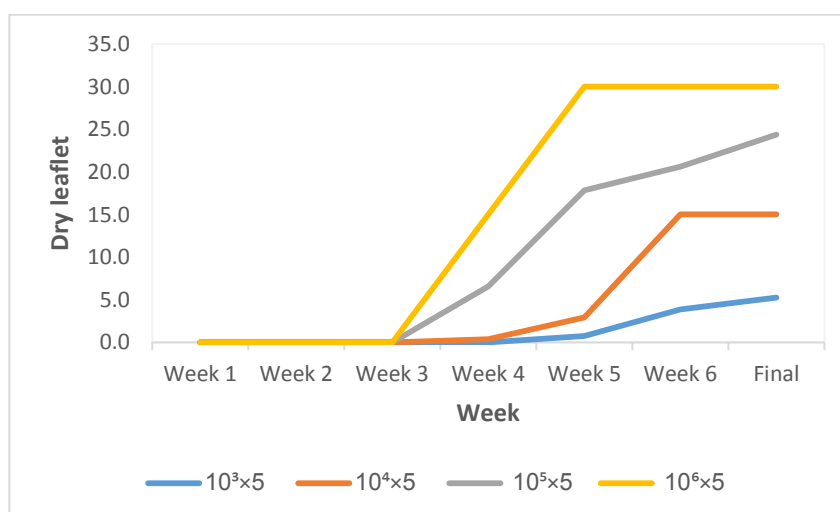
شکل ۲- شروع ظهور علائم در برگچه‌های پاجوش‌های دو ساله درخت خرما رقم استعمران و پیشرفت آن در هفته‌های متفاوت با غلظت‌های متفاوت سوسپانسیون قارچ *F. proliferatum* (جدایه SCUA-GHF)

Figure 2. The emergence of symptoms in two-year-old offshoots leaflets of sayer date palm and its progress in different weeks with different concentrations of *F. proliferatum* (SCUA-GHF) suspension



شکل ۳- A- خشک شدن برگ پاجوش دو ساله درخت خرما رقم استعمران به صورت یک طرفه در پایان هفته ششم پس از تزریق با سوسپانسیون قارچ *F. proliferatum* (جدایه SCUA-GHF)، B- راست- تست، چپ- شاهد

Figure 3- A. Asymmetrical leaf drying of two- year- old sayer date palm at the end of the sixth week after injection with *F. proliferatum* (SCUA-GHF) suspension, B- Right- Treatment, B- Control



شکل ۴- برگچه‌های خشک پاجوش‌های دو ساله درخت خرما رقم استعمران از هفته چهارم تا ششم با غلظت‌های متفاوت سوسپانسیون قارچ *F. proliferatum* (جدایه SCUA-GHF)

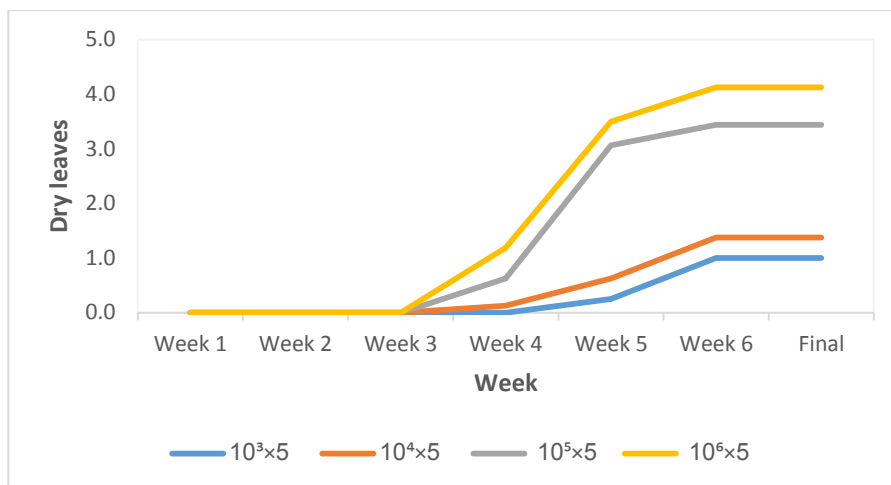
Figure 4. Offshoots dry leaflets of 2 year old sayer date palm from the fourth to sixth week with different concentrations of *F. proliferatum* (SCUA-GHF) suspension

نتایج بررسی و تحقیق در نخلستان‌های عراق نشان داد که دلیل اصلی برخی از مهمترین بیماری‌هایی که عمدتاً بر روی نخل‌ها گسترش یافته و باعث مرگ آنها شدند گونه‌های مختلف قارچ *Fusarium* بودند. سموم تولید شده توسط گونه‌های مختلف این قارچ باعث بروز علائم مختلف در درختان نخل شده و *F. proliferatum* باعث مرگ سریع و خشک شدن کامل نخل گردید (Al Yaseri et al., 2016).

از برگچه‌های دارای علائم بیماری، قارچ *F. proliferatum* جداسازی شد؛ این برگچه‌ها در ابتدا زرد بودند که با پیشرفت بیماری خشک شدند. شدت بروز علائم بر حسب تعداد برگچه‌های با علائم بیماری در غلظت‌های 5×10^5 و 5×10^6 ، بیشتر بود و در نهایت برگ‌های بیشتری به صورت یک طرفه زردی و خشکیدگی را نشان دادند (شکل ۵).

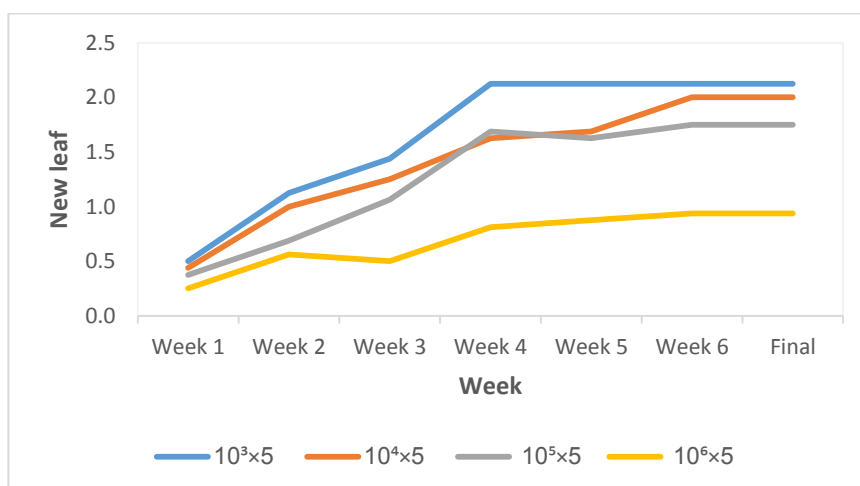
آب و مواد مغذی شده و منجر به از بین رفتن نخل در مدت کوتاهی می شود (Al Yaseri et al., 2016). در مناطقی از کشور پاکستان نیز گونه های مختلف قارچ *Fusarium* باعث محدودیت کشت درختان نخل و توسعه ی نخلستان ها شده است (Abul Soad et al., 2011).

در پاجوش های آلوده ایجاد و رشد برگ های جدید کند یا متوقف شد. در غلظت های 5×10^5 و 5×10^6 اسپور در میلی لیتر سوسپانسیون قارچ، رشد برگ های جدید پس از مدتی متوقف و در غلظت های 5×10^3 ، 5×10^4 کند شد (شکل ۵). این قارچ از طریق آوندهای چوبی در تنه حرکت کرده باعث جلوگیری از نقل و انتقال



شکل ۵- برگ های خشک پاجوش های دو ساله خرما رقم استعمران با برگچه های خشک یک طرف محور پس از تزریق سوسپانسیون قارچ *F. proliferatum* (جدایه SCUA-GHF)

Figure 5. Dry leaves of two- year- old sayer date palm offshoots with asymmetrical dry leaflet after injection *F. proliferatum* (SCUA-GHF) suspension



شکل ۶- تولید برگ های جدید در پاجوش های دو ساله خرما رقم استعمران پس از تزریق سوسپانسیون قارچ *F. proliferatum* (جدایه SCUA-GHF) در طول شش هفته

Figure 6. Production of new leaves in two- year- old sayer date palm offshoots after injection *F. proliferatum* (SCUA-GHF) suspension

با عارضه به صورت خطوطی موازی هم در محل نزدیک اتصال دمبرگ به تنه ظاهر می‌شود (Shetab boushehri, 2017). مطابق با نتایج این تحقیق، قارچ *F. proliferatum* از نمونه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان‌های آبادان، خرمشهر و شادگان جداسازی و به عنوان عامل خشکیدگی برگ نخل در این مناطق معرفی می‌شود. علائم این بیماری در نخلستان به صورت خشکیدگی سریع سه تا چهار ردیف برگ‌های پایینی می‌باشد که در حالات شدید در مدت تقریبی ۳ هفته برگ‌ها خشک می‌شوند. خشکیدگی برگ‌ها در ابتدا به صورت خشک شدن برگچه‌های یک طرف برگ می‌باشد که در موارد شدید دیده شده که پس از گذشت مدت زمانی کوتاه برگ‌ها کاملاً خشک می‌شود (Shetab boushehri, 2017). با توجه به نقش مهم درخت نخل در اقتصاد و معیشت نخلداران لزوم مطالعه و بررسی بیشتر در مورد این بیماری مهلک و راهکارهای جدی برای کنترل آن پیشنهاد می‌شود.

سپاس‌گزاری

بدینوسیله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز قدردانی می‌گردد.

جدایه‌های قارچ فوزاریوم در عراق با استفاده از پارامترهای ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی شدند. عامل بیماری در این درختان نخل در جنوب عراق، *F. proliferatum* بود. شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی جدایه به دست آمده از نخلستان‌ها، در این تحقیق نیز *F. proliferatum* را تشخیص داد شد. حمید (Hameed, 2012) گزارش داد که *F. proliferatum* سبب بیماری پوسیدگی گل آذین درختان خرما می‌شود که منجر به کاهش قابل ملاحظه عملکرد در جنوب عراق شد. این بیمارگر به مقدار زیادی از درختان نخل در جزایر قناری جداسازی شده و باعث پژمردگی و سرخشکیدگی درختان نخل شده است (Hameed, 2012). علائم ایجاد شده توسط این قارچ شامل رنگ‌پریدگی، خشکیدگی و پژمردگی می‌باشد (Saleh et al., 2016).

اکثر ارقام تجاری نخل خرما استان خوزستان به این بیماری حساس بوده ولی بعضی ارقام مثل رقم خضراوی حساسیت بیشتری دارند. در مواقعی روی دمبرگ‌های کاملاً خشکیده رشد قارچ‌های ساپروفیت مشاهده شد. بر روی دمبرگ‌ها فرورفتگی و خطوط زرد رنگ مشاهده شد و در حالات پیشرفته اندام‌های بارده قارچ‌های همراه

REFERENCES

- Abdalla, M. Y., AL-Rokibah, A., Moretti, A., and Mule, G. 2000. Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from date palm in Saudi Arabia. *Plant Disease*, 84: 321–324.
- Abul Soad, A. A., Maitlo, W. A., Markhand, G. S., and Mahdi, S. M. 2011. Date palm wilt disease (Sudden decline syndrome) in Pakistan, symptoms and remedy. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/260225334> (accessed in 18 February 2014).
- Ahmadpour, S. A., Mehrabi-Koushki, M., and Farokhinejad, R. 2017. *Neodidymelliopsis farokhinejadii*, a new fungal species from dead branches of trees in Iran. *Sydowia*, 69: 171–182.

Alberti, I., Prodi, A., Montanari, M., Paglia, C., and Nipoti, P. 2018. First report of *Fusarium proliferatum* associated with *Allium fistulosum* L. in Italy. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 125(2): 231–233.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17): 3389–3402.

Alwahshi, K. J., Saeed, E. E., Sham, A., Alblooshi, A. A., Alblooshi, M. M., El-Tarabily, K. A., and AbuQamar, S. F. 2019. Molecular Identification and Disease Management of date palm sudden decline syndrome in the united arab emirates. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(923): 2–18.

Al Yaseri, I. I., Adnan, Saad, N., Zuhair Ismail, A., and Rahim Nasser, A. 2016. Identification and Diagnosis of Some Pathological Phenomena on the Date Palm caused by *Fusarium* Species in Iraq. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(7): 692–700.

Amani, M. 2016. Introduction of Date palm leaf blite disease. 2nd International Conference on Agricultural Engineering and Natural Resources. 16–17 Feb. 2016. Tehran, Iran.

Amani, M., Farrokhi Nejad, R., and Mehrabi Koshki, M. 2018. Inflorescence rot disease of date palm caused by *Fusarium proliferatum* in Southern of Khozestan Province. 23rd Iranian Plant Protection Congress. 27–30 Aug. 2018. Gorgan, Iran.

Aoki, T., O'Donnell, K., and Ichikawa, K., 2001. *Fusarium fractiflexum* sp. nov. and two other species within the *Gibberella fujikuroi* species complex recently discovered in Japan that form aerial conidia in false heads. *Mycoscience*, 42(5): 461–478.

Azimi, S., Farrokhinejad, R., and Mousavi Jorof, S. A. 2005. Identification and investigation of pathogenicity of *Fusarium* with crown and roots of bean in Khuzestan province. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 28(1):149–163 (In Farsi with English abstract).

Babaahmadi, G., Mehrabi-Koushki, M., and Hayati, J. 2018. *Allophoma hayatii* sp. nov., an undescribed pathogenic fungus causing dieback of *Lantana camara* in Iran. *Mycological Progress*; 17(3): 365-379.

Crespo, M., Cazorla, F.M., De Vicente, A., Arrebola, E., Torés, J.A., Maymon, M., Freeman, S., Aoki, T., and O'Donnell, K., 2016. Analysis of genetic diversity of *Fusarium tuiense*, the main causal agent of mango malformation disease in southern Spain. *Plant Disease*, 100(2): 276–286.

El Bouhssini, M., and Faleiro, J. R. 2018. Date palm pests and diseases: Integrated management guide. *International Center for Agriculture Research in the Dry Areas (ICARDA)*, 232 p.

El Shafie, H. A. F., Abdel-Banat, B. M. A., and Al-Hajhoj, M. R. 2017. Arthropod pests of date palm and their management. CAB Reviews, 12(049): 1–18.

FAOSTATE. 2018: <http://www.Fao.org/faostate/en/#data/QC/visualize-07-November-2018>.

Farrag, E. S. H., and Abo-Elyousr, K. A. 2011. Occurrence of some fungal diseases on Date palm trees in Upper Egypt and its control. Plant Pathology Journal, 10: 154–160.

Fattahi, B., Rahanandeh, H., Chavoshi, S., Zamanizadeh, H.R., Bayat, H., and Moshayedi, M. 2014. Report primary of *Fusarium Proliferatum* and *Fusarium solani* agents of *Dianthus caryophyllus* wilting in Markazi province in Iran. International Journal of Biosciences, 4(1): 143–148.

Fourie, G., Steenkamp, E.T., Gordon, T.R., and Viljoen, A., 2009. Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense vegetative compatibility groups. Applied and environmental microbiology, 75(14): 4770–4781.

Geiser, D. M., Jiménez-Gasco, M. M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N. Kuldau G. A., and O'donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA Sequence Database for Identifying *Fusarium*. European Journal of Plant Pathology, 110: 473–479.

Ghaedi, H., Kocheili, F., Latifian, M., and Farrokhi Nejad, R. 2020. Role of *Oryctes elegans* (Coleoptera: Scarabaeidae) as a vector of *Fusarium proliferatum*, the pathogen of *Fusarium* leaf wilt disease of date palm in Khuzestan province. Journal of Entomological Society of Iran, 40(1): 47–64.

Gitau, C. W., Gurr, G. M., Dewhurst, C. F., Fletcher, M. J., and Mitchel, A. 2009. Insect pests and insect-vectored diseases of palms. Australian Journal of Entomology, 48: 328–342.

Hall, T. A. 1999. BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95–98.

Hameed, M. A. 2012. Inflorescence rot disease of date palm caused by *Fusarium proliferatum* in southern Iraq. African Journal of Biotechnology, 11: 8616–8621.

Heydari, K., Farrokhi nejad, R., and Mehrabi-Koushki, M. 2018. Detection and molecular identification of *Colletotricum* species causing anthracnose disease of some plants in Khuzestan province (Iran). Rostaniha, 19(1): 19–23.

Kee, Y.J., Zakaria, L., and Mohd, M.H., 2020. Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Fusarium* species from *Sansevieria trifasciata* in Malaysia. Plant Pathology, 69(3): 442–454.

Kim, J.H., Kang, M.R., Kim, H.K., Lee, S.H., Lee, T., and Yun, S.H., 2012. Population structure of the *Gibberella fujikuroi* species complex associated with rice and corn in Korea. Plant Pathology Journal, 28(4): 357–363.

Khudhair, M. W., Aboud, H. M., Khalaf, M. Z., and Shbar, A. K. 2014. *Oryctes elegans*, a vector of *Fusarium proliferatum* causing wilt disease symptoms of date palm. International Journal of Phytopathology, 03(02): 67–72.

Larki, R., Mehrabi-Koushki, M., and Farokhinejad, R. 2019. Identification of *Chaetomium* and *Amesia* Species Associated with Different Diseases of some Herbaceous Ornamentals in Ahwaz. Biological Journal of Microorganism, 31: 33–50 (In Farsi with English abstract).

Latifian, M., 2016. Integrated date palm pest manegment. Ahange Ghalam, 461p.

Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. 1st ed. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing., All rights reserved., USA, 399 p.

Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2006. 1st ed. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing., All rights reserved., USA, 399 p.

Mirhosseini, H. A., Babaeizad, v., Hashemi, L., and Basavand, E. 2016. Identification and investigation of genotypic and phenotypic characteristics of several plant pathogenic *Fusarium* isolated on different hosts. Journal of Entomology and Phytopathology, 84(2): 227–238.

Moussouni, S., Pintaud J-C., Vigouroux, Y., and Bouguedoura, N. 2017. Diversity of Algerian oases date palm (*Phoenix dactylifera* L., Arecaceae): Heterozygote excess and cryptic structure suggest farmer management had a major impact on diversity. PLOS ONE, 12(4): e0175232.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press. USA, 193 P.

O'Donnell, K., Nirenberg, H.I., Aoki, T., and Cigelnik, E., 2000. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. Mycoscience, 41(1): 61–78.

O'Donnell, K., Ward, T. J., Robert, V., Crous, P. W., Geiser, D. M., and Kang, M. 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. Phytoparasitica, 43:583–595.

Ozkale, E. and Demirel, P. 2017. Molecular Characterization of Some Soil Originated *Trichoderma* Species. Hecettep Journal of Biology and Chemistry, 45(4): 585–591.

Raeder, U., and Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology, 1: 17–20.

Saleh, A. A., Sharafaddin, A. H., El-Komy, M. H., and Ibrahim, Y. E. 2016. *Fusarium* species associated with date palm in Saudi Arabia. European Journal of Plant Pathology, 148(2): 367–377.

SAS Institute. (2005) SAS/STAT user's guide, version 9.1. SAS Institute, Cary, NC.

Shetab boushehri, M. 2017. Date palm wilt disease. Agricultural Management Publishing. Khuzestan Ministry of Agriculture–Jihad, 16 p.

SPSS (1998) SPSS 8.0 for Windows. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.

Suga, H., Kitajima, M., Nagumo, R., Tsukiboshi, T., Uegaki, R., Nakajima, T., Kushiro, M., Nakagawa, H., Shimizu, M., Kageyama, K., and Hyakumachi, M., 2014. A single nucleotide polymorphism in the translation elongation factor 1 α gene correlates with the ability to produce fumonisin in Japanese *Fusarium fujikuroi*. Fungal biology, 118(4): 402–412.

Wigmann, É.F., Behr, J., Vogel, R.F., and Niessen, L., 2019. MALDI-TOF MS fingerprinting for identification and differentiation of species within the *Fusarium fujikuroi* species complex. Applied microbiology and biotechnology, 103(13): 5323–5337.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30(12): 2725–2729.



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Report of *Fusarium proliferatum* causing leaf wilt disease of date palm in Khuzestan Province

H. Ghaedi¹, F. Kocheili*², M. Latifian³ and R. Farrokhi Nejad⁴

1. Ph.D student of Agricultural Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2. *Corresponding Author: Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran) (f.kocheili@scu.ac.ir)
3. Associate Professor, Education and Extension Organization, Horticulture Science Research Institute, Karaj, Iran
4. Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

(DOI): 10.22055/PPR.2020.16249

Received: 10 January 2020

Accepted: 22 December 2020

Abstract

Background and objective

Date palm *Phoenix dactylifera* L. is one of the income sources of cultural and economic importance in several countries. Leaf wilt disease is one of the important diseases observed in palm gardens in Khuzestan province. Disease symptoms are observed as asymmetrical leaves drying. *Fusarium proliferatum* is a common pathogen infecting numerous crops, including banana, carnation, cycads, date palm, garlic, mango, maize, onion, rice, and sesame plants.

Materials and Methods

To identify the causal agent(s), infected samples were collected from Abadan, Khorramshahr, and Shadegan cities and transferred to the laboratory. The samples were then disinfected and cultured on potato dextrose agar (PDA) plates. Fungi were purified by the single-spore technique. For molecular identification, the colonies were inoculated in potato-dextrose broth (PDB) and the grown mycelium mass was used for DNA extraction. Polymerase chain reaction was done with reaction initiators of Tef171F and Tef1997R to replicate a part of the *tef1* region.

Results

BLAST search showed that the sequence of the studied isolate was 99.55% similar to both the confirmed isolate and the reference of *F. proliferatum* strain TOR-55. Phylogenetic analysis of the isolate with sequences related to type strains, using the maximum likelihood, confirmed that they belonged to this species. Pathogenicity test was followed by re-isolation from the inoculated plants.

Discussion

These results indicated that all four concentrations were able to infect trees and cause disease symptoms and pathogenicity. However, disease severity was higher at 5×10^5 and 5×10^6 spores per ml than the other concentrations of spores used here. The second two concentrations of spores were more effective in drying of leaflets and leaves.

Keywords: *Wilt disease, Molecular methods, Fusarium proliferatum, tef1*