J. Agric. Sci. Mansoura Univ., 34 (3): 2297 - 2308, 2009

EVALUATION THE AFFECTIVE OF SOME PLANT EXTRACTS ON MYCELIUM GROWTH AND SPORE GERMINATION OF *Fusarium oxysporium* AND *Altrenaria alternate*

Nwara A. Mohamed and Jamela A. Idris
Plant Protection Dept., Omar Al-Mukhtar University, El- Bieda - Libya

اختبار فاعلية بعض المستخلصات النباتية على النمو الميسيليومى وإنبات الجراثيم للفطر *Fusarium oxysporium* وفطر *Altrenaria alternata*

نوارة على محمد و جميلة عطية ادريس
قسم وقاية النبات – جامعة عمر المختار.

الملخص

تم استعمال خلاصة أوراق بعض النباتات وهى النيم *Azadirachta indica*، الهوهوبا *Simmondsia chinensis*، الدفلة *Nerium oleander* والكافور *Eucalyptus* sp التي استخلصت مائيا وكحوليا وبتركيزات مختلفة، وقد أختبرت فى وجود ميبدي الزاينب و الدايثين للمقارنة وذلك بخلطها مع بيئة جلوكوز اسبارجين أجار (GAM) حيث أوضحت النتائج أن مستخلصات نباتي الدفلة والكافور سواء أكانت مائيا أوكحوليا كانا أكثر فاعلية على الفطرين *Fusarium oxysporium* و *Altrenaria alternata* المعزولين من نبات الطماطم، وإن البيئات المحقونة بهذه المستخلصات أدت إلى نقص في النمو الطولي والوزن الطازج والجاف وكثافة الجراثيم المنتجة لهذه الفطريات. وعند دراسة تأثير هذه المستخلصات على جراثيم الفطريات المختبرة دلت النتائج الإحصائية أن هذه المستخلصات تثبط إنبات الجراثيم وكذلك أنابيب الإنبات .

المقدمة

في إطار البحث عن البدائل الآمنة للمكافحة الكيميائية، يتجه البحاث نحو العودة للطبيعة وايجاد مصادر طبيعية وحيوية في برنامج متكامل للمكافحة المستنيرة وللحصول على الزراعة النظيفة لأجل حل مشكلة تلوث الغذاء والبيئة المتسبب عن استخدام المبيدات الكيميائية، وذلك لانها من احد أهم عوامل تلوث البيئة والغذاء وما يترتب عليه من مشاكل صحية، وأيضا أدى استخدامها المتكرر إلى زيادة في سعر المنتج بسبب تكلفة عمليات المكافحة، و إلى ظهور صفة المقاومة للمبيدات في الكائنات الممرضة. ومن ضمن هذه البدائل المستخدمة كسلاح ضد الإصابة كانت المستخلصات النباتية التي تعرف على أنها المبيدات ذات أصل نباتي (Wedge و Duke ٢٠٠٦)، و التي تلعب دورا في تثبيط الممرضات النباتية.

وتمتاز المستخلصات النباتية بأنها رخيصة الثمن لأنها من مصادر طبيعية وغالبا متوفرة محليا، وأيضا بأنها لا تلوث المياه أو البيئة وبالتالي تكون أكثر أمنا على صحة العانسان والحيوان، كما أنها لا توثر على مذاق الأغذية و لا تسبب اى ضرر للأعداء الحيوية سواء كانت كائنات دقيقة أوحشرات نافعة.

إن استخدام المستخلصات ضد العديد من الممرضات الفطرية للنبات تتباين في تأثيرها فقد تشجع او تثبط النمو الميسليومى (Qasemend و Abu- Blan 1996) وكذلك تؤثر على إنبات الجراثيم (Renuka وآخرون ٢٠٠٧)، وقد يكون لها تأثير أعلى من مبيد المانيب على إنبات جراثيم الفطر *Alternaria solani* (Montes Belmont و Garcia Licona 1997) كما خفضت وزن ميسليوم فطر *Fusarium solani* وبشكل معنوي نتيجة استخدام المستخلصات النباتية (Shazia-Shafique وآخرون ٢٠٠٤) وأيضا تثبيط نمو فطر *F. culmorum* (Magro وآخرون ٢٠٠٧) حتى اكثر من ٥٠% لفطر *F. moniliforme* (Miah وآخرون ١٩٩٠).

توجد العديد من المستخلصات النباتية المستخدمة في المكافحة ضد الأمراض النباتية من بينها مستخلص أوراق شجرة النيم *Azadirachta indica* الذي يثبط النمو الميسليومى لفطر *Colletrichum capsici* (Sinha وآخرون ٢٠٠٤) وفطر *Pyricularia grisea* وكذلك إنبات جراثيمه (Kamalakannan وآخرون ٢٠٠١) وبنسبة ١٠٠% لانبات جراثيم الفطريات الممرضة لأوراق الشاهى (Saha وآخرون ٢٠٠٥) ويثبط إنبات الاسكليروتينا (Mohan و Lakshmanan ١٩٨٩) فى حين انه لم يؤثر على النمو الميسليومى لفطر *Macrophomina phaseolina* (Oluma واخرون ٢٠٠٢) وهذا المستخلص كان عالي الفاعلية كمضاد فطرى لكل من الفطرين *Fusarium* و *Alternaria* (Pankaj-Sharma ٢٠٠٣) خاصة كمستخلص كحولي(Murugesan وآخرون ٢٠٠٢) و كان فعال لتثبيط إنبات الجراثيم للفطرين *F. proliferatum* و *A. brassicicola* (Hsieh وآخرون ٢٠٠٥) عند استخلاصه كحوليا او مائيا فانه يقلل من النمو الميسليومى لفطر *Fusarium* sp (Hasan وآخرون ٢٠٠٥) كما إن استخلاصه باردا ثبط معنويا نمو *F. oxysporum f. sp lycopersici* وكانت المستخلصات المائية الأقوى تأثيرا (Al-Khail٢٠٠٥)، فمستخلصات أوراق النيم أعطت أعلى تثبيط للنمو الميسليومى على أطباق بتري لفطر *Alternaria triticina* (Shabana-Parveen واخرون ٢٠٠٠) وفطر *A. brassicae* (Agnihotri و Ahamed ١٩٧٧) كذلك كثافة جراثيمه وإنباتها حيث تزداد التأثير بزيادة التركيز ويعتمد هذا التثبيط على طبيعة وتركيز المستخلص النباتي (Bhatiya و Awasthi ٢٠٠٧). أما مستخلص أوراق اليوكالبتوس فيعتبر مثبط قوى ضد العديد من الممرضات النباتية منها فطر *Trichophyton* sp (Dutta وآخرون ١٩٩٨) وفطر *Macrophomina phaseolina* (Oluma وآخرون ٢٠٠٢) وللمستخلصات القدرة على تثبيط النمو الميسليومى لفطر *Fusarium* بتأثير المواد الفعالة المكونة لها، فكانت مثبط لنمو فطر *F. oxysporium* (Kaushik وآخرون ٢٠٠٢) وعند إضافته للبيئة السائلة خفض النمو الميسليومى ووزن الفطر *A. alternata* (Rukhsana و Saima ٢٠٠٥) وفطر *A. brassicae* (Agnihotri و Ahamed ١٩٧٧)، في حين مستخلص أوراق الشجيرة الصحراوية الهوهوبا *Simmondsia chinensis* التابع لعائلة : Buxaceae اعطت نتائج ضد مرض صدأ الأوراق على نبات القمح (Sallam واخرون ٢٠٠١) تهدف هذه الدراسة لاختبار المستخلصات مباشرة على الفطريات ومقارنتها بالمبيد وذلك تحت الظروف المعملية.

المواد وطرق البحث

طريقة الحصول على المستخلصات النباتية:

تم تجميع أوراق كل من أشجار الدفلة (*Nerium oleander*) والكافور (*Eucalyptus* sp) من مدينة البيضاء أما الهوهوبا (*Simmondsia chinensis*) والنيم (*Azadirachta indica*) فجلبت من الكفرة . وتم وضع ٥٠ جم من الأوراق وأضيف إليها ٢٠٠ مل من الماء المقطر للحصول على المستخلص المائي و ٧٠% من الكحول الايثيلى للاستخلاص الكحولي، وبواسطة الخلاط تم تكسير الخلايا النباتية واستخلاص العصارة من الأنسجة وتم تصفيتها وجمعت المستخلصات لتوضع فى قنينات محكمة الإغلاق داكنة اللون بعد تعقيمها على البارد بواسطة مرشح زايتس لتحفظ فى الثلاجة على درجة -٢٠°م (Daayf وآخرون ١٩٩٥)

الفطريات المختبرة

تم عزل الفطر *Fusarium oxysporium* من شتلات نبات الطماطم أما فطر *Alternaria alternata* فتم عزله من ثمار الطماطم والتي كانت منزرعة فى صوبات الوسيطة حيث جلبت العينات للمعمل و قطعت لمساحة ١سم^2 شملت الأنسجة السليمة والمصابة ثم عقمت سطحيا باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم ٥% لمدة دقيقة واحدة وتم التخلص منه بالغسل ثلاث مرات متتالية بماء مقطر معقم وجففت القطع المعقمة على أوراق ترشيح معقمة ونقلت إلى أطباق تحوى بيئة الاجار المائي وبعد الحصول على نمو ميسليومى تم نقلها إلى أطباق بها بيئة غذائية وهى بيئة بطاطس دكستروز أجار وأجرى تعريف الفطريات

بدراسة الشكل المورفولوجي للمستعمرة النامية وبالفحص المجهرى تم تحديد الأنواع المعزولة وفقا للمراجع (Barnett و Hunter ١٩٩٨) (Toussoun و Nelson ١٩٧٦)

دراسة تأثير المستخلصات على الممرضات الفطرية

إنبات الجراثيم وطول أنابيب الإنبات

في شريحة زجاجية بها عيون مقعرة (ميكرومتيرية) multi well plates أضيف ١مل من التركيزات الثلاثة لكل مستخلص نباتي او شاهد (ماء مقطر وايثانول٧٠%) كل على حده مع ١مل معلق الجراثيم من أحد الفطرين المختبرين وبعد ١٢ ساعة من التحضين عند درجة حرارة الغرفة تم حساب إنبات ٤٠ جرثومة لكل معاملة وقد استخدمت المبيدات المتداولة محليا لإجراء اختبار المقارنة بالمعدلات الموصى بها ±٠,٠١غم وهما مبيد زينب wp ٨٠% (Zineb 80Wp) (٠,٢١ ، ٠,٢، ٠,١٩، غم / ١٠٠ مل) لفطر *F. oxysporium* اما لفطر *A. alternata* فكان مبيد الدايثين م-٤٥ (Dithane M-45 ٨٠ Wp) بتركيزات (0.26، ٠,٢٥، ٠,٢٤غم / ١٠٠ مل) وتم أيضا قياس طول أنبوبة الإنبات بواسطة الشريحة الميكرومتيرية ، ولإيقاف التجربة تم إضافة نقطة من محلول القتل والتثبيت ثم الفحص تحت المجهر (Wilson وآخرون ١٩٩٧).

النمو الميسليومى

أضيفت المستخلصات النباتية الخام بتركيز ١٠% (Singh و Singh ١٩٩٧) من كل مستخلص إلى أطباق بترى قطرها ٨,٥ سم يحوى ١٥ مل من بيئة جلوكوز اسبارجين أجار في كل طبق بمعدل ٥ أطباق لكل معاملة، وأضيف ماء مقطر معقم و الايثانول ٧٠% كل على حده والمبيدات المختبرة بالتركيزات الموصى بها وهما مبيدي زينب والدايثين م-٤٥ بتركيزات (٠,٢٠، ٠,٢٥) غم/ ١٠٠ مل على التوالي، كمعاملات مقارنة للتجربة. وفى مركز الطبق تم حقن قرص قطره ٠,٦ سم من الفطريات المختبرة وبعد تحضينها على ٢٥°م فى الظلام تم اخذ قياس النموالطولى وذلك بقياس القطرين المتعامدين واخذ متوسطهما ثم حساب مساحة النمو سم ^{٢} (Ismail .وآخرون ١٩٨٩).

إنتاج الجراثيم

تم إضافة ٥ مل ماء مقطر معقم بارد لكل طبق بحيث يغطى النمو الميسليومى النامي فى الأطباق المعاملة بالمستخلصات والمبيدات وأطباق الشاهد (الكنترول) غير المعاملة وتركت لمدة ساعة وأعيد رجها بشكل جيد ثم تم العد على شريحة الهيموسيتميتر ثلاث مرات واخذ متوسط القراءات.

الوزن الطازج والجاف

نمي الفطرين المختبرين فى أطباق بترى قطرها (٥ سم) بها ٥مل من بيئة جلوكوز اسبارجين السائلة والمضاف إليها المستخلص الخام ١٠% من كل مستخلص وماء مقطر وكحول ايثيلى ٧٠% بالإضافة إلى التركيز الموصى به من المبيدات المقارنة، وتم حقن ٠,٤سم من المسيليوم لكل فطر على حدا وبمعدل ٦ أطباق لكل معاملة. وحضنت الفطريات على ٢٥°م فى الظلام إلى أن غطى النمو الفطرى أطباق الشاهد (الكنترول) بالكامل فأوقفت التجربة وتم الترشيح على أوراق No 1 whatman واخذ الوزن الطازج والجاف بالجرام وأعيدت التجربة مرتين متتاليتين.

النتائج

التأثير على إنبات الجراثيم وطول أنابيبها

تشير نتائج التحليل الاحصائى إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات المختلفة وان المستخلصات لها تأثير على إنبات جراثيم الفطرين المختبرين مقارنة بالأطباق المعاملة بالماء أو الكحول الايثيلى، في حين نجد إن المبيدات المستخدمة بالتركيز الموصى به أوقفت كليا إنبات الجراثيم ولها تأثيرات فعالة على الفطرين حتى في التخفيفات الثانية والثالثة.ويتضح من النتائج أن جراثيم الفطرين*Fusarium oxysporium* و *Alternaria alternata*انخفض معدل إنباتها وأطوال أنابيب إنباتها فى وجود مستخلصات الأوراق لكل من الكافور والدفلة المائية والكحولية وكان لهذه المستخلصات تأثير قوى، ومن الجداول (١) يتضح ان مستخلصات الهوهوبا (مائيا وكحوليا) كذلك مستخلص أوراق النيم كحوليا لم تؤثر على الفطرين المختبرين وكانت مقاربة لنتائج الشاهد (الكنترول) المائى والكحولى اما مستخلص النيم المائى لم يكن له تأثير على فطر *A.alternata* بينما ظهرت فعاليته بشكل قوى على إنبات جراثيم فطر*F. oxysporium* حيث خفض

إنبات الجراثيم ولكن يقل تأثيره كلما زاد التخفيف على العكس من مستخلصات أوراق الكافور (المائى والكحولى) التى كانت قوية التأثير على نسبة إنبات جراثيم فطر *A.alternata* اكثر من جراثيم فطر *F. oxysporium* حيث أعطى تثبيط إنبات الجراثيم نفس تأثير المبيدين، أما عند الاستخلاص لأوراق الدفلة فكانت المستخلصات الكحولية أقوى تأثير من المائية عدا التخفيف الثالث على كلا الفطرين المختبرين وأعطت أعلى تثبيط من مستخلص أوراق الكافور على فطر *F. oxysporium* بينما كان اقل تثبيط لجراثيم فطر *A.alternata* مقارنة بمستخلص الكافور وتشير نتائج التحليل الاحصائى الى ان هذه المستخلصات كانت أقوى تأثير على فطر *A.alternata* مقارنة بفطر *F. oxysporium* ومن النتائج المتحصل عليها من هذه الدراسة إن لتركيز المستخلص دور فى انخفاض نسبة الإنبات وطول الأنابيب النابتة لجراثيم فطر *F. oxysporium*.

جدول (١): يبين نسبة انبات الجراثيم للفطريات المختبرة عند معاملتها بتركيزات مختلفة من المستخلصات النباتية والمبيدات في وجود الشاهد الكنترول المائي والكحولي.

المعاملة	الاستخلاص	*Fusarium*			*Alternaria*		
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
الشاهد (المقارن)	مائى	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠
	كحولى	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠
مبيد *		٠٠,٠	٠٠,٠	٠٠,٠	٠٠,٠	٠٠,٠	٠٠,٠
الهوهوبا	مائى	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠
	كحولى	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠
النيم	مائى	٢٠,٠	٤٢,٥	٦٢,٥	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠
	كحولى	١٠٠,٠	١٠٠,٠	١٠٠,٠	٩٧,٥	١٠٠,٠	١٠٠,٠
الدفلة	مائى	٦٥,٠	٧٠,٠	٧٢,٥	٦٧,٦	٧٠,٠	٧٠,٠
	كحولى	٣٠,٠	٦٥,٠	٩٠,٠	٥٠,٠	٥٠,٠	٨٠,٠
الكافور	مائى	٥٧,٥	٩٢,٥	٩٧,٥	٠٠,٠	٠٠,٠	٠٠,٠
	كحولى	٨٠,٠	٨٧,٥	٩٥	١٢,٥	١٢,٥	٦٠,٠

* مبيد زينب wp ٨٠% (Zineb 80Wp) (٠,٢١ ، ٠,٢ ، ٠,١٩ غم / ١٠٠ مل)

• مبيد الدايثين م-٤٥ (Dithane M-45 ٨٠ Wp) (0.26،٠,٢٥ ، ٠,٢٤ غم / ١٠٠ مل)

وكل المستخلصات المختبرة كان لها تأثير واضح على طول أنابيب الإنبات لجراثيم فطر *F. oxysporium* وهى تتباين فى درجة تثبيط استطالة هذه الأنابيب فكان مستخلص أوراق الهوهوبا فعال مقارنة بالشاهد الكنترول المائي والكحولي ٧٠% ايثانول وبينما كان الأقل تأثير مقارنة بالنباتات المختبرة الأخرى (النيم، الدفلة والكافور) ويتضح من الجدول (٢) إن استخلاص أوراق الهوهوبا مائيا أكثر فعالية من الاستخلاص الكحولي عند التخفيفات الثلاثة المستخدمة وانه فعال على *F. oxysporium* مقارنة بفطر *A. alternata* بينما كانت باقي المستخلصات لها تأثير قوى على أطوال أنابيب الإنبات للجراثيم وكان اقصر أنبوبة إنبات لجراثيم فطر *F. oxysporium* (٠,٥ ميكروميتر) عند معاملتها بمستخلص أوراق الدفلة الكحولي ولم تتجاوز ٢٠ ميكروميتر في وجود مستخلص النيم الكحولي الذي كان أطول متوسط لأنبوبة الإنبات. بمعنى إن جميع المستخلصات عدا الهوهوبا سواء كانت مستخلصة مائيا أو كحوليا أعطت درجة تثبيط عالية مما أدى لانخفاض فى أطوال أنابيب الإنبات لجراثيم الفطر رغم إن هذه المستخلصات أعطت نسبة إنبات عاليه وصل البعض منها إلى نسبة ١٠٠% ولكن ظهر التثبيط واضح فى أطوال أنابيب الإنبات، فقد كان أطوال الأنابيب لا تتجاوز ٠٣,٨ عند التخفيف الثالث لمستخلص النيم المائي وأما مستخلص الدفلة المائي فكان يؤثر على نسبة إنبات الجراثيم حيث وصل إلى ٦٥% للتخفيف الثاني بمتوسط طول الأنابيب ٠٣,٦ ميكروميتر ويتضح ان لهذا المستخلص تأثير على نسبة الإنبات وطول الأنابيب معا، ومن هذه النتائج يتبين إن لتركيز المستخلص دور كبير على أطوال أنابيب الإنبات والتى تزداد كلما انخفض التركيز بمعنى كلما زاد تركيز المستخلص زاد فعاليته على نسبة الإنبات وطول الأنابيب ، ومن الجدول (٢) يتضح أن أنابيب الإنبات الناتجة عن جراثيم الفطر *A. alternata* تزداد بطول يصل حتى ١٤٩,٩

ميكروميتر بالنسبة للشاهد، في حين أعطت المستخلصات تأثير واضح على جراثيم فطر *F. oxysporium* حيث كانت المستخلصات المائية والكحولية لنبات الهوهوبا ونبات النيم تؤثر بشكل ملحوظ مقارنة بالشاهد ولكنها اقل المستخلصات المختبرة تأثيراً، بينما أعلاها كان مستخلص أوراق الكافور المائى الذي منع إنبات الجراثيم بالتخفيفات الثلاثة والمتوسط كان ٠٠,٠ % بالنسبة للإنبات وكان نفس تأثير المبيدات بالتركيزات العالية، وقد أعطت مستخلصات الكافور المائية والكحولية درجة عالية جدا من الفاعلية لهذه المستخلصات ضد الفطر المختبر وصلت المتوسطات إلى ٠٤,٥، ١٠,٩ و ٠٤,٠ ميكروميتر على التوالى وذلك للتخفيف الثالث لهذه المستخلصات، وبالتالي المستخلص كان له فاعلية كمبيد طبيعى ضد الفطريات المختبرة ويؤثر على نسبة الإنبات وطول الأنابيب النابتة للفطرين المختبرين. وعند المقارنة بين تأثير مستخلصات الدفلة الكحولى على الفطرين نجد ان لها تأثير متقارب ١٠,٩ و ٠٩,٥ ميكروميتر لكل من *F. oxysporium* و *A. alternata* على التوالى ذلك للتخفيف الثالث.

الجدول (٢): تثير المستخلصات النباتية على طول أنابيب الإنبات لجراثيم الفطرين المختبرين

المعاملة	الاستخلاص	*Fusarium*			*Alternaria*		
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
الشاهد (المقارنة)	مائي	٦٨,٨	٦٨,٨	٦٨,٨	١٤٠,١	١٤٠,٣	١٤٠,٦
	كحولي	٦٤,٦	٦٦,٢	٦٧,٩	١٤١,٥	١٤٢,٧	١٤٦,٤
مبيد •		٠٠,٠	٠٠,٠	٠,٩	٠٠,٠	٠٠,٠	٠,٧
الهوهوبا	مائي	٤٩,٠	٥٥,٠	٥٦,٦	٦١,٤	٧٥,٧	١٤٩,٩
	كحولي	٣٣,٥	٣٧,٠	٤١,٧	٢٦,٤	٤١,٠	٧٨,٣
النيم	مائي	٠٩,١	٠٥,٨	٢٠,٢	١٨,١	٣٧,٧	٧٣,٦
	كحولي	٠,٨٥	٠٢,٩	٠٣,٨	١٧,٠	٧٣,٩	١٢٤,٤
الدفلة	مائي	٠٠,٥	٠٣,٦	٠٩,٥	٠٣,٥	٠٤,٧	١٠,٩
	كحولي	٠٤,٣	٠٦,٧	١٠,٠	٠٣,١	٠٣,٤	٠٤,٥
الكافور	مائي	١٠,٥	١٢,٣	١٢,٣	٠٠,٢	٠٠,٨	٠٤,٠
	كحولي	٠٤,٣	١٠,١	١١,٣	٠٠,٠	٠٠,٠	٠٠,٠

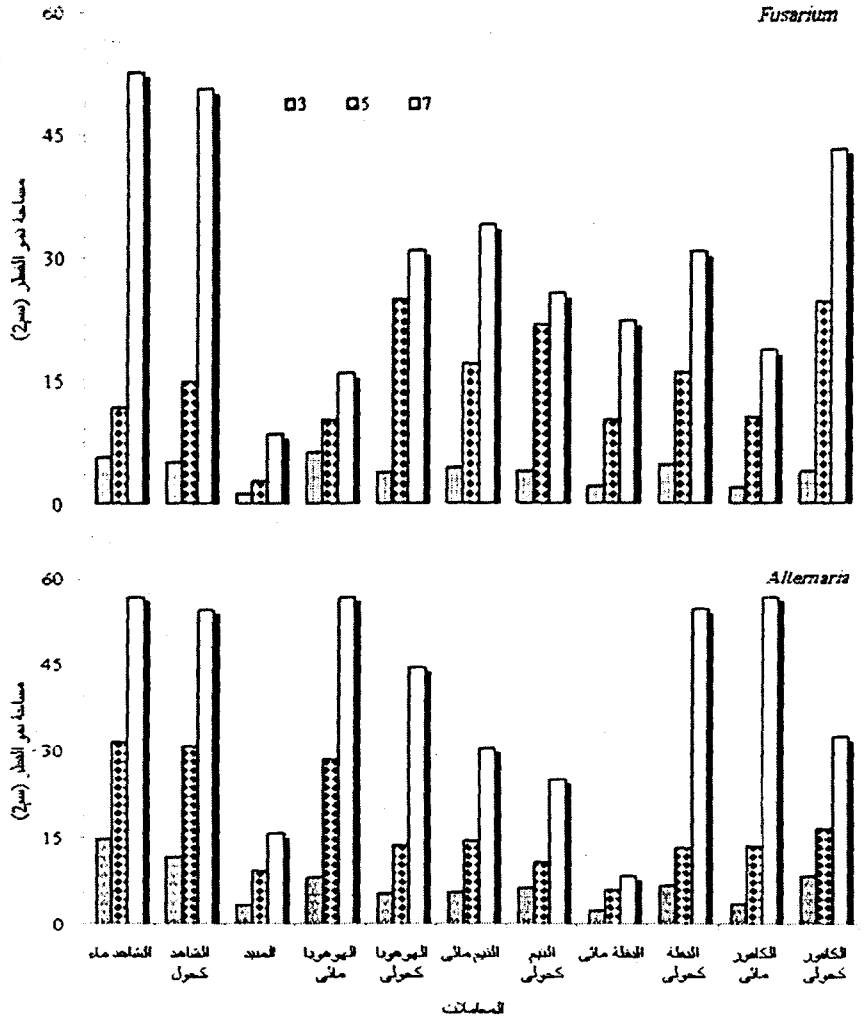
" مبيد زينب wp ٨٠% (Zineb 80Wp) (٠,٢١، ٠,٢، ٠,١٩، غم / ١٠٠ مل)

• مبيد الدايثين م-٤٥ (Dithane M-45 ٨٠ Wp) (٠,٢٥،0.26، ٠,٢٤، غم / ١٠٠ مل)

التأثير على النمو الميسليومى

تشير نتائج لاختبار التأثير على النمو الميسيليومى للفطرين عند خلط البيئة الناميين عليها بمعاملات مختلفة إلى وجود الفروق المعنوية بين المستخلصات المختبرة وبين الفطريات ومن أهم ما سجل فى هذه الدراسة إن مستخلص الدفلة المائي له تأثير قوى وفعال على الفطرين بينما باقي المستخلصات سواء أكانت مائية وكحوليه كان لها تأثير أفضل من الأطباق الشاهد (ماء او كحول) بينما فى الطبق المضاف إليه المبيد كانت مساحة النمو لا تتجاوز٠٨,٥ و ١٥سم^{2} لمبيد الزنيب والدايثين م-٤٥ على التوالي كما مبين بشكل (١). ويتضح أيضا من النتائج ان ميسيليوم فطر *F. oxysporium* يتأثر أكثر ولذا كان نموه فى الأطباق اقل من ميسيليوم فطر *A. alternata* ، كذلك يتضح من نتائج التحليل الاحصائى إلى وجود فروق معنوية بين القراءات الثلاثة المأخوذة لكل طبق وهى ٣، ٥ و٧ أيام بعد حقن الفطر فى الطبق وان الزيادة فى النمو الميسليومى لفطر *F. oxysporium* كانت بفروق معنوية بين أيام اخذ القراءات، ففي اليوم السابع حيث غطى النمو الميسليومى أطباق الشاهد نجد ٥١±١ سم^{2} يليها الكافور الكحولي ٤٣ سم^{2} نجد أن الأطباق المحتوية على مستخلصات الأوراق سواء أكانت مائية أو كحولية لكل من الهوهوبا، الدفلة وكذلك الكافور المستخلصة مائيا والنيم الكحولي كان أقصى نمو لها اقل من ٥٠% من أطباق الشاهد، أما باقي الأطباق فكانت بمتوسط ٣٢± ٢ سم^{2} ، وبالتالي توضح النتائج إن لمستخلصي الدفلة والكافور تأثير على النمو الميسليومى لهذا الفطر، وان الاستخلاص كحوليا كان أقوى تثبيطاً على النمو الفطرى من الاستخلاص مائيا. أما بالنسبة لتأثير المستخلصات على النمو الميسليومى لفطر *A. alternata* كان مستخلص الدفلة المائي أقوى المستخلصات حيث وصل مساحة النمو ٨,٣ بعد ٧ أيام من حقنه فى الطبق يليه النيم المائي والكافور الكحولي ٣١±١سم^{2} بينما كان نمو *F. oxysporium* مساحة متوسطها لهذين المستخلصين ٣٤،

٤٣سم٢ على التوالي و يتضح أيضا من النتائج ان الهوهوبا كحولي يقلل من مساحة نمو فطر *A. alternata* مقارنة بالشاهد الكحولي. ولتحديد الفاعلية بين المستخلصات وتأثيرها على الفطرين المختبرين كان مستخلص النيم الكحولى يثبط النمو الميسليومى للفطرين بنفس الدرجة ولا يتجاوز مساحة نموهما ٢٥ سم٢ .

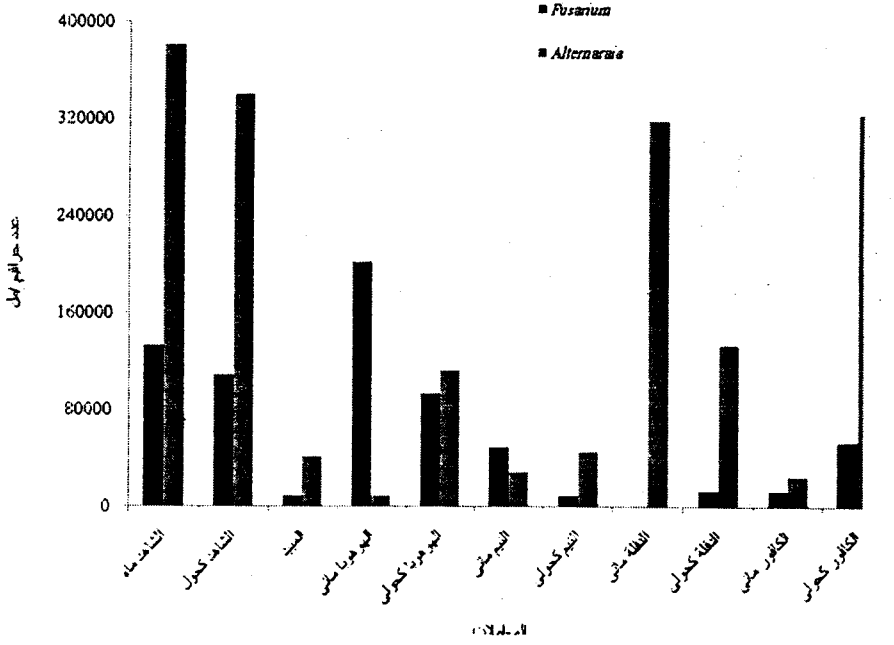


الشكل (١): يبين بيانيا مساحات النمو الفطرى سم٢ فى الأطباق بالمستخلصات النباتية و الشاهد (ماء او كحول كل على حده) بالإضافة إلى أطباق عوملت بالتركيز الموصى به من المبيدات المستخدمة والمتداولة ضد هذين الممرضين

إنتاج الجراثيم بعد النمو على أطباق معاملة بالمستخلصات النباتية

فى الأطباق المعاملة بالمستخلصات المختلفة والمبيدات وفى وجود الشاهد للمقارنة، تم عد الجراثيم التى انتجها الفطرين تحت الظروف المختلفة، ومن الشكل (٢) يتبين ان فطر *A. alternata* منتج للجراثيم أكثر من فطر *F. oxysporium* الذى يمتاز بإنتاجه للجرثيم الهلالية الكبيرة تشير النتائج إلى أن *F. oxysporium* عند نموه على بيئة معاملة بمستخلصات نباتية كحولية او مائية فان معدل إنتاجه للجراثيم اقل مقارنة بالشاهد. حيث وصل عدد جراثيم فطر *A. alternata* الى ٢,٨ و ٣,١ ضعف إنتاج جراثيم *F. oxysporium* فى الشاهد المعامل بالماء والكحول على التوالى، وبشكل عام توجد فروق معنوية بين المستخلصات النباتية المستخدمة وبين الفطرين المختبرين.وعند حساب الجراثيم المنتجة من الأطباق المعاملة لفطر *F. oxysporium* كان أعلى إنتاج له فى الأطباق المعاملة بالهوهوبا المائى يليه الكحولى والتى كانت مقاربة لعدد الجراثيم فى أطباق الشاهد يليه مستخلصات النيم والكافور الكحولي فى حين باقى المستخلصات المختبرة أعطت اقل عدد من الجراثيم وانخفض بها معدل التجرثم.

ويتبين من النتائج أيضا إن أعلى إنتاج للجراثيم كان فى الأطباق المعاملة بمستخلص الدفلة المائى يليه مستخلصات الكافور الكحولي حيث زاد عدد الجراثيم الناتجة من فطر *A. alternata* أما باقي المستخلصات فتظهر نتائج التحليل الاحصائى عدم وجود فروق معنوية بينها.

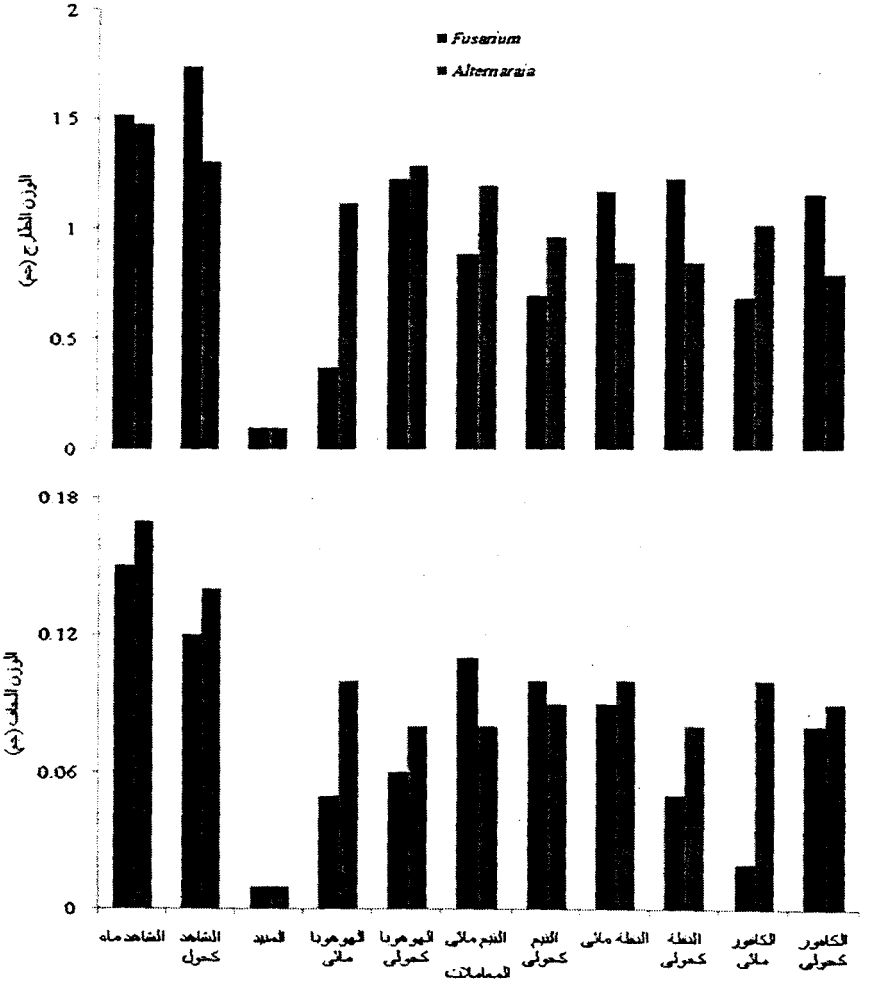


شكل (٢): يبين عدد الجراثيم الناتجة من اطباق بترى معاملة بمستخلصات نباتية ومبيدات فطرية فى وجود الشاهد ماء او كحول ايثانول ٧٠%

قياس الوزن الطازج والوزن الجاف

بقياس الوزن الطازج والجاف للنمو الفطري لكلا من الفطرين الناميين على بيئة جلوكوز اسبارجين السائلة والمعاملة بمستخلصات خام ومبيدين فى وجود الشاهد كلا على حده و بعد أن اكتمل نمو الفطرين وغطى النمو الفطري كل طبق الشاهد أوقفت التجربة وتم اخذ الأوزان الطازجة والجافة ، وتشير نتائج التحليل الاحصائى للأوزان الطازجة إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات المختلفة وعدم وجود هذه الفروق بين الفطرين بمعنى ان المعاملات توثر على الفطرين معا وكلاهما ينخفض الوزن الطازج مقارنة

بالشاهد وذلك يرجع لتأثير المستخلصات النباتية ولكن يبقى تأثيرها بدرجة اقل من المبيدات المختبرة، و كـان مستخلص الهوهوبا المائي له تأثير على الوزن الطازج لفطر *F. oxysporium* وكذلك مستخلص الكـافور المائي تأثير يليهما مستخلصي النيم مائيا وكحوليا بينما انخفاض الوزن الطازج لفطر *A. alternata* عنـد معاملته بالكافور الكحولي ٠,٨ جم ولا يختلف كثيراً عن تأثير الدفلة ٠,٨٥ جم حيث وصل بمتوسـط ٠,٩٧ جم فى الأطباق المعاملة بالنيم الكحولي يليه باقي المستخلصات التي خفضت وزن الفطر مقارنـة بالـشاهد المائي والكحولي بمتوسطات ١,٤٨ و ١,٣١ على التوالي، ولوحظ انخفاض الوزن الجاف لكـل المعـاملات للفطرين بأوزان متقاربة للفطرين مقارنة بالشاهد المائي والكحولي ولكن لم تصل هذه المعاملات لحد تـأثير المبيد، ومن الشكل (٣) يتضح ان الكافور المستخلص مائيا خفض الـوزن الجـاف الـى ٠,٠٢ جـم يليـه مستخلصي نبات الهوهوبا ثم مستخلص الدفلة الكحولي، اما باقى المستخلصات وخاصـة مستخلـصي النـيم كانت الأقل تأثير على الوزن الجاف لفطر *F. oxysporium* .



شكل (٣): يبين الوزن الطازج والجاف للنمو الميسليومى للفطرين الناتجة من اطباق بتـرى تحـوى بيئـة سائلة معاملة بمستخلصات نباتية ومبيدات فطرية فى وجود الشاهد ماء او كحول ايثانول ٧٠%

وعند قياس الوزن الجاف لفطر *A. alternata* يتبين من الشكل انخفاض الوزن الجاف لجميع الأطباق المعاملة بالمستخلصات النباتية وان المتوسطات تتراوح بين ٠,٠٨ – ٠,١ جم وهى اقل وزنا مقارنة بالشاهد المائي والكحولي ٠,١٧ و ٠,١٤ جم على التوالي.

المناقشة

فى السنوات الأخيرة شاع استعمال المستخلصات النباتية ضمن برامج المكافحة الحيوية ضد الأمراض الفطرية على النبات وفى العموم إن المستخلصات النباتية كحولية ومائية كانت فعالة فى الاختبارات المختلفة فى هذه الدراسة وتحت الظروف والتركيزات المختلفة ضد *Fusarium oxysporium* و *Alternaria alternata*وقد ثبطت هذه المستخلصات إنبات الجراثيم ، النمو الميسليومى للفطر وكثافة جراثيمه حيث ازداد التاثير بزيادة التركيز ويعتمد هذا التثبيط على طبيعة وتركيز المستخلص النباتي (Bhatiya و Awasthi ٢٠٠٧) ، وفى هذه الدراسة خفضت المستخلصات المائية والكحولية لكل من أوراق الدفلة والكافور معدل إنبات الجراثيم للفطرين وطول أنابيب إنباتها كذلك كان للنيم المستخلص مائيا (Kamalakannan وآخرون ٢٠٠١) (Renuka وآخرون ٢٠٠٧)، لم يكن للنيم المستخلص كحوليا اى تأثير على إنبات جراثيم الفطرين فى حين اعتبره (Kamalakannan وآخرون ٢٠٠١) كبديل للمكافحة الكيميائية لمبيد Carbendazin ويظهر التأثير على الفطرين فى التركيزات العالية عدا الكافور المائي كان قوى فى جميع التخفيفات وان نسبة إنبات جراثيم الفطر *A. alternata* كانت اقل بفعل المستخلصات مقارنة بفطر *F. oxysporium* وبالرغم من ان نسبة إنبات جراثيم الفطرين المختبرين كانت عاليه عند إضافة مستخلصي الهوهوبا إلا إن أطوال أنابيب الإنبات كانت اقل من الشاهد خاصة للمستخلصة مائيا وظهرت أيضا من النتائج أن الأقوى تأثير على أنابيب الإنبات هو مستخلص الدفلة الكحولي وباقي المستخلصات تباينت فيما بينها ولكنها جميعا أعطت قدرة تثبيطية عالية وخفضت من أطوال الأنابيب.

يظهر أيضا من النتائج أن مستخلصات النيم والهوهوبا قوية التأثير على *F. oxyspoium* مقارنة بفطر *A. alternata* الذي تأثر أكثر منه بتأثير مستخلصات الدفلة الكحولي والكافور (مائيا وكحوليا) بينما كانت الدفلة المستخلصة مائيا متقاربة التثبيط على كلا الفطرين

وبقياس مساحة نمو الفطرين المستخدمين على أطباق بترى والتي تعطى تأثير تثبيطي عندما تتناقص مساحة المستعمرة وذلك لمعرفة التأثير الفعال لهذه المستخلصات المختبرة فان النتائج تشير إلى أن المستخلصات النباتية لأوراق النيم والكافور لهما تأثير على الفطرين المختبرين (Murugesan وآخرون ٢٠٠٢) أما الاستخلاص المائي للنيم كان فعال حيث يثبط النمو الميسليومى (Lakshmanan و Mohan ١٩٨٩) وقد ثبط مستخلص النيم النمو الميسليومى لفطر *F.oxysporum* (Sinha وآخرون ٢٠٠٤ و Hasan وآخرون ٢٠٠٥) خاصة عند الاستخلاص الكحولى وكان له تاثيرعلى الفطرين المختبرين بنفس الدرجة اما المستخلصات الكحولية لنباتى الدفلة والكافور أعطت اقوي تأثير من المستخلصات المائية لهما.

بينما الدفلة المائي كان أقوى تأثير على *A. alternata*

بينما مستخلصات الكافور المائية والكحولية ثبطت بشكل عالى النمو الميسليومى لفطر *F. oxysporium* فى كل التخفيفات (Kaushik وآخرون ٢٠٠٢) ان التركيزات العالية من مستخلصات الكافور اقل تأثير وفاعلية مقارنة بالتركيزات المنخفضة (Rukhsana و Saima ٢٠٠٥) ذلك لأنه مضاد فعال ومثبط لنمو الفطريات الممرضة لنبات (Dutta وآخرون ١٩٩٨) ومن أهم ما أشارت إليه هذه الدراسة هي أن فطر *F. oxysporium* تأثر نموه الميسيليومى عند إضافة هذه المستخلصات المختبرة أكثر من فطر *A. alternate*. ويتضح من النتائج أيضا ان *A.alternata* تنتج طبيعيا الجراثيم من ٢ إلى ٣ إضعاف من جراثيم فطر *F. oxysporium* وان المستخلصات أثرت فى تجرثم الفطرين عدا مستخلصي نبات الهوهوبا الذي لم يعطى اى تأثير على فطر *F. oxysporium* فى حين انخفض إنتاج الجراثيم فى الإطباق النامي عليها فطر *A.alternata* والمعاملة بالدفلة المائي او الكافور الكحولي وقد يرجع ذلك للتأثير السام بعد إضافة هذه المستخلصات أصبحت البيئة غير ملائمة لنمو الفطر .

وعند دراسة تأثير المستخلصات على الوزنين الطازج والجاف فان المستخلصات المائية لكل من النيم والهوهوبا والكافور كذلك نيم الكحولي أظهرت انخفاض فى الوزن الطازج لفطر *F. oxysporium* بينما مستخلصات الدفلة والمستخلصات الكحولية للكافور والنيم كانت مؤثرة على أوزان الميسليوم لفطر *A.alternata* فى حين سجل فى هذا البحث انخفاض الوزن الجاف للفطريات المستخدمة بشكل معنوي نتيجة استخدام المستخلصات النباتية (Shazia-Shafique واخرون٢٠٠٤) من النتائج نجد أن مستخلص النيم الأقل تأثيراً على الفطرين فى حين كان الكافور المائي، ومستخلصي الهوهوبا و الدفلة الكحولي خفض الوزن المسليومى لفطر *F. oxysporium* بينما *A. alternata* كانت المعاملات منخفضة بدرجة متقاربة

تشير نتائج هذه الدراسة إلى أن الاستخلاص المائي والكحولي على البارد للنباتات الأربعة المختبرة بعد تعقيمها بمرشح زايتس قد كان لها تأثير تثبيطي على النمو الميسيليومى، إنبات الجراثيم والتجرثم ويعتمد هذا التثبيط على طبيعة وتركيز المستخلص ذكره(Bhatiya و Awasthi ٢٠٠٧ ، Hsieh وآخرون ٢٠٠٧) كما انه لم يؤثر على فاعلية هذه المستخلصات وظهر الفعل التثبيطي فى معظم الاختبارات التي أجريت في هذا البحث (Al-Khail٢٠٠٥)

الاختلاف فى التأثير المثبط للمستخلصات النباتية قد يرجع إلى الاختلاف في كمية ونوعية المادة الفعالة الأساسية كمضادة للفطريات وميكانيكية تأثيرها على فطر دون الأخر يتضح أن المستخلصات المائية والكحولية لها القدرة على تثبيط نمو وتجرثم الفطرين كما يعد مستخلص الكافور المائي له نفس تأثير مبيد الدايثين م-٤٥ في تثبيط إنبات الجراثيم وتجرثم الفطريات (Montes Belmont وGarcia Licona 1997) وان أوراق نباتي الدفلة والكافور وخاصة عند استخلاصها مائيا تعتبر الأقوى مقارنة بالمستخلصات لنباتى النيم والهوهوبا ولكن بشكل عام أن كل المستخلصات المختبرة فعالة ضد كلا الفطرين المستخدمين فى الدراسة.

المراجع

Ahmed, S.R; and Agnihotri, J.P. (1977) .Antifungal activity of some plant extracts. Indian-Journal of Mycology and Plant Pathology.; 7(2): 180-181.

Al-Khail, A. A.(2005). Antifungal activity of some extracts against some plant pathogenic fungi. Pakistan Journal of Biological Sciences. 8(3): 413-417.

Barnett, H. L. and Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. The american phytopathological Societ pp 130, 132.

Bhatiya, B.S; and Awasthi, R. P. (2007). *In vitro* evaluation of some antifungal plant extracts against Alternaria brassicae causing *Alternaria* blight of rapeseed-mustard. Journal of Plant Disease Sciences. 2(2): 126-131.

Daayf, F.; Schnitt, A. and Belanger, R. R. (1995). The effect of plant ectracts *of Reynoutria sachalinensis* on powder mildew, development and leaf physiology of long English cucumber. Plant Dis. 79: 580.

Dutta, B. K.; Rahman,.I.; and Das,T. K. (1998). Antifungal activity of Indian plant extracts. Mycoses-. 41(11-12): 535-536.

Hassan, M. M. ; Chowdhury,S. P.; Shahidul-Alam; Hossain, B.; and Alam, M. S.(2005). Antifungal effects of plant extracts on seed-borne fungi of wheat seed regarding seed germination, seedling health and vigour index. Pakistan Journal of Biological Sciences. 8(9): 1284-128.

Hsieh, T. F.; Huang, J. H.; Hsieh, L. J.; Hu, M. F.; and Ko, W. H. (2005). Antifungal effect of plant extracts on phytopathogenic fungi. Plant Pathology Bulletin.; 14(1): 59-66

Ismail, I. Abdel-Rahman, T. Eluy, E., and Osaman, M. (1989). Effect of the trigzine herbicides Goltix and Igran on cell wall degradation by some fungi. Can. Bot. 67: 834 -838.

Kamalakannan,-A; Shanmugam,-V; Surendran,-M; and Srinivasan,-R. (2001). Antifungal properties of plant extracts against *Pyricularia grisea*, the rice blast pathogen. Indian Phytopathology. 54(4): 490-492.

Kaushik, J. C.; Sanjay-Arya; and Tripathi, N. N. (2002). Antifungal properties of some plant extracts against the damping-off fungi of forest nurseries. Indian Journal of Forestry. 25(3/4): 359-361.

Lakshmanan, P.; and Mohan, S. (1989). Antifungal properties of some plant extracts against collar rot of *Phaseolus aureus*. Madras Agricultural Journal. 76(5): 266-270.

Magro, A.; Bastos, M.; Carolino, M.; and Mexia, A. (2007). Antifungal activity of plant extracts . Bulletin-OILB/SROP. 30(2): 291-295.

Miah, M. A. T.; Ahmed, H. U.; Sharma, N. R. ; Ali, A.; and Miah, S. A .(1990). Antifungal activity of some plant extracts.Bangladesh Journal of Botany.19(1): 5-10.

Montes Belmont, R. and Garcia Licona, R. (1997). Effect of plant extracts on spore germination and damage levels *of Alternaria solani* on tomato. Fitopatologia 32: 52-57.

Murugesan, S.; Mohan, V.; Sunitha, B.; and Balu, A. (2002). Antifungal activity of *Acacia nilotica* (babul) plant extracts against some fungal isolates. Myforest . 38(4): 351-355

Oluma, H. O. A.; Amuta, E. U.; and Sha'-ato, R.(2002). Antifungal activity of extracts of some medicinal plants against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) goid. Journal of Agriculture and Environment for International Development. 96(1/2): 85-95

Pankaj-Sharma; Singh, S. D; and Rawal, P. (2003) Antifungal activity of some plant extracts and oils against seed-borne pathogens of pea. Plant Disease Research Ludhiana. 18(1): 16-20

Qasem, J. R. , and Abu-blan, H. A. (1996). Fungicidal activity of some common weed extracts against different plant pathogenic fungi. J. Phytopathol. 144 : 157-161.

Renuka, R.; Prakasam, V.; Ravichandran, V.; and Karpagavalli, S. (2007) Antifungal activity of the plant extracts against *Alternaria* chlamydospora the incitant of leaf blight disease of *Chrysanthemum dendranthema* grandiflorum Tzelvev. Research on Crops. 8(2): 463-468

Rukhsana-Bajwa; and Saima-Iftikhar (2005). Antifungal activity of allelopathic plant extracts. VI: *In vitro* control of fungal pathogens by aqueous leaf extracts of *Eucalyptus*. Mycopath-. 3(1/2): 7-12

Saha,D.; Dasgupta, S.; and Saha,A. (2005). Antifungal activity of some plant extracts against fungal pathogens of tea (*Camellia sinensis*). Pharmaceutical Biology. 43(1): 87-91

Sallam, M. E. A.; Abou-Taleb,M. M. A.; and El-Nashar, F. K. (2001). Evaluation of some plant and mineral oils on the control leaf rust disease of wheat. Egyptian Journal of Phytopathology. 29(2): 1-17

Shabana-Parveen; and Kumar, V. R . (2000). Effect of extracts of some medicinal plants on the growth of *Alternaria triticina*. Journal of Phytological Research. 13(2): 195-196

Shazia-Shafique; Sobiya-Shafique; and Rukhsana-Bajwa. (2004). Antifungal activity of allelopathic plant extracts. V: Inhibition in biomass production of *Fusarium solani* by aqueous extracts of allelopathic grasses. Mycopath. 2(2): 83-86

Singh, C. J.; and Singh,B.G. (1997). Antifungal activity of some plant extracts against dermatophytes and related keratinophilic fungi. Advances-in-Plant-Sciences. 10(2): 249-251

Sinha,A. K.; Verma, K. P.; Agarwal, K. C.; Toorray, N. K.; and Thakur, M.P. (2004). Antifungal activities of different plant extracts against *Colletotrichum capsici.* Advances in Plant Sciences. 17(1): 337-338

Toussoun, T.A. ; and Nelson, P. E. (1976). *Fusarium* a Pictorial guide to the identitfication of *Fusarium* species according to the taxonomic system of snyder and Hansen. Second Edition . the pennsylvania state university press university park and London 43pp

Wedge, D. E; and Duke, S. O. (2006). Finding new fungicides from natural sources. Natural-products for pest management, 226th ACS National Meeting, Anaheim, California, USA.152-167.

Wilson, C. L.; Solar, J. M.; El-Ghaouth, A. and Wisniewski, M. E. (1997). Rapid evalution of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 81: 204-210.

EVALUATION THE AFFECTIVE OF SOME PLANT EXTRACTS ON MYCELIUM GROWTH AND SPORE GERMINATION OF *Fusarium oxysporium* AND *Altrenaria alternate*

Nwara A. Mohamed and Jamela A. Idris

Plant Protection Dept., Omar Al-Mukhtar University, El- Bieda - Libya

ABSTRACT

Leave of some plant ‹(*Azadirachta indica Nerium oleander Simmondsia chinensis* and *Eucalyptus sp*) were extracted using either water or Alcohol to study their effect against *Fusarium oxysporium* and , *Altrenaria alternata* (isolate from tomato plants) different concentrations of each extract were mixed with PDA medium to control , the growth of above pathogens.

The resulte indicated that both extracts for all plants. showed high effects against the tested fungi as all extracts inhibited spores germination, tube decreased the fungal growth lengh compound with fungicide diathene (control).