مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (40) العدد (3) 2018
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (40) No. (3) 2018

Effect of Chitosan in stimulating of olive plant resistance to peacock eye disease caused by: *Spilocaea oleagina* under the artificial infection

Dr. Mohamed Tawil*
Dr. Sabah Al-Maghribi*
Samer Ghanem**

(Received 18 / 3 / 2018. Accepted 25 / 6 /2018)

□ ABSTRACT □

To study the effect of Chitosan in stimulating the resistance of olive plants to the infection of eye peacock caused by the fungus *Spilocaea oleagina*. Olive plants were treated with Chitosan concentration of 300 mg / l. artificial infection was conducted using the fungs spores at different periods on Khadairy variety (susceptible). The infection was done after 2 or 4 weeks of treatment for one time by Chitosan , and two times with a 15 days interval. Copper fungicides (Oxychloro-copper) was used preventively for each treatment. Effectiveness was calculated after 165 days of infection, it was 75.4% and 81.7%, respectively for treatment with Chitosan and infection after 2 or 4 weeks compared with 85.8% and 82.7% for the copper compound. Effectiveness was higher when Chitosan was used for two times (86.9%) compared with the copper compound (88.6%).

The total phenol content and the activity of the peroxidase enzyme in the treated plant were assessed after 3 to 6 months of treatment with Chitosan. The total phenol content and peroxidase enzyme activity was increased compard with the control,whereas the highest value was for two treatments with Chitosan.

Key words : olive, Chitosan, peacock eye spot, *Spilocaea oleagina*, total phenol content, peroxidase enzyme, systemic resistance.

* **Professor, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Latakia, Syria.**
** **postgraduate Student, , Faculty of Agriculture, Tishreen University, Latakia, Syria.**

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (40) العدد (3) 2018
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (40) No. (3) 2018

تأثير المركب Chitosan في تحفيز مقاومة غراس الزيتون للإصابة بمرض عين الطاووس المتسبب عن الفطر *Spilocaea oleagina* تحت ظروف العدوى الاصطناعية

الدكتور محمد طويل*

الدكتورة صباح المغربي*

سامر غانم**

(تاريخ الإيداع 18 / 3 / 2018. قبل للنشر في 25 / 6 / 2018)

□ ملخّص □

لدراسة تأثير المركب Chitosan في تحفيز مقاومة غراس الزيتون للإصابة بمرض عين الطاووس المتسبب عن الفطر *Spilocaea oleagina*. تمت المعاملة بـChitosan بتركيز 300 مغ/ل وتنفيذ العدوى الاصطناعية على فترات مختلفة وذلك على غراس زيتون من الصنف خضيري المعروف بحساسيته للإصابة بالمرض. أجريت العدوى بعد 2 أو4 أسابيع من المعاملة لمرة واحدة بالمركب، أو معاملتين بفارق 15 يوم. كما استخدم مبيد معتمد من مركبات النحاس (أوكسي كلورو النحاس) بشكل وقائي لكل معاملة. حسبت الفاعلية بعد 165 يوم من العدوى وكانت 75.4 و81.7% على التوالي للمعاملة بالمركب والعدوى بعد 2 أو 4 أسابيع مقارنة مع 85.8 و82.7 % للمركب النحاسي، وكانت أعلى فاعلية عند إجراء معاملتين ب Chitosan حيث وصلت إلى 86.9% مقارنة مع 88.6% للمركب النحاسي. تم دراسة تغيرات المحتوى الكلي للفينول ونشاط أنزيم البيروكسيداز في الغراس المعاملة وذلك بعد 3 و6 أشهر من المعاملة بـChitosan ولوحظ زيادة المحتوى الكلي للفينول ونشاط أنزيم البيروكسيداز بالمقارنة مع الشاهد وكانت أعلى قيم لهما عند المعاملة مرتين بالمركب Chitosan.

الكلمات المفتاحية :زيتون، Chitosan، عين الطاووس، *Spilocaea oleagina*، المحتوى الكلي للفينول ، أنزيم البيروكسيداز ، المقاومة الجهازية.

* **أستاذ – قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.**

** **طالب دراسات عليا (دكتوراه) – كلية الزراعة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.**

مقدمة:

تصاب شجرة الزيتون بالعديد من الأفات الزراعية، ويعد مرض عين الطاووس من الأمراض المهمة التي تصاب بها في بلدان البحر المتوسط، وتزداد شدته وانتشاره في البساتين الساحلية والمناطق المجاورة لها، بسبب توافر الظروف البيئية الملائمة لنمو الفطر، وتكمن أهمية المرض في أن معظم أصناف الزيتون المزروعة لا تمتلك صفة المقاومة له، إضافة لعدم اتباع الطرائق الصحيحة لمكافحته في الوقت المناسب (Boulila and Mahjoub,1994).

تم وصف مسبب المرض في جنوب فرنسا من قبل Castagne عام 1845م وسمي ب *Cycloconium oleaginum* ، ذكر Hughes في عام 1953 أن هذا الفطر يتبع الجنس *Spilocaea* وسمي *Spilocaea oleagina* (cast) (أبو عرقوب ,1998)، يسبب المرض أضرار فادحة لشجرة الزيتون وثمارها حيث يقلل من إنتاجيتها إلى حوالي 20% في الحالات الوبائية (Jimene and Diaz, 1985).

يعد مرض عين الطاووس أكثر خطورة في المناطق الرطبة لزراعة الزيتون حيث تمتد فترات الطقس الرطبة مشجعة تطوره وتحدث العدوى بصفة عامة خلال الفترات الرطبة من الخريف مروراً بالشتاء إلى الربيع عندما تكون مستويات اللقاح من البقع هي الأعلى (Viruega and Trapero, 1999 ;Teviotdale and Sibbett, 1995)، وتتطلب العدوى بقاء الأوراق رطبة أو في جو مشبع بالرطوبة لمدة 1–2 يوم تبعاً لدرجة الحرارة ، يكون نمو الممرض محدود في الظروف الجوية الحارة والجافة (Obanor *et al*., 2008; Graniti,1993)، تظهر أعراض المرض بصورة بقع رمادية دائرية يتراوح قطرها بين 0.5 – 1 سم ثم يتشكل داخل هذه البقع دوائر ويصبح لون البقع زيتياً محاطاً بهالة مصفرة ينفصل مركز البقعة عن الهالة بدوائر متداخلة مخضرة فتأخذ شكلاً مشابهاً للعيون الموجودة على ريش الطاووس ومن هنا جاءت تسمية المرض (Graniti,1993).

يؤدي الاستخدام المتواصل للمبيدات الفطرية الكيميائية لمكافحة الأمراض الفطرية إلى تأثيرات بيئية كبيرة ونشوء ظاهرة المقاومة لدى بعض أنواع مسببات الامراض الفطرية مما يتطلب زيادة الطلب على المنتجات الصديقة للبيئة من أجل الحد من أثار انتشار المبيدات المستخدمة في حماية المحاصيل (Coats *et al*., 2003)، إحدى الطرائق المحتملة لتحقيق هذا الهدف هي تحريض مقاومة النبات (Gozzo, 2003; Malolepsza, 2006)، وقد تمت دراسة المقاومة المستحثة على نطاق واسع من أجل السيطرة على العديد من أمراض النباتات باستخدام العديد من المركبات مثل Acibenzolar–S– methyl وحمض السالسيليك المعروفة بفاعليتها لتحريض مقاومة النباتات للأمراض (Percival *et al*., 2009).

يمكن أن تكون المنتجات التي تحفز المقاومة مفيدة في المكافحة البيولوجية لمرض عين الطاووس لأنه من الصعب السيطرة على المرض عن طريق المبيدات الفطرية الوقائية تحت ارتفاع مستويات الإصابة بالمرض، و توفر المقاومة المستحثة الحماية الجهازية ضد الإصابة لتحل محل أو تكمل المكافحة بالمبيدات الفطرية المستخدمة في نظام إدارة متكامل، حيث استخدمت بعض المنتجات مثل Bion, Messenger و KeyPlex من أجل السيطرة على الأمراض الورقية على الأشجار المثمرة (Percival and Haynes,2008).

كما أجريت دراسة لتقييم فاعلية مركبين وهما(Acibenzolar–S–methyl (ASM, Bion وChitosan كمحفز لنبات البطاطا في السيطرة على الذبول الفيرتيسليومي في المختبر وتحت ظروف البيت المحمي، خفض Chitosan النمو الشعاعي للفطر *Verticillium dahliae* في المختبر معنوياً بعد 120 ساعة، في حين لم يقلل المركب ASMإلى حد كبير نمو الممرض في المختبر، كما طبق الرش الورقي ب ASM و Chitosan على شتلات

البطاطا وأظهرت النتائج انخفاض كبير في شدة المرض في كل معاملة وزادت أوزان الدرنات الطازجة، وبالتالي حفز ASM و Chitosan مقاومة نبات البطاطا ضد الإصابة بمرض الذبول الفيرتسيليومي (Amini ,2015).

كما اختبر Obanor وأخرون (2013) عدة مركبات لاستحثاث المقاومة الجهازية المكتسبة لمرض عين الطاووس حيث وجد بان مركبات Salicylic acid, Chitosan, 3-amino butyric acid و Acibenzolar- S- methyl خفضت شدة المرض بنسبة 48- 89 % عند الرش قبل 2 أو 4 أسابيع من العدوى بالممرض ، و بشكل عام أعطت جميع المركبات فاعلية أكبر عند الرش مرتين مقارنة بالمعاملة لمرة واحدة، كما وجد بأن التركيبة التجارية من Chitosan (Elexa) فعالة بدرجة عالية ضد مرض عين الطاووس بتخفيض شدة المرض بنسبة 74-86٪، كما أعطت فاعلية لمكافحة أمراض محاصيل أخرى، حيث خفضت شدة الإصابة بالبياض الزغبي على التبغ (Sharathchandra *et al.*,2004).

مركب Chitosan هو مادة طبيعية مشتق من الكيتين مع خصائص مضادة للفطريات، والتي ثبت فاعليته ضد عدة أنواع من الفطريات (Ziani *et al.*, 2010; Munoz *et al.*, 2009) كما أنه يحث الجينات لإنتاج الفيتوألكسينات النباتية كآلية دفاعية (Martinez Pena Alejandro, 2002)، ويحفز المقاومة الجهازية في النباتات ضد فطريات مختلفة بتراكم مكونات ال Phytoalexins والبروتينات المتعلقة بالإمراضية (PR) وزيادة نشاط الأنزيمات المسؤولة عن المقاومة مثل β-1,3-glucanases و chitinases (Stone *et al.*, 2003; Asgar *et al.*, 2014).

تبين بأن Chitosan يسيطر على إصابة ثمار الفريز ما بعد الحصاد بالفطرين *Botrytis cinerea* و *Rhizopus* sp (Reddy *et al.*, 2000). أشارت الدراسات إلى أن المركب Chitosan يمنع النمو الشعاعي للفطر *Colletotrichum* sp مخبرياً ويمنع بشكل ملحوظ إصابة نبات البندورة بهذا الفطر (Munoz *et al.*, 2009).

كما ساهم مركب Chitosan في تثبيط نشاط الفطر *Fusarium oxysporum* إلى (81.6، 83، 76.6 و 73.3%) عند إضافة Chitosan مع كل من *Trichoderma harzianum*, *T.viride* , *Aspergillus niger* , *Saccharomyces cerevisiae* على التوالي في حين كانت نسب التثبيط بدون إضافة Chitosan (72.2 ، 64.4 ، 38.8 و 22.2%) على التوالي، وأظهرت معاملة نقع بذور البندورة والفليفلة بمزيج (1:1:1) من (السوربات، Chitosan و البنزوات) لفترة 24ساعة فاعلية عالية في حماية النباتات ومنحها مقاومة تجاه الفطرين الممرضين *Fusarium oxysporum* و *F.solani* (شعبان ، 2016).

وجد أن تراكم مركبات الفينول في مواقع العدوى له ارتباط بالحد من تطور الكائن الممرض إذ لها تأثير سمي على الممرض كما يمكن أن تعيق العدوى بالممرض بزيادة صلابة جدر الخلايا (Benhamou *et al.*,2000)، كما يوجد ارتباط بين تركيز الفينولات ومقاومة النبات للممرضات في محاصيل عديدة فتراكم وتأكسد مركبات الفينول يمكن أن يكون مرتبط بأليات الدفاع في النبات والذي يعرف بأنه يزداد خصوصاً أثناء الإصابة الفطرية، إذ ثبت قدرة هذه الفينولات على تشكيل معقدات غير ذائبة والتي بدورها تتأكسد إلى عناصر سامة تؤثر بشكل كبير على الكائن الممرض (Anjum *et al.*,2012)، و تعد المركبات الفينولية منتجات استقلابية ثانوية، فهي تلعب دورا مهما في النمو وحماية النبات من الممرضات (Balasundram *et al.*,2006). إن زيادة تراكم الفينول يؤدي لزيادة تركيب بروبان الفينيل الذي يدخل في تركيب اللجنين، فتراكم مركبات الفينول واللجنين له ارتباط بمقاومة النبات للعديد من الممرضات،

كالممرض *Fusarium graminearum* على القمح والممرض *Pythium aphanidermatum* على الخيار (Manila and Nelson,2014).

يملك أنزيم البيروكسيداز دوراً في زيادة مقاومة النبات للكائنات الممرضة من خلال دوره في زيادة سماكة الجدار الخارجي لخلايا بشرة النبات نتيجة لحدوث ترسبات من مواد يصعب تحليلها بوساطة الفطور كاللجنين الذي يعترض عضو اختراق الفطر (Seleim *et al.*,2014) ، إن زيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز يزيد من نشاط أنزيم أوكسيداز فينول المسؤول عن زيادة محتوى النبات من الفينول و لكلا الأنزيمين دوراً في مقاومة النبات للممرضات حيث لهما علاقة في أكسدة المركبات الفينولية إلى مركب الكينون السام للممرضات (Manila and Nelson,2014)، وجد Chittoor وأخرون (1999) و Ebrahim وأخرون (2011) أن زيادة الأنزيمات النباتية ومنها إنزيم البيروكسيداز يمكن أن تترافق مباشرة بالقدرة المتزايدة على حماية الأنسجة جهازياً باللجننة عند مهاجمة النباتات بالممرضات النباتية.

أهمية البحث وأهدافه:

تأتي أهمية البحث من الأهمية الاقتصادية لشجرة الزيتون في سورية، بالإضافة إلى الحالة الوبائية التي يظهر بها مرض عين الطاووس في بعض السنوات، وضرورة إيجاد طرائق لمقاومة المرض ذات فاعلية جيدة ومجدية اقتصادياً وأكثر أماناً على البيئة من أجل الحد من أثار انتشار المبيدات ولذلك هدف البحث إلى التعرف على تأثير Chitosan في تحفيز مقاومة غراس الزيتون للإصابة بمرض عين الطاووس المتسبب عن الفطر *S. oleagina*.

طرائق البحث ومواده

تم إجراء التجربة وفقاً لطريقة Obanor وآخرون (2013) على غراس زيتون بعمر سنتين من الصنف خضيري المعروف بحساسيته للإصابة. زرعت الغراس في أكياس بلاستيكية كبيرة الحجم، ووضعت في بيت مغطى بالفايبر كلاس لتوفير الظروف المناخية الملائمة. أجريت التجربة بمعدل ثلاثة مكررات لكل معاملة و4 غراس في كل مكرر، حيث تمت المعاملة بـChitosan (مستحضر تجاري(مسحوق)، شركة PubChem CID USA) لمرة واحدة قبل 2 أو 4 أسابيع من العدوى بالفطر، أو المعاملة مرتين بفارق 15 يوماً وإجراء العدوى بعد 4 أسابيع من المعاملة الأولى وذلك في خريف2016 . تمت المعاملة ب Chitosan بواسطة مرش يدوي بمعدل 15 مل لكل نبات (300 ميليغرام Chitosan لكل 1ل ماء (Obanor *et al.*,2013)، تم إذابته بمحلول حمضي (حمض الخل) تركيز 2% حسب تعليمات الشركة المصنعة)، تم رش الشاهد غير المعامل بالماء المعقم، وخصصت معاملة بمبيد معتمد وهو أوكسي كلور النحاس المستخدم في مكافحة مرض عين الطاووس (Obanor *et al.*,2008). حضر المعلق البوغي من الفطر في يوم التلقيح بتركيز 5×10^4 بوغ/مل عن طريق غسل أوراق زيتون مصابة بالفطر بشكل طبيعي (Obanor *et al.*,2008). رش المعلق على النباتات على شكل رذاذ، وتمت تغطية الغراس بأكياس بولي إيثلين وذلك لزيادة الرطوبة النسبية وتوفير رطوبة كافية للإصابة لمدة 48 ساعة، بعد ذلك تم تشغيل نظام رش تلقائي علوي (ري ضبابي) يعمل لمدة 10 ثوان كل 20 دقيقة.

تمت مراقبة النباتات لملاحظة ظهور الإصابة وتطورها، وتسجيل مساحة السطح المصاب على جميع الأوراق المصابة لكل غرسة لتقدير شدة المرض (Obanor *et al.*,2010)، تم أخذ 6 قراءات بفاصل 15 يوماً بين

القراءة والأخرى ابتداء من 10-2-2017 حتى 27-4-2017 حيث لوحظ توقف تطور الإصابة على معاملة الشاهد بعد هذا التاريخ.

تم حساب نسبة الإصابة من المعادلة التالية:

$$N/100 \times n = (\%)\ P$$

حيث أن P: النسبة المئوية للأوراق المصابة في كل غرسة.

n: عدد الأوراق المصابة في كل غرسة.

N: العدد الكلي للأوراق في كل غرسة.

بعد ذلك تم حساب متوسط نسبة الإصابة لكل مكرر وكل معاملة.

حسبت شدة الإصابة باستخدام سلم خماسي وفق التالي (الشعبي وآخرون ،2012):

الدرجة	مساحة السطح المصاب (%)
0	لا توجد إصابة.
1	تصل حتى 10% من سطح الورقة.
2	تتراوح بين 11- 25% من سطح الورقة.
3	تتراوح بين 26 -50 % من سطح الورقة.
4	تزيد على 50% من سطح الورقة.

وتم حساب شدة الإصابة باستخدام المعادلة التالية (Tchymakova,1974):

$$DI\ (\%) = \sum ab\ X\ 100/N\ X\ k$$

حيث أن DI: شدة الإصابة (%).

a: درجة الإصابة وفقاً لسلم التقييس.

b: عدد الأوراق المصابة بهذه الدرجة في كل غرسة، ثم لغراس كل معاملة على حده.

N: العدد الكلي للأوراق في كل غرسة، ثم لغراس كل معاملة على حده.

K: القيمة العظمى لسلم التقييس وتساوي في هذه الحالة 4.

وتم حساب الفاعلية بعد 135 و165 يوم من العدوى من المعادلة التالية:

$$\textbf{الفاعلية (\%)} = \frac{\text{شدة الإصابة عند الشاهد - شدة الإصابة عند المعاملة}}{\text{شدة الإصابة عند الشاهد}} \times 100$$

تقدير المحتوى الكلي للفينول:

تم تقدير المركبات الفينولية الكلية باستخدام طريقة كاشف الفولين (Singleton and Rossi,1965)، بأخذ 2 غرام من أوراق طازجة من كل معاملة وطحنها في جفنة بورسلان وإضافة 15 مل من الكحول الإيثيلي 80% رشح المزيج من خلال ورق ترشيح ووضعت الرشاحة ضمن مثفلة على سرعة 10000 دورة/دقيقة ولمدة 15 دقيقة. جمعت المواد الطافية وأعيد الاستخلاص مرتين بالكحول والترشيح. جفف المستخلص الإيتانولي هوائياً على درجة حرارة الغرفة لقرب الجفاف ثم أضيف إليه 5 مل ماء مقطر. حضر محلول كربونات الصوديوم Na2CO3 (200 غ/ل)، وكاشف

فولين (Merck, Germany)، ومحلول حمض الكاتيكول القياسي (CHEMIE–LOBA, India) الذي حضر بتركيز 1 غ/ل. تمّ القياس أولاً بتحضير سلسة عيارية من حمض الكاتيكول بتراكيز تتراوح بين 0 و 400 مغ/ليتر. أخذ 20 ميكروليتر من المستخلص المحضر سابقاً أو محاليل السلسة العيارية (واستبدلت العينة بالميتانول 70% في الشاهد) وأضيف إليها 100 ميكروليتر من كاشف الفولين و 1.58مل من الماء المقطر. حُرِّك المزيج بعد ذلك جيداً ومن ثم ترك لمدة 5 دقائق ليضاف بعدها 300ميكروليتر من محلول كربونات الصوديوم 200غ/ل، ثم تُرك المزيج في الظلام لمدة ساعة ونصف، وقيست بعدها الامتصاصية الضوئية للمحلول الناتج باستخدام جهاز المطياف الضوئي (JASCO –اليابان) عند طول موجة 650 نانوميتر.

تقدير نشاط أنزيم البيروكسيداز:

قدر نشاط أنزيم البيروكسيداز حسب طريقة Hammerschmidt وأخرون (1982)، أخذ 1غ عينة نباتية طازجة ، وأضيف لها 3 مل محلول فوسفاتي منظم Phosphate buffer pH= 7 تركيز 0.1 مولاري ، ووضعت ضمن جفنة بورسلان وطحنت بالهاون، ثم وضع الناتج ضمن أنبوب سعته 1.5 مل ثم ثفلت لمدة 10 دقائق على سرعة 15000 دورة/دقيقة عند درجة حرارة 4 ْس ، تم استخدام المادة الطافية كمصدر للأنزيم وقيس نشاط أنزيم البيروكسيداز بعد إضافة 1.5 مل بيروغالول Pyrogallol 5 مولاري و0.5 مل من 1% ماء أوكسجيني و0.5 مل من المستخلص الإنزيمي، حضن مزيج التفاعل عند درجة حرارة (28 ْس). تم القياس عند طول موجة 420 نانوميتر وأخذت القراءة كل 30 ثانية لمدة 3 دقائق. قدر نشاط أنزيم البيروكسيداز بعدد ميكرومولات الماء الأوكسجيني التي تتفكك بواسطة 100 مغ من النسيج النباتي الداخل في تشكيل المستخلص الإنزيمي في الدقيقة الواحدة عند درجة حرارة 25 ْس (Behera *et al.*,2012) وقُدر نشاط أنزيم البيروكسيداز وفق المعادلة:

$$\text{نشاط أنزيم البيروكسيداز} = \frac{\text{عامل التمديد} \times \text{كمية الماء الأوكسجيني}}{\text{حجم العينة} \times \text{الزمن}}$$

كمية الماء الأوكسجيني المنخفضة بين الزمن الأولي والنهائي مقدرة بالنانومول = الامتصاصية عند الزمن 3 دقيقة – الأمتصاصية عند الزمن 0.5 دقيقة.

حجم العينة مقدرة بالمليلتر.

زمن التفاعل: الوقت النهائي (3دقائق) – الوقت البدائي (0.5 دقيقة).

حللت النتائج احصائياً باستخدام برنامج Genstat 12 بالاعتماد على قيم Lsd عند مستوى 5%.

النتائج والمناقشة:

1- نسبة الإصابة:

يبين الجدول 1 تطور نسب الإصابة للمعاملات المختلفة فنلاحظ من هذه النتائج أن نسبة الإصابة في معاملة الشاهد كانت 11.8% بعد 90 يوم وارتفعت بشكل تدريجي خلال مراحل التجربة لتصل إلى 56.9% بعد 165 يوم أما بالنسبة لمعاملة Chitosan وعدوى بعد 2 أسبوع فبلغت 5.65% بعد 90 يوم من العدوى وارتفعت إلى 17.9 % بعد 165يوم وبالنسبة لمعاملة نحاس وعدوى بعد 2 أسبوع بالمعلق البوغي فقد بلغت النسبة 1.1 % بعد 90 يوم و 8.0% بعد 165 يوم وتعبر هذه القيم عن انخفاض نسبة الإصابة بالمقارنة مع الشاهد في نهاية التجربة بمقدار 38% للمعاملة بالمحفز Chitosan و 48.9% للمركب النحاسي.

بالنسبة لمعاملة Chitosan وعدوى بعد 4 أسابيع من المعاملة نجد بأن نسبة الإصابة كانت 2.6 % بعد 90 يوم من العدوى ووصلت بعد 165 يوم إلى 13.6 % أما بالنسبة لمعاملة النحاس بلغت بعد 165 يوم من العدوى 14.5% وبالتالي أدت المعاملة ب Chitosan وعدوى بعد 4 أسبوع إلى انخفاض نسبة الإصابة في نهاية التجربة بالمقارنة مع الشاهد بمقدار 43.3% في حين بلغت 42.4% في المركب النحاسي بعد 165 يوم من العدوى.

أما في معاملة Chitosan مرتين وعدوى بعد 4 أسابيع من المعاملة الاولى فنجد ارتفاع نسب الإصابة بشكل طفيف في القراءات الأربع الأولى ووصلت إلى 8.6 % في القراءة بعد 165 يوم مقارنة مع 5.1% لمعاملة النحاس، وبالتالي كانت أفضل المعاملات عند إجراء معاملتين Chitosan بفارق 15 يوم وعدوى بعد 4 أسابيع من المعاملة الأولى حيث ساهمت في خفض نسبة الإصابة بعد 165 يوم بمقدار 48.3% مقابل 51.8% عند المعاملة مرتين بالنحاس.

جدول (1): نسب الإصابة للمعاملات المختلفة خلال مراحل التجربة بعد العدوى بالفطر *S. oleagina*.

زمن العدوى	المعاملات	نسبة الإصابة (%)					
		بعد 90 يوم	بعد 105 يوم	بعد 120 يوم	بعد 135 يوم	بعد 150 يوم	بعد 165 يوم
معاملة واحدة قبل 2أسبوع من العدوى	Chitosan	5.6 b	15.2 b	19.2 b	25.5 b	18.7 b	17.9 b
	معاملة النحاس	1.1 e	4.1 d	5.7 e	11.5 e	8.4 d	8.0 de
معاملة واحدة قبل 4 أسابيع من العدوى	Chitosan	2.6 cd	8.5 c	12.3 c	16.3 d	14.5 c	13.6 c
	معاملة النحاس	3.1 c	8.3 c	14.2 c	20.1 c	16.8 bc	14.5 c
معاملتين بفارق 15 يوم قبل العدوى	Chitosan	1.6 de	5.6 d	8.7 d	11.3 e	9.7 d	8.6 d
	معاملة النحاس	0.5 e	3.9 d	5.4 e	9.1 e	5.3 e	5.1 e
الشاهد		11.8 a	24.3 a	34.6 a	47.8 a	56.8 a	56.9 a
Lsd 5 %		1.253	1.908	2.873	2.861	2.970	2.931

وبنتيجة التحليل الإحصائي في نهاية التجربة (بعد 165 يوم من العدوى) نلاحظ تفوق جميع المعاملات معنوياً على الشاهد وتفوق معاملة النحاس والعدوى بعد 2 أسبوع معنوياً على معاملة Chitosan والعدوى بعد 2 أسبوع، وعدم وجود فروق معنوية بين Chitosan والعدوى بعد 4 أسابيع ومعاملة النحاس في حين وجد فرق معنوي بين معاملة النحاس مرتين وبين معاملة Chitosan مرتين والعدوى بعد 4 أسابيع من المعاملة الأولى.

2-شدة الإصابة:

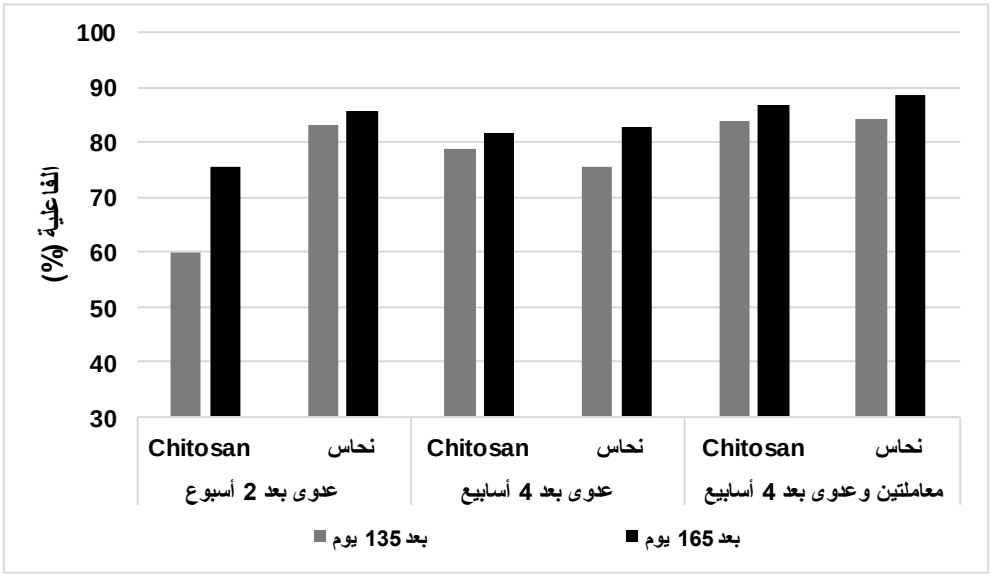
نلاحظ من الجدول2 توافق نتائج شدة الإصابة للمعاملات المختلفة مع نتائج نسب الإصابة من حيث تطور المرض، كانت شدة الإصابة في أوراق الشاهد 7.1% بعد 90 يوم وازدادت مع الزمن لتصل إلى 41.1% بعد 165 يوم أما في بقية المعاملات زادت شدة الإصابة بعد 135 يوم من العدوى ثم انخفضت بشكل تدريجي حتى نهاية التجربة (165 يوم من العدوى) بسبب تشكل أوراق جديدة على الغراس المعاملة لم تظهر عليها أعراض المرض، حيث بلغت شدة الإصابة بعد 165 يوم 10.0% في معاملة Chitosan والعدوى بعد 2 أسبوع مقارنة مع 5.8% لمعاملة النحاس، وبلغت 7.4% في معاملة Chitosan والعدوى بعد 4 أسابيع مقارنة مع 7.1% في معاملة النحاس، وكانت أفضلها عند إجراء معاملتين ب Chitosan(5.3% مقابل 4.7% لمعاملة النحاس).

جدول (2): شدة الإصابة للمعاملات المختلفة خلال مراحل التجربة بعد العدوى بالفطر *S. oleagina*.

زمن العدوى	المعاملات	شدة الإصابة (%)					
		بعد 90 يوم	بعد 105 يوم	بعد 120 يوم	بعد 135 يوم	بعد 150 يوم	بعد 165 يوم
معاملة واحدة قبل 2أسبوع من العدوى	Chitosan	2.4 ^{b}	8.2 ^{b}	10.3 ^{b}	15.1 ^{b}	13.6^{b}	10.0 ^{b}
	معاملة النحاس	0.5^{cd}	3.1 ^{c}	3.9 ^{cd}	6.4 ^{d}	6.1 ^{c}	5.8 ^{cd}
معاملة واحدة قبل 4 أسابيع من العدوى	Chitosan	1.1 ^{c}	3.9 ^{c}	5.6 ^{c}	8.0 ^{cd}	7.5 ^{c}	7.4 ^{c}
	معاملة النحاس	1.3 ^{c}	4.1^{c}	6.1 ^{c}	9.2 ^{c}	7.5 ^{c}	7.1 ^{cd}
معاملتين بفارق 15 يوم قبل العدوى	Chitosan	0.6 ^{cd}	2.3 ^{c}	4.0 ^{cd}	6.1 ^{d}	5.9 ^{c}	5.3 ^{cd}
	معاملة النحاس	0.1^{d}	2.6^{c}	3.1^{d}	5.9^{d}	5.0^{c}	4.7^{d}
الشاهد		7.1^{a}	19.7^{a}	26.9^{a}	37.7^{a}	39.9^{a}	41.1^{a}
Lsd 5 %		0.891	1.884	2.094	2.080	2.735	2.303

وبنتيجة التحليل الإحصائي نلاحظ في نهاية التجربة (بعد 165 يوم من العدوى) تفوق جميع المعاملات معنوياً على الشاهد، في حين كان هناك فرق معنوي بين معاملة Chitosan والعدوى بعد 2 أسبوع ومعاملة المبيد النحاسي وعدم وجود فروق معنوية لبقية المعاملات.

يبين الشكل 1 فاعلية المعاملة بالمركب Chitosan بعد 135 و165 يوم من العدوى بأبواغ الفطر المسبب لمرض عين الطاووس بالمقارنة مع المركب النحاسي.



الشكل (1): فاعلية المعاملة بالمركب Chitosan بعد 135 و165 يوم من العدوى بأبواغ الفطر المسبب لمرض عين الطاووس بالمقارنة مع المركب النحاسي.

نلاحظ من الشكل 1 بأن الفاعلية في القراءة بعد 135 يوم لمعاملة Chitosan والعدوى بعد 2 أسبوع بلغت 59.8 % في حين وصلت إلى 83.0% في معاملة النحاس، بالنسبة لفاعلية المعاملة بالمركب Chitosan والعدوى

بعد 4 أسابيع كانت 78.7 % مقارنة مع 75.5% في معاملة النحاس، وكانت أفضلها عند إجراء معاملتين ب Chitosan حيث وصلت الفاعلية إلى 83.8 % مقابل 84.2% عند المعاملة مرتين بالنحاس.

بالنسبة للفاعلية في نهاية التجربة (بعد 165 يوم من العدوى) بلغت في معاملة Chitosan والعدوى بعد 2 أسبوع 75.4 % في حين كانت 85.8% في معاملة النحاس وبلغت 81.7 % عند المعاملة بـChitosan والعدوى بعد 4 أسبوع مقابل 82.7% في معاملة النحاس وكانت أفضل النتائج عند إجراء معاملتين بـChitosan بفارق 15 يوم حيث وصلت الفاعلية إلى 86.9 % في حين كانت 88.6% عند المعاملة مرتين بالنحاس، وبمقارنة هذه النتائج في نهاية التجربة نلاحظ بأن معاملة Chitosan والعدوى بعد 2 أسبوع أقل من حيث الفاعلية من معاملة النحاس في حين كانت فاعلية Chitosan والعدوى بعد 4 أسابيع متقاربة من معاملة النحاس وكانت أفضلها عند إجراء معاملتين ب Chitosan بفارق 15 يوم وكانت متقاربة مع معاملة النحاس، ونلاحظ أن فاعلية Chitosan ازدادت بعد 165 يوم من العدوى بالمقارنة مع الفاعلية بعد 135 يوم، تتوافق نتائجنا مع نتائج Obanor وأخرون (2013) حيث وجدوا بأن محفزات المقاومة كانت فعالة عندما طبقت المعاملات قبل التلقيح بـ 2 أو 4 أسبوع، و بشكل عام كانت المحفزات أكثر فاعلية في الحد من شدة المرض عندما عوملت النباتات مرتين مما كانت عليه عندما عوملت مرة واحدة قبل التلقيح ، كما وجد بأن Chitosan خفض شدة الإصابة بمرض عين الطاووس بنسبة 74-86٪، و أعطى فاعلية لمكافحة أمراض محاصيل أخرى، فخفض شدة الإصابة بالبياض الزغبي على التبغ بنسبة 58٪ عند استخدامه كمعاملة البذور و بنسبة 75٪عند استخدامه كرش ورقي (Sharathchandra *et al.*,2004)، و أشارت الدراسات إلى أن Chitosan يمنع بشكل ملحوظ الإصابة ب *Botrytis cinerea* و *Plasmopara viticola* على الكرمة (Ben-Shalom and Fallik, 2003)، على نحو مماثل أدى استخدام ثمانية تطبيقات من Chitosan على الكرمة خلال الموسم إلى انخفاض معدل الإصابة بالبياض الزغبي بنسبة 50٪ والبياض الدقيقي بنسبة 75٪ مقارنة مع الشواهد غير المعاملة (Schilder *et al.*, 2002). كما خفضت معاملة بذور عباد الشمس ب Chitosan شدة الإصابة بالبياض الزغبي في ظل ظروف البيت البلاستيكي والحقل بنسبة 46 و52٪، على التوالي (Nandeeshkumar *et al.*, 2008).

3-تأثير المعاملة بالمركب Chitosan في نشاط أنزيم البيروكسيداز وفي المحتوى الكلي للفينول:

وجد من خلال الجدول (3) زيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز في أوراق غراس الزيتون مع التقدم بالزمن وزيادة نشاطه في معاملات المحفز الكيميائي المعداة بالمقارنة مع الشاهدين السليم والمصاب بعد 3 و6 أشهر من المعاملة بالمحفزات، وتفوقت المعاملة بالمحفز مع إجراء العدوى معنوياً على باقي المعاملات ، وكان أعلى نشاط للأنزيم عند المعاملة مرتين ب Chitosan بعد 3 و6 أشهر من المعاملة، إذ بلغ نشاط أنزيم البيروكسيداز 0.0636 و 0.1324 نانومول على التوالي، تلاه العدوى بعد 4 أسابيع فبلغت بعد 3 و6 أشهر من المعاملة بالمحفزات 0.0264 و0.0926 نانومول على التوالي، في حين بلغت 0.0163 و 0.0716 على التوالي عند العدوى بعد 2 أسبوع، بالمقارنة مع0.0064 و0.0088 نانومول بعد 3 أشهر للشاهد السليم والمصاب و 0.0334 و0.0584 نانومول بعد 6 أشهر على التوالي، كما تبين تفوق المعاملة مرتين معنوياً على معاملة لمرة واحدة بعد 2 أو 4 أسابيع وذلك بعد 3 أشهر و 6 أشهر من المعاملة بالمحفزات، و كان هناك فرق معنوي بين المعاملة ب Chitosan وعدوى

بعد2 أسبوع والعدوى بعد 4 أسابيع بعد 3 أشهر من المعاملة في حين لم يكن هناك فرق معنوي بين المعاملتين في القراءة بعد 6 أشهر.

جدول (3) تأثير المعاملة بالمركب Chitosan والمركب النحاسي في نشاط أنزيم البيروكسيداز(نانومول) في أوراق غراس الزيتون.

زمن العدوى	المعاملات	نشاط أنزيم البيروكسيداز (نانومول) في أوراق غراس الزيتون	
		بعد 3 أشهر من المعاملة ب Chitosan والنحاس	بعد 6 أشهر من المعاملة ب Chitosan والنحاس
معاملة واحدة قبل 2أسبوع من العدوى	Chitosan	0.0163 ^{c}	0.0716 ^{ab}
	معاملة النحاس	0.0082 ^{ab}	0.0652 ^{ab}
معاملة واحدة قبل 4 أسابيع من العدوى	Chitosan	0.0264 ^{d}	0.0926 ^{b}
	معاملة النحاس	0.0086 ^{ab}	0.0548 ^{a}
معاملتين بفارق 15 يوم قبل العدوى	Chitosan	0.0636 ^{e}	0.1324 ^{c}
	معاملة النحاس	0.0091 ^{b}	0.0629 ^{ab}
الشاهد السليم		0.0064 ^{ab}	0.0334 ^{a}
شاهد معدى		0.0088 ^{ab}	0.0584 ^{ab}
معاملة تشيتوسان مرة واحدة بدون عدوى		0.0051 ^{a}	0.0421 ^{a}
معاملة تشيتوسان مرتين بدون عدوى		0.0068 ^{ab}	0.0461 ^{a}
LSD 5%		0.0034	0.0335

تتوافق النتائج المتحصل عليها في هذا البحث مع نتائج بعض الباحثين حيث وجد بأن أنزيم البيروكسيداز يملك دوراً في زيادة مقاومة النبات للكائنات الممرضة من خلال دوره في زيادة سماكة الجدار الخارجي لخلايا بشرة النبات نتيجة لحدوث ترسبات من مواد يصعب تحليلها بواسطة الفطور كاللجنين الذي يعترض عضو اختراق الفطر (Seleim *et al.*,2014) ، كما إن زيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز يزيد من نشاط أنزيم أوكسيداز فينول وهو المسؤول عن زيادة محتوى النبات من الفينول و كلا الأنزيمين لهما دوراً في مقاومة النبات للممرضات حيث لهما علاقة في أكسدة المركبات الفينولية إلى مركب الكينون السام للممرضات (Manila and Nelson,2014). كما وجد Chittoor وآخرون (1999) و Ebrahim وأخرون (2011) أن زيادة الأنزيمات النباتية ومنها إنزيم البيروكسيداز يمكن أن تترافق مباشرة بالقدرة المتزايدة على حماية الأنسجة جهازياً باللجنة عند مهاجمة النباتات بالممرضات النباتية.

تبين النتائج زيادة في كمية الفينولات الكلية (جدول 4) داخل النبات في كل معاملات Chitosan المعداة بالمقارنة مع بقية المعاملات في حين كانت القيم متقاربة بين الشواهد ومعاملات النحاس، حيث كانت أفضلها عند المعاملة مرتين حيث بلغت 14.7 مغ/غ بعد 3 أشهر من المعاملة بالمحفزات في حين وصلت إلى 41.6 مغ/غ بعد 6 أشهر مقابل 6.1 و20.3 مغ/غ على التوالي لمعاملة النحاس.

أما بالنسبة للمعاملة بـChitosan والعدوى بعد 4 أسابيع بلغ المحتوى الكلي للفينول 12.4مغ/غ بعد 3 أشهر و36.6 مغ/غ بعد 6 أشهر وكانت 5.7 و19.2 مغ/غ لمعاملة النحاس.

وفي معاملة المحفز والعدوى بعد 2 أسبوع وصلت إلى 10.1 و30.5 مغ/غ بعد 3 و6 أشهر على التوالي وكانت 5.8 و19.5 مغ/غ على التوالي في معاملة النحاس.

كما كانت القيم متقاربة بين الشواهد (السليم – المعدى – المعامل بالمحفزات فقط) ولم تتجاوز 8.0 مغ/غ بعد 3 أشهر و24.3 مغ/غ بعد 6 أشهر، وهي منخفضة بالمقارنة مع المعاملات بالمحفز وإجراء العدوى.

تبين نتيجة التحليل الإحصائي (بعد 6 أشهر من المعاملة بالمحفزات) وجود فرق معنوي بين المعاملات بالمحفز المعداة وبقية المعاملات في حين لم يكن هناك فرق معنوي بين معاملات النحاس والشاهد السليم وشواهد المحفزات بدون عدوى كما وجد فرق معنوي بين الشاهد السليم والمعدى.

جدول (4) تأثير المعاملة بالمركب Chitosan في المحتوى الكلي للفينول(مغ/غ) في أوراق غراس الزيتون.

زمن العدوى	المعاملات	المحتوى الكلي للفينول (مغ/غ) في أوراق غراس الزيتون	
		بعد 3 أشهر من المعاملة ب Chitosan والنحاس	بعد 6 أشهر من المعاملة ب Chitosan والنحاس
معاملة واحدة قبل 2أسبوع من العدوى	Chitosan	10.1 ^{bc}	30.5 ^{c}
	معاملة النحاس	5.8 ^{a}	19.5 ^{a}
معاملة واحدة قبل 4 أسابيع من العدوى	Chitosan	12.4 ^{cd}	36.6 ^{d}
	معاملة النحاس	5.7 ^{a}	19.2 ^{a}
معاملتين بفارق 15 يوم قبل العدوى	Chitosan	14.7 ^{d}	41.6 ^{e}
	معاملة النحاس	6.1 ^{a}	20.3 ^{ab}
الشاهد السليم		6.2 ^{a}	19.8 ^{a}
شاهد معدى		8.0 ^{ab}	24.3 ^{b}
معاملة Chitosan مرة واحدة بدون عدوى		6.5 ^{a}	21.1 ^{ab}
معاملة Chitosan مرتين بدون عدوى		7.3 ^{ab}	22.5 ^{ab}
LSD 5%		2.852	3.818

نلاحظ بأن المعاملة ب Chitosan زادت كمية الفينولات الكلية بالرغم من وجود العدوى وهذا يدل على قدرة المركب على تحفيز النبات لتشكيل المواد الدفاعية المسؤولة عن المقاومة الجهازية ضد الممرضات، حيث أشار بعض الباحثين إلى أن تراكم مركبات الفينول في مواقع العدوى له ارتباط بالحد من تطور الكائن الممرض بسبب تأثيره السمي على الممرض بالإضافة إلى أن مركبات الفينول يمكن أن تعيق العدوى بالممرض بزيادة صلابة جدر الخلايا (Benhamou *et al.*,2000)، وثبت قدرة هذه الفينولات على تشكيل معقدات تتأكسد إلى عناصر سامة تؤثر بشكل كبير على الكائن الممرض (Anjum *et al.*,2012) ، كما أن زيادة تراكم الفينول يؤدي إلى زيادة تركيب بروبان الفينيل الذي يدخل في تركيب اللجنين ، وإن تراكم مركبات الفينول واللجنين له ارتباط بمقاومة النبات للعديد من الممرضات، كالممرض *Fusarium graminearum* على القمح والممرض *Pythium aphanidermatum* على الخيار (Manila and Nelson,2014)، وأشار Van Loon وأخرون (1998) أن زيادة المحتوى الفينولي دليل على تفعيل المقاومة الجهازية داخل النبات.

عند مقارنة ألية تأثير المحفز الكيميائي Chitosan مع المركب النحاسي نجد أن تأثير المركب النحاسي كان بشكل مباشر على الفطر المسبب للمرض بمنع إنتاش أبواغه وتطور نموه ولم يكن له تأثير في تحفيز المقاومة، في

حين كان تأثير المركب Chitosan بشكل غير مباشر على الفطر من خلال زيادة نشاط أنزيم البيروكسيداز وزيادة المحتوى الكلي للفينول وهذا لم يلاحظ في معاملة النحاس.

الاستنتاجات والتوصيات:

1-أدت المعاملة بالمحفز الكيميائي Chitosan بتركيز (300 مغ/ ل) إلى خفض نسبة الإصابة شدتها بمرض عين الطاووس وأعطت جميع معاملات Chitosan فاعلية جيدة في السيطرة على مرض عين الطاووس تقارب فاعلية المركب النحاسي المستخدم كشاهد قياسي، و أعطت المعاملة مرتين بالمحفز بفارق 15 يوم نتائج أفضل وفاعلية أعلى بالمقارنة بإجراء معاملة واحدة.

2-أعطت المعاملة بالمحفز أعلى زيادة في المحتوى الكلي للفينول ونشاط أنزيم البيروكسيداز في أوراق غراس الزيتون المعداة وكانت أفضلها عند إجراء معاملتين مقارنة بمعاملة واحدة.

3-ترافق زيادة كل من المحتوى الكلي للفينول ونشاط أنزيم البيروكسيداز مع انخفاض شدة الإصابة بمرض عين الطاووس، مما يشير لتفعيل آليات المقاومة الجهازية في غراس الزيتون ضد المرض.

4-ينصح بإجراء معاملتين Chitosan بفارق 15 يوم على غراس أصناف الزيتون الحساسة للإصابة بمرض عين الطاووس للحد من الإصابة بالمرض.

5-ينصح باختبار فاعلية Chitosan في السيطرة على مرض عين الطاووس تحت الظروف الحقلية لإدخال هذه المعاملة في برامج المكافحة المتكاملة.

المراجع

المراجع العربية:

1-أبو عرقوب، محمود موسى. *الزيتون، إنتاج – أمراض – حشرات – نيماتودا – حشائش*. الطبعة الأولى، المكتبة الأكاديمية، القاهرة، مصر،1998.

2-- الشعبي، صلاح، لينا مطرود، أسامة قطيفاتي، محمد حسام صافيه، جورج أسمر، فاضل القيم، سعيد محمد ورضوان علي. *حدوث مرض تبقع عين الطاووس على أشجار الزيتون في الهضاب الساحلية في سوريا والكشف عن مصادر مقاومة في أصناف المحلية والمستوردة*. مجلة وقاية النبات العربية، 30،2012، 110-127.

3-شعبان، سومر. *دراسة المقاومة المكتسبة عند بعض هجن (البندورة والفليفلة) إزاء الفطرين الممرضين Fusarium solani و F.oxysporum*. رسالة دكتوراه، جامعة تشرين، كلية العلوم، 2016، ص1-101.

المراجع الأجنبية:

1-AMINI, J. *Induced resistance in potato plants against verticillium wilt invoked by chitosan and Acibenzolar-S-methyl. Australian Journal of Crop* . Science, AJCS 9(6),2015,570-576.

2-ANJUM ,T.; FATIMA, S.and AMJAD, S. *Physiological changes in wheat during development of loose smut*. Tropical Plant Pathology, 37, 2012, 102–107.

3-ASGAR, A.; NOOSHEEN , Z.; SIVAKUMAR, M.; YASMEEN ,S.; PETER, G. and ALDERSON, M. M. *Induction of lignin and pathogenesis related proteins in dragon fruit plants in response to submicron chitosan dispersions*. Crop Prot. 63, 2014, 83-88.

4-BALASUNDRAM,N.; SUNDRAM,K. and SAMMAN,S. *Phenolic compounds in plants and agri-industrialby-products:Antioxidant activity, occurrence,and potential uses.* Food Chemistry, 99,2006,191-203.

5-BEHERA, B.; S. GHANTY.; F. AHMAD.; S. SANTRA and S, BANERJEE. *UV-Visible Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Paracetamol Tablet Formulation.* Analytical & Bioanalytical Techniques. J Anal Bioanal Techniques. Volume 3 .Issue 6,2012.

6-BENHAMOU,N.; GAGNE,S.;QUERE,D. and DEHBI,L. *Bacterial-Mediated induced Resistance in cucumber : Beneficial effect of endophytic bacterium serratia plymuthica on the protection against infection by Pythium ultimum*.Phytopathology,Vol.90,2000,45-56.

7-BEN-SHALOM , N and FALLIK, E . *Further suppression of Botrytis cinerea disease in cucumber seedlings by chitosan-copper complex as compared with chitosan alone* .Phytoparasitica. 31, 2003, 99-102.

8-BOULILA, M. and M. MAHJOUB. *Inventaire des maladies de l'olivier en Tunisie.* BULL.OEPP –Oxford. 24(4).1994, 817-823.

9-CHITTOOR, J.M.; LEACH, J.E. and WHITE, F.F. *Induction of peroxidase during defense against pathogens. In: Pathogenesis: Related proteins in plants.* S.K. Datta, S. Muthukrishnan (eds.). CRC Press, Boca Raton, FL, 1999, pp 291.

10- COATS, J.R.; PETERSON, C.J.; TSAO, R.;EGGLER, A.L. and TYLKA, G.L. *Compound related to natural sources and their use as biopesticides.Patent* no . US6, 545,043B1, 2003.

11-EBRAHIM, S.; USHA, K. and BHUPINDER, S. *Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 2011, pp12.

12-GOZZO, F. *Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach.* J Agric Food Chem. 51, 2003,4487 - 4503.

13-GRANITI, A. *Olive scab: a review*. Bulletin EPP/EPPO, oxford, Vol 23, 1993, 377-384.

14-HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.M. and KUC, J. *Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to Colletotrichum lagenarium*. Physiol. Plant Pathol., 20, 1982, 73-82.

15-JIMENE,S. and DIAZ,R.M. *Olive tree diseases.Olivae* IInd year, 8, 1985, 24 -26.

16- MALOLEPSZA, U. *Induction of disease resistance by acibenzolar - S-methyl and O-hydroxyethylorutin against Botrytis cinerea in tomato plants*. Crop Prot. 25, 2006, 956-962.

17-MANILA,S.and NELSON,R. *Biochemical changes induced in tomato as a result of arbuscular mycorrhizal fungal colonization and tomato wilt pathogen infection* .Asian Journal of Plant Science and Research,Vol .4.No.1,2014,62-68.

18-MARTINEZ PENA ALEJANDRO. *Biological pesticide based on chitosan and entomopathogenic nematodes*. Patente: WO,2002,037966.

19- MUNOZ, Z.; MORET, A. and GARCES, S. *Assessment of chitosan for inhibition of Colletotrichum sp. on tomatoes and grapes* .Crop Prot. 28, 2009, 36-40.

20-NANDEESHKUMAR,P.; SUDISHA, J.; RAMACHANDRA, K .K.; PRAKASH, H.S.; NIRANJANA, S.R.and SHEKAR, S.H .*Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by Plasmopara halstedii*. Physiol Mol Plant Path 72, 2008, 188–194.

21- OBANOR, F.O.; WALTER, M.;JONES, E.E. and JASPERS, M.V. *Effect of temperature, relative humidity, leaf wetness and leaf age on Spilocaea oleagina conidium germination on olive leaves.* European Journal of Plant Pathology, No. 120, 2008, 211-222.

22- OBANOR,F.O.; WALTER, M.; JONES,E.E. and JASPERS,M.V. *Effects of temperature, inoculum concentration, leaf age, and continuous and interrupted wetness on infection of olive plants by Spilocaea oleagina.* Plant Pathology . Vol 60, 2010,190–199.

23- OBANOR,F.O.; WALTER,M.; JONES,E.E. and JASPERS,M.V. *Efficacy of systemic acquired resistance inducers in olive leaf spot management*. Australasian Plant Pathology.Vol 42, 2013, 163– 168.

24-PERCIVAL,G.C.and HAYNES, I. *The influence of systemic inducing resistance chemicals for the control of oak powdery mildew Microsphaera alphitoides applied as a therapeutic treatment.* Arbor Urban Forest 34, 2008, 191–200.

25-PERCIVAL, G.C.; NOVISS, K.; HAYNES, I. *Field evaluation of systemic inducing resistance chemicals at different growth stages for the control of apple (Venturia inaequalis) and pear (Venturia pirina) scab*. Crop Prot 28, 2009, 629–633.

26-REDDY ,
BMV.; BELKACEMI , K.; CORCUFF , R.; CASTAIGNE, F. and ARUL ,J. *Effect of preharvest chitosan sprays on post-harvest infection by Botrytis cinerea and quality of strawberry fruit*. Postharv Biol Biotechnol. 20, 2000, 39-51.

27-SELEIM,M.A.; ELYOUSR,K.A.; MOHAMED,A.A. and MARZOKY,H.A. *Peroxidase and polyphenoloxidase activities as biocontrol markers for biocontrol efficacy in the control of tomato bacteria wilt*.Plant Physiol Pathol,2,2014,1-4.

28-SCHILDER, A.M.C.; GILLET, J.M.; SYSAK ,R.W.and WISE, J.C. *Evaluation of environmentally friendly products for control of fungal diseases of grapes*. In: Proceedings of the 10th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing and Viticulture, Weinsberg, Germany, 4–7February,2002, pp 163–167.

29-SINGLETON, V. L. and ROSSI, J .A .Jr. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.* Amer. J. Enol. Viticult. 16, 1965, 144-58.

30- SHARATHCHANDRA, R.G.; NIRANJAN ,RAJ. S.; SHETTY ,N.P.; AMRUTHESH ,K.N and SHEKAR, SHETTY. H. A. *Chitosan formulation Elexa induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet.* Crop Prot 23, 2004, 881–888.

31- STONE ,A.G.; VALLARD, G.E.; COOPERBAND, L.R.; ROTENBERG ,D.; DARBY, H.M.; JAMES , R.V.; STEVESON , W.R. and GOODMAN , R.M .*Effect of organic snap bean and amendments on soil borne and folia disease in field-grwn cucumber*. Plant Dis 87,2003, 1037-1042.

32-TCHYMAKOVA, A.E. *Principle methods of phytopathological researchs*, Kolos, Moscow, 1974, 6-8.

33- TEVIOTDALE, B.L.and SIBBETT, G.S. *Residual effects of treatment on future control of olive leaf spot disease.* Olivae, No. 57, 1995, 37-43.

34-VAN LOON, L.C.; BAKKER, C.M.J. and PIETERSE, P.A.H.M. *Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria.* Annual Review of Phytopathology, 36, 1998, 453-483.

35-Viruega,J.R. and Trapero, A. *Effect of temperature, wetness duration and leaf age on infection and development of olive leaf spot.* Acta Hort.(ISHS) 586, 1999, 785-787. Available at: www. actahort .org

36- Ziani , K.; Ursua, B .and Juan, I . Mate. *Application of bioactive coating based on chitosan for artichoke seed protection.* Crop Prot. 29, 2010, 853-859.