مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۲، شماره ۲، سال ۱۳۸۰ (۳۵۴-۳۴۵)

بیماری زالی یا سفید شدن گیاهچه‌های مرکبات (Albinism)

سید مهدی بنی هاشمیان [۱]، سید جواد زاد [۲]، قربانعلی حجا رود [۳]، سید محمود اخوت [۴] و غلامحسین مصاحبی [۵]

۱ الی ۵- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادان و استادیار گروه گیاهپزشکی

دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۹/۲۳

خلاصه

سفید شدن گیاهچه یا آلبینیسم یکی از بیماری‌های مرکبات در مراحل اولیه جوانه‌زنی بذر و تشکیل گیاهچه است که کم و بیش در بسترهای کشت وجود دارد. گیاهانی که به طور کامل سفید شده و تماماً کلروفیل خود رااز دست می‌دهند، از بین می‌روند. بررسی علل ایجاد این عارضه سال‌ها توجه پژوهشگران را به خود معطوف داشته است. در تحقیقات اولیه برخی از گونه‌های آسپرژیلوس را در این باره دخیل می‌دانستند اما مطالعات بعدی نقش قارچ *Alternaria alternata* و متابولیت‌های حاصله از آن را که مانع سنتز کلروفیل می‌شود، در ایجاد آلبینیسم روشن ساخت. این قارچ به عنوان یک ساپروفیت یا پارازیت ضعیف مطرح است و آلودگی بذرها به این قارچ اغلب به طور سطحی است و قارچ در پوسته بذر مستقر می‌گردد. به منظور بررسی تأثیر قارچ‌های سطحی بذر روی گیاهچه، بذور چهار پایه مهم مرکبات یعنی نارنج، پونسیروس، ترویر سیترنج و سوییتگل سیترومِلو با استفاده از روش‌های متداول در بیماری شناسی بذر، شامل استفاده از کاغذ صافی مرطوب، استفاده از محیط غذائی آگاردار و کشت بذر در ماسه مرطوب، مورد بررسی قرار گرفت و قارچهای آلوده کننده جداسازی و شناسایی گردید. آزمایش بیماریزایی روی گیاهچه‌های پونسیروس با روش تلقیح بذر در مورد گونه‌های *Alternaria alternata* و *Aspergillus* spp. انجام شد و نقش *A.alternata* در ایجاد آلبینیسم محرز گردید اما *Aspergillus* spp. با روش و شرایط این ازمایش ایجاد بیماری ننمود.

واژه‌های کلیدی: آلبینیسم، گیاهچه‌های مرکبات، *Alternaria alternata* و *Aspergillus* spp.

مقدمه

سفید شدن گیاهچه مرکبات یا آلبینیسم مسأله‌ای مقطعی در بسترهای کشت بذر می‌باشد. به طور معمول تنها در تعداد کمی از گیاهچه‌ها، همه یا بخش‌هایی از محور روی لپه، لپه‌ها و برگ‌های اولیه کلروفیل خود از دست می‌دهند (شکل ۱)، با این وجود در برخی از توده‌های بذری بیش از ۵۰ درصد گیاهچه‌های حاصله ممکن است سفید شوند (۲ و ۱۶). گیاهچه‌هایی که به طور کامل سفید می‌شوند از بین می‌روند، اما گیاهچه‌های ابلق ممکن است ترمیم یافته و تولید گیاهان طبیعی نمایند (۷ و ۱۶).

بررسی عامل آلبینیسم مدت‌ها توجه پژوهشگران را به خود معطوف داشت. در مطالعات اولیه به ژنتیکی بودن آن مشکوک

مکاتبه کننده: سید مهدی بنی هاشمیان

بودند، اما شواهد و تحقیقات بعدی نشان داد که این حالت در اثر دخالت قارچها به وجود می‌آید و ضد عفونی سطحی بذرهای مرکبات با برخی از ضدعفونی‌کننده‌ها و قارچ کش‌ها از وقوع آن جلوگیری می‌نماید (۷). تجر و کمرون (۱۵) نقش پوسته بذر را در بروز این نارسایی نشان دادند و اظهار داشتند که کاشتن بذرهای بدون پوست، منجر به تولید گیاهچه‌های سفید نمی‌گردد. دخالت قارچ آسپرژیلوس[1] به عنوان عامل عارضه مشابه‌ای در ذرت، به اثبات رسیده است. این یافته، دوربین (۴) را واداشت تا اثر *A.flavus* (جدا شده از گیاهچه‌های سفید ذرت) را روی بذرهای مرکبات مطالعه نماید. مشخص گردید که قارچ مزبور به صورت ساپروفیت روی پوسته بذر مرکبات رشد می‌کند و می‌تواند عامل آلبینیسم باشد.

ریان و همکاران(۱۲) دریافتند که آلبینیسم در مرکبات، با مایه‌کوبی بذر با برخی از جدایه‌های *Alternaria tenuis* Nees (Syn. *A. alternata* (Fries) Keissler) یا در معرض قرار دادن بذر جوانه زده با عصاره این قارچ ایجاد می‌شود و تأثیر روی سنتز کلروفیل را به مواد فعال موجود در عصاره قارچ نسبت دادند. این بررسی نشان داد که قارچ آلترناریا روی پوسته بذر تولید متابولیتی می‌نماید که وقتی گیاهچه‌ها ظاهر شدند، بیوسنتز کلروفیل را در آنها مهار می‌نماید. بارمور و همکاران(۲) نیز همین قارچ را از پوسته بذر گیاهچه‌های بیمار جدا نمودند. آنها نشان دادند که مایه‌زنی سطحی بذرهای تازه استخراج شده با این قارچ، منجر به تولید گیاهان سفید می‌گردد. وایتساید و همکاران(۱۶) اشاره دارند که قارچ *A.tenuis* از آنجا که همواره از نمونه‌های بذری که میزان زیادی گیاهچه سفید تولید می‌کنند، جدا شده و با مایه‌زنی آن به بذر، دوباره علائم ایجاد می‌گردد، به احتمال زیاد، رایج‌ترین عامل آلبینیسم است.این تحقیق به دلیل وجود این عارضه در خزانه‌های تکثیری مرکبات و در راستای بررسی عوامل قارچی مرتبط با بذر مرکبات صورت گرفته است.

مواد و روشها

۱-جمع‌آوری نمونه: بذر چهار پایه مهم مرکبات شامل نارنج[2]، پونسیروس[3]، ترویر سیترنج[4]، و سوئینگل سیترومیلو[5] برای این مطالعه انتخاب شد. تعدادی از نمونه‌های بذر از مؤسسه تحقیقات مرکبات (رامسر) تامین گردید و بقیه بذور مستقیماً از میوه استخراج شد.

۲- تعیین درصد جوانه‌زنی بذر و آلبینیسم: برای تعیین درصد جوانه‌زنی بذر از روش کشت در ماسه استریل[6] استفاده شد و درصد وقوع بیماری آلبینیسم در گیاهچه‌های حاصله از بذرهای مورد بررسی نیز از این روش ارزیابی گردید (جدول۱).

۳- روش‌های بررسی آلودگی بذور: به منظور جداسازی قارچهای موجود در سطح بذر یا همراه با توده بذری از روشهای زیر استفاده گردید:

۱-۳- روش استفاده از کاغذ صافی مرطوب[7]: در این روش در ظرف پتری به قطر ۹ سانتی‌متر دو لایه کاغذ صافی قرار داده شد و ۴-۳ سانتی‌متر مکعب آب مقطر به آنها اضافه گردید. سپس این ظروف در اتوکلاو تحت دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند. در هر تشتک پتری در شرایط استریل اتاقک کشت ۵ بذر با فواصل یکسان از همدیگر، روی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شد. برای هر رقم ۲۰ ظرف پتری به این ترتیب در نظر گرفته شد و این ظروف به انکوباتور با دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و نور متناوب ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی منتقل شدند. در طول انجام آزمایش رطوبت درون ظرف پتری با آب مقطر حفظ گردید و با بازدید مرتب تشتک‌ها، قارچهای رشد کرده در سطح بذور بررسی و در صورت لزوم خالص شدند.

۲-۳- روش استفاده از محیط غذایی آگاردار: صد بذر از هر رقم (۵ بذر در هر تشتک پتری) انتخاب و سپس ضدعفونی با محلول هیپوکلریت سدیم (۰/۵ درصد کلر فعال) به مدت ۵ دقیقه انجام شد و رطوبت اضافی آنها با قرار دادن روی کاغذ صافی سترون در شرایط اتاقک کشت ضد عفونی شده حذف گردید. ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین برای جلوگیری از آلودگی باکتریائی به محیط کشت Potato Dextrose Agar (به میزان ۳۹ گرم در لیتر از

1. *Aspergillus*
2 *Citrus aurantium* L.
3 . *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.
4 . *C. sinensis* (L.) Osbeck. XP. *trifoliata* (L.) Raf.
5 . *C. paradisi* Macf. X *P . trifoliata* (L.) Raf.
6 . Hiltner Test
7 . Blotter Test

پرگنه قارچ *A.alternata* روی محیط PAD به رنگ زیتونی و یا زیتونی مایل به خاکستری بوده، کنیدیوفورها ساده و پودر تجاری PDA ساخت کارخانه Merck) پیش از ریختن محیط به درون تشتک پتری اضافه، و سپس بذور روی محیط قرار داده شدند.به همین صورت صد بذر بدون ضد عفونی سطحی در ۲۰ ظرف پتری دیگر روی سطح محیط کشت قرار داده شد. همهاین ظروف تحت شرایط مشابه روش قبل در انکوباتور نگهداری شدند و به موازات رشد پرگنه‌های مختلف هر نمونه قارچ جداسازی و در صورت لزوم خالص‌سازی و نگهداری شد.

۳-۳- روش کشت بذر در ماسه مرطوب:[۱] از این روش برای ارزیابی بیماری آلبینیسم و تعیین درصد جوانه‌زنی بذر استفاده گردید. به این منظور در اسفند ماه سال ۱۳۷۶ ماسه شسته شده پس از سترون با اتوکلاو خاک در جعبه‌های چوبی به ابعاد ۴۳×۳۲×۹ سانتی‌متر که با الکل ۹۶ درجه ضدعفونی شده بودند، ریخته شد. از نارنج و پونسیروس ۲۰۰ بذر و از سیترنج و سیترومیلو ۱۰۰ بذر در این جعبه‌ها با فواصل ۳×۴ و عمق ۳-۲ سانتی‌متر، به دو صورت، بدون ضد عفونی و ضدعفونی شده با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد کلر فعال به مدت ۵ دقیقه در شرایط گلخانه کشت شد (جدول ۱). در طول دوره بررسی جعبه‌ها به طور مرتب آبیاری شده و سطح ماسه در آنها مرطوب نگه داشته شد. بررسی نهایی گیاهچه‌های جعبه‌ها در تیرماه سال ۱۳۷۷ انجام گرفت.

۴- بررسی بیماریزایی قارچ‌ها: به منظور مطالعه اثر قارچ آلترناریا در ایجاد بیماری آلبینیسم، ۱۸ جدایه از آن (۵ ایزوله جدا شده از بذر و ۳ ایزوله جدا شده از پوسته لپه گیاهچه‌های سفید) پس از خالص نمودن با روش تک اسپوری، از طریق تلقیح بذر بررسی شدند. به این منظور برای هر جدایه ۳۰ بذر پونسیروس تازه استخراج شده پس از ضد عفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک درصد کلر فعال به مدت ۲۰ دقیقه و شست و شو با آب مقطر سترون در سوسپانسیون اسپور قارچ‌های مزبور با غلظت $۲/۵x ۱۰^{۴}$ اسپور در میلی‌لیتر به مدت ۲۴ ساعت غوطه‌ور شد. در تیمار شاهد به جای سوسپانسیون اسپور از آب مقطر سترون استفاده گردید. پس از این مدت، در اتاقک کشت بذرها روی کاغذ صافی سترون قرار داده شد و پس از جذب آب سطحی، روی کاغذ صافی مرطوب درون پتری‌ها .(مطابق روش کشت بذر روی کاغذ صافی مرطوب) منتقل و در همان شرایط نگهداری شد. بعد از تندش بذرهای تلقیح شده، در گلدان‌های کوچک حاوی ماسه سترون، تعداد پنج بذر جوانه‌زده کشت گردید و در شرایط گلخانه نگهداری شد. به این ترتیب برای هر جدایه ۵-۳ گلدان در نظر گرفته شد و آبیاری گلدان‌ها نیز به طور منظم انجام گرفت. دو هفته پس از ظهور گیاهچه‌ها، درصد گیاهان سالم و سفیدتعیین گردید (جدول۳). برای جداسازی دوباره عامل بیماری، صد قطعه کوچک از پوسته بذر و ابتدای محور روی لپه گیاهچه‌های سفید شده پس از ضد عفونی (با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد کلر فعال به مدت ۵ دقیقه) روی محیط PDA کشت گردید.

برای مطالعه تأثیر قارچ آسپرژیلوس روی گیاهچه‌های مرکبات و ایجاد آلبینیسم، ۸ جدایه از این قارچ (جدا شده از بذر)، با روش مایه‌زنی بذر پونسیروس تازه استخراج شده، مشابه روشی که در مورد قارچ آلترناریا ذکر شد، مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۴).

نتایج

جدول ۱ و نمودارهای ۱ و ۲ نتایج بررسی کشت بذرهای مورد مطالعه در ماسه مرطوب و میزان جوانه‌زنی بذرها و درصد آلبینیسم و تأثیر ضد عفونی بذر را روی این فاکتورها نشان می‌دهد

قارچ‌های مختلفی از بذر و پوسته گیاهچه‌های مورد بررسی جدا شدند (جدول ۲) که از بین آنها *Aspergillus* spp. و *Alternaria alternata* به منظور تعیین نقش آنها در ایجاد آلبینیسم و بیماریزایی مورد بررسی قرار گرفت. از قارچ‌های دیگر، تست بیماری‌زایی *Fusarium solani* روی گیاهچه‌ها انجام شد که نتوانست بیماری پوسیدگی خشک ریشه را ایجاد نماید. همینطور *Geotrichum candidum* نیز مورد مطالعه قرار گرفت و تفکیک نژاد مرکبات که عامل پوسیدگی ترش[۲] است از نژاد غیر مرکبات با آزمون بیماری‌زایی روی میوه لمون و تست‌های بیوشیمیایی صورت گرفت که خارج از بحث این مقاله می‌باشد.

۱- Hiltner Test

۲- Sour Rot

جدول ۱ — مشخصات ارقام مورد بررسی و درصد جوانه زنی بذر و آلبینیسم درآنها

رقم	زمان تولید/تحویل	درصد رطوبت بذر[1]	محل جمع آوری	نحوه تهیه بذر[2]	ضدعفونی[3]	تعداد بذر کشت شده	تعداد بذر جوانه زده	تعداد کل گیاهچه[4]	تعداد گیاهچه سالم	تعداد گیاهچه سفید یا ابلق	تعداد گیاهچه از بین رفته[5]	درصد جوانه زنی بذر	درصدآلبینیسم از کل گیاهچه ها
نارنج۱	۷۶/۱۱/۱۰	۹/۳	رضی محله،رامسر	استخراج	−	۱۰۰	۷۳	۸۷	۷۸	۶	۳	۷۳	۶/۹
					+	۱۰۰	۷۲	۸۸	۸۳	۰	۵	۷۲	۰
نارنج ۲	۷۶/۱۱/۱۵	۱۱	آخوند محله، رامسر	استخراج	−	۱۰۰	۷۵	۸۵	۷۸	۴	۳	۷۵	۴/۷
					+	۱۰۰	۹۶	۱۱۰	۱۰۴	۲	۴	۹۶	۱/۸
پونسیروس۳	۷۶/۷/۲۸	۱۱/۳	مؤسسه تحقیقات مرکبات،رامسر	دریافت	−	۱۰۰	۱۷	۱۷	۱۵	۲	۰	۱۷	۱۱/۸
					+	۱۰۰	۳۷	۳۷	۳۷	۰	۰	۳۷	۰
سیترنج ۴	۷۶/۱۱/۱	۱۰/۸	مؤسسه تحقیقات مرکبات،رامسر	دریافت	−	۵۰	۵۰	۵۵	۲۹	۲۶	۰	۱۰۰	۴۷/۳
					+	۵۰	۵۰	۷۳	۷۲	۱	۰	۱۰۰	۱/۴
سیترنج ۵	۷۶/۹/۲۷	۱۰/۳	ایستگاه مرکبات خرم آبادتنکابن	استخراج	−	۵۰	۱۰	۱۴	۱۴	۰	۰	۲۰	۰
					+	۵۰	۲۹	۲۹	۲۹	۰	۰	۵۸	۰
سیترنج ۶	۷۶/۹/۱۲	۱۱/۷	ایستگاه مرکبات کترا،نشتارود	استخراج	−	۵۰	۱۴	۱۴	۱۱	۳	۰	۲۸	۲۱/۴
					+	۵۰	۴۵	۶۳	۶۳	۰	۰	۹۰	۰
سیترواملو ۷	۷۶/۹/۱۲	۱۰/۵	ایستگاه مرکبات کترا،نشتارود	استخراج	−	۵۰	۳	۳	۳	۰	۰	۶	۰
					+	۵۰	۱۰	۱۰	۱۰	۰	۰	۲۰	۰
سیترواملو ۸	۷۶/۱۱/۱۵	۱۰/۶	مؤسسه تحقیقات مرکبات،رامسر	دریافت	−	۵۰	۲۷	۳۱	۱۵	۱۶	۰	۵۴	۵۱/۶
					+	۵۰	۳۶	۳۹	۳۹	۰	۰	۷۲	۰

[1] اندازه گیری رطوبت بذرها در تاریخ ۷۷/۱۱/۲۰ انجام شد.

[2] استخراج : استخراج بذر از میوه وشست وشوی آن پس از ۲۴ ساعت خیساندن در آب دریافت : دریافت بذر از مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور،رامسر

[3] − : بدون ضدعفونی + : ضدعفونی شده

[4] به دلیل وجود حالت چندجنینی در برخی از بذور پایه های مرکبات ، نامساوی (تعداد بذر جوانه زده ≥ تعداد کل گیاهچه) برقرار است .

[5] در چهار جعبه مجاور پنجره گلخانه این گیاهچه ها توسط آفات،طوقه بر شده بودند و در تعیین درصدها در نظر گرفته نشدند.

جدول ۲- نتایج بررسی بذر ارقام پایه مورد بررسی با روش‌های رایج بیماری‌شناسی بذر

قارچ	نارنج ۱	نارنج ۲	پونسیروس ۳	سیترنج ۴	سیترنج ۵	سیترنج ۶	سیترومللو ۷	سیترومللو ۸
Alternaria alternata	B,H	B,H	A2,B,H	A2,B,H	-	H	-	H
Aspergillus spp.	A1	-	A1,A2,B	A2,B	A1	A1	A2	A2,B
Bipolaris sp.	-	-	B	-	-	-	-	-
Candida sp.	-	A2	-	A2	-	-	-	A2
Chaetomium sp.	-	A2	-	B	-	-	B	A2,B
Cladospocrium sp.	-	B	-	-	-	B	-	-
Doratomyces sp.	-	-	H	-	-	-	-	-
Fusarium spp.	A1,B,H	A1,A2,H	A1,A2,B,H	A1,A2,B,H	A1,A2	A1,H	A1,B	A1,A2,H
Geotrichum candidum	-	-	A1,A2,B	-	-	-	-	-
Humicola sp.	-	-	H	-	-	-	-	-
Melanospora sp.	-	-	-	B	-	-	-	-
Mucor spp.	A1,A2,H	A1,A2,H	A1,H	A2	A2	H	-	A1,A2,H
Myrothecium sp.	-	-	B	-	-	-	-	-
Nigrospora oryzae	A2	A2,H	A1,A2	A1,A2	A2	A2	A2	A2,H
Penicillium spp.	A1,A2,B,H,W	A1,A2,B,H,W	A1,A2,B,H,W	A1,A2,B,H,W	A1,A2,B,W	A1,A2,B,H,W	A1,A2,B,W	A1,A2,B,H,W
Periconia sp.	-	-	B	-	-	-	-	-
Rhizopus sp.	A2	A1,A2	A1,A2,B	A2	-	A1,H	A1,A2	A1
Sporothrix sp.	-	-	-	-	-	-	A2	-
Stachybotrys sp.	A2	B	-	B	-	-	-	-
Torula sp.	B	-	-	-	-	-	-	B
Trichoderma spp.	H	B,H	A1,B,H	A1,B	B	A1	-	A2
Ulocladium sp.	B	-	H	B	-	-	-	A2

روشهای مختلف آزمایش بذر:

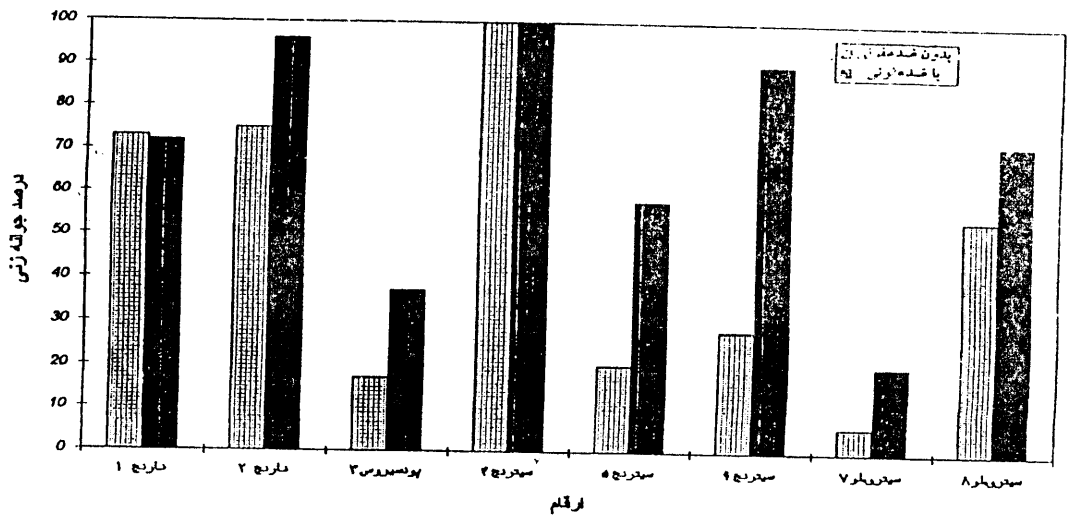
A1 – روش استفاده از محیط غذایی آگاردار، بدون ضد عفونی بذر

A2 – روش استفاده از محیط غذایی آگاردار، با ضد عفونی بذر

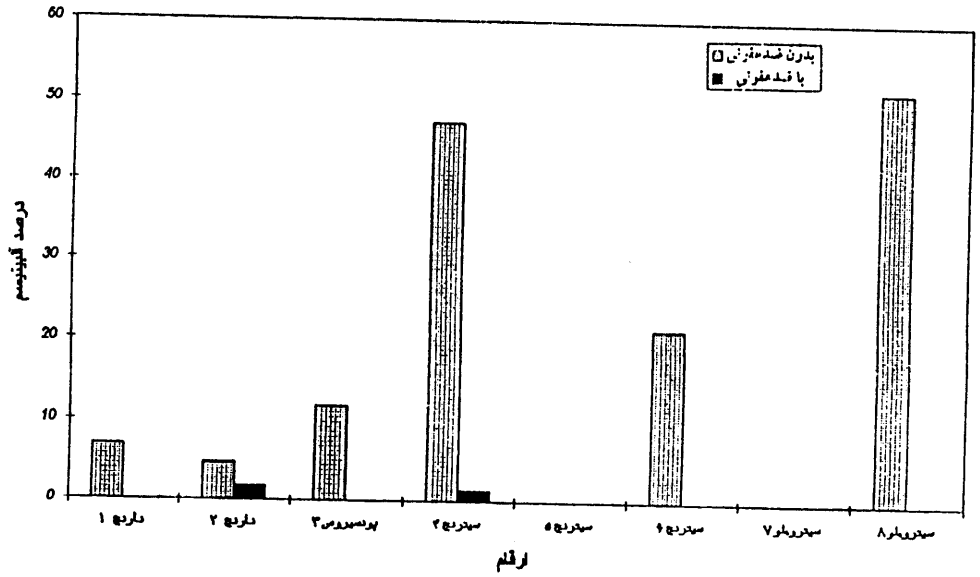
B- روش استفاده از کاغذ صافی مرطوب

H- روش کشت بذر در ماسه مرطوب

W- روش شست و شوی بذر



نمودار ۱- مقایسه درصد جوانه‌زنی بذر ارقام مورد بررسی



نمودار ۲- مقایسه درصد آلبینیسم در ارقام مورد بررسی

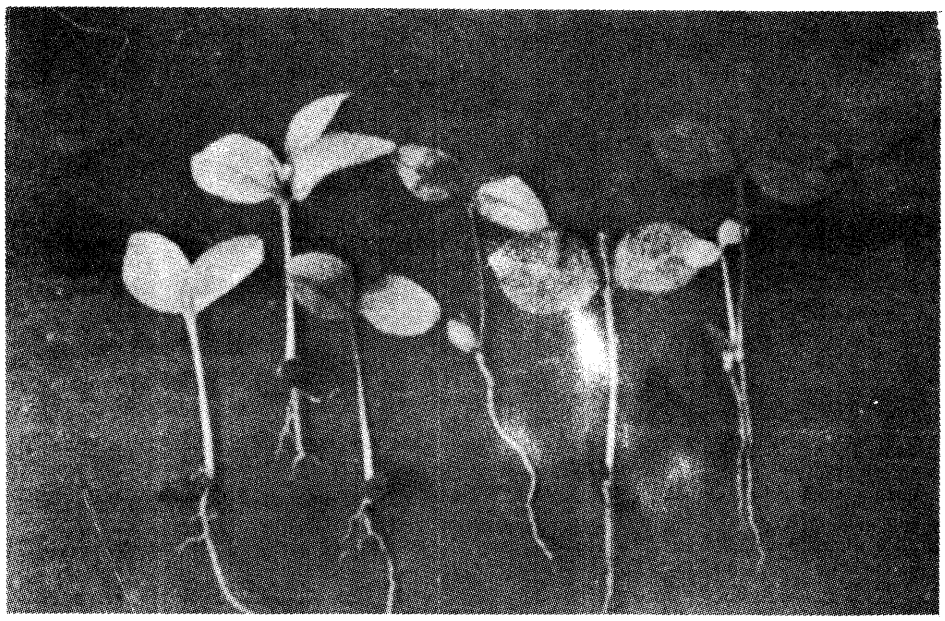
جدول ۳- نتایج آزمایش مایه زنی بذر با *Alternaria alternata* و ایجاد آلبینیسم

تیمار[1]	تعداد کل گیاهچه	تعداد گیاهچه سبز	تعداد گیاهچه سفید/ابلق	درصد آلبینیسم
شاهد	۲۳	۲۳	۰	۰
٤۲٦	۲۵	۲۵	۰	۰
۸-۲۰	۱۷	۰	۱۷	۱۰۰
۳۰-۱۰	۱٤	۰	۱٤	۱۰۰
٦٦	۱٤	۰	۱٤	۱۰۰
۱۰۰۰	۲۳	۰	۲۳	۱۰۰
۹(گیاهچه)	۲٤	۰	۲٤	۱۰۰
۱۹(گیاهچه)	۲۵	۰	۲۵	۱۰۰
۲٦(گیاهچه)	۲۲	۰	۲۲	۱۰۰

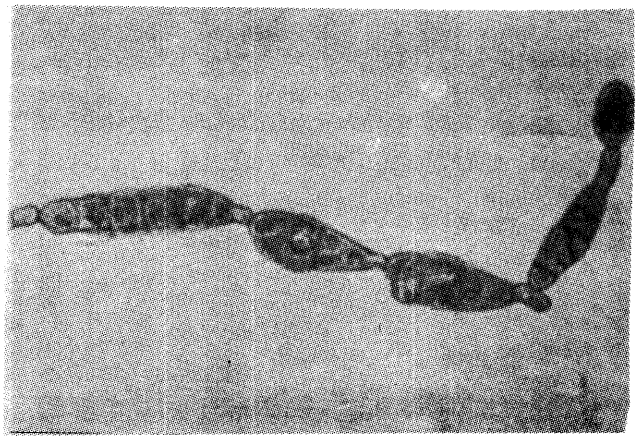
(۱) تیمارها شامل شاهد و جدایه‌های قارچ است.

جدول ٤- نتایج آزمایش تلقیح بذر با *Aspergillus* spp. و ایجاد آلبینیسم

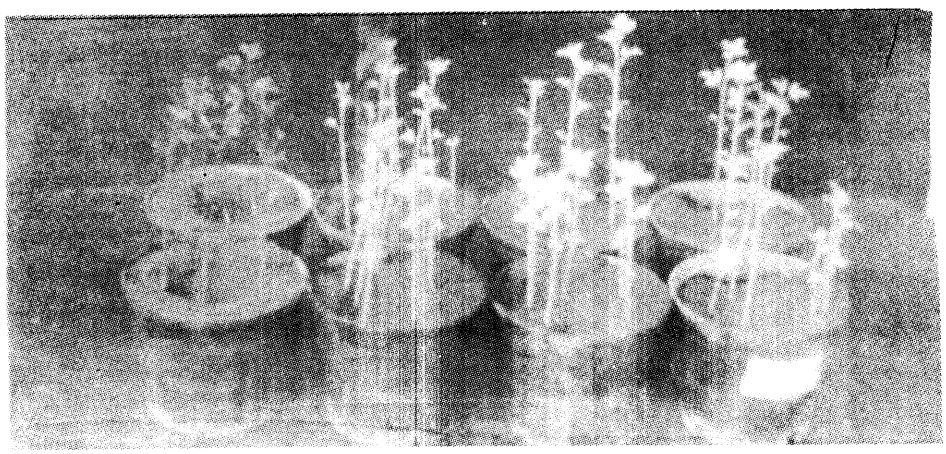
تیمار	تعداد کل گیاهچه	تعداد گیاهچه سبز	تعداد گیاهچه سفید/ابلق	درصد آلبینیسم
شاهد	۳۳	۳۲	۱	۳
Asp1	۲٦	۲٦	۰	۰
Asp2	۸	۸	۰	۰
Asp3	۲۰	۲۰	۰	۰
Asp4	۱٤	۱٤	۰	۰
Asp5	۲۲	۲۲	۰	۰
Asp6	۱٦	۱٦	۰	۰
Asp7	۱۷	۱۷	۰	۰
Asp8	۱٦	۱۵	۱	٦/۲۵



شکل ۱- حالت های مختلف بیماری آلبینیسم در گیاهچه های نارنج



شکل ۲-زنجیر کنیدی های قارچ *Alternaria alternata*



شکل ۳-ایجاد علائم آلبینیسم در گیاهچه های بذرهای تیمار شده با *A.alternata* در مقایسه با شاهد

گاهی منشعب، به رنگ قهوه‌ای، به عرض ۴-۲ و طول ۵۵-۱۲ میکرومتر، آرایش کنیدی به صورت زنجیرهای طویل (شکل ۲) و اغلب منشعب است و کنیدی‌ها از نظر شکل و اندازه متغیرند. کنیدی‌ها قهوه‌ای و به شکل‌های آلترناریوئید، بیضوی، گرد و دارای نوک و یا بدون آن، با عرض ۱۵-۵ در پهن‌ترین قسمت و طول۴۲-۶ و با احتساب نوک، ۴۶-۷ میکرومترمی‌باشد. این کنیدی‌ها دارای ۷-۱ دیواره عرضی و ۴-۱ دیواره طولی و مورب بوده و برخی از آنها تولید کنیدیوفور می‌نمایند.

بر اساس نتایج آزمایش‌های مایه‌زنی بذر (جدول ۳)، به جز جدایه ۴۲۶ جدا شده از بذر، مایه‌زنی بذور با جدایه‌های دیگر قارچ *A.alternata* که مورد بررسی قرار گرفتند، منجر به تولید گیاهچه‌های سفید گردید، در حالیکه در تیمار شاهد همه گیاهچه‌ها طبیعی بودند (شکل ۳). از کشت پوسته بذر، ابتدای محور روی لپه و زیر لپه گیاهچه‌های سفید، این قارچ از ۳۶ درصد قطعات دوباره به دست آمد، در ۴۶ درصد قطعات رشد پرگنه قارچی مشاهده نشد و در بقیه قطعات آلودگی به باکتری‌ها و قارچ‌های ساپروفیت دیده شد. در آزمون بیماری‌زایی با گونه‌های *Aspergillus* spp. در بررسی حاضر تقریباً در همه موارد گیاهچه‌های حاصل از بذور تلقیح شده با این قارچها سبز شدند و آسپرژیلوس جز موارد نادر نتوانست تولید گیاهچه‌های سفید نماید (جدول ۴).

بحث

نتایج این بررسی نشان می‌دهد که آلودگی بذرها روی درصد جوانه‌زنی آنها تأثیر داشته و ضدعفونی سطحی بذر در اغلب موارد (نارنج ۲، پونسیروس ۳، سیترنج ۵ و ۶ و سیترومله ۷ و ۸) این درصد را افزایش داده است که مؤید این نظر است که در شرایط نامطلوب نگهداری بذر و در غیاب استفاده از تیمار مناسب، میزان آلودگی قارچی در بذر افزایش یافته و میزان جوانه زنی آن کاهش می‌یابد (۹ و ۱۱). همچنین مقایسه درصد آلبینیسم بین تیمارهای بدون ضد عفونی و ضدعفونی شده در بذرهای پایه نارنج ۱ و ۲، پونسیروس ۳، سیترنج ۴ و ۶ و سیترومله ۸، این اختلاف را نشان می‌دهد و کارهای گذشته در این زمینه را تأیید می‌نماید (۷).

نتایج به دست آمده از آزمایش بیماری‌زایی با *A.alternata* و مطالعه اثر آن روی گیاهچه، دخالت واضح این قارچ در ایجاد آلبینیسم را ثابت نمود. این نتایج با یافته‌های ریان و همکاران (۱۹۶۱)، بارمور و همکاران (۱۹۸۴) و وایتساید و همکاران (۱۹۸۸) مطابقت دارد. در مورد مکانیزم ایجاد بیماری آلبینیسم، ریان و همکاران (۱۲) اشاره دارند که قارچ آلترناریا روی پوسته بذر تولید متابولیتی می‌نماید که وقتی گیاهچه‌ها ظاهر شدند، بیوسنتز کلروفیل را در آنها مهار می‌کند. همچنین وایتساید و همکاران (۱۶) ذکر می‌کنند که در طی مراحل استخراج از میوه، قارچ *A.alternata* به طور سطحی بذر را آغشته می‌کند و سپس در سطح بذر رشد نموده و تولید توکسینی می‌نماید که روی سنتز کلروفیل خاصیت بازدارنده دارد. بنابراین نظرات، اثبات قاطع نقش این قارچ روی گیاهچه نیاز به آزمایش‌های استخراج عصاره و بررسی اثرات آن دارد که در تحقیق حاضر انجام نشده است.

در آزمایش بیماریزایی با گونه‌های آسپرژیلوس در بررسی حاضر مشخص گردید که این قارچ نقشی در ایجاد آلبینیسم ندارد و بیماریزایی آن ثابت نگردید. این نتیجه بر خلاف یافته دوربین (۱۹۵۹) است. این محقق جدایه‌های *A.flavus* عامل عارضه‌ای با علایم مشابه در ذرت را به کار برده بود و جدایه‌های قارچ آسپرژیلوس به کار رفته، از مرکبات جداسازی نشده بود.

به طور کلی آلودگی بذور مرکبات را می‌توان به مراحل قبل و پس از برداشت میوه نسبت داد. تحقیقات مختلفی در مورد آلودگی‌گل و میوه مرکبات صورت گرفته و مطالعه آنها می‌تواند آلودگی بذرها به قارچهای عامل پوسیدگی را تفسیر نماید. بولینگ و مک میلان(۳)، به جداسازی قارچهای مختلفی از جمله آلترناریا از گل‌های لیموترش[1] اشاره دارند. سینگ و کانا(۱۳) و لوگریکو و همکاران (۸) اشاره دارند که عامل پوسیدگی سیاه نارنگی از نظر مورفولوژی و بیماریزایی در مقایسه با *A.citri* ، به *A.alternata* ,شباهت بیشتری دارد. از قارچهای جدا شده از بذر در بررسی حاضر ، *Alternaria alternata* ، *Aspergillus* spp. ، *Candida* sp. ، *Fusarium* spp. ، *Geotrichum candidum* ،*Penicillium* spp. ، *Rhizopus* spp. ، *Trichoderma* spp. به عنوان عوامل‌پوسیدگی‌میوه مرکبات در منابع معرفی شده‌اند (۵ و ۱۴). همچنین آلودگی بذر به قارچها می‌تواند در حین مراحل استخراج و جداسازی بذر از میوه و شست و شو و خشک کردن آن رخ دهد. در روش سنتی بذرگیری، به طور معمول بذرها با

۱- *Citrus latifolia*

کمک ظروف معمولی و گاهی همراه با بقایای میوه استخراج و شست و شو شده و پس از پخش روی سطوح مختلف خشک می‌شوند. در بررسی حاضر نمونه‌های بذر تهیه شده از مؤسسه مرکبات، با همین شیوه سنتی در آنجا استحصال گردید و سایر نمونه‌ها که به طور مستقیم از بذر استخراج شد پس از شست و شو با آب شهری و حذف تفاله میوه، به مدت ۲۴ ساعت در آب غوطه‌ور مانده و بعد از آبشویی نهایی روی سطح کاغذ خشک شدند.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از پایان‌نامه نگارنده اول می‌باشد. همکاری کلیه دست‌اندرکاران به ویژه مهندس یونس ابراهیمی ریاست مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور در این زمینه شایان تقدیر و تشکر است. هزینه مربوطه از اعتبارات پژوهشی دانشگاه تهران در قالب طرح مستمر بررسی بیماریهای مهم نباتات تامین شده که سپاسگزاری می‌نماید.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱- سلیمانی پری، م. ۱۳۷۰. بررسی بیماری‌های قارچی که از طریق بذر پنبه منتقل می‌شوند. پایان نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، ۱۵۷ صفحه.

2.Barmore, C. R., Brown, G. E. and Youtsey, C. O. 1984. Fungicide control of albinism in citrus seedlings caused by *Alternaria tenuis.* Plant Disease 63:43-44.

3. Bowling, L. and McMillan, R. J. 1988. Fungi found in association with persian lime flowers. Proceeding of Florida State Horticultural Society 101: 259 (Abs.).

4. Durbin, R. D. 1959. The possible relationship between *Aspergillus flavus* and albinism in citrus. Plant Disease Reporter 43: 922-923.

5. Eckert, J. W. and Eaks, I. L. 1989. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. In: The citrus industry, Vol. 5, Reuther, W., Calvan, E. C., and Carman, G. E., Eds., University of California . P: 179-260.

6. Kawase, K., Yoshinaga, K. and Uchida, M. 1981. Albinism in citrus seedlings and its prevention. Fruit Tree Res. Stn. (Jpn.) Ser. D. Bull. 3:35-55 (Abs.).

7. Klotz, L. J. 1978. Fungal, bacterial, and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed , nursery, and orchard. In: The citrus industry, Vol. 4, Reuther, W., Calvan, E. C. and Carman, G. E., Eds., University of California. P: 1-69.

8. Logrieco , A., Visconti, A. and Bottalico, A. 1990. Mandarin fruit rot caused by *Alternaria alternata* and associated mycotoxins. Plant Disease 74: 415-417.

9. Mas - Camacho, O., Valle - Valdes, N., Herrera, I. L., Camos Roque , A., Rios - Cruz, A., Acosta - Suarez , M. and Dita- Rodrigues, M. 1995. Conservation of citrus Rootstocks seeds. Centro Agricola 22: 5-9 (Abs).

10. Maude, R. B. 1996. Seedborne diseases and their control. CAB international. 280 pp.

11. Nauer, E. and Carson, T. 1985. Packaging citrus seed for long - term storage. Citrograph 70: 229-230 (Abs.)

12. Ryan, G. F., Greenblatt, G. and Al - Delaimy, K. A. 1961. Seedling albinism, indused by an extract of *Alternaria tenuis* Auct. Science, 134: 833-834.

13. Singh, R. S. and Khanna, R. N. 1966. Black core rot of mandarin oranges caused by *Alternaria tenuis* Auct. Plant Disease Reporter 50: 127-131.

14. Snowdon, A. L. 1990. A colour atlas of postharvest diseases and disorders of fruits and vegetables, Vol. 1. Wolfe Scientific Ltd. 302 pp.

15. Tager, J. M. and Cameron, S. H. 1957. The role of the seed coat in chlorophyll deficiency (albinism) of citrus seedlings. Physiol. Plantarum 10: 302 (Abs.).

16. Whiteside, J. O., Garnsey, S. M. and Timmer, L. W. 1988. Compendium of citrus diseases. APS Press. 80 pp.

Albinism in Citrus Seedlings

S.M. BANIHASHEMIAN[1], J.ZAD[2], GH.A.HEDJAROUD[3], S.M.OKHOVVAT[4], GH.H.MOSAHEBI[5]

1-5 former Graduate Student , Professors and Assistant Professor Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.

Accepted, Dec. 13,2000

SUMMARY

Albinism is a disease in early stages of seedling formation that occurs more or less in citrus seedbeds. The complete failure of the leaves to manufacture chlorophyll eventually results seedlings to die. The investigation to find out the causal agent of this disorder has attracted the attention of researchers for many years. In the first stages of studies some species of *Aspergillus* spp. were introduced as cause of albinism, but then relation of *Alternaria alternata* were cleared. This fungus is a saprophyte or weak parasite that infests seeds and its metabolites inhibits chlorophyll biosynthesis. To investigate the effects of surface seed infesting fungi on seedlings, four important rootstock seeds: Sour orange, Poncirus, Troyer Citrange and Swingle Citromelo were collected and standard seed pathology methods of Blotter paper, Agar plate and Hiltner (moist sand) were carried out. Amongst the isolated fungi, pathogenicity test of *Alternaria alternata* and *Aspergillus* spp. by seed inoculation were performed. Based on these tests, *Alternaria alternata* was cause of albinism on the plant and *Aspergillus* spp. with methods and conditions of this investigation did not produce any disease symptoms.

Key words: Albinism, citrus seedlings, *Alternaria alternata, Aspergillus* spp.