تأثير معاملة البذور بالمستخلصات النباتية وعوامل المقاومة الأحيائية والكيميائية في مكافحة الفطريات المسببة لموت بادرات وتعفن جذور اللوبياء

عصام داؤد سليمان ونور عبد الحافظ

قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، العراق، البريد الإلكتروني: Is_alr@yahoo.com

الملخص

سليمان، عصام داؤد ونور عبد الحافظ. 2013. تأثير معاملة البذور بالمستخلصات النباتية وعوامل المقاومة الأحيائية والكيميائية في مكافحة الفطريات المسببة لموت بادرات وتعفن جذور اللوبياء. مجلة وقاية النبات العربية، 31(2): 138-145.

هدفت الدراسة إلى تقويم مقاومة مرض تعفن بذور وموت بادرات اللوبياء (*Vigna unguiculata*) المتسبب عن الفطور *Fusarium heterosporum*، *F. solani*، *Macrophomina phaseolina*، *Rhizoctonia solani* و *Pythium aphanidermatum* عن طريق معاملة البذور بالمستخلصات المائية والكحولية لأوراق الأزدرخت/السبحبح *Melia azedarach* والفطر الأحيائي *Trichoderma viride* والبكتريا الأحيائية *Bacillus thuringiensis* مقارنة بالمبيد الفطري دايثين م-45. أظهرت النتائج تفوق معاملة البذور بالمبيد دايثين م-45 على جميع المعاملات الأحيائية في خفض نسبة إصابة البادرات وموتها قبل وبعد ظهورها فوق سطح التربة وبلغت الإصابة بها 2.96، 3.51 و 0.14%، على التوالي، تلتها معاملة المستخلص الكحولي لأوراق الأزدرخت/السبحبح (4.44، 5.18 و 0.15%، على التوالي)، ولم تختلف معنوياً عن معاملة *T. viride* علاوة على زيادة طول المجموع الخضري والجذري والوزن الجاف للنبات.

كلمات مفتاحية: مستخلصات نباتية أوراق الأزدرخت، عوامل مقاومة احيائية، دايثين م-45، موت بادرات اللوبياء، تعفن الجذور.

المقدمة

يعد محصول اللوبياء (*Vigna unguiculata* L. Walp) من محاصيل الخضر البقولية المهمة في العراق، إلا أن إنتاجيته تنخفض أحياناً بسبب إصابته بعدد من الآفات الزراعية ومن أهمها الفطور المسببة لموت البادرات وتعفنات الجذور والذبول، التي تؤدي إلى خسائر اقتصادية كبيرة في كل أنواع الترب العراقية (3). وتم في دراسة سابقة (1) عزل وتحديد الفطور المسببة لموت بادرات وتعفن جذور اللوبياء، وإثبات قدرتها الإمراضية وكان من بينها *Fusarium heterosporum* Nees ex Fries، *F. solani* Mart.، *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.، *Rhizoctonia Solani* Kuhn و *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitz. وتضمنت الإستراتيجيات المستقبلية آفاقاً للمكافحة الأحيائية كعنصر أساس طويل الأمد في مكافحة الآفات والإبتعاد عن عناصر المكافحة قصيرة الأمد وتلك التي تلحق أضراراً بالنظام البيئي يعد الإنسان أحد أهم عناصره. هدفت هذه الدراسة إلى اختبار عناصر مختلفة من المكافحة الأحيائية لمقاومة الفطور الممرضة للوبياء، وهي المستخلصات المائية والكحولية لنبات الأزدرخت/السبحبح (*Melia azedarach*) والفطر *T. viride* والبكتريا *Bacillus thuringiensis* والمبيد دايثين م-45 وذلك من حيث تأثيرها في نمو مستعمرات الفطور الممرضة على الوسط الغذائي، وكذلك مكافحة الفطور الممرضة عن طريق معاملات البذور في تجارب الأصص/السنادين.

مواد البحث وطرائقه

المستخلصات المائية

تم تحضير المستخلصات المائية لأوراق نبات الأزدرخت/السبحبح باتباع طريقة Rios وآخرون (21). أذيب غرام واحد من المستخلص النباتي الخام المجفف في 5 مل ماء مقطر فنتج مستخلص تركيزه 200 مغ/مل، الذي اعتبر كتركيزاً قياسياً، ومنه لتحضير مجموعة التراكيز المدروسة (2). عقمت المستخلصات المائية الخام باستخدام جهاز الـ Millipore (مرشح غشائي Membrane filters، 0.45µm). اختبر تأثير المستخلص في نمو الغزل الفطري لممرضاته بإضافة أحجام محددة من كل مستخلص معقم إلى أحجام محدودة من الوسط المغذي(بطاطا – سكروز- أجار) المعقم عند حرارة 45 ^{o}س قبل تصلبه في دوارق زجاجية (250 مل)، تم بذلك الحصول على التراكيز 0، 5، 10، 20، 25 و 30 مغ/مل من الوسط المغذي للحصول على التركيز التثبيطي الأدنى في أطباق بتري معقمة (9 سم)، بثلاث مكررات وترك الوسط المغذي حتى التصلب. لقحت الأطباق بأخذ أقراص 5 مم من حافة مستعمرة الفطر بعمر3-6 أيام بحسب نمو

الفطور وبواسطة مثقاب الفلين (Cork borer) ووضعت في مركز الطبق ثم حضنت الأطباق عند حرارة 27±1 °س. أخذت النتائج بحساب متوسط قياس قطرين متعامدين للمستعمرة أما معاملة الشاهد فتم تحضيره بإضافة الماء المقطر المعقم بدلاً من المستخلص إلى الوسط المغذي.

المستخلصات الكحولية

حضرت المستخلصات الكحولية لأوراق الأزدرخت/السبحبح بطريقة Grand وآخرون (13)، واستخدم لذلك 20 غ من مسحوق النموذج النباتي في 200 مل من الكحول اللأثيلي (95%) (10:1 وزن:حجم) ثم خُلط بجهاز الخلاط الكهربائي داخل حمام ثلجي، وحرك المزيج لمدة 60 دقيقة بوساطة محرك مغناطيسي بقصد تفجير جدران الخلايا النباتية. وضع المزيج في الثلاجة عند حرارة 4°س ولمدة 24 ساعة ثم رشح خلال عدة طبقات من الشاش باستخدام قمع بخنر وأوراق ترشيح (Whatman N0.1) تحت التفريغ، ونلك باستخدام مضخة التفريغ. أجري للرشاحة نبذ بالطرد المركزي (6000 دورة/دقيقة) مبرد (4°س) مدة 30 دقيقة ووضع المستخلص الكحولي الخام في جهاز المبخر الدوار تحت التفريغ عند حرارة 40°س ومن ثم التجفيف بجهاز المجفد وحفظ تحت التجميد لحين الاستعمال. تم اختبار تأثير هذه المستخلصات الكحولية في الفطور المعزولة بإضافة أحجام محدودة من كل مستخلص إلى أحجام محدودة من الوسط المغذي (PSA) قبل تصلبه. أذيب غرام واحد من المستخلص النباتي في 5 مل من مادة Diethyl ether للحصول على تركيز 200 مغ/مل كتركيز قياسي، ومنه تم تحضير التراكيز المطلوبة (0، 1، 2، 4، 6 و 8 مغ/مل). تم تعقيم المستخلص باستخدام حمام مائي عند حرارة 62 °س لمدة 10 دقائق ووضع في أطباق بتري (9 سم) بثلاث مكررات وترك حتى تصلب الوسط المغذي، وتركت أطباق الشاهد (اضافة ماء مقطر إلى الوسط المغذي). لقحت الأطباق بالفطر وحُضنت بالطريقة آنفة الذكر. كما أخذت النتائج بحساب متوسط قياس قطرين متعامدين وتم حساب نسبة تثبيط نمو الفطر وفق المعادلة التالية:

$$\text{نسبة التثبيط \%} = \frac{\text{متوسط قطر المقارنة – متوسط قطر المعاملة}}{\text{متوسط قطر المقارنة}} \times 100$$

المقدرة التضادية للفطر الحيوي *T. viride*

اختبرت المقدرة التضادية لهذا الفطر إزاء الممرضات عن طريق الزراعة المزدوجة للفطر الأحيائي المضادة مختبرياً إزاء الفطر الممرض باتباع طريقة Bell وآخرون (6)، في أطباق بتري 9 سم تحتوي على الوسط المغذي. قسم كل طبق بقلم شمعي إلى نصفين ثم وضع قرص مقلوب من مستعمرة الفطر 5 مم للفطر الحيوي في النصف الأول وقرص مماثل من مستعمرة الفطر الممرض عمرها 3-6 أيام في النصف الثاني من الطبق. أما أطباق الشاهد فقد لقح النصفان بالفطر الممرض فقط، ثم حضنت الآطباق عند حرارة 27±1 °س. أخذت النتائج بعد 3-6 أيام، وحسبت درجة التضاد تبعاً لسلم تقييس1−5 كما يأتي: 1= نموات الفطر الحيوي غطت كامل مساحة الطبق ولم يسمح للفطر الممرض بالنمو؛ 2= نموات الفطر الحيوي غطت ثلثي مساحة الطبق، والفطر الممرض ثلث الطبق؛ 3= نموات الفطر الحيوي غطت نصف مساحة الطبق، والممرض النصف الآخر، بدون ظهور مناطق فاصلة بين المستعمرتين؛ 4= نموات الفطر الحيوي غطت ثلث مساحة الطبق، ونموات الممرض الثلثين الآخرين؛ 5= الفطر الحيوي غير نامي، وغطت نموات الفطر الممرض كامل مساحة الطبق. واعتبر الفطر الحيوي فاعلاً عند إظهار قدرة تضادية 2 أو 1 إزاء الفطور الممرضة المدروسة.

المقدرة التضاديه للبكتريا الحيوية *B. thuringiensis*

اختبرت المقدرة التضادية باتباع طريقة Sharif وآخرون (22). لقح وسط الأجار المغذي المائل بالبكتريا المضادة عند وبعد التحضين في درجة حرارة 37±1 °س لمدة 24 ساعة، وحضر معلق البكتيريا باستعمال المحلول الملحي الفسيولوجي وذلك بإضافته إلى الوسط المائل للحصول على المعلق البكتيري. ثبت تركيز المعلق عند 10^8 خلية/مل، ونشر 0.1 مل منه في أطباق بتري معقمه تحتوي على الوسط المغذي بوساطة أنبوب زجاجي معقم بشكل حرف L ومن ثم حضنت عند حرارة 37±1 °س مدة 24 ساعة. لقح مركز الطبق بقرص قطره 5 مم من الفطور الممرضة، وكررت ثلاث مرات لكل فطر، ثم حضنت عند حرارة 27±1 °س ، كما تركت أطباق أخرى للفطور الممرضة من دون البكتريا الحيوية كشاهد. أخذت النتائج بعد 7 أيام وذلك بحساب نمو الفطور والنسبة المئوية للتثبيط باستخدام الشاهد.

الإختبار الحيوي للمبيدات الفطرية ازاء الفطور الممرضة

درس تأثير سمية أربعة مبيدات فطرية في نمو الفطور الممرضة. اشتملت المبيدات المدروسة على: دايثين م 45= Mancozeb (80%) ورايزولكس (60%) وريدوميل مز (72%) ويوبارين Euparin (50%). استخدمت المبيدات بتركيز 100 مغ/لتر مادة فاعلة، بإتباع تقنية الغذاء المسموم (8)، وذلك بإضافة المبيد إلى الوسط المغذي قبل تصلبه عند حرارة 45 °س. بعد ذلك وزع الوسط الحاوي على كل مبيد لوحده على أطباق بتري 9 سم، ولقحت بمركزها بقرص 5 مم من مستعمرة الفطر

الممرض وتركت أطباق بدون اضافة المبيد لها استخدمت كشاهد. اشتملت المعاملة على ثلاث مكررات لكل فطر. حضنت الأطباق عند حرارة 27±1 °س ثم أخذت النتائج بحساب متوسط قياس قطرين متعامدين لكل مستعمرة، والنسبة المئوية لتثبيط نمو الفطور الممرضة كما سبق ذكره.

تأثير المعاملة بالمستخلصات وعناصر المقاومة الأخرى في نسبة الإصابة بموت البادرات وتعفنات جذور اللوبياء وشدتها

نفذت تجربة عاملية وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة بثلاث مكررات، في أصص/سنادين تحتوي تربة معقمة وملوثة بالفطور الممرضة المنماة مسبقا في أطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي وبمعدل نصف طبق بتري/فطر/أصيص، وتركت أصص أخرى بدون تلويث تربتها كشاهد. رويت الأصص بالماء مدة يومين، ثم زرعت فيها بذور الصنف المحلي من اللوبياء بعد تطهيرها سطحياً بمادة هايبوكلوريت الصوديوم 1%، وذلك بواقع 15 بذرة/أصيص وتم استخدام السكر زانثان كمادة لاصقة في معاملة البذور بالمبيد الفطري والعامل الحيوي الفطري والبكتيري ومسحوق أوراق النباتات. وتضمنت التجربة المعاملات التالية:

1. الشاهد تربته غير ملوثة.
2. شاهد تربته ملوثه بالفطور الممرضة كل لوحده.
3. مستخلص الآزدرخت/السبحبح المائي الخام، حيث نقعت البذور بتركيز 30 مغ/مل من المستخلص المائي مدة 5 ساعات (19)، ثم زرعت في تربة ملوثة بكل من الفطريات الممرضة على إنفراد.
4. مستخلص الآزدرخت/السبحبح الكحولي الخام، حيث نقعت البذور بتركيز 8 مغ/مل من المستخلص مدة 5 ساعات قبل زراعتها.
5. مسحوق أوراق الآزدرخت/السبحبح، حيث تم نقع البذور بمحلول سكر زانثان (5%) لمدة 10 دقائق وعوملت بمسحوق أوراق الآزدرخت/السبحبح بتركيز 8 غ/كغ بذور قبل زراعتها (12).
6. المبيد الفطري، حيث نقعت البذور لمدة 10 دقائق بمحلول سكر زانثان (5 غ/لتر)، ثم عوملت بالمبيد الفطري دايثين م-45 بتركيز 3 غ/كغ بذور قبل زراعتها.
7. الفطر الحيوي *T. viride*، والذي تم الحصول على معلق أبواغه بإضافة 10 مل من محلول الزانثان (5 غ/لتر)/طبق بتري من هذا الفطر الحيوي (3×10^5 بوغة/مل)، واستخدم Tween-20 (2%) كمادة ناشرة لمعاملة البذور قبل زراعتها.
8. البكتريا الحيوية *B. thuringiensis*، حيث أضيف 10 مل من محلول سكر الزانثان الى البكتريا المنماة على وسط الأجار المغذي النامية وذلك للحصول على معلق بكتري (3.6×10^8CFU)، كما أضيف Tween-20 (2%) لمعاملة البذور قبل زراعتها.

أخذت النتائج بحساب نسبة موت البادرات قبل الظهور وذلك بعد أسبوع واحد من زراعة البذور، وكذلك النتائج النهائية لموت البادرات بعد الظهور، وشدة الإصابة بعد أسبوعين من الزراعة، بناء لمايلي:

- نسبة الإصابة ماقبل الظهور= عدد البذور غير النابتة مقسومة على العدد الكلي (وهو 15) × 100
- نسبة الإصابة مابعد الظهور= عدد البادرات الميتة والمصابة مقسومة على العدد الكلي (وهو 15) × 100
- قيمت درجة شدة الإصابة بإتباع سلم تقييس 0–3 وبإستخدام معادلة Mckinney (18)، حيث: 0= بادرات سليمة، 1= بادرات حية لكنها مصابة بتعفن الجذور، 2 = موت البادرات بعد الظهور، 3 = موت البادرات قبل الظهور.
- حسبت شدة الإصابة تبعاً للمعادلة التالية:
شدة الإصابة = عدد البادرات التي شدتها 0×0 + عدد البادرات التي شدتها 1×1 + عدد البادرات التي شدتها 2×2 + عدد البادرات التي شدتها 3×3/15 × 3
- كما سجل ارتفاع البادرة وطول الجذر والوزن الجاف.

التحليل الاحصائي

تم تحليل البيانات وفق نظام التجارب العاملية باستخدام التصميم العشوائي الكامل. وتمت المقارنة بين المتوسطات باختبار دنكن متعدد الحدود حيث ميزت المتوسطات المختلفة فيما بينها معنوياً عند مستوى احتمال 0.05.

النتائج والمناقشة

تأثير المستخلص النباتيفي تثبيط نمو الفطريات الممرضة مختبرياً

أدت إضافة تراكيز مختلفة من المستخلصات الكحولية (5، 10، 15، 20، 25 و 30 مغ/مل) ومن المستخلصات المائية (1، 2، 4، 6 و 8 مغ/مل) لأوراق الآزدرخت/السبحبح إلى تثبيط معنوي في نمو الغزل الفطري عند الفطريات المدروسة وبنسب متفاوتة، وازدادت الفاعلية بزيادة تركيز المستخلص النباتي (جدول 1).

جدول 1. النسبة المئوية لتثبيط تراكيز مختلفة من المستخلص المائي الخام لأوراق الأزدرخت / السبحبح في نمو الفطور الممرضة مختبرياً.

Table 1. Inhibition rate of different crude concentrations of aqueous extracts of *Melia azedarach* leaves on growth of pathogenic fungi *in vitro*.

المتوسط Mean	Concentration (mg/ml) التركيز (مغ/مل) 30	25	20	15	10	5	0.0	الفطر الممرض Pathogenic fungus
43.23 c	84.90 c	78.82 e	64.70 gh	61.37 k	11.70 o	1.17 s	0.00 s	*F. heterosporum*
54.06 b	88.23 b	74.90 e	65.29 h	61.17 jk	23.5 n	9.41 pq	0.00 s	*F. solani*
32.42 d	76.47 c	61.17 f	43.52 i	29.41 l	14.11 o	2.30 rs	0.00 s	*M. phaseolina*
42.64 a	94.11 a	74.11 cd	52.90 gh	39.88 jk	25.88 lmn	11.76 po	0.00 s	*P. aphanidermatum*
31.39 d	77.64 c	55.29 g	41.17 i	28.05 ml	14.30 o	3.50 rs	0.00 s	*R. solani 1*
26.71 f	60.00 f	54.11 g	36.47 jk	23.52 n	10.58 op	2.35 rs	0.00 s	*R. solani 2*
36.05 e	71.76 d	52.94 gh	40.00 ij	24.70 mn	9.11 o	5.80 qr	0.00 s	*R. solani 3*
	77.05 a	61.28 b	45.19 c	30.88 d	16.29 e	5.19 f	0.00 s	Mean المتوسط

* القيم المتبوعة بحروف متشابهة في نفس العامود تدل على عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن متعدد الحدود.

*Values followed by the same letters in the same column are not significantly different based on Duncan's multiple range test at P=0.05.

أعطى تركيز 30 مغ/مل أعلى تثبيط لنمو جميع الفطور الممرضة تراوح مابين 60-94.11%، وظهر أعلاه عند *P.aphanidermatum*، وأضعفه عند *R. solani 2*. كما أظهرت نتائج إستخدام المستخلص الكحولي للأزدرخت/السبحبح (جدول 2) تثبيطاً معنوياً للفطريات الممرضة لاسيما العزلات الثلاثة من *R. solani* التي أدت إلى تثبيط كامل للفطر الممرض (100%) يليه *F. heterosporum* (95.57%). ولدى مقارنة تأثير متوسط المستخلص الكحولي والمائي في تثبيط نمو تلك الفطريات الممرضة، أظهر المستخلص الكحولي أكثر فاعلية في تثبيط نموها (48.14%) مقارنة مع المستخلص المائي (36.05%) وقد يعزى ذلك إلى قدرة الكحول الايثانولي على إستخلاص المركبات القطبية عموماً مثل الفينولات المختلفة كالفلافينويدات والانثوسيانادين واللجنين ومركبات أخرى (14). وأشارت دراسة سابقة (11) إلى التأثير الفاعل للمستخلصات المائية لأوراق الأزدرخت/السبحبح والتي أحدثت تخفيضاً في نمو الغزل الفطري لكل من *R. solani*، *M. phaseolina*، *F. oxysporum* و *S. rolfsii* المسببة لتعفن جذور اللوبياء والبازلاء في مصر، وأعزى ذلك إلى زيادة نسبة المركبات الفينولية في أوراق ذلك النبات. كما كان لإضافة مستخلصات أوراق الأزدرخت (*Azadirachta indica*) والثوم والبصل والداتورا (*Datura* globulus) أثراً كبيراً في خفض نمو الفطر *S. rolfsii* وفي إنتاج أجسامه الحجرية (23)، وكذلك الأمر لمستخلصات أوراق النيم التي أحدثت تثبيطاً للفطر *Thanatephorns cucumris* وهو الطور الجنسي للفطر *R. solani*.

جدول 2. النسبة المئوية لتثبيط تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي الخام لأوراق لأزدرخت/السبحبح في تثبيط نمو الفطور الممرضة.

Table 2. Inhibition rate of different crude concentrations of crude alcoholic extracts of *Melia azedarach* leaves on growth of pathogenic fungi *in vitro*.

المتوسط Mean	Concentration (mg/ml) التراكيز (مغ/مل) 8	6	4	2	1	0.0	الفطر الممرض Pathogenic fungus
42.77 e	95.57 c	64.70 j	57.64 l	28.23 q	10.58 u	0.0 v	*F. heterosporum*
46.44 d	87.88 e	76.47 g	61.17 k	34.11 p	18.82 s	0.0 v	*F. solani*
39.84 f	88.47 ed	60.0 k	52.94 m	25.88 r	11.76 u	0.0 v	*M. phaseolina*
46.27 d	90.47 d	70.94 i	61.71 k	35.29 p	20.00 s	0.0 v	*P. aphanidermatum*
51.96 c	100.00 a	95.29 c	72.94 h	27.05 qr	16.47 t	0.0 v	*R. solani 1*
53.33 b	100.00 a	97.64 b	65.88 j	37.67 o	18.82 s	0.0 v	*R. solani 2*
57.05 a	100.00 a	94.11 c	78.80 f	42.35 n	27.05 qr	0.0 v	*R. solani 3*
	94.62	79.84	64.36	32.74	17.32	0.0	Mean المتوسط

* القيم المتبوعة بحروف متشابهة في نفس العامود تدل على عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن متعدد الحدود.

*Values followed by the same letters in the same column are not significantly different based on Duncan's multiple range test at P=0.05.

اختبار القدرة التضادية للفطر الأحيائي *T. viride* والبكتريا الأحيائية *B. thuringienisi* مختبرياً

أبدى الفطر الحيوي *T. viride* كفاءة عالية في مقدرته التضادية إزاء الفطور الممرضة التي تصيب اللوبياء وبمعدل 1.71 (جدول 3) إذ أظهر أعلى درجة تضاد (درجة 1) مع كلا الفطرين *F. heterosporoum* و *F. solani* في حين بلغت درجة التضاد 2 إزاء باقي الفطريات المدروسة وذلك بإعتماد سلم التقيس الخماسي (6). وتجدر الإشارة إلى أن مسيليوم الفطر الحيوي المدروس قد نمى فوق سطح مستعمرة الفطور الممرضة ولوحظ التفاف خيوطهما حول بعضها البعض. كما لم تشاهد في جميع الحالات ظهور مساحة فاصلة بين مستعمراتهما مما يدعو للإعتقاد إلى وجود نشاط تطفلي عند *T. viride* ازاء الفطر الممرض. وأظهرت النتائج (جدول 3) وجود قابلية عالية لـ *B. thuringiensis* في تثبيط نمو كافة أنواع الفطريات الممرضة المختبرة.

الاختبار الحيوي للمبيدات الفطرية الكيميائية

يوضح جدول 4 تأثير المبيدات الفطرية بتركيز 100 مغ مادة فاعلة/لتر في الفطور الممرضة من خلال النسبة المئوية للتثبيط، حيث كان دايثين م–45 الأفضل في تأثيرها لتثبيطي لنمو جميع الفطور الممرضة (89.27%)، وكان الرايزولكس الأضعف تأثيراً (44.00%). وكان دايثين م–45 الأفضل في مكافحة الفطور المسببة موت بادرات اللوبياء قبل وبعد ظهورها فوق سطح التربة، وكذلك في تقليل شدة الإصابة بها (2.96%،3.51% و 0.14، على التوالي) (جدول5)، يليها المعاملة بالمستخلص الكحولي لأوراق الأزدرخت/السبحبح (4.44%، 5.18% و 0.15، على التوالي). وانعكست هذه النتائج على خصائص نمو النبات (جدول 6) إذ سجل أعلى طول بادرات وطول مجموع جذري ووزن جاف للنبات عند معاملة البذور بالمبيد دايثين م–45 إذ بلغ 29.7 سم، 5.01 سم و 0.53 غ، على التوالي ثم تلاها المعاملة بالمستخلص الكحولي. ولم تختلف جميع معاملات البذور معنوياً في تأثيرها على الوزن الجاف للنبات مقارنة بمعاملة البذور بالفطور الممرضة بمفردها.

جدول 3. تأثير عاملي المكافحة الأحيائية الفطري *T. viride* والبكتيري *B. thuringiensis* في تثبيط نمو الفطور الممرضة.

Table 3. Inhibition (%) caused by the fungal biocontrol agents *T. viride* and bacteria *B. thiringiensis* on mycelial growth of pathogenic fungi.

Biocontrol agent العامل الأحيائي		الفطر الممرض
B. thiringiensis* (%)*	***T. viride* ***	**Pathogenic fungi**
90.39 e	1	*F. heterospoum*
99.60 a	1	*F. solani*
95.68 cd	2	*M. phaseolina*
97.25 bc	2	*P. aphanidermatum*
96.47 cd	2	*R. solani 1*
94.90 d	2	*R. solani 2*
95.29 cd	2	*R. solani 3*
95.65	1.71	Mean المتوسط

* درجة التضاد عند الفطر *T. viride* تبعاً لسلم التقييس الخماسي الذي وضعه Bell وآخرون (6).

** القيم المتبوعة بحروف متشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن متعدد الحدود.

* Antagonistic degree of *T. viride* according to Bell *et al.* (6) scale.

** Values followed by the same letters are not significantly different based on Duncan's multiple range test at P=0.05

جدول 4. النسبة المئوية لتثبيط المبيدات الفطرية المختبرة (100 مغ/لتر) في الفطور المسببة لموت بادرات وتعفن جذور اللوبياء مختبرياً.

Table 4. *In vitro* inhibition rate of tested fungicides (100 mg/l) on growth of fungi causing cowpea damping-off and root rot.

Inhibition rate (%) نسبة التثبيط (%)					الفطر الممرض
المتوسطات Mean	**رايزولكس Rhizolex**	**يوبارين Euparin**	**ريدوميل Ridomil**	**دايثين م-45 Dithane M-45**	**Pathogenic fungus**
59.94 f	51.96 i	66.07 g	24.51 o	69.21 f	*F. heterosporum*
64.70 c	35.29 l	81.96 d	64.70 gh	76.86 e	*F. solani*
87.00 a	87.64 c	62.74 h	100.00 a	97.64 ab	*M. phaseolina*
51.49 f	1.56 p	32.74 m	71.37 f	100.00 a	*P. aphanidermatum*
64.60 c	46.47 j	63.92 gh	52.55 i	95.49 b	*R. solani 1*
77.88 b	45.68 j	65.68 g	100.00 a	100.00 a	*R. solani 2*
59.65 e	39.41 k	86.07 c	27.45 n	85.68 c	*R. solani 3*
	44.00 d	65.60 b	62.94 c	89.27 a	Mean المتوسط

* القيم المتبوعة بحروف متشابهة في نفس العامود تدل على عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن متعدد الحدود.

* Values followed by the same letters in the same column are not significantly different based on Duncan's multiple range test at P=0.05.

وتؤكد هذه الدراسة نتائج دراسات سابقة التي أظهرت كفاءة عالية للمبيدات الفطرية الكيميائية لاسيما المبيد دايثين م-45 في مكافحة الفطور المسببة لموت بادرات اللوبياء وتعفن جذورها وخفض نسبة الاصابة وشدتها، وكذلك تحسين مواصفات نمو النبات (5، 7، 24) غير أن معظم التوجهات الحديثة في مجال مكافحة الفطور الممرضة تعتمد على ايجاد وسائل بديلة للمكافحة الكيميائية ومنها المكافحة الاحيائية. وأشارت نتائج العديد من الأبحاث إلى أن *T. viride* أثبتت فاعلية عالية في مكافحة الفطور الممرضة وتحسين معايير النمو في النبات مثل الفريز/الفراولة (9) واللوبياء (4، 25) والجت/الفصة (15) والطماطم/البندورة (17) والفاصولياء (10). كما أكدت النتائج كفاءة مستخلصات أوراق النيم في مكافحة الفطور الممرضة وتحسين مواصفات نبات الحلبة (20) والفاصوليا (16) والطماطم/البندورة (26).

جدول 5. تأثير معاملات البذور في نسبة وشدة الإصابة بالفطور المسببة لموت بادرات اللوبياء

Table 5. Effect of seed treatment on infection rate and disease severity with pre- and post-emergence damping-off of cowpea seedlings.

Treatments المعاملات							
مبيد فطري Fungicide	**بكتريا مضادة Antagonistic bacteria**	**فطرمضاد Antagonistic fungus**	**مستخلص كحولي Alcoholic extract**	**مستخلص مائي Water extract**	**مسحوق الأوراق Leaves powder**	**فطر لوحده Fungus alone**	**الفطور الممرضة Pathogenic fungi**
Pre-emergence damping off (%) (%) موت البادرات قبل الظهور							
2.22 g	8.88 eg	4.44 fg	6.66 eg	8.88 eg	66.66 eg	11.11 eg	*F .heterosporum*
4.44 fg	17.77 de	11.11 eg	6.66 eg	13.33 df	15.55 df	17.77 de	*F. solani*
4.44 fg	11.11 eg	11.11 eg	6.66 eg	15.55 df	22.22 cd	51.11 a	*M. phaseolina*
4.44 fg	13.33 df	8.88 eg	6.66 eg	8.88 eg	11.11 eg	15.55 df	*P. aphanidermatum*
2.22 g	12.22 eg	6.66 eg	0.00 g	15.55 df	17.77 de	44.44 b	*R. solani 2*
0.00 g	00.00 g	0.00 g	0.00 g	00.00 g	00.00 g	00.00 g	تربة معقمة غير ملوثة Un-inoculated sterilized soil
2.96 e	18.88 a	7.03 cd	4.44 d	10.37 bc	12.22 b	20.00 a	Mean المتوسط
Post-emergence damping off (%) (%) موت البادرات بعد الظهور							
2.22 fg	6.66 dg	2.22 fg	0.00 g	4.44 eg	17.77 cd	33.33 ab	*F .heterosporum*
4.44 eg	8.88 dg	17.77 cd	4.44 eg	15.55 ce	22.22 bc	35.55 a	*F. solani*
8.88 dg	8.88 dg	4.44 eg	13.33 cf	6.66 dg	17.77 cd	22.22 bc	*M. phaseolina*
2.22 fg	6.66 dg	2.22 fg	6.66 dg	8.88 dg	11.11 cg	22.22 bc	*P. aphanidermatum*
5.55 eg	17.77 cd	6.88 d	6.66 dg	11.11 cg	17.77 cd	35.55 a	*R. solani 2*
0.00 g	00.00 g	00.00 g	0.00 g	00.00 g	00.00 g	00.00 g	تربة معقمة غير ملوثة Un-inoculated sterilized soil
3.51 e	8.14 cd	5.92 cd	5.18 d	7.77 cd	14.44 b	24.81 a	Mean المتوسط
Disease severity شدة الإصابة							
0.11 io	0.05 mo	0.06 mo	0.11 io	0.15 gm	0.10 ko	0.29 df	*F .heterosporum*
0.21 fk	0.08 lo	0.22 ei	0.25 ei	0.27 dg	0.02 o	0.37 cd	*F. solani*
0.14 hno	0.19 gl	0.33 de	0.27 eg	0.06 mo	0.22 ej	0.40 b	*M. phaseolina*
0.14 hn	0.16 gm	0.21 fk	0.09 ko	0.15 gm	0.13 hn	0.27 cd	*P. aphanidermatum*
0.27 eg	0.43 c	0.05 mo	0.16 gm	0.09 ko	0.21 fk	0.62 a	*R. solani 2*
0.00 o	0.00 o	0.00 o	0.00 o	0.00 o	0.00 o	0.00 o	تربة معقمة غير ملوثة Un-inoculated sterilized soil
0.14c	0.15 b	0.14 bc	0.15 bc	0.12 d	0.11 e	0.33 a	Mean المتوسط

* القيم المتبوعة بحروف متشابهة في نفس العامود تدل على عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن متعدد الحدود.

* Values followed by the same letters in the same column are not significantly different based on Duncan's multiple range test at P=0.05.

جدول 6. تأثير معاملات البذور في طول المجموع الخضري والجذري (سم) والوزن الجاف للنبات (غ).

Table 6. Effect of seed treatment with different control agents on shoot and root length (cm) and dry weight (g) of cowpea seedlings.

Treatments المعاملات							
مبيد Fungicide	بكتيريا مضادة Antagoni-stic bacteria	فطرمضاد Antagoni-stic fungus	مستخلص كحولي Alcoholic extract	مستخلص مائي Water extract	مسحوق الأوراق Leaves powder	فطر لوحده Fungus alone	الفطور الممرضة Pathogenic fungi
							Foliage height (cm) طول المجموع الخضري (سم)
29.6 ac	24.2 gm	24.7 fl	29.6 ac	27.7 bi	22.9 jm	20.2 mn	*F .heterosporum*
30.7 ac	29.6 ac	28.4 bh	29.3 af	28.5 bf	27.8 bi	22.8 jm	*F. solani*
27.2 dj	23.9 im	24.2 hm	30.2 ac	28.8 af	24.7 fl	23.2 jm	*M. phaseolina*
32.9 a	23.1 jm	31.8 ab	21.0 ac	25.8 dk	25.0 el	18.1 n	*P. aphanidermatum*
28.6 bf	21.4 ln	23.9 jm	24.8 fl	21.8 kn	18.1 n	14.2 o	*R. solani 2*
29.0 af	27.4 di	25.1 el	24.1 im	25.7 dk	27.4 bi	23.9 im	تربة معقمة غير ملوثة Un-inoculated sterilized soil
29.7a	24.9 cd	27.1 c	28.9 b	26.6 c	24.3 d	20.4 e	Mean المتوسط
							Root length (cm) طول المجموع الجذري (سم)
5.65 ad	9.82 af	4.20 bf	5.08 ae	4.07 bf	4.73 af	3.30 df	*F .heterosporum*
5.08 ae	3.98 bf	4.58 af	5.48 ae	3.81 cf	3.74 cf	2.86 f	*F. solani*
5.35 ae	3.61 cf	3.18 ef	4.23 bf	3.36 df	3.23 df	3.18 ef	*M. phaseolina*
5.48 ae	3.57 cf	5.25 ae	4.43 af	3.31 df	3.55 cf	2.62 f	*P. aphanidermatum*
5.48 ae	3.73 df	4.12 bf	6.35 ab	4.54 af	2.66 f	2.58 f	*R. solani 2*
4.54 af	4.57 af	4.44 af	6.73 a	5.84 ac	5.84 ac	5.42 ae	تربة معقمة غير ملوثة Un-inoculated sterilized soil
5.01 ab	4.05 cd	4.30 bc	5.38 a	4.15 cd	4.15 cd	2.91 e	Mean المتوسط
							Plant dry weight (g) الوزن الجاف (غ)
0.56 ae	0.61 ac	0.51 ag	0.64 ab	0.61ac	0.41 ag	0.33 cg	*F .heterosporum*
0.56 ae	0.49 ag	0.50 ag	0.43 ag	0.63 ab	0.60 ad	0.30 eg	*F. solani*
0.48 ag	0.49 ag	0.46 ag	0.58 ae	0.52 ag	0.49 ag	0.38 ag	*M. phaseolina*
0.49 ag	0.38 ag	0.56 ae	0.54 af	0.41 ag	0.54 af	0.36 dg	*P. aphanidermatum*
0.56 ae	0.35 bg	0.40 ag	0.50 ag	0.35 bg	0.40 ag	0.27 fg	*R. solani 2*
0.54 a	0.57 a	0.66 a	0.49 a	0.60 a	0.56 ae	0.42 ag	تربة معقمة غير ملوثة Un-inoculated sterilized soil
0.53 a	0.48 a	0.51 a	0.53 a	0.52 a	0.49 a	0.34 b	Mean المتوسط

* القيم المتبوعة بحروف متشابهة في نفس العامود تدل على عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن متعدد الحدود.

* Values followed by the same letters in the same column are not significantly different based on Duncan's multiple range test at P=0.05.

Abstract

Sulaiman, E.D. and N.H. Abdulhafedh. 2013. Effect of seed treatment with plant extracts, biological and chemical agents in controlling fungi causing cowpea damping–off and root rot. Arab Journal of Plant Protection, 31(2): 138-145.

This study was conducted at the College of Education, University of Mosul, Iraq, to evaluate the effectiveness of controlling root rot and damping-off disease of cowpeas caused by *Fusarium heterosporum, Macrophomina phaseolina*, *F. solani, Pythium aphanidermatum,* and *Rhizoctonia solani* by different methods. Seeds were treated with aqueous and alcoholic extracts of neem (*Melia azedarach), as well as* biocontrol fungus *Trichoderma viride* and the bacterium *Bacillus thuringiensis* and with fungicide Dithane M-45. Results indicated the superiority of Dithane M-45 over all biological treatments in decreasing infection rate of pre-emergence and post-emergence damping off and disease severity (2.96%, 3.51 % and 0.14, respectively) followed by alcoholic extract of neem leaves (4.44%, 5.18 % and 0.15 %, respectively) which did not differ from the fungal bio-control agent *T. viride* in addition to increased seedling shoot and root length and dry weight.

Keywords: Plant extracts, bio-control, seed treatment, damping-off, root rot, cowpea.

Corresponding author: ***E.D. Sulaiman, Department of Biology, College of Education, University of Mosul, Iraq, Email: Is_alr@yahoo.com***

المراجع

1. **الحمداني، نور عبد الحافظ.** 2009. تقييم فاعلية بعض المستخلصات النباتية وطرق مقاومة حيوية وكيميائية أخرى لمقاومة الفطريات المسببة لموت بادرات وتعفن جذور اللوبياء *Vigna unguiculata* (L.).
2. **النعمان، أديبة يونس شريف حمو.** 1998. التأثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وأيض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.
3. **حسن، محمد صادق.** 2001. دراسات عن مرض تعفن جذور وساق اللوبيا المسبب عن الفطر *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid، مجلة العلوم الزراعية العراقية، 32:151-154.

References

4. **Adandonon, A., T.A.S. Aveling and M. Tamo.** 2004. Occurrence and distribution of cowpea damping-off and stem rot and associated fungi in Benin. Journal of Agricultural Science, 142: 1-6.
5. **Ahmed, K.G.M., S.I.A. El-Said, R.N. Fawzy, A.E. Badr and M.A. Abd-Allah.** 1994. Pathological study on sunflower plant, chemical and biological control and seed oil content. Annals of Agricultural Science Moshtoh, 3:1529-1543.
6. **Bell, D.K., H.D. Wells and C.R. Markham.** 1982. The in vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant Pathogens. Phytopathology, 72: 379-382.
7. **Dash, S.K. and A. Narain**. 1996. Efficacy of selected fungicides on seed borne fungi and on percentages of germination of diseased seeds of crops. Crop Research-Hisar Journal,11:207-211.
8. **Dixit, S.N., S.C. Tripathy and R.R. Padhyey.** 1974. The antifungal substances of role flower (*Rose indice*). Economic Botany, 30: 371-374.
9. **Elad, Y., I. Chet, P. Boyle and Y. Henis.** 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia rolfsii* scanning electron microscope and fluorescence microscopy. Phytopatoholgy, 73: 85-88.
10. **El-Kafrawy, A.A.** 2002. Biological control of bean damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. Egyptian Journal of Agricultural Research, 80: 57-70.
11. **El-Shaer, A.H.I.** 1998. Integrated control of root rot disease of some legumes. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt.
12. **El-Shaer, A.H.I.** 2002. Advanced studies on root infecting fungi of lentil and their control. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, Cairo University. 208 pp.
13. **Grand, A., P.A. Wondergem, R. Verpoorte and J.L. Pousset.** 1988. Anti-infections phytotherapies of the tree-savannah of Senegal (West-Africa) II. Antimicrobial activity of 33 species. Journal of Ethnopharmacol, 22: 25-31.
14. **Harborne, J.B.** 1973. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, Chapman and Hall, New York, NY, USA.
15. **Hassanein, A.M., E. El-Barougy, A.M. Elgarhy, P. Parikka and T.A. El-Sharkawy.** 2000. Biological control of damping–off, root-rot/wilt diseases of alfalfa in Egypt. Egyptian Journal of Agricultural Research, 78: 63-71
16. **Lakshmanan, P., S. Mohan and R. Jeyarajan**. 1990. Antifungal properties of some plant extracts against *Thanatephorns cucumeris*, the causal agent of color rot disease of *Phaseolus aureum*. Madras Agricultural Journal, 77: 1-4
17. **Mary Charlotte O. Fresco.** 2001. Dump that damping-off disease. Official Quarterly Publication of the Bureau of Agricultural Research, April-June 2001 (Vol. 3, No. 2).
18. **Mckinney, H.H.** 1923. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum.* Journal of Agricultural Research, 26: 195-218.
19. **Mohamed, E.A.E.** 2001. Feasibility of using some plant extracts for biological control of some plant pathogenic fungi. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Mansora University, Egypt. 172 pp.
20. **Ranjan, K.S., P. Gajendra, A.K. Sinha and G. Prasad.** 1991. Evaluation of some bitter plant extracts against aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus*. National Academy Science Letters. 14:241-243.
21. **Rios, J.L., M.C. Recio and A. Villar**. 1987. Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. Journal of Ethnopharmacol, 21:139-152.
22. **Sharif, T.S., S. Khalid and S. Ahmed.** 2003. Effect of *Rhizobium* sp. on growth of paothogenic fungi under in vitro conditions. Pakistan Journal of Biological Science, 6: 1597-159.
23. **Singh, R.K. and R.S. Dwivedi.** 1987. Fungitoxicity of different plant species against *sclerotium rolfsii* Sacc. a foot-rot pathogen of barley. National Academy science Letters-India 10: 89-91.
24. **Sundarvelu, S., T. Muthukrishnana and S. Arumugam.** 1988. Effect of fungicides on the growth, chlorophyll content and yield of Okra. Advances in Plant Science, 11:33-36.
25. **Ushamalini, C., K. Rajappan and Kousalya–Gangedheran.** 1997. Management of charcoal rot of cowpea using biocontrol agents and plant products. Indian Phytopathology, 50: 504-507.
26. **Walia, K.K., N. Mehta D.C. and Gupta.** 1994. Effect of green manuring on *Rhizoctonia* and root-knot nematode complex on tomato. Newatologia Mediterranea, 22: 131-132.

تاريخ الاستلام: 2011/3/21؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2012/4/2

Received: March 21, 2011; Accepted: April 2, 2012