



Identification of fungal postharvest agents of date fruit in cold storages of Saravan County

Adel Pordel^{1✉}, Kaghobad Kikavosi², Azam Amiri³, Khashayar Rigi²

1. Baluchestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Iranshahr, Iran.
2. Agronomy and Horticulture crops research Department, Baluchestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Iranshahr, Iran
3. Date Palm and Tropical Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran.

Received Date:2026.01.02 Accepted Date:2026.02.07

Abstract

Every year, date fruits stored in cold storage suffer significant damage from various factors. Among these factors, storage pests and post-harvest diseases are particularly detrimental to the quality of date fruits. To assess the presence of fungal agents, five samples weighing one kilogram each were randomly collected from each cold storage every two weeks (ten cold storages) in Saravan County, Sistan and Baluchestan province. The samples were then transported to the plant protection research laboratory of Baluchestan Agriculture and Natural Resources Research and Education Center. After sampling, infected samples were cultured on general and special culture media to identify pathogenic agents. Pure culture of fungi was prepared using the single spore method and transferred in potato-dextrose-agar (PDA) medium. A total of one hundred fourteen isolates from the fungal genera *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Alternaria* were isolated and identified by morphological criteria. To validate the morphological identification, sequencing of the genomic region ITS-rDNA was employed. The examination of samples from cold storages in Saravan city revealed that *Alternaria alternata* fungal species had the highest level of contamination. The findings from this study indicated that under cold storage conditions, pathogenic fungi can potentially contaminate a significant portion of the date fruits due to high temperatures, inadequate ventilation (resulting in relative humidity exceeding 70% in certain areas), and poor sanitation practices (including the presence of previous year's date fruit and waste in some cold storage facilities).

Keyword: Cold storage, Date, *Alternaria*, Sistan and Baluchestan

✉ a_pordel@areeo.ac.ir

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: The date-producing area in Iran covers 286393 ha with a production of 1971444 tons in 2020. The main date palm plantations in Iran are located often in south, southeast and southwest which Sistan and Baluchestan by having seventeen percent of producing area and production of 242093 ton are in top of the list. High sensitivity of date fruit to physical damage and microbial contamination has made the marketing risk of this product very high over a long period of time, especially over long distances. Identifying microorganisms that cause spoilage and decay of fresh date fruit, it will be possible to access appropriate methods for storing and packaging this fruit. Some varieties of date fruit is perishable in the wet stage and is more susceptible to microbial spoilage compared to dry and semi-dry varieties. Every year, date fruits stored in cold storage suffer significant damage from various factors. Among these factors, storage pests and post-harvest diseases are particularly detrimental to the quality of date fruits. Date diseases have been increasing in recent decades, which has caused concern among date producers. It is crucial to monitor and detect these pests and diseases early on in order to prevent and manage outbreaks in post-harvest conditions.

Materials and Methods: To assess the presence of fungal agents, five samples weighing one kilogram each were randomly collected from each cold storage every two weeks (ten cold storages). The samples were then transported to the plant protection research laboratory of Baluchestan Agriculture and Natural Resources Research and Education Center. Sampling, infected samples were cultured on general and special culture media to identify pathogenic agents. Pure culture of fungi was prepared using the single spore method and threading in potato-dextrose-agar (PDA) medium. To identify the morphological characteristics of the species, after examining the macroscopic and microscopic characteristics, descriptions available in reputable mycological sources and articles were used based on colony characteristics, shape and type of conidiophore and conidium, and presence or absence of sporoducium. For sporulation of fungal species and observation of colony characteristics, specific culture media and growth conditions specific to each species were used. Identification was based on available books, keys, and authoritative articles. Phylogenetic analysis, generated and published sequences of ITS-rDNA were used. Sequences downloaded from Genbank originated. DNA extraction was done and PCR amplification for ITS gene was conducted. The sequences were edited by CLC Genomic workbench 10.1 software, and then aligned using sequence alignment program MUSCLE. Phylogenetic analyses were performed with MEGA v. 6 software. A phylogenetic tree was constructed by the maximum likelihood method based on the Kimura two parameter model.

Results and Discussion: A total of one hundred and fourteen isolates from the fungal genera *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Alternaria* were isolated and identified by morphological criteria. These genus are reported from some date storage in other province of Iran. Subsequently, twelve isolates with distinct morphological characteristics were chosen for DNA extraction and determination of nucleotide synonyms. To validate the morphological identification, sequencing of the genomic region ITS-rDNA was employed and the sequences obtained from amplifying a part of the genomic region were compared with the sequences in the gene bank using the BLASTn search tool. The phylogenetic analyses were performed as well. Finally, the species including *Penicillium digitatum*, *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* and *A. atra* were identified. The species could infect date fruits in garden and then transfer to cold storage which in suitable condition for the mentioned species cause economic losses.

Conclusion: Annually, date fruits stored in cold storage suffer significant damage from various factors that cause effect losses to date producers. The lack of suitable temperature and humidity conditions for storing dates has caused cold storage to be seriously damaged by various factors including fungi, bacteria and pests. Fungal species are important causal agent of infecting of date fruits in cold storage. Saravan city is one of the important areas for date-producing in Sistan and Baluchestan province. Due to the low price of dates during the harvest season and the lack of market and demand during this season, a large portion of the date crop is stored in cold storage of Saravan city. The examination of samples from cold storages in Saravan city revealed *Alternaria alternata* fungal species had the highest level of contamination. The findings from this study indicated under cold storage conditions, pathogenic fungi can potentially contaminate a significant portion of the date fruit due to high temperatures, inadequate ventilation (resulting in relative humidity exceeding 70% in certain areas), and poor sanitation practices (including the presence of previous year's date fruit and waste in some cold storage facilities).



شناسایی عوامل قارچی پس از برداشت در سردخانه‌های خرما شهرستان سراوان

عادل پردل^{۱*}، کی قباد کیکاوسی^۲، اعظم امیری^۳، خشایار ریگی^۲

۱. بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان (ایران شهر)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران شهر، ایران

۲. بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان، ایران شهر، ایران

۳. پژوهشکده خرما و میوه‌های گرمسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۸

چکیده

میوه خرما نگهداری شده در سردخانه‌ها همه‌ساله توسط عوامل مختلفی مورد آسیب‌های جدی قرار می‌گیرد. بیمارگرهای قارچی پس از برداشت یکی از مهم‌ترین عوامل طبیعی خسارت‌زا در سردخانه‌های میوه خرما می‌باشد. برای پیش‌آگاهی، پیشگیری و مدیریت طغیان بیماری‌های گیاهی در شرایط پس از برداشت، نیاز به پایش قارچ‌های بیمارگر است. به منظور بررسی قارچ‌های بیمارگر، حداقل ۵ نمونه یک کیلویی رقم مضافتی (هر دو هفته یکبار از ۱۰ سردخانه در شهرستان سراوان از) از هر سردخانه بصورت تصادفی برداشته شده و به آزمایشگاه تحقیقات گیاهپزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان منتقل گردید. به منظور شناسایی عوامل بیمارگر پس از برداشت، اقدام به کشت نمونه‌های آلوده روی محیط‌های کشت عمومی و اختصاصی شد. در مجموع ۱۱۴ جدایه متعلق به سه جنس قارچی پنی‌سیلیوم، آسپرژیلوس و آلترناریا از خرماهای جمع‌آوری شده از سردخانه‌های سطح شهرستان، جداسازی و به روش ریخت‌شناختی مورد شناسایی قرار گرفت. در نهایت دوازده جدایه از جدایه‌های دارای ویژگی‌های ریخت‌شناختی متفاوت به منظور انجام استخراج دی‌ان‌ای و تعیین ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ژنومی ITS1-5.8S-ITS2 انتخاب شدند. بررسی نمونه‌های جمع‌آوری شده از سردخانه‌ها نشان داد بیشترین میزان آلودگی متعلق به گونه قارچی آلترناریا می‌باشد. قارچ‌های بیمارگر در شرایط سردخانه توانایی آلودگی بخش زیادی از محصول خرما را در دمای بالا (دمای بالای ۱۰ درجه سلسیوس)، عدم تهویه مناسب (در برخی مناطق رطوبت نسبی به بالای ۷۰ درصد می‌رسید) و عدم بهداشت سردخانه (در برخی از سردخانه‌ها میوه خرما سال قبل و همچنین در یک قسمت سردخانه ضایعات خرما نگهداری می‌شد) را دارا می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: سردخانه خرما، سراوان، *Alternaria*، سیستان و بلوچستان

* a_pordel@areeo.ac.ir

مقدمه

خرما (*Phoenix dactylifera* L.) گیاهی دو پایه گرمسیری و نیمه گرمسیری از تیره Palmaceae یا Arecaceae است. سطح زیر کشت نخلستان‌های ایران با احتساب درختان پراکنده در سال ۱۴۰۰ حدود ۳۶۵۱۴۰ هزار هکتار برآورد گردیده است (آمارنامه جهادکشاورزی، ۱۴۰۳). بیشترین سطح بارور خرما در کشور با ۱۷ درصد به استان سیستان و بلوچستان تعلق دارد و استان‌های بوشهر، هرمزگان، منطقه جیرفت و کهنوج در جنوب کرمان، خوزستان، کرمان و فارس در رده‌های بعدی قرار می‌گیرند. سطح برداشت خرما در کشور ۲۸۶۳۹۳ هکتار و میزان تولید خرما در ایران ۱۰۹۷ میلیون تن در سال ۲۰۲۴ می‌باشد (آمارنامه جهادکشاورزی، ۱۴۰۳). میزان سطح زیر کشت خرما در استان سیستان و بلوچستان و کرمان به ترتیب ۶۲۶۸۹ و ۴۳۸۳۹ هکتار و میزان تولید آن ۳۲۹۲۲۰ و ۲۶۷۶۲۶ تن است (۱). حساسیت زیاد میوه خرما به آسیب‌های فیزیکی و آلودگی‌های میکروبی سبب گردیده تا ریسک بازاری رسانی این محصول در مدت زمان طولانی و به خصوص در فواصل دور بسیار بالا باشد. با جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های عامل فساد و پوسیدگی میوه خرما، تازه، دسترسی به روش‌های مناسب انبارداری و بسته‌بندی این میوه امکانپذیر خواهد بود. بیماری‌های خرما در دهه‌های اخیر در حال افزایش است که این مساله باعث نگرانی تولید کنندگان خرما شده است. بیمارگرهای قارچی درخت خرما به عنوان عوامل مشکل‌زا در نظر گرفته می‌شوند که منجر به کاهش معنی‌داری در رشد و توسعه و همچنین تولید محصول خرما در کل دنیا می‌گردند (۲ و ۳). میوه خرما در مرحله رطب فسادپذیر بوده و در مقایسه با ارقام خشک و نیمه خشک بیشتر در معرض فساد میکروبی قرار دارند. روی سطح خرماهای تازه و انبار شده، در محیط

کارخانه بسته‌بندی و بازار خرده فروشی، میکروارگانیسم‌هایی از قبیل باکتری‌ها و قارچ‌ها مشاهده می‌شود، به خصوص وقتی عملیات ضد عفونی به شکل مناسب اعمال نگردد انواع آلودگی میکروبی جداسازی شده از میوه‌های خرما شامل مخمرها، کپک‌ها، باکتری‌های هستند (۴). خرماهای حاوی رطوبت بالای ۲۵ درصد در دماهای بالا به طور طبیعی تحت تاثیر میکروارگانیسم‌ها قرار می‌گیرند. مقدار pH میوه‌های خرما معمولاً بین ۵/۵-۶ و رشد قارچ‌ها را میسر می‌سازد (۵). رشد قارچ‌ها بر روی خرما را می‌توان از روی رشد ریشه‌ها، تغییر رنگ یا طعم و بوی خرما تشخیص داد. این میکروارگانیسم‌ها بطور معمول قبل از آن که خرما چروکیده یا خشک شود، روی آن گسترش می‌یابند، زیرا قادر به رشد و تکثیر روی خرماهای چروکیده نمی‌باشند. از مهمترین بیمارگرهای قارچی در سردخانه خرما می‌توان به مخمرها و قارچ‌های *Alternaria*، *Penicillium*، *Aspergillus* و *Cladosporium* اشاره کرد. این قارچ‌ها ممکن است در خرماهایی که محتوی آب بیشتری دارند ظهور پیدا کنند. اگر در زمان برداشت، هوا بارانی یا مرطوب باشد میزان این آلودگی‌ها به مراتب بیشتر خواهند بود و علاوه بر اینکه تأثیرات نامطلوبی روی بازاری پسندی محصول دارد، استفاده‌ی آن را برای مصرف کننده خطرناک می‌کند (۶). گونه‌هایی از قارچ *Fusarium*، *Penicillium*، *Aspergillus* و *Alternaria* با تولید مایکوتوکسین‌ها به عنوان عوامل ایجاد پوسیدگی در خرما شناخته شده‌اند (۷). برخی پژوهشگران، گونه‌های قارچ *Aspergillus* و *Alternaria* را عمومی‌ترین عوامل فساد در خرما گزارش کرده‌اند (۸ و ۹). بررسی کیفیت میکروبی برخی ارقام خرما، مراکش حاکی از وجود کپک *Aspergillus niger* به عنوان فراوانترین گونه قارچی بود (۱۰).

به دلیل پایین بودن قیمت خرما در فصل برداشت و همچنین نبود بازار و تقاضا در این فصل، بخش زیادی از محصول خرما در سردخانه‌های استان سیستان و بلوچستان نگهداری می‌گردد. نبود شرایط مناسب دمایی و رطوبتی برای نگهداری خرما باعث شده تا سردخانه‌های استان سیستان و

بلوچستان همه ساله توسط عوامل مختلفی مورد آسیب های جدی قرار گیرد. بیمارگرهای قارچی نیز یکی از مهم ترین این عوامل هستند که در سطوح وسیعی خسارت های زیادی را به میوه خرما وارد می کنند. به دلیل نبود سیستم پایش هوشمند و مستمر در سطح سردخانه های خرما معمولاً پس از بروز طغیان آفات و بیماری ها و ایجاد خسارت گسترده، متولیان اقدامات مورد نیاز را آغاز می کنند که در این مرحله خسارت وارده شده و هزینه های تحمیل شده بسیار بالا بوده و میزان موفقیت کنترل نیز بسیار پایین می باشد. تحقیق حاضر با هدف جداسازی و شناسایی قارچ های پس از برداشت خرما از سردخانه های خرما در استان سیستان و بلوچستان انجام شد.

مواد و روش ها

نمونه برداری در سال های ۱۴۰۱ تا ۱۴۰۳ از رقم مضافتی در برخی از سردخانه های شهرستان سراوان صورت پذیرفت. در طی نمونه برداری بخش زیادی از خرماهای بسته بندی شده مورد ارزیابی و نمونه های دارای علائم به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه های مورد بررسی دارای علائم پوسیدگی و لهیدگی بود و همچنین در برخی از نمونه های بررسی شده مراحل مختلف رشدی آفات مشاهده گردید. خرماهای آلوده ضد عفونی سطحی با و بدون محلول هیپوکلرید سدیم رقیق

شد (دارای دو درصد ماده موثر) و متعاقب آن سه بار شستشو با آب مقطر استریل و آب گیری با کاغذ صافی استریل انجام گرفت. جهت جداسازی قارچ از خرماهای دارای علائم لهیدگی، از روش محیط های کشت آب - آگار دو درصد استفاده شد. جهت خالص سازی، جدایه های به دست آمده تک اسپور گردید و به محیط آب آگار دو درصد انتقال یافت. پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت اسپورها جوانه زده و با استفاده از روش نوک هیف کردن^۲ به محیط کشت عمومی (Potato Dextrose Agar, PDA) منتقل شدند (۱۱). جهت شناسایی ریخت شناختی گونه ها، پس از بررسی ویژگی های ماکروسکوپی و میکروسکوپی، از توصیف های موجود در منابع معتبر قارچ شناسی و مقالات بر اساس خصوصیات پرگنه، شکل و تیپ کنیدیوفور و کنیدیوم، حضور یا عدم حضور اسپودوکیوم استفاده شد. جهت اسپورزایی گونه های قارچی و مشاهده خصوصیات پرگنه از محیط های کشت اختصاصی و شرایط رشدی مخصوص هر گونه استفاده گردید. شناسایی بر اساس کتاب ها، کلیدها و مقالات معتبر موجود انجام شد (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵).

واکاوی فیلوژنتیکی جدایه های بدست آمده از میوه های دارای علائم آلودگی

جدول ۱- قارچ های جدا شده از میوه خرما در سردخانه های سراوان

ردیف	نام بیمارگر	خسارت	محل جمع آوری	تعداد جدایه
۱	<i>Penicillium sp.</i>	لهیدگی و اضمحلال میوه و تولید توکسین های پاتولین و نورتوکسین	سراوان	۳۵
۲	<i>Penicillium digitatum</i>	لهیدگی و اضمحلال میوه	سراوان	۱۶
۳	<i>Alternaria alternata</i>	لهیدگی و اضمحلال میوه	سراوان	۵۰
۴	<i>Aspergillus niger</i>	لهیدگی و اضمحلال میوه	سراوان	۱۰
۵	<i>Alternaria atra</i>	لهیدگی و اضمحلال میوه	سراوان	۳

² Hyphal tip method

برای واکاوی فیلوژنتیکی جدایه‌های جنس *Alternaria* و *Aspergillus* از ناحیه ژنی ITS-rDNA استفاده شد. برای این منظور ابتدا DNA ژنومی استخراج شد. سپس ناحیه هدف براساس نوشته گایزر و همکاران تکثیر شد (۱۶). خالص‌سازی و توالی‌یابی محصولات به دست آمده توسط شرکت کدون ژنتیک تهران انجام گردید. همردیف‌سازی توالی‌ها با برنامه MUSCLE در نرم افزار (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, v 6.0) انجام شد (۱۷، ۱۸). روابط فیلوژنتیکی میان جدایه‌های بدست آمده همراه با توالی تعداد دیگری از جدایه‌های تیپ گرفته شده از مقالات معتبر به روش حداکثر صرفه‌جویی (Maximum Parsimony) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و تبارنمای مربوط به آنها رسم شد. اعتبار شاخه‌ها با انجام اعتبارسنجی (Bootstrap) در ۱۰۰۰ تکرار مورد سنجش قرار گرفت و ارزش بیشتر از ۹۰ روی درخت فیلوژنتیکی نشان داده شد.

نتایج و بحث

پس از بررسی سردخانه‌های شهرستان سراوان، برخی از بیماری‌ها و آفات مهم در این سردخانه‌ها ردیابی و پایش گردید که در جدول ۱ ذکر شده است. طی بررسی تعداد ۱۰ سردخانه در سطح شهرستان سراوان و حومه، تعداد ۱۰۰ نمونه یک کیلویی از این سردخانه‌ها جمع‌آوری گردید که پس از بررسی آزمایشگاهی به منظور پایش بیماری‌های سردخانه خرما، بیشترین تعداد جدایه قارچی بدست آمده متعلق به گونه *Alternaria alternata* (۵۰ جدایه) و کمترین متعلق به گونه *Alternaria atra* بود. با بررسی نمونه‌های جمع‌آوری شده از سردخانه‌های خرما بیشتر فراوانی را گونه *Alternaria alternata* در سردخانه‌های پایش شده دارد.

Alternaria alternata (Fr.) Keissl., Beih. bot. Zbl., Abt. 2 29: 434 (1912)

محل جمع‌آوری: سراوان در استان سیستان و بلوچستان.
زمان جمع‌آوری: تیرماه، مردادماه، شهریورماه، آبان‌ماه و آذرماه ۱۴۰۲.

مشخصات ریخت شناسی: پرگنه جدایه‌های این گونه روی محیط کشت PCA بعد از گذشت هفت روز در دمای ۲۲-۲۵ درجه سلسیوس و دوره‌ی نوری/ تاریکی به مدت ۱۶/۸ ساعت، به رنگ قهوه‌ای زیتونی تا قهوه‌ای تیره و دارای قطر رشدی برابر با ۷۰ میلی‌متر بود. رشد پرگنه این گونه بصورت حلقه‌های متحدالمرکز واضح بود. ریشه‌ها در سطح و داخل محیط کشت رشد کرده و به رنگ زرد روشن با بندهای عرضی روشن بودند. هاگ‌برهای اولیه اغلب از ریشه‌های موجود در سطح محیط کشت حاصل شده و به رنگ قهوه‌ای روشن، کوتاه تا متوسط، صاف و گاهی دارای خمیدگی‌های زانویی شکل و به ابعاد $3-4 \times 2-9$ میکرومتر بودند. هاگ‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای متمایل به طلایی، با بندهای عرضی تیره، به اشکال بیضوی تا بیضوی کشیده، تخم مرغی، چماقی شکل و در مواردی کروی بودند. سطح هاگ‌ها دارای تزییناتی بودند. هاگ‌ها به ابعاد $16-18 \times 14-50$ میکرومتر و دارای ۸-۱۰ بند عرضی، ۲-۰ بند طولی و ۲-۰ بند مورب بودند. هاگ‌برهای ثانویه در برخی از هاگ‌ها تشکیل شده و تا ۲۸ میکرومتر نیز طول داشتند.

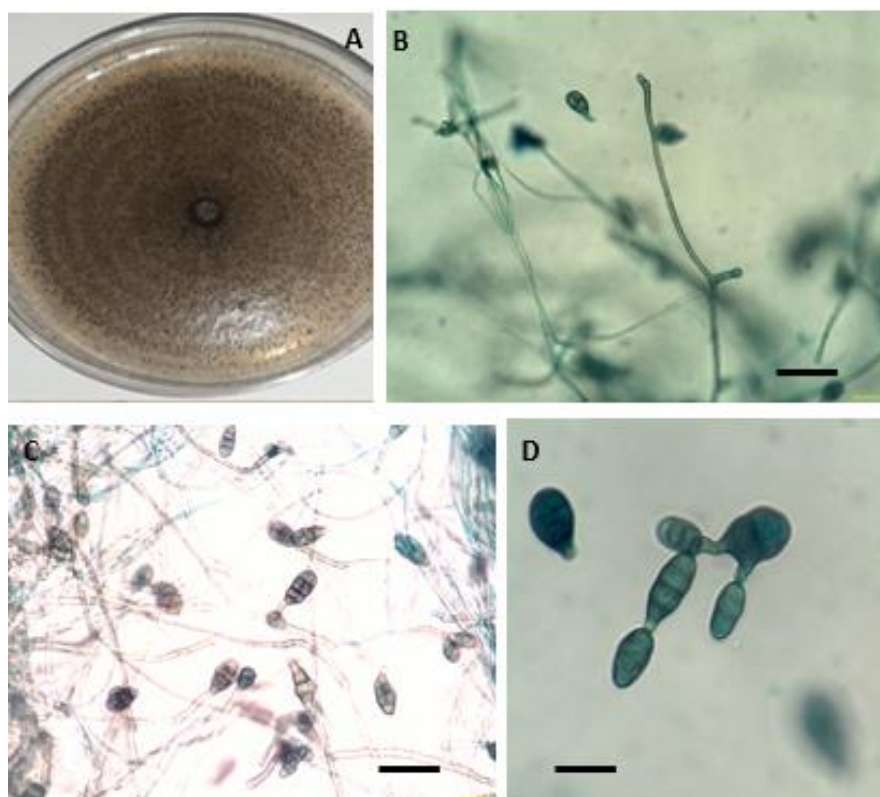
Alternaria atra (Preuss) Woudenh. & Crous, comb. nov. MycoBank MB803717.

محل جمع‌آوری: سراوان در استان سیستان و بلوچستان.
زمان جمع‌آوری: آبان‌ماه ۱۴۰۲.

مشخصات ریخت شناسی: پرگنه این گونه روی محیط کشت PCA بعد از گذشت هفت روز در دمای ۲۲-۲۵ درجه سلسیوس و دوره‌ی نوری/ تاریکی به مدت ۱۶/۸ ساعت به رنگ زیتونی تیره و به قطر ۶۰ میلی‌متر بودند. جدایه‌های این گونه هاگ‌زایی فراوان بوده و اغلب از ریشه‌های هوایی بصورت مجتمع صورت می‌گیرد (شکل ۱). ریشه‌های قارچ به رنگ قهوه‌ای روشن بودند. هاگ‌برها به رنگ روشن راست تا خمیدگی‌های زانویی شکل، کوتاه تا متوسط، با ۸-۰ بند عرضی و دارای ابعاد $20-65 \times 3-5$ میکرومتر بودند. در روی هریک از هاگ‌برها ممکن است ۸-۳ هاگ تشکیل شدند. تشکیل هاگ‌ها بصورت منفرد از هاگ‌بر اولیه اغلب

دارای تزئیناتی زگیل مانند در سطح خود بودند (شکل ۲). هاگ‌ها دارای ابعاد $13-25 \times 9-19$ میکرومتر و با ۴-۱ بند عرضی و نیز در مواردی دارای ۳-۱ بند طولی و ۲-۰ بند مورب بودند. این گونه در ایران از میزبان‌های مختلفی جداسازی و شناسایی شده است (۸).

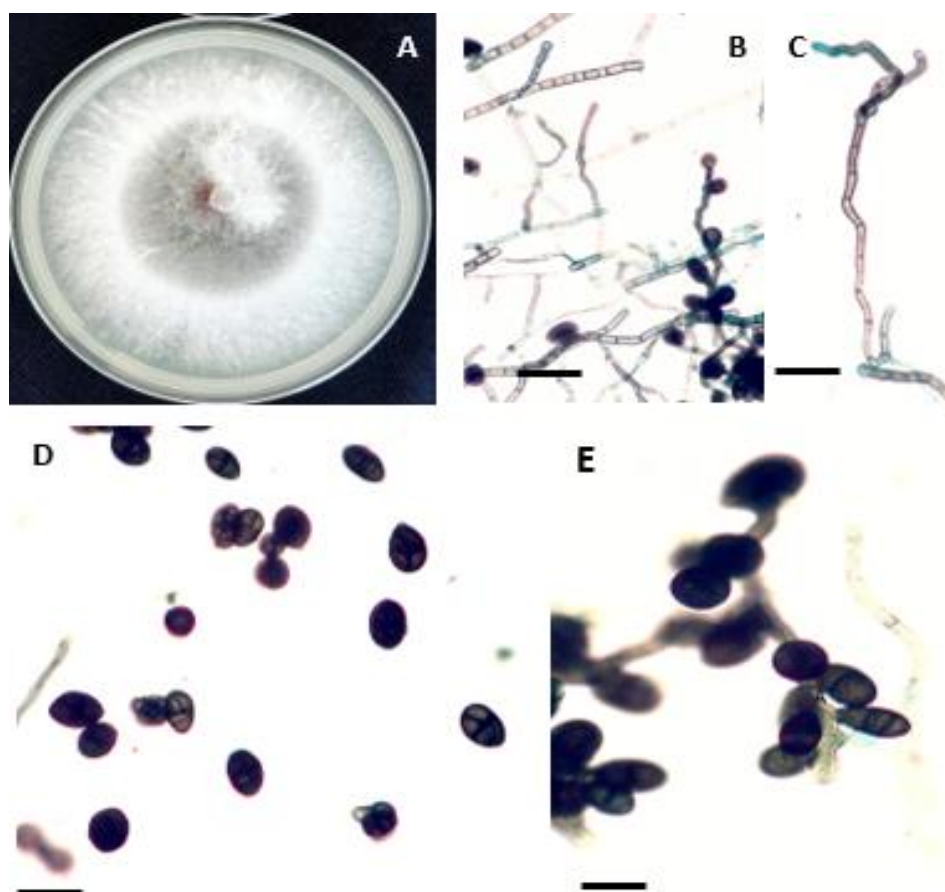
از ریشه‌های هوایی صورت می‌گیرد که در زیر بینوکولار بصورت مجتمع مشاهده شدند. هاگ‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره، اغلب به اشکال کروی تا تخم مرغی تا کروی کشیده و دارای بندهای عرضی صلیبی شکل بودند. در مواردی نیز هاگ‌ها کاملاً کشیده مشاهده می‌شدند. هاگ‌ها



شکل ۱- گونه *Alternaria alternata* (A) پرگنه، (B) کنیدیوفور، (C-D) کنیدیوم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

شناسایی ریخت‌شناختی گونه *Alternaria atra*، جدایه‌های Aa1 و Aa2 با استفاده از جفت آغازگرهای ITS4 و ITS5 تکثیر و ترادف‌یابی گردید. جستجوی بلاست ترادف‌های نوکلئوتیدی به دست آمده در بانک ژن NCBI، شباهت بالایی (۹۹ درصد) را با استرین ACC 18040 از گونه *Alternaria atra* نشان داد.

ناحیه rDNA-ITS هسته‌ای با استفاده از جفت آغازگرهای ITS4 و ITS5 تکثیر و ترادف‌یابی گردید (White et al. 1990). ترادف‌های به دست آمده تحت شماره به منظور ثبت در بانک ژن NCBI در حال اصلاح می‌باشد. جستجوی بلاست ترادف‌های نوکلئوتیدی به دست آمده در بانک ژن NCBI، شباهت بالایی (۱۰۰ درصد) را با گونه *Alternaria alternata* EG 34-016 نشان داد. برای تایید



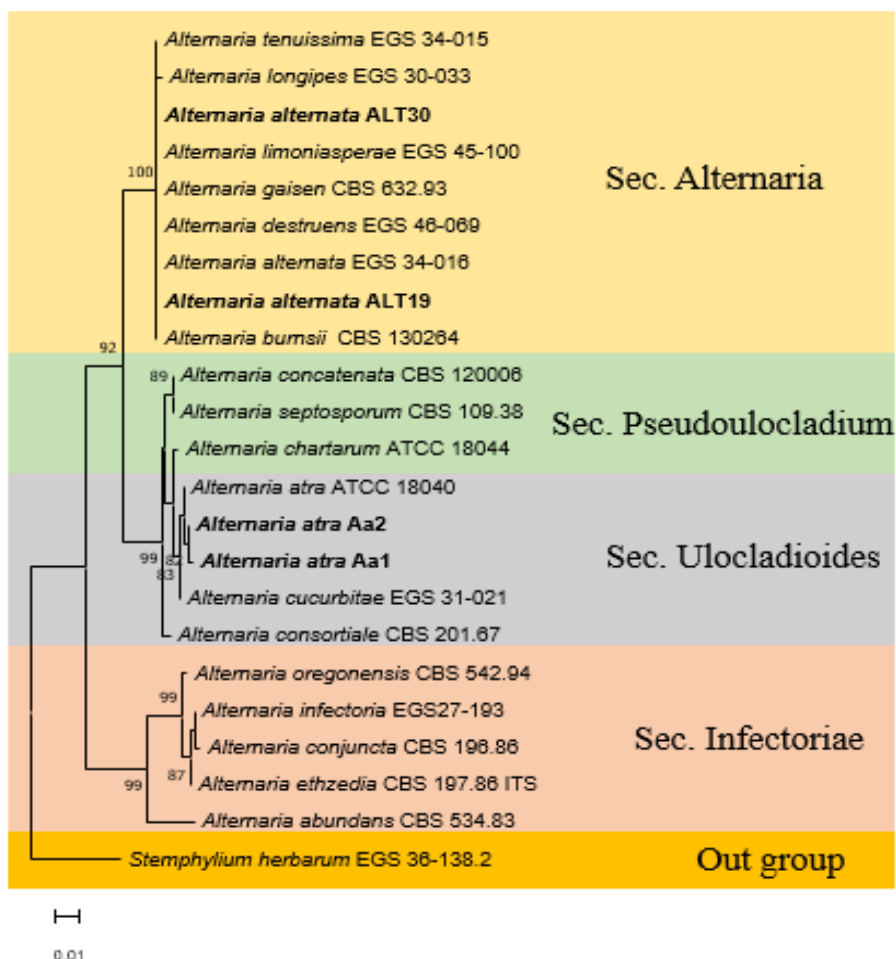
شکل ۲- *Alternaria atra* (A) پرگنه، (B-C) کنیدیوفورهای اولیه و (D-E) کنیدی‌های قارچ (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

ابتدایی انجام شده بر اساس صفات ریخت شناختی از قبیل الگوی کنیدیوم‌زایی (گروه‌های گونه‌ای) می‌باشد. نتایج این تجزیه تحلیل با نتایج سایر مطالعات تاکسونومی مولکولی انجام شده در زمینه تعیین بخش‌های درون جنس *Alternaria*، مطابق می‌باشد (۱۹). در نهایت با توجه به نتایج بررسی ریخت شناختی، جستجو در بلاست ترادف‌های نوکلئوتیدی و درخت فیلوژنی ترسیم شده (جدایه‌ها در بخش مربوط به خود قرار گرفتند) جدایه‌ها شناسایی شدند.

Aspergillus niger sensu auct. pro parte, pre 2007; fide Kirk (in litt.)

. محل جمع‌آوری: سراوان در استان سیستان و بلوچستان. زمان جمع‌آوری: بهمن ماه، ۱۴۰۱ و اردیبهشت ماه، خردادماه، شهریورماه و مهرماه ۱۴۰۲.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی ترادف‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA هسته‌ای با استفاده از روش Maximum Parsimony برای جدایه‌های جنس *Alternaria* نشان داد که اطلاعات بدست آمده از ترادف‌های این ناحیه ژنومی با مقادیر اعتبار سنجی بالایی قادر به تفکیک بخش‌های درون جنس *Alternaria* می‌باشد اما امکان تفکیک گونه‌های این جنس را ندارد. بر اساس تجزیه و تحلیل انجام شده، جدایه‌های مختلف مورد بررسی در این تحقیق از بالا به پایین در شجره فیلوژنتیکی به ترتیب در بخش‌های *Alternaria* با مقدار اعتبار سنجی ۱۰۰ درصد، *Ulocladioides* و *Pseudocladium* با مقدار اعتبار سنجی ۹۹ درصد و *Infectoriae* با اعتبار سنجی ۹۹ درصد در کنار سایر بخش‌ها قرار گرفتند (شکل ۳). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل‌های ترادف‌های نواحی ژنومی مذکور، تایید کننده گروه‌بندی‌های



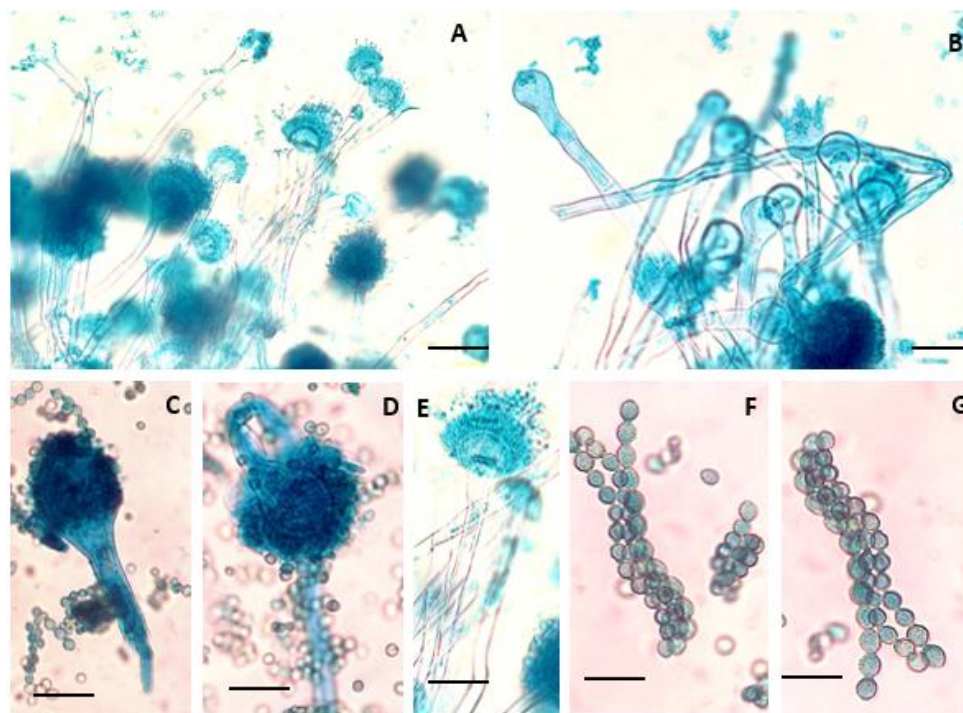
شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی استنباط شده از ناحیه ITS-rDNA هسته‌ای برای ۲۳ جدایه از جنس *Alternaria* با روش Maximum Parsimony. اعداد بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد.

هوایی بود. میسلیم‌های داخلی نزدیک به سطح و در سطح محیط کشت به صورت بسیار متراکم و سفت رشد کردند. اسپورزایی سریع و زیاد، کنیدیوفورها ایستاده و بی رنگ، سرهای کنیدیومی به رنگ قهوه‌ای تیره، کروی، متراکم، درشت و به تعداد فراوان در کل سطح پرگنه قارچ تشکیل می‌شدند که به هنگام بلوغ به صورت ستون‌های شعاعی در چندین جهت شکافته می‌شدند. قطرات ترش‌چی شفاف به تعداد زیاد در سطح کنیدیوفورها و سرهای کنیدیومی در زیر استریومیکروسکوپ دیده می‌شد (شکل ۴).

مشخصات ریخت شناسی: قطر رشدی پرگنه قارچ روی محیط کشت CYA بعد از گذشت ۷ روز در شرایط تاریکی و دمای ۹۷ درجه سلسیوس برابر ۷۱ میلی‌متر بود. پرگنه قارچ سریع‌الرشد بوده، به رنگ قهوه‌ای تیره مایل به سیاه، با بافت مخملی دانه‌ای درشت، پودری، خشک، صاف، مسطح؛ پرگنه از پشت به رنگ خاکستری مایل به سیاه، صاف و فاقد شیار است و به دلیل تولید رنگدانه زرد به ویژه روی یک نوار در حد فاصل بین مرکز و حاشیه پرگنه، متمایل به زرد دیده می‌شد. میسلیم‌ها بی‌رنگ، در داخل به‌ویژه نزدیک به سطح و در سطح محیط کشت رشد کرده و پرگنه فاقد میسلیم‌های

(۱۰۰ درصد) را با استرین CMV005H55 و CMV005415 از گونه *Aspergillus niger* نشان داد.

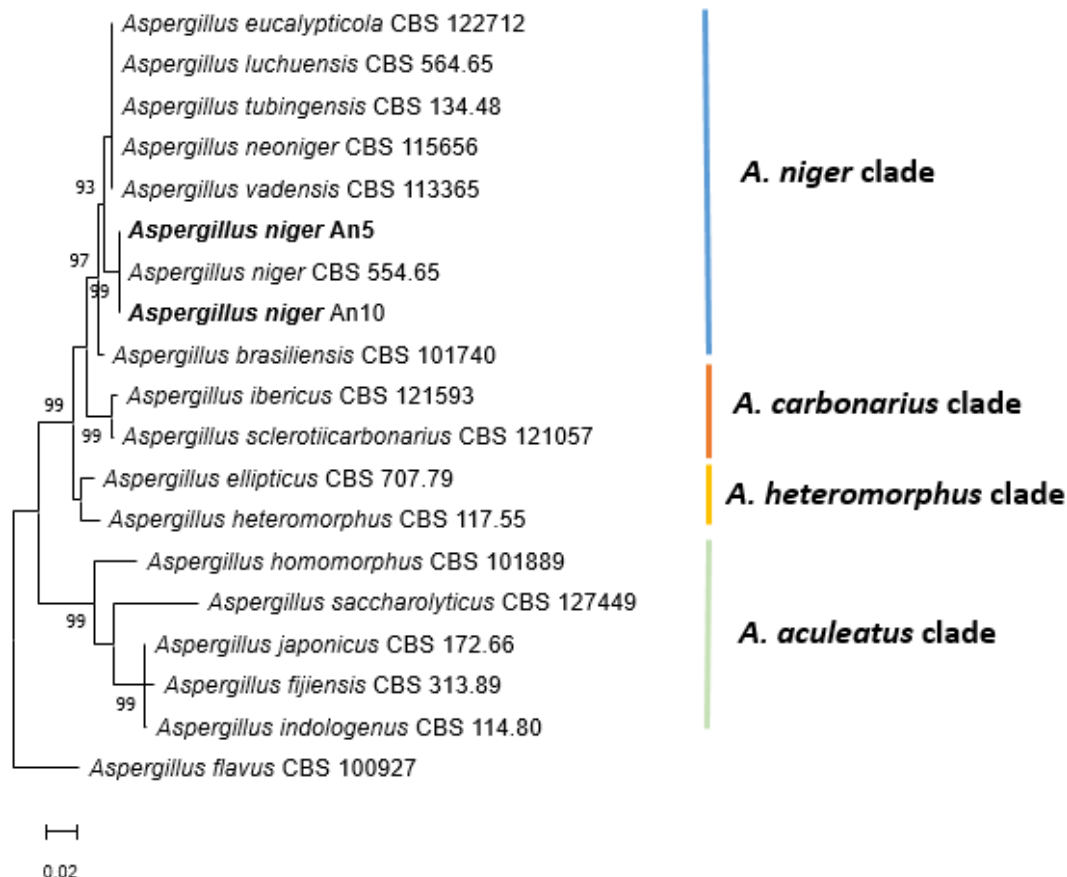
برای تایید شناسایی ریخت‌شناختی ناحیه rDNA-ITS با استفاده از جفت آغازگرهای ITS4 و ITS5 تکثیر و ترادف‌یابی گردید (۲۰). جستجوی بلاست ترادف‌های نوکلئوتیدی به دست آمده در بانک ژن NCBI، شباهت بالایی



شکل ۴- گونه *Aspergillus niger* (A-B) کنیدیوم‌ها، (C-D) وزیکل و فیالید، (E-G) کنیدیوم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

فیلوژنتیکی به ترتیب در گروه‌های *A. niger* با مقدار اعتبار سنجی ۹۷ درصد، گروه *A. carbonarius* و *A. heteromorphus* با مقدار اعتبار سنجی ۹۹ درصد و *A. aculeatus* با اعتبار سنجی ۹۹ درصد در کنار یکدیگر قرار گرفتند (شکل ۵). نتایج این تجزیه تحلیل با نتایج سایر مطالعات تاکسونومی مولکولی انجام شده در زمینه تعیین بخش‌های درون جنس *Aspergillus*، مطابق می‌باشد (۲۱).

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی ترادف‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA هسته‌ای با استفاده از روش Maximum Parsimony نشان می‌دهد که اطلاعات بدست آمده از ترادف‌های این ناحیه ژنومی با مقادیر اعتبار سنجی بالایی قادر به تفکیک گروه‌های درون جنس *Aspergillus* می‌باشد. بر اساس تجزیه و تحلیل انجام شده، جدایه‌های مختلف مورد بررسی در این تحقیق از بالا به پایین در شجره



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی استنباط شده از ناحیه ITS-rDNA هسته‌ای برای ۱۹ جدایه از جنس *Aspergillus* با روش Maximum Parsimony. اعداد بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد.

میسلیوم‌ها در داخل محیط کشت رشد کردند. ریشه‌ها نزدیک به سطح محیط کشت و یا در سطح محیط کشت و به میزان کمتری به صورت پراکنده در برخی نقاط پرگنه به صورت هوایی رشد کردند. ارتفاع پرگنه در بخش مرکزی بیشتر بوده و به سمت حاشیه از ارتفاع آن کاسته می‌شد. اسپورزایی سریع و به میزان بسیار زیاد در کل سطح پرگنه قارچ و در سطح ریشه‌های موجود در سطح محیط کشت و نیز به میزان کمتری در سطح ریشه‌های هوایی صورت گرفت (شکل ۶). قطرات ترش‌خی شفاف تا مایل به زرد در لا به لای کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها به ویژه در ابعاد بزرگتر در مرکز پرگنه دیده می‌شد. زنجیرهای کنیدیومی در ابتدای تشکیل

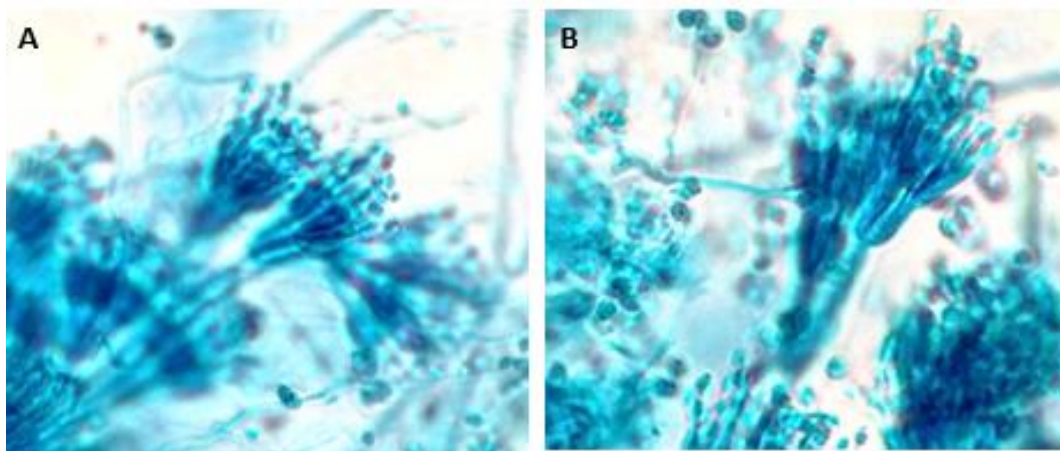
Penicillium sp.

محل جمع‌آوری: سراوان در استان سیستان و بلوچستان. زمان جمع‌آوری: تیرماه، خردادماه، شهریور ماه، مهرماه و آذرماه، ۱۴۰۲.

مشخصات ریخت شناسی: قطر رشدی پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA بعد از گذشت ۷ روز در شرایط تاریکی و دمای ۱۵ درجه ۱۸ میلی متر بود. پرگنه قارچ به رنگ سبز آبی مایل به خاکستری و در حاشیه سفید رنگ بود که به دلیل وجود میسلیوم‌های سفید رنگ و اسپورهای نابالغ بود. حاشیه پرگنه صاف و در قالب یک نوار باریک حاشیه ای،

دیواره‌های عرضی، با سطح زیر، در انتها منشعب، انشعابات اغلب متقارن، گاهی اوقات نامتقارن و اغلب به صورت Biverticillate و ندرتاً Treverticillate بود (شکل ۶).

کوتاه و منظم بوده و به تدریج بلندتر و نامنظم‌تر می‌شد. ریشه‌ها باریک، منشعب، دارای دیواره عرضی و بی رنگ بودند. کنیدیوفورها بی‌رنگ، راست، مستقیم، واجد



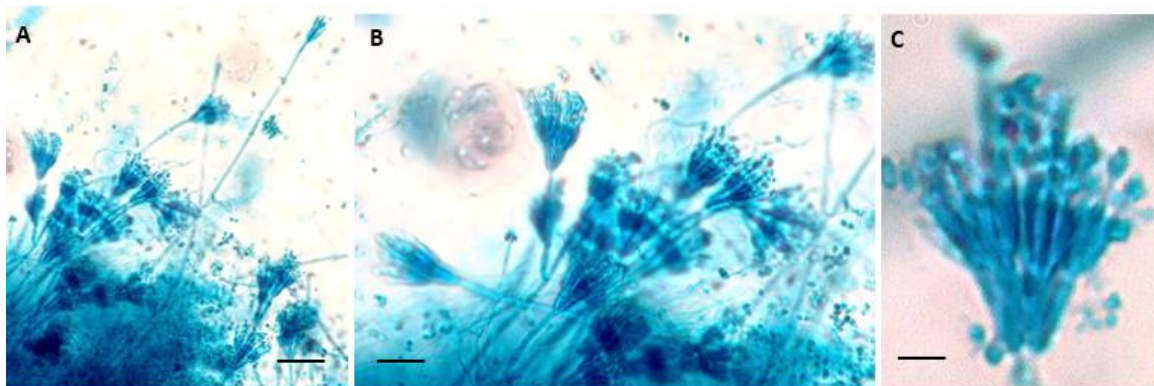
شکل ۶- کنیدیوفور و کنیدیوم گونه *Penicillium* sp. (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)

کشت و به میزان کمتری به صورت پراکنده در برخی نقاط پرگنه به صورت هوایی رشد کردند. ارتفاع پرگنه در بخش مرکزی بیشتر بوده و به سمت حاشیه از ارتفاع آن کاسته می‌شد. اسپور زایی سریع و به میزان بسیار زیاد در کل سطح پرگنه قارچ و در سطح ریشه‌های موجود در سطح محیط کشت و نیز به میزان کمتری در سطح ریشه‌های هوایی صورت گرفت. قطرات ترش‌خی شفاف تا مایل به زرد در لا به لای کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها به ویژه در ابعاد بزرگتر در مرکز پرگنه دیده می‌شد. زنجیرهای کنیدیومی در ابتدای تشکیل کوتاه و منظم بوده و به تدریج بلندتر و نامنظم‌تر می‌شد. ریشه‌ها باریک، منشعب، دارای دیواره عرضی و بی رنگ بودند. کنیدیوفورها بی رنگ، راست، مستقیم، واجد دیواره‌های عرضی، با سطح زیر، در انتها منشعب، انشعابات اغلب متقارن، گاهی اوقات نامتقارن و اغلب به صورت Biverticillate بودند (شکل ۷).

Penicillium digitatum (Pers.) Sacc., Fungi italica autogr. del. 17-28: tab. 894 (1881)

جدایه‌های بررسی شده: PD1، PD2، PD3، PD4، PD5، PD21، PD22، PD23، PD24، PD25، PD26، PD27، PD28، PD29، PD30، PD31. محل جمع‌آوری: سراوان در استان سیستان و بلوچستان. زمان جمع‌آوری: تیرماه، خردادماه، شهریور ماه، مهرماه و آذر ماه و دی ماه ۱۴۰۲.

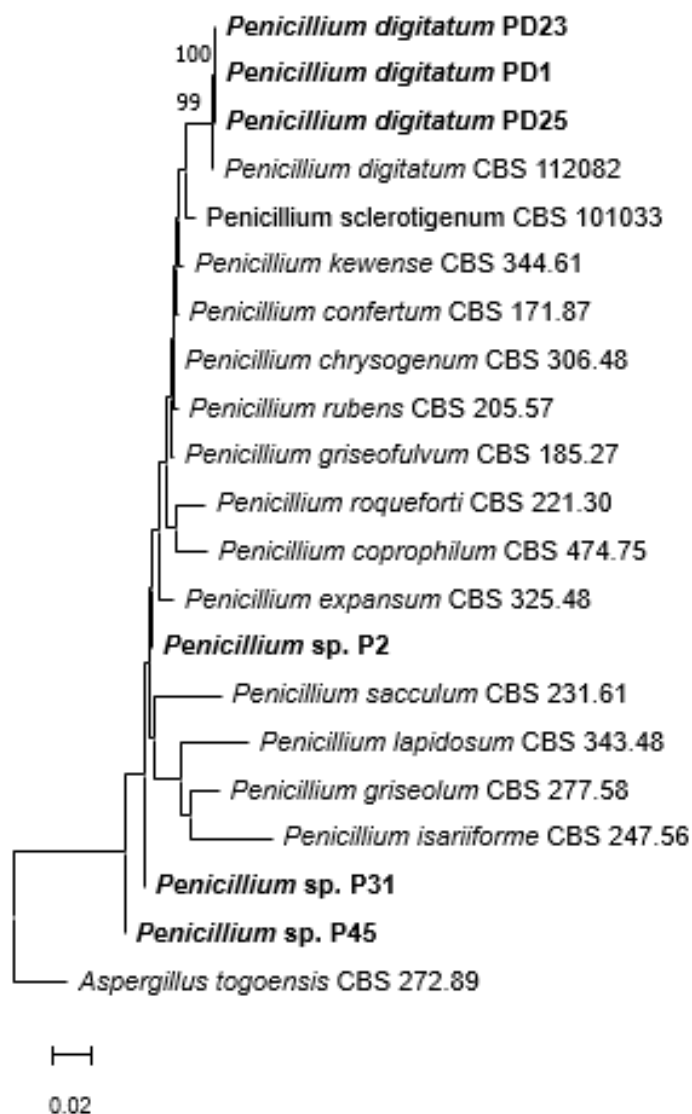
مشخصات ریخت شناسی: قطر رشدی پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA بعد از گذشت ۷ روز در شرایط تاریکی و دمای ۱۵ درجه سلسیوس ۲۰ میلی‌متر است. پرگنه قارچ به رنگ سبز آبی مایل به خاکستری و در حاشیه سفید رنگ است که به دلیل وجود میسلیم‌های سفید رنگ و اسپورهای نابالغ بود. حاشیه پرگنه صاف و در قالب یک نوار باریک حاشیه‌ای، میسلیم‌ها در داخل محیط کشت رشد می‌کنند. ریشه‌ها نزدیک به سطح محیط کشت و یا در سطح محیط



شکل ۷- گونه *Penicillium digitatum* (A-B)، کنیدیوفور، C)، فیالید و کنیدیوم (مقایس = ۱۰ میکرومتر)

درخت فیلوژنی رسم شده به روش Maximum parsimony
نیز جدایه‌های بدست آمده با جدایه تیپ (CBS 112082) در
یک گروه قرار گرفت. جدایه P2، P13 و P45 در هیچ گروهی
از *Penicillium* قرار نگرفت. به طور کلی ناحیه ژنی ITS-
rDNA قادر به تفکیک گونه‌های جنس *Penicillium* نمی‌باشد
(شکل ۸).

برای تایید شناسایی ریخت‌شناختی، جدایه‌های PD1، PD23، PD25، P2، P13 و P45 ناحیه rDNA-ITS با استفاده از جفت
آغازگرهای ITS4 و ITS5 تکثیر و ترادف‌یابی گردید (۲۰).
جستجوی بلاست ترادف‌های نوکلئوتیدی به دست آمده در
بانک ژن NCBI، شباهت بالایی (۹۹ درصد) را با استرین‌های
CBS 112082 از گونه *Penicillium digitatum* نشان داد. در



شکل ۸- درخت فیلوژنتیکی استنباط شده از ناحیه ITS-rDNA هسته‌ای برای ۲۲ جدایه از جنس *Penicillium* با روش Maximum Parsimony. اعداد بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

در این بررسی تعداد پنج گونه قارچی با اطلاعات ریخت‌شناختی و مولکولی شناسایی شد که متعلق به جنس‌های *Aspergillus*، *Penicillium* و *Alternaria* هستند. در بین جدایه‌های قارچی بدست آمده، گونه *Alternaria alternata* بیشترین فراوانی و گونه *Alternaria atra* کمترین فراوانی را داشتند که از سردخانه‌های قدیمی با انباشت خرما سال قبل بدست آمد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان و شرکت شهرک‌های صنعتی استان سیستان و بلوچستان (خوشه کسب و کار خرما) جهت تامین منابع مالی برای انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌شود. مقاله حاضر از نتایج پروژه تحقیقاتی به شماره مصوب "۳۴-۶۵-۱۰۶۷۷-۰۷۱-۱۶۰۳" بدست آمده است.

منابع

۱. آمارنامه کشاورزی ۱۴۰۳ (محصولات باغبانی). وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات.
2. El Hassni M, El Hadrami A, Daayf F, Chérif M, Ait Barka E, El Hadrami I. Biological control of bayoud disease in date palm: Selection of microorganisms inhibiting the causal agent and inducing defense reactions. *Environmental and Experimental Botany*. 2007 Mar 1;59(2):224-34.
3. Abass MH, Hameed MA, Alsadoon AH. Survey of fungal leaf spot diseases of date palm (*Phoenix dactylifera*.) In shaat-alarab orchards/basrah and evaluation of some fungicides. *Basrah Journal For Date Palm Research*. 2007;6
۴. نجفی مرغلکی سالاله، مرتضوی سیدمحمدحسن، معتمدی حسین. بررسی اثر ضد میکروبی ده اسانس گیاهی بر عوامل باکتریایی و مخمر ایجاد کننده فساد میوه خرما در مرحله رطب. *میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی* ۱۳۹۸؛ ۵(۱)- (۱۴)
5. Escott C, Del Fresno JM, Loira I, Morata A, Suárez-Lepe JA. *Zygosaccharomyces rouxii*: Control strategies and applications in food and winemaking. *Fermentation*. 2018 Aug 22;4(3):69.
6. Ebrahimi H, Mortazavi SM, Khorasani Ferdavani ME, Mehrabi Koushki M. The impact of two-sided ultraviolet radiation and long-term freezing on quality of date fruit at rutab stage. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2019 Oct;43(10):e14128.
7. Anjili S, Chimbekujwo FC. Fungi associated with post-harvest spoilage of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in Yola, Adamawa State. *International Journal of Research*. 2015 Nov 11;14.
8. Irshad Ahmed IA, Muhammad Abid MA, Faisal Hussain FH, Abbas SQ, Rao TA. Pathogenic fungi associated with date palm trees in Turbat, Balochistan.
9. Colman S, Spencer TH, Ghamba PE, Colman E. Isolation and identification of fungal species from dried date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits sold in Maiduguri metropolis. *African Journal of Biotechnology*. 2012;11(57):12063-
10. Hasnaoui A, ElHoumaizi MA, Asehraou A, Sindic M, Deroanne C, Hakkou A. Chemical composition and microbial quality of dates grown in Figuig oasis of Morocco.
11. Pordel A, Javan-Nikkhah M, Khodaparast SA. Revision of *Pyricularia oryzae* and occurrence of new hosts for the pathogen in Iran.
12. Crous PW, Braun U, Schubert K, Groenewald JZ. Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies in Mycology*. 2007 Jun 1;58(1):33-56.
13. Asgari B, Zare R, Zamanizadeh HR, Rezaee S. *Aspergillus osmophilus* sp. nov., and a new teleomorph for *A. proliferans*. *Mycoscience*. 2014;55(1):53-62.
14. Tavakol Noorabadi M, Babaeizad V, Zare R, Asgari B, Haidukowski M, Epifani F, Stea G, Moretti A, Logrieco AF, Susca A. Isolation, Molecular identification, and mycotoxin production of *Aspergillus* species isolated from the rhizosphere of sugarcane in the South of Iran. *Toxins*. 2020 Feb 14;12(2):122.
15. Ellis MB. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. Ellis MB (1976). *More Dematiaceous, Hyphomycetes*, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 1971.
16. Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in mycology*. 2007 Sep 1;59(1):1-0.

17. Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC bioinformatics. 2004 Aug 19;5(1):113.
18. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution. 2011 Oct 1;28(10):2731-9.
19. Woudenberg JH, Groenewald JZ, Binder M, Crous PW. *Alternaria* redefined. Studies in mycology. 2013 Jun 1;75(1):171-212.
20. White C, Del Fresno JM, Loira I, Morata A. Suárez-Lepe J.A. *Zygosaccharomyces rouxii*: Control Strategies and Applications in Food and Winemaking. Fermentation 1990. 4(3): 1-69.
21. Varga J, Juhász Á, Kevei F, Kozakiewicz Z. Molecular diversity of agriculturally
22. Important *Aspergillus* species. European Journal of Plant Pathology. 2004 Jun;110(5):627-40.