**Name of Candidate :** Hanan Ali Shaheen Ali **Degree**: Ph.D.
**Title of Thesis:** Studies on the Efficacy of Some Chemicals and Plant Extracts in the Control of Plant Pathogenic Bacteria
**Supervisors:** Dr. Farouk Mohamed Barakat
Dr. Maurice Sabry Mikhail
Dr. Ali El-Sayed Tawfik
**Department**: Plant Pathology
**Branch:** **Approval:** 14 / 7 / 2010


## ABSTRACT

The study was conducted to study the effect of eighteen different aromatic and medicinal plants extracts, chemical compounds, 3 antibiotics, and 9 bioagents for controlling the causal agent of fire blight of pear *in vitro*, controlling of streptomycin resistant isolates of fire blight and controlling the causal agent of brown rot of potato *in vitro* and *in vivo*. Samples of aromatic and medicinal plants were used to prepare cold water, hot water, ethanolic and chloroform extracts at 15% concentrations.

*In vitro* study, madder, ribwort, harmel, garlic, thyme and garden sage water extracts were more effective on suppresive the growth of *E. amylovora* and *R. solanacearum*. All concentrations of thymol ( purified from garden thyme )and Alkaloids (purified from harmel seedes ) were appeared to inhibit growth of the two pathogens. As well as, all the concentrations of sulfur compound from garlic were appeared to inhibit the growth of *Erwinia amylovora,* however, the crude extract only inhibit growth of *Ralstonia solanacearum*. The leaves of pear that treated with plant extracts pre-inoculation with *E. amylovora* have less development of symptoms than treated with plant extracts post-inoculation with *E. amylovora.*

Seven isolates were collected and tested to tolerant 50µg /ml of streptomycin, cold water extract of harmel, alkaloids and hot water extracts from madder(30%) suppressive the growth of streptomycin resistant isolates of *E. amylovora* on immature fruitlets of pear. Protein banding pattern for resistant isolates revealed that there are some protein were present in all resistant and sensitive isolates either treated with madder extract or extract-free. However, they absent in the same isolates treated with harmel extract, also harmel extract inhibited synthesis of some protein that have low molecular weight in either resistant or sensitive isolates. Madder extract activates the production of a protein in streptomycin sensitive isolates and suppressed synthesis of other protein in same isolates. However, madder extract has also inhibited production of low molecular weight protein in streptomycin

resistant isolates.

All the tested chemical compounds inhibited growth of the two pathogen. Bafry D 50/500 and Virucidal extra were used as new chemical compounds. All concentrations of Virucidal extra were suppressed to growth of the two pathogens, but Bafry D 50/500 was reduced growth of *R. solanacearum* in all concentrations used, while the crude only reduced growth of *E. amylovora*.Ofloxacin was the best antibiotic to reduce the growth of the two pathogens compared with erythromycin and ampicillin.

All bioagents inhibited growth of *E. amylovora in vitro* , but an isolate of *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *P. putida* were only inhibited growth of *E.amylovora* on pear fruitlets.

*In vivo* study, ribwort, garden thyme, garlic and extract had most effective on reduced the disease index of bacterial wilt disease of tomato. Starner (0.15%) had inhibitory effect on disease index. The antibiotic streptomycin 200 ppm was the most effective on reduce the disease index than other antibiotics, followed by ofloxacin (100 ppm).

Concentration of Virucidal extra 1:100 gave the best effect to reduce the disease index of bacterial wilt disease of tomato. Only *P. agglomerans* reduced the wilt development by of *R. solanacearum* on seedlings of tomato.

In this investigation, effect of plant extracts and chemical compounds were studied on the growth of bioagents.

**Key words:** *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia amylovora*, resistant isolates of *Erwinia amylovora*, plant extracts, chemical control, biological control.

**اسم الطالب**: حنان على شاهين **الدرجة**: دكتوراه الفلسفة
**عنوان الرسالة** : دراسة على فاعلية بعض المركبات الكيماوية و المستخلصات النباتية فى مقاومة امراض النبات التى تسببها البكتريا
**المشرفون**: **دكتور**: فاروق محمد بركات
**دكتور**: موريس صبرى ميخائيل
**دكتور**: على السيد توفيق
**قسم :** أمراض النبات **فرع :** **تاريخ منح الدرجة:** 14 / 7 /٢٠١٠ م

**المستخلص العربى**

الهدف الرئيسى لهذا البحث دراسة تأثير ١٨ مستخلص نباتى من نباتات طبية و عطرية مختلفة وبعض المركبات الكيميائية و ٣ مضادات حيوية و ٩ عزلات مضادة لمقاومة مرض اللفحة النارية فى الكمثرى والعزلات المقاومة للاستربتوميسين منها فى المعمل و مقاومة البكتريا المسببة لمرض العفن البنى فى البطاطس و ذلك فى المعمل والصوبة.

تم تحضير مستخلصات من الماء البارد والساخن ومستخلص الكحول و الكلوروفورم بتركيز ١٥ ٪ .

فى اختبارات المعمل ، وجد فقط أن مستخلص الماء الساخن لنباتات الزعتر و لسان الحمل و الحرمل هو الذى أعطى أقوى تأثير بالمقارنة بمستخلص الكلوروفورم لكل المستخلصات النباتية ما عدا مستخلص الحرمل و الفوة .

كل التركيزات من الثيمول (المفصول من الزعتر ) و القلويدات (المفصولة من الحرمل ) اظهرت تأثير تثبيطى لنمو المسببين المرضيين .

و بالمثل كل التركيزات للمواد الكبريتية المفصولة من الثوم أظهرت تأثير تثبيطى لنمو بكتريا *Erwinia amylovora* ومع ذلك ، التركيز الاصلى فقط هو الذى ثبط نمو *Ralstonia solanacearum*

أوراق الكمثرى المعاملة بالمستخلص قبل التلقيح بالبكتريا كانت أكثر تأثرا عن التى عوملت بالمستخلص بعد التلقيح بالبكتريا .

جمعت ٧ عزلات من الميكروب *Erwinia amylovora* المقاوم للمضاد الحيوى وكانت تتحمل تركيز ٥٠ ميكروجرام / مل.

مستخلص الماء البارد للحرمل و القلويدات و مستخلص الماء الساخن للفوة ( بتركيز ٣٠ ٪) ثبطت نمو البكتريا المقاومة للمضاد الحيوى. و بتفريد البروتين الخلوى لهذه العزلات المقاومة أظهرت النتائج وجود بعض البروتينات فى العزلات الحساسة و المقاومة للمضاد الحيوى فى حالة الكنترول بدون مستخلص أو التى عوملت بمستخلص الفوه , فى حين ان هذه البروتينات كانت غائبة عندما عوملت هذه العزلات بمستخلص الحرمل . ايضا مستخلص الحرمل ثبط تخليق بعض البروتينات ذات الوزن الجزيئى منخفض فى العزلات الحساسة و المقاومة. مستخلص الفوه نشط انتاج بعض البروتينات فى العزلات الحساسة و ثبط تخليق بعض البروتينات الاخرى فى نفس العزلات و مع ذلك ثبط انتاج بعض البروتينات التى لها وزن جزئى منخفض فى العزلات المقاومة.

كل المواد الكميائية المستخدمة ثبطت نمو المسببين المرضيين و ماد ة Virucidal extra ومادة BafryD50/500 كانت مواد جديدة استخدمت فى مقاومة المسببين المرضيين ووجد أن كل تركيزات Virucidal extra ثبطت نمو المسببين المرضيين ولكن كل تركيزات BafryD50/500 ثبطت نمو *Ralstonia*

*solanacearum* بينما التركيز الاصلى فقط هو الذى ثبط نمو *Erwinia amylovora* .
المضاد الحيوى ofloxacin كان أفضل المضادات لتثبيط نمو المسببين المرضيين مقارنة بالمضاد الحيوى erythromycin و ampicillin .
كل عزلات البكتريا المضادة ثبطت نمو بكتريا *Erwinia amylovora* على الاطباق و لكن عزلات *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* و *P . putida* ثبطت نمو بكتريا اللفحة النارية على الكمثرى .
فى أختبارات الصوبة ، مستخلصات لسان الحمل و الزعتر و الثوم كانت أكثر المستخلصات تأثيرا فى خفض مقياس القدرة المرضية لبكتريا الذبول على شتلات الطماطم . ومادة ستارنر (١٥,٪ ) كان له تأثير مثبط على مقياس القدرة المرضية .
و المضاد الحيوى streptomycin (٢٠٠ خزء فى المليون ) كان أقوى مضاد حيوى خفض القدرة المرضية على شتلات الطماطم عن باقى المضادات الحيوية يليه المضاد الحيوى ofloxacin (١٠٠ جزء فى المليون ) ومادة Virucidal extra (١: ١٠٠) اعطت أكثر تأثير لخفض القدرة المرضية للمسبب المرضى .
البكتريا المضادة (2) *Pantoeae agglomerans* أظهرت أكبرخفض للقدرة المرضية لبكتريا الذبول على شتلات الطماطم .
فى هذا البحث تم أيضاً دراسة تأثير المستخلصات النباتية و المواد الكميائية على نمو البكتريا المضادة.
**الكلمات الدالة:** *Ralstonia solanacearum* ، *Erwinia amylovora* ، عزلات *Erwinia amylovora*المقاومة للمضاد الحيوى streptomycin، مستخلصات نباتية ، مقاومة كميائية ، مقاومة بيو لوجية.

# CONTENTS


| | Page |
|---|---|
| **INTRODUCTION** | **1** |
| **REVIEW OF LITERATURE** | **3** |
| **1. Incidence of antimicrobial agents in selected medicinal and aromatic plants** | **3** |
| **2. Preparation of plant materials and methods of extraction** | **9** |
| **3. Methods used to prove antimicrobial activity** | **9** |
| **4. Effect of bioagent on tested bacteria and their mode of action** | **9** |
| **5. Mode of action and chemical composition of differentmedicinal plant** | **12** |
| **6. Effect of chemical compounds and antibiotic on tested bacteria** | **13** |
| **MATERIALS AND METHODS** | **17** |
| **1. Pathological studies** | **17** |
| **a.** Sampling | **17** |
| **b.** Isolation of the causal organisms | **19** |
| **c.** Pathogenicity | **20** |
| **2. Identification of the pathogens** | **21** |
| **3. Preparation of plant extracts** | **21** |
| **4. Screening extracts for antibacterial activity *in vitro*** | **23** |
| **a.** Effect of different concentration of plant extract on growth of the two pathogens | **24** |
| **b.** Testing the change of pH values of plant extract on growth of the two pathogens | **25** |
| **c.** Purified of the active ingredient from some plant extracts | **26** |
| **d.** Isolating the resistant isolates of *E. amylovora* to streptomycin sulfate | **27** |
| **e.** Testing the effect of different chemical compounds and antibiotics on the growth of bacteria | **29** |
| **f.** Biological control of brown rot and fire blight | **30** |
| **g.** Testing the effect of plant extract on infected immature pear fruitlets | **31** |
| **h.** Testing the effect of bioagents, chemical compounds and antibiotics on infected immature pear fruitlets | **32** |

**i.** Testing the effect of plant extracts on the reduction of symptoms on leaves of pear inoculated with *E. amylovora*..... **32**
**j.** Testing the effect of some plant extracts on the incidence of fruit blight of resistant isolates on immature pear fruitlets..... **33**
**5. Screening the effect of plant extracts, chemical compounds and bioagents on the incidence of bacterial wilt *in vivo*** ..... **33**
**6. Effect of chemical compound and plant extracts against the isolated bioagents *in vitro*** ..... **35**
**RESULTS** ..... **36**
**1. Pathological stuies** ..... **36**
**2. Identification of the pathogens** ..... **38**
**3. Testing plant extracts against growth of *E. amylovora* and *R. solanacearum* bacteria *in vitro*** ..... **39**
**a.** Effect of pH variable of plant extract on growth of pathogens..... **44**
**b.** Effect of active ingredient of thyme, garlic and harmel on the growth of the pathogens ..... **48**
**4. Effect of plant extracts on severity of fire blight disease using immature green fruits of pear inculated with *E. amylovora*** ..... **49**
**5. Testing plant extracts on severity of fire blight disease using pear leaves inoculated with *E. amylovora*** ..... **50**
**6. Recovery of streptomycin in resistant ($Str^r$) isolates of *E .amylovora*** ..... **53**
**a.** Effect of plant extracts on the growth of streptomycin resistant isolates of *E. amylovora* ..... **53**
**b.** Effect of some plant extracts on the development of necrotic lesion and oozing on pear fruitlets inoculatied with streptomycin resistant isolates ..... **54**
**c.** Protein banding pattern..... **56**
**7. Effect of chemical compounds and antibiotics on growth of the two pathogen**..... **59**
**a.** Effect of some chemical compounds on the development of blight infection on pear fruitlets ..... **66**

**8. Isolation and identification of antagonistic bacteria** ..... **67**
**a.** Effect of some bioagents against *E. amylovor* and *R.solanacearum* bacteria. **69**
**b.** Effect of some bioagents on development of fire blight symptoms on fruitlets of pear..... **70**
**9. Antibacterial activity against *R . solanacearum* (*in vivo* test)** ..... **71**
**a.** Effect of plant extracts on the incidence of bacterial wilt on tomato seedlings in inoculated soil with *R. solanacearum* ..... **71**
**b.** Effect of some chemical compounds on the incidence of bacterial wilt of tomato ..... **72**
**c.** Effect of different antibiotics on disease index of bacterial wilt..... **73**
**d.** Effect of Virucidal extra on disease index of bacterial wilt ..... **74**
**e.** Reaction of some bioagents towards bacterial wilt of tomato plants ..... **75**
**10. Reaction of plant extracts towards different bioagents**..... **76**
**11. Reaction of chemical compounds towards different bioagents**..... **76**
**DISCUSSION** ..... **80**
**SUMMARY**..... **87**
**REFERENCES** ..... **93**
**ARABIC SUMMARY**