

نقش سوسک شاخ‌دار خرما (*Oryctes elegans* (Coleoptera: Scarabaeidae) در انتقال قارچ *Fusarium proliferatum* عامل بیماری خشکیدگی فوزاریومی برگ خرما در استان خوزستان

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

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران ۲- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، کرج، ایران.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: kocheilif@gmail.com

چکیده

سوسک شاخ‌دار خرما، *Oryctes elegans* Perll یکی از آفات مهم نخل خرما می‌باشد. مطالعه حاضر به بررسی نقش احتمالی این آفت در انتقال بیماری خشکیدگی فوزاریومی برگ نخل خرما در استان خوزستان می‌پردازد. خشکیدگی فوزاریومی برگ نخل از بیماری‌های مهم نخل می‌باشد که در سال‌های اخیر در مناطق وسیعی از نخلستان‌های خوزستان گسترش یافته است. نمونه‌برداری از ۲۴ نخلستان در شهرستان‌های آبادان، خرمشهر و شادگان که به طور همزمان آلودگی به سوسک شاخ‌دار و بیماری خشکیدگی برگ را نشان می‌دادند، صورت گرفت. نمونه‌ها شامل مراحل لاروی و بالغ سوسک شاخ‌دار خرما، برگ، دم‌برگ و دم خوشه‌های دارای علائم عارضه خشکیدگی برگ بودند. قارچ *Fusarium proliferatum* Matsush از نمونه‌های یاد شده با فراوانی متفاوت جداسازی و شناسایی شد. برای بررسی توانایی انتقال حشرات بالغ، آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت فاکتوریل انجام شد. چهار تراکم شامل ۳، ۵، ۷ و ۹ عدد سوسک و ۴ غلظت از سوسپانسیون قارچ شامل 5×10^2 ، 5×10^4 ، 5×10^6 و 5×10^8 اسپور در میلی‌لیتر استفاده شد. فراوانی قارچ‌های جداسازی شده از حشرات بالغ و مواد گیاهی بررسی شده، انتقال قارچ یاد شده به وسیله سوسک شاخ‌دار خرما را تأیید می‌کند. نتایج به دست آمده همبستگی مثبت و معنی‌دار بین درختان آلوده به بیماری خشکیدگی فوزاریومی برگ و سوسک‌های شاخ‌دار خرما را نشان داد. نتایج آزمون بیماری‌زایی نشان داد که حشرات در هر ۴ تراکم و هر ۴ غلظت قادر به انتقال قارچ و بروز بیماری هستند و در تراکم ۷ عدد سوسک، با غلظت 5×10^6 و در تراکم ۹ عدد سوسک با غلظت‌های 5×10^6 و 5×10^8 اسپور در میلی‌لیتر سبب خشکیدگی پاجوش‌ها شدند.

واژه‌های کلیدی: سوسک شاخ‌دار خرما، ناقل، بیماری خشکیدگی فوزاریومی برگ نخل

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

Hoorizad Ghaedi¹, Farhan Kocheili^{1&*}, Masoud Latifian² & Reza Farrokhi Nejad¹

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran &

2. Education and Extension organization, Horticulture science research institute. Karaj, Iran.

*Corresponding author, E-mail: kocheilif@gmail.com

Abstract

Oryctes elegans Perll is one of the most important pests of date palm trees. The present study was done to determine the probable role of this pest as a vector of Fusarium wilt disease in date orchards of Khuzestan province. Leaf wilt disease is one of the important diseases observed in date orchards of Khuzestan. Sampling was carried out from 24 date orchards in Abadan, Khorramshahr and Shadegan, which showed simultaneous infestation by *O. elegans* and fungal leaf wilt diseases. The collected samples included larvae and beetles of the date palm borer, leaves, petioles and fruit bunches of the tress. *Fusarium proliferatum* Matsush was isolated from collected samples with different percentages. To determine the disease transferring ability of the beetles, the experiments were carried out based on randomized complete design experiment with factorial test. Four densities; 3, 5, 7 and 9 of the beetles and four concentrations of the fungal suspensions 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 and 5×10^6 spores per ml were used. The frequency of isolated fungi from the insect specimens and plant materials confirmed transmission of fungus by the date palm borer. The results showed a positive and significant correlation between infested trees with Fusarium wilt disease and date palm borer. The pathogenicity test showed that insects in all four densities and all four concentrations were able to transfer the fungus and disease and in the densities of 7 beetles with 5×10^6 spores per ml and 9 beetles with 5×10^5 and 5×10^6 spores per ml caused drying of offshoots.

Key words: *Oryctes elegans*, vector, Fusarium leaf wilt disease

Received: 27 July 2019, Accepted: 14 March 2020.

مقدمه

در میان سوسک‌های کرگدنی، جنس *Oryctes* از قدیمی‌ترین جنس‌های آن می‌باشد که شامل حدود ۴۰ گونه می‌باشد (Rochat *et al.*, 2004). سوسک شاخ‌دار خرما، *Oryctes elegans* Perll (Coleoptera: Scarabaeidae) به عنوان آفت مهم درختان خرما گزارش شده است (Al Aydeh & Al Khudhair *et al.*, 2014; Dhafer., 2015). حشرات کامل *O. elegans* دالان‌هایی در تنه درختان یا ساقه‌های میوه دهنده ایجاد کرده و از بافت‌های زنده تغذیه می‌کنند (Al Aydeh & Al Dhafer., 2015)، لاروها متناسب با شدت حمله، سوراخ‌ها یا حفراتی در تنه درخت ایجاد می‌کنند و در نهایت می‌توانند باعث شکستن تنه نخل شوند (Khalaf, 2016). درختان خرما علاوه بر خسارت جدی حشرات و کنه‌های گیاه‌خوار توسط چندین بیمارگر نیز آلوده می‌شوند (Gurr *et al.*, 2009). انتقال بیشتر بیمارگرهای نخل بستگی به رفتار تغذیه‌ای حشرات دارد (Mitchel, 2004; Kaloshian & Walling, 2005). حشرات ناقل بیمارگرهای گیاهی در بوم سامانه‌های مصنوعی و طبیعی فراوان هستند و بسیاری از آنها باعث ایجاد بیماری‌های مخرب در کشاورزی و جنگل‌داری می‌شوند (Eigenbrode *et al.*, 2017). شرایط زیست محیطی و اقلیمی که نخل‌ها، بیمارگرها و حشرات ناقل در آن قرار دارند نیز بر روی چگونگی بیماری تأثیر می‌گذارند (Abdullah *et al.*, 2010). برگ‌خوارهای نخل از نظر انتقال بیمارگرها مهم نیستند، اما با کاهش فتوسنتز منجر به کاهش تولید میوه و کاهش قدرت گیاه می‌شوند. حشرات مکنده شیره گیاهی و سوسک‌های چوب‌خوار و حشرات از راسته جوربالان از انواع مختلفی هستند که بیمارگرها را در درختان نخل منتقل می‌کنند (Howard, 2001; Kaloshian & Walling, 2005). این حشرات می‌توانند با ایجاد زخم در محل تغذیه، بیمارگرها را به گیاهان سالم انتقال دهند (Purcell & Almeida, 2005). قارچ *Fusarium proliferatum* Matsush بیمارگر مهمی در سراسر جهان است و باعث بیماری‌های مخرب در بسیاری از گیاهان مانند خرما، موز، انبه، ذرت، برنج، مارچوبه، پیاز و سیر می‌شود (Khudhair *et al.*, 2014). سوسک *Euwallacea* sp. از خانواده Curculionidae و زیرخانواده Scolytinae، در کالیفرنیا گونه‌ای از قارچ فوزاریوم را به آوکادو و چند گونه‌ی گیاهی دیگر منتقل کرده و باعث بروز علائم خشکیدگی فوزاریومی روی آن‌ها شده بود (Eskalen *et al.*, 2013). انتقال *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell توسط سوسک‌های Scolytidae به درختان کاج موثرتری و دیگر گیاهان جنس *Pinus* در شمال اسپانیا، فرانسه و ایتالیا به تازگی گزارش شده است و خسارت اقتصادی زیادی به جنگل‌ها و نیز نهالستان‌ها وارد کرده است (Bezoz *et al.*, 2015; Blank *et al.*, 2019). سوسک بالغ

Tomicus piniperda L. (Coleoptera: Scolytidae) اسپورهای قارچ *F. circinatum* را طی ایجاد گالری‌های زادآوری یا تغذیه‌ای خود به درختان سالم کاج منتقل می‌کند. سوسک (Coleoptera: Scolytidae) *Pityophthorus carmeli* Swaine نیز به عنوان ناقل این بیماری در کالیفرنیا گزارش شده است (Bezou et al., 2015). مگس‌های بالغ خانواده Ephydriidae و Sciariidae می‌توانند قارچ *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* را در گلخانه‌ها به گیاهان گلخانه‌ای انتقال دهند (Scarlett et al., 2013). بین انتشار عوامل قارچی به گیاهان و نقش حشرات به عنوان ناقل مهم بیمارگرها ارتباطی وجود دارد (Feldman et al., 2008). حشره بالغ سوسک شاخ‌دار خرما به عنوان ناقل *F. proliferatum* به درختان نخل ذکر شده است. این بیمارگر می‌تواند سموم مختلفی در نخل خرما تولید کند (Khudhair et al., 2014). گونه‌های مختلف *Fusarium* در محصولات اقتصادی و راهبردی کشور مانند گندم، برنج، ذرت (Saremi, 2005) و خرما (Saremi et al., 2007) آلودگی و خسارت زیادی را ایجاد می‌کنند. علائم ایجاد شده شامل رنگ پریدگی، خشکیدگی و پژمردگی می‌باشد (Saleh et al., 2016). خشکیدگی برگ نخل از سال ۱۳۹۲ در استان خوزستان مشاهده شد و تا اردیبهشت ۱۳۹۳ در مناطق وسیعی از نخلستان‌های خوزستان گسترش یافت. در حالت طبیعی از برگ‌های پایینی نخل به‌طور معمول یک یا دو ردیف خشک می‌شوند، اما علائم این بیماری به صورت خشک شدن سریع سه تا چهار ردیف برگ‌های پایینی می‌باشد که در حالات شدید در مدت زمان سه هفته برگ‌ها خشک می‌شوند. بررسی منابع علمی در مورد این بیماری نشان می‌دهد که بیشتر گزارش‌ها مربوط به عوامل زنده قارچی و فیتوپلاسمایی است (Shetab boushehri, 2017). حضور همزمان سوسک شاخ‌دار خرما در مناطق مختلف استان خوزستان همراه با افزایش یافتن علائم خشکیدگی برگ نخل خرما احتمال ایفای نقش این حشره را به عنوان ناقل عامل این بیماری مطرح کرد. *F. proliferatum* از پنج منطقه در جنوب کشور عراق از حشرات بالغ سوسک شاخ‌دار خرما جداسازی و شناسایی شده است (Khudhair et al., 2014). از نظر اقتصادی شناسایی ناقلین عوامل بیماری‌زا در نخلستان‌ها حائز اهمیت فراوان است. در ایران تاکنون مطالعه‌ای در مورد ناقل بودن سوسک شاخ‌دار خرما صورت نگرفته است. بر این اساس مطالعه بیشتر در مورد این بیماری، گسترش آن و نقش احتمالی سوسک شاخ‌دار در انتقال عوامل بیمارگر آن ضروری به نظر می‌رسید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها از روستاهای ثامر (N ۳۰° ۱۶' ۲۱/۷۶"، E ۴۸° ۲۵' ۱۲/۲۸")، امام حسن (N ۳۰° ۱۴' ۲۶"، E ۴۸° ۲۴' ۳۹"، منبوحی (N ۳۰° ۳' ۴۱/۲۷"، E ۴۸° ۲۴' ۴۸")، نقشه حیر (N ۳۰° ۱۳' ۲/۵"، E ۴۸° ۲۲' ۹۶/۱"، بهم‌نشیر (N ۳۰° ۱۶' ۱۱/۱۲"، E ۴۸° ۲۵' ۵۶/۷۶")، واقع در شهرستان آبادان، روستاهای گیدرای (N ۳۰° ۳۹' ۷"، E ۴۸° ۳۶' ۱۸" و خنافره (N ۳۰° ۳۸' ۴۵"، E ۴۸° ۳۶' ۲۷") واقع در شهرستان شادگان و روستای حفار (N ۳۰° ۳۹' ۷"، E ۴۸° ۳۰' ۱۲' ۱۶/۵۸") از شهرستان خرمشهر انجام شد. در هر روستا از ۳ نخلستان و در مجموع از ۲۴ نخلستان و در هر نخلستان که علائم آلودگی با سوسک شاخ‌دار خرما و بیماری خشکیدگی برگ نخل را به‌طور همزمان نشان می‌دادند، نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌های گیاهی شامل برگ، دم‌برگ و نیز دم‌خوشه‌های دارای علائم بیماری خشکیدگی برگ بود. حشرات بالغ با استفاده از تله‌های نوری و روش مستقیم از نیمه‌ی اسفند ماه ۱۳۹۶ تا پایان شهریور ماه ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند. لاروها از کنار پاچوش‌ها و نیز تاج درختان نخل جمع‌آوری شدند، نمونه‌های گیاهی درون پاکت‌های کاغذی قرار داده شدند و سپس به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام

آزمایش‌ها درون یخچال نگهداری شدند. حشرات درون ظروف پلاستیکی یا شیشه‌ای به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 5 ± 60 درصد درون ظرف‌های محتوی خاک اره غیرصنعتی و تکه‌های سیب درختی نگهداری شدند و برای انجام آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

جداسازی قارچ عامل بیماری از گیاه

به منظور جداسازی عوامل بیماری‌زا از بافت‌های گیاهی، بافت آلوده به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در زیر جریان ملایم آب شسته و سپس قطعات کوچکی از حد فاصل بافت آلوده و سالم به کمک اسکالپل بریده شد. پس از ضدعفونی سطحی نمونه‌ها به مدت ۲-۳ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد و شستشو با آب مقطر سترون و خشک کردن بر روی کاغذ صافی سترون، روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) و نش و اسنایدن (NS) قرار گرفتند (Azimi et al., 2005). تشتک‌ها در اتاقک رشد در دمای 2 ± 25 درجه سلسیوس نگهداری شدند. خالص سازی به روش تک اسپور کردن روی محیط کشت آب آگار (WA) و سپس انتقال به محیط کشت PDA انجام شد.

جداسازی قارچ *F. proliferatum* از حشره

به منظور مشخص کردن اینکه حشرات بالغ حامل قارچ *F. proliferatum* هستند؛ قطعات دهانی، بالپوش‌ها و پاها مورد استفاده قرار گرفتند. قطعات با محلول هیپوکلریت سدیم (۱ درصد) به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی سطحی، و سپس در آب مقطر سترون به مدت ۳ دقیقه شسته شدند. سپس، با قرار گرفتن در حوله کاغذی سترون خشک شدند. پس از آن، قطعات روی محیط کشت PDA حاوی سولفات استرپتومایسین ($100 \mu\text{g/ml}$) و تتراسیکلین هیدروکلراید ($10 \mu\text{g/ml}$) منتقل شدند (شکل ۱).



شکل ۱- قرار دادن قطعات بدن سوسک شاخدار خرما *Oryctes elegans* روی محیط کشت

Fig 1. Insertion body parts of *Oryctes elegans* on the medium

تشتک‌های حاوی قارچ‌ها درون اتاقک رشد، در دمای ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷-۵ روز قرار گرفتند. بعد از تک اسپور کردن، برای تهیه ماده تلقیح، از محیط کشت NS استفاده شد. پس از آن، ظروف کشت در اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ روز نگهداری شدند. برای جداسازی قارچ‌ها از لاروها از روش رقت‌های متوالی و شمارش پرگنه استفاده شد. برای اینکار ۱۰ گرم از نمونه به ۹۰ میلی لیتر آب مقطر سترون در یک ظرف مخروطی شکل به حجم ۱۵۰ میلی لیتر منتقل و به وسیله تکان دهنده مخلوط شد سپس یک میلی لیتر از این محلول رقیق شده به ۹ میلی لیتر آب مقطر افزوده شد. در نهایت، یک میلی لیتر از این محلول به محیط کشت PDA اضافه شد و با شیشه سترون به طور مساوی پخش و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. در پایان برای شمارش تعداد پرگنه‌ها بررسی شد (Ogbalu & Williams, 2015).

خالص‌سازی با روش تک اسپور کردن

به هر شیشه مک کارتی، نه میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد تووین ۸۰ (Tween 80) اضافه و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه سترون شد. به وسیله لوپ سترون، مقدار کافی از بافت قارچ حاوی اسپور در سطح محیط کشت به لوله‌های مک کارتی اضافه و به وسیله تکان‌دهنده مخلوط شد. سپس ته لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری را با سوزن سوراخ کرده و مقداری پشم شیشه به عنوان صافی در آن قرار داده و سترون شد. سوسپانسیون به دست آمده از این صافی عبور داده شد تا عاری از قطعات ریشه شود. به این ترتیب سوسپانسیون پایه اسپور تهیه شد. برای تهیه غلظت ۰/۱ سوسپانسیون اسپور، با استفاده از سر سمپلر سترون، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون پایه اسپور به لوله آزمایش حاوی نه میلی‌لیتر آب تووین ۰/۱ درصد سترون منتقل و سپس به وسیله تکان‌دهنده مخلوط شد. برای تهیه غلظت ۰/۰۱ سوسپانسیون اسپور، به همین روش از غلظت ۰/۱ درصد تهیه شد. از رقت‌های مختلف سوسپانسیون اسپور، ۱۰۰۰ میکرولیتر به تشتک حاوی محیط کشت PDA مایه‌زنی و با استفاده از پخش‌کننده L شکل به خوبی در سطح محیط پخش شد. تشتک‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و تاریکی مطلق به مدت ۴۸-۲۴ ساعت نگهداری شدند. با مشاهده‌ی پرگنه‌های مستقل قارچ در تشتک‌ها با تعداد محدود پرگنه، نسبت به مایه‌زنی آن‌ها به محیط کشت PDA جدید به عنوان پرگنه‌های تک اسپور شده اقدام شد.

شناسایی جدایه قارچی

به منظور شناسایی جنس قارچ از کلیدهای نلسون (Nelson) و همکاران استفاده شد (Nelson *et al.*, 1983). ابتدا جدایه‌های تک اسپور روی محیط کشت‌های PDA و برگ میخک آگار (CLA) کشت داده شدند. کشت‌ها در اتاقک کشت در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی، ۲۵ درجه سلسیوس در روز و ۲۰ درجه سلسیوس در شب) نگهداری شدند. برای تعیین رنگ و نرخ رشد پرگنه از محیط کشت PDA و برای تعیین ویژگی‌های میکروسکوپی از محیط کشت CLA استفاده شد. به منظور شناسایی گونه‌ی *Fusarium* ویژگی‌های مهم ریخت‌شناسی شامل شکل ماکروکنیدیوم، وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم و شکل آن، اندازه کنیدیوم‌ها، نوع فیالیلید، وجود یا فقدان زنجیره میکروکنیدیوم و سرهای دروغین، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور، نرخ رشد پرگنه و رنگ آن به خصوص از سطح زیرین محیط کشت PDA مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۲، a و b، شکل ۶، a، b و c). به منظور شناسایی مولکولی گونه قارچ، از روش استخراج DNA به روش ریدر و برودا با اندکی تغییر استفاده شد (Raeder & Broda, 1985).



شکل ۲- a. محیط کشت PDA و رنگ پرگنه‌ی قارچ از سطح فوقانی، b. محیط کشت PDA و رنگ پرگنه‌ی قارچ از سطح زیرین پتری، c. محیط کشت CLA، d. اسپوردوخیوم‌ها

Fig 2. a. PDA media and colony color from upside, b. PDA media and colony color from under side, c. CLA culture media, d. sporodochium

الف- استخراج DNA و تکثیر قسمتی از ناحیه *tefl*

زیست توده میسیلیومی جدایه در محیط مایع سیب زمینی دکستروز بروث (PDB) تهیه و در دستگاه فریز درایر خشک انجمادی شد. استخراج DNA با روشی مبتنی بر فنل و کلروفرم (Ahmadpour *et al.*, 2017). برای

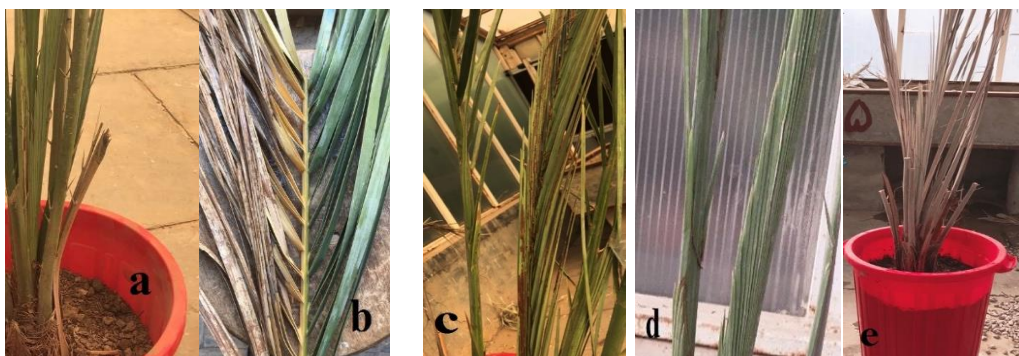
تکثیر ۱۰۰۰ جفت باز از بخشی از ژن عامل تداوم ترجمه (*tefl*) از جفت آغازگرهای اختصاصی TEF171F (CAAAATGGGTAAGGAGGASAAGAC) و TEF1997R (CAGTACCGGCRGCRATRATSAG) استفاده شد (Ozkale & Demirel, 2017). مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر با استفاده از پنج میکرولیتر 10 x PCR buffer، غلظت سه میلی‌مول از $MgCl_2$ ، دو میکرولیتر آغازگر مستقیم، دو میکرولیتر آغازگر معکوس، یک میکرولیتر dNTP، نیم میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase، دو میکرولیتر DNA الگو و آب مقطر دو بار تقطیر شده میلی‌کیو (Mili-Q) تهیه و تکثیر در دستگاه ترموسایکلر MJ Mini™ Gradient Thermal انجام شد. در مرحله واسرشت‌سازی اولیه، مولکول‌های دو رشته‌ای DNA در دمای ۹۴ درجه سلسیوس در مدت زمان ۳-۵ دقیقه و یک چرخه از هم جدا شدند. در مرحله دوم، واسرشت‌سازی (در دمای ۹۴ درجه سلسیوس در مدت زمان ۳۰ ثانیه)، اتصال (با حرارت ۶۲ درجه سلسیوس در مدت زمان ۳۰ ثانیه) و گسترش آغازگرها (با حرارت ۷۲ درجه سلسیوس در مدت زمان ۶۰ ثانیه طی ۳۵ چرخه و در مرحله سوم گسترش نهایی با حرارت ۷۲ درجه سلسیوس در مدت زمان ۳۰۰ ثانیه و یک چرخه انجام شد.

ب- توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل توالی‌ها با انجام عملیات جستجوی BLASTn و فیلوژنی مولکولی

قطعات تکثیری روی ژل آگارز جداسازی و باندهای هدف جداسازی شد و سپس با استفاده از کیت استخراج از ژل GF-1 AmbiClean Kit خالص‌سازی شد. توالی‌یابی توسط آزمایشگاه ژنتیک نرگس واقع در شهر اهواز انجام شد. 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 شد. توالی به دست آمده از تکثیر قسمتی از ناحیه *tefl* با توالی‌های مربوط به سویه‌های تیب یا معتبر با استفاده از الگوریتم جستجوی BLASTn و تجزیه و تحلیل تبارشناسی مقایسه و مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل تبارشناسی مبتنی بر ناحیه *tefl* با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه (Maximum likelihood) و با کمک نرم‌افزار MEGA ver. 6.0 (Tamura et al., 2013) انجام شد.

آزمون بیماری‌زایی

به منظور بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ی انتخابی از روش اسپری کردن و تزریق سوسپانسیون اسپور استفاده شد. ابتدا جدایه‌های قارچ روی محیط کشت CLA کشت شدند. پس از گذشت ۵ روز هر کدام از جدایه‌ها که روی محیط کشت یاد شده، رشد کرده بودند؛ به محیط کشتی که حاوی عصاره مخمر، پپتون، گلوکز، دیفکواآگار و آب مقطر بود منتقل شدند. ظروف کشت به مدت ۵ روز در دمای ۲۳-۲۲ درجه سلسیوس در شرایط نور مداوم نگهداری شدند، سپس سطح پتری‌ها با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون شسته شد و با کمک لام گلبول‌شمار (Haemocytometer)، سوسپانسیون اسپور با غلظت 1×10^6 تهیه شد (Azimi et al., 2005). تعیین بیماری‌زایی جدایه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار و ۱۱۲ تیمار انجام شد. پاجوش‌های سالم با شرایط رشدی و سنی یکسان از رقم استعمران انتخاب شدند. برگ‌های پاجوش‌های مورد تیمار توسط سوسپانسیون 10^6 اسپور با اسپری کردن و نیز تزریق کردن، تلقیح یا آغشته شد (شکل ۳، a و b). شاهد به وسیله اسپری کردن و نیز تزریق کردن آب مقطر سترون آماده شد (شکل ۳، c و d). پاجوش‌ها و گلدان آن‌ها با پوشش مناسب پوشانیده و در گلخانه با دمای 24 ± 3 درجه سلسیوس نگهداری و به مدت شش هفته بازبینی شدند. مشاهدات به صورت هفتگی ثبت و با تیمار شاهد مقایسه شد. همچنین طبق اصول کخ، جداسازی مجدد عامل بیمارگر از پاجوش‌های آلوده مورد بررسی قرار گرفت (Khudhair et al., 2014).

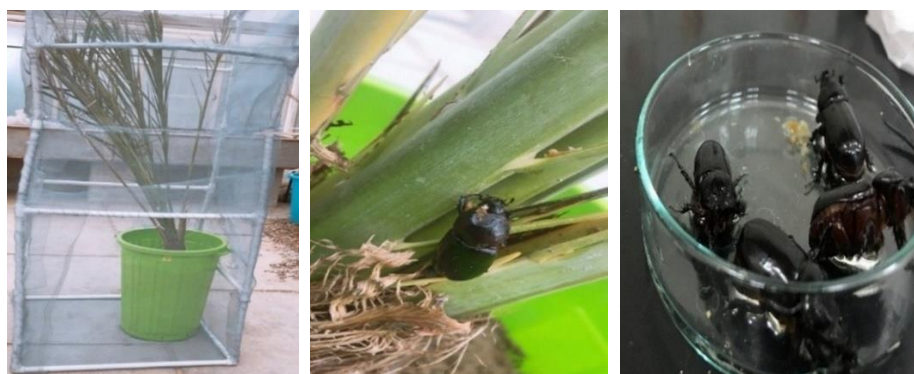


شکل ۳- a. تیمار تلقیح شده با سوسپانسیون قارچ *Fusarium proliferatum* در هفته‌ی اول، b. تیمار تلقیح شده با سوسپانسیون قارچ *F. proliferatum* در هفته‌ی ششم، c. تیمار شاهد در هفته‌ی اول، d. تیمار شاهد پس از شش هفته و e. تیمار تلقیح شده با سوسپانسیون قارچ *F. proliferatum* پس از شش هفته

Fig 3. a. Inoculated treatment with *Fusarium proliferatum* suspension in the first week, b. Inoculated treatment with *F. proliferatum* suspension in sixth week, c. Control in the first week, d. Control after six weeks and e. Inoculated treatment with *F. proliferatum* suspension after six weeks

آزمون اثبات ناقل بودن سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans*

برای این منظور ۵ عدد از سوسک‌ها با سوسپانسیون آماده شده قارچ با غلظت 1×10^6 اسپور در میلی‌لیتر، به روش غوطه‌وری تلقیح شد. سوسک‌های تلقیح شده روی پاجوش سالم در چهار تکرار رها سازی شدند. پاجوش و گلدان با توری فلزی پوشانده شد (شکل ۴). در تیمار شاهد سوسک‌های عاری از آلودگی روی پاجوش رها سازی شدند (شکل ۷، a). تیمارها به مدت شش هفته بررسی و علایم یادداشت شد.



شکل ۴- تلقیح کردن سوسک‌های شاخ‌دار خرما *Oryctes elegans* با سوسپانسیون قارچ *Fusarium proliferatum* و رها سازی آنها روی پاجوش

Fig 4. Inoculation of *Oryctes elegans* by *Fusarium proliferatum* suspension and releasing them on off-shoot

آزمون توانایی ناقل بودن سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans*

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت فاکتوریل با ۳ فاکتور شامل غلظت‌های مختلف سوسپانسیون، تراکم‌های سوسک شاخ‌دار خرما و هفته‌های انجام آزمایش و در ۴ تکرار انجام شد. هر تکرار شامل یک پاجوش به وزن تقریبی ۷-۵ کیلوگرم بود که در داخل یک گلدان ۲۰ لیتری مطابق شرایط استاندارد در شرایط

گلخانه‌ای نگهداری شد. پس از استقرار کامل پاجوش‌ها در گلدان که حدود ۲ ماه طول کشید و اطمینان از سلامت آن‌ها، تیمارها اعمال شد. برای اعمال تیمارها مراحل زیر انجام شد.

الف- پرورش سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans*

مراحل مختلف رشدی سوسک شاخ‌دار خرما از نخلستان‌های آلوده استان خوزستان جمع‌آوری و به آزمایشگاه حشره‌شناسی انتقال داده شد. پرورش در دمای 27 ± 5 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 60 ± 5 درصد درون ظروف پلاستیکی به ابعاد $10 \times 20 \times 40$ سانتی‌متر انجام شد. از خاک اره و سیب درختی به عنوان بستر تغذیه و پرورش استفاده شد.

ب- کشت جدایه‌ی قارچی *F. proliferatum*

پس از تک اسپور شدن، جدایه‌ی قارچی بیمارگر در محیط غذایی مناسب کشت شد. بعد از اسپورزایی کامل (کشت ۱۲-۱۴ روزه) سطح محیط کشت به وسیله سوزن انتقال خراش داده شد. اسپورها در داخل ارلن‌های جداگانه‌ای که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون با محلول ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ بود، جمع‌آوری شد. سوسپانسیون فوق به منظور پراکنده شدن یکنواخت اسپورها در داخل آن به مدت ۵ دقیقه به طور پاندولی به هم زده شد. برای تعیین غلظت اسپور قارچ از لام گلبول‌شمار، استفاده شد.

ج- تهیه غلظت‌های مختلف اسپور قارچ *F. proliferatum*

در آزمایش‌های انجام شده نیاز به تهیه غلظت‌های متفاوتی از سوسپانسیون قارچ بود. برای رسیدن به یک غلظت مشخص چنانچه مقدار آن از غلظت سوسپانسیون پایه تهیه شده کمتر بود، از طریق رقیق‌سازی پی در پی و با استفاده از میکروپیپت مدرج با قدرت تشخیص یک میکرولیتر و اضافه کردن آب مقطر سترون، غلظت مورد نظر تامین شد. اما در صورت نیاز به غلظت بالاتر، از دستگاه سانتریفیوژ با قدرت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه استفاده شد.

د- آلوده‌سازی از طریق غوطه‌وری

ابتدا اسپورهای جدایه‌ی مورد آزمایش از سطح پتری خراشیده شده و پس از ریختن درون محلول آب مقطر سترون و توئین ۸۰، به حالت معلق درآمد. سپس سوسپانسیون حاصله از صافی پشم شیشه عبور داده شد. به منظور شمارش اسپورها و تهیه غلظت‌های مختلف اسپور در واحد حجم از لام گلبول‌شمار استفاده شد. برای اندازه‌گیری زنده‌مانی اسپورها روز قبل از آزمایش مقدار اندکی از اسپورهای مورد آزمایش به صورت استریل درون محلول ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ به حالت تعلیق درآمد و روی محیط مناسب کشت شد. روز بعد فقط از کشت‌هایی استفاده شد که بیش از ۸۵ درصد اسپورهای آن جوانه زده بودند. چهار دوز شامل 5×10^3 ، 5×10^4 ، 5×10^5 و 5×10^6 اسپور در میلی‌لیتر تهیه و آلوده‌سازی ناقل فرضی با آنها در ۴ تراکم ۳، ۵، ۷ و ۹ عدد سوسک شاخ‌دار خرما انجام شد. ابتدا به منظور ضدعفونی سطحی و حذف ساپروفیت‌ها از سطح بدن حشرات، آن‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه در هیپوکلریت سدیم یک درصد غوطه‌ور نموده و نیز برای ۳۰ ثانیه در آب مقطر سترون شستشو داده شدند. سپس حشرات مذکور جهت حذف آب اضافی به مدت یک دقیقه روی کاغذ صافی واتمن قرار داده شدند (Meyling & Eilenberg, 2007). برای اطمینان از این‌که هر یک از حشرات نسبت یکسانی از غلظت را دریافت کنند، همه حشرات یک تراکم به طور همزمان در سوسپانسیون غوطه‌ور شدند (Butt & Goettel, 2000). سپس هر یک از حشرات ناقل بر روی پاجوش‌ها منتقل شده و روی کل پاجوش و گلدان محتوی آن با توری مناسب پوشش داده شد سپس با فواصل زمانی ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ هفته روند توسعه بیماری خشکیدگی برگ در تیمارهای مختلف ثبت شد (شکل ۴).

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق تاثیر غلظت‌های مختلف قارچ همراه با تراکم‌های مشخص حشرات بالغ، در شرایط گلخانه روی پاجوش‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین شدت بروز بیماری و نیز صفاتی مانند زنده‌مانی پاجوش‌ها و حشرات بالغ محاسبه شد. مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون LSD انجام شد. همبستگی از نوع پیرسون و رگرسیون انحنایی از نوع درجه دو یا سهمی بود. تجزیه تحلیل آماری با بکارگیری نرم افزارهای آماری SPSS ver. 22 (SPSS, 1998) و SAS ver. 9.1 (SAS, 2005) و رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

علائم خشکیدگی برگ خرما و نمونه برداری

قارچ‌های جداسازی شده از نمونه‌های گیاهی شامل جنس‌های *Helminthosporium*، *Alternaria*، *Stemphylium* و *Cylindrocarpon*، *Curvularia*، *Fusarium*، *Chaetomium* از حشرات بالغ *O. elegans* شامل *Helminthosporium*، *Chaetomium*، *Fusarium* و *Curvularia* و *Cylindrocarpon* بودند. جدایه‌ی قارچی که به صورت مشترک از حشرات بالغ و مواد گیاهی به دست آمد و باعث خشکیدگی برگ می‌شود، قارچ *Fusarium proliferatum* بود، بنابراین بقیه قارچ‌ها از نظر بیماری‌زایی مورد بررسی قرار نگرفتند و در آزمایش‌های گلخانه‌ای استفاده نشدند. علائم عارضه در نخلستان شامل زردی برگ، خشکیدگی برگ به صورت نامتقارن و یک‌طرفه، لکه‌های رنگ پریده، قهوه‌ای یا سیاه روی برگ و محور برگ بودند (شکل ۵).



شکل ۵- علائم بیماری خشکیدگی برگ خرما در نخلستان

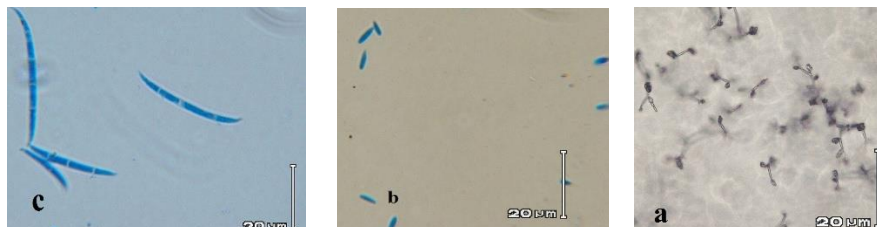
Fig 5. Symptoms of leaf wilt disease in date orchards

شناسایی قارچ عامل بیماری

شناسایی ریخت‌شناسی جدایه

میزان رشد پرگنه در محیط کشت PDA سریع بود به طوری که در مدت زمان ۱۰ روز برابر ۹ سانتی‌متر بود. میسلیوم‌های هوایی ابتدا سفید رنگ بودند که با گذشت زمان به رنگ کرم تغییر رنگ دادند (شکل ۲، a). رنگ سطح زیرین پرگنه از کرم تا بنفش متغیر بود (شکل ۲، b). کنیدیوم‌زایی این گونه از نوع مونوفیالید و پلی‌فیالید بود. میکروکنیدیوم‌ها بدون دیواره عرضی، تک سلولی، به ابعاد $1/13 - 1/7 \times 1/7 - 10/53$ میکرومتر بودند. بیضی شکل، درون سرهای دروغین و بیشتر به صورت منفرد و به ندرت به صورت زنجیرهای کوتاه تولید شدند (شکل ۶، a و b). ماکروکنیدیوم‌ها تا حدودی راست با اندکی خمیدگی، معمولاً دارای ۳-۴ دیواره عرضی و به ابعاد $2/81 \times 2/2 \times 56 - 42/15$ میکرومتر بودند. سطح پشتی و شکمی ماکروکنیدیوم‌ها تقریباً موازی و سلول پایه به شکل

پاشنه بود (شکل ۶، c). اسپرو دوخیوم‌ها (شکل ۲، d). به رنگ نارنجی روی تکه‌های برگ میخک دیده شدند. در این گونه کلامیدوسپور دیده نشد.



شکل ۶- a. فیالیدها، سرهای دروغین و زنجیره‌ی کوتاه میکروکنیدیوم، b. میکروکنیدیوم و c. ماکروکنیدیوم

قارچ *Fusarium proliferatum*

Fig. 6. a. Phialides, False heads and short chain of microconidium, b. Microconidium and c. Macroconidium of *Fusarium proliferatum*

شناسایی مولکولی جدایه

جستجوی بلاست نشان داد که توالی مربوط به جدایه‌ی مورد مطالعه با سویه‌های مرجع گونه *Fusarium proliferatum* strain TOR-55 ۹۹/۵۵ درصدی دارد. تجزیه و تحلیل تبارشناسی جدایه‌های حاصله در این مطالعه با توالی‌های مربوط به سویه‌های تیپ با استفاده از الگوریتم درست نمائی بیشینه، تعلق آن‌ها را به این گونه تأیید کرد. توالی مربوط به جدایه‌ی مورد بررسی در بانک ژن NCBI ثبت و شماره‌ی دستیابی به آن MT062910 می‌باشد.

پراکنش و فراوانی قارچ *Fusarium* در منطقه و در حشرات ناقل

نتیجه نشان داد که قارچ *F. proliferatum* از حشرات بالغ سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans* از مناطق مختلف استان خوزستان با فراوانی متفاوت جداسازی شد (جدول ۱). بالاترین میزان جداسازی قارچ *F. proliferatum* از سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans*، از شهرستان آبادان روستای منیوحی با ۷۱/۷ درصد ثبت شد و کمترین میزان جداسازی از شهرستان آبادان روستای امام حسن با ۴۶/۵ درصد بود (جدول ۱).

جدول ۱- تعداد سوسک‌های شاخ‌دار خرما *Oryctes elegans* و درصد جداسازی قارچ *Fusarium* از آن‌ها در مناطق مختلف

Table 1. Number of *Oryctes elegans* and the frequency of fungal isolation from them from different locations

Location	Number of <i>O. elegans</i> use for isolation	Number of isolates	Isolation frequency %
Abadan- savamer	54	31	57.4
Abadan- Emam- Hasan	43	20	46.5
Abadan- Maniohi	60	43	71.7
Abadan- Naghshe hayer	45	22	48.9
Abadan- Bahmanshir	51	34	66.6
Shadegan- Khanafereh	42	24	57.1
Shadegan- Geydari	58	29	50
Khoramshahr- hafar	55	29	52.7

نتایج حاصل از جداسازی قارچ *F. proliferatum* از درختان نخل خرما نشان داد که قارچ از همه مناطق فوق که به سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans* نیز آلودگی نشان دادند، با فراوانی متفاوت جداسازی شده است (جدول

۲). بیشترین میزان جداسازی قارچ *F. proliferatum* از درختان، از شهرستان آبادان، روستای مینوچی با ۸۰ درصد و کمترین فراوانی از شهرستان آبادان، روستای نقشه حیر با ۳۸/۳ درصد بود (جدول ۲).

جدول ۲- تعداد درخت‌های مورد بررسی قرار گرفته و درصد قارچ *Fusarium* جدا شده از آنها در مناطق مختلف

Table 2. Number of trees and the frequency of fungal isolation from them from different locations

Location	Number of tree use for isolation	Number of isolates	Isolation frequency %
Abadan- savamer	45	29	64.4
Abadan- Emam- Hasan	45	21	46.7
Abadan- Maniohi	30	24	80
Abadan- Naghshe hayer	60	23	38.3
Abadan- Bahmanshir	45	35	77.7
Shadegan- Khanafereh	45	23	51.1
Shadegan- Geydari	45	24	53.3
Khoramshahr- hafar	60	34	56.7

نتایج همبستگی درختان آلوده به سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans* با درختان دارای علائم بیماری خشکیدگی برگ که قارچ *F. proliferatum* از آنها جداسازی شد، همبستگی مثبت و معنی‌داری را نشان داد (جدول ۳).

جدول ۳- همبستگی بین درختان آلوده به بیماری و درختان آلوده به سوسک شاخ‌دار خرما *Oryctes elegans*

Table 3. Correlation between infected trees with fungi and trees infected with *Oryctes elegans*

Infected trees with fusarium	<i>O. elegans</i> with fusarium		
0.527**	1	<i>O. elegans</i> with fusarium	Kendall's tau_b
1	0.527**	Infected trees with fusarium	
0.715**	1	<i>O. elegans</i> with fusarium	Spearman's rho
1	0.715**	Infected trees with fusarium	

نتیجه رگرسیون سوسک‌های آلوده و درختان دارای عامل بیماری نیز نشان داد بین حضور سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans* و عارضه خشکیدگی برگ در درختان خرما ارتباط وجود دارد (شکل ۸). نتایج حاصل از جداسازی قارچ از درختان خرما، نتایج حاصل از جداسازی قارچ از حشرات بالغ را تأیید کرد.

نتایج آزمون بیماری‌زایی قارچ *F. proliferatum* روی پاجوش نخل خرما

چهار هفته پس از تلقیح، لکه‌های نکروزه کوچک تقریباً ۳-۲ میلی‌متری در اطراف محل تزریق و نیز در اطراف محل اسپری کردن روی زخم مشاهده شد. ظهور لکه‌های نکروتیک روی برگ‌ها نشان دهنده آلودگی قارچی است (شکل ۳، b) (Hameed, 2012). در ششمین هفته، لکه‌ها به بیش از دو سانتی‌متر رسیدند و یک‌طرفه بودن علائم واضح شد (شکل ۳، b). پس از آن، علائم گسترده‌تر شد و پاجوش تلقیح شده در مقایسه با پاجوش شاهد که سالم بود، شروع به زردی و ضعیف شدن کرد و از بین رفت (شکل ۳، e).

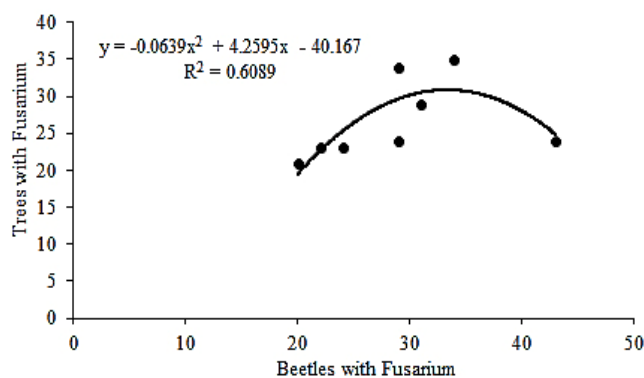
نتایج آزمون انتقال قارچ توسط سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans*

در تیماری که سوسک‌های عاری از آلودگی برای مشاهده علائم خسارت سوسک شاخ‌دار خرما رهاسازی شده بود، از هفته‌ی اول رهاسازی تغذیه شروع شد و از هفته‌ی دوم به بعد علائم به صورت جویدگی در قاعده محور برگ‌ها دیده شد. به تدریج علائم به صورت بریدگی در محور برگ‌ها و یا حفره در قاعده برگ‌ها و تنه دیده شد اما منجر به از بین رفتن پاجوش‌ها نشد (شکل ۷، a).



شکل ۷- a. علائم تغذیه و خسارت سوسک شاخ‌دار خرما *Oryctes elegans* در پاجوش شاهد و b. بروز علائم توسط سوسک‌های تلقیح شده *Oryctes elegans* پس از شش هفته

Fig 7. a. Symptoms of feeding behavior and damage of *Oryctes elegans* on control offshoot and b. emergence of symptoms by inoculated *O. elegans* after 6 weeks



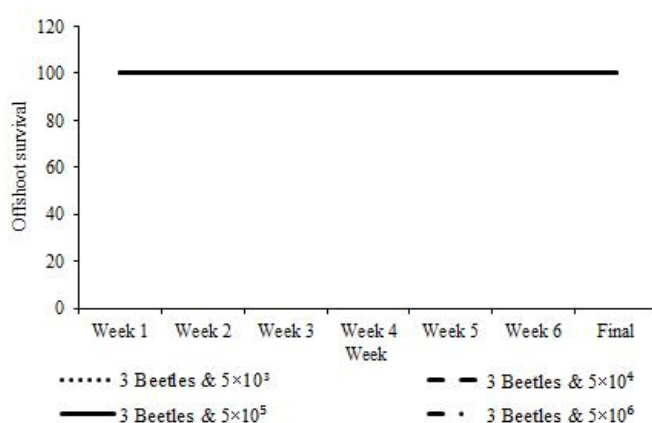
شکل ۸- رگرسیون بین سوسک‌های شاخ‌دار *Oryctes elegans* و درختان دارای عامل Fusarium

Fig 8. Regression between infested *Oryctes elegans* and trees by Fusarium

در تیمارهایی که با سوسک‌های آغشته شده با غلظت های 5×10^5 و 5×10^6 اسپور در میلی لیتر آلوده شده بودند، علائم به صورت زرد شدن یک طرفه بود که از نوک برگ‌ها به تدریج از سمت پایین به طرف بالا از یک سمت برگ شروع شد و سپس از بالا به سمت پایین گسترش یافت (شکل ۷، b). هر دو غلظت در تراکم‌های ۷ و ۹ عدد سوسک بیشترین میزان آلودگی را نشان دادند. شروع ظهور علائم از ابتدای هفته چهارم رهاسازی حشرات بود و پس از هفته پنجم روند خشکیدگی سرعت بیشتری یافت به طوری که پس از پایان هفته ششم کاملاً خشکیدند. بین تراکم ۷ و ۹ عدد سوسک با غلظت‌های مزبور تفاوت معنی داری دیده نشد. در هر دو غلظت مذکور در تراکم ۵ عدد سوسک، اگرچه ظهور علائم از ابتدای هفته چهارم بود ولی شدت بیماری کمتر بود و پاجوش‌ها کاملاً خشک نشدند. همچنین در هر دو غلظت با تراکم ۳ عدد سوسک ظهور علائم از ابتدای هفته چهارم بود ولی شدت آلودگی با غلظت 10^6 اسپور در میلی لیتر بیشتر و محسوس تر بود ولی در نهایت پاجوش‌ها کاملاً خشک نشدند.

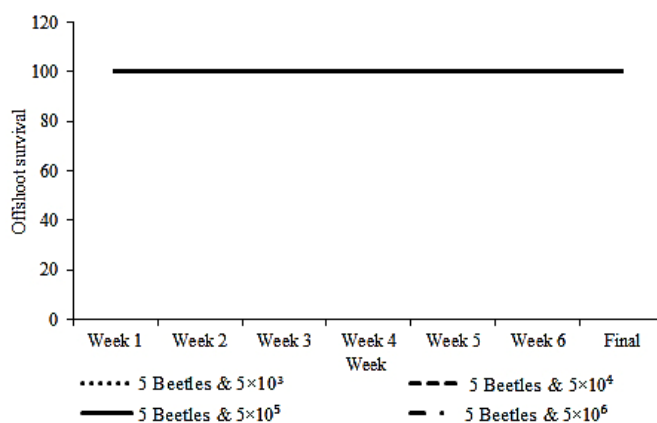
در پاجوش‌هایی که با سوسک‌های آغشته شده با غلظت‌های 5×10^3 ، 5×10^4 اسپور در میلی لیتر آلوده شده بودند، علائم همراه با ظهور لکه‌های نکروتیک در برگچه‌های یک طرف محور برگ‌ها بود که به تدریج به تمام برگچه گسترش یافت. به تدریج محور برگ‌ها نیز زرد و گاهی دارای لکه‌های کلروزه یا سیاه رنگ گردید. در هر

دو غلظت در تراکم‌های ۷ و ۹ عدد سوسک، ظهور علائم از ابتدای هفته چهارم بود ولی شدت آلودگی با غلظت 5×10^4 اسپور در میلی‌لیتر بیشتر و محسوس‌تر بود. در نهایت پاجوش‌ها کاملاً خشک نشدند و تا پایان هفته ششم هم زنده بودند. هر دو غلظت در تراکم ۵ عدد سوسک ظهور علائم از ابتدای هفته چهارم ولی شدت بیماری کمتر بود و پاجوش‌ها کاملاً خشک نشدند. همچنین در هر دو غلظت با تراکم ۳ عدد سوسک ظهور علائم از ابتدای هفته چهارم بود ولی شدت آلودگی با غلظت 10^4 اسپور در میلی‌لیتر بیشتر و محسوس‌تر بود و پاجوش‌ها کاملاً خشک نشدند و تا پایان هفته ششم زنده بودند (شکل‌های ۹-۱۲).



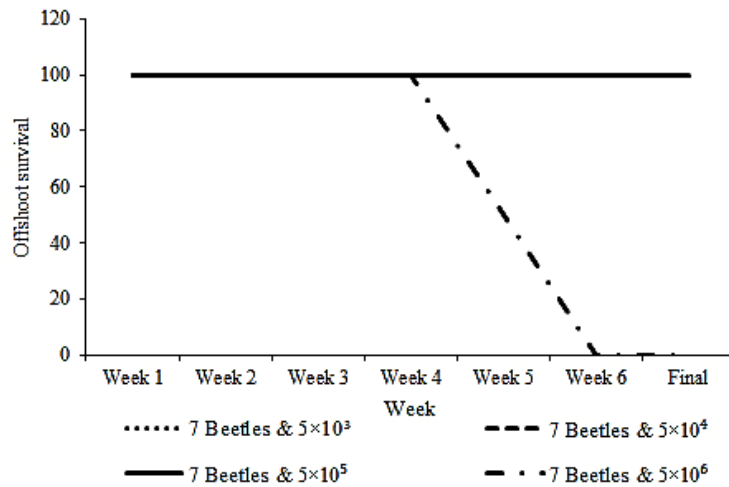
شکل ۹- تاثیر غلظت‌های متفاوت سوسپانسیون قارچ *Fusarium proliferatum* و تراکم ۳ سوسک شاخ‌دار *Oryctes elegans* بر زنده‌مانی پاجوش‌ها

Fig 9. Effect of different concentration of *Fusarium proliferatum* suspension and density of 3 *Oryctes elegans* on the survival of the offshoots



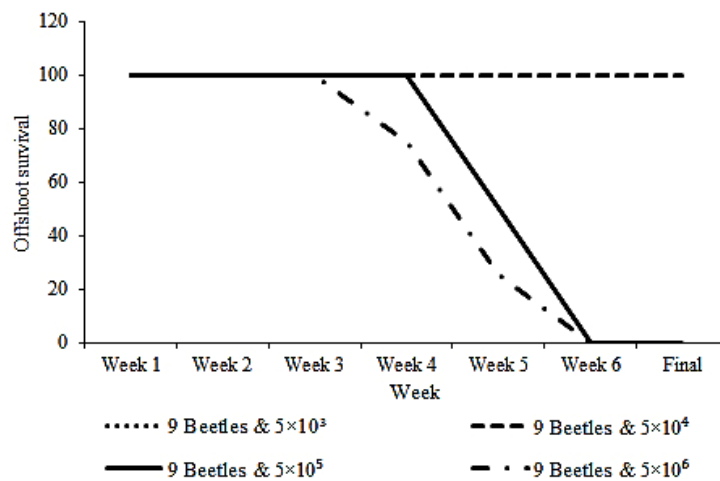
شکل ۱۰- تاثیر غلظت‌های متفاوت سوسپانسیون قارچ *Fusarium proliferatum* و تراکم ۵ سوسک شاخ‌دار *Oryctes elegans* بر زنده‌مانی پاجوش‌ها

Fig 10. Effect of different concentration of *Fusarium proliferatum* suspension and density of 5 *Oryctes elegans* on the survival of the offshoots



شکل ۱۱- تاثیر غلظت‌های متفاوت سوسپانسیون قارچ *Fusarium proliferatum* و تراکم ۷ سوسک شاخ‌دار خرما *Oryctes elegans* بر زنده‌مانی پاجوش‌ها

Fig 11. Effect of different concentration of *Fusarium proliferatum* suspension and density of 7 *Oryctes elegans* on the survival of the offshoots



شکل ۱۲- تاثیر غلظت‌های متفاوت سوسپانسیون قارچ *Fusarium proliferatum* و تراکم ۹ سوسک شاخ‌دار خرما *Oryctes elegans* بر زنده‌مانی پاجوش‌ها

Fig 12. Effect of different concentration of *Fusarium proliferatum* suspension and density of 9 *Oryctes elegans* on the survival of the offshoots

بر اساس نتایج این تحقیق، بین حضور سوسک شاخ‌دار خرما و شیوع قارچ *F. proliferatum* در درختان خرما ارتباط وجود داشت. تعداد زیادی از درختان آلوده توسط *O. elegans* علائم پژمردگی و زرد شدن برگ‌ها را نشان دادند. جداسازی قارچ *F. proliferatum* از حشرات بالغ سوسک شاخ‌دار خرما با فراوانی بالا نشان داد که حشرات بالغ، قارچ *F. proliferatum* را که عامل خشکیدگی برگ‌ها می‌باشد، انتقال می‌دهند. همراه با آسیب مستقیم سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans* که باعث کاهش تولید محصول می‌شود، انتقال عوامل بیماری‌گر مانند قارچ *Fusarium* می‌تواند از طریق کشتن درخت باعث بیشتر شدن خسارت در نخلستان‌ها شود. این ارتباط بین علائم

پژمردگی و خشکیدگی برگ‌ها و درختان آلوده با سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans*؛ می‌تواند مکانیسم شیوع بیماری را از یک منطقه به منطقه دیگر و از درختی به درخت دیگر که در مکان‌های جداگانه هستند، سبب شود. در آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق، با تراکم‌های ۳ و ۵ سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans* با هر چهار غلظت سوسپانسیون قارچ *F. proliferatum*، آلودگی پاجوش‌ها کمتر از تراکم‌های ۷ و ۹ عدد سوسک بود و در نهایت قارچ سبب مرگ پاجوش‌ها نگردید. این مطلب بیانگر تاثیر مخرب این آفت در تراکم‌های بالا برای نخلستان‌ها از نظر انتقال عارضه فوزاریومی خشکیدگی برگ درختان خرما می‌باشد. با افزایش تراکم سوسک‌ها شدت بیماری و علائم ایجاد شده افزایش می‌یابد و در برخی موارد منجر به خشکیدگی و مرگ درختان خواهد شد. علی‌رغم آسیب‌های جدی گونه‌های مختلف *Fusarium* به درختان نخل، مطالعات کمی در زمینه‌ی انتقال آن توسط حشرات آفت نخلستان‌ها انجام شده است. در گزارشی از کازرون در استان فارس، زردی برگ‌ها و مرگ درختان نخل توسط گونه‌ای از *Fusarium* ارائه شده است (Mansoori & Kord, 2006). در عربستان سعودی این قارچ به عنوان عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی و سرخشکیدگی نخل ثبت شده است (Abdalla et al., 2000). در پاکستان از قسمت‌های مختلف درختان نخل آلوده جداسازی شد و به عنوان عامل خشک شدن ناگهانی برگ‌ها و درختان نخل گزارش شد. این قارچ کشت جدید درخت نخل را در برخی از مناطق پاکستان با محدودیت مواجه کرد (Abul Soad et al., 2011). همچنین گونه‌های مختلف *Fusarium* همراه با هم در ارتباط با زوال درختان نخل خرما در مصر گزارش شده است (Abul Soad et al., 2011). همینطور (Khudhair et al., 2014) قارچ *F. Proliferatum* را به عنوان عامل پژمردگی برگ درختان نخل خرما از نخلستان‌های عراق جداسازی و سوسک شاخ‌دار خرما *O. elegans* را به عنوان ناقل آن گزارش کرده‌اند (Khudhair et al., 2014) که نتایج کار آنها با نتایج این تحقیق مشابه می‌باشد. مطالعات مربوط به حشرات آفت و بیماری‌های مرتبط با آنها به دلیل سختی تأیید این‌که کدام گونه حشره ناقل بیماری می‌باشد پیچیده است (Harrison et al., 2008). تحقیقات زیادی در زمینه فرآیند انتقال لازم است تا توضیح دهد چرا فقط انواع خاصی از حشرات یا کنه‌ها می‌توانند ناقل باشند و شناسایی چه عواملی برای فهم این فرآیند لازم است (Purcell & Almeida, 2005). شناسایی زود هنگام بیماری‌ها و حشرات ناقل آنها، قبل از نابودی بسیاری از نخل‌ها، می‌تواند به اقدامات کنترلی منجر شود.

References

- Abdalla, M. Y., AL Rokibah, A., Moretti, A. & Mule, G. (2000) Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from date palm in Saudi Arabia. *Plant Disease* 84, 321–324.
- Abdullah, S. K., Lopez Lrca, L.V. & Jansson, H. B. (2010) Diseases of date palms (*Phoenix dactylifera* L.). *Basrah Journal for Date Palm Researches* 9 (2), 1–43.
- Abul Soad, A. A., Maitlo, W. A., Markhand, G. S. & Mahdi, S. M. (2011) DatePalm 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. & Farokhinejad, R. (2017) *Neodidymelliopsis farokhinejadii*, a new fungal species from dead branches of trees in Iran. *Sydowia* 69, 171–182.

- Al Aydeh, H. Y. & Al Dhafer, H. M.** (2015) Does *Oryctes elegans* (Coleoptera: Scarabaeidae) abundance determine future abundance of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Rhynchophoridae) in the date palms of Saudi Arabia? *African Entomology* 23(1), 43–47.
- Azimi, S., Farrokhi nejad, R. & Mousavi Jorof, S. A.** (2005) Pathogenicity identification and investigation of *Fusarium* with the crown and root of Bean in Khuzestan province. *Scientific Journal of Agriculture* 28(1), 149–163. (In Persian with English summary).
- Bezoz, D., Martínez Álvarez, P., Diez, J. J. & Fernández, M. M.** (2015) The pine shoot beetle *Tomicus piniperda* as a plausible vector of *Fusarium circinatum* in northern Spain. *Annals of Forest Science, Springer Verlag/EDP Sciences* 72 (8), 1079–1088.
- Blank, L., Martín García, J. Bezoz, D., Vettriano, A., Krasnov, H., Lomba, J., Fernández, M. & Diez, j.** (2019) Factors affecting the distribution of pine pitch canker in Northern Spain. *Forests* 10, 305.
- Butt, T. M. & Goettel, M. S.** (2000) Bioassays of entomogenous fungi. In: A. Navon and Ascher, K. R.S. (eds). Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes, pp: 141–145, *CABI Publishing*.
- Eigenbrode, S. D., Bosque-Pérez, N. A. & Davis, T. S.** (2017) Insect borne plant pathogens and their vectors: ecology, evolution, and complex interactions. *Annual Review of Entomology* 63, 169–191.
- Eskalen, A., Stouthamer, R., Lynch, S. C., Rugman Jones, P.F., Twizeyimana, M., Gonzalez, A. & Thibault, T.** (2013) Host range of *Fusarium* dieback and its ambrosia beetle (Coleoptera: Scolytinae) vector in southern California. *Plant Disease* 97, 938–951.
- Feldman, T., O'brien, H. & Arnold, A. E.** (2008) Moths that vector a plant pathogen also transport endophytic fungi and mycoparasitic antagonists. *Microbial Ecology* 56, 742–750.
- Gurr, G., Fletcher, M. J. & Mitchell, A.** (2009) Insect pests and insect-vectored diseases of palms. *Australian Journal of Entomology* 48(4), 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(35), 8616–8621.
- Harrison, N. A., Helmick, E. E. & Elliott, M. L.** (2008) Lethal yellowing-type diseases of palms associated with phytoplasmas newly identified in Florida, USA. *Annals of Applied Biology* 153, 85–94.
- Howard, F. W.** (2001) Insect pests of palms and their control. *Pesticide Outlook* 12, 240–243.
- Kaloshian, I. & Walling, L. L.** (2005) Hemipterans as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43, 491–521.

- Khalaf, M. Z. & Alrubiae, H. F.** (2016) Impact of date palm borer species in Iraqi agroecosystems. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 28(1), 52–57.
- Khudhair, M. W., Aboud H. M., Khalaf, M. Z. & 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.
- Mansoori, B. & Kord, M. H.** (2006) Yellow death: A disease of date palm in Iran caused by *Fusarium solani*. *Journal of Phytopathology* 154, 125–127.
- Meyling, N. V. & Eilenberg, J.** (2007) Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control* 43(2), 145–155.
- Mitchell, P. L.** (2004) Heteroptera as vectors of plant pathogens. *Neotropical Entomology* 33, 519–545.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. & Marasas, W. F. O.** (1983) *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press. USA. 193 pp.
- Ogbalu, O. K. & Williams, J. O.** (2015) The edibility, distribution and damage indices of *Oryctes Monocerosoliv.* (Coleoptera: Scarabaeidae) an edible larva of the oil palms (Elaise Guineensis) and associated microorganism. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 10(6), 118–125.
- Ozkale, E. & Demirel, P.** (2017) Molecular characterization of some soil originated *Trichoderma* Species. *Hecettep Journal of Biology and Chemistry* 45(4), 585–591.
- Purcell, A. H. & Almeida, R. P. P.** (2005) Insects as vectors of disease agents. encyclopedia of plant and crop science. *Encyclopedia of Plant and Crop Science* 10.1081/E-EPCS-120010496.
- Raeder, U. & Broda, P.** (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1, 17–20.
- Rochat, D., Mahammad Poor, K., Malosse, C., Avand Faghieh, A., Lettere, M., Beauhaire, J., Morin, J. P., Pezier, A., Renou, M. & Abdollahi, G. A.** (2004) Male aggregation pheromone of date palm fruit stalk borer *Oryctes elegans*. *Journal of Chemical Ecology* 30, 387–407.
- Saleh, A. A., Sharafaddin, A. H., El Komy, M. H. & Ibrahim, Y. E.** (2016) *Fusarium* species associated with date palm in Saudi Arabia. *European Journal of Plant Pathology* 148(2), 367–377.
- Saremi, H.** (2005) *Fusarium Biology, Ecology and Taxonomy*. Mashhad University Press. First ed. 153 pp. (In Persian with English summary).
- Saremi, H., Okhovvat, S. M. & Ashrafi, S. J.** (2007) Wilting of date palm branches by *Fusarium oxysporum* in south of Iran and its control managements with soil solarization method. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 72(4), 831–7.

-
- SAS Institute.** (2005) SAS/STAT user's guide, version 9.1. SAS Institute, Cary, NC.
- Scarlett, K., Tesoriero, L., Daniel, R. & Guest, D.** (2013) Sciarid and shore flies as aerial vectors of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* in greenhouse cucumbers. *Journal of Applied Entomology* 138(5), 315–391.
- Shetab boushehri, M.** (2017) Date palm wilt disease. *Agricultural Management Publishing* 16.
- SPSS** (1998) SPSS 8.0 for Windows. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S.** (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12), 2725–2729.
-