تأثير المستخلصات المائية لخمسة أنواع نباتية في مكافحة مرض التبقع الألترناري على نبات الفول مخبرياً.

عمرراعي سلوم موسى محمد عبد الحي

قسم وقاية النبات، كلية الهندسة الزراعية، جامعة إدلب

الملخص:

أجري هذا البحث في جامعة إدلب (2020-2019) حيث تم دراسة تأثير المستخلصات المائية لخمسة أنواع نباتية مخبرياً وهي ثمار الأزدرخت، وفصوص الثوم، وأوراق الكينا، والزعتر، وإكليل الجبل، بثلاثة تراكيز لكل مستخلص وهي (5% و10% و20%) على تثبيط النمو الشعاعي لفطر النوباء المتناوبة *Alternaria alternata* المسبب لمرض التبقع الألترناري على نبات الفول، والمعزول من نباتات فول مصابة على مستنبت دكستروز آغار البطاطا PDA، ومقارنة تأثير هذه المستخلصات مع المبيد الفطري (دايفينوكونازول + أزوكسي ستروبين) المعروف تجاريا باسم أمستار توب (Amstar Top).

أوضحت النتائج أن جميع المستخلصات بجميع التراكيز سببت تثبيطاً واضحاً للنمو الشعاعي للفطر بنسب متفاوتة، وكان هناك فروق معنوية واضحة بين المستخلصات فيما بينها وبين التراكيز المختلفة ضمن المستخلص نفسه عند مستوى معنوية 0.01 وكانت أعلى نسبة تثبيط للمبيد أمستار بنسبة 100%، تلاه التركيز 20% من مستخلصات: ثمار الأزدرخت، فصوص الثوم، أوراق إكليل الجبل، أوراق الكينا، أوراق الزعتر بنسب تثبيط 68.55%، 64.22%، 60.83%، 57.56 %، 53.89%. على التوالي، وكان التركيز المثبط لنمو 50% من وحدات الفطر المختبر(IC50) من المستخلصات: 8.13%، 9.33%، 12.3%، 14.79%، 17.38%. لكل من الأزدرخت، الثوم، إكليل الجبل، الكينا، الزعتر على التوالي.

الكلمات المفتاحية: الفول – الألترناريا- المستخلصات المائية – *Alternaria alternata*

Effect of Aquatic Extracts of Five Plant Species in the Control of Alternaria Leaf Spot Disease on Faba Bean in Vitro

Omar Raee, Salloum Mousa and Mohammed Abdel-Hay

Department of Plant Protection, College of Agricultural Engineering, University of Idlib

Graduate student (master)

Abstract:

This research was conducted at the University of Idlib (2019-2020).it studies The effect of aqueous extracts of five plant species in vitro, (Azedarach fruits, garlic cloves, eucalyptus leaves, thyme and rosemary, with three concentrations of each extract: 5%, 10% and 20%) on inhibiting the radial growth of *Alternaria alternata* that causes alternaria spotting disease on the Faba bean plant isolated from Infected Faba bean plants on PDA, and comparing the effect of these extracts with the fungicide (diphenoconazole + azoxystrobin) known commercially as Amstar Top.

The results showed that all the extracts of all concentrations caused a clear inhibition of the radial growth of the fungus in varying proportions, and there were clear significant differences among the extracts themselves and among the different concentrations within the same extract at a significant level of 0.01. The highest inhibition percentage of the pesticide Amstar was 100%, followed by the concentration of 20% of the extracts: Azedarach fruits, garlic cloves, rosemary leaves, eucalyptus leaves, and thyme leaves with inhibition rates of 68.55%, 64.22%, 60.83%, 57.56%, and 53.89% respectively.

The inhibitory concentration of 50% of the tested strains fungi (IC50) of the extracts was: 8.13%, 9.33%, 12.3%, 14.79%, 17.38%. for each of Azedarach fruits, garlic cloves, rosemary leaves, eucalyptus, and thyme respectively.

Key words: Faba Bean - *Alternaria alternata* - Aqueous extracts

1– المقدمة:

يعتبر نبات الفول (*Vicia faba* L.) أحد نباتات العائلة البقولية العشبية الحولية (الفولية) Fabaceae (منصور وأخرون، 2005، ص81). وهو من المحاصيل البقولية الهامة في معظم دول العالم ومنها سوريا ويستخدم في التغذية إذ إنَّه يحوي على البروتين والنشاء والدهون وأملاح معدنية ومواد أخرى، ويصنع منه العديد من الأطعمة ويعدُّ غذاءً شعبياً واسع الانتشار. يزرع الفول بهدف الحصول على القرون الغضة والبذور الجافة ويستخدم في صناعة التعليب ويُصْنَعُ من بذوره دقيقٌ يدعم دقيقَ النجيليات كما يُستعملُ في صناعة المرتديلا (العيبان والخليفة، 2003 ؛ عبود، 2017، ص137).

تُحسِّنُ زِراعةُ الفولِ خواصَ التربة (عبد العزيز،2007، ص31) حيث يقوم بتثبيت الآزوت الجوي وإذابة المواد صعبة الذوبان وتحويلها الى مواد قابلة للامتصاص من قبل النبات وخاصة المركبات الفوسفورية حيث تفرز جذوره مواداً تحلل هذه المركبات (عبود،2017، ص138).

يُهاجم الفول بأكثر من 100 نوع من العوامل الممرضة في منطقة البحر الأبيض المتوسط والتي تخفض كثيراً من إنتاجيته من بينها فطر النوباء المتناوبة *Alternaria alternata* الذي أصبح يهدد نبات الفول في السنوات الأخيرة ويقلل كثيراً من العائد (El-hai, 2015, p.124).

حيث يمكن لهذا العامل الممرض أن يصيب الأوراق والساق والأزهار والثمار ويحدث عليها تبقعاتٍ ويصيب الجذور ويحدث عليها تعفناتٍ كما يمكن أن يحدث تعفناتٍ على الثمار في المخزن ويمكن أن يحدث الضرر في جميع مراحل النمو

(Lima *et al*., 2016, p764; Nashwa and Abo-Elyousr, 2012, P.74)

وتظهر أعراض هذا المرض على شكل بقع رمادية صغيرةٍ على شكل دوائر متحدة المركز داكنةَ اللون حدودها أكثر قتامةً ومحاطة بهالة صفراء تتوسع تدريجياً بتقدم الإصابة ومن ثم تجف الأوراق وتتساقط وقد تؤدي الإصابة إلى موت النبات بالكامل في

حال كانت الظروف مناسبة حيث يتحول المرض من تبقع أوراق إلى لفحةٍ مدمرةٍ للنبات(Nasraoui, 2008, p186 ;جلال الدين، 2009، ص39).

تكمن خطورة الممرض في كونه ينتقل عن طريق البقايا النباتية المصابة وعن طريق البذور المصابة وتبقى الأبواغ قادرة على إحداث العدوى في التربة بعد 10–12 شهراً، وحتى 13 شهراً تقريباً عندما تكون محمولة على البذور. وتعد التربة المصابة والبقايا النباتية المصابة والبذور المصابة هي مصدر اللقاح الأولي وتحدث الإصابة الثانوية عن طريق الأبواغ الكونيدية (Dubey and Patel, 2000, p175).

تعود خطورة هذا الممرض إلى إفرازه بعض السموم الفطرية حيث ذكر (Wenderoth *et al*., 2019,p131) أن ذيفان Alternariol يساهم في زيادة الفوعة وقدرة الفطر *A. alternata* على غزو النبات. ويتبع الفطر صف الفطور الناقصة رتبة Pleosporales فصيلة Pleosporaceae (Dematiaceae) (Nagrale *et al*., 2016, p114; Barnett and Hunter,1998,p132).

وقد ساهمت المبيدات في حماية المحاصيل الزراعية المختلفة ولكن استخدامها العشوائي والتركيز عليها كوسيلة وحيدة في المكافحة أدى إلى ظهور العديد من المشاكل الضارة بالبيئة والإنسان والحيوان، مما أدى إلى اتخاذ إجراءات عديدة في الكثير من الدول لتقييد استخدامها (Harris *et al*., 2001,p 1126)، ونتيجة لذلك حفزت العديد من الجهات البحثية والعلمية على الاهتمام بطرق ومواد بديلة أقل ضرراً على البيئة وذات فاعلية جيدة في الحد من تأثير الآفات. وكان الهدف المنشود في المستخلصات النباتية حيث اتجهت الكثير من الدراسات باتجاه دراسة إمكانية استخدامها كبدائل عن المبيدات الكيميائية في مكافحة أمراض النبات المختلفة ووجد الباحثون أنَّها تحتوي على العديد من المركبات التي يمكن تطويرها كمبيدات آفات بعد إجراء الاختبارات الضرورية الفيزيائية والكيميائية والحيوية، لأنَّها مواد طبيعية وتملك صفاتٍ مرغوبة وآمنة على البيئة والصحة (الناصر ودعاس ،2014، ص33)، وهي سهلة المنال، وقد حبا الله سوريا الكثير من النباتات الطبية والعطرية

التي يمكن الاستفادة منها كبدائل عن المبيدات الكيميائية وهي آمنة على الإنسان والحيوان والحياة البرية.

وتمَّ في هذا البحث دراسة تأثير المستخلصات المائية لخمسة أنواعٍ نباتيةٍ على مرض التبقع الألترناري على نبات الفول. وهي الأزدرخت، والكينا، والثوم، وإكليل الجبل، والزعتر المزروع، ومقارنة تأثيرها بالمبيد الفطري دايفينوكونازول + أزوكسي ستروبين.

استخدم عدد من الباحثين هذه المستخلصات في السيطرة على الفطر *Alternaria*.spp وكانت النتائج مرضية ومن بين هذه الدراسات:

قام (سرحان، 2003، ص 84) بدراسة تأثير المستخلصات المائية لعشرة أنواع نباتية من بينها المستخلص المائي لفصوص الثوم على العديد من الفطريات *A. alternata, Fusarium oxysporum, F. solani, Aspergillus flavus, Rhizopus stolonifer* ووجد أن مستخلصات الثوم والحلبة والنعناع هي الأكثر فعالية في تثبيط الفطريات المختبرة وأن درجة التثبيط كانت تزداد بزيادة التركيز.

وجد (Guleria and Kumar, 2006, p81) أن المستخلص المائي لأوراق نبات الأزدرخت يعمل على تنشيط المقاومة المستحثة لدى نبات السمسم ضد فطر *Alternaria sesami*

ولقد قام (الرحمة واليحيى، 2007، ص34) بإعداد دراسة حول (9) أنواع من المستخلصات النباتية مخبرياً من بينها الكينا وإكليل الجبل لمعرفة تأثيرها على فطريات الذبول الوعائي وهي : *Alternaria alternata, Macrophomina phaseolina, Fusarium solani, Fusarium oxysporum,* ووجد أنَّ مستخلصات الكينا والإكليل قد ثبطا نمو الفطر *Alternaria alternata* بنسبة 23.9% عند التركيز 4%.

وقد درس (Feng *et al*., 2011,p78) تأثير زيت الزعتر في السيطرة على فطر *A. alternata* في المخبر وفي الحقل وأعطى تثبيطاً واضحاً لنمو الفطر في المخبر بمختلف التراكيز سواءٌ بالتبخير أم بالملامسة المباشرة ولوحظ أن نسبة التثبيط تزداد بازدياد التركيز.

وقد قام (Nashwa and Abo-elyousr, 2012P76) بدراسة تأثير ستة أنواع من المستخلصات المائية في المخبر وفي الحقل من بينها الأزدرخت والكينا والثوم ضد مرض اللفحة المبكرة في البندورة *Alternaria solani* ووجد أن نسب التثبيط كانت عند التركيز 5% لكل من الأزدرخت والثوم والكينا كما يلي(43.33، 42.2 ،30)% على التوالي.

درس (الناصر وعز الدين، 2014، ص35) تأثير المستخلصات المائية والكحولية لأربعة أنواع نباتية وهي فصوص الثوم وأوراق الطيون والزعتر والأزدرخت في المخبر على نمو ميسيليوم الفطرين *A. alternata, Fusarium oxysporum* ومقارنتها بتأثير المبيدات الفطرية carbendazim, chlorothalonil على وسط PDA وأدى مستخلص الثوم إلى تثبيط الفطرين بنسبة 100% عند التركيز 1000مغ/لتر.

وقد درس (Khan *et al*., 2019,p14) في باكستان مخبرياً تأثير خمسة أنواع من المبيدات الفطرية المتخصصة بأربعة تراكيز هي(400، 300، 200، 100) ppm وهذه المبيدات هي Aliette(Fosetyl Aluminum) ،Cabriotop(Pyraclostrobin-Metiram)،(Mandipropamid)Revus، Topsin-M(Thiophanate-methyl) ، (Propineb) Antracol بالمقارنة مع خمسة أنواع من المستخلصات النباتية في مكافحة فطر *A. alternata* المسبب لتبقع أوراق نبات العنب وهذه المستخلصات *Azadirchta indica, Allium sativum, Allium cepa, Aloe barbadnsis,Eucalyptus obliqua* بثلاثة تراكيز هي (5، 10، 15)% ووجد أن أفضل نسبة تثبيط كانت للمبيد Topsin-M بالتركيز 400 ppm فيما أبدت جميع المستخلصات تثبيطاً واضحاً للفطر وازدادت نسبة التثبيط بزيادة تركيز المستخلص المائي.

قام (Shukla *et al*., 2019, p14) بدراسة تأثير 8 أنواع من المستخلصات النباتية (المائية) على الفطر *Alternaria lini* المسبب لمرض تبقع الكتان في المخبر بتركيز (10،7.5) % لكل مستخلص وكان لنبات الأزدرخت أعلى تأثير تثبيطي عند التركيز 10% بنسبة 85.71% تلاه مستخلص الريحان بنسبة تثبيط 82.85% عند التركيز نفسه.

درس (Valvi *et al*., 2019, p1775) تأثير المستخلصات المائية للثوم والكينا والأزدرخت ونبات *Sapindus trifoliatus* في المخبر على الفطر *Alternaria brassicae* ولوحظ أن أفضل تأثير كان لنبات *Sapindus trifoliatus* عند التركيز 10% تلاه مستخلص الثوم.

قام (Meena *et al*., 2020, p339) بدراسة تأثير المبيدات الفطرية من ضمنها Azoxystrobin مع بعض المستخلصات النباتية من بينها الأزدرخت ضد الفطر *A. alternata* الذي يصيب أوراق الرشاد في المخبر ووجد أن لمستخلص النيم تأثيراً واضحاً ضد الفطر الممرض.

درس(Singh *et al*., 2020, p1861-1862) إمكانية إدارة مرض لفحة الألترناريا وتأثيره على القطن *A. alternata* بواسطة بعض المبيدات وهي (مانكوزيب وريدوميل وكاربندازيم) بأربعة تراكيز (125، 250، 500، 1000) ppm مع بعض المستخلصات النباتية واستخدم المستخلص الزيتي لنبات الأزدرخت والمستخلص المائي لنبات الثوم في المخبر وكان المستخلص المائي للثوم أفضل في التأثير من مستخلص الأزدرخت.

2– مبررات البحث وأهدافه:

نتيجة تغير الظروف المناخية في السنوات الأخيرة في سوريا لوحظ انتشار فطر الألترناريا على مختلف أجزاء نبات الفول (أوراق – سيقان – بذور) بشكل كبير داخل الأراضي الزراعية من خلال الزيارات الميدانية المتكررة، ومن أجل البحث عن مواد بديلة للمبيدات آمنة على الإنسان والحيوان والكائنات النافعة، والتقليل ماأمكن من التلوث البيئي الناتج عن الاستخدام المفرط للمبيدات وتخفيض تكاليف الإنتاج ماأمكن على المزارعيين، وتمَّ البحث عن مواد متوفرة بالطبيعة بشكل كبير وإيجاد طرق سهلة لتحضيرها و استخدامها كبدائل عن تلك المبيدات.

هدف البحث إلى :

- عزل وتعريف الكائن الممرض.
- دراسة تأثير المستخلصات المائية لنباتات (الأزدرخت –الكينا – إكليل الجبل – الزعتر–الثوم) في الفطر المعزول مخبرياً، ومقارنة تأثيرها بتأثير المبيد الفطري أمستار (Azoxytrobin 20% Difenoconazole +12.5%).4

3- مواد وطرائق البحث:

3-1 تحضير الأوساط الزرعية:

استُخدم لتنمية الفطريات بيئة Potato Dextrose Agar (PDA) وذلك بإضافة 39 غرام بيئة إلى ليتر ماء حسب توصيات الشركة المصنعة في حوجلة معيارية (1) لتر ومن ثم تم سد فوهة الحوجلة ومن ثم سخنت على حمام مائي إلى درجة حرارة 100م حتى تمام الذوبان وعقمت بالموصدة إلى درجة حرارة 121م° ولمدة 15 دقيقة وأضيف إليها بعد أن تصل إلى حرارة 50 م° تقريبا (5) مل ستربتومايسين 200 ملغرام/ لتر (يحضر بإضافة 0.8 غرام ستربتومايسين إلى 20 مل ماء مقطر ومعقم) لمنع نمو الجراثيم ومن ثم صب المستنبت في الأطباق قبل التصلب (الدوسري والأسدي ،2007، ص200).

3 –2 عزل الفطريات:

تم عزل الفطر الممرض من أوراق نباتات فول تظهر عليها علامات الإصابة اعتماداً على الأعراض الظاهرية النموذجية من حقول مزروعة بنبات الفول في محافظة إدلب،حيث كانت الأعراض على شكل بقع رمادية غير منتظمة في الغالب وتحيط بها حدود أغمق ومحاطة بهالة صفراء ويظهر داخل البقعة دوائر متحدة المركز ، كما أمكن عزل الفطر فيما بعد من بذور نباتات الفول في نهاية الموسم (Nasraoui, 2008,p186) .

وضعت الأوراق المصابة في أكياس ورقية ونقلت إلى المخبر وغسلت بالماء الجاري للتخلص من الأوساخ والأتربة العالقة وقطعت إلى قطع صغيرة على شكل مربعات بحدود (1) سم2 وعقمت سطحياً بواسطة هيبوكلوريت الصوديوم 1% لمدة 30 ثانية ومن ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ونشفت بين ورقتي ترشيح ومن ثم زرعت في أطباق بتري قطر(9) سم وحاوية على بيئة دكستروز آغار البطاطا (PDA) المحضرة مسبقا والمتصلبة، بواقع خمس قطع للطبق الواحد وموزعة على أطراف الطبق بواقع خمسة مكررات، حضنت الأطباق على درجة حرارة 2±25 م° لمدة أسبوعين في مخبر الترصد الوبائي بجامعة إدلب وتركت الأطباق حتى ظهور النموات الفطرية على الأجزاء المزروعة (الدوسري والأسدي، 2007، ص200).

وتم تحديد نوع الممرض من خلال شكل المستعمرة ولونها أولاً ومن ثم أخذ جزء من المستعمرة بواسطة إبرة تلقيح ووضعت على شريحة تحوي نقطة من اللاكتوفينول وغطيت بساترة وفحصت تحت المجهر وتم تحديد الصفات المورفولوجية للفطر وأبواغه، من خلال شكل الغبيرات Conidia والحواجز العرضية والطولية وطول السلسلة الغبيرية التي تتضح عند فحص جزء من المستعمرات النامية للفطر (حسن،2012، ص31)، وتم تعريف الفطر بالاعتماد على الصفات التصنيفية التي أوردها كل من (Barnett and Hunter, 1998, p132; Ellis, 1971,p465)

تمت تنقية الفطر من خلال الزرع المتكرر حيث تم أَخْذُ جزءٍ من المستعمرة من الأطراف النامية وأُحدثتِ العدوى على أطباق بتري حاوية على بيئة (PDA) سابقة الذكر

بواسطة ثاقب فليني بقطر 5 ملم ووضع القرص وسط الطبق للحصول على مستعمرات نقية للفطر وذلك في غرفة عزل وبوجود مصدر للهب وحضنت لمدة أسبوعين على درجة حرارة 25±2م° مع المراقبة المستمرة كل ثلاثة أيام (الناصر ودعاس ، 2014، ص36).

3-3 جمع المادة النباتية (المستخلصات):

تاريخ الجمع:

تمَّ جمع المادة النباتية من تاريخ 1/3/2019 ميلادي ولغاية 25/5/2019 ميلادي الموافق 24/6/1440 هجري ولغاية 20/9/1440 هجري لإمكانية جمع المادة النباتية وقت الإزهار قدر الإمكان.

كمية العينة:

تمَّ جمع كمية مختلفة الأوزان من كل مادة نباتية بحيث نستطيع الحصول منها في النهاية على مادة نباتية جافة بحدود 1كغ (الناصر ودعاس،2014، ص35).

مكان الجمع:

تمَّ جمع أوراق الكينا من منطقة العرشاني في ريف إدلب الغربي والأزدرخت وإكليل الجبل من منطقة خان العسل والثوم من سوق مدينة إدلب والزعتر من منطقة الشيخ بحر.

طريقة الجمع:

كان هناك اختلاف في الجزء النباتي اللازم للاستخلاص من كل نبات جدول رقم (1) حيث استخدمت أوراق (إكليل الجبل والكينا والزعتر) وتم الحصول على العينات من أوراق سليمة غير مصابة لا تظهر عليها أي علامات مرضية وتم اختيار وقت الجمع من بداية تفتح الأزهار وحتى اكتمال نموها حيث تكون المادة الفعالة في أعلى مستوياتها بين مراحل النمو المختلفة (الرحمة واليحيى،2007، ص32).

فيما استخرج مستخلص الثوم من الفصوص الثوم التي جمعت بعد الجني، أما الأزدرخت فاستخدمت الثمار للحصول على المستخلص المائي اللازم لإجراء البحث وجمعت الثمار في نهاية موسم النمو.

نقلت العينات المجموعة إلى المخبر وغسلت جيداً بالماء المقطر للتخلص من الأوساخ والأتربة العالقة ومن ثم نشرت في صوانٍ على الهواء وبدرجة حرارة الغرفة مع التقليب المستمر منعاً لحدوث التعفن حتى تمام الجفاف ومن ثم تم طحنها بواسطة مطحنة كهربائية (الناصر ودعاس،2014، ص35)، وحفظت بودرة الطحن بأكياس بلاستيكية في الثلاجة بدرجة حرارة من2-8 م لحين استخدامها (الرحمة واليحيى،2007، ص33).

جدول (1) يبين الأنواع النباتية المستخدمة في الاستخلاص مع الجزء المستخدم من كل نوع نباتي (الناصر وعز الدين،2014، ص35؛ Carpinella et al.,2005, p2923)

الاسم العربي	الاسم العلمي	الفصيلة	الاسم العربي	الجزء المستخدم في الاستخلاص
الكينا	*Eucalyptus camaldulensis*	Myrtaceae	الفصيلة الآسية	الأوراق
الأزدرخت	*Melia Azedarach*	Meliaceae	الفصيلة الأزدرختية	الثمار
إكليل الجبل	*Rosmarinus officinalis*	Lamiaceae	الفصيلة الشفوية	أوراق
الثوم	*Allium sativum*	Liliaceae	الفصيلة الزنبقية	فصوص الثوم
الزعتر	*Thymus vulgaris*	Lamiaceae	الفصيلة الشفوية	أوراق

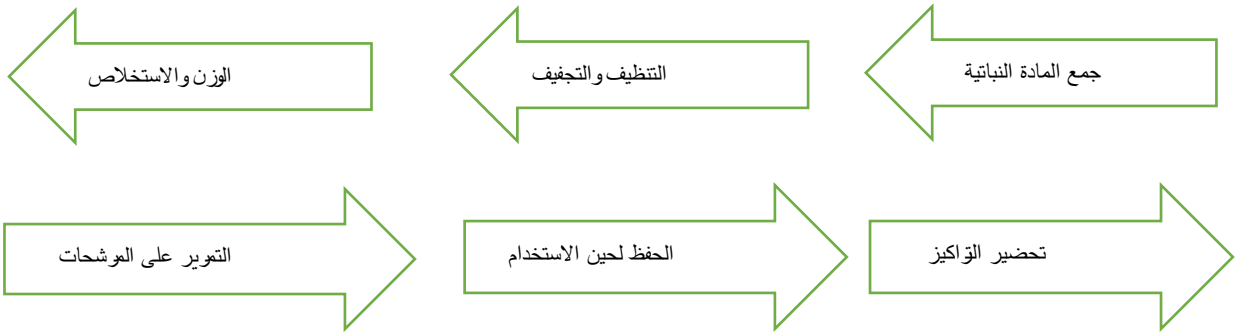
3-4 طريقة الاستخلاص:

تم أخذ 200 غرام من المادة النباتية الجافة، وزنت بدقة بواسطة ميزان حساس ووضعت ضمن حوجلة سعة (1) لتر وأضيف (1) لتر ماء معقم للعينة النباتية لكل مستخلص ووضعها على هزاز لتحسين الاستخلاص لمدة ثلاث ساعات، تُرِكَ المزيج لمدة 48 ساعة مع التحريك المستمر كل فترة، تم ترشيح المستخلص إلى حوجلة معيارية (1) لتر بواسطة ورق ترشيح قياس (Wattman No.2) للتخلص من الرواسب، ومن ثم غُسِلت

محتويات الحوجلة بالماء المقطر وتم إكمال الحجم إلى (1) لتر. ووضعت الحوجلة في حمام مائي عند درجة حرارة 50م (الغرياني وآخرون،2017، ص3) .

وتم تركيز الرشاحة لكل مادة نباتية إلى 200 مل، ونقلت إلى جهاز طرد مركزي 3000 دورة / دقيقة للحصول على محلول رائق(قيثار،2005، ص3)، وبذلك تم الحصول على مستخلص أولي تركيز 100% ومن ثم رُشِّحَ 100 مل من المستخلص النهائي لكل مادة نباتية من الأنواع الخمسة بواسطة جهاز Whatman Klari- Flex حيث يتم فيه ترشيح العينة على ورق ترشيح 0.22 um يمكن من خلاله حجز الفطور والجراثيم ويَستخدِم جهاز التفريغ تحت الضغط ويتم الترشيح إلى عبوة معقمة تماماً بغطاء محكم BottleTop Filtration System تحفظ في البراد على درجة حرارة من 2–8 مo لحين إجراء الاختبارات الخاصة (Diaz Dellavalle *et al*., 2011,p332)

ويمكن تلخيص المرحلتين السابقتين بالمخطط الآتي:



3–5 دراسة تأثير المستخلصات النباتية على نمو فطر النوباء المتناوبة *A. alternata*:

أُخِذت الرشاحة النهائية لكل مستخلص ذات التركيز 100% وقسمت إلى قسمين كل قسم 50 مل، احتفظ بالقسم الأول في الثلاجة والقسم الثاني قُسِّم إلى قسمين كل قسم 25 مل، استخدم القسم الأول مباشرةً للحصول على التركيز 20%، أما القسم الثاني فأضيف اليه 25 مل ماء مقطر معقم، وأصبح المحلول بحجم 50 مل بتركيز 50%، قُسِّمَ أيضاً هذا المحلول إلى قسمين كل قسم 25 مل، أُخِذَ القسم الأول للحصول على التركيز 10%

مباشرةً، أما القسم الآخر فقد أضيف إليه 25 مل ماء مقطر معقم، وأصبح المحلول النهائي بحجم 50 مل بتركيز 25%، حُضِّرَت التراكيز النهائية المطلوبة (20،10،5)% بإجراء التمديدات المناسبة بإضافة كمية مناسبة من المستخلص مع كمية مناسبة من مستنبت الزرع(PDA) تحقق التركيز المطلوب حسب القانون (الدوسري والأسدي، 2007، ص200).

ح1 × ت1 = ح2 × ت2

ح1 الحجم المأخوذ من المحلول الأساسي.

ت1 التركيز الأساسي 100%.

ح2 الحجم الجديد للمستخلص مع المستنبت وهو 10 مل.

ت2 التركيز المطلوب (5، 10، 20)%

أُضِيفَت المستخلصات النباتية إلى مستنبت الزرع (PDA) المعقم بالموصدة بواقع (5 مكررات لكل تركيز). استخدم نظام الغذاء المسموم (سرحان،2003، ص87) في دراسة تأثير المستخلصات النباتية على النمو الشعاعي للفطر حيث تم أخذ (2) مل من كل مستخلص لكل تركيز ولكل مكرر وزعت بشكل جيد على كامل الطبق بتحريكه حركة رحوية ومن ثم تم صب مستنبت الـ PDA (المعقم بالموصدة بعد تركها لتبرد) في أطباق (9 سم) والحاوية على المستخلصات وذلك قبل تصلبها وبواقع (8) مل مستنبت لكل طبق (الرحمة واليحيى،2007، ص40).

تم تحضير (5) مكررات كشاهد بدون مستخلص بإضافة 10 مل بيئة.

تم تحضير (5) أطباق بتري معاملة بالمبيد(أمستار) بدلاً من المستخلص النباتي وذلك من خلال تحضير محلول مبيد من المستحضر التجاري أمستار 32.5%(325) ppm حيث أخذ (1) مل وأضيف إلى 100 مل ماء ومن ثم أخذ (1) مل من المحلول السابق وأضيف إلى طبق بتري ووزع بشكل متجانس وأضيف للطبق (9) مل مستنبت PDA سابقة

الذكر وبالتالي نكون قد حصلنا على التركيز الموصى به للاستخدام من المبيد وهو (1) مل لكل لتر ماء.

بعد تصلب المستنبت لقحت جميع الأطباق بالفطر الممرض بواسطة الثاقب الفليني وذلك بأخذ جزء من مستعمرة الفطر بمقدار 0.5 سم2 من مزارع حديثة النمو بعمر (5-7) أيام وخطط أسفل الوجه السفلي للطبق بشكل متعامد +، وحُضنت الأطباق عند درجة حرارة 25 ± 2 م (الرحمة واليحيى،2007، ص40).

تمَّ مراقبة النمو بشكل يومي حتى غطت مستعمرات الفطر في معاملة الشاهد كامل المستنبت بعد حوالي 15 يوم. وتم أخذ القراءات المختلفة للنمو الفطري الطولي والعرضي بال سم (وحسب متوسط كل قراءة) لمعاملات المستخلصات النباتية الخمس ولكل تركيز والمبيد والشاهد لمعرفة نسبة التثبيط لكل مستخلص ولكل تركيز، وحُسِبت النسبة المئوية للتثبيط من المعادلة:(Okigbo and Nmeka 2005,p 805; الدوسري والأسدي،2007، ص200).

$$\% \text{ النمو لتثبيط} = \frac{\text{معدل النمو الشعاعي في الشاهد} - \text{معدل النمو الشعاعي في المعاملة}}{\text{معدل النمو الشعاعي في الشاهد}} \times 100$$

بعد الانتهاء من حساب نسبة التثبيط نقوم بحساب التركيز المثبط لـ 50% من الفطر وهو IC50.

3- 6 التحليل الإحصائي:

استخدم التصميم العشوائي الكامل وتم تحليل النتائج بواسطة برنامج V23 spss عند مستوى معنوية 0.01 حيث تم إجراء اختبار التباين باتجاه واحد tow- way Anova وتم مقارنة المتوسطات باستخدام اختبار أقل فرق معنوي LSD عند مستوى معنوية 0.01 (قيثار،2005، ص5).

4- النتائج:

4-1 عزل وتعريف فطر النوباء المتناوبة:

أظهرت نتائج العزل من عينات نبات الفول المصابة (أوراق – بذور) بالتبقع وجود الفطر *A. alternata* في هذه النباتات، حيث تمكن الفطر المعزول من النمو وتشكيل مستعمراته على بيئة PDA وعلى حرارة 25 ± 2 مo وامتلأ الطبق(9 سم) كاملاً بمستعمرة الفطر الذي نما سطحياً بعد حوالي 15 يوم من التحضين، وقد بدت مستعمرة الفطر على شكل غزل فطري بلون أبيض شفاف في البداية ومن ثم يتحول إلى اللون الداكن الذي تراوح بين الأخضر الزيتوني الفاتح فالرمادي فالأسود وذلك نتيجة تشكل الأبواغ الحاوية على صبغة الميلانين بكثافة عالية.

بيَّن التشخيص المجهري للفطر المعزول أن أفطورة الفطر كانت مقسمةً بحواجز عرضية وظهرت بلون زهري شفاف عند استخدام صبغة أحمر الفوكسين وبلون أزرق شفاف عند استخدام صبغة اللاكتوفينول، وكان حامل الغبيرات Conidiphor قصيراً يحمل أبواغاً كمثريةً داكنةَ اللون أعرض في أحد طرفيها من الآخر مقسمة بعدة حواجز طولية وعرضية وذات رأس مدبب، وكانت هذه الأبواغ محمولة على الحوامل اما بشكل مفرد أو في سلاسل في الغالب وكان عدد الأبواغ في السلسلة الواحدة عادة مايتراوح بين 2-5 بوغة في الغالب.

ولوحظ أن الفطر يمكن أن ينتقل عن طريق البذور إذ أمكن عزله من بذور نباتات الفول في نهاية الموسم.

4-2 تأثير المستخلصات المائية على نمو الفطر *A. alternata*:

بينت النتائج أنَّ للمستخلصات المائية للأنواع النباتية الخمسة تأثيراً تثبيطياً واضحاً في النمو الشعاعي للفطر المنمى *A. alternata* على الوسط الزرعي PDA مع وجود فروق معنوية واضحة بين المستخلصات في تثبيط الفطر، كما لوحظ وجود فروق معنوية بين التراكيز المختلفة لكل مستخلص عند مستوى معنوية 0.01.

وتبين أن لجميع المستخلصات تأثيراً معنوياً مثبطاً لهذا الفطر عند مستوى معنوية 0.01 مقارنة بالشاهد، كما لوحظ وجود فروق معنوية بين التراكيز الثلاثة في المستخلص نفسه، حيث كانت معدلات أقطار نمو المستعمرات الفطرية تتناسب عكسياً مع تركيز المستخلص، إذ تقل معدلات الأقطار كلما ازداد تركيز المستخلص على العكس من النسب المئوية للتثبيط والتي كانت تزداد كلما ازداد تركيز المستخلص المائي.

وكانت أعلى نسبة تثبيط للمبيد الفطري (أزوكسي ستروبين + دايفينوكونازول) 32.5% بنسبة 100% وأفضل نسبة تثبيط كانت للمستخلصات المائية بالتركيز 20% وسجل مستخلص الأزدرخت عند هذا التركيز أعلى نسبة تثبيطية 68.55% بينما أقل نسبة تثبيطية كانت لمستخلص الزعتر بنسبة 53.89% عند التركيز نفسه جدول رقم (2).

ويتبين من خلال حساب IC50 أنَّ أفضل تركيز مثبط بنسبة 50% لنمو الفطر الشعاعي كان التركيز 8.51% للمستخلص المائي لثمار الأزدرخت وأعلى تركيز مثبط للنسبة نفسها كان لنبات الزعتر بتركيز 17.38% جدول رقم (2).

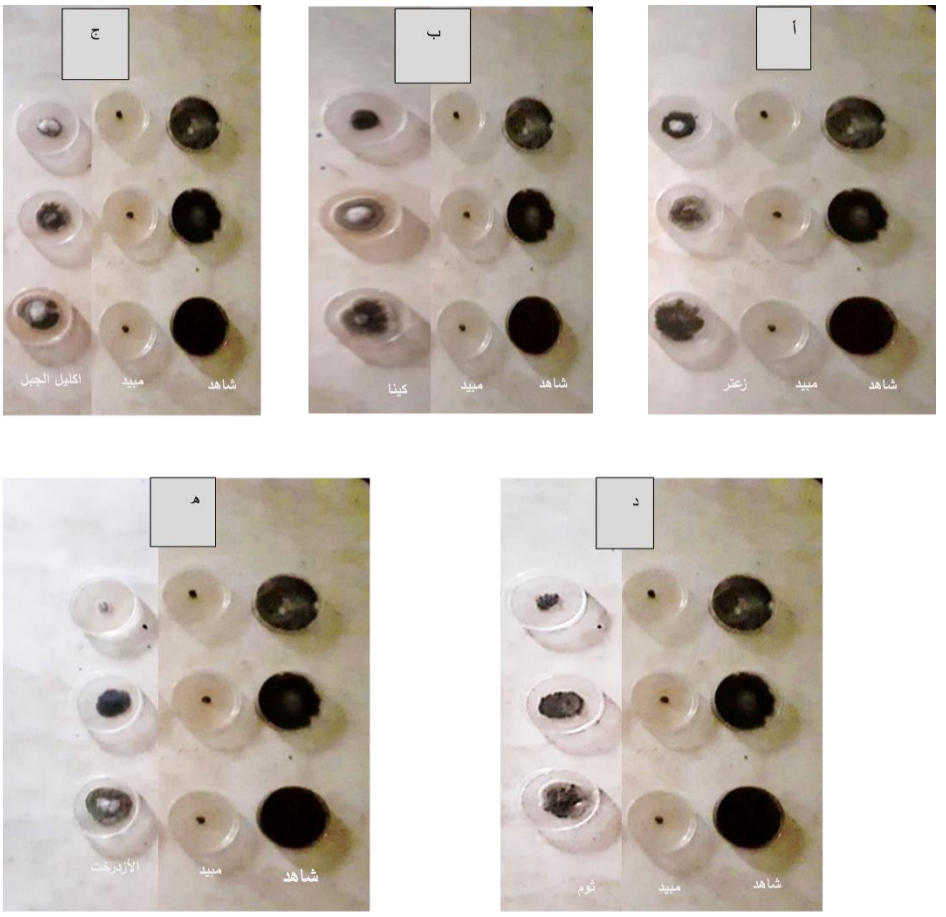
جدول رقم (2) يبين النسب المئوية لتثبيط الفطر *A.alternata* باستخدام ثلاثة تراكيز مختلفة من المستخلصات المائية الخمسة:

- تشير ** إلى تفوق التركيز 20% بفروق معنوية على باقي التراكيز عند مستوى معنوية $p>0.01$، * إلى تفوق التركيز 10% على التركيز 5% عند مستوى معنوية $p>0.01$
- الأحرف من (a ⟸ e) تشير إلى وجود فروق معنوية بين المستخلصات عند مستوى

المعاملة	التركيز%	معدل النمو الشعاعي /سم	معدل التثبيط%	IC50%
الأزدرخت *Melia azedarach*[a]	5	5.52	40.44	8.13
	*10	4.26	52.67	
	**20	2.83	68.55	
الثوم *Allium sativum*[b]	5	5.45	38.66	9.33
	*10	4.38	51.33	
	**20	3.22	64.22	
إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis*[c]	5	6.14	31.8	12.3
	*10	5.07	43.66	
	**20	3.52	60.88	
الكينا *Eucalyptus camaldulensis*[d]	5	6.5	27.77	14.79
	*10	5.48	39.11	
	**20	3.82	57.56	
الزعتر *Thymus vulgaris*[e]	5	6.86	23.77	17.38
	*10	5.83	35.2	
	**20	4.15	53.89	
معاملة المبيد		0	100	
الشاهد		9	0	
قيمة الانحراف المعياري الكلي SD				σ=1.21
قيمة LSD 0.01				0.14
الخطأ القياسي std error				0.2

معنوية($p\leq0.01$)

- إن معدل النمو الشعاعي هو متوسط النمو الطولي والعرضي لخمسة مكررات بالسنتيمتر.



صورة رقم (1) تبين تأثير المستخلصات المائية الخمسة (الأزدخت ، الثوم ، اكليل الجبل ، الكينا ، الزعتر) على النمو الشعاعي للفطر *A. Alternata* بالمقارنة مع المبيد الفطري (أمستار) والشاهد (ماء مقطر معقم).

أ: تأثير مستخلص الزعتر بالمقارنة مع المبيد أمستار والشاهد على نمو الفطر *A. alternata*

ب: تأثير مستخلص الكينا بالمقارنة مع المبيد أمستار والشاهد على نمو الفطر *A. alternata*

ج: تأثير مستخلص أكليل الجبل بالمقارنة مع المبيد أمستار والشاهد على نمو الفطر *A. alternata*

د: تأثير مستخلص الثوم بالمقارنة مع المبيد أمستار والشاهد على نمو الفطر *A. alternata*

هـ: تأثير مستخلص االأزدرخت بالمقارنة مع المبيد أمستار والشاهد على نمو الفطر *A. alternata*

5- المناقشة:

5-1 عزل وتعريف الكائن الممرض:

إن نتائج العزل والتشخيص بيّنت أنَّ الفطر *A. alternata* يصيب نبات الفول ويسبب تشوهات على الأوراق بما يعرف بمرض التبقع الألترناري على نبات الفول، وهو مرض اقتصادي يصيب نبات الفول، ويتحول إلى لفحة مدمرة على النبات في حال توفر الظروف المناخية،

وتتفق النتائج مع ماأورده الباحثان حيث أشارا إلى خطورة المرض على نبات الفول (El-hai,2015, p.124, Kayim et al., 2018, p170).

كما اتفقت نتائج العزل من البذور مع ماأوجده (Dubey and Patel, 2000, p175) (الناصر وعز الدين،2014، ص33؛ محمد رضا،2015، ص9) حول انتقال الفطر *A.alternata* عن طريق البذور واعتبارها مصدر اللقاح الأولي في الحقل.

لذلك لابد من تعقيم بذور الفطر قبل زراعتها بأحد المعقمات الفطرية المتخصصة للتخلص من اللقاح الأولي ماأمكن والحصول على إنبات أكبر وعدم نقل الممرض الى أراضي سليمة غير موبوءة.

5-2 تأثير المستخلصات:

أشارت النتائج أن جميع المستخلصات كان لها تأثير واضح في تثبيط النمو الشعاعي لفطر النوباء المتناوبة *A. alternata* وأن هذا التثبيط كان يزداد بازدياد التركيز، وذلك لأن زيادة التركيز تزيد من كمية المواد الفعالة للمستخلص المؤثرة في نمو الفطر مما يشير إلى إمكانية استخدام هذه المستخلصات في مكافحة مرض التبقع الألترناري على نبات الفول للتقليل ماأمكن من مخاطر استخدام المبيدات.

وتتوافق النتائج مع ما ذكره العديد من الباحثين فقد ذكر (الرحمة واليحيى،2007، ص80) حول تثبيط نمو فطر النوباء المتناوبة *A. alternata* بواسطة مستخلصي إكليل الجبل والكينا عند التركيز 4% بمقدار 23.9%.

وتتفق النتائج مع ما وجده (الناصر وعز الدين، 2014، ص39) من حيث تأثير مستخلصي الثوم والأزدرخت على فطر النوباء المتناوبة *A. alternata* وتختلف معه في تفوق تأثير مستخلص الثوم على مستخلص الأزدرخت حيث وجد أنَّ مستخلص نبات الثوم قد ثبط نمو الفطر بنسبة 54.22% عند التركيز 200 ملغرام/لتر بفعالية أعلى من تأثير مستخلص الأزدرخت في الفطر المذكور وربما يعود السبب إلى استخدامنا المستخلص المائي لثمار الأزدرخت في البحث التي قد يكون لها تأثير تثبيطي أكبر لنمو الفطر من المستخلص المائي للأوراق.

المراجع العربية :

1- جلال الدين، أنفال مؤيد.(2009). "تأثير المكافح الحيوي *T. harzianum* والمبيدات ومستخلصات النباتات على الفطر *A. alternata* المسبب لمرض تبقع أوراق الباقلاء في البيت الزجاجي"، مجلة علوم الرافدين:20(2): 33- 45.

2- حسن، كوثر محمد علي.(2012). "عزل وتشخيص أنواع الجنس *Alternaria* spp المعزولة من الأجزاء النباتية وتقدير فعاليتها الأنزيمية". مجلة القادسية للعلوم الصرفة: 17(1): 28-38.

3- الدوسري، حميد ناصر، رامز مهدي صالح الأسدي.(2007). "تأثير بعض المستخلصات النباتية في نمو ثلاث فطريات مسببة لمرض تبقع أوراق نخيل التمر" مجلة جامعة كربلاء العلمية: 5(4): 199-203.

4- الرحمة ،عبد الله ناصر، سامي عبد العزيز اليحيى. (2007). "دور المستخلصات النباتية الطبيعية في مقاومة الفطريات المسببة للأمراض النباتية". رسالة ماجستير، قسم النبات والأحياء الدقيقة، كلية العلوم، جامعة الملك سعود، السعودية. 146 ص.

5- سرحان، عبد الرضا طه. (2003). "سمية مستخلصات بعض النباتات الطبية لعدد من الفطريات المرضية". المجلة العراقية للعلوم: 44 ب(1): 98-84.

6- عبد العزيز، محمد علي. (2007). "تأثير موعد الزراعة والكثافة النباتية في النمو والتبكير بالنضج ومكونات الغلة للفول العادي *Vicia faba* L. في الساحل السوري". مجلة جامعة تشرين للدراسات والعلوم البيولوجية:29(4):47-29.

7- عبود، وفاء.(2017). "أثر معدلات البذار وموعد الزراعة في نمو الفول *Vicia faba* L. وإنتاجيته في ظروف المنطقة الغربية في محافظة حمص". مجلة جامعة البعث:39،(27):162-135.

8- العيبان، سلوم طلال، طه حمادي الخليفة. إنتاج محاصيل الحبوب والبقول، منشورات جامعة حلب، سورية، 2003.1-377 ص.

9- الغرياني، خليفة نجاة ، خديجة فرج العربي، رويدا سراج الدين النفاتي، زينب الصادق البوزيدي.(2017). "تأثير المستخلص المائي لمسحوق بذور الحلبة *Trigonella foenum-graecum* L. على الفطريات المرافقة لبعض البذور البقولية المخزونة". المجلة الليبية لوقاية النبات: 7: 1-14.

10-قيثار، رشيد مجيد. (2005). "تأثير الفعالية التضادية لبعض المستخلصات النباتية على نمو بعض الاحياء المجهرية". مجلة التقني،18(3): 1-10.

11-محمد رضا، دعاء عبد العباس. (2015). "كفاءة القلويدات المستخلصة من نباتي الحنظل والكاريس في السيطرة على فطري *Aspergillus ochraceus* و *Alternaria alternata* المرافقة لبذور وجذور الباقلاء".رسالة ماحستير. قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة القادسية، العراق. 1-161.

12-منصور، غيثاء، ابتسام حمد، عماد القاضي.(2005). "الفصيلة الفولية في وادي القرن". مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية: 21(1): 65-84.

13-الناصر، زكريا، دعاس عز الدين. (2014). "فاعلية بعض المستخلصات النباتية ضد الفطرين *Fusarium oxysporum* و *A. Alternata* ومقارنتها بالمبيدات الفطرية مخبريا". مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية: سلسلة العلوم البيولوجية:36(3): 46-31.

المراجع الأجنبية

14- Barnett, H.L. HUNTER, B.B. (1998). "Illustrated Genera of Imperfect Fungi". Burgess Publishing Co., Minnesota, 4th ed, Pages:241.
15- Carpinella, M. C., Ferrayoli, C. G., Palacios, S. M. (2005). "Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits". Journal of agricultural and food chemistry: 53(8): 2922-2927.
16- Diaz Dellavalle, P., Cabrera, A., Alem, D., Larranaga, P., Ferreira, F., Dalla Rizza, M. (2011). "Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp". Chilean Journal of Agricultural Research: 71(2) 231–239.
17- Dubey, S. C., Patel, B. (2000). "Mode of perpetuation and spread of alternaria blight of broad bean". Indian Phytopathology: 53(2) :175-177.
18- Dubey, S. C., Patel, B., Jha, D. K. (2000). "Chemical management of Alternaria blight of broad bean". Indian Phytopathology: 53(2): 213-215.
19- El-hai, K. M. A. (2015). "Controling of Alternaria Leaf Spot Disease on Faba Bean Using some Growth SubstancesControlling". Asian Journal of Plant Pathology: 9(3): 124–134.
20- Ellis, M.B., 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute,Kew,Surrey,England.1-608.
21- Feng, W, Chen, J., Zheng, X., Liu, Q.(2011). "Thyme oil to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo as fumigant and contact treatments". Food Control: 22(1): 78–81.
22- Guleria, S., Kumar, A. (2006). " *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in sesame against Alternaria leaf spot disease". Journal of Cell and Molecular Biology: 5(2): 81-86.
23- Harris, C.A., . Renfrew, M.J., Woolridge, M.W. (2001). "Assessing the risk of pesticide residues to consumers:recent and future developments". Food Additives and Contamination:18(2):1124-1129.
24- Kayim, M., Yones, A. M., Endes, A. (2018). "Biocontrol of *Alternaria alternata* Causing Leaf Spot Disease on Faba Bean (*Vicia faba* L.) Using Some *Trichoderma harzianum* Isolates Under In vitro Condition. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi: 22(2): 169-178.

25- Khan, M. U., Abro, M. A., Jatoi, G. H., Ali, A., Hullio, M. H., Guo, L. D. (2019). "Evaluation of different fungicides, botanical extracts and bio control agents against *Alternaria alternata* the causal agent of leaf spot in Grapes". BioCell, 43(2): 12-21.
26- Lima, C. B, Rentschler, L. L. A., Bueno, J. T., Boaventura, A. C. (2016). "Plant extracts and essential oils on the control of *Alternaria alternata* , *Alternaria dauci* and on the germination and emergence of carrot seeds (*Daucus carota* L.)" Ciência Rural: 46(5): 764–770.
27- Meena, R. P., Saran, P. L., Kalariya, K. A., Manivel, P. (2020). "Efficacy of fungicides and plant extracts against *Alternaria alternata* causing leaf blight of chandrasur (*Lepidium sativum*)". Indian Journal of Agricultural Sciences: 90(2): 337-340.
28- Nagrale, D. T., Sharma, L., Kumar, S., Gawande, S. P. (2016). "Recent diagnostics and detection tools: implications for plant pathogenic *Alternaria* and their disease management". In Current trends in plant disease diagnostics and management practices Springer, Cham. 111-163.
29- Nashwa, S. M, Abo-Elyousr, K. A.(2012). "Evaluation of various plant extracts against the early blight disease of tomato plants under greenhouse and field conditions". Plant Protection Science: 48(2): 74-79.
30- Nasraoui, B.(2008). "Main fungal diseases of cereals and legumes in Tunisia". Centre de Publication Universitaire, Tunisia, 117-194.
31- Okigbo, R. N., Nmeka, I. A. (2005). "Control of yam tuber rot with leaf extracts of *Xylopia aethiopica* and *Zingiber officinale*". African Journal of Biotechnology: 4(8): 804-807.
32- Shukla, S., Mishra, J. K., Khare, R. K. (2019). " Evaluation of Different Botanicals Against Alternaria Blight Disease of Linseed (*Alternaria lini*)". International Journal of Research in Engineering, Scienceand Management: 2(10): 13-16.
33- Singh, B., Beniwal, M., Sohi, G. S., Sran, A. S., Kaur, P.(2020). "Studies on Alternaria leaf spot of cotton with special reference to disease management by use of chemicals and botanicals". Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry: 9(5): 1857-1863.
34- Thomma, B.P.H. (2003). "*Alternaria* spp. from general saprophyte to specific parasitie".Molecular Plant Pathology: 4(4): 225-236
35- Valvi, H. T., Kadam, J. J., Bangar, V. R. (2019)." In vitro evaluation of certain antifungal plant extracts and biocontrol agents against

Alternaria brassicae (Berk.) Sacc. Causing Alternaria leaf spot of cauliflower. International Journal of Chemical Studies: 7(2): 1774-1777.

36- Wenderoth, M., Garganese, F., Schmidt-heydt, M., Soukup, S. T., Ippolito, A., Sanzani, S. M., Fischer, R. (2019). :Alternariol as virulence and colonization factor of *Alternaria alternata* during plant infection". Molecular Microbiology, 112(1), 131–146.