مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 19 العدد 3 سنة 2014
عبد الأمير سمير سعدون \رؤى عبد جيثوم ISSN 1997 - 4290

*تقييم كفاءة بعض القلويدات النباتية في النمو الشعاعي للفطرين *Alternaria raphani* و *Fusarium solani* المعزولين من بذور وجذور نبات الباذنجان

تاريخ الاستلام : 7\11\2013 تاريخ القبول : 3\1\2013

عبد الأمير سمير سعدون رؤى عبد جيثوم
قسم علوم الحياة / كلية العلوم
جامعة القادسية
Ameersmeer2013@yahoo.com

الخلاصة :-

شملت هذه الدراسة اختبار تأثير قلويد الأتروبين Atropine المستخلص من ثمار نبات الداتورة *Datura metel* L. و قلويد السولانين Solanine المستخلص من أوراق نبات الثلثلان *Solanum dulcamara* L. في النمو الشعاعي للفطر *Alternaria raphani* و الفطر *Fusarium solani* المعزولين من بذور وجذور نبات الباذنجان ، بالمقارنة مع مبيدي الفطريات بينوميل و بلوديل ، وكذلك اختبار تأثير القلويدات على إنبات بذور الباذنجان في التربة المعقمة وغير المعقمة ، و تشخيص الفطريات جزيئيا بأستخدام تقنية تفاعل السلسلة المتبلمر PCR . وأظهرت النتائج أن القلويدات النباتية كان لها تأثير مثبط معنوي لنمو الفطريات المختبرة على الوسط الغذائي الصلب (P.D.A) بالقياس مع معاملة المقارنة والمبيدين المختبرين عند مستوى احتمال 5 % . وكذلك لها تأثير واضح في رفع نسبة إنبات بذور الباذنجان في التربة المعقمة وغير المعقمة. وكان التركيز 15 ملغم / مل الأكثر تأثيرا مقارنة مع التراكيز الأخرى ومع فعل المبيدات الفطرية المستخدمة . وأوضح اختبار قياس طيف الأشعة تحت الحمراء Infra Red Spectrum العديد من الحزم المميزة التي تعود للمركبات القلويدية المنقاة .

المقدمة :-

يعد الباذنجان(*Solanum melogena* L. (Eggplant واحد من أهم محاصيل الخضر كثيرة الاستهلاك التي تزرع في جميع أنحاء العالم ، وينتمي للعائلة الباذنجانية *Solanaceae* وموطنه الأصلي جنوب شرق آسيا . والعديد من الأمراض تشكل تهديدا لزراعة الباذنجان (22 ,33) . ومنها الأمراض التي تسببها الفطريات مثل تبقع الأوراق Leaf spot ، اللفحة المبكرة Early blight ، تعفن الثمار Fruit root ، البياض الدقيقي Powdery mildew والذبول Wilt وغيرها التي تؤدي الى تدهور المحصول وتؤثر بصورة مباشرة أو غير مباشرة على نوعية المنتج وقيمته التسويقية (28) .وللحد من خسائر الأمراض النباتية يستخدم المزارعين المبيدات الكيميائية والتي يؤدي استخدامها الى العديد من المشاكل البيئية ، الصحية ، وسميتها المتبقية ، علاوة على ظهور صفة المقاومة لدى الآفات للعديد من هذه المبيدات الكيميائية . أزداد ضغط الرأي العام للحد من استخدام المبيدات الفطرية الكيمياوية في الزراعة وقد أثيرت مخاوف بشأن كل من الأثر البيئي والمخاطر الصحية المحتملة المتعلقة باستخدام هذه المركبات، حيث اتجهت الكثير من المؤسسات الزراعية والبحثية نحو أيجاد وسائل بديلة غير ضارة بالنبات وذات كفاءة عالية في القضاء على المسببات الممرضة للنبات ، والخيار البديل هو استخدام المبيدات الفطرية ذات الأصل النباتي بهدف زيادة الإنتاج الغذائي ، والتي تكون غير سامة للنبات وقابلة للتحلل بسهولة في الطبيعة ومتوفرة ومنخفضة التكلفة مقارنة بالمبيدات الكيميائية (17 ,24 ,27 ,34) ونظرا لأهمية المواد الفعالة في النباتات الطبية أتجه أهتمام العديد من الباحثين صوبها للتعرف على المزيد من هذه المواد غير المعروفة ، حيث شاع أستعمال النباتات الطبية بشكل متزايد في الفترة الأخيرة وفي عدة مجالات وفي دول مختلفة لما تحتويه من مواد فعالة مهمة ذات خصائص مضادة للفطريات من جهة(19) ، ومشجعة لإنبات البذور ومختزلة للأمراض الفطرية من جهة أخرى (27).ومن النباتات الطبية المهمة نباتي الداتورة *Datura metel* L. و الثلثلان *Solanum dulcamara* L. اللذان ينتميان للعائلة الباذنجانية *Solanaceae* ، (9) حيث يمتلك نبات *Datura metel* فعالية تثبيطية مضادة للفطريات الممرضة للنبات (Phytopathogens) (19,12) . أما نبات الثلثلان فيحتوي على قلويد السولانين Solanine الكلايكوسيدي الذي يمثل أحد الدفاعات الطبيعية للنبات ، وله خصائص مضادة للفطريات والآفات وكذلك يمتلك فعالية مضادة للأحياء المجهرية (20,31). لذلك هدفت هذه الدراسة الى تقييم كفاءة المستخلصات القلويدية لنباتي الداتورة و الثلثلان مقارنة

*البحث جزء مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني .

ببعض المبيدات الفطرية ودراسة سبل اعتمادها كبدائل عن المبيدات الكيميائية في السيطرة على الأمراض النباتية . وشملت محاور البحث :

1- عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لبذور وجذور الباذنجان.
2- تقييم كفاءة القلويدات في انبات بذور الباذنجان في التربة ، وفي النمو الشعاعي للفطريات المرافقة لبذور وجذور الباذنجان.

2- المواد وطرائق العمل :-

1-2 جمع العينات

تم جمع بذور نبات الباذنجان (صنف محلي) المستخدمة في هذا البحث من السوق المحلية في مدينة الديوانية بوصفه نبات عائل لعدد من الفطريات . وهذه البذور المنقاة من الأتربة والشوائب بشكل جيد تستخدم لأغراض الزراعة ،. وتم جمع ثلاث عينات عشوائية. اما عينات الجذور فقد تم جمعها من إحدى المزارع في مدينة الديوانية أيضا. وتم الحصول على ثمار نبات الداتورة من إحدى البساتين في مدينة الزعفرانية – محافظة بغداد ، أما نبات الثلثلان فقد جمعت أوراقه من إحدى المزارع في مدينة الطليعة– محافظة بابل . وغسلت الثمار والأوراق بالماء العادي ثم بالماء المقطر ، ثم تركت لتجف في درجة حرارة الغرفة . بعدها طحنت بمطحنة كهربائية وحفظ المسحوق بعبوات جافة لحين الأستعمال (25). وتم الحصول على المبيدات الفطرية بلوديل Bluedil و بينوميل Benomyle من السوق المحلية في مدينة الديوانية أيضا .

2-2 استخلاص القلويدات

اتبعت طريقة (16) لفصل القلويدات النباتية ، اذ تم وزن 100 غم من كل من المسحوق الجاف لثمار نبات الداتورة و أوراق نبات الثلثلان ، وجرى استخلاصها بجهاز الاستخلاص المستمر السكسوليت Soxholet extractor بمزجه مع 400 مل من الايثانول واستمر الاستخلاص لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة(45) مْ .تم نقل المستخلص في وعاء خزفي مع (50) غم من اوكسيد المنغنيسيوم و (300) مل من الماء المقطر ووضع الخليط بعدها في حمام مائي مع التحريك المستمر إلى إن جف المستخلص .ثم غلي ما تبقى من المستخلص الجاف مع (500) مل من الماء المقطر وأعيدت الخطوة الأخيرة مرتين مع إضافة (250) مل من الماء المقطر .بعدها رشح الخليط وهو ساخن بواسطة قمع الترشيح وأضيف للراشح (50) مل من حامض الكبريتيك 10% ثم ركز إلى ثلث الحجم الاصلي بأستخدام التقطير تحت ضغط متخلخل. بعدها رشح المزيج وهو ساخن لإزالة الرواسب العالقة المتكونة في أثناء التبخير .تم الاستخلاص بقمع الفصل باضافة (5 ×30) مل كلوروفورم واضيفت بضعة ملليترات من محلول هيدروكسيد الصوديوم 1% ثم الحجم نفسه من الماء المقطر للتخلص من اللون الأصفر بعدها تم تبخير المستخلص للتخلص من الكلوروفورم واعيدت بلورة النموذج بإضافة كمية قليلة جدا من الماء الساخن.

3-2 اختبار طيف الأشعة تحت الحمراء Infra Red Spectrum

تم دراسة طيف الاشعة تحت الحمراء IR للقلويدات المستخلصة من ثمار نبات الداتورة وأوراق نبات الثلثلان بأستخدام الأقراص Fourier KBr Transforms Infra Red FTIR وأجري هذا القياس في مختبرات قسم الكيمياء / كلية العلوم/ جامعة القادسية وذلك بأخذ كمية قليلة من القلويد النباتي الجاف لكل نبات ، ووضعت في جهاز قياس طيف الأشعة تحت الحمراء المربوط الى الحاسوب وعند تشغيل الجهاز يبدأ بقياس حزم كل قلويد على حدة (29).

4-2عزل الفطريات المختبرة

عزلت الفطريات المرافقة لبذور وجذور نبات الباذنجان المستخدمة في هذا البحث كالأتي: قسمت البذور والجذور بعد تنظيفها بالماء جيدا وتقطيعها لعدة قطع الى مجموعتين ، الأولى عقمت سطحياً بأستخدام محلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 1% لمدة ثلاث دقائق ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات ، أما المجموعة الثانية غسلت بالماء المقطر المعقم فقط ، ثم زرعت البذور والجذور في أطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي PDA (Potato’s Dextrose Agar) وبواقع خمس بذور أو قطع الجذور في كل طبق وبثلاثة مكررات لكل مجموعة وتركت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 25°م وبعد مرور أربعة أيام على عملية الحضن تم متابعة نمو الفطريات، إذ فحصت الأطباق لمعرفة الفطريات النامية وتم تنقية عزلات الفطريات على الوسط الغذائي PDA وتم حفظ العزلات النقية بزراعتها على الوسط الغذائي نفسه بصورة مائلة في أنابيب اختبار حجم 20 مل وحضنها لمدة أسبوع بدرجة حرارة 25°م بعدها حفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4°م لحين الاستعمال (4).

2-5 تشخيص الفطريات

2-5-1 التشخيص بالأعتماد على المفاتيح التصنيفية

تم تشخيص الفطريات بالاعتماد على المظهر الخارجي للمستعمرة (Morphological features) مثل الشكل واللون وقطر المستعمرة وارتفاعها وأيضاً بالاعتماد على الصفات المجهرية (Microscopic features) مثل شكل وحجم ولون وتركيب الحوامل والأبواغ والتراكيب الأخرى وفق الأسس التصنيفية المعتمدة بالمفاتيح التصنيفية الواردة في المصادر (32) و(21) و (13) و(11) .

2-5-2 التشخيص التأكيدي باستخدام تقنية تفاعل السلسلة المتبلمر PCR

1- استخلاص الحامض النووي DNA Extraction

استخلص الحامض النووي DNA للفطريات المختبرة باستعمال عدة خاصة لهذا الغرض هي عدة البايونير(Bioneer Kit) وحسب تعليمات الشركة المصنعة .

2- مضاعفة الحامض النووي المستخلص Amplification DNA

تم تحضير (Accu Power® TLA PCR Pre Mix tube) الخاص بتفاعل الـ PCR بأضافة 5µl من الحامض النووي المستخلص و 4µl (2µl forward and 2µ reverse) من البوادئ التي صممت في هذا البحث الجدول (2) حسب برنامج التصميم (Primer3 Plus) وتم إكمال الحجم إلى 20µl بإضافة الماء المقطر ثم مزجت المكونات جيدا باستعمال المازج Vortex ثم وضعت هذه الأنابيب في جهاز ال Convential PCR تحت الظروف المبينة بالجدول(1) .

جدول(1) ظروف تفاعل الPCR للبوادئ المصممة

البادئات	الظروف المستخدمة في جهاز الدورات الحرارية				
	المسخ الأولي (دورة واحدة)	30(دورة)			الاستطالة النهائية (دورة واحدة)
		المسخ	التثبيت	الاستطالة	
EF1-a	2 / 95 C° min.	30 sec. / 95 C°	30 / 58.3 C° sec.	40 / 72 C° sec	5 / 72 C° min.
ITS-r	2 / 95 C° min.	30 sec. / 95 C°	30 / 58.3 C° sec.	50 / 72 C° sec.	5 / 72 C° min.

جدول(2) تسلسل القواعد النتروجينية للبوادئ المصممة

اسم البادئ		تســلســـل القواعد النتروجينية ('3-'5)	العدد	حجم (BP) الناتج	المصدر
EF1-a	F	GGTATCGACAAGCGAACCAT	20	329 bp	صمم في هذه الدراسة
	R	CAGGCGTACTTGAAGGAACC	20		
ITS-r	F	CCCGTGTCTTTTGCGTACTT	20	444 bp	صمم في هذه الدراسة
	R	CCTACCTGATCCGAGGCAA	20		

F: Forword البادئ الأمامي ، R :Reverse البادئ العكسي .

3 -الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis

أتبعت طريقة (30) لتحضير جل الاكاروز (Agarose Gel) وذلك بإذابة 1gm من مسحوق الاكاروز في 90 ml من الماء المقطر و10 ml من (10X TBE buffer) وسخن المزيج حتى الغليان باستعمال المسخن الحراري ، بعدها تم تبريد المزيج إلى 65 م وإضافة 5µl من الأيثيديوم برومايد (Ethidium bromide) ، ومزج الخليط بالرج الخفيف وصب في المكان المخصص له في جهاز الترحيل الكهربائي وتم وضع مشط معقم بالأشعة فوق البنفسجية في الخليط لكي يتم عمل حفر في الجل وترك لمدة 30 -45 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة حتى يتصلب . ثم بعدها أزيل المشط ، وأضيف 5µl من اللادر (Ladder) إلى الحفرة الأولى (حاوي على قطع من DNA القياسي) ، وأضيفت الكمية نفسها من الحامض النووي المستخلص إلى بقية الحفر . ومن ثم تمت تغطية الجهاز بالغطاء الخاص به وتم الترحيل عند 70 فولت لمدة ساعة كاملة.

2-6 تأثير القلويدات النباتية والمبيدات الفطرية في النمو الشعاعي للفطريات المختبرة

لتحديد فاعلية قلويد الأتروبين لثمار نبات الداتورة و قلويد السولانين لأوراق نبات الثلثلان والمبيدات الفطرية المختبرة في النمو الشعاعي للفطريات المختبرة اتبعت طريقة (14) وهي تقنية الغذاء المسموم (Poisoned Food Technique) إذ تم تحضير ثلاثة تراكيز من القلويدات المختبرة وهي (5 ، 10 ، 15) ملغم/ مل من الوسط الغذائي المعقم PDA ، أما معاملة المبيدات الفطرية فقد حضرت بالتراكيز (5 ، 10 ، 15) ملغم/ 10مل من الوسط الغذائي المعقم PDA ثم صبت في الأطباق، أما معاملة المقارنة فقد تضمنت أطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي المعقم PDA من غير أية إضافة، وبعد أن تصلبت الأوساط في الأطباق، تم نقل قطعة قطرها 5 ملم من مزارع نقية للفطريات بعمر ثمانية أيام باستخدام ثاقب الفلين ووضعت في منتصف الطبق وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 مْ وبثلاثة مكررات لكل معاملة ومن ثم تم قياس معدل نمو الفطريات في المعاملات المختلفة باستعمال المسطرة (معدل ثلاثة أقطار متعامدة) بعد وصول الغزل الفطري في معاملة المقارنة إلى حافة الطبق، وتم حساب النسب المئوية للتثبيط باستخدام المعادلة الآتية:

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{معدل قطر الفطر في اطباق المقارنة} - \text{معدل قطر الفطر في اطباق المعاملة}}{\text{معدل قطر الفطر في اطباق المقارنة}} \times 100.$$

2-7 تأثير القلويدات والمبيدات في إنبات بذور الباذنجان في التربة

لمعرفة فيما إذا كان هنالك تأثير للقلويدات النباتية والمبيدات المختبرة في إنبات بذور الباذنجان لأغراض الزراعة في التربة ، تم تحضير محاليل بثلاثة تراكيز وهي (5 ، 10 ، 15) ملغم\ مل من القلويدات و التراكيز (5 ، 10 ، 15) ملغم\10مل من المبيدات بالتخفيف بالماء المقطر المعقم ، بعدها تمت معاملة البذور بالمحاليل المختلفة للقلويدات والمبيدات وذلك بتغطيسها لمدة ثلاث دقائق ، ثم تم غسلها بالماء المقطر المعقم ، أما معاملة المقارنة فقد تضمنت بذور غير معاملة بأية مادة أضافية ، وقد تم تحضير التربة وذلك بجلبها من أحدى الحقول في مدينة الديوانية ، وبعد ذلك تم تقسيمها على مجموعتين الأولى تركت من غير تعقيم والثانية عقمت باستخدام المؤصدة (Autoclave) بدرجة حرارة

121 °م و بضغط 15 باوند\أنج^2 لمدة ساعتين (4) ، ملأت بعدها أصص قطرها 15 سم و ارتفاعها 15 سم بالتربة وبكميات متساوية ، بعدها زرعت البذور المعاملة وبواقع عشر بذور في كل أصيص وبثلاثة مكررات لكل من معاملة الترب المعقمة وغير المعقمة وتم توفير ظروف مشابهه قدر الأمكان لظروف زراعة البذور في الحقل ، من درجة حرارة وضوء والماء اللازم لإنبات الحبوب (5). وعند بزوغ البادرات تم حساب النسبة المئوية للإنبات في المعاملات المختلفة من خلال المعادلة الآتية:

$$\text{النسبة المئوية لإنبات البذور} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{\text{عدد البذور الكلي}} \times 100 .$$

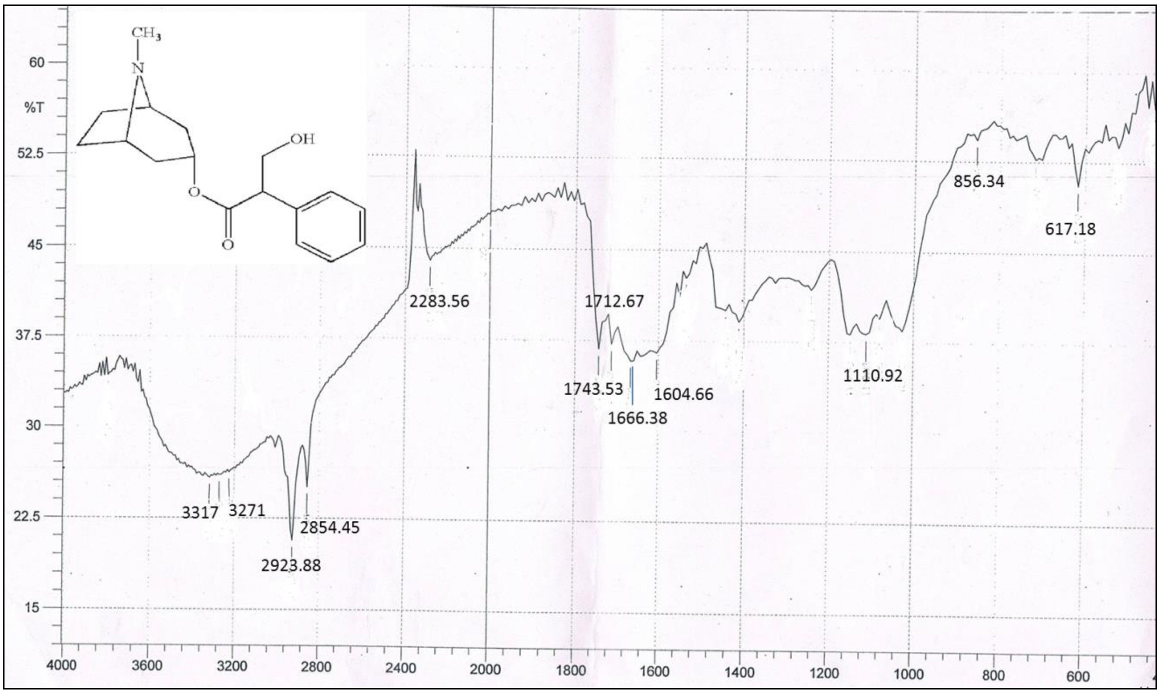
8-2 التحليل الإحصائي

أخضعت النتائج للتحليل الإحصائي لتحديد الفروق المعنوية عند مستوى احتمال 5 % ،إذ شمل التحليل الإحصائي تحليل التباين الثنائي ANOVA (Tow Way Analysis of Variance) ، وتم اختبار الفروق المعنوية بين المتوسطات بواسطة اختبار أقل فرق معنوي L.S.D (1) . تم تحليل النتائج إحصائيا بواسطة برنامج spss في الكومبيوتر .

3- النتائج والمناقشة :-

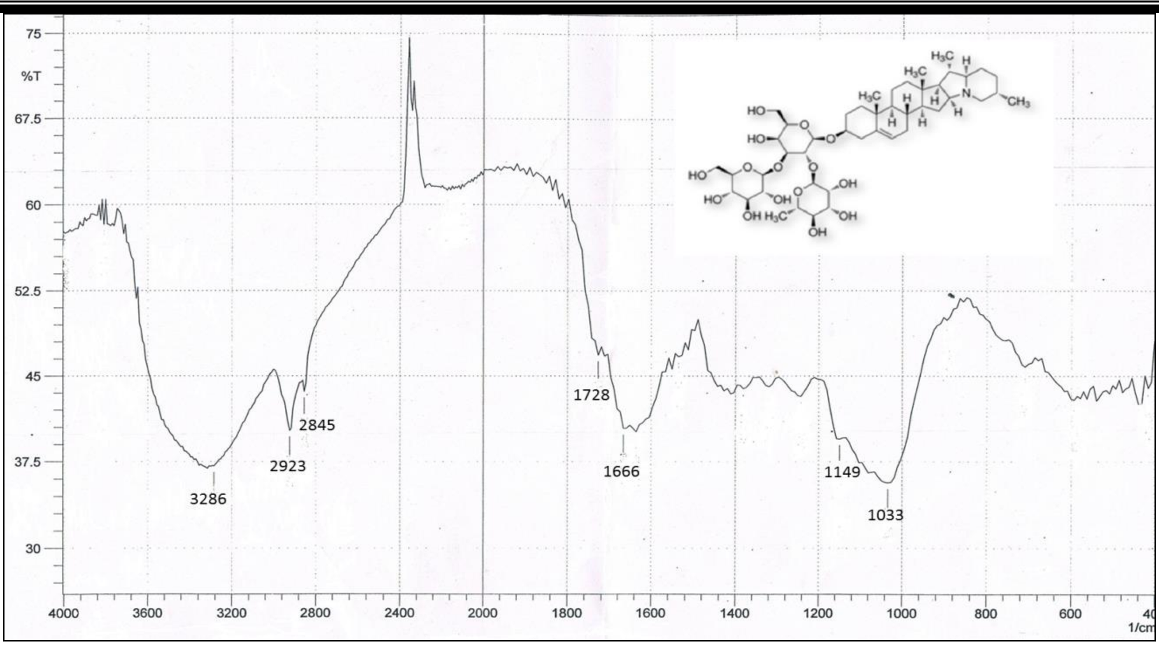
1-3 اختبار طيف الأشعة تحت الحمراء Infra Red Spectrum

فسر طيف الأشعة تحت الحمراء (FTIR) للقلويدات النباتية وحددت مواقع الحزم بالاعتماد على ما ذكره (29).حيث اتسم هذا النوع من الأطياف لتلك المركبات العضوية بتعقيده بعض الشئ وذلك بسبب التداخلات الحاصلة بين الحزم العائدة إلى جريئة القلويد من جهة والمجاميع المرتبطة بها من جهة أخرى. وقد تبين عند دراسة أطياف الأشعة تحت الحمراء (FTIR) لقلويدي نباتي الداتورة والثلثلان ظهور حزم مميزة تعود للمجاميع الفعالة (O-H) ، (C-H)، (C=O) ،(C=C)، (C-H)، (C-N) ،(N-H) و(C-O) الموجودة في قلويد الأتروبين الشكل (1) وقلويد السولانين الشكل (2).



الشكل (1) اختبار طيف الأشعة تحت الحمراء لقلويد الأتروبين المستخلص

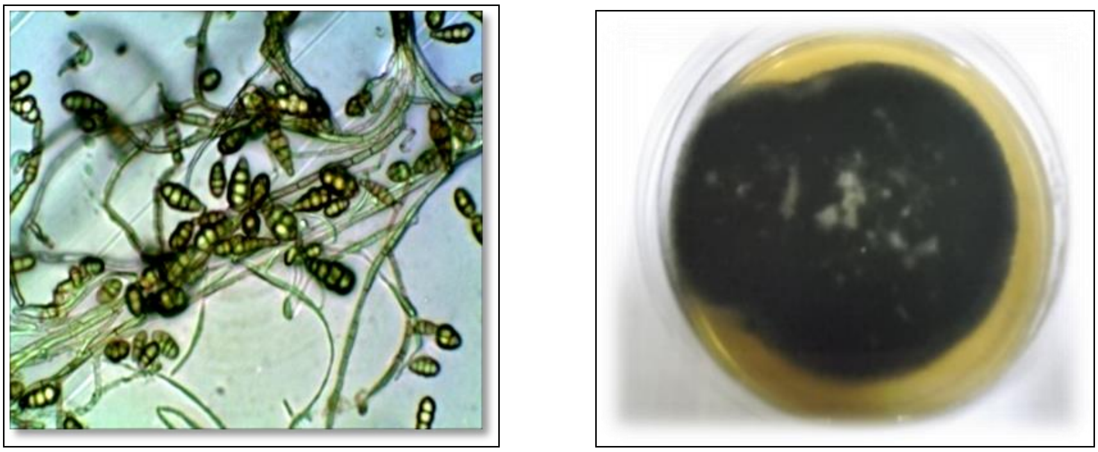
مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 19 العدد 3 سنة 2014
ISSN 1997 - 4290
عبد الامير سمير سعدون \رؤى عبد جيثوم



الشكل (2) اختبار طيف الأشعة تحت الحمراء لقلويد السولانين المستخلص

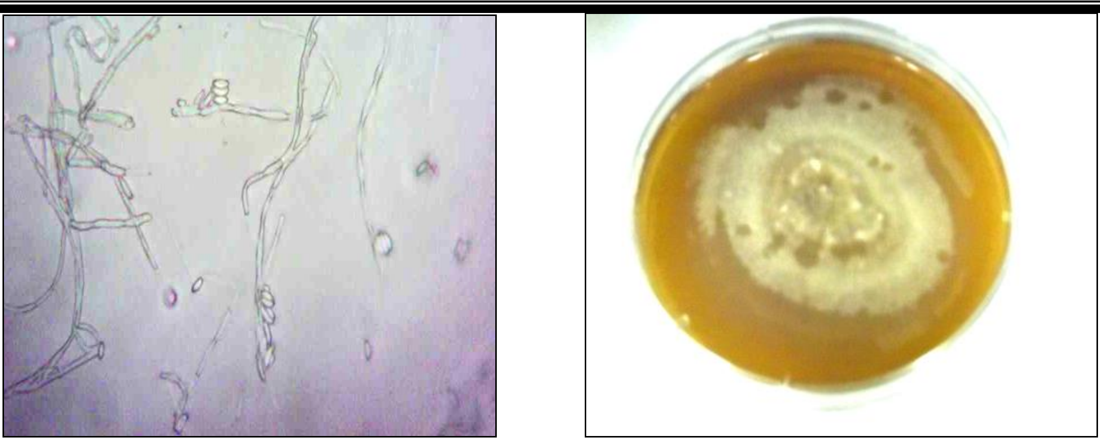
2-3 عزل وتشخيص الفطريات

تم تشخيص الفطريات بوساطة الطرائق الروتينية بحسب المفاتيح التصنيفية، بالاعتماد على المظهر الخارجي للمستعمرة (Morphological features)وأيضاً بالاعتماد على الصفات المجهرية (Microscopic features) الشكل (3 و 4) (15,8).



(أ) مستعمرة الفطر **(ب) أبواغ الفطر**

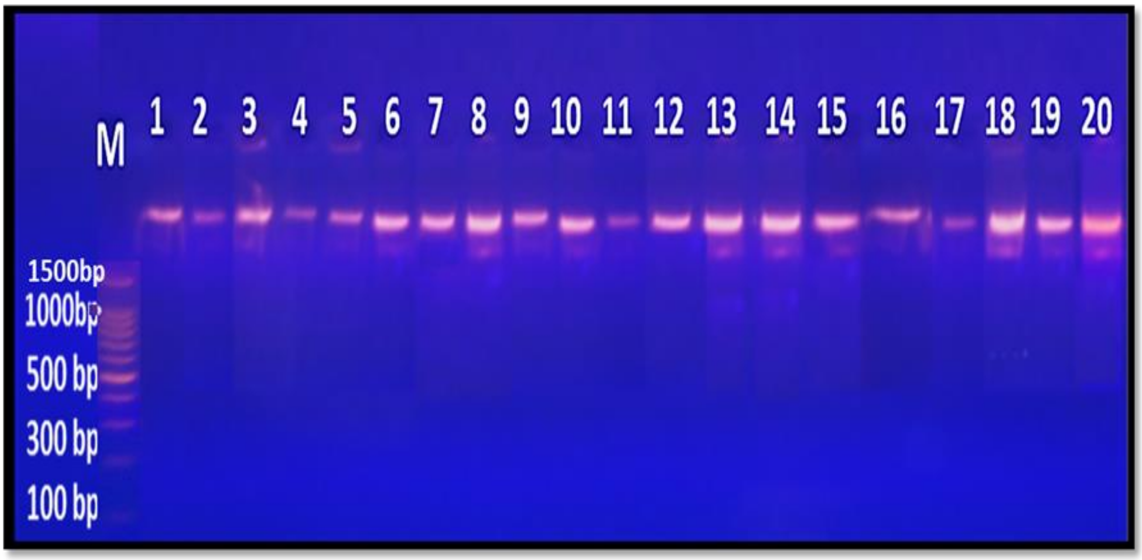
الشكل (3) الفطر *Alternaria raphani*



(أ) مستعمرة الفطر (ب) أبواغ الفطر

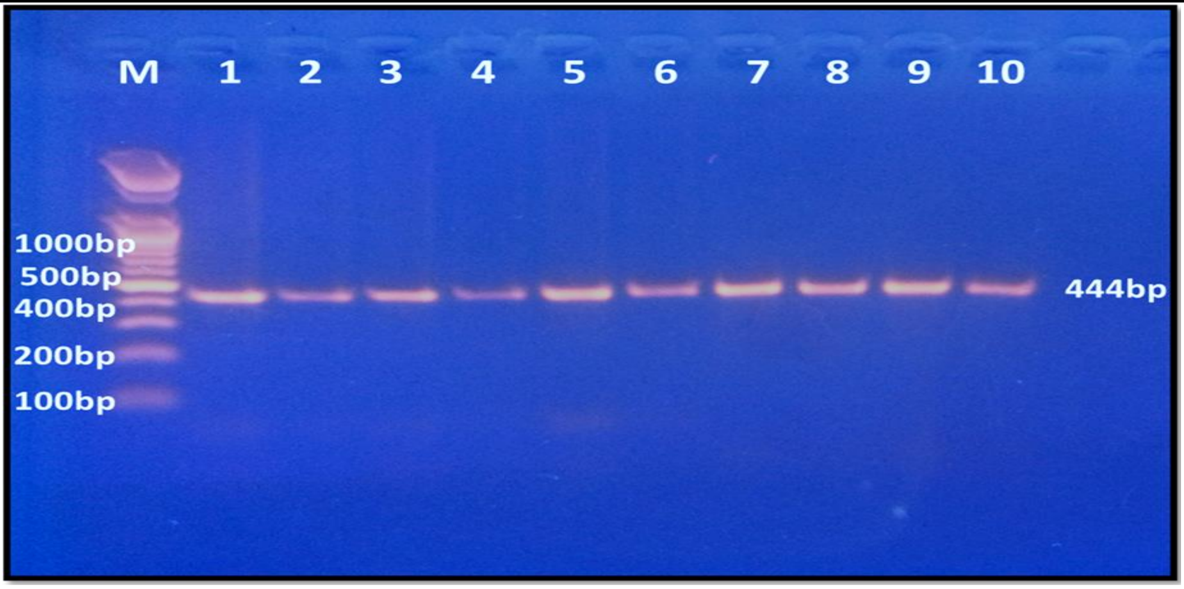
الشكل (4) الفطر *Fusarium solani*

وللتأكد من صحة تشخيص الفطريات تم تشخيصها جزيئيا بوساطة تقنية PCR ، وباستخدام البادئات ITSr (Internal Transcripted Spacer) للفطر *Alternaria raphani* و EF1-a للفطر *Fusarium solani* المصممة في هذا البحث بوساطة برنامج التصميم (Primer 3 Plus) ، حيث بلغت مسافة الترحيل الكهربائي للحامض النووي المضاعف للفطر *A.raphani* مع البادئ ITS-r 444 bp الشكل (5) ، وبلغت مسافة الترحيل الكهربائي للحامض النووي المضاعف للفطر *Fusarium solani* مع البادئ EF1-a 329 bp الشكل(6). ويمكن استخدام التشخيص الجزيئي بوساطة تقنية PCR لدعم وتأكيد التشخيص المعتمد على الصفات المظهرية ، وذلك لأنها من طرق التشخيص المعتمدة على الحامض النووي DNA (7).



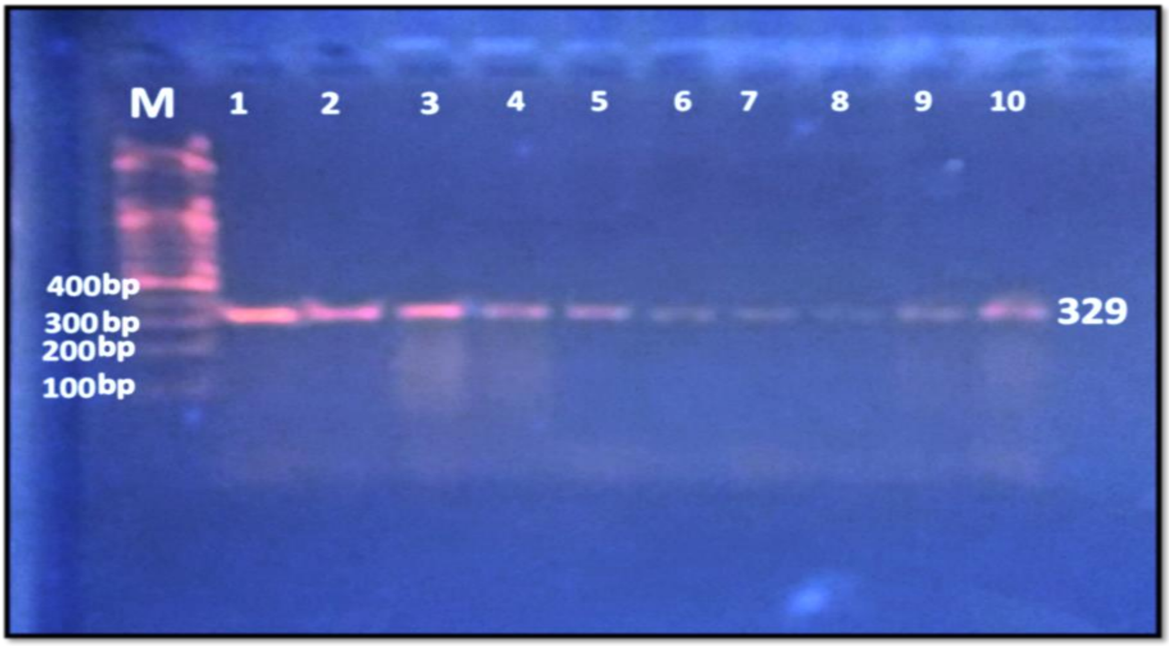
الشكل (5) الترحيل الكهربائي للأحماض النووية للفطريات المختبرة

- **1-10 *Fusarium solani*** .
- **11-20 *Alternaria raphani*** .



الشكل (6) الترحيل الكهربائي للحامض النووي المضاعف للفطر *A.raphani* مع البادئ ITS-r

- **M Ladder .**
- **1- 10 *A. raphani* .**



الشكل (7) الترحيل الكهربائي للحامض النووي المضاعف للفطر *F. Solani* مع البادئ EF1-a

- **M Ladder .**
- **1- 10 *F. solani* .**

3-3 : تأثير القلويدات النباتية والمبيدات الفطرية في النمو الشعاعي للفطريات

بينت نتائج تأثير القلويدات النباتية والمبيدات الفطرية المختبرة في النمو الشعاعي للفطريات *Fusarium solani* و *Alternaria raphani* المرافقة لبذور وجذور الباذنجان ، أن قلويد الأتروبين Atropine المستخلص من ثمار نبات الداتورة *Datura metel* L. وقلويد السولانين Solanine المستخلص من أوراق نبات الثلثلان *Solanum dulcamara* L. قد أثرت تأثيرا مثبطا معنويا في نمو الفطريات المختبرة عند مستوى احتمال 5 % وبالقياس مع معاملة المقارنة و مقاربة لتأثير المبيدين وخاصة عند التركيز 15 ملغم/مل الجدول (3) و (4). وكانت معدلات أقطار مستعمرات الفطريات تتناسب عكسيا مع تركيز القلويد ، أذ تقل أقطار نمو الفطريات بزيادة التركيز المستخدم ، أما النسب المئوية للتثبيط فقد كانت تزداد مع زيادة تركيز القلويد .

كما بينت النتائج تفوق قلويد الأتروبين لثمار نبات الداتورة على قلويد السولانين لأوراق نبات الثلثلان في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين المختبرين *Alt. raphani* و *F. solani* حيث تراوحت معدلات أقطار المستعمرات الفطرية عند التركيز 15 ملغم/ مل في معاملات قلويد الأتروبين 11 و 9.5 ملم وبنسب تثبيط 87.77 و 89.44% على التوالي . في حين بلغت معدلات أقطار مستعمرات الفطريات في معاملات قلويد السولانين 11.91 و 10.96 ملم وبنسب تثبيط 86.76 و 87.82 % على التوالي عند نفس التركيز. أما في معاملات المقارنة فقد بلغت معدلات أقطار المستعمرات الفطرية 90 ملم . وبالنسبة لمعاملات المبيدات الفطرية فقد بلغ معدل أقطار المستعمرات الفطرية في معاملات مبيد بينوميل عند التركيز15 ملغم/10مل 14.33 و 8.83 ملم وبنسب تثبيط 84.07 و 90.18 % على التوالي ، اما معاملات المبيد الفطري بلوديل فكان معدل أقطار المستعمرات 11.5 و6.5 ملم وبنسب تثبيط 87.22 و92.77 % على التوالي (جدول 3 و 4). وهذا يتفق مع ما وجدته السعيدي (2) والتي أكدت أن القلويد المعزول من بذور نبات الحلبة قد خفض من معدلات النمو الشعاعي للفطريات المختبرة. وكذلك تتفق مع ما وجدته حسن (3) بأن القلويدات المعزولة من اوراق نبات الداتورة قد ثبط نمو عدد من الفطريات الممرضة للنبات وبنسب تثبيط تراوحت مابين 0- 96%). يكمن الأثر السمي للمواد الفعالة النباتية من خلال عدة ميكانيكيات تؤثر بها على الخلية الفطرية ، فهي قد تعمل على التداخل مع الأغشية الخلوية وتغيير نفاذيتها ،أو تتداخل مع العمليات الأيضية مثل سلسلة نقل الإلكترونات و آمتصاص المغذيات وغيرها ،أو تعمل على تثبيط ومسخ الأنزيمات والبروتينات الخلوية (23). مسببة بذلك ضررا شديدا في الجدار الخلوي و الغشاء الخلوي و العضيات الخلوية نتيجة لقدرتها على الارتباط مع البروتينات الخارج خلوية والذائبة ،و مع الجدار الخلوي والأحماض النووية وتشكيل القنوات الأيونية في الأغشية الخلوية (10)، حيث تعمل القلويدات على الأرتباط مع الحامض النووي DNA للفطريات مؤدية الى منع نمو خلاياها (26) .

جدول (3) تأثير القلويدات النباتية والمبيدات في النمو الشعاعي للفطر *Alternaria raphani*

التركيز (ملغم/ مل) للقلويد و (ملغم/10مل) للمبيد	قلويد الأتروبين		قلويد السولانين		مبيد البينوميل		مبيد البلوديل	
	القطر (ملم)	التثبيط (%)	القطر (ملم)	التثبيط (%)	القطر (ملم)	التثبيط (%)	القطر (ملم)	التثبيط (%)
5	19.78	78.02	22.79	74.67	17.33	80.74	13	85.55
10	17.76	80.26	20.34	77.43	14.5	83.88	12	86.66
15	11	87.77	11.91	86.76	14.33	84.07	11.5	87.22
Control	90.00	_	90.00	_	90.00	_	90.00	–

- **تمثل النتائج الموضحة في الجدول معدل ثلاث مكررات .**
- **LSD 5 % بين التراكيز = 0.98 .**

جدول (4) تأثير القلويدات النباتية والمبيدات في النمو الشعاعي للفطر *Fusarium solani*

التركيز (ملغم/مل للقلويد و (ملغم/ 10 مل) للمبيد	قلويد الأتروبين		قلويد السولانين		مبيد البينوميل		مبيد البلوديل	
	القطر (ملم)	التثبيط (%)	القطر (ملم)	التثبيط (%)	القطر (ملم)	التثبيط (%)	القطر (ملم)	التثبيط (%)
5	22.07	75.47	23.25	74.16	11.16	87.6	10.5	88.33
10	19.71	78.1	18.03	79.96	9	90.00	8.4	90.66
15	9.5	89.44	10.96	87.82	8.83	90.18	6.5	92.77
Control	90	-	90	-	90	-	90	-

- تمثل النتائج الموضحة في الجدول معدل ثلاثة مكررات .
- L.S.D 5% بين التراكيز 1.17 .

4-2 تأثير القلويدات النباتية والمبيدات الفطرية في إنبات بذور الباذنجان في التربة

يتبين من النتائج في الجدول (5) أن القلويدات النباتية المعزولة قد رفعت من نسب إنبات بذور الباذنجان في التربة . فقد بلغت نسب انبات البذور عند التركيز 15 ملغم / مل 100 % في التربة المعقمة وغير المعقمة. أما عند التركيزين 5 و 10 ملغم/ مل فقد بلغت نسب إنبات البذور (90- 100 %) و (96.66 – 100 %) في معاملة قلويد الأتروبين والسولانين على التوالي في التربة المعقمة ، في حين بلغت نسب إنبات البذور في التربة غير المعقمة (93.33-83.33 %)في معاملة قلويد الأتروبين ، و (86.66 – 90 %) في معاملة قلويد السولانين ، بالقياس مع معاملة المبيدات الفطرية المستخدمة (بينوميل و بلوديل) والتي تراوحت نسب إنبات بذور الباذنجان المعاملة بها مابين (90-100%) بالنسبة لمبيد البينوميل و (86.66-100%) بالنسبة لمبيد البلوديل في التربة المعقمة . وقد تراوحت نسب الإنبات في التربة غير المعقمة لمعاملة مبيد البينوميل مابين (86.66-100%) و (83.33-93.33%) بالنسبة لمبيد البلوديل . وفي معاملة المقارنة بلغت نسب الإنبات 70% في التربة المعقمة و 66.33% في التربة غير المعقمة .

ويلاحظ أن نسب الإنبات قد ازدادت مع زيادة التركيز المستخدم وذلك لأن زيادة التركيز تؤدي إلى زيادة تأثير المواد المضادة للفطريات وبالتالي إنبات أكبر عدد ممكن من البذور وكذلك توفير الحماية الكافية للبذور من الفطريات المتواجدة في التربة غير المعقمة التي قد تهاجم البذور وتؤثر في نسب إنباتها بسبب ما تفرزه من مواد محللة للأنسجة الداخلية للبذور(6). وهذا يتفق مع ما توصلت اليه السعيدي (2) بان القلويد المعزول من من بذور نبات الحلبة قد رفع من نسب انبات بذور الباقلاء والسبانغ في التربة المعقمة وغير المعقمة وبجميع التراكيز المدروسة .

جدول (5) تأثير القلويدات النباتية والمبيدات في انبات بذور الباذنجان في التربة

التركيز (ملغم/مل للقلويد و (ملغم / 10مل) للمبيد	نسب إنبات البذور (%)							
	التربة المعقمة				التربة غير المعقمة			
	قلويد الأتروبين	قلويد السولانين	مبيد بينوميل	مبيد بلوديل	قلويد الأتروبين	قلويد السولانين	مبيد بينوميل	مبيد بلوديل
5	90	96.66	90	86.66	83.33	86.66	86.66	83.33
10	100	100	93.33	93.33	93.33	90.00	93.33	86.66
15	100	100	100	100	100	100	100	93.33
Control	70	70	70	70	66.33	66.33	66.33	66.33

- تمثل النتائج الموضحة في الجدول معدل ثلاثة مكررات .
- LSD 5 % بين التراكيز = 0.46 .

المصادر:-

1 - الراوي ، خاشع محمود و خلف الله ، عبد العزيز محمد .(2000). تصميم و تحليل التجارب الزراعية ،الطبعة الثانية . دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل .

2- السعيدي ، ولاء ياس لهمود . (2012) . تقييم كفاءة المستخلصات المائية والكحولية لثمار البلوط و بذور الحلبة قياسا ببعض المبيدات الفطرية في السيطرة على الفطريات المرافقة لبذور الباقلاء والسبانغ . رسالة ماجستير / كلية العلوم . جامعة القادسية .

3- حسن ، نجلاء طارق . (2011) . التأثير التثبيطي للمستخلص القلويدي الخام لنباتي الداتورة و الحرمل والزيوت الطيارة لنباتي الآس والقرنفل ودراسة التداخل بينهما في نمو عدد من الفطريات الممرضة للنبات . مجلة تكريت للعلوم الصرفة . المجلد (16) ، العدد (3) : 35-29.

4- ديوان ، مجيد متعب ويحيى ، عبد الرحمن حسن .(1984) . أمراض النبات / العملي . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . هيئة المعاهد الفنية . العراق .

5- سرحان ، عبد الرضا طه ؛ محسن ، خلدون ياسر و سعدون ، عبد الأمير سمير .(2001) . دراسة كفاءة بذور الحنطة والشعير في عدة مناطق في محافظتي القادسية و واسط . مجلة القادسية . المجلد (6). العدد(3):94-83 .

6- سعيد ، كامل كزار . (1986) . دراسة تأثير الفطريات المعزولة من الحنطة و إفرازاتها على الإنبات . المجلة العراقية للعلوم الزراعية (زانكو) . المجلد (4) . العدد (4) : 171-163.

7- Arif , M.; Chawla , S. ; Zaidi , N. W.; Rayar , J. K.; Variar , M. and Singh , U . S. (2012) . Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA Sub-unit and(transcription elongation factor TEF- 1a) gene . African Journal of Biotechnology . vol.(11). No.(2) .444-447.

8- Alexopoulos, C. J. ; Mims , C. W. & Blacwell , M. (1996). Introductory Mycology , 4th ed . John Wiley and Sons , Inc. pp: 869.

9- Al-Rawi , A. & Chakravarty , H.L. (1988). Medicinal plants of Iraq .Minst . of Agric. Baghdad . 2 nd ed.

10- Bokhari, F.M.(2009).Antifungal activity of some medicinal plants used in Jeddah, Saudi Arabia. Mycopaht. Vol.(7).no.(1).pp.51-57.

11-Barneet , H.L. and Hunter , B. B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi . Burgess Puble . Co. , Minnesota . 3rd . ed.

12- Dabur,R. ; Ali, M. ; Singh, H.; Gupta, J. and Sharma , G. L. (2004) . Anovel antifungal pyrrol derivative from *Datura metel* leaves . Pharmazie . Vol.(59) .568-570.

13- Domsch , K.H. ; Gams , W. and Anderson, T.(1980). Compendium of soil fungi Academic press , p.85.

14-Dixit , S.N.; Tripathy , S. C. and Upadhyey , R. R. (1976). The antifungal Substance of flower (*Rose indica*).Economic Botany.30:371- 373.

15-Ellis , M. B. (1971). Dematiaceous Hyphomycetes .Common Wealth Mycological Institute. Kew , Surrey , England . 608 pp.

16-Ikan , R. (1969). Natural products a laboratory guide .Academic Press London & New York . 3135 pp.

17- Khan, Z.S. and Nasreen, S.(2010). Phytochemical analysis , antifungal activity and mode of action of methanol extracts from plants against pathogens. J. of Agriculture Technology . vol.(6).no.(4).pp:793-805.

18- Khatoon, R.; Jahan ,N. ;Ahmed ,S. and Shahzad, A. (2013). Antifungal activity of aerial parts as well as in vitro raised calli of the medicinal plant science. vol.(7). No.(10).pp:476-481.

19 - Kagale , S. ; Marimuthu , T. ; Thayumanavan , B. ; Nandakumar , R. and Samiyappan , R. (2004) . Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctoni solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. Oryzae .Physiol . Mol . Plant Pathol . Vol.(65). No.(2): 91-100.

20- Kumar, p. ; Sharma , B. and Bakshi ,N. (2009). Biological activity. Of alkaloids from *Solanum dulcamara* . NatProdRes.Vol.(23).No.(8).pp719-723.

21-Leslie, J.F. and Summerell.B.A.(2006). The *fusarium* laboratory manual. Photographs by Suzanne Bullock.

22- Mohammedi, Z. and Atik , F.(2013). Fungitoxic effect of natural extracts on mycelial growth, spora germination and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus.*Australian Journal of crop Science. Vol.(7). No.(3). Pp:293-298.

23- Mishra ,A.K. and Vinit ,K.M.(2012). Field survy for some fungal diseases on eggplant .International Multidisciplinary Research Journal. Vol.(2). No.(9).pp:23.

24- Montealegre, J.R.; Reyes , R.; Peres, L.M. ; Herrera , R. ; Silva , P. and Besoain X. (2003). Selection of bioantigonistic Bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato . Environ . Biotechnol . vol.(6). No.(8).

25- Makboul , A. M. & Baky , A.M.(1998). Pharmacognosy . Dar AL-Hamed for Poplisher and distribution . Amman . Jordan. 1st ed.

26- Marr,W.; Tan,G.T.; Gordell, G.A. and Pezzuo , J.M. (1991) .Biological activity of noval microcyclic alkaloid from *albizi amara* detected on the basis of interaction with DNA . J.Nat. Prod., 54:1531-1542.

27-Rashid ,M.M.; Ruhul Amin,A.B.M. and Rahman, F. (2010). Determination of effective dose of garlic for controlling seed borne fungal disease of tomato .J. of Yeast and fungal Research .vol.(1). No.(9). Pp:183-187.

28-Sharma, D.K.; Sharma, N.and Rana, S. (2013). Seed-Borne disease of Brinjal (*Solanum melongena* L.) and their control measures :Areview . International Journal of Bioassay . vol.(2).no.(11). Pp:1428-1433.

29- Silverstein , R.M. ; Bassler, G.C. & Morrill , T.C.(2008). Spectrometric Identification of Organic compounds. Jour.Wiley and Sons, Inc.V. S. A., 6th ed. 340 pp.

30- Sambrook , J . and Russell, D. W. (2001) . Molecular cloning . Alaboratory manual. 3th ed . cold spring Harbor (NY): cold spring Harbor Laboratory Press , N.Y.

31- Sotelo, A. and Serrano, B. (2000). High-Performance liquid chromatographic determination of the glycoalkaloids alpha-solanine and alpha -chaconine in12 commerical varieties of Mexican potato . J Agric Food Chem .Vol.(48).No.(6).2472-2475.

32-Watanabe, T.(2002). Pictorial Atlas of soil and seed Fungi ,morphologies of cultured fungi and key to species .2nd ed. CRC Press. Boca Ratn, London, New York, Washington,D.C .

33-Usman , A.and Siddiqui, M.A.(2012). Effect of some fungal strains for the management of root-knot nematode (Meloidogyne incognita on eggplant (*Solanum melonena).* J.of A. Technology .vol.(8).no.(1).pp.213-218.

34-Yazdain, D.: Tan, , Y.H. :Zainal Abidin ,M.A. and Jaganath, I.B. (2011). Areview bioactive compounds isolated from plants against plant pathogenic fungi . J. of Medicinal Plants Research. Vol.(5). No.(30).

مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 19 العدد 3 سنة 2014
ISSN 1997 - 4290 عبد الامير سمير سعدون \رؤى عبد جيثوم

Evalution Efficacy of some plants alkaloids in radial growth of *Alternaria raphani* which isolated from seeds and roots of Eggplant

Received : 7\11\2013 **Accepted : 3\1\2013**

Abdulamir S. Saadoon **Roa'a A. Jeathom**

Department of Biology – college of sciences

AL-Qadicya University

Abstract:-

This study included the efficacy of the atropine alkaloid , which extracted from fruits of *Datura metel* L. , and the solanine alkaloid which extracted from leaves of *Solanum dulcamara* L. and some fungicides on the radial growth of *A. raphani* and *Fusarium solani* isolated from seeds and roots of eggplant compare with fungicides Benomyl and Bluedil , and also testing the effect of these treatments in germination of seeds in sterilized and unsterilized soil , and detection of tested fungi by molecular method using Polymerase Chain Reaction (PCR) . the results showed that the alkaloids have significant effect for growth of tested fungus on soild culture medium (PDA) , in measuring with controlled treatment and tested fungicides at level of possibility 5 % , and also increasing the rate of germination of eggplant seeds in sterilized and unsterilized soil , and the concentration 15 mg/ml was the most effect among other concentrations and nearest to the action of fungicides . The testing of measuring Infra Red Spectrum (FTIR) showed the presence of many specific bands due to the extraction alkaloids.

***The Research is apart of on MSC. Thesis in the case of the second researcher**