

تأثير ماء الجفت في مكافحة مرض ذبول فرتسيليوم على الزيتون

Verticillium dahliae Kleb. المتسبب عن الفطرخيام علي محرز^{1*}، محمد زكريا طويل² وباسمة برهوم¹

(1) مركز البحوث العلمية الزراعية، اللاذقية، سورية؛ (2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية سورية.

*البريد الإلكتروني للباحث المرسل: muhrezk@yahoo.com

الملخص

محرز، خيام علي، محمد زكريا طويل وباسمة برهوم. 2021. تأثير ماء الجفت في مكافحة مرض ذبول فرتسيليوم على الزيتون المتسبب عن الفطر

Verticillium dahliae Kleb. مجلة وقاية النبات العربية، 39(4): 273-280. <https://doi.org/10.22268/AJPP-39.4.273280>

تمت الدراسة في الحقل المفتوح في موقع بحوث دبا خلال الموسم الزراعي 2020/2019 لتقويم كفاءة ماء الجفت بتراكيز 100 و200 و300 و450 مل/ليتر في مكافحة الفطر *Verticillium dahliae* Kleb. المسبب لمرض ذبول فرتسيليوم على أشجار الزيتون، أجريت هذه الدراسة على غراس زيتون صنف خضيرى بعمر 2 سنة زرعت في أصص بعد إعدادها اصطناعياً بالفطر *V. dahliae*، سُجِلت شدة الإصابة على مدى 90 يوماً، قُدرت فاعلية التراكيز المستخدمة في نهاية التجربة. أظهرت النتائج أن شدة الإصابة عند التركيز 450 مل/ل كانت 8.89% قبل المعاملة ووصلت إلى 28.89 و13.33% بعد 60 و90 يوماً، على التوالي، كما ارتفعت شدة الإصابة عند التركيز 300 مل/ل من 11.11% قبل المعاملة إلى 37.78% بعد 60 يوماً من بداية التجربة لتتخفض إلى 35.56% بعد 90 يوماً، بينما ارتفعت الشدة نتيجة استخدام المبيد الفطري القياسي azoxystrobin من 17.78% قبل المعاملة إلى 40% بعد 90 يوماً وذلك مقارنة مع الشاهد المُعدى الذي ارتفعت لديه شدة الإصابة من 13.33% قبل المعاملة إلى 100% خلال الفترة ذاتها. أعطى التركيز 450 مل/ل الفاعلية الأعلى في نهاية التجربة إذ بلغت 80%، تلاه المبيد القياسي azoxystrobin 70%، بينما أعطى التركيز 300 مل/ل فاعلية متوسطة 57.33%. تشير النتائج إلى إمكانية استخدام ماء الجفت كمبيد حيوي في استراتيجية مكافحة مرض ذبول الزيتون.

كلمات مفتاحية: ماء الجفت، *Verticillium dahliae*، زيتون، Fungicide.

المقدمة

لأول مرة في سورية عام 1983 من قبل Al Ahmad & Mosli (1993)، كما وجدت برهوم (2012) في مسح قامت به في محافظات حلب وادلب وحماة ان متوسط نسبة الإصابة بلغ 22.59%. ويعد مرض الذبول واحداً من العوامل الرئيسية التي تحد من إنتاج زيت الزيتون (Jimenez-Diaz et al., 2012)، تتبع أهمية المرض من تأثيره السلبي في الإنتاج، إذ سبب خسارة في غلة الزيتون على الصنف Picual في الأراضي المحتلة وصلت إلى 75-89% (Levin et al., 2003)، كما تؤثر إصابة أشجار الزيتون بمرض الذبول في نوعية الزيت المستخرج وتحديداً في المركبات الطيارة والفينولات وهما المسؤولين عن الرائحة العطرية لزيت الزيتون وعن مذاقه وبالتالي على قيمته التسويقية (Landa et al., 2019).

تعد الأجسام الحجرية المثابرة بشكل ساكن في التربة مصدراً رئيساً للعدوى، تنتش فيما بعد وتعطي هيفا فطرية تخترق جذور العائل (شجرة الزيتون) وتتمو باتجاه الأوعية الخشبية وينتج عنها ميسليوم وحوامل

يُعد الزيتون أحد أكثر الأشجار انتشاراً في الدول المطلة على حوض البحر المتوسط، تؤكد الدراسات أن الموطن الأصلي لشجرة الزيتون هو سورية ومنها انتشرت هذه الزراعة إلى بقية بلدان حوض المتوسط (Zohary & Spigel-Roy, 1975) تمثل سورية أحد بلدان حوض المتوسط المهمة في زراعة الزيتون، إذ بلغت المساحة المزروعة به لعام 2019 حوالي 693227 هكتاراً، وتعطي هذه المساحة إنتاجاً سنوياً يُقدر بـ 844316 طن (FAO, 2019). تُصاب شجرة الزيتون بعدة أمراض وآفات ويعد مرض ذبول الزيتون (*Verticillium wilt*) من أخطر الأمراض الفطرية التي تصيب هذه الشجرة. يتسبب المرض عن الفطر *Verticillium dahliae* Kleb. وهو من أكثر الأمراض الفطرية النباتية المنقولة بواسطة التربة ضرراً بأشجار الزيتون (Lopez-Escudero & Mercado-Blanco, 2011). سُجِلَ المرض

الصف Koroniewski بينما كانت مرتفعة لدى الصف Amfissis وذلك ضمن تجارب العدوى الاصطناعية. تتبع أهمية هذا البحث من مكانة شجرة الزيتون في الاقتصاد السوري، ونظراً لطبيعة الأضرار التي يتسبب بها مرض ذبول الزيتون على مستوى قطاع الزيتون وإنتاج الزيت، بالإضافة إلى صعوبة مكافحة هذا المرض نظراً لطبيعة الإصابة. هدفت هذا البحث إلى دراسة تأثير عدة تراكيز من ماء الجفت OMWW الناتج كمخلفات ثانوية لاستخراج الزيت في الحد من إصابة أشجار الزيتون بمرض ذبول فرتسليوم المتسبب عن الفطر *V. dahliae*.

مواد البحث وطرقه

الحصول على الفطر الممرض كمصدر للعدوى الاصطناعية

نُفذ الجزء المختبري من البحث في محطة أبحاث السن التابع للمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (ACSAD). جُمعت عينات (أقلام) من أشجار زيتون تظهر عليها أعراض الإصابة بمرض ذبول الزيتون من محافظة حماة (تل التوت في السلمية) ومن محافظة اللاذقية (منطقة الدروقيات) في سورية. غسلت العينات بالماء المقطر لمدة 10 دقائق وجُففت بوساطة ورق ترشيش، قُطعت إلى أجزاء صغيرة بأبعاد 0.5 سم، غُمرت بعدها بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيزه 2% لمدة 3 دقائق، ثم غسلت بماء مقطر ومعقم وجُففت بوضعها على ورق ترشيش. تم زرع كل 3 قطع في طبق بتري 9 سم يحتوي على الوسط الغذائي بطاطا دكستروز آغار (PDA) مضافاً له المضاد الحيوي Cefazolin بتركيز 100 مغ/ليتر. وُضعت الأطباق ضمن حاضنة عند حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ولمدة 7 أيام، ثم نُقِيت العزلة الفطرية بأخذ طرف خيط من حافة مستعمرة حديثة وزُرعت في أطباق بتري جديدة تحتوي على الوسط PDA، ثم حُصنت الأطباق عند $25 \pm 2^\circ\text{C}$ لمدة 7 أيام. تم تشخيص الفطر اعتماداً على المفتاح التصنيفي المعتمد من قبل Smith (1965) بما يتعلق بالصفات المورفولوجية (التقرع السواري للحوامل البوغية) المميزة للجنس *Verticillium*، بالإضافة إلى تشكيل الجسيمات الحجرية كصفة مميزة للنوع *V. dahliae*. تم تحضير عزلات وحيدة البوغية من الفطر اعتماداً على طريقة طرف الهيغا من مستعمرة حديثة بعمر 7 أيام، وتم اختيار عدد من العزلات ممثلة للمناطق المدروسة وإجراء اختبار قدرتها الإراضية. اعتمدت العزلة الممثلة لمحافظة حماة التي تميزت بقدرتها الإراضية العالية وسرعة نموها المتوسطة حيث بدأ تشكل الجسيمات الحجرية باليوم الـ 12، كما تميزت بنسبة تغطية بالجسيمات الحجرية (أكثر من 50% من مساحة الطبق).

بوغية، تحلل جدر الأوعية الخشبية نتيجة الإصابة، وتتجمع نواتج التحلل مع ميسليوم الفطر في الأوعية الناقلة الخشبية مسببة انسدادها، كما تلتصق خيوط الممرض بتلك المواد، ويضاف إلى ذلك تشكل بعض المركبات الفينولية التي لها دور الفايثوأكسينات كوسيلة من آليات دفاع النبات إزاء دخول الكائن الممرض. ونتيجة لذلك تحدث إعاقة في انتقال الماء (Keykhasaber *et al.*, 2018). يلي ذلك بدء ظهور الأعراض على شجرة الزيتون على شكل جفاف بطيء للأوراق، التي تبدأ بالاصفرار لاحقاً وتسقط بشكل تدريجي بدءاً من الأفرع العلوية في أحد جهات الشجرة ثم ينتقل ليعم كافة أجزائها، يترافق ذلك مع تلون الأوعية الناقلة بلون بني. وينتج عن الانسداد الحاصل بالأوعية الناقلة تدهور الأشجار المصابة وموتها (Blanco-Lopez *et al.*, 1984). تم استخدام الإضافات العضوية كطريقة لمكافحة الممرضات الفطرية المنقولة بوساطة التربة (ساكنات تربة) من قبل عدة باحثين (Abawi & Widmer, 2000؛ Hoitink *et al.*, 1996) حيث يمكن اعتبارها بدائل للمبيدات الكيميائية لمكافحة الآفات وكمثال على ذلك مخلفات صناعة (استخراج) زيت الزيتون حيث ينتج عن عملية فصل الزيت مكونين هما الجزء الصلب (المخلفات العجينية) والجزء السائل ماء الجفت (المياه المرافقة) والتي تسمى Olive mill waste water ويرمز لها بـ OMWW وهو سائل غامق اللون ذو رائحة مميزة، غني بالشوارد اللاعضوية وبالمادة العضوية والمواد الصلبة العالقة. وتتراوح الكمية الناتجة عن استخلاص 1 طن من ثمار الزيتون بين 640 و1100 لتر من هذه المياه (Benitez *et al.*, 1997). مؤخراً قام العديد من الباحثين بالحصول على الفوائد من ماء الجفت انطلاقاً من غناه بالمادة العضوية وبعض العناصر المعدنية وخواصه المضادة للميكروبات واستخدامه في الزراعة كمبيد حيوي لحماية المحاصيل من الآفات (Larif *et al.*, 2013؛ Lykas *et al.*, 2014؛ Yangui *et al.*, 2010)، ومن أهم الفينولات الموجودة في الزيتون يعد الـ Hydroxytyrosol المركب الفينولي الرئيس في ماء الجفت (El-Abbassi *et al.*, 2012)، حيث يتميز هذا المركب بطيف واسع من النشاط الحيوي الهام. بين Yangui *et al.* (2009) وجود نشاط مضاد للفطور والبكتريا الممرضة للنبات في ماء الجفت وبخاصة مركباته الفينولية ذات الوزن الجزيئي المنخفض مثل الـ Hydroxytyrosol وTyrosol وقد أبدت مستخلصات ماء الجفت تأثيراً قوياً مضاداً للفطور حيث تدرجت IC_{50} ما بين 7.18 و57.4 مغ/ليتر. كما وجد Markakis *et al.* (2010) أن مستويات المركب الفينولي Hydroxytyrosol كانت مرتفعة لدى صنف الزيتون Koroniewski المقاوم لمرض ذبول فرتسليوم بينما كانت هذه المستويات منخفضة لدى الصف الحساس Amfissis وترافق ذلك مع مستويات منخفضة من DNA الفطر *V. dahliae* لدى

استخلاص العينة وتحليل الفينولات الكلية في ماء الجفت

تم إحضار 25 لتر من ماء الجفت من معصرة زيتون حديثة (ثلاثية الطور) تقع على بعد 12 كم شرق مدينة اللاذقية وحللت العينة في مختبر المعهد العالي لبحوث البيئة ومختبرات مركز البحوث العلمية الزراعية باللاذقية (محطة بحوث الهنادي)، واستخدمت طريقة Leouifoudi et al. (2014) في الكشف عن تركيز الفينولات الكلية في ماء الجفت، بحيث تم التخلص من المواد الدسمة في عينة ماء الجفت بمزجها مع المذيب العضوي الهكسان بنسبة 1:1 (حجم:حجم) ثم وضع المزيج في المثقلة على سرعة دوران 4000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة. كررت هذه العملية مرتان، وتم الاستخلاص سائل-سائل باستخدام المذيب ايتيل أسيتات بنسبة 1:1 (حجم:حجم) ثم تم تنقيت الناتج على سرعة 4000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق، تم تبخير المذيب ايتيل أسيتات بواسطة جهاز المبخر الدوار عند حرارة 40°س. تم حفظ المستخلص الناتج في البراد عند حرارة -18°س، وتم تقدير الفينولات الكلية في ماء الجفت بواسطة جهاز سيكتروفوتوميتر باستخدام كاشف فولن (Folin-Ciocalteu) حيث تم مزج 2.5 مل من كاشف فولن مع 0.5 مل من العينة وتركت لتتفاعل بالظلام لمدة 5 دقائق. أضيف للمزيج بعد ذلك 2 مل من محلول كربونات الصوديوم 75 غ/لتر وتم التفاعل بالظلام لمدة ساعة. تم قياس الامتصاصية بواسطة جهاز سيكتروفوتوميتر عند طول موجة 720 نانوميتر، وتم التعبير عن النتيجة كمكافئ لحمض الجالليك (Gallic acid) أي ميليغرام فينولات كلية/لتر ماء الجفت، وحُفظ ماء الجفت في البراد عند حرارة -5°س لحين استخدامه.

إجراء العدوى الاصطناعية على الغراس

تمت مُكاثرة الفطر *V. dahliae* في المختبر على أطباق بتري تحوي المستتبت الغذائي PDA. جُمعت المستعمرات الفطرية النامية على الوسط الغذائي ووضعت في خلّاط كهربائي (معقم بالكحول الإيتيلي 70%)، وأضيف له ماء مقطر معقم، وأجريت عملية الخلط لمدة 3 دقائق. رُشح المعلق البوغي الناتج باستخدام طبقتين من القطن المعقم، وتم ضبط تركيز أبواغ الفطر في المعلق على التركيز 10×10^6 بوغوة/مل وذلك باستخدام شريحة عد كريات الدم (مالاسيه). تم قلع غراس الزيتون من الأصص وغُسلت بالماء الجارٍ لإزالة البقايا، ثم تُركت لتجف مدة 5 دقائق. قُلّمت نهايات الجذور في كل غرسة بواسطة مقص لتقليم معقم (لضمان اختراق اللقاح المعدي أنسجة الجذر)، وأجريت عملية العدوى الاصطناعية لغراس الزيتون حيث تم غمر الجذور ضمن المعلق البوغي ذو التركيز 10×10^6 بوغوة/مل لمدة نصف ساعة. بعد ذلك أُعيد زراعة الغراس في أكياس من البولي ايتيلين (سعة 10 كغ) تحوي تربة معقمة

وتورب معقم بنسبة (1 : 1) حجم. تمت معاملة الغراس بالمعلق البوغي سقايةً بمعدل 100 مل لكل غرسة وذلك لضمان نجاح عملية العدوى الاصطناعية، كما تمت سقاية جميع الغراس بشكل دوري بمعدل 500 مل ماء مرة واحدة كل أسبوع. ظهرت أعراض الإصابة بمرض الذبول على جميع الغراس المُعدة بعد 50 يوماً من إجراء العدوى الاصطناعية، وقُدّرت شدة الإصابة حسب سلم التقييس اللاحق وسُجّلت قيم شدة الإصابة قبل المعاملة بماء الجفت (القراءة الأولى). بعد ذلك تم إضافة محاليل ماء الجفت المُخصّصة لكل معاملة بالإضافة لمحلول المبيد الفطري القياسي وذلك بمعدل 500 مل سقايةً لكل غرسة. استمر تقدير الشدة المرضية على جميع المعاملات بفواصل زمني كل 15 يوماً، حتى وصلت شدة الإصابة لدى الشاهد المعامل إلى الدرجة 5 (موت كامل الغرسة)، وتزامن ذلك مع القراءة السابعة.

تقويم فاعلية المعاملات

تم تنفيذ هذه التجربة ضمن مفهوم المكافحة العلاجية، حيث تمت السقاية بمحلول ماء الجفت بحجم 500 مل/غرسة وذلك بعد حدوث الإصابة على غراس الزيتون (عدوى اصطناعية). ولتقويم فاعلية ماء الجفت تم إجراء عدة قراءات بما فيها القراءة الأولى قبيل المعاملة بماء الجفت، وذلك بفحص أوراق الغراس. تم تسجيل درجة الإصابة لكل غرسة حسب سلم قياس مؤلف من 6 درجات بحسب Tjamos et al. (1991) على الشكل التالي: 0= نباتات سليمة، 1= إصابة 1-20% من أوراق الغرسة الواحدة، 2= إصابة 21-40% من أوراق الغرسة الواحدة، 3= إصابة 41-60% من أوراق الغرسة الواحدة، 4= إصابة 61-80% من أوراق الغرسة الواحدة، 5= إصابة 81-100% من أوراق الغرسة أو موت كامل الغرسة. كرّرت القراءة 6 مرات خلال 90 يوماً بعد المعاملة بماء الجفت وبمعدل قراءة كل 15 يوماً، وتم تقويم النتائج اعتماداً على المعايير التالية:

- شدة الإصابة وتعتمد على السلم السابق بعد استخدام المعادلة التالية (Michenny, 1923) حيث:

$$\text{شدة الإصابة \%} = \frac{\text{مجموع (عدد النباتات في كل درجة} \times \text{قيمة الدرجة)}}{\text{العدد الكلي للنباتات} \times \text{قيمة أعلى درجة (5)}} \times 100$$

- الفاعلية %: وحسبت اعتماداً على قيمة شدة الإصابة من المعادلة التالية (Abbot, 1925):

$$\text{فاعلية المعاملة \%} =$$

$$100 - \left(\frac{\text{شدة الإصابة بعد المعاملة}}{\text{شدة الإصابة قبل المعاملة}} \times \frac{\text{شدة الإصابة للشاهد قبل المعاملة}}{\text{شدة الإصابة للشاهد بعد المعاملة}} \right) \times 100$$

معاملة الغراس بماء الجفت ومبيد المقارنة

جدول 1. نتائج تحليل عينة ماء الجفت التي استخدمت في البحث.
Table 1. Chemical analysis of olive mill wastewater sample used in this study.

القيمة Value	المعيار Criteria
6	الرقم الحمضي Acidic Number
80 مغ/لتر 80 mg/l	الفينولات الكلية Total phenols
4.13 ديسي سيمنز/متر 4.13 dc simenz/m	الناقلة Conductivity
0.19%	المادة العضوية Organic Matter
108 مغ/لتر 108 mg/l	الاحتياج الكيميائي للأوكسجين Chemical demand to Oxygen
84 مغ/لتر 84 mg/l	الاحتياج الحيوي للأوكسجين Biological demand to Oxygen
0.09%	نتروجين Nitrogen
0.05%	فوسفور Phosphorus
0.78%	بوتاسيوم Potassium
0.04%	كالسيوم Calcium
0.03%	مغنيزيوم Magnesium

يوضح شكل 1 بأن شدة إصابة الغراس قبل المعاملة بماء الجفت تراوحت بين 8.89 و 17.78% وازدادت شدة الإصابة عند غراس الشاهد المصاب خلال مراحل التجربة تدريجياً إلى 26.67% بعد 15 يوماً و 60% بعد 45 يوماً لتصل إلى 100% بعد 90 يوماً من الإعداء. بينما اختلف معدل زيادة شدة الإصابة الغراس المعدة بالفطر *V. dahliae* والمعاملة بماء الجفت بعد 15 يوماً من المعاملة بحسب التركيز، حيث لوحظ أن لماء الجفت بالتركيزين 100 و 200 مل/ل تأثير ضعيف في خفض شدة الإصابة بمرض ذبول فرتسليوم على غراس الزيتون بالمقارنة مع الشاهد، حيث لم تتجاوز شدة الإصابة بعد 15 يوماً من المعاملة بماء الجفت 26.67 و 22.22%، على التوالي مقارنة مع 26.67% للشاهد المُعدى. أما بعد 30 يوماً من المعاملة فقد كان لماء الجفت بالتركيز 450 مل/ل والتركيز 300 مل/ل وللمبيد azoxystrobin التأثير الأفضل في شدة الإصابة حيث لم تتجاوز شدة الإصابة بعد 30 يوماً 20، 22.22% و 28.89% على التوالي مقارنة مع 35.56% لدى الشاهد المُعدى.

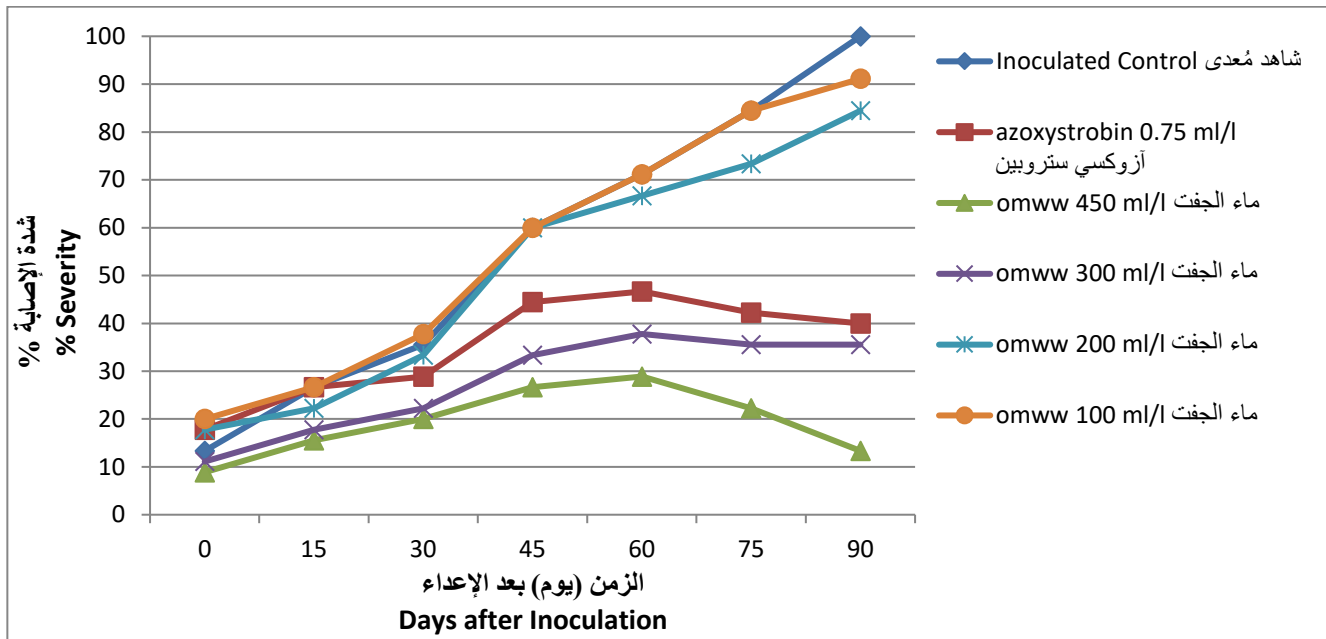
تم تنفيذ هذا البحث ضمن الحقل المكشوف في موقع بحوث دبا بمحافظة اللاذقية الذي يتبع الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية خلال الموسم الزراعي 2020/2019 على غراس زيتون صنف خضيري بعمر سنتين. تم توزيع الغراس ضمن قطع عشوائية، تضمنت القطعة الواحدة 9 غراس، وتم اعتماد 7 معاملات بواقع 3 مكررات للمعاملة الواحدة، والمكرر الواحد عبارة عن 3 غراس. وزعت المعاملات بطريقة المجموعات العشوائية، واستخدمت فيها 4 تراكيز لماء الجفت، بالإضافة للتركيز الموصى به من مبيد فطري قياسي azoxystrobin (الاسم التجاري LACERTA بشكل SC يحوي على 250 غ مادة فعالة/لتر). وكانت المعاملات على الشكل التالي:

1. غراس غير ملوثة بالفطر *V. dahliae* وغير معاملة بماء الجفت أو المبيد (شاهد سليم).
2. غراس ملوثة بالفطر *V. dahliae* وغير معاملة بماء الجفت أو المبيد (شاهد مصاب) ومعاملة بالماء المقطر.
3. غراس ملوثة بالفطر *V. dahliae* ومعاملة بماء الجفت بالتركيز 100 مل/لتر.
4. غراس ملوثة بالفطر *V. dahliae* ومعاملة بماء الجفت بالتركيز 200 مل/لتر.
5. غراس ملوثة بالفطر *V. dahliae* ومعاملة بماء الجفت بالتركيز 300 مل/لتر.
6. غراس ملوثة بالفطر *V. dahliae* ومعاملة بماء الجفت بالتركيز 450 مل/لتر.
7. غراس ملوثة بالفطر *V. dahliae* ومعاملة بالمبيد azoxystrobin بالتركيز الموصى به (0.75 مل تجاري/ لتر).

حللت النتائج إحصائياً للقراءة الأخيرة باستخدام برنامج التحليل الإحصائي Genstat 12th Edition وفق نموذج التجارب المنفذة باستخدام التصميم العشوائي الكامل. قورنت قيم المتوسطات الحسابية باستخدام اختبار أقل فرق معنوي (LSD) عند مستوى احتمالية 0.05 واختبرت المتوسطات بطريقة دونكان (Duncan).

النتائج والمناقشة

يلخص جدول 1 نتائج تحليل عينة من ماء الجفت المستخدم في التجربة حيث نلاحظ احتواء ماء الجفت على كمية جيدة من الفينولات بالإضافة إلى عدد من العناصر المعدنية وبخاصة البوتاسيوم. ويوضح شكل 1 شدة الإصابة للمعاملات المختبرة مقارنة مع الشاهد ومبيد المقارنة خلال مراحل التجربة.



شكل 1. تغيرات شدة الإصابة بمرض ذبول فرتسيلليوم بتأثير ماء الجفت ومبيد المقارنة خلال 90 يوماً بعد المعاملة (قيمة أقل فرق معنوي عند مستوى احتمال $0.05 = 6.25$ للقراءة الأخيرة)

Figure 1. Olive Verticillium wilt disease severity changes as affected by olive mill wastewater and the control pesticide azoxystrobin within 90 days after treatment (LSD at $P=0.05 = 6.25$ for the last reading).

المعاملات التي ارتفعت لديها الشدة وذلك بالمقارنة مع الشاهد المُعدى 84.44%.

ظهر التأثير الكامل لماء الجفت والمبيد azoxystrobin بعد 90 يوماً من الإعداء حيث حافظ ماء الجفت بالتركيز 450 مل/ل على تفوقه تأثيراً في شدة الإصابة، فانخفضت شدة الإصابة لتصل إلى 13.33% مقارنة مع 100% لدى الشاهد المُعدى، وقد كان الفرق المعنوي واضحاً بين معاملة ماء الجفت بالتركيز 450 مل/ل ومعاملة الشاهد وبقية المعاملات. كما انخفضت شدة الإصابة لدى كل من معاملة المبيد azoxystrobin ومعاملة ماء الجفت بالتركيز 300 مل/ل إلى 40% و 35.56%، على التوالي، مقارنة مع 100% لدى الشاهد المُعدى، حيث لم تكن الفروق معنوية بين المعاملتين السابقتين، بينما وجدت فروق معنوية واضحة بين معاملة المبيد azoxystrobin وبقية المعاملات. ارتفعت شدة الإصابة لدى معاملة ماء الجفت بالتركيز 100 مل/ل وماء الجفت بالتركيز 200 مل/ل إلى 91.11% و 73.33%، على التوالي، مقارنة مع 100% لدى الشاهد المُعدى مع ملاحظة وجود فروق معنوية بين معاملة ماء الجفت بالتركيز 200 مل/ل ومعاملة ماء الجفت بالتركيز 100 مل/ل وبقية المعاملات. يبين جدول 2 فاعلية ماء الجفت حسب التركيز المستخدم والمبيد الفطري القياسي في مكافحة مرض ذبول فرتسيلليوم على الزيتون.

اختلف تأثير المعاملات بعد 45 يوماً في شدة الإصابة حيث تراوحت بين 26.67% و 60% وكان التأثير واضحاً لماء الجفت بالتركيز 450 مل/ل وللتركيز 300 مل/ل حيث كانت شدة الإصابة 26.67% و 33.33%، على التوالي، بينما لوحظ تأثير متوسط للمبيد azoxystrobin، فقد ارتفعت شدة الإصابة عند استخدامه قليلاً وسجلت 44.44%، في حين كان التأثير ضعيفاً بالنسبة لماء الجفت بالتركيز 100 مل/ل و 200 مل/ل سيما وأن شدة الإصابة لدى كلتا المعاملتين بلغت 55.56% و 46.67%، على التوالي، وذلك مقارنة مع 60% لدى الشاهد المُعدى.

يلاحظ من قيم شدة الإصابة المُسجلة بعد 60 يوماً من الإعداء استمرار تفوق كل من معاملة ماء الجفت بالتركيز 450 مل/ل ومعاملة المبيد azoxystrobin بارتفاع شدة الإصابة لديهما بشكل طفيف حيث لم تتجاوز 28.89% و 46.67%، على التوالي. كما كان التأثير مقبولاً بالنسبة لمعاملة ماء الجفت بالتركيز 300 مل/ل حيث ارتفعت قليلاً إلى 37.78% في حين كان التأثير ضعيفاً بالنسبة لباقي المعاملات وذلك مقارنة مع الشاهد المُعدى 71.11%. بدأ تأثير المعاملات في شدة مرض الذبول يظهر بشكل أكبر بعد 75 يوماً من الإعداء فكان التأثير واضحاً لدى معاملة ماء الجفت بالتركيز 450 مل/ل حيث انخفضت الشدة لتصل إلى 22.22% تلتها معاملة المبيد azoxystrobin التي انخفضت الشدة فيها إلى 42.22% كما انخفضت الشدة لدى معاملة ماء الجفت بالتركيز 300 مل/ل وسجلت 35.56% بينما كان التأثير ضعيفاً لدى بقية

جدول 2. فاعلية (%) ماء الجفت والمبيد الفطري azoxystrobin بمكافحة مرض الذبول بعد 90 يوم من الإعداء.

Table 2. Efficacy (%) of olive mill wastewater (OMWW) and the fungicide azoxystrobin in controlling olive verticillium 90 days after inoculation.

الزمن بعد المعاملة (يوم)	ماء جفت (مل/ليتر)				أزوكسي ستروبيين (0.75 مل/ل) Azoxystrobin (0.75 ml/l)
	100	200	300	450	
15	33.3	37.5	20.0	12.5	25.0
30	29.2	29.7	25.0	15.6	39.1
45	33.3	25.0	33.3	33.3	44.4
60	33.3	29.7	36.3	39.1	50.8
75	33.3	34.9	49.5	60.5	62.5
90	39.3	36.7	57.3	80.0	70.0

على مستبت PDA، وبشكل عام فإن تراكم الفيتوالكسينات الفينولية في النبات يعزز من دفاع العائل ضد الممرضات وأن نشاط الفينولات في دفاع النبات ضد الممرضات النباتية يتم تطبيقها كمبيدات حيوية في الزراعة (Daayf *et al.*, 2012)، كما أتى بالمرتبة الثانية من حيث الفاعلية المبيد الفطري القياسي azoxystrobin بفاعلية قدرها 70% ويُفسر فاعلية هذا المبيد كونه يتبع مجموعة Strobilurins وهو مبيد فطري جهازي واسع الطيف، يُتَبَط إنتاج الأبوغ ونمو الميسليوم لعدد من مسببات الفطرية وخصوصاً الأسكية والناقصة والبيضية، وتتمثل آلية عمله في حدوث خلل في التنفس في ميتوكوندريا الخلية الفطرية بوقف انتقال الإلكترونات في السيستوكروم bc1 بالإضافة إلى منع إنتاج الطاقة ATP مؤدياً إلى موت سريع للخلية الفطرية (Joseph, 1999). بينما أعطى ماء الجفت بالتركيز 300 مل/ليتر الفاعلية 57.33%، أما بالنسبة لماء الجفت عند التركيزين 200 و 100 مل/ليتر فيبدو أنهما ضعيفا الفاعلية في الحد من انتشار مرض ذبول الزيتون على غراس الزيتون حيث لم تتجاوز الفاعلية لديهما 26.67 و 21.9%، على التوالي.

مما تقدم يمكننا أن نستخلص بأن استخدام ماء الجفت أظهر فاعلية في الحد من انتشار مرض الذبول على غراس الزيتون المتسبب عن الفطر *V. dahliae* عند استعماله بالتركيز 450 مل/ليتر وكانت التراكيز الأدنى من ذلك ضعيفة التأثير. لذلك يمكن النصح باستخدام ماء الجفت بالتركيز 450 مل/ليتر أو مبيد azoxystrobin كإجراء علاجي لمكافحة مرض الذبول على أشجار الزيتون. كما يمكن استخدام ماء الجفت كمبيد فطري حيوي وإدخاله في برامج مكافحة المتكاملة لمرض الذبول على الزيتون المتسبب عن الفطر *V. dahliae*.

عند مقارنة فاعلية المعاملات المختلفة مع بعضها (جدول 2) أعطى ماء الجفت بالتركيز 450 مل/ليتر في نهاية التجربة الفاعلية الأعلى (80%) في الحد من الإصابة بمرض ذبول فرتسيليوم على غراس الزيتون وقد تفوق بذلك على جميع المعاملات الأخرى. ويُفسر ذلك أن الفينولات الكلية (80 مغ/ليتر) في ماء الجفت المستخدم بالتجربة قد تثبتت الفطر *V. dahliae* حيث ذكر *Leontopoulos et al.* (2015) أن التركيزين 5% و 10% من المستخلص الفينولي لماء الجفت قد منع بشكل كامل ظهور أعراض الإصابة بمرض الذبول فرتسيليوم على نباتات البندورة المعدة اصطناعياً بالمعلق البوغي للفطر *V. dahliae*، ويتوافق ذلك مع ما أشار إليه *Ciafardini & Zullo* (2003) اللذان فسرا التثبيط الحاصل لميسليوم الفطر عند إضافة ماء الجفت بأن المركبات الفينولية تقوم بإعاقة الوظيفة الخلوية للغشاء الخلوي لخلية الممرض، وضمن السياق نفسه فقد بين *Diallinas et al.* (2018) بأن المركب الفينولي Hydroxytyrosol الموجود في ماء الجفت يغير من تركيب الغشاء البلازمي للخلية الفطرية خلال بضعة دقائق بعد إضافته إلى المزارع الفطرية حيث يمنع امتصاص الكزانثين عن طريق النقل وتحدث عملية عرقلة في وظيفة الغشاء. كما ذكر *Kitts & Wong* (2006) أن تثبيط ماء الجفت للفطور المنقولة بوساطة التربة يتم بتفاعل المركبات الفينولية مع DNA خلية الممرض وتقاطع عملية تضاعفه. كما أشار *El-Abbassi et al.* (2017) عن التأثير المباشر للمركبات الفينولية في ماء الجفت ذات الخواص المضادة للفطور مثل المركب Hydroxytyrosol بالإضافة لتحريض النبات العائل على تنشيط آليات الاستجابة الدفاعية ضد الفطر *V. dahliae*، كما وجد *Vagelas* (2009) أن ماء الجفت المرشح قد تثبت مختبرياً نمو ميسليوم الفطر *V. dahliae*

Abstract

Muhrez, K.A., M.Z. Tawil and B. Barhoum. 2021. Effect of Olive Mill Wastewater of in the Control of Olive Verticillium Wilt Caused by *Verticillium dahlia* Kleb. Arab Journal of Plant Protection, 39(4): 273-280. <https://doi.org/10.22268/AJPP-39.4.273280>

This research aimed to evaluate the application of olive mill wastewater in controlling *Verticillium dahliae* the causal agent of olive wilt disease on olive trees. This study was carried out on 2 years old olive local variety (Khderi) plants planted in pots after it has been artificial inoculated with *V. dahliae*, and severity was recorded within 90 days. Olive mill wastewater (omww) efficacy was estimated at the end of the experiment. Severity was increased from 8.89% before treatment to 28.89% 60 days after treatment, and decreased to 13.33% 90 days after treatment with omww 450 ml/l. Disease severity increased from 11.11% before treatment to 37.78% 60 days after treatment and decreased to 35.56% 90 days after treatment with omww 300 ml/l. Whereas, disease severity increased from 17.78% before treatment to 40% 90 days after treatment with azoxystrobin compared to the inoculated control where disease severity increased from 13.33% before treatment to 100% 90 days after treatment. Omww 450 ml/l had the highest efficacy of 80% followed by azoxystrobin 70%, and omww 300 ml/l 57.33%. It can be concluded that olive mill wastewater has a potential application as a bio-fungicide for the control of olive verticillium wilt disease.

Keywords: Olive mill waste waters, *Verticillium dahlia*, olive, Fungicide.

Affiliation of authors: K.A. Muhrez¹, M.Z. Tawee² and B. Barhoum¹. (1) Agricultural Scientific Research Center, Lattakia, Syria; (2) Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria. *Email of corresponding author: muhrezk@yahoo.com

References

المراجع

- Al Ahmad, M.A. and M.N. Mosli. 1993. Verticillium wilt of olive in Syria. EPPO Bulletin, 23(3): 521-529. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1993.tb01364.x>
- Benitez, F.J., J. Beltran-Heredia, J. Torregrosa and J.L. Acero. 1997. Aerobic degradation of olive mill wastewater. Applied Microbiological Biotechnology, 47: 185-188. <https://doi.org/10.1007/s002530050910>
- Blanco-Lopez, M.A., R.M. Jimenez-Diaz and J.M. Caballero. 1984. Symptomatology, incidence and distribution of verticillium wilt of olive trees in Andalusia. Phytopathologia Mediterranea, 23: 1-8.
- Ciafardini, G. and B.A. Zullo. 2003. Antimicrobial activity of oil-mill wastewater polyphenols on the phytopathogen *Xanthomonas campestris*. Annals of Microbiology, 53(3): 283-290.
- Daayf, F., A. El Hadrami, A.F. El-Bebany, M.A. Henriquez, Z. Yao, H. Derksen, I. El Hadrami and L.R. Adam. 2012. Phenolic compounds in plant defense and pathogen counter-defense mechanisms. Recent Advances in Polyphenols Research, 3(3): 191-208. <https://doi.org/10.1002/9781118299753.ch8>
- Diallinas, G., N. Rafailidou, I. Kalpaktsi, A.C. Komianou, V. Tsouvali, I. Zantza, L. Zantza, E. Mikres, A.L. Skaltsounis and L.K. Kostakis. 2018. Hydroxytyrosol (HT) analogs act as potent antifungals by direct disruption of the fungal cell membrane. Frontiers in Microbiology, 9: 2624. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02624>
- El-Abbassi, A., H. Kiai and A. Hafidi. 2012. Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. Food Chemistry, 132(1): 406-412. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.013>
- El-Abbassi, A., N. Saadaoui, H. Kiai, J. Raiti and A. Hafidi. 2017. Potential applications of olive mill wastewater as biopesticide for crops protection. Science of the Total Environment, 576: 10-21. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.032>
- الأحمد، ماجد، محمد نذير موصلي وعبد الرزاق دقسي. 1992. مرض ذبول الزيتون في وسط وشمال سورية وأثر عوامل الصنف والعمر وبعض العمليات الزراعية في انتشاره وتطوره. مجلة وقاية النبات العربية، 10(2): 131-139.
- [Al-Ahmad, M., M.N. Moselli and A.R. Doksi. 1992. Verticillium wilt of olive and effects of variety, age of trees and other agricultural practices on disease development in middle and northern Syria. Arab Journal of Plant Protection, 10(2): 131-139. (In: Arabic).]
- الباكير، ساهر. 2005. الاختلافات الوراثية ونوعية الإنتاج بين بعض أصناف الزيتون المزروع *Olea europaea* L. والبري في المنطقة الشمالية من سورية، رسالة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة حلب، سورية. 232 صفحة.
- [Al-Bakeer, S. 2005. Genetic differences and production quality between some olive cultivars *Olea europaea* L. and wild olive in the northern region of Syria, PhD Thesis, Faculty of Agriculture, Aleppo University, Syria. 232 pp. (In: Arabic).]
- برهوم، باسم. 2012. استخدام التقانات الحيوية في دراسة تباين التركيب الوراثي في مجتمع الزيتون البري وفطر الذبول (*Verticillium dahliae*) وتأثرهما في سورية. أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة حلب، سورية. 179 صفحة.
- [Barhom, B. 2012. Use of biotechnologies in studying the genetic variation in the population of wild olive and wilt fungus (*Verticillium dahliae*) and their interaction in Syria. PhD thesis, Faculty of Agriculture, Aleppo University, Syria. 179 pp. (In: Arabic).]
- Abawi, G.S. and T.L. Widmer. 2000. Impact of soil health management practices on soil borne pathogens, nematodes and root diseases of vegetable crops. Applied Soil Ecology, 15(1): 37-47. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00070-6)
- Abbot, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18(2): 265-267. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>

- Lopez-Escudero, F.J. and J. Mercado-Blanco.** 2011. Verticillium wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant and Soil*, 344: 1-50. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0629-2>
- Lykas, C., I. Vagelas and N. Gougoulis.** 2014. Effect of olive mill waste water on growth and bulb production of tulip plants infected by bulb diseases. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 12(1): 233-243. <https://doi.org/10.5424/sjar/2014121-4662>
- Markakis, E.A., E.S. Tjamos, P.P. Antoniou, P.A. Roussos, E.J. Paplomatas and E.C. Tjamos.** 2010. Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and non-defoliating *Verticillium dahliae* Pathotypes. *Plant Disease*, 94(9): 1156-1162. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-9-1156>
- Michenny, H.H.** 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, 26: 195-217.
- Smith, H. C.** 1965. The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 8(3): 450-478. <https://doi.org/10.1080/00288233.1965.10419889>
- Tjamos, E.C., D.A. Biris and E.J. Paplomatas.** 1991. Recovery of olive trees with Verticillium wilt after individual application of soil solarization in established olive orchards. *Plant Disease*, 75(6): 557-562. <https://doi.org/10.1094/PD-75-0557>
- Vagelas, I., H. Kalorizou, A. Papachatzis and M. Botu.** 2009. Bioactivity of olive oil mill wastewater against plant pathogens and post-harvest diseases. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 23(2): 1217-1219. <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10817641>
- Wong, P.Y.Y. and D.D. Kitts.** 2006. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry*, 97(3): 505-515. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.031>
- Yangui, T., A. Dhouib, A. Rhouma and S. Sayadi.** 2009. Potential of hydroxytyrosol-rich composition from olive mill waste water as a natural disinfectant and its effect on seeds vigour response. *Food Chemistry*, 117(1): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.069>
- Yangui, T., S. Sayadi, A. Gargoubi and A. Dhouib.** 2010. Fungicidal effect of hydroxytyrosol-rich preparations from olive mill wastewater against *Verticillium dahliae*. *Crop Protection*, 29(10): 1208-1213. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.04.016>
- Zohary, D. and P. Spiegel-Roy.** 1975. Beginnings of fruit growing in the old world. *Science*, 187(4174): 319-327. <https://doi.org/10.1126/science.187.4174.319>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).** 2019. FAOSTAT Database. Rome, Italy. <https://faostat3.fao.org/home/E>.
- Hoitink, H.A.J., A.G. Stone and M.E. Grebus.** 1996. Suppression of Plant Diseases by Composts. Pages 373-381. In: *The Science of Composting*. M. de Bertoldi, P. Sequi, B. Lemmes and T. Papi (eds.). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1569-5_35
- Jimenez-Diaz, R., M. Cirulli, G. Bubicci, M. Jimenez-Gasco, P.Y. Antoniou and E. Tjamos.** 2012. Olive: an ancient crop under a major health threat Verticillium wilt on olive: importance and distribution. *Plant Disease*, 96(3): 304-329. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-11-0496>
- Joseph, R.S.I.** 1999. Metabolism of Azoxystrobin in Plants and Animals. Pages 265-278. In: *Pesticide Chemistry and Bioscience*. Woodhead Publishing.
- Keykhasaber, M., B.J. Thomma and J.A. Hiemstra.** 2018. Verticillium wilt caused by *Verticillium dahliae* in woody plants with emphasis on olive and shade trees. *European Journal of Plant Pathology*, 150(1): 21-37. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1273-y>
- Landa, B.B., A.G. Pérez, P. Luaces, M. Montes-Borrego, J.A. Navas-Cortés and C. Sanz.** 2019. Insights into the effect of *Verticillium dahliae* defoliating-pathotype infection on the content of phenolic and volatile compounds related to the sensory properties of virgin olive oil. *Frontiers in Plant Science*, 10: 232. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00232>
- Larif, M., A. Zarrouk, A. Soulaymani and A. Elmidaoui.** 2013. New innovation in order to recover the polyphenols of olive mill wastewater extracts for use as a biopesticide against the *Euphyllura olivina* and *Aphis Citricola*. *Research on Chemical Intermediates*, 39: 4303-4313. <https://doi.org/10.1007/s11164-012-0947-5>
- Leontopoulos, S., I. Giavasis, K. Petrotos and M. Kokkora.** 2015. Effect of different formulations of polyphenolic compounds obtained from OMWW on the growth of several fungal plant and food borne pathogens. *Agriculture and Agricultural Science Procordia*, 4: 327-337. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.03.037>
- Leouifoudi, I.A., A. Zyad, A. Amechrouq, H.A. Mouse and M. Mbarki.** 2014. Identification and characterization of phenolic compounds extracted from Moroccan olive mill wastewater. *Food Science and Technology*, 34(2): 249-257. <https://doi.org/10.1590/fst.2014.0051>
- Levin, A.G., S. Lavee and L. Tsror (Lahkim).** 2003. Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (cv. Picual) and its effect on yield under saline conditions. *Plant Pathology*, 5(2): 212-218. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00809.x>

Received: February 12, 2021; Accepted: November 8, 2021

تاريخ الاستلام: 2021/2/12؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2021/11/8