تأثير المستخلصات النباتية المائية والكحولية الخام لأوراق اليوكاليبتوس والآس وعوامل المكافحة الأحيائية في نمو الفطور 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 المستخلصات النباتية المائية والكحولية الخام لأوراق اليوكاليبتوس والآس وعوامل المكافحة الأحيائية في نمو الفطور المسببة لموت بادرات وتعفن جذور اللوبياء. مجلة وقاية النبات العربية، 31(1): 57-63.

هدفت هذه الدراسة إلى عزل وتحديد هوية الفطور المسببة لمرض موت بادرات وتعفن جذور اللوبياء في مدينة الموصل/العراق خلال عامي 2007-2009 والتي تبين أنها تتسبب عن الفطور *Fusarium heterosporum* Nees ex Fries، *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.، *F.solani* Mart. و *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitz. وثلاث عزلات من الفطر *Rhizoctonia solani* Kuhn. كما هدفت إلى إختبار كفاءة كلا النوعين من المستخلصات المائية والكحولية في تثبيط نمو الفطور قيد الدراسة. أظهرت النتائج تفوق المستخلص الكحولي لأوراق اليوكاليبتوس على الآس في خفض معدل النمو إذ بلغ 39.28% مقارنة مع الآس 32.30%. كما حقق عاملا المكافحة الأحيائية البكتيريين *Bacillus mycodes* و *B. cereus* تثبيطاً مقداره 76.30% و 61.30%، على التوالي، وأظهر عامل المكافحة الأحيائي الفطري كبحاً لنمو الفطور الممرضة.

كلمات مفتاحية: مستخلصات نباتية، عوامل أحيائية، موت البادرات، تعفن الجذور، فطور.

المقدمة

تتعرض نباتات اللوبياء (*Vigna unguiculata* L. Walp) في أنحاء العالم للإصابة بالعديد من الأمراض الفطرية وهي المسؤولة عن موت البادرات قبل ظهورها فوق سطح التربة (تعفن البذور) أو بعد ظهورها (موت البادرات) وتعفن الجذور والذبول مؤدية إلى خسائر كبيرة. وعلى الرغم من أن المكافحة الكيميائية تعد وسيلة سريعة وفعالة في مكافحة المرض إلا أنه لا يمكن اعتمادها استراتيجية للمكافحة بسبب العديد من المساوئ والآثار الضارة للمبيدات الكيميائية على الإنتاج الزراعي بالإضافة إلى أن المقاومة للمبيدات الجديدة مستمرة بسبب تطور بعض المسببات المرضية، فأصبحت الرغبة ملحة الآن لتقليل استخدام المبيدات في الزراعة والبحث عن بدائل فعالة لمكافحة المسببات المرضية التي تنتقل عن طريق التربة. ولذلك فقد توجه الإهتمام للبحث عن عوامل المكافحة الأحيائية والمواد المضادة للممرضات المنتجة طبيعياً من النباتات الراقية وبصورة خاصة تلك التي تمتلك مخزوناً وفيراً من المواد الفعالة المضادة للميكروبات كاليوكاليبتوس والآس كبدائل طبيعية كفوءة وذات مركبات أمينة للإنسان والبيئة (7، 11، 26، 39)، إلى جانب استخدام الأعداء الحيوية كأنواع الفطر *Trichoderma* وبكتيريا الـ *Bacillus* التي أثبتت فاعلية في تحديد نمو العديد من المسببات المرضية (16، 31، 33، 40، 41)، ولذلك فقد هدفت هذه الدراسة إلى اختبار تأثير المستخلصات المائية والكحولية لأوراق نباتي اليوكاليبتوس والآس فضلاً عن الفطر والبكتيريا كعوامل أحيائية في مقاومة تلك الفطور المسببة لموت بادرات وتعفن جذور اللوبياء.

مواد البحث وطرائقه

عزل الفطور الممرضة من الأجزاء النباتية المصابة

وضعت العينات المصابة والميتة في دورق زجاجي وتركت تحت ماء جار لمدة ساعتين لإزالة الأتربة العالقة بها، وقطعت المناطق المصابة وهي الجذور وتيجان النباتات إلى قطع صغيرة بأبعاد لا تتجاوز 0.5 سم، ثم وضعت في قطعة من الموسلين في كأس زجاجي وطهرت سطحياً بغمرها في محلول 1% هايبوكلوريت الصوديوم مدة دقيقتين، ثم غسلت القطع المصابة بعد ذلك بماء مقطر معقم مدة دقيقتين أيضاً، وجففت بين ورقتي ترشيح، ونقلت بوساطة ملقط معقم إلى أطباق بتري معقمه قطرها 9 سم حاوي على الوسط المغذي البطاطا/البطاطس والسكروز والأجار (Potato Sucrose Agar (PSA) مضافاً إليه المضاد الحيوي كلورامفينيكول Chloramphenicol بمعدل 10 مغ/لتر لمنع نمو البكتريا. وتم زراعة خمس قطع لكل طبق، ثم حضنت الأطباق عند 27±1°س (3-6 أيام) تبعاً لسرعة نمو الفطورر، وبعد ذلك فحصت النموات الفطرية النامية حول القطع المصابة. وأجريت

عملية تنقيتها على الآجار المائل (Slant) ثم حددت هويتها باستخدام المفاتيح التصنيفية المناسبة لها (8) وتم اثبات قدرتها الإمراضية على الصنف القابل للإصابة جينكس.

المستخلصات المائية

تم تحضير المستخلصات المائية لأوراق نبات اليوكاليبتوس *Eucalyptus microtheca* والآس *Myrtus communis* باتباع طريقة Rios وآخرون (34)، حيث اذيب غرام واحد من المستخلص النباتي الخام المجفف في5 مل من الماء المقطر للحصول على مستخلص تركيزه 200 مغ/مل كتركيز قياسي الذي اعتبر مصدراً لتحضير التخفيفات المستخدمة في هذه الدراسة (4). عقمت المستخلصات المائية الخام باستخدام جهاز الـ Millipore الحاوي على مرشح غشائي Membrane filters (0.45 ميكروميتر) وتم اختبار تأثيرها في نمو مستعمرات الفطور الممرضة. اضيفت أحجام محددة من كل مستخلص معقم إلى أحجام محدودة من الوسط المغذي (PSA) المعقم عند 45°س في دوارق زجاجية سعة 250 مل، وتم الحصول على التراكيز0، 5، 10، 15، 20، 25، 30مغ/مل من الوسط المغذي (PSA) وذلك للحصول على التركيز التثبيطي الأدنى Minimum Inhibitory Concentration (MIC) في أطباق بتري معقمة بقطر9 سم بثلاثة مكررات. وبعد تصلب المستنبت أخذ قرص من حافة مستعمرة فطرية بعمر 3-6 أيام بوساطة ثاقبة الفلين (Cork borer) بقطر 5 مم ووضع في مركز الطبق، ثم حضنت الأطباق عند 27±1°س وأخذت النتائج بحساب متوسط قياس قطرين متعامدين لكل مستعمرة فطرية.

المستخلصات الكحولية

حضرت المستخلصات الكحولية لأوراق النباتات المستخدمة باتباع طريق Grand وآخرون (19). مزج 20 غ من مسحوق النبات في 200 مل من الكحول الإيثيلي (95%) أي بنسبة 10:1 (وزن:حجم) ثم إكمال الهرس باستخدام خلاط كهربائي داخل حمام ثلجي كما تم تحريك المزيج بوساطة محرك مغناطيسي لمدة 60 دقيقة وذلك لتفجير جدران الخلايا النباتية ثم ترك المزيج بعد ذلك في الثلاجة عند 4°س لمدة 24 ساعة. رشح المزيج خلال عدة طبقات من الشاش للتخلص من الألياف والأجزاء النباتية غير المسحوقة باستخدام قمع بخنر وأوراق ترشيح (Whatman No.1) تحت التفريغ وذلك باستخدام مضخة التفريغ. وضعت الرشاحة في جهاز طرد مركزي مبرد عند 4°س مدة 15 دقيقة وبمعدل 6000 دورة/دقيقة ووضع المستخلص الكحولي الخام في جهاز المبخر الدوار تحت التفريغ عند 40°س ثم اكمل التجفيف بجهاز المجفد Lyophilizer وحفظت العينات تحت التجميد لحين الإستعمال.

تم اختبار تأثير المستخلصات الكحولية لأوراق النباتات على الفطور *Fusarium heterosporum*، *Macrophomina phaseolina*، *F. solani*، *Pythium aphanidermatum* و *Rhizoctonia solani* Kuhn الممرضة المدروسة وذلك بإضافة أحجام محدودة من كل مستخلص إلى أحجام محدودة من الوسط الغذائي (PSA) قبل تصلبه، بإذابة غرام واحد من المستخلص النباتي في 5 مل من مادة Diethyl ether للحصول على تركيز 200 مغ/مل كتركيز قياسي لتحضير التراكيز المطلوبة (0، 1، 2، 4، 6 و 8 مغ/مل)، ثم عقم المستخلص باستخدام حمام مائي عند 62°س لمدة 10 دقائق (4). نفذت الدراسة في أطباق بتري بقطر 9سم وبواقع ثلاثة مكررات (قطر/تركيز/مستخلص). وبعد تصلب الوسط، أخذ قرص من حافة المستعمرة الفطرية، وزرعت في مركز الطبق ثم حضنت الأطباق عند 27±1°س وأخذت النتائج بعدها بحساب متوسط قياس قطرين متعامدين، وتم حساب نسب تثبيط نمو مستعمرات الفطور الممرضة وفق المعادلة التالية:

نسبة التثبيط %= (متوسط قطر الشاهد – متوسط قطر المعاملة/متوسط قطر الشاهد)× 100

الفطر المضاد

اختبرت المقدرة التضادية لعامل المكافحة الأحيائية الفطري *Trichoderma harzianum* عن طريق الزراعة المزدوجة للفطور المضادة مختبرياً ضد الفطور الممرضة المختبرة في هذه الدراسة باتباع طريقة Bell وآخرون (9)، في أطباق بتري معقمة، قسم كل طبق بوساطة قلم شمعي إلى نصفين، ثم وضع قرص من نمو الفطر بقطر 5مم لعامل المكافحة الأحيائي في النصف الأول للطبق مع قرص مماثل له مأخوذ من حافة مستعمرة فطرية نامية. تركت الفطور الممرضة في النصف الثاني من الطبق بصورة مقلوبة حتى يلامس الغزل الفطري سطح الوسط المغذي. أما أطباق الشاهد فقد لقح نصفي الطبق بالفطور الممرضة فقط وحضنت 3-6 أيام عند 27±1°س، قومت درجة التضاد باستخدام سلم من 1 إلى 5 كما يلي:1=الفطر المقاوم يغطي كامل الطبق، 2=الفطر المقاوم يغطي ثلثي الطبق، 3=الفطر المقاوم والممرض يغطي كل منهما نصف الطبق، 4= الفطر الممرض يغطي ثلثي الطبق، 5= الفطر الممرض يغطي كامل الطبق. يعد المقاوم الحيوي ذو قدرة تضادية عالية عند مستوى 1-2.

البكتيريا المضادة

عزلت البكتريا باتباع طريقة التخفيف Dilution Plate Method (21) وتم تنقيتها على مستنبت الآجار المغذي. اختبرت القدرة التضادية للبكتريا المضادة *B. cereus* و *B. mycodes* باتباع طريقة

Sharif وآخرون (37). لقح وسط الأجار المغذي المائل بالبكتيريا وحضنت عند 37±1°س لمدة 24 ساعة. حضر معلق البكتيريا باستعمال المحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline إذ نشر 0.1 مل منه في أطباق بتري تحتوي على الوسط الغذائي (PSA) وحضنت عند 37±1°س مدة 24 ساعة. لقحت الأطباق في مركزها بقرص من الفطور الممرضة بمعدل 3 مكررات لكل فطر ثم حضنت عند 27±1°س وتركت أطباق أخرى للفطور الممرضة بدون إضافة المضاد الحيوي البكتيري كشاهد. أخذت النتائج بعد سبعة أيام بحساب النسبة المئوية للتثبيط بعد أخذ متوسطات مستعمرات الفطر ومقارنتها بالأطباق غير الحاوية على المضاد البكتري.

التحليل الاحصائي

تم تحليل البيانات باستخدام التصميم العشوائي الكامل. وتمت المقارنة بين المتوسطات باختبار دنكن المتعدد المدى حيث ميزت المتوسطات المختلفة فيما بينها معنوياً. عند مستوى احتمال 0.05 (3).

النتائج والمناقشة

العزل

تم عزل الفطور الممرضة التالية: *Fusarium solani*، *F. heterosporum*، *Macrophomina phaseolina*، *Rhizoctonia solani* و *Pythium aphanidermatum* وشخصت لمرتبة الجنس باستخدام مفتاح تصنيفي (8) وذلك بحسب الصفات المورفولوجية. وتم استكمال تحديد هوية الأنواع بحسب المفاتيح التصنيفية المعدة لكل منها (1، 10، 22، 30، 32).

تأثير المستخلصات النباتية في تثبيط نمو الفطور الممرضة مختبرياً

أظهرت تراكيز مختلفة من المستخلصات المائية (5، 10، 15، 20، 25، 30 مغ/مل) ومن المستخلصات الكحولية (1، 2، 4، 6، 8 مغ/مل) الخام للأوراق في وسط أجار البطاطا والسكروز (PSA) تثبيطاً معنويا بنسب متباينة في نمو مستعمرات جميع الفطور الممرضة المدروسة، وازدادت نسبة التثبيط طرداً مع تركيز المستخلص النباتي. وأشارت النتائج (جدول 1) إلى وجود تثبيط معنوي للتراكيز المختلفة و بلغت أعلى نسبة تثبيط للعزلتين 2 و 3 من *R. solani* 83.52 و 80.0%، على التوالي، ثم *P. aphanidermatum* (78.82%). أما أقل نسبة تثبيط فكانت عند الفطر *M. phaseolina* إذ بلغت 68.23%. كما أوضحت النتائج حدوث تثبيط معنوي لمستخلص الآس في جميع الفطور الممرضة وأعطى التركيز العالي (30 مغ/سم^3) أعلى نسبة تثبيط لنموها الذي لم يختلف عند جميع الفطورالممرضة ماعدا *R. solani 1* (71.76%). وكان تأثير المستخلص المائي لأوراق الآس تأثيراً ضعيفاً في تثبيط نمو الفطر *P. aphanidermatum* إذ بلغ (29.41%) عند أعلى تركيز مستخدم (30 مغ/مل) مقارنة مع باقي الفطورالتي تراوح تثبيطها مابين 71.76% و80.0%.

جدول 1. النسبة المئوية لتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي الخام لأوراق اليوكالبتس والآس في نمو الفطور الممرضة مختبرياً (مغ/مل).
Table 2. Inhibition rate (%) of different concentrations (mg/ml) of crude aqueous leaf extracts of *Eucalyptus mirotheca and Myrtus communis* on the growth of pathogenic fungi in vitro.

Concentration (mg/ml) التركيز (مغ/مل)							الفطورفطور الممرضة	المستخلص النباتي
30	25	20	15	10	5	0.0	Pathogenic fungi	Plant extract
76.47 c	56.47 gh	42.35 k	30.58 op	21.17 rs	08.20 vw	00.00 y	*F. heterosporum*	اليوكاليبتوس
72.44 d	54.11 hi	38.80 l	29.41 p	15.20 u	03.50 xy	00.00 y	*F. solani*	*Eucalyptus mirotheca*
68.23 e	55.29 gh	42.35 k	25.88 q	16.47 u	07.05 vw	00.00 y	*M. phaseolina*	
78.82 bc	64.70 f	50.58 j	32.94 no	23.52 qr	07.23 vw	00.00 y	*P. aphanidermatum*	
71.76 bc	57.64 g	43.52 k	30.58 op	17.64 tu	04.70 wx	00.00 y	*R. solami 1*	
83.52 a	73.17 d	51.76 ij	37.64 ml	21.17 rs	09.40 v	00.00 y	*R. solani 2*	
80.00 b	62.35 f	44.52 k	32.29 mn	20.00 st	07.05 vw	00.00 y	*R. solani 3*	
75.97 a	60.53 b	44.84 c	31.76 d	19.31 e	06.31 f	00.00 g	Mean المتوسطات	
78.80 ab	62.35 ed	44.70 hj	26.00 lmn	11.70 qt	03.50 tu	00.00 u	*F. heterosporum*	الآس
80.00 a	65.88 cd	65.88 cd	32.94 ef	18.80 nq	05.80 stu	00.00 u	*F. solani*	*Myrtus communis*
78.80 ab	72.94 ac	55.20 eg	29.41 ml	16.47 qr	07.23 stu	00.00 u	*M. phaseolina*	
29.41 ml	20.00 np	14.11 ps	10.50 rst	05.80 su	00.00 u	00.00 u	*P. aphanidermatum*	
71.76 bc	62.28 fd	51.76 fh	33.29 kl	18.82 nq	04.70 tu	00.00 u	*R. solami 1*	
76.47 ab	49.41 gh	37.64 jk	23.52 mno	07.23 su	00.00 u	00.00 u	*R. solani 2*	
77.64 ab	49.23 gh	37.64 jk	30.00 nop	07.23 su	00.00 u	00.00 u	*R. solani 3*	
70.41 a	54.57 b	42.65 c	25.09 d	12.29 e	03.03 f	00.00 g	Mean المتوسطات	

الحروف المتشابهة في نفس العامود تدل على عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات عند مستوى احتمال 0.05 بحسب اختباردنكن متعدد الحدود.
Numbers followed by the same letters in the same column are not significantly different at P= 0.05.

المستخلصات الكحولية

بينت النتائج (جدول 2) حدوث زيادة طردية في تثبيط نمو الفطورالممرضة تبعاً لتركيز المستخلصات الكحولية الخام لأوراق اليوكاليبتوس والآس إذ أدى استخدام التركيز 8 مغ/مل من اليوكاليبتوس إلى منع نمو العزلتين 1 و 2 من الفطر *R. solani* بصورة كاملة 100%. كما أوضحت النتائج حدوث أعلى نسبة عند التركيز 8 مغ/مل من مستخلص الآس للعزلات الثلاثة من *R. solani* التي تشابهت معنوياً عند تركيز 6 ملغ/مل. وكان أقل تثبيط هو عند تركيز 1 ملغ/مل إذ بلغ 9.75% ولكنه ازداد عند التركيز 8 مغ/مل (71.21%). كما لوحظ أقل تثبيط لمتوسط النمو عند الفطر *M. phaseolina* يليه *F. solani*. أظهرت المستخلصات الكحولية لكل من اليوكاليبتوس والآس تفوقاً معنوياً في تثبيط نمو الفطورالممرضة مقارنة بالمستخلصات المائية وربما يعزى ذلك إلى كون الكحول الايثانولي مذيب قطبي له القدرة على فصل المركبات القطبية عموماً مثل الفينولات المختلفة ومن ضمنها الفلافيويدات والانثوسينادين واللكنين ومركبات أخرى (20).

ويؤيد هذه النتائج العديد من الدراسات التي أكدت كفاءة المستخلصات المائية والكحولية لليوكاليبتوس والآس في تثبيط نمو الفطورالممرضة وتثبيط انبات أبواغها وانتاجها للأجسام الحجرية والسموم الفطرية (2، 6، 17، 18، 24، 25، 29). وربما تعزى الفعالية التضادية للمكروبات عند أوراق اليوكاليبتوس إلى احتوائها على الفينولات والتانينات والفلافونويدات والتربينات والزيوت الطيارة (5، 7، 26، 39)، وكذلك في أوراق الآس لاحتوائها على تانيناتوقلويدات وزيوت طيارة (11، 35).

اختبار القدرة التضادية لعامل المكافحة الأحيائي الفطري *T. harzianum*

أظهرت النتائج تباين القدرة التضادية لعامل المكافحة الأحيائي *T. harzianum* ضد أنواع الفطور الممرضة (جدول 3) إذ أعطى أعلى درجة تضاد بلغت مستوى 1 مع الفطر *F. heterosporum* وأقلها كان عند مستوى 3 ازاء *P. aphanidermatum*. أما مع باقي الفطورفقد أعطى تضاداً عالياًعند مستوى 2 وذلك حسب سلم القياس الخماسي الذي أعده Bell وآخرون (9). ولوحظ أن هناك تلامساً مباشراً بين مستعمرة المضاد الحيوي ومستعمرات الفطور الممرضة وتلاه نمو مستعمرة المضاد الحيوي فوق سطح مستعمرات الفطور الممرضة والتفاف بعض خيوطه حول مايسيليوم الفطور الممرضة، كما لم يلاحظ في جميع الحالات ظهور مناطق فاصلة بين النموات الفطرية لمستعمرة المضاد الحيوي والنموات الفطرية لمستعمرات الفطور الممرضة مما قد يشير إلى أن هناك نشاطاً تطفلياً لـ *T. harzianum* على الفطور الممرضة. وتدعم هذه النتائج ما ذكره بعض الباحثين بأن الفطر *T. harzianum* يهاجم الفطر الممرض *R. solani* بصورة مباشرة وذلك بتكوين عقد هايفية (hyphal coils) وخطاطيف (hooks) وأعضاء التصاق (appressoria) (15).

جدول 2. النسبة المئوية لتأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي الخام لأوراق اليوكالبتس والآس في نمو الفطورالممرضة مختبرياً (مغ/مل).
Table 2. Inhibition rate (%) of different concentrations (mg/ml) of crude alcoholic leaf extracts of *Eucalyptus mirotheca* and *Myrtus communis* on the growth of pathogenic fungi in vitro.

المستخلص النباتي	الفطورفطور الممرضة	التركيز (مغ/مل) Concentration (mg/ml)					
Plant extract	**Pathogenic fungi**	**0.0**	**1**	**2**	**4**	**6**	**8**
اليوكاليبتوس	*F. heterosporum*	0.0 t	11.76 r	18.82 pq	43.52 j	62.35 f	74.11 d
Eucalyptus mirotheca	*F. solani*	0.0 t	09.40 rs	23.52 no	41.17 h	51.76 hi	67.05 e
	M. phaseolina	0.0 t	18.82 pq	28.23 km	51.76 hi	58.82 g	92.94 b
	P. aphanidermatum	0.0 t	17.60 q	25.88 mn	50.05 i	58.82 g	69.41 e
	R. solami 1	0.0 t	08.23 s	27.05 lm	43.52 j	72.94 d	100.00 a
	R. solani 2	0.0 t	16.40 q	30.58 k	54.11 h	74.11 d	100.00 a
	R. solani 3	0.0 t	21.71 op	29.41 kl	52.94 h	94.11 e	77.74 c
	المتوسطات Mean	0.0 f	14.45 e	26.21 d	48.15 c	63.86 b	83.02 a
الآس	*F. heterosporum*	0.0 t	16.47 p	20.00 no	37.64 jk	64.70 e	67.88 d
Myrtus communis	*F. solani*	0.0 t	05.88 s	10.50 qr	27.05 m	48.23 g	59.41 f
	M. phaseolina	0.0 t	08.23 rs	16.40 p	25.88 m	31.76 l	40.23 il
	P. aphanidermatum	0.0 t	70.50 s	17.60 op	35.20 k	48.23 g	64.90 e
	R. solami 1	0.0 t	10.50 qr	24.70 m	44.70 h	72.94 c	90.08 a
	R. solani 2	0.0 t	08.23 rs	21.17 n	41.17 i	72.94 c	89.29 b
	R. solani 3	0.0 t	12.94 q	18.80 nop	37.64 jk	75.29 c	86.70 b
	المتوسطات Mean	0.0 f	09.75 e	18.20 d	35.61 c	59.16 b	71.21 a

الحروف المتشابهة في نفس العامود تدل على عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن متعدد الحدود.
Numbers followed by the same letters in the same column are not significantly different at P= 0.05

وتعود القدرة التضادية لهذا الفطر إلى إفراز المضادات الحيوية Trichodermin، Trichodermol و Gliotoxin، كما أنها تعمل على اختزال نمو العديد من الفطور الممرضة *R. solani*، *S. rolfsii* و*F. oxysporum* كما تثبط إنبات الأبواغ وتفرز أنزيمات حالة للكايتين (Chitinase) والبروتين (Alkaline protease) (12، 13، 14، 36، 40).

القدرة التضادية لنوعي البكتيريا المضادة *B.cereus* و *B.mycodes*

تشير النتائج (جدول 3) إلى مقدرة هذه البكتريا على تثبيط نمو كافة أنواع الفطور قيد الدراسة إذ أحدثت *B. mycodes* أعلى تثبيط لعزلات الفطر *R. solani* بلغ 99.21، 99.41 و 100.0%، على التوالي. وكان أقل نسبة تثبيط عند الفطر *F. heterosporum* مع البكتريا *B. cereus* (39.80%). وظهرت البكتريا *B. mycodes* أكثر تأثيراً في النمو (76.30%) مقارنة مع *B. cereus* (61.56%).

وتؤكد العديد من الدراسات نتائج الدراسة الحالية في كفاءة أنواع البكتريا المضادة العائدة لجنس *Bacillus* على كبح نمو الفطور الممرضة، من خلال وجود آلية لتثبيط نمو الفطور الممرضة، ويعزى ذلك لقدرتها على إفراز مواد أيضية في الوسط الغذائي، مثل المضادات الحيوية Bacillomycin، Iturin A، Zwittermicin A و Mycosubtilin (23، 26، 27، 28، 38).

جدول 3. تأثير عوامل المكافحة الأحيائية الفطرية والبكتيرية في تثبيط نمو الغزل الفطري للفطور الممرضة.

Table 3. Effect of fungal and bacterial biocontrol agents on inhibition of mycelial growth of the fungal pathogens.

مستوى المكافحة الاحيائي الفطري (1-5) Fungal biocontrol level induced by *T. harzianu*	مستوى المكافحة الأحيائي البكتيري (%) Bacterial biocontrol agent				الفطور الممرضة Fungal pathogens
	المتوسطات Mean	*B. mycodes*	*B. cereus*	الشاهد control	
1	42.99 f	41.76 h	39.80 h	00.00 i	*F. heterosporum*
2	51.66 e	53.52 g	53.52 g	00.00 i	*F. solani*
2	54.11 d	53.52 i	60.39 f	00.00 i	*M. phaseolina*
3	63.72 b	79.80 cd	77.84 d	00.00 i	*P. aphanidermatum*
2	67.54 a	99.21 ab	74.90 e	00.00 i	*R. solami 1*
2	68.67 a	99.41 a	80.39 c	00.00 i	*R. solani 2*
2	59.85 c	100.00 a	44.11 k	00.00 i	*R. solani 3*
2		76.30 a	61.56 b	00.00 i	Mean المتوسطات

الحروف المتشابهة في نفس العامود تدل على عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن متعدد الحدود

Numbers followed by the same letters in the same column are not significantly different at P=0.05

Abstract

Sleiman, E.D. and N. Abd El-Hafez. 2013. Effect of crude aqueous and alcoholic plant extracts of *Eucalyptus mirotheca* and *Myrtus communis* as biocontrol agents on the *in vitro* growth of cowpea damping off and root rot pathogens. Arab Journal of Plant Protection, 31(1): 57-63.

This study aimed to isolate and identify the causing organisms of damping-off and root rot diseases of cowpeas in the Mosul area, Iraq during the years 2007-2009. *Fusarium heterosporum* Nees ex Fries, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Mart., *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitz. and three isolates of *Rhizoctonia solani* Kuhn were isolated and identified. *In-vitro* studies on the efficacy of crude aqueous and alcoholic plant extracts of *Eucalyptus microtheca* and *Myrtus communis* leaves on the mycelial growth of pathogenic fungi tested indicated that alcoholic extracts showed more inhibition to the fungal growth than aqueous extracts by 34.10% and 29.70%, respectively. *Eucalyptus microtheca* alcoholic extract gave higher inhibition effect by 39.28% as compared with *Myrtus communis* (32.30%). Both biocontrol bacterial agents *Bacillus mycodes* and *B. cereus* inhibited mycelial growth of pathogenic fungi by 76.30% and 61.30%, respectively. Inhibition of fungal growth by the fungal biocontrol agent *Trichoderma harzianum* was high.

Keywords: Plant extracts, Biocontrol, damping-off, Root rot, Cowpea.

Corresponding author: Esam Dawood Sleiman, Faculty of Education, Biology Department, University of Mosul, Iraq, Email: Is_alr@yahoo.com

المراجع

References

1. **العاني، ناهدة مهدي صالح.** 1988. دراسات مورفولوجية وفسيولوجية عن الفطر *Macrophomina phaseolina* المسبب لمرض التعفن الفحمي. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق.

2. **الآسعدي، جنان غازي.** 1988. دراسة التأثيرات الحيوية لبعض مكونات نبات الآس *Myrtus communis* (Myrtacea). رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

3. **الراوي، خاشع محمود وعبد العزيز محمد خلف الله.** 1980. تصميم وتحليل التجارب القليلة.مطبعة دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.
4. **النعمان، اديبة يوس شريف.** 1998. التاثير الجزيئي لبعض الستخلصات النباتية على نمو وايض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام. اطروحة دكتوراة، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.
5. **قطب، فوزي طه**. 1981.النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها. دار المريخ للنشر، الرياض، المملكة العربية السعودية.
6. **Ansari, A.A. and A.K. Shrivastava.** 1991.The effect of *Eucalyptus* oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. Letters in Applied Microbiology, 13: 75-77.
7. **Abo-Zeid, A.M., A.D. Altahi and R.I. Abd El-Fattah.** 2008. Fungal control of pathogenic fungi isolated from some wild plants in Taif governorate, Saudi Arabia. Malaysian Journal of Microbiology, 4:30-39.
8. **Barnett, H.C. and B.B. Hunter.** 2006. Illustarted Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company. Minnesota, 241 pp.
9. **Bell, D.K., H.D. Wellsand C.R. Markham.** 1982. The *in vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant Pathogens. Phytopathology, 72: 379-382.
10. **Booth, C.** 1978. *Fusarium heterosporum*. Description of Fungi and Bacteria http://www.cababstractsplus.org/dfb/reviews.
11. **Brada, M., A. Hennia, S. Nemmiche, J.P. Wathelet and G. Lognay.** 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Myrtus communis* L. from Algeria. 2nd International Symposium of Medicinal Plants, Their Activation and Aspects of Uses. Petra, Jordan, 3-4 November 2010.
12. **Brion, D., A. Schpouten and J.M. Raijmakers** 2003. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. Annual Review of Phytopathology, 41:501-538.
13. **Chet, I., J. Inbar and I. Hadar.** 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. Pages 165-184. In: The Mycota IV: Environmental and Microbial relationships. D.T. Wicklow and B. Soderstrom (eds.).Springer-Verlag, Berlin.
14. **Chet, I. and L. Chernin.**2002. Biocontrol, Microbial Agents in Soil. Pages 450-465. In: Encyclopedia of Environmental Microbiology. G. Bitton (ed.). New York, John Wiley and sons.
15. **Elad, Y.,I. Chet, P. Boyle and Y. Henis.** 1982. Parasitism of *Trichoderma*spp. On *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia rolfsii* scanning electron microscope and fluorescence microscopy. Phytopatoholgy, 73: 85-88.
16. **Dawar, S., H. Sadia and M.J. Zaki.** 2008. Effect of seed coating material in the efficacy of microbial antagonist for the control of root rot fungi on okra and sunflower. Pakistan Journal of Botany, 40: 1268-1278.
17. **El-Shaer,A.H.I.** 1998. Integrated control of root rot disease of some legumes. M.Sc.Thesis, Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt.
18. **Ezhilan, J.G., V. Chandrasekar and V. Kurucheve.** 1994. Effect of six selected plant products and oil cakes on the Sclerotial production and germination of *Rhizoctonia solani*. Indian Pytopathology, 47:183-185.
19. **Grand, A., P.A. Wondergem, R. Verpoort and J.L. Pousset.** 1988. Anti-Infections phytotheropies of the tree-savannah of Senegal (West Africa) II Antimicrobial activity of 33 species. Journal of Ethnopharmacol, 22: 25-3.
20. **Harborne, J.B**.1973. Phytochemical Methods. Guide To Modern Phytochemical Investigation.1:6.
21. **Jahnz, U., A. Fitch and F.G. Priest.** 1996. Evaluation of an rRNA-Targeted oligonucleotide probe for the detection of mosquitocidal strains of *Bacillus spaevicusin* soils: characterizations of novel strains lacking toxin genes. FEMS Microbiology Ecology, 20: 91-99.
22. **John, F.L and A.S. Brett.** 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing Company ,USA. 388 pp.
23. **Klopper, J.W., C.M. Ryu and S. Zhang**. 2004. Induce systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology, 94: 1259-1266.
24. **Kane, P.V., C.R. Kshirsar, A.C. Jadhav and N.B. Pawar.** 2002. *In vitro* evaluation of some plant extrcats. *Rhizoctoria solani* for *Chickpea*. Journal of Maharashtra Agricultural Universities, 27: 102.
25. **Kaushik, J.C., A. Sanjay, N.N. Tripathi and S. Arya.** 2002. Antifungal properties of some plant extracts against the damping off fungi of forest nurseries. Indian Journal of Forestry, 25: 359-361.
26. **Lee, S.O., J.C. Gyung, S.J. Kyouns, K.L. He, Y.C. Kwang and K. Jin-Cheol.** 2007. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against post harvest and soil borne plant pathogenic fungi. Plant Pathology Journal, 23: 97-102.
27. **Licere,V., M. Bechet, A. Adam, J.S. Guez, B. Wathelet, M. Ongena and P.P. Thonart**. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. Applied and Environmental Microbiology, 71:4577-4584.
28. **Moyne, A.L., R. Shelby, T.E. Clevelandand S. Tuzun.** 2001. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. Journal of Applied Microbiology, 90: 622-629.
29. **Muanza, D.N., B.W. Kim, K.L. Eulerand L. Williams.** 1994. Antibacterial and Antifungal activities of nine medicinal plants from zaira. International Journal of Pharmacology, 32: 337-345.
30. **Naterhouse, J.M.** 1968. The genus *Pythium pringsheim* diagnosis or descriptions and figures from the original papers. Common-Wealth Mycological Institute, Kew. Mycological Papers. No. 110.

31. **Nour, E.K., G. Sami, K. Mebrouk and H. Eddin.** 2010.Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolated from Algerian tomato by *Pseudomonas fluorescens, Bacillus cereus, Serratia marcescens* and *Trichoderma harzianum*. Research Journal of Agronomy, 4:31-34.
32. **Oogoshi, A**. 1987. Ecology and pathogenecity of anastomosis and intera specefic groups of *Rhizoctonia solani* (Khun). Annual Review of Phytopathology, 25:125-143.
33. **Sandra, G.A.,V. Carolina, D.P. Katy, H. Jose, U.M. Matilde and E. Sanfuelntes.** 2009. Identification and biological characterization of isolates with activity inhibitive against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. Chilean Journal of Agricultural Research, 69:526-533.
34. **Rios, J.L., M.C. Recio and A. Villar.** 1987. Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. Journal of Ethnopharmacology, 21:139-152.
35. **Scora, R.W.** 1973.Essential leaf oil variability in green, variegated and albino foliage of *Myrtus communis.* Phytochemistry, 12: 153-155.
36. **Szekeres, A., L. Kredics, Z. Antal, F. Kevei and L. Manczinger.** 2004. Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiological Letters, 233:215-222
37. **Sharif, T., S. Khalid and S. Ahmad.** 2003. Effect of *Rhizobium* sp. on growth of pathogenic fungi under *in vitro* conditions. Pakistan Journal of Biological Sciences, 6: 1597-159.
38. **Smith, K.P., M.J. Havey and J. Handlesman.** 1993. Suppression of cottony leak of cucumber with *Bacillus cereus* strain UW85. Plant Disease, 77: 139-142.
39. **Somda, I., V. Leth and P. Sereme.** 2007. Antifungal effect of *Cymbopoyon citratus, Eucalyptus camaldulensis* and *Azadirachta indica* oil extracts on sorghum seed-borne fungi. Asian Journal of Plant Sciences, 6: 1182-1189.
40. **Vey, A., R.E. Hoagland and T.M. Butt.** 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. Pages 311-346. In: Fungi as biocontrol agents: Progress, Problems and Potential. T.M. Butt, C. Jackson and N. Magan (eds.). CAB International, Bristol.
41. **Wilson, C.L., J.M. Solar, A. El-Ghaouth and M.E. Wisniewski.** 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Disease, 81:204-210.

Received: January 14, 2011; Accepted: October 16, 2011

تاريخ الاستلام: 2011/1/14؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2011/10/16