



Research Article

Evaluation of the possibility of determining genetic diversity of *Mauginiella scaettae* isolates using UP-PCR

Hamid Alvanipour^{1✉}, Mohammad Javan-Nikkhah², Heshmatollah Aminian³,
Khalil Alami-Saeid⁴, Karim Sorkheh⁵

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science & Engineering, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Department of Agricultural Entomology and Plant Pathology, College of Agricultural Technology (Aburaihan), Pakdasht, Iran
4. Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
5. Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Abstract

The fungus *Mauginiella scaettae* is the causative agent of the destructive Khamej disease (inflorescence rot) common in various date palm cultivation areas. UP-PCR is one of the DNA fingerprinting methods with high reproducibility and specificity. The aim of this study was to investigate the possibility of DNA amplification with UP-PCR primers and the feasibility of studying the genetic diversity of *M. scaettae* isolates using this marker. Date palm inflorescences with Khamej disease symptoms were sampled in Khuzestan and Fars provinces. The purified isolates were identified based on morphological characteristics and confirmed by amplification and sequencing of the ITS-nrDNA genomic region. Three primer pairs UP-15/19, UP-21 and UP-45 were used to investigate the possibility of amplification and determine the genetic diversity among the fungal isolates. Five isolates of *M. scaettae* were obtained from three cities: Abadan, Karun and Behbahan in Khuzestan province and one sample from Kazerun in Fars province. The isolates were obtained from four date palm cultivars: Sayer, Khazravi, Khasi and Zahedi. Constructing of phylogenetic tree based on ITS sequences confirmed that the isolate belonged to *M. scaettae* fungus with 100% bootstrap values. Examination of the UP-PCR marker amplification results showed that the highest number of observed bands was related to the UP15 primer and the lowest number of bands was related to the UP45 primer. Band diversity was observed between the UP-PCR primers used, but genetic diversity was not observed among the five *M. scaettae* isolates in any of the three UP-PCR primers and the banding pattern of the isolates was similar for each primer. The reason for the failure to detect genetic diversity between isolates of this pathogen using these primers and the marker could be due to their close genetic relationship.

Keywords: Fingerprinting, Disease, Khamej, Date palm

مقاله پژوهشی

ارزیابی امکان تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Mauginiella scaetiae* با UP-PCRحمید علوانی پور^{۱*}، محمد جوان‌نیکخواه^۲، حشمت‌اله امینیان^۳، خلیل عالمی‌سعید^۴، کریم سرخه^۵

۱. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

۴. گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

۵. گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

قارچ *Mauginiella scaetiae* عامل بیماری مخرب خامج (پوسیدگی گل‌آذین) شایع در مناطق مختلف کشت نخل خرما است. UP-PCR یکی از روش‌های انگشت‌نگاری DNA است که تکرارپذیری و اختصاصیت بالایی دارد. هدف از این مطالعه بررسی امکان تکثیر DNA با آغازگرهای UP-PCR و امکان‌سنجی بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *M. scaetiae* با استفاده از این نشانگر بود. گل‌آذین‌های نخل خرمای دارای علائم بیماری خامج در استان‌های خوزستان و فارس نمونه‌برداری شدند. جدایه‌های خالص شده، براساس مطالعه خصوصیات ریختی شناسایی و با تکثیر و با توالی‌یابی ناحیه‌ی ژنومی ITS-nrDNA تایید شدند. از سه جفت آغازگر UP-15/19، UP-21 و UP-45 به منظور بررسی امکان تکثیر و تعیین تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های قارچ استفاده شد. پنج جدایه‌ی *M. scaetiae* از سه شهرستان آبادان، شهرستان کارون و بهبهان استان خوزستان و یک نمونه از شهرستان کازرون استان فارس به دست آمدند. جدایه‌ها از روی چهار رقم نخل خرمای: سایر، خضراوی، خاصی و زاهدی به دست آمدند. واکاوی تبارزایی با اعتبار سنجی ۱۰۰ درصد تعلق جدایه‌ی مورد مطالعه را به قارچ *M. scaetiae* تایید نمود. بررسی نتایج تکثیر نشانگر UP-PCR نشان داد بیش‌ترین تعداد باند مشاهده شده مربوط به آغازگر UP15 و کمترین تعداد باند مربوط به آغازگر UP45 است. بین آغازگرهای UP-PCR به کار رفته، تنوع بانندی دیده شد، ولی بین پنج جدایه‌ی *M. scaetiae* در هیچ یک از سه آغازگر UP-PCR تنوع ژنتیکی مشاهده نشد و الگوی بانندی جدایه‌ها برای هر کدام از آغازگرها شبیه هم بود. دلیل عدم تشخیص تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های این بیمارگر با استفاده از این آغازگرها و نشانگر، می‌تواند ناشی از رابطه‌ی ژنتیکی نزدیک آنها باشد.

واژگان کلیدی: انگشت‌نگاری، بیماری، خامج، نخل خرما

Introduction

مقدمه

بیماری قارچی خامج ناشی از *Mauginiella scaetiae* Cav. یکی از بیماری‌های مهم نخل خرما در دنیا است.

* دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۲، بازنگری: ۱۴۰۳/۰۹/۲۵، پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۸

اولین علامت شناسایی بیماری ظهور لکه‌های قهوه‌ای تیره روی غلاف گل‌آذین است. این لکه‌ها با توسعه بیماری گسترش یافته و قارچ گل‌ها و محورها را خوشه را آلوده می‌کند. در آلودگی شدید بیماری به محور گل‌آذین می‌رسد و کل اسپات پوسیده و گندیده می‌شود و با پوشش سفید رنگ کنیدیوم‌های و میسلیم‌های قارچ پوشیده می‌شود. این بیماری در سال ۱۵-۲ درصد به محصول خرما خسارت وارد می‌کند و در سال‌های با شرایط آب و هوایی مساعد برای قارچ، بیماری به حالت اپیدمی درآمده تا ۸۰-۷۰ درصد هم خسارت وارد می‌کند (Abdullah et al. 2005). یکی از راه‌های موثر در مدیریت بیماری‌ها شناسایی رقم‌های مقاوم است. اما موفقیت در اصلاح ارقام مقاوم بدون شناخت کافی از ژنتیک بیمارگر میسر نخواهد بود. بنابراین بدون تردید مشخص شدن ماهیت دقیق ژنتیکی قارچ *M. scaetiae* نقش مهمی در برنامه‌های مدیریتی آن ایفا خواهد کرد (Alvanipour et al., 2022). کاربرد نشانگرها در علم بیماری‌شناسی گیاهی سابقه طولانی داشته و محققین این علم از دیرباز به دنبال درک تفاوت‌ها و تفکیک موجودات حتی تا سطوح تاکسونومیک پایین‌تر از گونه بوده و تولد واژه‌هایی نظیر زیرگونه، پاتوتیپ و غیره در حقیقت حاصل این تلاش‌ها بوده است. به‌طور کلی، برای اینکه صفتی به عنوان نشانگر تلقی شود باید دارای دو خصوصیت مهم و کلیدی باشد؛ اول اینکه صفت توانایی توارث داشته باشد و دوم اینکه بتواند بین افراد آن گونه تفاوت یا چندشکلی را نشان دهد. نشانگرهای مبتنی بر فنوتیپ و مرفولوژی که پایه علم قارچ‌شناسی کلاسیک به شمار می‌آیند هرگز خالی از اشکال نبودند چرا که این نشانگرها غالباً متأثر از سن قارچ و شرایط محیطی هستند (Galehdari et al. 2006). در دهه‌های اخیر و با پیشرفت در علم ژنتیک مبتنی بر تکثیر DNA، تلاش‌ها برای فهم تفاوت‌ها و مطالعه‌ی تنوع موجودات براساس این ماده‌ی ژنتیکی قوت گرفته و روش‌ها و تکنیک‌های مختلفی برای نیل به این هدف ابداع و معرفی شده است. روش UP-PCR در سال ۱۹۹۰ توسط بولات و میرونکو توسعه داده شد. روش UP-PCR، مبتنی بر تکثیر DNA یک موجود با استفاده از یک آغازگر عمومی^۱ بوده که این آغازگر دارای توالی نوکلئوتیدی اختیاری^۲ است و یک الگوی باندی متفاوت از نظر اندازه برای DNA تکثیر شده حاصل خواهد شد که نه تنها برای یک ژنوم خاص منحصر به فرد است بلکه برای سطوح پایین‌تر از گونه (جدایه‌ها) نیز تکرارپذیر است. بنابراین بررسی شباهت الگوی DNA تکثیر شده به ما اطلاعاتی راجع به ارتباطات ژنومی موجودات خواهد داد. این روش که یکی از روش‌های انگشتنگاری DNA است بدون اطلاع قبلی از ترادف بازی‌ها امکان تکثیر DNA را فراهم می‌کند و شبیه روش راپید^۳ و در حقیقت ارتقا یافته‌ی این روش است ولی نسبت به روش رپید دارای مزایایی از قبیل طول آغازگرهای بلندتر (۱۵ تا ۲۲ بازی) و دمای نسبتاً بالای واکنش است. به همین دلیل تکرارپذیری این روش بالاست (Bulat et al. 1998, Demissie et al. 2019). پرایمرهای یونیورسال با اختصاصیت بالا به مکان‌های مشخصی در ژنوم متصل می‌شوند و چنانچه در آن مکان‌ها جایگزینی نوکلئوتیدی رخ داده باشد الگو و شباهت DNA تکثیر شده نیز تغییر خواهد کرد در نتیجه چنین ژنومی با ژنوم اولیه متفاوت خواهد بود

1. Universal
2. Arbitrarily
3. RAPD

(Bulat et al. 1994). یکی دیگر از مزایای این روش اینست که این روش در مقایسه با راپید از تعداد باند بیشتری برخوردار است که این امر باعث تسهیل در شناسایی نشانگرهای خاص شده و در عین حال باندهای حفاظت‌شده‌ی گونه‌ها را نیز نشان می‌دهد (Bulat et al. 1998). عموماً آغازگرهای یونیورسال به دو گروه تقسیم می‌شوند: یک گروه آغازگرهای حفاظت‌شده که الگوی یکسان یا خیلی شبیه به هم در جدایه‌های یک گونه ایجاد می‌کنند؛ در موجودات عالی که نرخ جایگزینی کمتر است شباهت DNA تکثیر شده در سطوح طبقه‌بندی‌های بالا ایجاد می‌شود و گروه دیگر آغازگرهای متغیر که تنوع درون گونه‌ای را در ساختار ژنوم حفاظت‌شده‌ی گونه نشان می‌دهند. بنابراین این روش برای بررسی تنوع و تشخیص سریع گونه‌ها و ارزیابی روابط ژنتیکی واریته‌ها قابل استفاده بوده و طیف الکتروفورزی DNA تکثیر شده دارای اختصاصیت گونه‌ای خواهد بود و حتی تنوع درون گونه‌ای نیز براساس تنوع چندشکلی UP-PCR قابل استنباط است (Bulat et al. 1994, Bulat et al. 1995).

استفاده از نشانگر UP-PCR برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *M. scaetiae*، فارغ از ایجاد یا عدم ایجاد پلی‌مرفیسم، می‌تواند شاخصی برای میزان وابستگی ژنتیکی جدایه‌های جغرافیایی این قارچ باشد. لذا این پژوهش با هدف مطالعه‌ی امکان تکثیر DNA با آغازگرهای UP-PCR و بررسی امکان‌سنجی تعیین تنوع ژنتیکی قارچ *M. scaetiae* با استفاده از این نشانگر انجام شد.

Materials and Methods

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی قارچ *M. scaetiae*

تعدادی نمونه‌ی گل‌آذین خرما‌ی دارای علائم بیماری خامچ از شهرستان‌های آبادان، کارون و بهبهان استان خوزستان و شهرستان کازرون استان فارس جمع‌آوری شد. برای جداسازی قارچ *M. scaetiae*، مقداری از آثار اسپورهای سفیدرنگ قارچ موجود در محل آلودگی برداشته و در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب-زمینی/دکستروز/آگار PDA (مرک، المان) حاوی سولفات استرپتومایسین (۴۰۰ ppm) قرار داده شد. پس از ۷-۵ روز، میسلیوم و آرتروسپورهای تازه رشد یافته، روی محیط کشت جدید PDA قرار داده شدند. ظروف کشت قارچ در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. خالص‌سازی قارچ به روش تک‌اسپور انجام شد (Alvanipour et al. 2022).

شناسایی ریختی و مولکولی *M. scaetiae*

جدایه‌ها براساس مطالعه خصوصیات ریختی و ناحیه‌ی ژنومی ITS-nrDNA با استفاده از ترکیب آغازگرهای ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) و ITS1 (5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA) به عنوان آغازگرهای مستقیم و معکوس استفاده شد. برنامه‌ی زمانی و دمایی به شرح ذیل تنظیم شد. ۹۵ درجه‌ی سلسیوس و اسرشتی اولیه به مدت ۸ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل: ۹۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸

جدول ۱- جدایه‌های قارچی مورد استفاده برای مطالعه‌ی تبارشناسی

Table 1. Fungal isolates used in phylogenetic study

Species	Isolate	Accession number	Reference
<i>Mauginiella scaettae</i> *	Abad-sa1		This study
<i>Mauginiella scaettae</i>	CBS 158.26	MH854874	Vu et al. (2019)
<i>Populocrescentia forlicesenensis</i>	MFLUCC 14-0651	NR_154326	Ariyawansa et al. (2015)
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	STAN11	AY817682	Cowger and Silva-Rojas (2006)
<i>Parastagonospora nodorum</i>	DT1893-A	OP748745	Qi (2022) Unpublished data
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	STAN24	AY817686	Cowger and Silva-Rojas (2004) Unpublished data
<i>Leptosphaeria doliolum</i>	CBS 505.75	NR_155309	de Gruyter et al. (2013)
<i>Parastagonospora avenae</i>	CBS:289.52	MH857041	Vu et al. (2019)
<i>Parastagonospora avenae</i>	CBS 384.86	KY090642	Ahmed et al. (2016)
<i>Septoriella poae</i>	CBS 136766	NR_155793	Crous et al. (2014)
<i>Neostagonospora sorghi</i>	CBS 145366	NR_164452	Marin-Felix, and Crous (2019) Unpublished data

*جدایه‌ی بررسی شده در مطالعه‌ی حاضر

درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سلسیوس گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه شناسایی شدند (Abdullah et al. 2005). توالی‌یابی توسط آزمایشگاه ژنتیک پاتوبیولوژی و ژنتیک نرگس اهواز انجام گرفت. توالی حاصل با استفاده از نرم افزار BioEdit ver. 4.0.6.2 ویراستاری و با استفاده از نرم‌افزار BLAST با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های بانک ژن NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) مقایسه شد. جهت واکاوی‌های فیلوژنتیکی عمل ویرایش و هم‌ترازسازی توالی‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزار BioEdit صورت گرفت. درخت تبارزایشی با الگوریتم Maximum likelihood براساس مدل Tamura 3-parameter و با استفاده از نرم افزار 7.0MEGA ترسیم شد. برای ریشه دار کردن درخت تبارزایشی، قارچ *Leptosphaeria doliolum* Ces. & De Not به عنوان آرایه‌ی خارجی استفاده شد. برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در شجره، از تجزیه و تحلیل اعتبارسنجی (بوت استراپ) با انجام ۱۰۰۰ تکرار استفاده و ارزش اعتبار مساوی یا بیشتر از ۵۰ درصد روی درخت فیلوژنی نشان داده شد. فهرست قارچ‌های به کار رفته در رسم درخت فیلوژنی در جدول ۱ آورده شده است.

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ با نشانگرهای UP-PCR

برای بررسی امکان‌سنجی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *M. scaettae*، از سه آغازگر UP-PCR (Bulat et al. 1995) استفاده شد (جدول ۲). مخلوط واکنش PCR روی یخ تهیه شد. بدین صورت که در ابتدا برای هر نشانگر حجم مورد نیاز از مخلوط واکنش PCR حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۲ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای UP-PCR (۱۰ پیکومولار از هر آغازگر)، ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر (به غیر از میزان DNA) برای کل نمونه‌ها محاسبه گردید و مخلوط پایه به دست آمده به مدت چند ثانیه با استفاده از دستگاه ورتکس هم زده

جدول ۲. توالی آغازگرهای UP-PCR استفاده شده برای بررسی تنوع ژنتیکی *Mauginiella scaettae*
Table 2. Sequences of UP-PCR primers used for analysis of genetic diversity of *Mauginiella scaettae*.

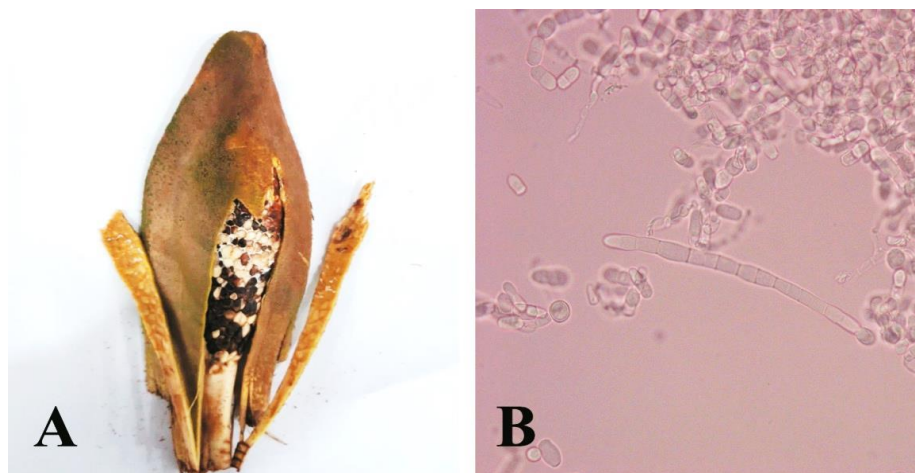
UP-PCR primer	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
UP-15/19	GAGGGTGGCGGCTAG	15
UP-21	GGATCCGAGGGTGGGGTTCT	21
UP-45	GTAAAACGACGGCCAGT	18

شد. سپس حجمی معادل ۲۲ میکرولیتر از این مخلوط به درون لوله‌های میکروتیوب ۲۰۰ میکرولیتری سترون، محتوی سه میکرولیتر DNA الگو (۵۰ نانوگرم) از هر جدایه، اضافه شد تا حجم نهایی مخلوط واکنش در هر لوله ۲۵ میکرولیتر گردید. پس از سانتریفیوژ کوتاه چند ثانیه‌ای، لوله‌ها درون دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تحت برنامه دمایی و زمانی مناسب اجرا شد. پس از تکثیر نشانگر مورد نظر، محصولات واکنش PCR در ژل آگارز یک درصد دارای رنگ محلول اتیدیوم بروماید تفکیک شدند. محصولات واکنش PCR در دستگاه Gel Documentation کمپانی IMAGO مشاهده و عکسبرداری شدند.

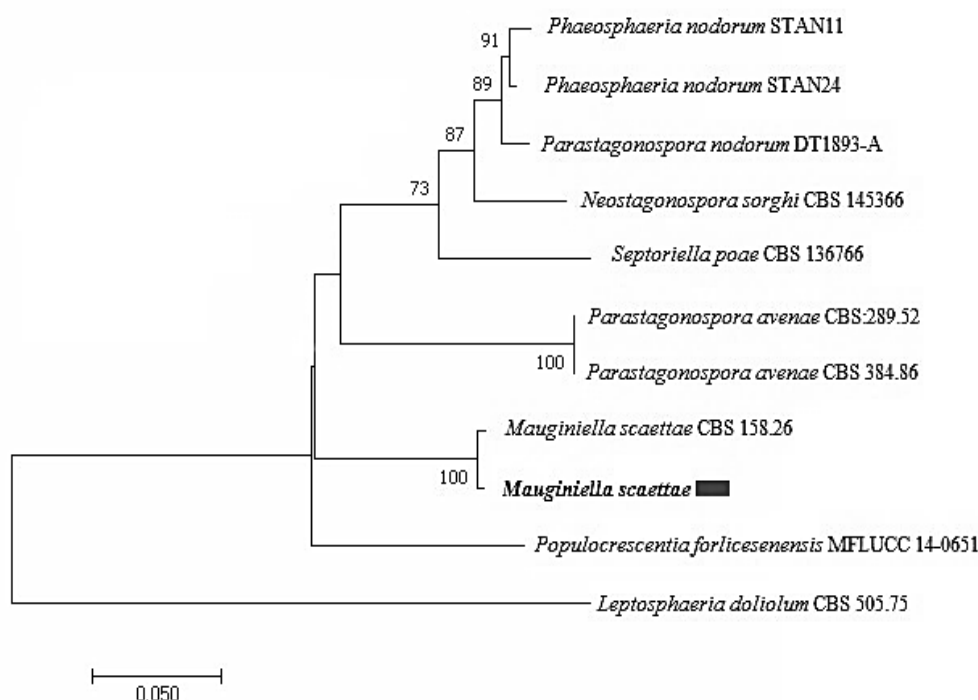
Results

یافته‌ها

خصوصیات ریختی و مولکولی بیمارگر
رنگ پرگنه‌ی قارچ روی محیط PDA از نمای بالای تشک پتری سفید مایل به کرم و از نمای زیرین تشک، کرم مایل به زرد و یا سیاه است. هیف‌ها بی‌رنگ، شفاف و در اثر بند بند شدن به آرتروسپورهای فراوان تک‌سلولی یا چندسلولی تبدیل می‌شوند (شکل ۱).



شکل ۱. علائم و آثار *Mauginiella scaettae* روی گل‌آذین خرماي آلوده.
Figure 1. Symptoms and signs of the *Mauginiella scaettae* on infected date palm inflorescence.



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش Maximum likelihood براساس ناحیه ژنومی ITS-nrDNA. اعداد محل انشعاب شاخه‌ها درصد اعتبارسنجی بزرگتر یا مساوی ۵۰ درصد را نشان می‌دهد. از قارچ *Leptosphaeria doliolum* به عنوان آرایه‌ی خارجی برای ریشه دار کردن درخت استفاده شد. مستطیل تیره جدایه‌ی *Mauginiella scaettae* جداسازی شده در این پژوهش را نشان می‌دهد.

Figure 2. Phylogenetic tree constructed from a maximum likelihood based on the ITS-nrDNA sequence data. Bootstrap values $\geq 50\%$ are exhibited at the node. The tree was rooted using *Leptosphaeria doliolum* as an out-group taxon. The black oblong indicates *Mauginiella scaettae* isolated in this study.

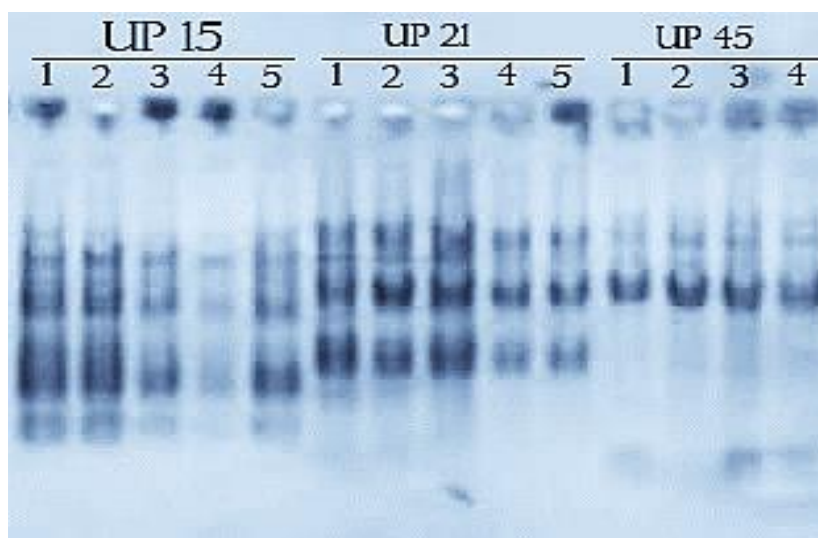
نتایج جستجوی ابزار BLAST نشان داد توالی مربوط به جدایه‌ی مورد مطالعه بیش از ۹۹/۵ درصد با جدایه‌های *M. scaettae* موجود در بانک ژن NCBI همولوژی دارد. از طرف دیگر داده‌های حاصل از واکاوی تبارنمایی نشان داد که این جدایه با مقدار اعتبار سنجی ۱۰۰ درصد با جدایه‌ی *M. scaettae*, CBS 158.26 در یک گروه قرار می‌گیرد و تعلق آن به این جنس و گونه اثبات شد (شکل ۲).

تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ با نشانگرهای UP-PCR نمونه‌های بیماری خامج از روی چهار رقم استعمران (سایر)، خضراوی، خاصی و زاهدی و از پنج شهرستان در دو استان خوزستان و فارس جمع‌آوری شدند و تعداد پنج جدایه *M. scaettae* برای این آزمایش انتخاب شدند (جدول ۳). نتایج تکثیر نشانگر UP-PCR نشان داد؛ بین آغازگرهای به کار رفته تنوع باندی وجود دارد. بیش‌ترین تعداد باند DNA با آغازگر UP15 و کمترین تعداد باند با آغازگر UP45 تکثیر گردید (شکل ۳). بین

جدول ۳. مشخصات پنج جدایه *Mauginiella scaettae* به کار رفته برای ارزیابی نشانگر UP-PCR

Table 3. Five isolates of *Mauginiella scaettae* used for UP-PCR markers evaluation

Sampling area	Variety	Sampling date	Isolates
Khuzestan-Abadan (Abobarim)	Sayer	2019/3/16	Abad-sa1
Khuzestan-Behbahan (Shahrui)	Khasi	2018/3/27	Behb-Kh-2
Khuzestan-Behbahan (Shahrui)	Khasi	2018/3/27	Behb-Kh-1
Khuzestan-Karun County	Khadrawy	2019/3/20	Karo-khad1
Fars-Kazerun	Zahedi	2018/4/21	Fa-za



شکل ۳. الگوی بانندی نشانگر UP-PCR ایجاد شده برای جدایه‌های *Mauginiella scaettae*. جدایه‌ها به ترتیب شامل: 1) F، 2) Abad-sa1، 3) Behb-kh-2، 4) Karo-khad1 و 5) Behb-Kh-1

Figure 3. Banding pattern produced by UP-PCR marker in *Mauginiella scaettae* Isolates. Isolates respectively: 1) F, 2) Abad-sa1, 3) Behb-kh-2, 4) Karo-khad1 and 5) Behb-Kh-1

پنج جدایه برای هیچ یک از سه آغازگر UP-PCR تنوع بانندی، مشاهده نشد و الگوی بانندی جدایه‌ها برای هر کدام از آغازگرها شبیه هم بود.

Discussion

بحث

فراوانی و پراکنش ارقام نخل خرما در مناطق مختلف کشور متفاوت می‌باشد. در شهرستان‌های جنوبی و مرکزی استان خوزستان نظیر آبادان و شهرستان کارون رقم اصلی کاشته شده استعمران است در حالیکه رقم عمده کاشته شده در شهرستانی نظیر بهبهان رقم خاصی (خاصویی) می‌باشد. در استان فارس نیز ارقامی نظیر مضافتی و زاهدی ارقام مهمی به شمار می‌آیند. بنابراین بالطبع درصد ابتلا ارقام به بیماری خامج در شهرستان‌های

مختلف بی‌ارتباط به فراوانی و پراکنش ارقام کاشته شده نیست. ظهور بیماری در هر منطقه منطبق با شرایط اقلیمی از یک سو و فنولوژی درخت و زمان ظهور گل‌آذین (که آن هم متأثر از شرایط آب و هوایی و نوع رقم است) از سوی دیگر است. لذا در شهرستان‌های گرم‌تر مثل آبادان و در ارقام زودرسی مثل استعمران این بیماری زودتر ظهور پیدا می‌کند. بیماری در سال‌های که بارندگی و رطوبت بالا همزمان با ظهور اسپات‌ها باشد از شدت بیشتری برخوردار است. تمام ارقام نخل خرما در ایران به بیماری خامج حساس بوده و رقم مصنوعی برای این بیماری وجود ندارد. جدایه‌های قارچ *M. scaetiae* که از ارقام مختلف نخل در ایران به دست می‌آمد با استفاده از معیارهای ریخت‌شناسی شناسایی می‌شد. جدایه‌های قارچ *M. scaetiae* به کار رفته در این پژوهش براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ترسیم درخت تبارزایشی شناسایی دقیق شدند. اگر چه جدایه‌های به کار رفته از نظر جغرافیایی (شهرستان‌های مختلف استان خوزستان و استان فارس) و رقم میزبان از هم متفاوت هستند لکن همانگونه که ذکر شد هیچ‌گونه تفاوت ژنتیکی مشاهده نگردید. یکی از دلایل عدم تشخیص تنوع ژنتیکی و عدم مشاهده‌ی چندشکلی برای این نشانگر، می‌تواند ناشی از شباهت ژنتیکی زیاد جدایه‌های این قارچ باشد. این تنوع کم گویای رابطه‌ی ژنتیکی بسیار نزدیک جدایه‌های قارچی باشد (Sheikholeslami et al. 2005). به طور کلی میزان همولوژی قطعات DNA تکثیر شده بیانگر میزان خویشاوندی ژنتیکی ارگانیس‌هاست (Bulat et al. 1994). وجود جریان ژنی اصلی‌ترین عامل عدم تمایز و تنوع بین جمعیت‌های این قارچ است. در حقیقت این جریان، نیرویی در جهت کاهش تمایز و اختلاط گروه‌ها و اشتراک ال‌ها بین جمعیت‌هاست (Alvanipour et al. 2022). بنابراین، و به طور کلی نتایج این پژوهش می‌تواند درک بهتری از اکولوژی، ژنتیک و چرخه زیستی قارچ هم ارائه دهد چرا که با وجود عدم تشکیل یا عدم شناسایی فرم جنسی (Alvanipour et al. 2022) در این قارچ امکان تغییرپذیری ژنتیکی قارچ از طریق مرحله‌ی تلئومرف از بین خواهد رفت (Sheikholeslami et al., 2005). از طرف دیگر، کنیدیوم‌های قارچ دیواره‌ی نازک و طول عمر کوتاهی دارند و در گرمای بالای تابستان و در طول زمستان نمی‌توانند بقا پیدا کنند (Abdullah et al. 2010, Al Hassan & Waleed 1977) و این اسپورها در فاصله‌ی زمانی طولانی از برداشت محصول تا شروع بیماری در سال آینده نمی‌توانند بقای قارچ را تامین کنند. تصور می‌شود که منبع اینوکولوم اولیه میسلیم نهفته در اندام‌های چوبی پوسیده نظیر اسپات‌ها، محور گل‌آذین یا قانده برگ‌ها و الیاف در اواخر زمستان و یا اوایل بهار باشد (Rattan & Aldboon 1980). اضافه بر این، بیماری خامج منحصر نخل خرما را آلوده می‌کند و میزبان دیگری برای بقاء قارچ در شرایط زمستان یا تابستان، که شاید به تنوع کمک کند، وجود ندارد. بنابراین جمع موارد یاد شده احتمال پیدایش جدایه‌های جغرافیایی با تنوعی که توسط این نشانگر شناسایی شود را کاهش می‌دهد. پژوهش‌های Alvanipour و همکاران (2022) نیز نشان داد فاصله یا شباهت ژنتیکی جدایه‌ها ارتباط چندانی به رقم، منطقه جغرافیایی و یا سال زراعی ندارد و جدایه‌هایی با منشاء و رقم و سال جمع‌آوری متفاوت با هم در یک گروه ژنوتیپی قرار گرفتند. این محققین اعلام کردند به طور کلی ارتباط چندانی بین منشاء و گروه‌های ژنوتیپی وجود ندارد و گروه‌ها دارای جدایه‌هایی با منشا متفاوت بودند. Sheikholeslami و همکاران (2005) نیز در بررسی جدایه‌های جغرافیایی مختلف *Erysiphe betae* با استفاده از نشانگر rDNA-RFLP بین نقوش باندهای تمام جدایه‌ها تفاوتی

مشاهده نکردند و اعلام کردند جمعیت‌های ایرانی قارچ عامل سفیدک پودری چغندر از یکنواختی بسیار بالایی برخوردار است. با این وجود از دلایل دیگر عدم تشخیص تنوع ژنتیکی و وجود چندشکلی در نشانگر UP-PCR می‌تواند کارایی پایین این نوع نشانگر در بررسی تنوع در این جنس قارچ باشد. مشاهده‌ی باندها در ژل آگاروز فقط اختلاف اندازه‌ی آنها را حداکثر بین ۵ تا ۱۰ جفت باز ممکن می‌کند. بنابراین، با دماهای مورد استفاده فوق باندهای بدست آمده گویای اتصال آغازگرهای مورد استفاده برای این قارچ هستند ولی قادر به تشخیص تنوع ناشی از جهش‌های نقطه‌ای در قطعات تکثیری نیستند. تکثیر DNA برای هر ارگانیسم با استفاده از پرایمرهای یونیورسال یک الگوی پیچیده‌ای از قطعات تکثیری بوجود می‌آورد که نه تنها برای ژنوم یک ارگانیسم بلکه برای گونه‌ها، استرین‌ها و سروتیپ‌های آن موجود هم خاص می‌باشد. این تفاوت‌های DNA مربوط به سطوح معین جایگزینی نوکلئوتیدها در محل‌های غیر کد کننده هستند. با این وجود در موجودات عالی که نرخ جایگزینی کم است همولوژی قطعات تکثیر شده مربوط به سطوح بالای تاکسون (در حد جنس) می‌باشد (Bulat et al. 1994). بنابراین طبق اظهارات Bulat و همکاران (۱۹۹۵) تکنیک UP-PCR علاوه بر اینکه جزئیات اساسی از ساختار ژنومی جدایه‌ها ارائه می‌دهد و برای ارزیابی روابط ژنتیکی قابل استفاده است می‌توان از آن به عنوان روش پایه‌ای برای شناسایی گونه‌های جانداران استفاده کرد. لذا شاید در مواردی بتوان استفاده از الگوی باندی قطعات تکثیر شده DNA را معیار مولکولی مناسب و مقرون به صرفه برای تایید شناسایی ریختی بیمارگرها استفاده کرد.

References

منابع

1. Abdullah, S.K., Lorca, L.V.L. & Jansson, H.B. (2010). Diseases of date palms (*Phoenix dactylifera* L.). *Basrah Journal for Date Palm Researches*, 9 (2), 1-44.
2. Abdullah, S.K., Asensio, L., Monfort, E., Gomez-Vidal, S., Palma-Guerrero, J., Salinas, J., Lopez-Llorca, L.V., Jansson, H.B. & Guarro, J. (2005). Occurrence in Elx, SE Spain of inflorescence rot disease of date palms caused by *Mauginiella scaettae*. *Journal of Phytopathology*, 153 (7-8), 417-422.
3. Ahmed, S.A., Hofmüller, W., Seibold, M., De Hoog, G.S., Harak, H., Tammer, I., Van Diepeningen, A.D. & Behrens-Baumann, W. (2017). *Tintelnotia*, a new genus in *Phaeosphaeriaceae* harbouring agents of cornea and nail infections in humans. *Mycoses*, 60 (4), 244-253.
4. Al Hassan, K.K. & Waleed, B.K. (1977) Biological study on *Mauginiella scaettae* Cav. the cause of inflorescence rot of date palm in Iraq. Yearbook of Plant Protection Research, Ministry of Agriculture. Iraq, 1,184-206.
5. Alvanipour, H., Aminian, H., Alami-Saeid, K., Sorkheh, K., Farrokhinejad, R., Ali Nejati, A. & Javan-Nikkhah, M. (2020). Cross-transferability of SSR loci of *Phaeosphaeria nodorum* to *Mauginiella scaettae*. *Mycologia Iranica*, 7(1), 135-142.
6. Alvanipour, H., Aminian, H., Alami-Saeid, K., Sorkheh, K., Farrokhinejad, R. & Javan-Nikkhah, M. (2022). Genetic diversity and pathogenicity of *Mauginiella scaettae* the causal agent of date palm. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 53 (1), 57-70. (In Persian).

7. Ariyawansa, H.A., Hyde, K.D., Jayasiri, S.C., Buyck, B., Chethana, K.T., Dai, D.Q., Dai, Y.C., Daranagama, D.A., Jayawardena, R.S., Lücking, R. & Ghobad-Nejhad, M. (2015). Fungal diversity notes 111–252—taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal Diversity*, 75, 27-274.
8. Bulat, S.A., Lübeck, M., Mironenko, N., Jensen, D.F. & Lübeck, P.S. (1998). UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of strains of *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Mycological Research*, 102 (8), 933-943.
9. Bulat, S.A., Mironenko, N.V. & Zholkevich, Y.G. (1995). Genetic structure of soil population of fungus *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr.: Molecular reidentification of the species and genetic differentiation of isolates using polymerase chain reaction. *Russian Journal of Genetics*, 31 (3), 271-278.
10. Bulat, S.A., Mironenko, N.V., Lapteva, M.N. & Strelchenko, P.P. (1994). Polymerase chain reaction with universal primers (UP-PCR) and its application to plant genome analysis. *Conservation of Plant Genes II: Utilization of ancient and modern DNA*, 48, 113-129.
11. Cowger, C., & Silva-Rojas, H. V. (2006). Frequency of *Phaeosphaeria nodorum*, the sexual stage of *Stagonospora nodorum*, on winter wheat in North Carolina. *Phytopathology*, 96 (8), 860-866.
12. Crous, P.W., Shivas, R.G., Quaedvlieg, W.V., Van der Bank, M., Zhang, Y., Summerell, B.A., Guarro, J., Wingfield, M.J., Wood, A.R., Alfenas, A.C. & Braun, U. (2014). Fungal Planet description sheets: 214–280. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 32(1), 184-306.
13. De Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Aveskamp, M. M., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). Redisposition of Phoma-like anamorphs in *Pleosporales*. *Studies in Mycology*, 75(1), 1-36.
14. Demissie, Z.A., Brown, W.G. & Loewen, M.C. (2019). A universally primed-polymerase chain reaction (UP-PCR) marker to discriminate *Clonostachys rosea* ACM941 from Related Strains. *Journal of Fungi*, 5 (2), 1-11.
15. Galehdari, H., Foroughmand, A.M., Roshanfekar, H. & Nzari, M. (2006). Exhaustive Genetic Engineering. Golhai Behesht Publications. 419 pp. (in Persian).
16. Rattan, S.S. & Aldboon, A.H. (1980). Notes on fungi associated with date-palm I. *Sydowia*, 32, 246-273.
17. Sheikholeslami, M., Okhovat, S.M., Hejaroude, G.h., Sharifi Tehrani, A., Javan Nikkhah, M. & Najafi Mirak, T. (2006). Investigation on interaction of isolate-genotype between *Erysiphe betae* and *Beta vulgaris* under greenhouse condition, *Journal of Sugar Beet*, 21 (2), 123-135. (in Persian).
18. Vu, D., Groenewald, M., De Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Al-Hatmi, A., Groenewald, J.Z., Cardinali, G., Houbraken, J., Boekhout, T., Crous, P.W., Robert, W. & Verkley, G.J.M. (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology*, 92 (1), 135-154.