J. Plant Prot. and Path., Mansoura Univ., Vol. 3 (11): 1121 - 1127, 2012

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF TWO ANTIOXIDANTS AND GROWTH REGULATORS AGAINST *Botrytis cinerea*

El-Gali, Z. I.; N. A. Mohamed and A. A. Larbod
Dept. of Plant Protection, Fac. of Agric., Omer Al-Mukhtar Univ. El-Beida, P.O. 919. Email: Z_Elgali@yahoo.com

تقييم فعالية التأثير التثبيطي لأثنين من مضادات الأكسدة ومنظمات النمو ضد الفطر *Botrytis cinerea*

زهرة إبراهيم الجالي ، نوارة علي محمد و أمينة أمبارك لأربد
قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة عمر المختار، البيضاء، ليبيا

الملخص

أجري هذا البحث في مختبرات كلية الزراعة بجامعة عمر المختار، ليبيا خلال الموسم الزراعي ٢٠١٢/٢٠١١ لمعرفة مدى تأثير إضافة مضادات الأكسدة ومنظمات النمو على النمو الخضري أو الميسليومي للفطر *Botrytis cinerea* المسبب لمرض العفن الرمادي أو عفن الرقبة في البصل، وقد أدت المعاملة بالهيدروكوينون إلى خفض معنوي في النمو القطري للفطر عند جميع التراكيز المستعملة مقارنة بالشاهد، في حين أدت المعاملة بالامونيوم ترتريت إلى تشجيع النمو الميسيليومي في البداية وبارتفاع التركيز إلى ٥% لم يحصل نمو وتوقف على الإطلاق، كما خفضت المعاملة بمنظم النمو الجبرالين النمو القطري للفطر بنسب بسيطة جدا في حين أن المعاملة بمنظم النمو النفثالين اسيتك اسيد أدت إلى تشجيع النمو القطري للفطر بشكل معنوى أكثر من الشاهد وعند جميع التراكيز المستخدمة.

الكلمات المفتاحية: البصل ، مضادات الاكسدة، منظمات النمو، Botrytis cinerea، النمو الخضري ، العفن الرمادى ، عفن الرقبة.

المقدمة

ينتمى فطر *Botrytis cinerea* إلى مجموعة الأعفان التي تهاجم عددا كبيرا من المحاصيل الزراعية في الحقل (Coly-Smith وآخرون، ١٩٨٠) والبيت الزجاجي (Eden وآخرون ١٩٩٦؛ Sutton وSirjusingh ، 1996) وأيضا في المخزن (Reyes، ١٩٩٠؛ EL-Abd، ٢٠٠٢). يتصف هذا الفطر بخصائص فسيولوجية (Elad وEvensen (1995) تمكنه من التغير الوراثي المستمر (Elad واخرون 2004) من حيث مقاومته للمبيدات العضوية وغير العضوية (Parry و Wood، ١٩٥٨، Leroux وMoncomble 1993)، وحيث أن الاستعمال المتكرر والعشوائي لمبيدات الآفات في الزراعة يتسبب عنها ظهور العديد من المشاكل البيئة منها تلوث الماء والتربة و الحيوانات والغذاء بالإضافة إلي تلوث المنتجات الزراعية إضافة إلى القضاء على الميكروبات النافعة بالتربة ، بالإضافة إلى فقدان اختيارية المبيد ضد الكائنات الممرضة والآفات والحشائش (Stangarlin وآخرون، 1999)، لذا كان السبيل الأمثل للتقليل من التأثيرات السلبية لاستخدام هذه المبيدات هو تطوير برامج لمكافحة أمراض النبات لتشمل استخدام المقاومة الحيوية عن طريق إدخال الكائنات المضادة مثل البكتيريا، الخمائر و الفطريات أو نواتجها الايضية أو عن طريق استخدام مبيدات ذات أصل نباتي مثل المستخلصات أو الزيوت النباتية أو الأحماض العضوية وأملاحها وخاصة ضد فطريات الأعفان وذلك لحث المقاومة وتنشيط أنظمة دفاع النبات المستترة والتي تظهر نفسها بمجرد حدوث تلامس أو اتصال بين النبات والمثير الحي (Stangarlin و Pascholati، ١٩٩٤ ؛ Di Piero و Pascholati، ٢٠٠٢ ؛ Sun وآخرون ٢٠٠٧ ؛ Stangarlin و لخرون، ٢٠٠٨ ؛ Stangarlin واخرون، ٢٠١٠) (Larous وآخرون، ٢٠٠٧ ؛Carré-Missio وآخرون، ٢٠١٠).

وقد أكدت دراسات عديدة على أن استخدام مضادات الأكسدة (Antioxidants) لها تأثيرا فعالا في تثبيط النمو القطري للفطريات الممرضة ، حيث استخدم Galal و Abdou (١٩٩٦) ستة عشر نوعا من مضادات الأكسدة والتي أثبتت فعاليتها في تثبيط النمو القطري للفطريات *Fusarium moniliforme* ، *F. oxysporum* و *F. solani*. بينما استخدم Elwakil و El-Metwally (٢٠٠٠) مجموعة من مضادات الأكسدة اشتملت على: Benzoic acid، Citric acid، Salicyclic acid، Sodium benzoate، Sodium citrate، و Hydroquinone وكان الـ Hydroquinone أكثرهم فعالية في تثبيط نمو الفطريات: *Cephalosporium*، *F. moniliforme*، *F. oxysporum* ، *F. solani*، *Rhizoctonia solani*، *Sclerotinia bataticola* و *Verticillium* sp. كذلك اثبت Larous وآخرون (٢٠٠٧) فعالية استخدام Sodium benzoate في تقليل الوزن الجاف لميسليوم للفطر *Penecillium expansum* وتقليل إنتاج سم الباتيولين، أما عن تأثير مركب امونيوم ترتريت على النمو القطري لعزلات مختلفة من الفطر *R. solani* فقد أوضحت الدراسة مقدرة الفطر على استخدام المركب كمصدر للنتروجين وزيادة النمو الميسليومى لجميع العزلات المختبرة (Umpanya و Gupta ، ٢٠٠٩)، كما أكد Lopez-Berges وآخرون (٢٠١٠) على إن اختلاف شدة وضراوة للفطر الممرض يختلف باختلاف مصدر النتروجين في البيئة.

وعن مدى فعالية استخدام منظمات النمو (Growth Regulators) لمقاومة الفطريات الممرضة للنبات فقد اثبتت دراسات عديدة فعالية التركيزات المرتفعة (١٠%) من منظم النمو NAA في تثبيط نمو الفطر *Fusarium oxysporum* (Dimond، ١٩٧٠) والفطر *Nectria gallgina* (Anand وآخرون، ١٩٧٥)، كذلك وجد El-Abd (٢٠٠٢) أن استخدام كل من منظم النمو الجبرالين والنفثالين اسيتك اسيد أدى إلى زيادة النمو القطري للفطر *B. cinerea* وحتى تركيز ٥٠ جزء في المليون لكلا المركبين ثم تناقص النمو بعد ذلك بارتفاع التركيز. كما اثبت Al-Gorani و Lopez (٢٠٠٩) فعالية استخدام حمض الجبرالين بتركيز ٥٠٠ ميكروجرام/مل/طبق في تقليل مساحة المستعمرة النامية للفطرين *Penecillium digitatum* و *Penecillium italicum* في الأطباق المعاملة وتقليل تكوين الجراثيم وفى ذات الوقت أدى إلى حدوث تشوه ونمو غير طبيعي للهيفات.

أما هذه الدراسة فقد أجريت بهدف اختبار فعالية التأثير التثبيطي لاثنين من مضادات الأكسدة هما (Hydroquinone و Ammonium tartrate) بالإضافة إلى اثنين من منظمات النمو (Gibberellic acid، Naphthalene acetic acid) على النمو القطري للفطر *Botrytis cinerea* معمليا وهي جزء من رسالة ماجستير تهدف إلى مقاومة مرض العفن الرمادي على البصل بدون استخدام المبيدات.

المواد والطرق:

الفطر الممرض:

تم الحصول على عزلة نقية من فطر *B. cinerea* وذلك بأخذ جزء من النمو الفطري من تحت حراشيف أبصال مصابة بمرض عفن الرقبة أو العفن الرمادي وذلك بعد تنقيتها وتعريفها.

الكيماويات:

مضادات الاكسدة: الهيدروكوينون (Hydroquinone $C_6H_6O_2$) والأمونيوم ترتريت (Ammonium tartrate $(NH_4)_2C_4H_4O_6$) تم الحصول عليهما من (Lausen, Switzerland). منظمات النمو : الجبرالين (Gibberellic acid- GA3- $C_{19}H_{22}O_6$) و النفثالين اسيتك اسيد (Naphthalene acetic acid- NAA $C_{12}H_{10}O_2$) تم الحصول عليها من (Sigma Chemical Co. (Sigma–Aldrich GmbH. Sternheim. Germany). ومن ناحية أخرى فإن كل الكيمياويات السابقة تمت إذابتها في الماء المقطر والمعقم للحصول على التركيزات المطلوبة.

التأثير على النمو القطري:

اتبعت في هذه الطريقة تقنية الغذاء المسموم (Dixit وآخرون، ١٩٧٤) لتحضير التراكيز المطلوبة من مضاد الأكسدة (الهيدروكوينون) وزعت الكميات التالية من التركيز الأساس: ٠، ٥، ١٠، ٢٠، ٤٠ ميكرومول انفراديا في دوارق زجاجية مخروطية تحوي ١٠٠، ٩٥، ٩٠، ٨٠، ٦٠ مل من الوسط المغذي أجار البطاطس والسكروز المعقم والمبرد بحدود ٤٥م°. صبت الأوساط الغذائية المدعمة بمضاد الأكسدة في أطباق بتري بواقع ٤ مكررات/تركيز، وبعد تصلب الوسط تم تلقيحه من مزرعة نقية للفطر *B.*

cinerea بعمر ٧ أيام بقرص ٠,٤ مم وضع بشكل مقلوب على سطح الوسط وفي منتصف الطبق وحضنت الأطباق في درجة حرارة ٢٠ ±٢م°. تم تسجيل معدل النمو القطري للفطر بعد ٣ و ٥ أيام من التحضين من خلال قياس قطر متعامد لمستعمرة نمو الفطر واخذ معدل القراءتين، و حساب مساحة المستعمرة النامية في كل طبق ومقارنتها بمعاملة الشاهد (٠%).

في حال استخدام مضاد الأكسدة (أمونيوم ترتريت) تم تعديل كمية الوسط الغذائي بما يتناسب مع التراكيز: ٠، ٠,٥، ١، ٢، ٤، ٥ ميكرومول. وفيما يتعلق باستخدام منظمات النمو(حمض الجبراليك، النفثالين اسيتك أسيد) تم إتباع نفس الخطوات السابقة ولكن بتركيزات ٠، ١٢,٥، ٢٥، ٣٠، ٣٧,٥ جزء في المليون.

التحليل الإحصائي:

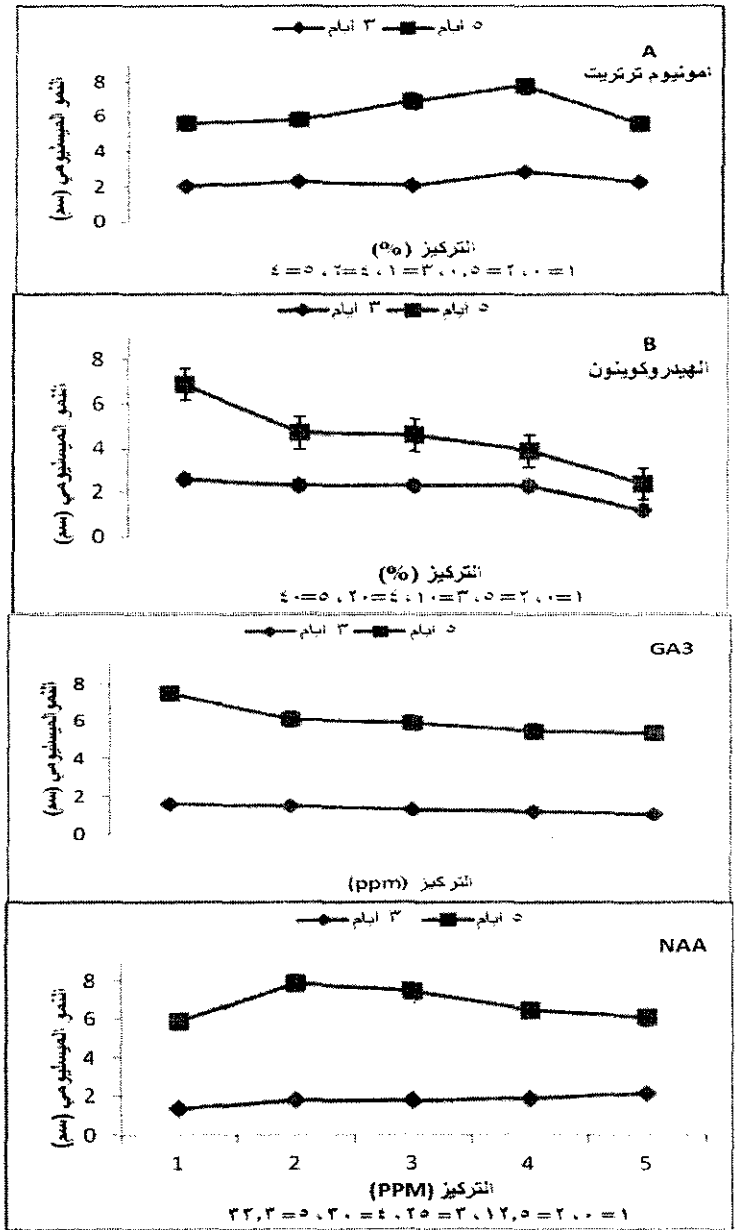
صممت التجربة باستخدام التصميم العشوائي التام CRD في أربع مكررات وحللت النتائج إحصائيا باستخدام طريقة تحليل التباين ANOVA على حاسوب شخصي بواسطة برنامج COSTAT وقورنت المتوسطات باستخدام اختبار Duncan's multiple ranges عند مستوى احتمال ٥%.

النتائج والمناقشة

يوضح الشكل ١ تأثير إضافة مضادات الأكسدة (أمونيوم ترتريت و الهيدروكوينون) في الوسط المغذي على النمو الفطرى (الميسليومي) للفطر *B. cinerea* ويتضح من التجربة أن استخدام الامونيوم ترتريت يعمل على تشجيع النمو الخضري وزيادة مساحة المستعمرة النامية مقارنة بالهيدروكوينون، ويلاحظ من الشكل ١– A انه عند إضافة الأمونيوم ترتريت يزداد النمو الميسليومي للفطر بزيادة التركيز المستخدم من ٠,٥% وحتى ٢% حيث بلغ اكبر قطر له أعلى من الشاهد (تركيز ٠%) وهذه النتيجة تتفق مع ما وجده Upmanya وGupta (٢٠٠٩) وقد يعزي ذلك إلى قدرة الفطر على استخدام الامونيوم كمصدر للنتروجين في البيئة والذي يشجع نمو الفطر، أما عند ارتفاع التركيز إلى ٤% فقد سجلت النتائج انخفاض ملحوظ في النمو الفطرى. وباستقراء النتائج (جدول ١) يتبين ارتفاع معدل مساحة نمو المستعمرة عند التركيزات الأولى وبارتفاع التركيز إلى ٥% لم يظهر نمو للفطر على الإطلاق وربما يعود ذلك إلي زيادة سمية النتروجين بزيادة تركيزه في البيئة، وهذا يتفق مع نتائج Lopez-Berges وآخرون (٢٠١٠) فى حدوث تثبيط تام للنمو الخضري للفطر *F. oxysporum* المسبب للذبول في الطماطم في حالة استخدام مركبات الامونيوم مثل امونيوم نتريت وامونيوم ترتريت كمصدر للنتروجين في البيئة.

أما عن نتائج تأثير الهيدروكوينون على النمو القطري (شكل١– B) ومساحة المستعمرة الفطرية (جدول ١) فقد تلاحظ انخفاض النمو الخضري للفطر *B. cinerea* فى جميع التراكيز المستخدمة و في كلا فترتي التحضين مقارنة بالشاهد (تركيز ٠%)، وقد كان التركيز ٤٠% أكثرهم فعالية حيث بلغ معدل مساحة المستعمرة الفطرية ٤,٧٣ سم^2 بينما بلغ معدل مساحة المستعمرة النامية لمجموعة الشاهد ٣٧,٨سم^2. وتتفق هذه النتائج مع النتائج التي تحصل عليها Galal و Abdou (١٩٩٦) و (Elwakil و El-Metwally، ٢٠٠٠) والتي تؤكد على قدرة الهيدروكوينون على إعاقة النمو الخضري لانواع الفطر *Fusarium* spp وعلى تثبيطه لمجموعة من فطريات البذرة في الفول السوداني وربما تعود قدرة هذا المركب التثبيطية الى خواص المركب الكيميائية (The Marck index، ١٩٧٦).

وباستعراض نتائج دراسة تأثير منظمات النمو حمض الجبراليك (GA3) و النفثالين استيك اسيد (NAA) كما هو في الشكل ١. والجدول ٢. والتي يظهر منها مدى فعالية حمض الجبراليك في خفض النمو الميسليومى وزيادة مساحته فى الطبق مقارنة باستخدام النفثالين اسيتك اسيد الذي شجع النمو الفطرى فى جميع التركيزات المستعملة. فإن النتائج تشير الى مقدرة GA3 على إعاقة النمو الفطرى عند جميع التركيزات المستخدمة مع ملاحظة أن تأثيره كان محدودا خلال الثلاث أيام الأولى من التحضين ثم زادت فاعليته بعد ذلك بزيادة فترة التحضين حتى (٥ أيام) مقارنة مع NAA والذي كان تأثيره مشجعا للنمو الفطري ليتفوق على الشاهد فى جميع التركيزات. وبزيادة تركيز NAA في البيئة بدأ النمو الفطرى ينحسر ولكن ليس اقل من الشاهد. وهذه نتائج تتفق مع ما تحصل عليه El-Abd (٢٠٠٢) والتي اثبت ان الجبرالين والنفثالين كانا مشجعان للنمو الخضري للفطر *B. cinerea* عند التركيزات المنخفضة وأنه بزيادة التركيز الى ٥٠ جزء في المليون حدث تثبيط للنمو القطري للفطر، كما وجد أن اختلاف تأثير التركيز المستخدم في هذه الدراسة عن التركيز المستخدم في الدراسة السابقة قد يعزى سببه إلى اختلاف عزلة الفطر فسيولوجيا.



شكل ١. تـأثير تركيـزات مختلفـة مـن مـضادات الأكـسدة (أمونيـوم ترتريـت و الهيـدروكوينون) ومنظمات النمو(GA3، NAA) على النمو القطري للفطر *B. cinerea*

جدول ١: تأثير مضادات الأكسدة على مساحة المستعمرة النامية (سم٢) للفطر *B. cinerea*

(Hydroquinone) الهيدروكوينون			(Ammonium tartrate) أمونيوم ترتريت		
أيام التحضين		التركيز	أيام التحضين		التركيز
5	3	Conc. (%)	5	3	Conc. (%)
37.8 a	5.12 a	0	34.2 bc	3.14 b	0
17.0 b	4.37 a	5	29.7 bc	3.98 ab	0.5
16.3 b	4.34 a	10	38.2 ab	4.19 ab	1
11.8 c	4.19 a	20	47.3 a	5.76 a	2
4.71 d	2.0 b	40	26.1 c	3.77 ab	4
–	–	–	NG	NG	5

الأرقام داخل الجدول متوسط ٤ مكررات.
NG: لا يوجد نمو
الأرقام في نفس العمود والمتبوعة بنفس الحرف تعني عدم وجود فروق معنوية

جدول ٢. تأثير منظمات النمو على مساحة المستعمرة النامية (سم٢) للفطر *B. cinerea*

النفثالين اسيتك اسيد (NAA)		الجبرالين (GA3)		التركيز
أيام التحضين		أيام التحضين		Conc.(ppm)
5	3	5	3	
28.5 c	1.58 b	43.7 a	2.0 a	0
51.1 a	2.60 b	29.3 b	1.6 ab	12.5
48.7 ab	2.71 b	25.8 b	1.4 ab	25
46.3 ab	2.80 b	23.0 b	1.2 b	20
37.9 bc	4.56 a	22.4 b	1.0 b	27.3

الأرقام داخل الجدول متوسط ٤ مكررات.
الأرقام في نفس العمود والمتبوعة بنفس الحرف تعني عدم وجود فروق معنوية

المراجع

1- Al-Gorani, R.U.M. and Lopez, A.M. 2009. Effect of plant hormone (GA3) on the fungi causing green and blue mold of citrus. (Abstract). 10th Arab congress of plant protection, October, 2009, Beirut, Lebanon.

2- Anand, V.K.; Bauer, C. and Heberlind, T. 1975. Pathways of carbon fixation in green plant. Ann. Reiv. Biochem. 44:125-145.

3- Carré-Missio, V.; Rodrigues, F.Á.; Schurt, D.A.; Rezende, D.C.; Ribeiro, N.B. and Zambolim, L. 2010. Foliar application of potassium silicate, acibenzolar-S- methyl and fungicides on the reduction of Pestalotia leaf spot on strawberry. Tropical Plant Pathology.35:182-185.

4- Coly-Smith, J.R.; Verhoff, K. and Jarvis, W.R. 1980. The Biology of *Botrytis*. Academic Press, London.

5- Dimond, A.E. 1970. Composition factors associated with the growth responses of young cotton plants to GA3 . Plant physiol. 33:344-346.

6- Di Piero, R.M., and Pascholati S.F. 2002. Effect of the cyanobacteria *Synechococcus leopoliensis* and *Nostoc* sp. on *Colletotrichum sublineolum* and on the interaction of the fungus with sorghum plants. Fitopatologia Brasileira.;27:163-169.

7- Dixit, S.N., Tripathy, S.C. and Upadhyey, R.R. 1974. The anti-fungal substances of role flower (*Rose indica*). Economic Bot. 30: 371-374.

8- Eden, M.A., Hill, R.A. and Stewart, A. 1996. Biological control of botrytis stem infection of greenhouse tomatoes. Plant Pathol. 45: 276-284.
9- EL-Abd, S.M. 2002. Studies on some fungal diseases infection crop in Egypt. Ph. D. Thesis Submitted to Univ. of Alexandria. Pp 204.
10- Elad Y, Evensen K (1995) Physiological aspects of resistance to Botrytis cinerea. Phytopathology 85: 637-643.
11- Elad, Y. Williamson, B. Tudzynski, P.and Delen, N.(2004). Botrytis: Biology, Pathology and control.Kluwer Academic publisher428pp
12- Elwakil, M. and Ei-Metwally. 2000. Hydroquinone, A Promising antioxidant for managing seed-borne pathogenic fungi of peanut. Pakistan J. of Bio. Sciences 3(3): 374-375.
13- Galal, A.A. and Abdou, S. 1996. Antioxidants for the control of fusarial diseases in cowpea. Egypt. J. Phytopathol., 24:1-12.
14- Larous, L., Hendel, N., Abood, J.K. and Ghoul, M. 2007. The growth and production of patulin mycotoxin by Penecillium expansum on apple fruits and its control by the use of propionic acid and sodium benzoate. Arab J. Pl. Prot. 25: 123-128.
15- Leroux P., Moncomble D.1993. Lutte chimique contre la pourriture grise de la vigne (2ième partie) Phytoma déf. vég., , 461, 23-27
16- Lopez-Berges, M.S., Rispail, N., Prados-Rosales, R.C. and Di Pietro, A. 2010. A nitrogen response pathway regulates virulencein plant pathogenic fungi. Plant Signaling & Behavior 5(12): 1623-1625.
17- Parry, K.E. and Wood, R.K.S. 1958. The adaptation of fungi to fungicides: Adaptation to copper and mercury salts. Ann. Appl. Boil., 46:446-456.
18- Reyes, A.A.1990. Pathogenicity, growth and sporulation of *Mucor mucedo* and *Botrytis cinerea* in cold or CA storage. Hort. Science 25:549-552.
19- Sirjusingh, C., and Sutton, J.C. 1996. Effects of wetness duration and temperature on infection of geranium by Botrytis cinerea. Plant. Dis., 80: 160-165.
20- Stangarlin, J.R and Pascholati, S.F. 1994. Protection of maize seedlings against *Exserohilum turcicum* by *Saccharomyces cerevisiae*. *Summa* Phytopathologica.20:16-21.
21- Stangarlin, J.R., Kuhn, O.J, and Schwan-Estrada, K.R.F. 2008. Control of plant diseases by plant extracts. Revisão Anual de Patologia de Plantas.;16:265-304.
22- Stangarlin, J.R, Schwan-Estrada, K.R.F., Cruz, M.E.S. and Nozaki, M.H. 1999. Medicinal plants and alternative control of phytopathogens. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.;11:16-21
23- Stangarlin, J.R., Schul,z D.G., Franzener, G., Assi, L., Schwan-Estrada, K.R.F. and Kuhn, O.J. 2010. Induction of phytoalexins in soybean and sorghum by *Saccharomyces boulardii*. Arquivos do Instituto Biológico.77:91-98.

24- Sun, O.L., Gyung, J.C., Kyoung, S. J., He, K. L., Kwang, Y. C. and Jin Cheo,I K. 2007. Antifungal Activity of Five Plant Essential Oils as Fumigant Against Postharvest and Soilborne Plant Pathogenic Fungi. Plant Pathol. J. 23(2) : 97-102.
25- The Merck index, Ninth Edition. 1976. An encyclopedia of chemicals and drugs. Merck & Co., Inc. USA,
26- Umpanya S. and Gupta, K. 2009. Physiologiacal variation among French bean isolates of Rhizoctonia solani. J. of Plant Diseases Sciences 4(2): 160-163.

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF TWO ANTIOXIDANTS AND GROWTH REGULATORS AGAINST *Botrytis cinerea*

El-Gali, Z. I.; N. A. Mohamed and A. A. Larbod
Dept. of Plant Protection, Fac. of Agric., Omer Al-Mukhtar Univ. El-Beida, P.O. 919. Email: Z_Elgali@yahoo.com

ABSTRACT

This study was conducted at Faculty of Agriculture, Omar El-Mokhtar University, Libya during 2011/2012, to investigate the efficiency of two antioxidants and two of growth regulators on the vegetative and linear growth of *Botrytis cinerea*. Hydroquinone was more effective than Ammonium tartrate. At 5% conc. of Ammonium tartrate, completely inhibited the growth of the fungus. The inhibition growth was less effective when GA_3 was used, while NAA stimulated the growth of the fungus.

Keywords: Onion, Antioxidants, growth regulators, *Botrytis cinerea*, linear growth, Gray mold, bulb rot.

قام بتحكيم البحث
أ.د / محمد عبد الرحمن الوكيل — كلية الزراعة – جامعة المنصورة
أ.د / سمير طه العفيفى — كلية الزراعة – جامعة المنصورة