گزارش علمی کوتاه

اولین گزارش از زنگار حفره دم‌میوه سیب ناشی از قارچ مخمر مانند *Aureobasidium* sp. در ایران

احمد حیدریان*، محمدرضا نعمت‌اللهی و حسن الماسی[1]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۳)

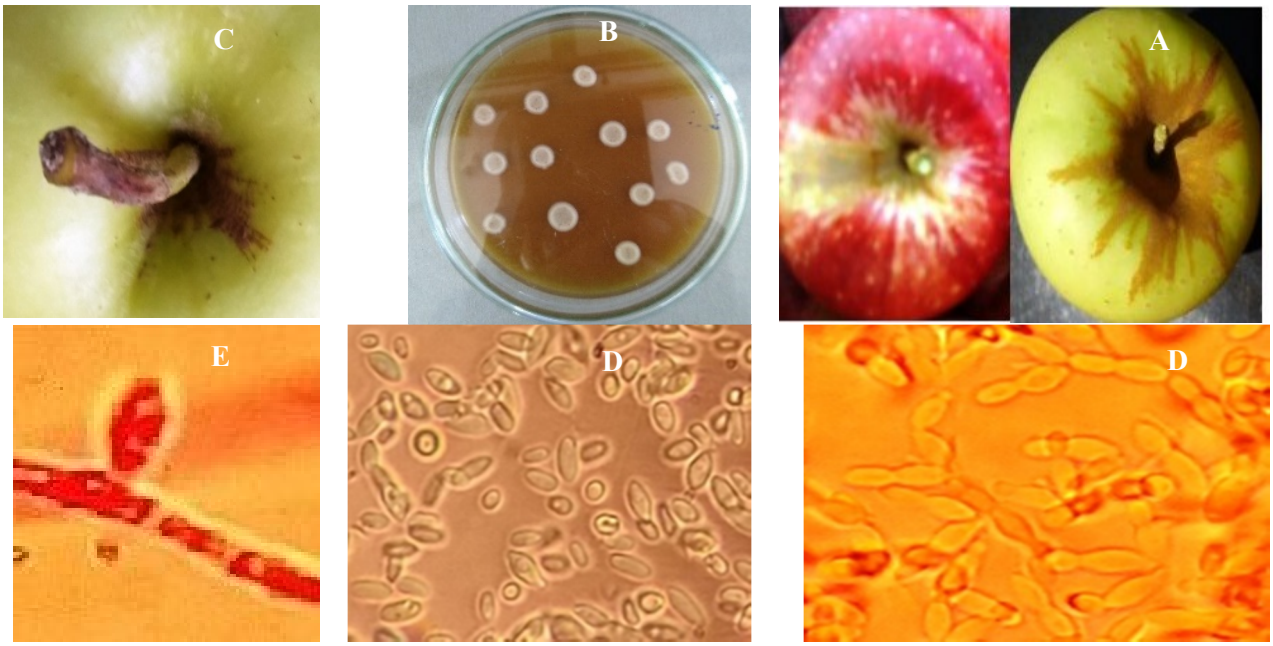
در سال‌های اخیر، عارضه زنگار حفره دم میوه در منطقه سمیرم استان اصفهان روی ارقام سیب گلدن دلیشز و رد دلیشز رو به گسترش است. در این عارضه، یک بافت کرکی قهوه‌ای رنگ در سلول‌های اپیدرمی حفره دم‌میوه سیب حدودا ۳۰ روز بعد از تمام‌گل و در زمان رشد سریع سلول‌های اپیدرمی در میوه‌های گلدن دلیشز و رد دلیشز شکل می‌گیرد و تا رشد کامل میوه ادامه پیدا می‌کند (شکل 1-A). زنگار میوه در واقع تشکیل بافت چوپ‌پنبه‌ای در سطح میوه است که سبب کاهش بازارپسندی میوه می‌شود (Gildemacher *et al.*, 2006). قارچ‌های مخمرمانند *Aureobasidium pullulans* و *Rhodotorula glutinis* و برخی مخمرهای ناشناخته به‌عنوان میکروارگانیزم‌های مولد زنگار روی میوه‌های سیب و گلابی ذکر شده‌اند (Xenopopoulos & Millar 1977; Matteson Heidenreich, 1997; Goffinet, *et al.* 2002).

در راستای تعیین علت این عارضه، از سه منطقه کشت عمده شهرستان سمیرم با اقلیم‌های تقریبا متفاوت، ۳۰ نمونه دارای علائم در طول فصل رویش به آزمایشگاه منتقل شد. برای جداسازی و تهیه تک کلن از روش گیلدرماچر و همکاران (Gildemacher *et al.* 2004) با تغییراتی به‌شرح زیر استفاده شد.

قسمت‌های آلوده میوه به‌مدت ۱۰ دقیقه زیر فشار آب معمولی قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها با آب مقطر استریل، شستشو و در داخل هود استریل قرار گرفتند تا کاملا خشک شوند. از حاشیه‌های آلوده با اسکالپل استریل، برش‌های نازکی از پوست همراه با کمی گوشت میوه برداشته شد و در داخل ارلن‌های محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی ۳٪ گلوکز قرار داده شدند و به‌مدت ۳۶-۲۴ ساعت داخل دستگاه شیکر قرار گرفتند. سپس یک سی‌سی از آخرین رقت سوسپانسیون آماده با نه میلی‌لیتر آب مقطر استریل سه مرتبه رقیق شد. یک میلی‌لیتر از آخرین سوسپانسیون را روی محیط غذایی عصاره‌مخمر + آگار + پپتون + پنی‌سیلین + گلوکز ریخته و در دمای ۲۳°C به مدت ۷۲-۴۸ ساعت قرار داده شد تا تک‌کلن‌های قارچ رشد نمودند. هیچ اختلافی بین جدایه‌ها از نظر رنگ روی محیط غذایی مشاهده نشد. همگی کرمی‌رنگ متمایل به سفید و حالت مخمری داشتند (شکل 1-B).

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ahmadheidarian@yahoo.com

۱. به ترتیب مربی پژوهش، استادیار پژوهش و کارشناس بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران.



شکل ۱. زنگار حفره دم‌میوه سیب روی ارقام سیب گلدن دلیشز و رد دلیشز (A)؛ کلنی *Aureobasidium pullulans* (B)؛ اثبات بیماری‌زایی *Aureobasidium pullulans* (C)؛ کنیدیوم‌ها (400X) (D)؛ – کنیدیوم‌زایی و کنیدیوم (400X) (E)

Fig. 1. Stem-end russeting on red delicious and golden delicious cultivars (A); *Aureobasidium pullulans* colony (B); Pathogenicity of *Aureobasidium pullulans* (C); Conidia (400 X) (D); Conidiogenous cell and conidium (400X) (E)

برای اثبات بیماری‌زایی، سوسپانسیون کنیدیوم در آب مقطر استریل با غلظت تقریبی 10^{10} اسپور در میلی‌لیتر از کلنی‌های حاصل از تک اسپور تهیه شد و یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون فوق در محل حفره دم‌میوه‌های (قطر سه سانتی‌متر) دارای خراش و بدون خراش (از هر گروه چهار میوه) ریخته شد. در حفره چهار دم‌میوه نیز آب مقطر بدون اسپور ریخته شد و در چهار حفره دم‌میوه نیز هیچ محلولی ریخته نشد. میوه‌ها در محیط مرطوب به مدت ۴۰ روز قرار گرفتند. همه میوه‌هایی که با سوسپانسیون اسپور مایه‌زنی شده بودند، علائم مشابه شرایط باغ را نشان دادند (شکل 1-C) درصورتی‌که سایر میوه‌ها هیچ علائمی نشان ندادند. جدایه‌های قارچی از میوه‌های آلوده جداسازی شدند.

برای تشخیص میکروسکوپی با چسب نواری شیشه‌ای یک لایه نازک از سطح دارای علایم میوه برداشته و روی اسلاید دارای اسید فوشین چسبانده شد. سپس ساختار و الگوی انشعاب ریسه‌ها و اندازه کنیدیوم‌ها با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ مورد بررسی قرارگرفت. ریسه‌ها شفاف، دارای دیواره عرضی و ۱۰–۲ میکرومتر ضخامت داشتند. کنیدیوم‌های تک‌سلولی شفاف، صاف، بیضوی و در اندازه متنوع بودند. اندازه آن‌ها در محدوده ۶–۴/۳ × ۱۴–۷/۸ میکرومتر، مشابه محدوده گزارش شده توسط زالار و همکاران (Zalar *et al.*, 2008) بود. کنیدیوم‌های دوسلولی شفاف تا قهوه‌ای تیره بودند و اندازه آن‌ها ۱۰–۶ × ۲۴–۱۵ میکرومتر متغیر بود. براساس مقایسه مشخصات ریخت‌شناختی کلنی، ریسه‌ها و کنیدی‌ها با اطلاعات موجود در منابع (Matteson Heidenreich, 1997; Goffinet, *et al.* 2002; Zalar *et al.*, 2008) عامل عارضه زنگار حفره دم‌میوه روی ارقام گلدن دلیشز و رد دلیشز احتمالا قارچ مخمرمانند، گونه *Aureobasidium pullulans* (De Bary) G. Arnaud است (شکل‌های 1-D-E).

کلیدواژه‌ها: زنگار، قارچ مخمرمانند، دلیشز، حفره دم‌میوه

First report of stem-end russeting in apple fruits caused by the yeast-like fungus of *Aureobasidium* sp. in Iran

A. Heidarian, M.R. Nematollahi, and H. Almasi[1*]

(Received: 24.12.2019; Accepted: 2.2.2020)

Stem-end russeting has recently been widespread on golden delicious and red delicious apple fruits in Semirom, Isfahan province, Iran. In this disorder, a tan colored, corky tissue is appeared on the skin of the fruit surface in the stem-end cavity, approximately 30 days after full blooming stage simultaneously with the rapid growth of epidermal cells in fruits and continued until the fruits are fully grown (Fig. 1-A).

In fact, fruit russeting is the formation of crock cells on the fruit surface (Meador & Taylor, 1987), reducing fresh-market value of the fruits (Gildemacher *et al.*, 2006). Yeast-like fungi of *Aureobasidium pullulans* and *Rhodotorula glutinis* and some unknown yeasts are listed as russet-producing microorganisms on apple and pear fruits (Xenopopoulos & Millar, 1977; Matteson Heidenreich, 1997; Goffinet, *et al.*, 2002).

To determine the cause of the disorder, 30 samples having similar symptoms, from three major cultivation areas of Semirom with approximately different climates, were taken to the laboratory during the growing season. Isolation and preparation of single clones was conducted using a method described by Gildemacher *et al.* (2004) with some modifications as follows.

The infected parts of the fruit were initially rinsed for 10 minutes under tap water. The samples were then rinsed with sterile distilled water and kept under laminar hood to dry completely. Thin slices of skin with a little bit of fruit flesh were removed from the infected margins with a sterile scalpel, and placed into a Erlenmeyer flask containing 100 ml sterile distilled water and 3% glucose for 24-36 hours on the shaker. One ml of the prepared suspension was serially diluted three times with nine ml of sterile distilled water. To obtain single clones, one ml of the last dilution was poured onto yeast extract + agar + peptone + penicillin + glucose medium and incubated at 23 °C for 48-72 hours. No color difference was observed between colonies on the medium. All were creamy white and yeast like (Fig. 1-B).

For pathogenicity test, conidial suspensions were initially prepared in sterile distilled water at approximate concentration of 10^{10} spores/ml using the single-spore colonies of each isolate. One ml of the each suspension was poured onto stem-end cavity of the scraped and non-scraped fruits (three cm in diameter). Untreated non-inoculated fruits and the fruits treated only with sterile distilled water were served as controls. Fruits were kept in humid environment for 40 days. All fruits inoculated with spore suspensions showed symptoms similar to those observed in orchard (Fig. 1-C), whereas, in other fruits no symptoms were observed. The fungal isolates were recovered from infected fruits.

For microscopic identification, a thin layer of skin having symptom was removed using adhesive tape and adhered onto a slide containing fushin acid. Structure and pattern of hyphae bifurcations and conidia size were examined at 400X magnifications. The hyphae were transparent, with transverse walls and 2–10 µm thick. The single-celled conidia were transparent, smooth, and elliptical and varied in shape and size. Their size was 4.3-6 × 7.8-14 µm, similar to Zalar *et al.* (2008). The two-celled conidia were translucent to dark brown and their size was 6-10 × 15-24 µm. Xenopopoulos & Millar (1977) found that the fungus could produce pycnidium on the needles sterile of oak. In the present study, all the colonies were produced pycnidia onto yeast extract + agar + peptone + penicillin + glucose medium, after 30 days in the refrigerator having 6°C. Based on morphological characteristics of colonies, hyphae and conidia with literatures

* Corresponding author's email: ahmadheidarian@yahoo.com
1. Plant Protection Research Department, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Isfahan, Iran.

(Matteson Heidenreich, 1997; Goffinet,, *et al*., 2002; Zalar, *et al*., 2008), the yeast-like fungus of, *Aureobasidium pullulans* (De Bary) G. Arnaud (Fig. 1-D-E-F), was determined as the likely causative agent of the stem-end russeting on golden delicious and red delicious fruits.

Keywords: russeting, yeast-like fungus, delicious, stem-end.

منابع

Gildemacher P. R., Heijne B., Houbraken J., Vromans T., Hoekstra E. S. and Boekhout T. 2004. Can phyllosphere yeasts explain the effect of scab fungicides on russeting of Elstar apples? European Journal of Plant Pathology 110: 929–937.

Gildemacher P., Heijne B., Silvestri M., Houbraken J., Hoekstra E., Theelen B. and Boekhout T. 2006. Interactions between yeasts, fungicides and apple fruit russeting. FEMS Yeast Research 6:1149–1156.

Goffinet M. C., Burr T. J. and Heidenreich M. C. 2002. Anatomy of apple russet caused by the fungus *Aureobasidium pullulans*. New York Fruit Quarterly 10(3): 3-6.

Matteson Heidenreich M. C., Corral-Garcia M. R., Momol E. A., and Burr T. J. 1997. Russet of apple fruit caused by *Aureobasidium pullulans* and *Rhodotorula glutinis*. Plant Disease 81(4): 337-342.

Xenopopoulos S. and Millar C. 1977. Pycnidium prodution by *Aureobasidium pullulans* type-cultures. Transactions of the British Mycological Society 68(1): 127-130.

Zalar P., Gostinčar C., Hoog G. S. de, Uršič V., Sudhadham M. and Gunde-Cimerman M. 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. Studies in Mycology 61: 21–38.