مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۳، شماره ۲، ۱۳۹۱ (۳۲۲-۳۱۳)

بررسی آثار نیترات و سولفات کلسیم بر میزان مقاومت به بیماری کپک خاکستری ناشی از *Botrytis cinerea* در دو رقم گل سوسن (*lilium* sp.) در گلخانه

معظم حسن پور اصیل[۱]، عبداله حاتم زاده[۲]، سیدعلی الهی نیا[۳]، حبیب اله سمیع زاده لاهیجی[۴] و ولی کریمی[۵*]
۱، ۲، ۳، ٤، ٥، دانشیاران، استاد ، دانشیار و دانشجوی سابق دکتری دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۸ – تاریخ تصویب: ۹۱/۹/۲۹)

چکیده

این آزمایش در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار بر ارقام سوسن بنام های Navona و Fangio با سطوح مختلف سولفات کلسیم در غلظت های ۰ ، ۲/۵ ، ۵ و ۱۰ میلی مول در لیتر و نیترات کلسیم در غلظت های ۰، ۱/۵ و ۲ میلی مول در لیتر انجام گرفت. نتایج نشان داد که اثرات توام منابع نیتراتی و سولفاتی کلسیم باعث افزایش مقاومت به بیماری کپک خاکستری ناشی از *Botrytis cinrea* و همچنین زمان نگهداری پس از برداشت گل شد. نتایج مقایسه میانگین ها نشان داد که اختلافی معنی دار در سطح ۵ ٪ در بین صفات اندازه گیری وجود داشت. کمترین مقاومت به بیماری کپک خاکستری در تیمار شاهد(صفر میلی مول سولفات و نیترات کلسیم) بروز نمود که در این تیمار بیشترین اتیلن به علت پیری زود رس نسوج گل بواسطه حمله بیمارگر تولید شد. شدت بیماری در تمام صفات مورد ارزیابی همبستگی مثبت و تنها با اتیلن همبستگی منفی معنی دار داشت. برهمکنش بین سولفات و نیترات کلسیم و ارقام، نشان داد که آستانه مطلوب تغذیه با نیترات کلسیم در غلظت ۱/۵ میلی مول در لیتر و سولفات کلسیم در غلظت ۵ میلی مول در لیتر برای بروز مقاومت در گل سوسن نسبت به بیماری کپک خاکستری در ارقام مورد بررسی است و در این شرایط بیشترین ترکیبات فنلی گلبرگ و کمترین اتیلن تولید شد. در مجموع، نتایج نشان داد که یکی از روشهای کاهش این بیماری و افزایش ماندگاری در ارقام سوسن، استفاده متعادل از منابع سولفات و نیترات کلسیم می باشد.

واژه های کلیدی : اتیلن، جوانه زنی اسپور، زمان نگهداری، کاهش خسارت، ماندگاری گل

مقدمه

گل سوسن(*Lilium* sp.) متعلق به خانواده *Liliaceae* از مهمترین گلهای شاخه بریده دنیا می باشد(Anderson, 2007). این گل در حراجهای عمده گل در هلند از نظر رتبه فروش چهارمین گل شاخه بریده بشمار می رود (Anonymous, 2011). در حال حاضر گل سوسن از نظر سطح زیرکشت ششمین و از نظر ارزش فروش سومین گل شاخه بریده کشور بشمار می رود که بیشتر در گلخانه کشت می شود (Anonymous, 2010). امروزه واریته های جدید این گیاه از هیبریدهای درون گونه ای سه رقم به اسامی Longiflorum، Asiatic و Oriental بوجود آمده

* نویسنده مسئول: ولی کریمی تلفن: ۰۹۱۲۸۰۲۵۲۸۵ E-mail: golesaati@yahoo.com

اند. مثلا رقم LA از تلاقی رقم Longiflorum و Asiatic می باشد(De Jong, 1974; Comber, 1949). هیبریدهای آسیایی سوسن نسبت به کپک خاکستری حساس، ولی نسبت به بیماری فوزاریوم مقاوم هستند (Gill, 2006; Anderson, 2007). دور نمای برنامه های اصلاحی این گیاه در بخش بیماریها در قرن ۲۱ روی مقاومت به بیماری های ویروسی، بوتریتیس(کپک خاکستری) و فوزاریومی با استفاده از سیستم های اصـــلاح مولکولی و تکنیـــک Genomic in situ hybridization (GISH) می باشد(Anderson, 2007). به دلیل بالا بودن رطوبت داخل گلخانه ها، امکان فعالیت انواع بیماریهای قارچی بخصوص بیماری کپک خاکستری بالا می رود(Jarvis, 1989). کپک خاکستری از مهمترین بیماری گیاهان گلخانه ای بخصوص گل شاخه بریده سوسن است(Albajes *et al*., 2002). این بیماری به انواع قارچکشها مقاوم گردیده درصورت عدم مدیریت صحیح در امر تغذیه بخصوص افزایش کودهای ازته در محلول غذایی سبب افزایش حساسیت گیاه سوسن به کپک خاکستری ناشی از بیماری بوتریتیس می شود و علاوه بر این فعالیت شته ها و مینوزهای برگی گسترش می یابد(Albajes *et al*., 2002). علایم بیماری کپک خاکستری ابتدا به صورت نقاط کم رنگ با حاشیه قرمز در شاخساره، برگ، غنچه گل و گلبرگ ظاهر می شود سپس با پیشرفت بیماری این نقاط به رنگ قهوه ای در آمده و بدنبال آن بافت مرده و در نهایت منجر به مرگ آن می گردد(Elad et al., 2007).

در ایران عوامل بیماری کپک خاکستری سوسن، گونه های *B. elliptica* و *B. cinerea* معرفی شده است(Mirabolfathy, 2004). از یون کلسیم بعنوان مواد مقاوم کننده دیواره سلولی در قبل از برداشت بسیاری از گلها و میوه ها استفاده گردیده است(Montealegre & Valdes, 1993; Gerasopoulos & Chebli, 1999; Volpin & Elad; 1991; Conway et al., 1993; Bartal et al., 2001). کلسیم بعنوان کنترل کننده عامل کپک خاکستری بصورت ترکیبات سولفاتی، نیتراتی و کلرید استفاده شده است بخاطر اینکه این یون از نظر فیزیولوژیکـــی بر میزبـــان و هـــم قـــارچ تـــاثیـــر می گذارد(Volpin & Elad, 1991; Abeles *et al*., 1992). در بیماریهایی که بوسیله قارچ *B. cinerea* ایجاد می شود تصور براین است که کلسیم از فعالیت پلی گالاکترونازها و سایر آنزیمهای پکتیکی جلوگیری می نماید و با کاهش فعالیت آنها تجزیه دیواره ترکیبات تیغه میانی و دیواره سلولی کاهش می یابد(Bateman &Lumsden, 1965; Volpin & Elad, 1991).

در این میان پوست و دیواره سلولی، سدهای مهمی در برابر نفوذ ریسه های قارچ *B. cinerea* هستند(Elad and Evensen, 1995). در بین عناصر، کلسیم تنها عنصری است که به شدت از فعالیت آنزیمهای تجزیه کننده پکتات (پکتولیتیک) موجود در تیغه میانی و دیواره سلولی ممانعت می کند(Marschner,1995). بکارگیری شیوه های مناسب تغذیه ای می تواند دفاع طبیعی گیاهان را در برابر خسارت *B. cinerea* محافظت نماید. بنابراین نحوه تغذیه گیاهان بر عکس العمل آنها به بیماریها تاثیر می گذارد. بطوریکه تعادل تغذیه ای از نظر نسبت و ترکیب عناصر در محلول غذایی بعنوان سلاحی در جلوگیری از بیماری بشمار می رود (Huber & Watson, 1974; Goodman et al., 1986; Dik & Wubben, 2004). اثرات عناصر غذایی نه تنها به نوع میزبان و نیازهای های آن، بستگی دارد بلکه به ترکیب تیتره مورد استفاده از عناصر(به عنوان مثال ترکیب آمونیاکی و یا نیتراتی ازت) نیز بستگی دارد. در مورد کپک خاکستری استفاده از نسبت بالاتر ازت منجر به حساسیت بیشتر گیاه میزبان به آن می شود (Hobbs & Waters, 1964; Verhoeff, 1968; Hoffland et al., 1999; Dik & Wubben, 2004). اما نسبت بالاتر کلسیم عمدتا منجر به کاهش حساسیت به بیماری کپک خاکستری گردیده است (Volpin & Elad, 1991; Elad & Volpin, 1993; Starky & Pedersen, 1997; Bartal et al., 2001).

Kiani (2010) با بررسی تأثیر پتاسیم و کلسیم بر میزان حساسیت گل رز به بیماری کپک خاکستری به این نتیجه رسید که نسبت بیش از ۵ میلی مولار پتاسیم در محلول غذایی باعث افزایش حساسیت به بیماری کپک خاکستری می گردد و این به دلیل کاهش غلظت کلسیم گلبرگ می باشد. همچنین به نتیجه رسید که افزایش غلظت کلسیم در محلول غذایی از ۱/۴ تا ۴/۸ میلی مولار باعث کاهش شدت بیماری از ۲۹/۶ درصد به ۲۴/۶ درصد شد. نشان داده شده که تیمار کلسیمی در

گیاه رز، میزان مقاومت آنها نسبت به بیماری بوتریتیس را افزایش می دهد. کلسیم در مکانیسم مقاومت گیاه به آلودگی توسط این بیماری در زمان پس از برداشت گلها، افزایش ماندگاری گل، باز شدن گل و فرایند پیری آن نقش دارد(Bartal et al., 2001). De Capdeville et al. (2005) با اسپری سولفات کلسیم قبل از برداشت، بر گل شاخه بریده رز به این نتیجه رسیدند که کلسیم باعث افزایش ماندگاری گل و مقاومت آن به بیماری کپک خاکستری می شود. نقش کلسیم در افزایش استحکام دیواره سلولی و تاخیر در فرایند پیری که بر اثر حمله بوتریتیس در محصولات سبزی و صیفی از جمله باقلا و گوجه فرنگی (Elad & Volpin, 1993)، ریحان(Yermiyahu et al., 2006) خیار، بادمجان و فلفل(Elad et al.,1993) بوجود می آید، به اثبات رسیده است. بر اساس تحقیقی که توسط Khazaeli *et al*(2010) برای شناسایی عامل بیماری کپک خاکستری رز با استفاده از خصوصیات مورفولوزیکی و مولکولی کنیدیومها در گلخانه های گل شاخه بریده رز در منطقه محلات، تهران، ورامین و یزد به عمل آمد، مشخص گردید کـــه گونـــه *B. cinerea* می باشد. با توجه به اینکه گل سوسن در کشور ما عمدتا در گلخانه تولید می شود، عدم مدیریت صحیح تهویه و رطوبت درآن منجر به افزایش رطوبت، کاهش تعرق و به دنبال آن کاهش جذب کلسیم توسط گیاه می شود و نیز شرایط آب و هوایی حاکم بر شمال کشور که دارای رطوبت بالاتر از مناطق دیگرمی باشد، امکان جذب کلسیم را در گیاه کم و حمله قارچ عامل کپک خاکستری را افزایش می دهد. بنابراین این تحقیق جهت بررسی اثرات کلسیم بر افزایش مقاومت دو رقم رایج و تجاری از گل سوسن به بیماری کپک خاکستری انجام گرفت.

مواد و روش ها

این طرح در بهار سال ۱۳۸۹ درگلخانه دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل دو رقم از سوسن بنام ناونا(Navona) به رنگ سفید از ارقام آسیایی و فانجیو (Fangio) به رنگ صورتی از هیبرید های ارقام LA، سولفات کلسیم با غلظت های۰ ، ۲/۵ ، ۵ و ۱۰ میلی مول در لیتر و نیترات کلسیم با غلظت های ۰، ۱/۵ و ۲ میلی مول در لیتر بود.

تهیه مواد گیاهی و شرایط رشد گیاه

پیازهای F_1 ارقام انتخابی از کشور هلند و از شرکتهای اونینگ(Oning) و وی دبلیو اس (VWS) تهیه شدند. غلظت کلسیم در پیاز قبل از کشت بطور میانگین ۰/۱ ± ۰/۳۵ درصد وزن خشک پیاز بود. وزن پیازها قبل از کشت برای رقم ناونا(Navona) بطور متوسط ۵± ۵۵ گرم و رقم فانجیو (Fangio) نیز ۵± ۶۵ گرم بود. از هر رقم یک پیاز در گلدانهای پلاستیکی حاوی بستر تجاری به نسبت ۷۰٪ کوکوپیت و ۳۰ ٪ پرلیت کشت شد. گیاهان بعد از کشت از هفته دوم با نیترات کلسیم به غلظت های ۰ ، ۱/۵ و ۲ میلی مول در لیتر بصورت کود آبیاری تغذیه شدند. یک ماه پس از کشت تا زمان برداشت گل، روی برگ و شاخساره هر هفته یک بار به مدت یک ساعت با محلول سولفات کلسیم با غلظت های ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰میلی مول در لیتر همراه با ۰/۰۱ درصد ماده توئین ۲۰ روی گیاهان اسپری شد. در طی رشد رویشی بمدت ۳ روز یکبار بمنظور تغذیه تکمیلی با کود کامل تجاری پلانتا(Planta) بر اساس ترکیبات کودی ماکروها؛ نیتروژن ۱۲ درصد(N)، فسفر ۱۲ درصد(P_2O_5)، پتاسیم ۳۶ درصد (K_2O)، منیزیم ۱درصد (MgO) و میکروها به شکل EDTA مولیبدن ۰/۰۰۱ درصد، منگنز ۰/۰۰۱ درصد، روی ۰/۰۱ درصد، آهن ۰/۰۷۵ درصد، مس ۰/۰۳ درصد و بور ۰/۰۲ درصد به شکلH_3BO4 کود آبیاری شدند. دمای محیط پرورش ۵±۲۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۰-۷۰ درصد و نور فلورسانت با شدت ۴۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه تنظیم گردید. از هر ترکیب آزمایشی بطور تصادفی ۶ شاخه گل (گل شاخه بریده) در ارتفاع ۶۰ سانتی متر بریده شد. به منظور بررسی میزان مقاومت به بیماری کپک خاکســـتـــری در طـــی عمـــر پس از بـــرداشت (ماندگاری)، گیاهان به آزمایشگاه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان انتقال یافتند. همزمان با این آزمایش ، بررسی اثر قارچ *Botrytis cinerea* بعد از برداشت گل در روی برگهای بوته های مایه زنی شده تا ۱/۵- ۱ ماه بعد ادامه یافت.

نمونه برداری و خالص سازی اسپور قارچ بیمارگر

برای این منظور از تعدادی از گلخانه های ژربرا، موجود در شهرستان پاکدشت استان تهران که احتمال داده می شد آلوده به *Botrytis cinerea* باشند، نمونه برداری شد. نمونه های برگ و گل از بوته های مذکور برداشت شد و در پاکت قرارگرفت و سپس به منظور شناسایی، کشت، جداسازی و شناسایی قارچ اسپور های آن، به آزمایشگاه بیماری شناسی منتقل گردید. بعد از اینکه نمونه های برگ و گلبرگ به قطر۵ میلی متر بریده شد و به منظور ضدعفونی سطحی به مدت ۲ دقیقه هیپوکلرید سدیم ۱درصد قرار گرفته و در نهایت با آب مقطرسه بار شستشو گردیدند. نمونه ها بعد از ضدعفونی روی کاغذ صافی استریل به مدت یک دقیقه رطوبت زدایی شدند. برای تهیه محیط کشت قارچ از پودر سیب زمینی دکستروز و آگارPotato Dextrose Agar (PDA) استفاده شد. به این ترتیب که ۳۹ گرم از پودر مذکور را در یک لیتر آب مقطر با دمای ملایم حمام آبی(بن ماری) حل نموده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون شد. بعد از خنک شدن محیط کشت، به زیر هود برده به آرامی داخل پتری دیش ها ریخته شد. قطعات برگ و گلبرگ به قطر ۵ میلی متر ضدعفونی شده دردرون پتری دیش در شرایط دمایی ۲۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۳۰ درصد و ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت نور۲۰ میکرومول در مترمربع بر ثانیه در اتاقک کشت قرار داده شد. بعد از حدود ۱۲ روز از اسپور زایی قارچ، اسپورها را از کاغذ صافی عبور داده تا اقدام به تهیه سوسپاسیون اسپور گردد. اسپورهای تهیه شده دوباره در محیط کشت PDA در اتاقک کشت، باز کشت شدند و پس از جداکردن تک اسپور، بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی ، گونه قارچ بیمارگر شناسایی شد.

مایه زنی گیاهان

اسپورهای تهیه شده سه بار با آب مقطر سترون، شستشو شدند و سپس با عبور دادن از صافی سوسپانسیون آن به غلظت $۱۰^{۴}$ اسپور در هر میلی لیتر آن تهیه شد. بخاطر اینکه قارچ عامل کپک خاکستری در غلظت فوق توان بیماری زایی خوبی دارد(Bartal *et al*., 2001). برای مایه زنی گیاهان با قارچ از هر ترکیب آزمایشی بطور تصادفی، ۶ شاخه بریده از گل سوسن را در اتاق رشد که دارای شرایط محیطی دمای ۲۰ درجه سلسیوس رطوبت ۹۵ درصد و نور دایمی ۲۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه بود، منتقل شدند و سپس در ظروف استوانه ای یک لیتری که تا ۵۰۰ میلی لیتر از آب مقطر پر شده بود، قرار گرفتند. به دنبال آن گیاهان با استفاده از یک افشانه دستی حاوی سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر مایه زنی شدند. به منظور فراهم نمودن شرایط برای جوانه زنی اسپور قارچ مذکور، روی گیاهان با ورقه پلاستکی به مدت ۲۴ ساعت پوشانده شد سپس پوششها را برداشته و رطوبت نسبی محیط به میزان ۵± ۶۵ درصد کاهش داده تا شرایط مشابه فضای گل فروشی برای آنها فراهم شود. به دنبال آن بطور روزانه نسبت به اندازه گیری پیشرفت بیماری (شدت بیماری) تا زمان عمر پس از برداشت گل اقدام شد. شاخساره های گیاهان در گلخانه نیز با سوسپانسیون اسپور *B. cinerea* با استفاده از یک افشانه دستی مایه زنی شدند و اندازه گیری شدت بیماری شاخساره ها به مدت یک و نیم ماه پس از برداشت گلها در گیاه ادامه یافت. برای سهولت در اندازه گیری شدت بیماری عمل رتبه بندی انجام گرفت(Yermiyahu *et al*., 2006). در این رتبه بندی اعداد نشان دهنده شدت آلودگی به بیماری می باشد. این رتبه بندی بصورت (گیاهان بدون آلودگی) ٪۰= ۱ ، ٪۲۰-۱۰ = ۲ ، ٪۳۰- ۲۰ = ۳ ، ٪۴۰-۳۰ =۴ و ٪۵۰-۴۰ = ۵ انجام گرفت. میزان پیشرفت سطوح بیماری با استفاده از رابطه استاندارد AUDPC (Area under disease progress curve) که برابر سطح آلوده شده نسبت به تعداد روزهای زمان آزمایش می باشد، محاسبه شد(Shanner & Finney, 1977). برای اندازه گیری کلسیم، مقدار یک گرم از بافت برگ و گلبرگ را در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت خشک کرده و پس از پودر کردن در بوته چینی ریخته شد و در کوره با دمای ۶۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۶ ساعت حرارت داده تا خاکستر تهیه گردید، سپس با استفاده از هضم توسط اسید کلریدریک۱۰ نرمال از کاغذ صافی عبور داده شد تا عصاره از آن تهیه شود و عصاره حاصل توسط دستگاه جذب اتمی قرائت شد. برای اندازه گیری ازت کل، یک گرم بافت برگ و گلبرگ را داخل ظرف

مخصوص اتوکجلتیک ریخته بعد توسط اسید سولفوریک غلیظ هضم کرده و بعد از عملیات تقطیر و تیتراسیون، در نهایت درصد ازت کل بر روی نمایشگر دستگاه اتوکجلتیک نشان داده شد. برای اندازه گیری اتیلن از دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC) استفاده شد. برای اندازه گیری ترکیبات فنلی و قند های محلول ازدستگاه اسپکتروفتومتری استفاده شد(Emami, 1996). سطح سوختگی برگ و گلبرگ ناشی از*Botrytis cinerea* با استفاده از کاغذ میلی متری محاسبه گردید و سپس درصد آلودگی محاسبه شد. نتایج حاصله با نرم افزار MSTATC تجزیه و تحلیل و برای مقایسه میانگین ها از آزمون LSD و همبستگی بین صفات از نرم افزار SPSS رویه آزمون پیرسون و در نهایت از نرم افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج و بحث

تاثیر سولفات و نیترات کلسیم بر شدت بیماری کپک خاکستری در گل سوسن

با افزایش نسبت های مختلف سولفات و نیترات کلسیم در محلول غذایی شدت پیشرفت بیماری کپک خاکستری در برگ و گلبرگ اثر متفاوت داشت بطوریکه بیشترین پیشرفت بیماری کپک خاکستری در برگ و گلبرگ به ترتیب ۴۰/۳۴ و ۲۸/۵۱ درصد در روز (درصد /روز) در صفر میلی مول در لیتر (شاهد) مشاهده شد. افزایش زود هنگام تولید اتیلن به دلیل پیری زودرس نسوج گل بواسطه حمله قارچ عامل بیماری می باشد(Sharon et al., 2007). همزمان با افزایش سولفات کلسیم تا ۵ میلی مول در لیتر و نیترات کلسیم تا ۱/۵ میلی مول در لیتر پیشرفت بیماری کاهش یافت. بطوریکه کمترین پیشرفت بیماری در برگ و گلبرگ به ترتیب ۲۹/۷۹ و ۲۴/۸۹ درصد /روز رسید که با نتایج تحقیق .Bartal et al (2001) در مورد اثرات کلسیم بر کاهش حساسیت به بیماری کپک خاکستری در گل رز مطابقت داشت. ادامه روند افزایشی سولفات و نیترات کلسیم منجر به کاهش مقاومت به بیماری کپک خاکستری گردید(جدول۱) که مطابق با نتایج پژوهش .Yermiyahu et al (2006) در مورد استفاده از غلظت های متفاوت ازت و کلسیم در گیاه ریحان می باشد. افزایش غلظت کلسیم بصورت نیترات تا ۱/۵ میلی مول در لیتر باعث کاهش جوانه زنی اسپورهای قارچ *B. cinerea* شد. بیشترین میزان ازت در بافت برگ و گلبرگ به ترتیب به میزان ۳/۴۹۷ و ۳/۰۷ برحسب درصد ماده خشک بدست آمد. افزایش ازت کل منجر به افزایش اتیلن درغلظت ۲ میلی مول در لیتر و نیز در غلظت ۱۰ میلی مول در لیتر سولفات کلسیم در گلبرگ شد.

جدول ۱- مقایسه میانگین تاثیر نسبت های مختلف سولفات و نیترات کلسیم بر صفات تاثیر گذار روی شدت بیماری در گل سوسن

غلظت‌سولفات کلسیم (میلی مول)	اتیلن (میکرولیتر بر وزن تر)		کلسیم (درصد ماده خشک)		ازت کل (درصد ماده خشک)		قندهای محلول(میلی گرم بر گرم وزن خشک)		ترکیبات فنلی(میلی گرم برگرم وزن خشک)		شدت بیماری (درصد/روز)	
	گلبرگ	ساقه	گل	گلبرگ	برگ	گلبرگ	برگ	گلبرگ	برگ	گلبرگ	برگ	گلبرگ
۰	۱/۲۲۷ a	۰/۴۱۳ b	۰/۲۲۷ c	۰/۳۸۸ c	۱/۲۹۷ b	۱/۲۰۳ c	۳/۱۰۴ c	۱/۹۸۹ c	۶/۸۰۱ a	۳/۷۲۱ d	۴۰/۳۴ a	۲۸/۵۱ a
۲/۵	۱/۰۵ b	۰/۴۳۵ b	۰/۲۶۲ c	۰/۴۳ c	۱/۴۶ b	۱/۴۷۸ b	۴/۰۵۷ b	۲/۳۸۶ b	۷/۷۶۴ a	۴/۴۹۴ c	۳۷/۹۴ b	۲۷/۹۶ b
۵	۰/۸۰۴ c	۰/۵۹۵ a	۰/۳۸۷ b	۰/۶۷ b	۲/۳۸ a	۲/۲۷۳ a	۴/۶۶۱ a	۳/۲۰۳ ab	۸/۹۰۱ b	۶/۷۶۶ a	۲۹/۷۹ d	۲۴/۸۹ d
۱۰	b ۱/۰۴۴	۰/۶۳۵ a	۰/۴۴۸ a	۰/۷۵ ۹ a	۲/۴۴۱ a	۲/۲۷ a	۴/۶۹۱ a	۳/۴۱۸ a	۵/۳۵ ۷b	۵/۴۵ b	۳۲/۳۳ c	۲۶/۰۲ c
غلظت نیترات کلسیم (میلی مول)												
۰	۱/۰۹۱ a	۰/۴۱۸ c	۰/۲۸۸ b	۰/۴۰۵ c	۱/۴۲۸ c	۱/۵۱۹ c	۳/۰۰۱ c	۲/۱۰۱ c	۶/۵۷ a	۴/۰۰۲ c	۳۸/۲۸ a	۲۹/۹۴ a
۱/۵	۰/۹۸۷ b	۰/۵۳ b	۰/۳۲۲ b	۰/۶۰۵ b	۲/۱۷۱ b	۲/۲۳ b	۴/۸۹۴ b	۲/۸۵۵ b	۶/۸۱۲ a	۷/۸۹۱ b	۳۲/۸۷ c	۲۷/۴۷ b
۲	۱/۰۱۶ b	۰/۵۹۲ a	۰/۳۷۸ a	۰/۶۷۵ a	۳/۴۹۷ a	۳/۰۷ a	۵/۴۶۷ a	۳/۵۹۴ a	۶/۶۱۵ a	۵/۴۴۳ a	۳۴/۱۵ b	۲۹/۸۷ a

میانگین هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک می باشد از لحاظ آزمون چند دامنه ای LSD معنی دار نمی باشد.

بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش مقدار کلسیم بافت های برگ و گلبرگ از طرق مختلف باعث افزایش مقاومت به این بیمارگر شد. به لحاظ اینکه کلسیم باعث پایداری غشاء سلولی شد زیرا کمترین میزان اتیلن گلبرگ به میزان ۰/۸۰۴ و ۰/۹۸۷ مایکرو لیتر بر ساعت گرم وزن تر گلبرگ بترتیب در غلظت های ۵ و ۱/۵

میلی مول در لیتر سولفات و نیترات کلسیم مشاهده شد(جدول ۱). Williamson (1950) و Kepczynski & Kepczynska (1977) نشان دادند که اتیلن به دو دلیل باعث جوانه زنی اسپورهای قارچ *Botrytis cinerea* می گردد یکی اینکه تمام نژادهای قارچ مذکور باعث تولید اتیلن در بافت گیاه می شدند(Qadir et al., 1997; Chagué et al., 2002) و دیگری اینکه اتیلن به رشد کنیدیوم ها و میسلیومهای قارچ بطور موثری کمک می کند(Elad et al., 2007). Smith et al. (1964) گزارش نمودند که مایه زنی قارچ*Botrytis cinerea* به گل داودی باعث افزایش تولید اتیلن در بافتهای گل نسبت به گیاهان غیرتیماری(شاهد)شد. Elad & Volpin (1988) با استفاده از تیمارسولفات کلسیم برای کنترل بیماری کپک خاکستری در گیاهان زینتی رز، شمعدانی به این نتیجه رسیدند که افزایش اتیلن باعث افزایش حساسیت به بیماری کپک خاکستری شد. ضمن مطابقت نتایج فوق با تحقیق حاضر، نتیجه گیری می شود که ارقام گل سوسن که هیچ گونه کلسیمی دریافت نکرده بودند(شاهد) بیشترین میزان اتیلن را تولید کردند و این عمل به دلیل اثر تحریکی قارچ *Botrytis cinerea* و نیز عدم ثبات غشاء و دیواره سلولی در اثر پایین بودن میزان کلسیم از حد مجاز (۰/۵ درصد وزن خشک بافت) می باشد. همچنین به نظر می رسد که این امکان وجود دارد که در زمان تجزیه مواد پکتیکی دیواره سلولی کلسیم بیشتری به فضای آپوپلاست سلولی آزاد می شود در این صورت کلسیم ممکن است در رشد نوک هیف های قارچ*Botrytis cinerea* سهیم باشد (Kaile et al., 1991; Marschner,1995). افزایش ازت بصورت نیترات کلسیم در رژیم غذایی هم باعث کاهش و هم باعث افزایش حساسیت به بیماری کپک خاکستری گردید. ارتباط بین نیتروژن و حساسیت به بیماری کپک خاکستری غیر مستقیم می باشد و این به دلیل نحوه تاثیر پذیری بافتهای آنها به جذب کلسیم و نیز میزان ازت موجود درآنها می باشد. مصرف نیتروژن زیادی (بالاتر از سطح مناسب برای رشد گیاه میزبان) سبب افزایش حساسیت به بیماری می گردد. به دلیل اینکه نیاز به کربن فتوسنتزی و یا کربن موجود برای ترکیبات آلی محلول افزایش می یابد، بنابراین کربن مورد نیاز برای ساخت ترکیبات دفاعی مانند فنلها کاهش می یابد که در نتیجه مقدار مواد لیگنینی و برخی ترکیبات فنلی و نیز تعدادی از آنزیمهای کلیدی در متابولسیم فنل ها کاهش می یابد(Marschner,1995).

فنل ها در حقیقت پیش نیاز لیگنین بوده و کاهش آنها سبب افزایش نسبت بافت های جوان در گیاه می شود. در این تحقیق افزایش نیترات کلسیم بیش از ۱/۵ میلی مول در لیتر در محلول غذایی منجر به کاهش ترکیبات فنلی در برگ و گلبرک گردید(جدول ۱) که مطابق با نتایج پژوهش Yermiyahu et al. (2006) در مورد استفاده از غلظت های متفاوت ازت و کلسیم در افزایش و یا کاهش ترکیبات فنلی در گیاه ریحان در نحوه حساسیت به بیماری کپک خاکستری می باشد. همانطوریکه از جدول ۱ مشاهده می گردد بیشترین میزان قندهای محلول به میزان ۵/۴۶۷ و ۳/۵۹۴ برحسب میلی گرم بر وزن خشک به ترتیب در برگ و گلبرگ درغلظت ۲ میلی مول در لیتر نیترات کلسیم بدست آمد این عمل منجر به افزایش حساسیت در هر دو اندام برگ و گلبرگ نسبت به بیماری کپک خاکستری گردید که علت این پدیده در اثر افزایش منبع ازت (نیترات کلسیم) می باشد(Hobbs & Waters, 1964; Verhoeff, 1968). Dik & Wubben (2004) و Hoffland et al. (1999) درمورد اثرات افزایش ازت در حساسیت به بیماری کپک خاکستری در برگهای گوجه فرنگی نشان داد که افزایش ازت در محلول غذایی حساسیت برگها را نسبت به بیماری کپک خاکستری افزایش داد. این اثر به لحاظ افزایش قندهای محلول در برگهای گوجه فرنگی بود که با میزان حساسیت به بیماری رابطه همبستگی مثبت داشت. همچنین غلظت قندهای محلول در فضای آپوپلاست گیاه میزبان(گوجه فرنگی) به عنوان مهمترین عامل رشد اسپورهای قارچ می باشد(Marschner, 1995). نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق محققین دیگر در مورد استفاده از منابع مختلف کلسیم بر میزان مقاومت به بیماری کپک خاکستری در گل رز (Bartal et al., 2001; De Capdeville et al., 2005; Kiani., 2010) و کیفیت گل سوسن(Mazaheri, 2009) و با تاکید بر اینکه افزایش غلظت کلسیم در گلهای شاخه بریده رز (Torre et al.,

(1999; Mortazavi, 2008 و اورنیتوگالوم (Ornithogalum) (Friedman et al., 2005) باعث کاهش تولید اتیلن شده و آن نیز باعث کاهش خمیدگی ساقه گلدهنده آن درمرحله پس از برداشت گردید، مطابقت دارد.

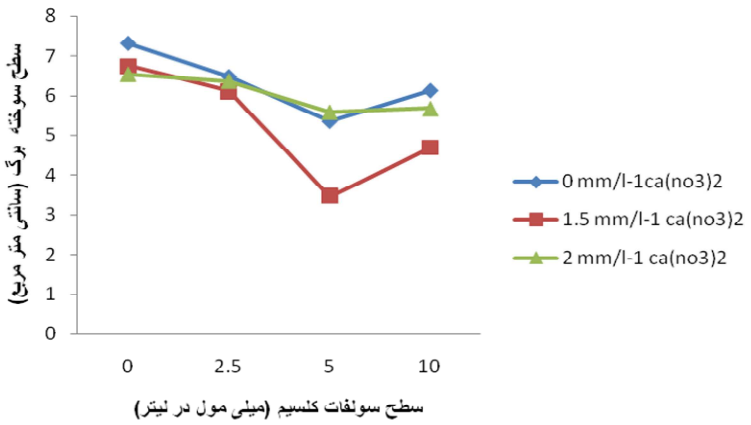
همبستگی و برهمکنش سولفات و نیترات کلسیم بر پیشرفت بیماری کپک خاکستری در گل سوسن

همانطوریکه از نتایج همبستگی صفات مورد ارزیابی در شدت پیشرفت بیماری کپک خاکستری درگل سوسن در جدول۲ مشاهده می شود شدت بیماری در شاخص های مربوط به کلسیم، ازت، ترکیبات فنلی و قندهای محلول همبستگی مثبت و معنی داری داشت به این معنی که افزایش هرکدام از صفات مورد اندازه گیری باعث افزایش مقاومت به بیماری کپک خاکستری در گل سوسن گردید و برعکس با اتیلن همبستگی منفی معنی دار مشاهده گردید. بنابراین با افزایش میزان اتیلن میزان مقاومت به بیماری کپک خاکستری کاهش یافت. همانطوریکه از بر همکنش بین سولفات و نیترات کلسیم در پیشرفت شدت بیماری کپک خاکستری در ارقام مشاهده می گردد (شکل ۱)، ارقام گل سوسن در غلظت۱/۵ میلی مول بر لیتر نیترات کلسیم و ۵ میلی مول بر لیتر سولفات کلسیم کمترین سطح سوختگی (بافت مردگی) را در برگ داشتند بنابراین در این ترکیب تغذیه ای بیشترین مقاومت به بیماری کپک خاکستری در برگ بدست آمد.

جدول ۲ – همبستگی بین صفات اندازه گیری شده در گل سوسن

		کلسیم		ترکیبات فنلی		قندهای محلول		ازت کل		شدت بیماری		اتیلن
		گلبرگ	برگ	گلبرگ	برگ	گلبرگ	برگ	گلبرگ	برگ	گلبرگ	برگ	گلبرگ
کلسیم	گلبرگ	۱										
	برگ	۰/۶۹۳**	۱									
ترکیبات فنلی	گلبرگ	۰/۳۳۸*	۰/۲۱۷ ns	۱								
	برگ	۰/۲۸۹*	۰/۲۴۲*	۰/۷۲۹**	۱							
قندهای محلول	گلبرگ	۰/۶۶۶**	۰/۸۲۹**	۰/۳۳۹*	۰/۳۳۴*	۱						
	برگ	۰/۵۹۸**	۰/۸۰۵**	۰/۲۶۲*	۰/۲۷۷*	۰/۸۸۹**	۱					
ازت کل	گلبرگ	۰/۶۰۴**	۰/۷۲۰**	۰/۲۲۸ ns	۰/۱۳۲ ns	۰/۷۰۴**	۰/۶۲۵**	۱				
	برگ	۰/۶۸۲**	۰/۸۲۵**	۰/۲۳۴*	۰/۱۵۵ ns	۰/۸۲۹**	۰/۷۷۳**	۰/۸۲۷**	۱			
شدت بیماری	گلبرگ	-۰/۱۱۰ ns	-۰/۲۰۸ ns	-۰/۱۶۲ ns	-۰/۲۴۸*	-۰/۱۰۲ ns	-۰/۰۵۷ ns	-۰/۰۵۲ ns	-۰/۱۲۹ ns	۱		
	برگ	-۰/۵۸۳**	-۰/۶۷۵**	-۰/۶۰۷**	-۰/۵۳۳**	-۰/۶۶۵**	-۰/۶۲۹**	-۰/۴۳۲**	-۰/۵۳۲**	-۰/۴۲۵**	۱	
اتیلن	گلبرگ	-۰/۳۴۱*	-۰/۳۵۴*	-۰/۶۲۰**	-۰/۴۲۰**	-۰/۴۳۶**	-۰/۳۵۶**	-۰/۳۰۹**	-۰/۳۱۴**	-۰/۴۲۵**	-۰/۶۳۷**	۱

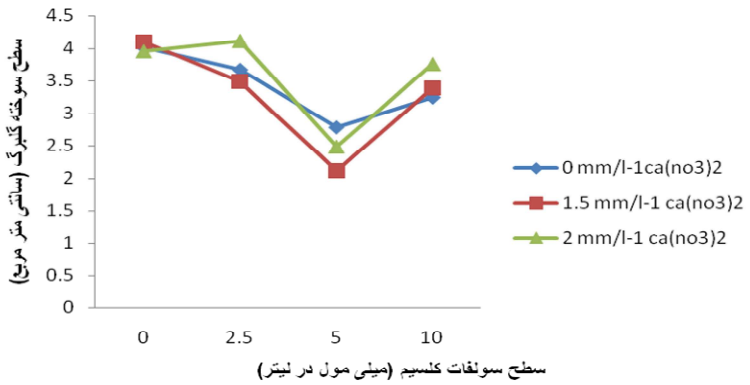
ns= عدم معنی دار ** معنی دار در سطح یک درصد* معنی دار در سطح ۵ درصد



شکل ۱- اثر متقابل سطوح مختلف سولفات و نیترات کلسیم برمیزان سوختگی برگ در اثر خسارت قارچ کپک خاکستری در دو رقم سوسن

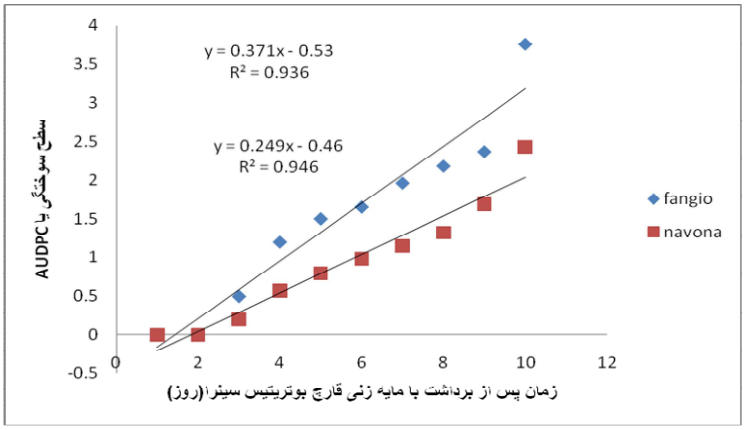
مشابه این نتایج در غلظت های مذکور سولفات و نیترات کلسیم در مورد گلبرگ نیز بدست آمد. بنابراین در بر همکنش(اثر متقابل) بین سولفات و نیترات کلسیم با ارقام کمترین سوختگی گلبرگ به ترتیب در غلظت

۱/۵ میلی مول بر لیتر نیترات کلسیم و ۵ میلی مول بر لیتر سولفات کلسیم مشاهده گردید(شکل ۲).



شکل ۲- اثر متقابل سطوح مختلف سولفات و نیترات کلسیم برمیزان سوختگی گلبرگ دراثر خسارت قارچ کپک خاکستری در دو رقم سوسن

با توجه به ضریب همبستگی بالای سطح سوختگی گلبرگ در ارقام(R^2=94)، می توان نتیجه گیری کرد که تاثیر سولفات و نیترات کلسیم در ارقام گل سوسن مورد آزمایش در افزایش مقاومت نسبت به قارچ *B.cinerea* معنی دار شد. که رقم ناونا مقاومت بیشتری نسبت به رقم فانجیو از خود بروز داد. بعبارت دیگر در زمان عمر پس از برداشت گل سطوح بیشتری از گلبرگ در رقم فانجیو دچار آسیب دیدگی توسط قارچ مذکورشد و این باعث ریزش زود هنگام گلبرگ و کاهش کیفیت گل گردید(شکل ۳).



شکل ۳–اثر متقابل پیشرفت بیماری کپک خاکستری درگلبرگ در زمان عمر گلدهی (ماندگاری) و مقایسه آن در دو رقم سوسن

در سطوح نیترات کلسیم در غلظت ۱/۵ میلی مول در لیتر و سولفات کلسیم در غلظت ۵ میلی مول در لیتر ماندگاری گل در هر دو رقم مورد آزمایش به میزان ۱۰ روز افزایش یافت. این در حالیست که در شرایط طبیعی و بدون هیچ گونه تیمار بهبود عمر گل، ماندگاری گل سوسن بین ۵ الی ۹ روز می باشد (Armitage & Laushman, 2003). در این تحقیق مشخص شد که حساسیت بافتهای برگ و گلبرگ در دو رقم مورد مطالعه نسبت به قارچ *B. cinerea* متفاوت می باشد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که تاثیر سولفات و نیترات کلسیم برای افزایش مقاومت نسبت به بیماری کپک خاکستری، در گلبرگهای رقم ناونا و برگهای رقم فانجیو بیشترین تاثیر را داشته است.

REFERENCES

1. Abeles, F. B., Morgan P. W. & Saltveit, M. E. (1992). *Ethylene in Plant Biology*. Academic Press.
2. Albajes, A., Gullino, M. L., Vanlenteren J. C. & Elad, Y. (2002). *Integrated pest and disease management in greenhouse crops*. Kluwer academic publishers.
3. Anderson, N. O. (2007). *Flower breeding and genetics. issues, challenges and opportunities for the 21st century*. Springer press.
4. Anonymous. (2010). *The Iranian agricultural statistics yearbook*. Ministry of Jihade – Agriculture. (In Farsi)
5. Anonymous. (2011). *The Dutch floriculture sector in figures*. Agriculture Ministry of the Netherlands.
6. Armitage, A. M. & Laushman, I. M. (2003). *Specialty cut flowers, the production of annuals, perennials, bulbs and woody plants for fresh and dried cut flowers* (2nd ed). Timber press.
7. Bartal, A., Rob, B., Ruth, G. N., Aleid, D., Nollie, M., Avner, S., Sara, D., Amram, H., Benny K. & Yigal, E. (2001). Rose flower production and quality as affected by Ca concentration in the petal. *Agronomic*, 21, 393-402.
8. Bateman, D. F. & Lumsden, R. D. (1965). Relation of calcium content and nature of the pectic substance in bean hypocotyls of different ages to susceptibility to an isolate of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 55, 291-296.
9. Chagué, V., Elad, Y., Barakat, R., Tudzynski, P. & Sharon, A. (2002). Ethylene biosynthesis in Botrytis cinerea. *FEMS Microbial Ecology*, 40, 143-149.
10. Comber, H. F. (1949). A new classification of the genus *Lilium*. Lily yearbook. *Royal Horicultural. Society*, 13, 86-105.
11. Conway, W. S., Sams, C. E. & Tobias, R. B. (1993). Reduction of storage decay in apples by post-harvest calcium infiltration. *Acta Horiculturae*, 326, 115-121.
12. De Capdeville, G., Maffia, L. A., Finger, F. L. & Batista, U. G. (2005). Pre-harvest calcium sulfate applications affect vase life and severity of gray mold in cut roses. *Scientia Horiculturae*, 103, 329-338.
13. De Jong, P. C. (1974). Some notes on the evolution of lilies. Lily yearbook, *North American Lily. Society*, 27, 23-28.
14. Dik, A. J. & Wubben, J. P. (2004). Epidemiology of Botrytis cinerea diseases in greenhouses. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N., (eds). *Botrytis: biology, pathology and control*. (pp. 31-317). Kluwer Academic.
15. Elad, Y. & Evensen, K. (1995). Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 85, 637-643.
16. Elad, Y. & Volpin, H. (1988). The involvement of ethylene and calcium in gray mold of pelargonium, ruscus and rose plants. *Phytoparasitica*, 16(2), 119-131.
17. Elad, Y. & Volpin, H. (1993). Reduced development of gray mold (*Botrytis cinerea*) in bean and tomato plants by ca nutrition. *Journal of Phytopathology*, 139, 146-156.
18. Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. & Delen. N. (2007). *Botrytis; biology, pathology and control*. Springer Press.
19. Elad, Y., Yunis, H. & Volpin, H. (1993). Effects of nutrition on susceptibility of cucumber, eggplant and pepper crops to *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Botany*, 71, 602-608.
20. Emami, A. .1996. Methods of plant analysis. *Technical journal of soil and water researches*. p.202. (In Farsi)
21. Friedman, H., Meir, S., Rosenberger, I., Halevy, A. H. & Philosoph-Hadas. S. (2005). Calcium antagonists inhibit bending and differential ethylene production of gravistimulated *Ornithogalum* 'Nova' cut flower spikes. *Postharvest Biology and Technology*, 36, 9-25.
22. Gerasopoulos, D. & Chebli. B. (1999). Effects of pre and postharvest calcium applications on the vase life of cut gerberas. *Journal of Horticultural. Science & Biol*ogy, 74, 78-81.
23. Gill, S. (2006). *Production of the hybrid lilies as cut flowers*. Maryland cooperative extension. Fact sheet. 687.
24. Goodman, R. N., Kiraly, Z. & Wood. K. R. (1986). *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. Colombia, MO, USA: University of Missouri Press.
25. Hobbs, E. L. & Waters, W. E. (1964). Influence of nitrogen and potassium on susceptibility of *Chrysanthemum morifolium* to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 54, 674–6.
26. Hoffland, E., Van Beusichem, M. L. & Jeger, M. J. (1999). Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to Botrytis cinerea. *Plant and Soil*, 210, 263-72.
27. Huber, D. M. & Watson, R. D. (1974). Nitrogen form and plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, 12, 139-65.
28. Jarvis, W. R. (1989). Managing diseases in greenhouse crops. *Plant Disease*, 73, 190-194

29. Kaile, A., Pitt D.& Kuhn, P.J. (1991). Release of calcium and other ions from various plant host tissues infected by different necrotrophic pathogens with special reference to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 38, 275-291.
30. Kepczynski, J. & Kepczynska, E. (1977). Effect of ethylene on germination of fungal spores causing fruit rot. *Fruit Science Reports*, 4, 31-35.
31. Khazeli, p., Zamanizadeh, H., morid,B. & Bayat, H.(2010).morphological and molecular identification of *Botrytis cinerea* casual agent of Gray Mold in Rose greenhouses in central region of iran.*International Journal of Agriculture Science and Research*,1(1),19-24.
32. Kiani, S. H., ghaforzadeh, D., Malakouti, M. J. & Alizadeh, A. (2010). Influence of potassium and calcium in soluble nutrition in order to rose flower for resistance gray mold. *Iranian Journal of Technical, Natural and Soil and Water Sciences.* 51: 117- 127.(In Farsi)
33. Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. Academic press.
34. Mazaheri, H. & Malakouti, M.J. (2009). Remove of leaf calcium deficient in lily. *11th Iranian soil science symposium*. Gorgan University, Gorgan, Iran. (In Farsi)
35. Mirabolfathy, M. (2004). Incidence of botrytis blight of ornamental lilies in greenhouses, *Journal of Plant Pathology*, 4, 85-86. (In Farsi)
36. Montealegre, A. J. R. & Valdes, D. J. M. (1993). Efecto de aplicaciones de calcio en pre´-cosecha sobre la susceptibilidad de frutos de frambuesa a Botrytis cinerea. *Fitopatologia*, 28, 93-98.
37. Mortazavi, S. N., Naderi, R. A., Kafi, M., Khalighi, A., Babalar, M. & Alizadeh, H. (2008). A study of the effects of cytokinin and calcium application on some morphological traits in rosa (Rosa hybrid cv. Illona). *Iranian Journal of Horticultural science*, 39, 137- 145. (In Farsi)
38. Qadir, A., Hewett E. & Long, P. (1997). Ethylene production by Botrytis cinerea. *Postharvest Biology and Technology*, 11, 85-91.
39. Shanner, G. & Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytophatology*, 70, 1183-1186.
40. Sharon, A., Elad, Y., Barakat, R. & Tudzynski, P. (2007). *Botrytis; Biology , pathology and control*. (pp.162-179) Springer.
41. Smith, W. H., Meigh D.F. & Parker, J. C. (1964). Effect of damage and fungal infection on the production of ethylene by carnation. *Nature*, 204, 92-93.
42. Starkey, R. K. & Pedersen, A. R. (1997). Increased levels of calcium in the nutrient solution improve the post-harvest life of potted rose. *Journal of the American Scociety for Horicultural*, 122, 863-868.
43. Torre, S., Borochov, A. & Halevy, A. H. (1999). Calcium regulation of senescence in roses. *Physiologia Plantarum*, 107, 214-219.
44. Verhoeff, K .(1968). Studies on Botrytis cinerea in tomatoes. Effect of soil nitrogen level and of methods of deleafing upon occurrence of B. cinerea under commercial conditions. *The Netherlands Journal of Plant Pathology*, 74, 184-192.
45. Volpin, H. & Elad, Y. (1991). Influence of calcium nutrition on susceptibility of rose flowers to Botrytis blight. *Phytopathology*, 81, 1390-1394.
46. Williamson, C.E. (1950). Ethylene, a metabolic product of diseased or injured plants. *Phytopathology*, 40, 205-208.
47. Yermiyahu, U., Shamai, I., Peleg, R., Dudai, N. & Shtienberg, D. (2006). Reduction of *Botrytis cinerea* sporulation in sweet basil by altering the concentrations of nitrogen and calcium in the irrigation solution. *Plant Pathology*, 55, 544-552.