

## بررسی تندهش، نفوذ و گسترش *Alternaria alternata* عامل بیماریهای لکه قهوه ای و

### پوسیدگی سیاه در برگ و میوه مرکبات شمال ایران

عباسعلی دهپور جویباری<sup>1\*</sup>، احمد مجد<sup>2</sup> و سید وحید علوی<sup>3</sup>

<sup>1</sup> قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست شناسی

<sup>2</sup> تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، گروه زیست شناسی

<sup>3</sup> ساری، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، بخش آفات و بیماریهای گیاهی

تاریخ دریافت: 85/6/15 تاریخ پذیرش: 87/5/21

#### چکیده

قارچ *Alternaria alternata* یکی از عوامل بیماریزای مهم مرکبات در جهان می باشد. بیماری لکه قهوه ای (Brown spot) به ویژه روی برگ و میوه نارنگی پیچ و تانجلو و بیماری پوسیدگی سیاه (Black rot) مخصوصاً در میوه پرتقال تامسون ناول از جمله بیماریهای بوده که به وسیله قارچ آلترناریا ایجاد شده است. و در سالهای اخیر گسترش یافته و موجب بروز خسارت زیادی در مرکبات شمال ایران گردیده است. در این بررسی سر شاخه های سالم و بیمار ارقام مرکبات تانجلو مینولا و نارنگی پیچ، و میوه های سالم و آلوده پرتقال تامسون ناول در مراحل مختلف تکوین از باغهای شمال ایران جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه ها به قطعات حدود 2x2 میلی متر برش داده شده، و با گلو تار آلدئید 3 درصد در بافر فسفات تثبیت گردید. تثبیت تکمیلی با اسمیوم تتراکسید انجام شد. پس از آبیگری اولیه به کمک درجات رو به افزایش اتانول، نمونه ها با روش انجماد خشک کاملاً آبیگری و با طلا پوشش داده شد، نمونه های آماده شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات هیستوپاتولوژیکی نشان داد که مهمترین راه نفوذ قارچ در بافتهای میزبان روزنه های هوایی بوده است. هاگهای قارچ ایجاد لوله تندهشی نموده و بدون تشکیل چنگک (appressorium) پس از رشد در سطح برگ خود را به روزنه های هوایی رسانده و وارد اطاقک زیر روزنه گردیدند. بعضی از انشعابات این ریشه ها نیز به درون بافت مزوفیل برگ نفوذ نموده، ترشحات ریشه، منجر به تخریب دیواره های سلولی و از هم گسیختگی بافتها و سلولها می گردد در حالی که ریشه های قارچی به درون کیسه های ترشچی برگها و پوست میوه مرکبات نفوذ نکرده بودند. بر این اساس احتمال دارد که محتوای کیسه های ترشچی برگها و مخصوصاً پوست میوه مرکبات نقش بازدارنده در برابر نفوذ، گسترش و آلوده کنندگی ریشه های قارچ آلترناریا داشته باشد.

واژه های کلیدی: میکروسکوپ الکترونی، آلترناریای مرکبات، لکه قهوه ای مرکبات، پوسیدگی سیاه تامسون ناول

\* نویسنده مسئول : تلفن تماس : 09113548955 پست الکترونیک: adehpour@yahoo.com

#### مقدمه

آنها بیمارگر مهم گیاهان است و تولید بیماریهای شدید نموده و دامنه میزبانی وسیعی دارد (17 و 19).

جنس آلترناریا با گونه تیپ *Alternaria tenuis* مترادف با *A. alternata* معرفی شده که ویژگی اصلی آن تولید

جنس آلترناریا (*Alternaria spp.*) متعلق به رده قارچهای ناقص و یکی از جنسهای بزرگ و پیچیده از نظر ریخت شناسی است. این جنس حدود یکصد گونه دارد که در مکانهای متنوعی در سرتاسر دنیا یافت می شود. بسیاری از

پیشنهاد شده که به عنوان دو زیر گونه یا دو تیپ بیماریزا (Pathotype) محسوب گردند. اگر چه برخی محققان از این پیشنهاد استقبال نموده اند، اما هنوز مورد پذیرش عمومی قرار نگرفته است (5، 14 و 19).

بیماری لکه قهوه ای روی نارنگی و دورگهای آن موجب ریزش برگ و میوه گردیده (6 و 9) و ایجاد لکه های قهوه ای رنگ در سطح بافت آلوده نموده (شکل-1 الف و ب)، این بیماری در غرب استان مازندران شیوع یافته است (6). بیماری پوسیدگی ناف، بیشتر از جنبه ایجاد پوسیدگی در حین انبارداری روی میوه لیمو شیرین (*Citrus limon*) و پرتقالهای نافدار (*Navel orange*) حائز اهمیت بوده (شکل 2)، اگر چه ریزش میوه قبل از برداشت نیز توسط این بیماری صورت گرفته است (6، 9، 15 و 16)، لذا از نظر ماهیت، از انواع بیماریهای قبل و بعد از برداشت (Pre and Post harvest) مرکبات به شمار آمده است (7 و 20).



شکل-1 الف: بیماری لکه قهوه ای در سطح میوه پیچ



شکل-1 ب: بیماری لکه قهوه ای در سطح برگ پیچ

زنجیری از هاگهای تیره رنگ با دیواره های طولی و عرضی بوده است (Nees et al 1816).

عامل بیماری لکه قهوه ای نارنگی (Brown spot) و پوسیدگی سیاه ناف میوه پرتقال تامسون (Black rot) در ابتدا به گونه *A. citri* نسبت داده شده بود (9).

در ایران نیز به ترتیب در سالهای 1379 و 1381 بیماریهای لکه قهوه ای نارنگی و پوسیدگی سیاه ناف میوه پرتقال تامسون ناول با عامل *A. citri* گزارش گردیده است (2 و 4).

با توجه به فقدان فرم جنسی در این جنس، خصوصیات طبقه بندی آن بر اساس خصوصیات ریخت شناسی ریشه ها و هاگهای غیر جنسی صورت گرفته است و عموماً بر اساس نوع، شکل و نحوه قرار گرفتن هاگها روی هاگ برها، طبقه بندی شده است. با توجه به این موضوع بررسیهای متعددی توسط محققین برای تفکیک و تشخیص این دو عامل بیماریزا صورت گرفته و در آخرین مطالعات منتشر شده است، با توجه به اینکه هر دو عامل قارچی، هاگهای کوچک (4-12×45-8 میکرومتر) تولید و سایر خصوصیات مرفولوژیکی و مولکولی آنها شبیه به هم بوده است، لذا هر دو عامل را در گونه *A. alternata* قرار داده اند (21).

در مطالعات صورت گرفته در مورد گونه های آلترناریای موجود در شمال کشور که روی مرکبات ایجاد بیماری نموده اند، خصوصیات ریخت شناسی دو عامل بیماریزای لکه قهوه ای و پوسیدگی سیاه شبیه به یکدیگر بوده و نقوش الکتروفورزی پروتئین نیز این امر را تأیید نموده، که این نتایج مشابه با نتایج تیمر و همکارانش (21) بوده، لذا هر دو عامل در گونه *A. alternata* قرار داده شدند (1 و 12).

در واقع اختلاف این دو عامل بیماریزا، بیشتر در دامنه میزبانی و نحوه بیماریزایی آنها بوده است و به همین لحاظ

## مواد و روشها

برگها و میوه های سالم و آلوده به قارچ آلترناریا از ارقام مرکبات تانجلو مینولا، نارنگی پیچ و پرتقال تامسون در مراحل مختلف تکوین (اندازه میوه ها از حدود 2 میلی متر تا میوه های رسیده) در سال 1384 از باغهای تنکابن و رامسر، قائمشهر و ساری جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از شستشوی با آب مقطر، قطعاتی با اندازه حدود 2x2 میلی متر از نمونه ها تهیه و با گلو تار آلدئید 3 درصد در بافر فسفات 0/075 و  $pH = 7/6$  به مدت 4 تا 6 ساعت در یخچال تثبیت شد پس از سه تا چهار بار شستشوی نمونه های تثبیت شده با بافر فسفات، تثبیت تکمیلی آنها به کمک اسمیوم تتراکسید 125 درصد در همان نوع بافر به مدت 2 تا 4 ساعت در یخچال انجام شد. آگیری اولیه نمونه ها با استفاده از درجات افزایشده اتانول (35، 50، 70، 95 و 100 درجه الکلی) انجام و پس از چسباندن در جایگاه مخصوص (Stube) با غبار طلا پوشش داده و با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مدل ZIESS و LEO 435 (80 kv) مورد بررسی قرار گرفت. بررسیهای دیگر با استفاده از روشهای متداول سیتو هیستولوژیکی با تهیه برشهای دستی و میکروتومی، آماده سازی و رنگ آمیزی آنها به کمک روشهای متداول و سپس با فتو میکروسکوپیهای نوری ZIESS عکسبرداری شد. هر آزمایش حداقل سه بار در سه مرحله زمانی (ابتدای آلودگی، فاز میانی و انتهای آلودگی (فاز تخریب)) تکرار شد. در هر آزمایش تعداد 50 نمونه مورد بررسی قرار گرفت (3).

## نتایج

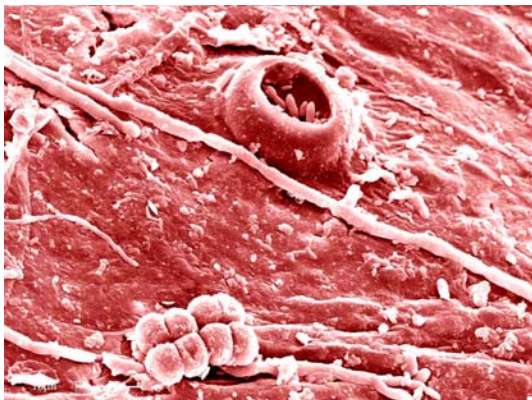
یافته های حاصل از بررسیهای انجام شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و نوری (LM) نشان می دهد که: هاگدانهای (کنیدیوفور) آلترناریا بزرگ (طول حدود 8-45 و عرض 4-12 میکرومتر) و دارای دیواره های طولی و عرضی می باشند (شکل 3 الف و ب) در هر کنیدیوفور



شکل 2- پوسیدگی سیاه ناف تامسون ناول (Black rot) آلودگی تا حدگوشت میوه پیشروی کرده است

پوسیدگی سیاه روی میوه پرتقال تامسون ناول در شرق مازندران اهمیت داشته و از اواسط تیر ماه موجب ریزش میوه در باغات شده و پس از برداشت نیز باعث پوسیدگی میوه در انبار می شود، اگر چه وقوع آلودگی قبل از برداشت صورت گرفته است (2).

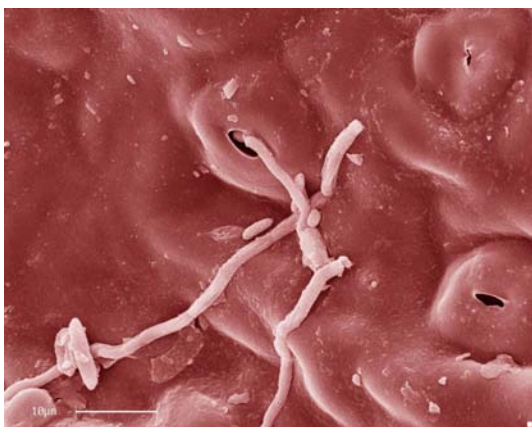
بررسی چرخه بیماری و چگونگی نفوذ، گسترش و ایجاد آلودگی قارچ آلترناریا در مرکبات تاکنون در ایران صورت نگرفته است و اطلاعات موجود در مورد این بیماریها تنها محدود به گزارش آلودگی از شمال کشور بوده است (2، 4 و 10). به دلیل فقدان اطلاعات کافی از روند تندش، نفوذ و گسترش این قارچ در برگ و میوه مرکبات، و عدم آگاهی از چرخه بیماری، راهکار مناسبی برای کنترل این بیماریها در شمال کشور به دست نیامده است. به همین دلیل در پژوهش حاضر با استفاده از میکروسکوپیهای الکترونی نگاره (SEM) و نوری (LM) تلاش گردیده است تا چگونگی آغاز روند آلودگی در برگها و میوه های تانجلو رقم مینولا و نارنگی پیچ، و میوه های پرتقال تامسون ناول مشخص شده و مراحل گسترش بیماری خصوصاً جایگاههای نفوذ و گسترش ریشه ها تعیین گردد.



شکل 4- الف: میکروگراف الکترونی نگاره از ریشه حاصل از تندش هاگ آلترناریا در سطح پوست میوه پیچ



شکل 4-ب: یک کنیدی با تشکیل یک لوله تندشی



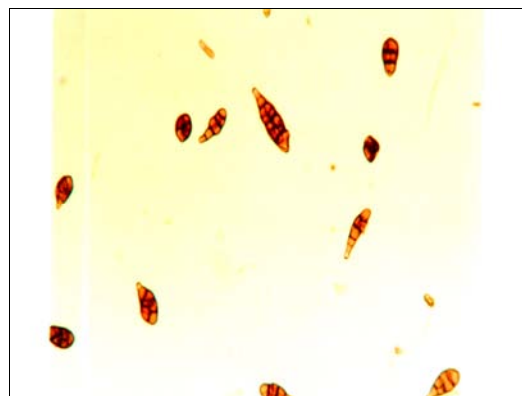
شکل 5- الف: میکروگراف الکترونی نگاره از راه نفوذ قارچ به بافت میزبان از طریق روزنه های هوایی.

در سطح پوست میوه های نارنگی تانجلو و پیچ روزنه های همیشه بازی وجود داشت که لوله های تندشی (ریشه ها) از این طریق به میوه ها نفوذ می کنند (شکل 7).

چهار کنیدید اسپور (هاگ) تشکیل می شود. هاگها با چسبندگی سطح خود روی برگها، شاخه های جوان و پوست میوه ها می چسبند. تندش هاگها لوله های تندشی را بوجود می آورد که حالت ساده یا منشعب دارند (شکل- 4 الف و ب).

در برگها لوله های تندشی بدون تشکیل چنگک (appressorium) رشد کرده و از محل منفذ روزنه های هوایی به بافتهای درونی برگ نفوذ نمودند (شکل 5 الف). برخی از لوله های تندشی از راه شکاف یا زخم در بافت برگها نفوذ کردند (شکل- 5 ب).

ریشه ها در بافتهای مزوفیلی برگ موجب تخریب دیواره های سلولی و از هم گسیختگی سلولها و بافتها می شوند (شکل- 6).

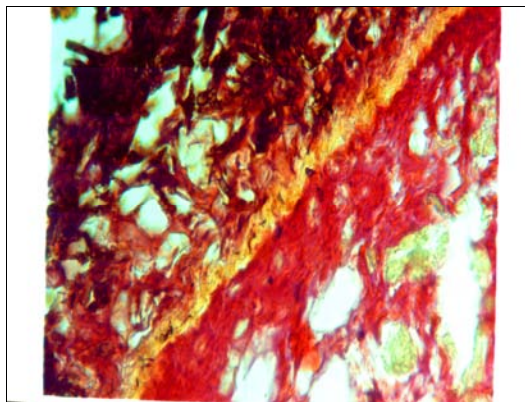


شکل 3- الف: هاگهای قارچ آلترناریا جدا شده از سطح برگ آلوده، با بندهای طولی و عرضی



شکل 3-ب: میکروگراف الکترونی نگاره از یک کنیدی قارچ آلترناریا

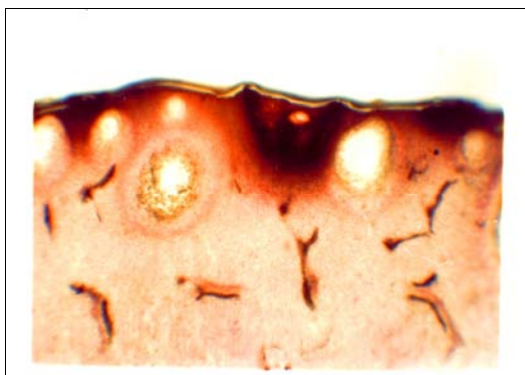
نفوذ کرده (شکل - 8 الف و ب) و در بافتهای برون بر  
و میان بر میوه گسترش یافته ولی ریشه های قارچ آلترناریا  
به درون کیسه های ترشچی برگها و پوست میوه مرکبات  
نفوذ نکردند (شکل - 9 الف و ب).



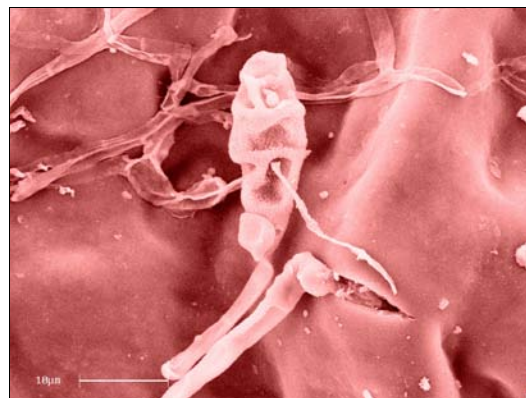
شکل - 8 الف: برش میکروتومی از منطقه ناف تامسون ناول منطقه  
تیره مربوط به اجتماعات هاگهای قارچ آلترناریا می باشد.



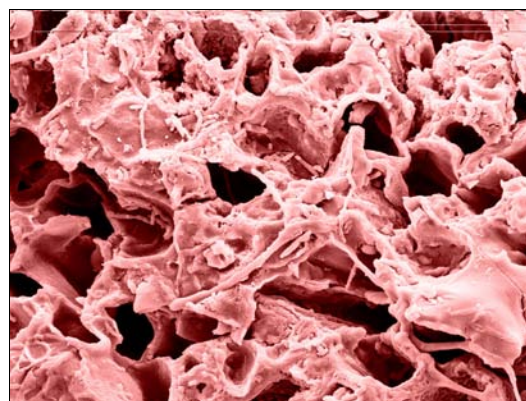
شکل - 8 ب: میکروگراف الکترونی نگاره از منطقه ناف تامسون آلوده  
به آلترناریا و تشکیل کنیدیهای جدید



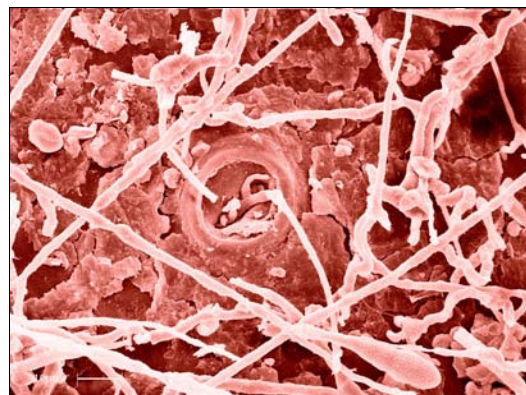
شکل - 9 الف: برش عرضی از منطقه پوست میوه پیچ و نفوذ  
آلودگی تا کیسه های ترشچی



شکل - 5 ب: میکروگراف الکترونی نگاره از نفوذ ریشه حاصل از  
تندش هاگ از طریق شکاف به بافت میزبان



شکل - 6: میکروگراف الکترونی نگاره از تخریب دیواره های سلولی  
در اثر متابولیت های مترشحه از ریشه قارچ آلترناریا در سطح پوست  
تانچلو



شکل - 7: میکروگراف الکترونی نگاره وجود روزنه های همیشه باز  
در سطح پوست میوه پیچ و نفوذ ریشه از طریق این مجاری

در پرتقال تامسون، لوله های تندشی از محل ناف به میوه

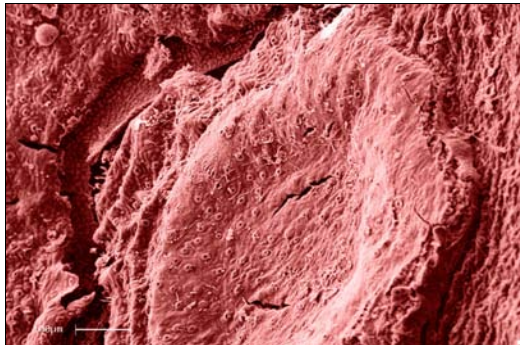
توکسینها و آنزیمهایی خاصی ترشح می شود که موجب از بین رفتن سلولها می گردد.

3- منطقه بدون آلودگی (سبز رنگ) که ریشه ها تندرست نیافته یا رشد محدودی داشتند (شکلهای شماره 11، 12 و 13).

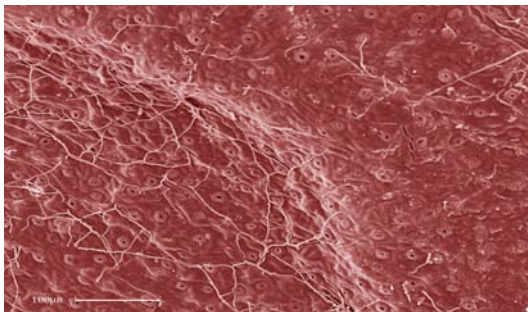
در برخی از نواحی سطح برگ یا میوه مرکبات، سلولهای کشته شده یا سلولها فاقد دیواره و یا روزنه های بازی وجود داشت که ریشه ها به سمت بیرون جهت تشکیل کنیدی رشد کرده اند (شکل 14).

### بحث

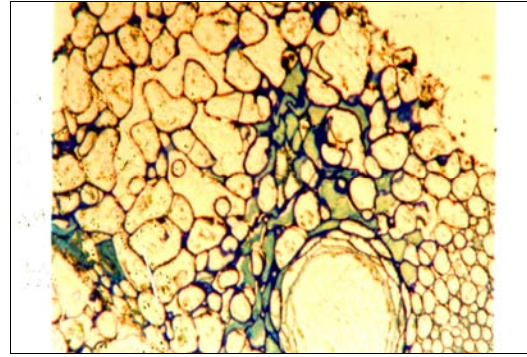
فرآیند آلوده سازی قارچ آلترناریا مشاهده شده در برگ و میوه مرکبات بسیار شبیه به آلودگی به قارچ *A.cassiae* در *Cowpea* می باشد (22).



شکل 11: میکروگراف الکترونی نگاره منطقه لکه نکروتیک برگ پیچ آلوده به قارچ آلترناریا

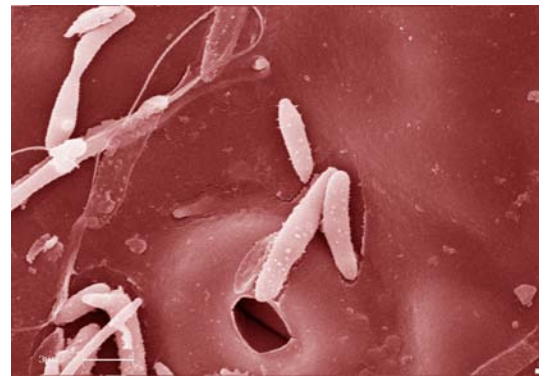


شکل 12: سطح برگ پیچ آلوده به آلترناریا و وجود سه منطقه در اثر آلودگی به قارچ منطقه نکروزه شدن با ریشه های فراوان 1 - منطقه با هاله زرد رنگ مرز بین ناحیه آلوده و ناحیه سالم 2 - منطقه سالم با انشعابات ریشه های کمتر



شکل 9- ب: برش عرضی از نواحی کیسه ترشعی سطح برگ آلوده به آلترناریا و عدم نفوذ ریشه به داخل کیسه های ترشعی

در سطح برگ آلوده به هاگ آلترناریا، هاگ سایر گونه های قارچی وجود داشت که در موارد مشاهده شده هیچیک جوانه زنی ننمودند (شکل 10).



شکل 10: میکروگراف الکترونی از هاگ گونه های مختلف قارچ که توانایی جوانه زنی در سطح برگ تانجلو را ندارند.

سطح برگها، ساقه ها و میوه های آلوده (منطقه نکروتیک و هاله اطراف آن) دارای سه منطقه قابل تفکیک بود:

1- منطقه نکروتیک به رنگ قهوه ای یا سیاه که سلولها، در این ناحیه مرده و دیواره سلولی نیز در این منطقه از بین رفته اند.

2- منطقه با هاله زرد رنگ که ریشه ها در این قسمت زیاد بوده و بعضی از انشعابات ریشه نیز به درون بافت مزوفیل برگ نفوذ کرده بود. از این ریشه ها

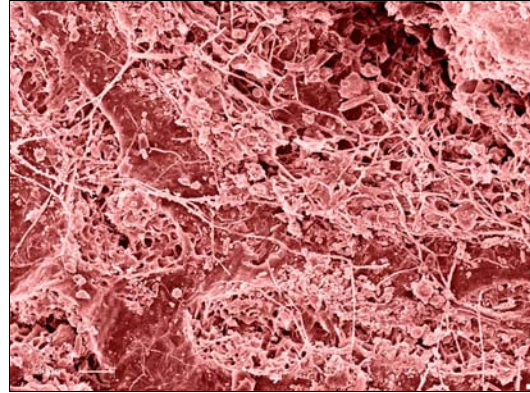
ریسه ها از محل روزنه ها با این گزارشات همسو بود (8). نتایج پژوهش حاضر نشان دهنده این بود که لوله های تندش یافته از کنیدیوسپورها می توانند بدون تشکیل آپروسوریا (چنگک) مستقیماً از طریق روزنه ها وارد مزوفیل برگ یا میوه گردند که این نتایج با گزارشات ون ده برگ و همکاران در سال 2003 مطابقت داشت (22).

نفوذ مستقیم یا غیر مستقیم ریسه های آلترناریا به درون بافتهای میزبان بدون تشکیل چنگک (آپروسوریا)، نشان دهنده این بود که وجود چنگک برای ایجاد آلودگی در بافتهای میزبان ضروری نبوده است (11 و 18).

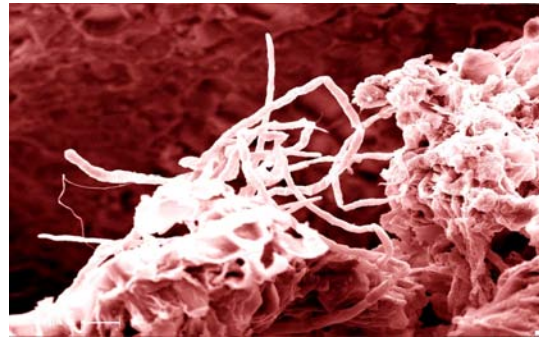
این یافته با گزارشات ون دن برگ و همکاران در سال 2003 همسو و با گزارشات پیور و تیمر در سال 2003 متفاوت بود (21 و 22).

وجود سلولهای نکروتیک در محل نفوذ و گسترش ریسه ها نشان دهنده این است که سلولهای این ناحیه با تهاجم قارچ از بین رفته که این نتایج با مشاهدات، وندیگ و تریجینو همسو بود (22).

عدم نفوذ ریسه ها به کیسه های ترشچی که از نکات قابل توجه بوده، احتمالاً به دلیل وجود ترکیبات بازدارنده رشد ریسه ها در ترکیبات موجود در این کیسه ها بوده است، تأثیر بازدارندگی ترکیبات موجود در کیسه های ترشچی روی جوانه زنی هاگها و رشد ریسه ها این قارچ در دست بررسی می باشد. این اولین بررسی از فرآیند آلوده سازی قارچ آلترناریا در مرکبات شمال ایران می باشد.



شکل 13- میکروگراف الکترونی نگاره از سلولهای منطقه نکروتیک ساقه پیچ آلوده با دیواره هضم شده که بعضی از ریسه ها جهت تشکیل کنیدی بر ها به سمت بیرون رشد می کنند



شکل 14- میکروگراف الکترونی نگاره از سلولهای منطقه نکروتیک که ریسه ها به سمت بیرون جهت تشکیل کنیدی رشد کرده اند

وان دن برگ (22)، و همکارانش در سال 2003 گزارش نمودند که کنیدیهای قارچ آلترناریا لوله های تندشی ساده یا منشعبی رادر موقعیتهای کاملاً تصادفی در سطح برگ ایجاد می کنند، این نتایج با شواهد به دست آمده در این بررسی تطبیق داشت (13 و 23).

طبق گزارشات وندیگ و تریجینو در سال 1987 لوله تندشی می تواند به طور مستقیم به داخل سلولهای اپیدرمی وارد شود یا اینکه از طریق روزنه ها وارد بافت پارانشیم مزوفیلی گردد که نتایج پژوهش حاضر در بخش نفوذ

## منابع

2- علوی، و، جعفری، م، و زاغی، ع، (1381) وقوع بیماری پوسیدگی سیاه (پوسیدگی داخلی) میوه پرتقال تامسون ناول در شرق

1- ده پور جویباری، عباسعلی (1384) بررسی مقایسه ای ویژگیهای ریخت شناسی، تشریحی و تکوینی دو گونه از قارچ آلترناریا. رساله دوره دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

- 4-مهدویان، س.ا. 1379 شیوع *Alternaria citri* عامل بیماری لکه قهوه ای آلترناریایی نارنگی تانجلو رقم مینولا در تنکابن استان مازندران. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، اصفهان، صفحه 324
- 3-مجد، ا و شریعت زاده، م. 1379 میکروسکوپ الکترونی و هیستوتکنیک در میکروسکوپ الکترونی و نوری. انتشارات آیز 279 ص
- 5-Akimatsu K; Peever T.L; and Timmer L.W. (2003). Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. *Molecular Plant Pathology*. 4(6):435-446.
- 6-Bartholomew, E.T. (1926) *Alternaria* rot of lemons. *Cal. Agri. Exp. Sta. Bull.* 408, 32pp.
- 7-Benhamou Nicole (2004). Potential of the mycoparasite *verticillium levanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold. A comparison with the effect of chitosan. *The American phytopathological society*. 94(7): 693-705.
- 8-Blodgett J.T. (2002). Infection colonization and diseases of *Amarantus hybridus* leaves by the *Alternaria tenuissima* group. *The American phytopathological society*. 1199-1205.
- 9-Brown, G.E. and McCornack, A.A. (1972). Decay caused by *Alternaria citri*. *Florida citrus fruit. Plant Dis. Rep.* 56, 909-912.
- 10-Golmohammadi M.M. Andrew T.L. Peever A. peer and L.W. Timmer (2005). First report of brown spot of minneola and page tangelo and fortune tangerine caused by *Alternaria alternata* in iran. BSPP new disease report 12 (August 2005)-Jan 2006. published online
- 11-Hatzipas P, Kalosaka k; Dara A. and Christias. (2002). Spore germination and appressorium formation in the entomopathogenic *Alternaria alternata*. *Mycol.res* (11):1349-1359.
- 12-Kiely, T.B. (1964). Brown spot of Emperor mandaria. *Agric. Gaz.*, Feb, 20:854-856.
- 13-Mimms C W. Royers M A, van Dyke CG (1997). Ultrastructure of conidia and conidium germination in the plant pathogenic Fungus *Altrnaria cassiae*. *Canadian journal-of botony*. 75:252-260.
- 14-Peever; T.L., G. Su, L. Carpenter-Boggs, and L.W. Timmer. (2004). Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria spp.* *Mycology*. 96:119-134
- 15-Pierce, N.B. (1902). Black rot of oranges. *Botanical Gazette* 3334-2354.
- 16-Roger, J.M., and Earle, F.S. (1917) A simple and effective method of protecting citrus fruits against stem-end rot. *Phytopathology* 7:361-367
- 17-Rotem J (1996) The Genus *Alternaria* (the American phytopathological society, st. paul; Minnesta usa)
- 18-Slavov, S. Mayama, S. & tanassov A. (2004). Some aspects of epidemiology of *Alternaria alternata* Tobacco pathotype. *Biotechnol & biotechnol. Eq.* 85-89
- 19-Thomma, B.P.H.J. (2003). *Alternaria spp.*: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*. 4(4):225-236
- 20-Timmer, L.w., (1999). Diseases of fruit and foliage in citrus health management (L.W. Timmer, L.W. Duncan, eds.), APS press, st. Paul, MN, USA. 107-115
- 21-Timmer L.W.; Peever T.L; Slel, Z. and Akimitsu ;K. (2003) *Alternaria* diseases of citrus-Novel pathosystem. *Phytopatholol. Mditerr.* 42.3-15
- 22-van Den Berg. V, Areling. T.A.S. and S.Lventer (2003) Infection studios of *Alternaria cassiae* on cowpea. *austrulasian plant pathology*. 32-33-38
- 23-van Dyke CG, Trigino T.N (1987) Light and scanning microscopy of the interaction of the biocontrol fungus *Alternaria cassiae* with sicklepod (cassia obtusifolia). *Canadian journal of plant pathology*. 9.230-235



## Study on Germination, Penetration and Development of *Alternaria alternata*, Causal Agent of Brown spot and Black rot Diseases, on Citrus Leaves and Fruits in North of Iran

Dehpour Joybari A.A.<sup>1</sup>, Majd A.<sup>2</sup>, and Alavi S.V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Biology Dept., Islamic Azad University, Ghaemshahr, I.R. of IRAN

<sup>2</sup> Biology Dept., Islamic Azad University, North branch, Tehran, I.R. of IRAN

<sup>3</sup> Plant Pests and Diseases, Mazandaran Agricultural Research Center, Sari, I.R. of IRAN

### Abstract

*Alternaria* fungi causes two different diseases on citrus in Mazandaran province, North of Iran: *Alternaria* brown spot of tangerines and their hybrids, and *Alternaria* black rot of the Navel orange fruits. In this study, infected tissues collected from infected leaves, fruits and young stems of the plants. The tissues were cut to (2×2 mm) pieces and fixed over night at gluteraldehyde and phosphate buffer, post fixation was done with osmium tetroxide, after lyophilization, the specimens were coated with gold and then studied using a SEM (LEO 435). Multiple germ-tubes developed randomly from each conidium and grew in any direction across the leaf and fruit skin surfaces. The hyphal penetration in the plant surface, whether directly through the epidermis or via stomata occurred with or without the appressoria formation. The present study showed that occurrence of the infection was through stomata and direct penetration. Hyphal penetration continued through of the substomata cavity, and then some of hyphal branches grew in the intercellular space of mesophyll tissue. The hyphal products, specially toxins (HST and NHST), caused cell and cell wall damages. None of the hyphal branches were penetrated in to oil glands of the leaves and specially of the fruits. Based on the observations, the oil gland components have had inhibitor roles on the hyphal penetration and development.

**Keywords:** *Alternaria alternata*, Citrus, Electron microscopy, citrus Brown Spot, Thomson Navel Black rot