مكافحة الفطر *Fusarium graminearum* باستخدام المستخلصات الكحولية لأوراق نبات السنامكي والميرامية والاخيلية الالفية

نادية قحطان محمود

قسم التمريض / المعهد التقني

الموصل

الاستلام	القبول
١١ / ١٢ / ٢٠١١	٠١ / ٠٢ / ٢٠١٢

ABSTRACT

In this study the effect of alcoholic leaves extracts of *Cassia spp*, *Salvia officinalis* and *Achillea millefolium* was tested on the growth of the fungus *Fusarium graminearum* which was isolated from rice. Four concentration (5,10,15,20 mg/ml) for each plant were used. it was noticed that the inhibition effect of these extracts increase with increasing the concentration of them Prcentage of *Cassia spp*, *Salvia officinalis*, *Achillea millefolium* were (35.7, 100, 100%) respectively at the concentration 20 mg/ml. These results were compared with bioresistor *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* since they gives high antagonistic efficiency reached to 100 % Therefore we advice to use these plant extracts instead of chemical substance (fungicide), Because they are cheap, safety in use and don’t have any poisons effect on plant, animal, human and environment in addition the achieving of these extracts was very easy and available in nature.

الخلاصة

في هذه الدراسة تم اختبار تأثير المستخلص الكحولي لأوراق نبات السنامكي *Cassia spp* والميرامية *Salia officinalis* والاخيلية الألفية *Achillea millefolium* على نمو الفطر *Fusarium graminearum* المعزول من الرز وبمعدل اربع تراكيز لكل مستخلص وهي (5، 10، 15، 20 ملغم/مل) حيث لوحظ ان نسبة التثبيط بالنسبة لأوراق المستخلصات

النباتية تزداد بزيادة التركيز حيث كانت نسبة التثبيط لكل من مستخلصات السنامكي والميرامية والاخيلية الألفية (35.7 و 100 و 100 %) على التوالي عند التركيز 20 ملغم/مل، قورنت هذه النتائج مع المقاوم الحيوي *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma viride* حيث اثبت المقاوم الحيوي كفاءة تضادية عالية بلغت 100%، لذلك ننصح باستخدام هذه المستخلصات النباتية كبدائل عن المقاومة الكيميائية والمبيدات الفطرية وذلك لكونها رخيصة الثمن وأمينة الاستخدام ولا تترك أي أثار سمية على النبات والحيوان والإنسان والبيئة بالإضافة إلى سهولة الحصول عليها لتوفرها بكثرة في الطبيعة.

المقدمة

ينتمي الفطر *Fusarium* إلى شعبة أو قسم Ascomycota صنف الفطريات Sordariomycetes ورتبة Hypocreales وعائلة Nectriaceae[1] يسبب مرض لفحة الرأس في الحبوب الصغيرة مثل الرز والحنطة والشعير وصف هذا الفطر لأول مره في ايطاليا من قبل Cattaneo بعد ذلك سجلت إصابات للرز في البرازيل والصين والهند واليابان والنيبال واوغندا [2] حيث يكون واسع الانتشار ويكون متوفر في التربة وممرض للعديد من الأصناف النباتية وله القدرة على إنتاج السموم الفطرية في المحاصيل وبذلك تؤثر على صحة الإنسان والحيوان الذي يتناولها[3] تقدر نسبة الخسائر الناتجة بسبب هذا الفطر في أمريكا لمحصولي الحنطة والشعير مابين عام 1991 و 1996 تقريبا 3 بليون دولار [4] بينما بلغت نسبة الخسائر في state Planis and central united تقريبا 2.7 بليون دولار مابين عامي 1998 -2000[1] كذلك يسبب أمراض وتعفنا في الذرة والأعشاب التي تستخدم كأعلاف كالشوفان حيث أن لهذا الفطر القابلية على البقاء فوق سطح التربة وينتشر بواسطة الرياح والأمطار[5،١] ولهذا الفطر القدرة على إنتاج السموم ومنها Zearalenone و (DON) Deoxynivalenol و Trichothencenes[6،٤] ومن الطرق الحالية المستخدمة بنجاح في مكافحة المسببات المرضية هي المستخلصات النباتية كبدائل واعدة عن طرق المقاومة الكيميائية التي لها أضرار على البيئة والصحة وخاصة عند استخدامها بشكل خاطئ فالمستخلصات النباتية فاعلية في مقاومة المسببات الفطرية والبكترية وغيرها ولكونها رخيصة الثمن وأمينة الاستخدام ولا تترك أي متبقيات سمية على النبات بالإضافة إلى سهولة الحصول عليها لتوفرها بكثرة في الطبيعة [٧]. وتعد الميرامية *Salvia officinalis* من النباتات الواسعة الانتشار في العالم حيث تعود إلى العائلة الشفوية وتشمل حوالي ٩٠٠ نوع[٨] وتسمى أيضا Sage و Garden sage و Dalmation sage تستخدم في الكثير من التطبيقات العلاجية [٩] حيث الزيت المستخلص من الميرامية يستخدم كدواء عشبي ويمتلك فعالية مضادة للبكتريا والفطريات [١٠] لاحتوائها على العديد من

المركبات الكيميائية ومنها rosmarinic و caffeicو chlorogenic acid و carnosol و flavonoids بالإضافة إلى الزيوت الأساسية وهي thuyone و cineole[١١] أما السنامكي *Caasia spp* يعود إلى العائلة البقولية يسمى ايضا Ring worm senna حيث أن المستخلص النباتي له يستخدم ضد الأمراض البكتيرية والفطرية التي تصيب الإنسان[١٢،13،١٤] يحتوي النبات على العديد من المركبات منها القلويدات والليكتين والسابرونين والكلايكوسيد والسيانوجين و الايزوفلافونيد ، أما الاخيلية الالفية *Achillea millefolium* فهي من النباتات الطبية المنتشرة بصورة واسعة حيث تستخدم منذ أكثر من 3000 سنة [١٥] وتسمى أيضا Yarrow وهي نبات زهري تنتمي إلى العائلة المركبة تحتوي على مواد فعالة مثل حامض السيليك والاسبارجين والتانين [١٦] تمتلك الاخيلية فعالية مضادة للالتهابات Antinflammantory[١٧] وفعالية مضادة للأورام Antiumor[١٨] وفعالية مضادة للأكسدة Antioxidant[١٩] كما تستخدم أيضا في معالجة الكثير من الأمراض التي تصيب الإنسان[٢٠] نلاحظ من هذه الدراسات السابقة أن المستخلصات النباتية السابقة الذكر لم تستخدم كمبيد ضد الفطريات الممرضة للنبات (في الحقل) وهي أمينة ولا تسبب أضرار للبيئة والحيوان والإنسان ولذلك ارتئينا في هذه الدراسة استخدام المستخلصات النباتية كبدائل للمبيدات في التخلص من الممرضات الفطرية المسببة للأمراض الفطرية الحقلية وكذلك إمكانية تعفير الحبوب والمنتجات الغذائية والفواكه المخزونة بهذه المستخلصات الأمينة نوعا ما لتجنب إصابتها وتلفها من قبل الفطريات.

المواد وطرائق العمل

١- العزل

تم عزل الفطريات الملوثة للرز بزراعة حبوب الرز المعقمة والمأخوذة بصورة عشوائية في اطباق بتري حاوية على وسط Potato Dextros Agar PDA وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 28±2°م ولمدة سبعة أيام ومن ثم أخذت العزلات الفطرية النامية وزرعت في أوساط مائلة لحين التشخيص[٢١،2٢].

٢- تشخيص الاعفان

تم تشخيص هذه العزلات بدراسة الخواص العامة والمجهرية من حيث شكل المستعمرة ولونها وقوامها وشكل ولون الكونيدات وأبعادها ومن ثم أخذت عينة من كل مستع مرة ولقحت باستخدام تقنية تلقيح الأوساط الزرعية على ثلاث أوساط زرعية أساسية للتشخيص وهي:

1- (CYA) Czapek Yeast Extract Agar

2- (MEA) Malt Extract Agar
3- (G25 N) 25% Glycerol Nitrate Agar

وحضنت هذه البيئات عند درجات الحرارة 5°م و 25°م و 37°م ولمدة سبعة أيام [٢٣] وكذلك شخصت باستخدام تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية [٢٤] .

٣- تحضير المستخلص الكحولي لأوراق السنامكي والميرامية والاخيلية الالفية واختبار تأثيره على الفطر *Fusarium graminearum*

تم الاستخلاص الكحولي لكل من السنامكي، الميرامية، الاخيلية الالفية بنقع مسحوق الأوراق الجاف للنباتات في كحول الايثانول Ethanol بتركيز 99 % وبعد عملية السحق بجهاز Hommgenizer تم حفظ ها بوعاء محكم الغلق بدرجة 4-8°م ولمدة ثلاثة أيام ثم رشح المستخلص بعده طبقات من الشاش ثم ادخل في طرد مركزي بمقدار 2000 دورة لكل دقيقة للتخلص من البقايا النباتية وجفف المستخلص ثم اذيب الوزن المعلوم منه بمقدار معلوم من Dimethyl sulphoxide (DMSO) وبذلك أصبح لدينا محلول قياسي معلوم التركيز مقدر بالملغم/مل وعقم المستخلص بالبسترة عند درجة حرارة 64°م ولمدة 15 دقيقة[٢٥] وحضرت التراكيز (5،10،15،20) ملغم/مل من المستخلص مع الوسط (PDA) وباستخدام قانون التخفيف N1 V1= N2V2 للحصول على ادنى تركيز مثبط (MIC) وكذلك استخدمت معاملة المقارنة وهي طبق بتري حاوي على الوسط الزرعي بدون أي إضافة ومن ثم زرعت الأطباق بأقراص من المستعمرة الفطرية بعمر ٧ أيام وبقطر ٦ ملم وبمقدار ثلاث مكررات لكل تركيز ثم حضنت الأطباق بدرجة 28± 2°م ولمدة 7 أيام ومن ثم سجلت النتائج بقياس أقطار المستعمرات النامية.

٤- اختبار القدرة التضادية بين المقاومان الحيويان *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma viride* والفطر الممرض *Fusarium graminearum*.

تم الاختبار بالزراعة المزدوجة للفطر *Fusarium graminearum* مع المكافح الحيوي *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma viride* كلا على حدا على الوسط الغذائي PDA في اطباق بتري معقمة بقطر 9 سم بوضع قرص من النمو الفطري قطر 4 ملم بشكل مقلوب مع قرص مماثل له من المقاوم الحيوي وكانت المسافة بين القرصين 4 سم تقريبا. نفذت التجربة بواقع ثلاث مكررات وحضنت الأطباق بالحاضنة على درجة 25± 2 °م واخذت النتائج بعد أسبوع وقدرت درجة التضاد حسب سلم التقدير الخماسي الذي اعده [٢٦] وذلك كما يأتي:

١) تغطي نموات الفطر المقاوم كامل مساحة الطبق دون السماح للفطر الممرض بالنمو.

٢) تغطي نموات الفطر المقاوم ثلثي مساحة الطبق ويغطي الفطر الممرض الثلث الباقي.
٣) تغطي نموات الفطر المقاوم نصف مساحة الطبق ونموات الفطر الممرض تغطي النصف الاخر مع عدم وجود منطقة فاصلة بين المستعمرتين.
٤) تغطي نموات الفطر المقاوم ثلث مساحة الطبق في حين تغطي نموات الفطر الممرض الثلثين الاخرين.
٥) الفطر المقاوم غير نامي ونموات الفطر الممرض كامل الطبق.

يكون المقاوم فعالا عندما تكون القدرة الامراضية 2 أو اقل مع الفطريات الممرضة.

النتائج والمناقشة

تم عزل الفطر *Fusarium graminearum* من الرز وتم تشخيصه بالاعتماد على المظهر الخارجي والتشخيص المجهري للمستعمرة وبالاعتماد على الأطالس التصنيفية وبما أن لهذا الفطر تأثير على كثير من المحاصيل الزراعية ومنها الحنطة والشعير والرز والذرة والشوفان فقد ارتأينا دراسة إمكانية استخدام المستخلصات النباتية لأوراق نبات السنامكي والميرامية والاخيلية الالفية لمكافحته فالجدول (1) يمثل معدل أقطار مستعمرات الفطر المعاملة بالتراكيز المختلفة من المستخلصات الكحولية لأوراق النباتات السابقة.

الجدول (1): تأثير المستخلص الكحولي لأوراق نبات السنامكي والميرامية والاخيلية الالفية على معدل قطر مستعمرة الفطر *F . graminearum* (سم)

أسم النبات	التراكيز ملغم / مل				السيطرة
	٥	١٠	١٥	٢٠	
السنا مكي	5.9 B	5 C	4.8 D	4.5 D	7 A
الميرامية	3.2 B	2.9 C	0.4 D	0 D	7 A
الأخيلية الألفية	4.4 B	3 C	2.5 C	0 D	7 A

* الأرقام التي تحمل احرف متشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية بينها عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن

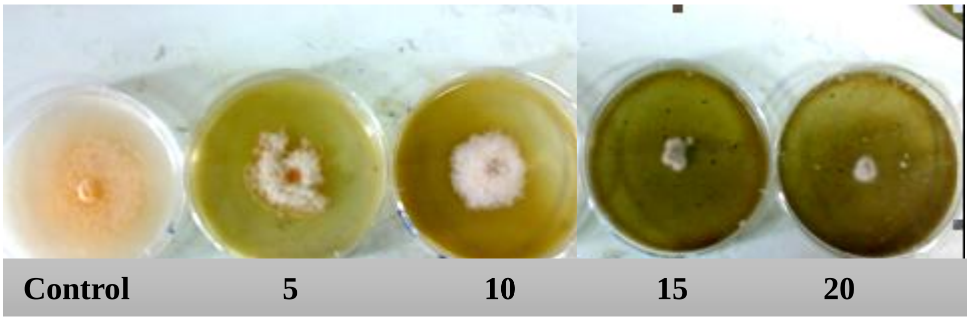
والجدول (٢) يبين أن النسبة المئوية لتثبيط المستخلصات الكحولية لنبات السنامكي والميرامية والاخيلية الالفية على الفطر المدروس تزداد بزيادة تراكيز المستخلصات حيث أظهرت النتائج أن المستخلص الكحولي لاوراق نبات الميرامية والاخيلية الالفية كانا اكفأ المستخلصات النباتية في تثبيط نمو الفطر *Fusarium graminearum* حيث كان اعلى نسبة تثبيط عند التركيز ٢٠ ملغم/مل اذا بلغت ١٠٠% ولكلا النباتين الشكل (١) و(٢) اما بالنسبة لمستخلص السنامكي فكان اعلى تثبيط عند التركيز ٢٠ ملغم/مل اذا بلغ 7 . ٣٥% الشكل (٣) من هذا يتضح ان

مستخلص الميرامية والاخيلية الالفية يعدان من اكفأ المستخلصات المستخدمة تثبيطا لنمو الفطر *Fusarium graminearum* ويعود السبب الى احتواء الميرامية على العديد من المركبات الكيميائية ومنها rosmarinic و caffeic و chlorogenic acid و carnosol و flavonoids بالإضافة الى الزيوت الاساسية وهي thuyone و cineole(١١) وقد ذكر(٨) ان المستخلص الكحولي لنبات الميرامية كان ذات فعالية مثبطة لنمو العديد من البكتريا وقد اكد(٢٧) ان المستخلص الكحولي لنبات الميرامية كان ذات فعالية مثبطة لنمو العديد من الفطريات وخاصة الأنواع التالية *Aspergillus flavus*، *Alternaria A.niger*، *Candida species*، *Pencillium frequentans*، *Fusarium oxysporum* اما نبات الاخيلية الالفية فيحتوي على المركبات الكيميائية التالية tannins Flavonoids، comarins، proazulene (١١) حيث تستخدم مستخلصاته الكحولية لتثبيط البكتريا المسببة للجروح وكذلك الفطريات ومنها *A.niger* و *Candida albicans*(٢٠) اما نبات السنامكي فله تاثير تثبيطي على نمو الفطريات الجلدية والخمائر (٢٨) كذلك بين (١٤) تأثير تراكيز مختلفة من مستخلص السنامكي وهي ٥، ١٠، ١٥، ٢٠، ٢٥ ملغم/مل على الفطريات التالية *Aspergillus fumigatus*، *Microsporum cains*، *Candida albicans* وقد لاحظ ان منطقة التثبيط تزداد بزيادة تراكيز المستخلص . كذلك فان لمستخلص السنامكي تاثير على الفطريات *Aspergillus flavus*، *A.parasiticus*، *Fusarium oxysporium*، *Helminthosporium*، *Candida albicans*، *Microsporium andoiumini* وقد كانت نسبة التثبيط ١٠٠% عند التركيز ١٠ و١٥ ملغم/مل بالنسبة للفطر *Aspergillus flavus*، *A.parasiticus* و ١٠٠% عند التركيز ١٥ملغم/مل للفطريات (الممرضة للإنسان والنبات)(١٣) كذلك فان له تأثير تثبيطي في الفطر *Aspergillus flavus* و *Fusarium proliferatum* و *Fusarium monilifome* (٢٩).

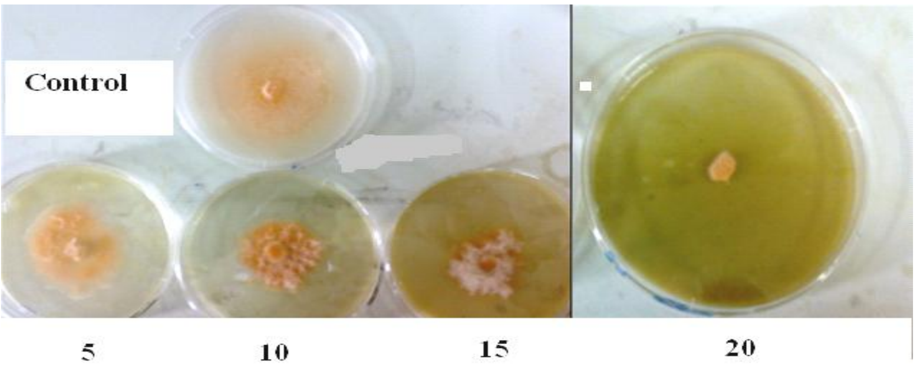
الجدول (2): النسبة المئوية لتأثير المستخلص الكحولي لأوراق نبات السنامكي والميرامية والاخيلية الألفية في الفطر *F . graminearum*

أسم النبات	النسبة المئوية للتثبيط %				السيطرة
	التراكيز ملغم / مل				
	٥	١٠	١٥	٢٠	
السنا مكي	15.6 C	27.5 B	31.3 B,A	35.7 A	0 D
الميرامية	54.2 D	57.6 C	93.7 B	100 A	0 D
الأخيلية الألفية	37.1 C	57.1 B	64.2 B	100 A	0 D

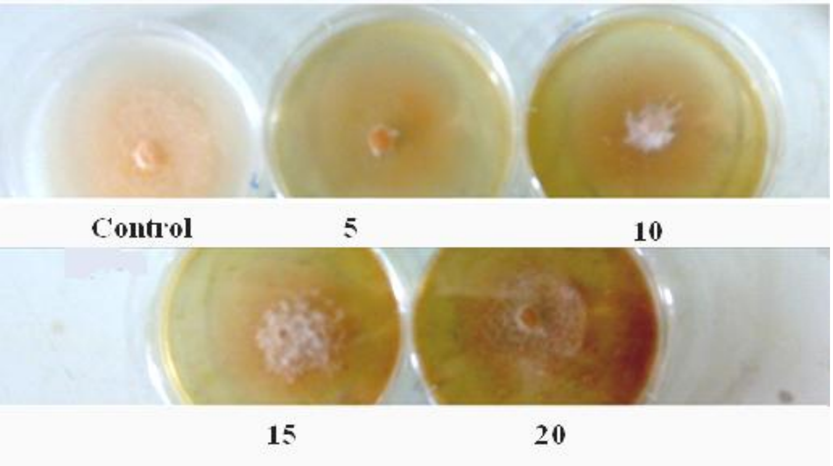
الارقام التي تحمل احرف متشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية بينها عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن



الشكل (١): تأثير مستخلص الميرامية في الفطر *F.graminearum*



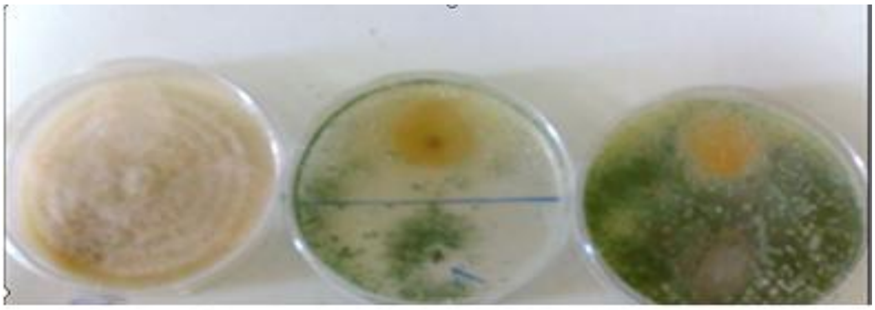
الشكل (٢): تأثير مستخلص الاخيلية الالفية في الفطر *F.graminearum*



الشكل (٣): تأثير مستخلص السنامكي في الفطر *F.graminearum*

وأظهرت نتائج اختبار القدرة التضادية ان المقاوم الحيوي *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma viride* كانا أسرع نموا من الفطر الممرض اذ غطى نموه كامل مساحة الطبق دون السماح للفطر الممرض بالنمو وهذا يعني أن التضاد ١٠٠% او (١) حسب سلم(

[26] الشكل (٤) حيث اشارت العديد من البحوث الى قدرة المقاوم الحيوي *Trichoderma harzianum* على افراز العديد من الانزيمات المحللة او المضادات الحيوية مثل Emodine و Trichodermin و Glgatoxins وافراز مواد ايضية غازية مثل Acetalhyde[31،٣٠] كذلك اكد[٣٢] بان *Trichoderma harzianum* له تأثير تثبيطي قوي على الفطر *Fusarium graminearum* وقد بين[٣٣] ان المقاوم الحيوي *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma viride* لهما القابلية على تثبيط نمو الفطر يات مثل *A. niger* و *Fusarium spp* و *Alternaria spp* وذلك لانهما ينتجان مضادات حيوية وانزيمات لها القدرة على ت ثبيط نمو الفطر وتكوين السبورات من هذا يتضح ان مستخلصي الميرامية والاخيلية الالفية لهما قوة تثبيطية مقاربة للمقاوم الحيوي وبهذا يكونان كفوئين في استخدامهما كمبيدات امينة ولاتترك أي اثار سمية على النبات والإنسان والبيئة اضافة الى توفرهما في الطبيعة.



الشكل (٤): اختبار القدرة التضادية بين المقاوم الحيوي *T.viride* و *T.harzianum* مع الفطر *F.graminearum*

المصادر

1) Goswami, R.S.; Kistler, H.C., Mole.Plan.Patho.,5: 515-525 (2004).
2) Lee, J.; Chang, I.; Kim, H.; Yun, S.; Leslie, J.; Lee, Y., Appl. Envi. Microbi., 75: 3289 – 3295 (2009).
3) www. Wikpedia.org
4) Sun, C.; Zhao, X.; Tang, W.; Chen, L., BMC Syste. Biolo., 4: 512 (2010).
5) Dewolf , E., www.wheat scab .psu.edu (2003).
6) Bacon, C.; Hinton, M., Biocont. Scien. Technol. 17: 81 – 94(2007).
7) Bobbarala, V.; Katikala, P.K.; Naidu, K.C.; Penumajji,S., J. Sci. Techn., 2: 87-90(2009).

8) Velickovic, D.; Randjelovic, N.V.; Ristic, M. Velickovic, A.; Smelcerovic, A. A., J.Serb.Chem.Soc.,68:17-24 (2003).
9) Mallesh, S. B.; Narendrappa, T.; Ramanujam, B., Karnataka, J. Agric. Sci., 21: 301-302 (2008).
10) Pereira, R.S.; Sumita, T.C.; Furlan , M.R.; Jorge, A.O.; Ueno, M., Rev. Saude. Publica., 38: 1-3 (2004).
11) Nascimento, G.G.F.; Locatelli, J.; Freitas, P.C.; Silva, G.L., Braz. J. Microbiol., 31: 247-256 (2000)
12) Abdel Gadir, W.S.; Ali, A.M.; Bakhiet, A.O., J. Ani. Veteri. Adv., 5: 468-471 (2006).
13) Abubacker, M.N.; Ramanthan, R.; Kumar, T.S., Nat . Prod. Radi., 7 : 6-9 (2008).
14) Reezal, I.; Somchit, M. N.; Abdul Rahim, M., Kuala Lumpur, Malaysia., 1: 654-659 (2002).
15) Mitich, L. W., *Weed Technol*., 4: 451-453 (1990).
16) Weakly, A.S., http:\\ www.herbarium.une.edu\ flora. Htm (2008).
17) Tunon, H.C. Olavsdotter.; L.B., J. Ethnopharmacol., 48:61-76 (1995).
18) Tozyo, T. Y.; Yoshimura, K. Sakurai, N.; Uchida, Y. Takeba, H. Nakai.; H. I., Chem. Pharm. Bull., 42: 1096- 1100 (1994).
19) Candan, F. M.; Unlu, B.; Tepe, D. Daferera, M.; Polissiou, A. Sokmen; H.A., J. Ethnopharmacol., 87: 215-220 (2003).
20) Tajik, H.; Jalali, F.S.; Sobhani, A.; Shahbazi, Y.; Zadeh, M.S., J. Ani. Veter. Advc., 7: 508-511 (2008).
21) Leslie, J.F.; Pearson, Charles, A.S.; Nelson, P.E.; Toussoun, T.A., Fusarium spp. Fromcorn, sorghum and soy bean fields in the central and eastern united states. *Phytopathol*., 80: 343-34 (1990).
22) Mengistu, A.; Sinclair, J.B., Plant. Dis. Rep., 63:616-619 (1979).
23) Pitt, J.I.; Hocking, A.D., "Fungi and food spoilage", 2 nd, Academic press, Sydney, 593 (1997).
24) Koneman, E.W.; Roberts, G.D.; Wright, S.E., "Practical labortatory mycology". 2 nd edition, Williama and Wilkins, 153 (1979).
25) AL-Rijabo. M. A., Ph.D. Thesis, College of science, University of Mosul (2004).
26) Bell, D.K.; Wells, H.D.; Markham, C.R., Plan. Pathol. Phytopathol., 72: 382 – 379 (1982).
27) Dulgar, A. and Hacioglu, N., J. Pharma. Res., 7:1051-1054 (2008).
28) Phongpaichit, S.; Pujenjob, N. Rukachaisirikul, V.; Ongsakul, S. M., Songkl. J. Sci. Technol., 26: 741-748 (2004).
29) Udomsilp, J.; Piyo, A.; Khang- Khun, P.; Thobunluepop, P., As. J. Food Ag. Ind., 24- 30 (2009).
30) Papavizas, G. C., Ann. Rev. Phytopathol., 23: 32-54 (1985).
31) EL- Kafrawy, A.A.; Egypt. J. Agric. Res., 80: 57-70 (2002).
32) Jun – Yong, H., Agricult. Scien ., 2: 1 (2010).
33) Odebode, A.C., J.Plan. Protect. Resear., 64: 1 – 5 (2006).