Antagonistic effect of activity of Propolis, Royal Jelly and Bio-control agent, *Trichoderma harzianum* Rifai in growth of fungal pathogen *Rhizoctania solani* Kuhn.

تأثير الفعالية التضادية للبروبوليس والغذاء الملكي و فطر المقاومة الاحيائية *Trichoderma harzianum* Rifai في نمو الفطر الممرض *Rhizoctania solani* Kuhn

حامد عبدزيد الخفاجي محسن عبداللة كريم المسافر
مدرس مساعد / المعهد التقني المسيب

المستخلص

استهدف البحث دراسة تأثير تراكيز مختلفة (60,40,20,0 %) مستخلصات البروبوليس والغذاء الملكي وراشح مستعمرة فطر المقاومة الاحيائية *Trichoderma harzianum* Rifai في تثبيط نمو الفطر الممرض *Rhizoctania solani* Kuhn والمقارنة بينهما.

أظهرت النتائج إن استخدام مستخلصات البروبوليس والغذاء الملكي وراشح مستعمرة فطر المقاومة الاحيائية *T. harzianum* أدت إلى تثبيط نمو الفطر *R. solani* بنسب مختلفة ولكافة المعاملات مقارنة بمعاملة المقارنة، إذ أظهرت النتائج أن التركيز 60% من راشح مستعمرة الفطر *T. harzianum* هو الأكثر فاعلية في التأثير التثبيطي لنمو الفطر *R. solani* بلغ 100%، واثبت الفطر *T. harzianum* بشكل عام كفاءة عالية في تثبيط نمو الفطر الممرض *R. solani* فقد بلغ نمو مستعمرة الفطر الممرض بمعدلات أقطار بلغت (5.1، 3.2و0.0) سم للتراكيز (20، 40 و60)% وعلى التوالي، بينما تخلف عنه البروبوليس في كفاءة التثبيط للفطر الممرض، في حين كان الغذاء الملكي اقل تأثيرا" في منع نمو الفطر *R. solani* فقد بلغ نموه بمعدل أقطار بلغت (6.0، 4.6 و3.5) سم للتراكيز المستعملة من مستخلص الغذاء الملكي 20 , 40 و 60 % وعلى التوالي .

Abstract

The research aimed to study the effect of different concentration of proplis and Royal jelly extracts (0, 20, 40 and 60)% and colony filtration at bio - control agent, *T.harzianum* in growth of fungal pathogen *R.solani* and compared these results. Results Showed that the 60% concentration of *T.harzianum* was the most active in effect of *R.solani* growth inhibition reached 100%. Generally the *T.harzianum* appeared high efficacy in fungal in pathogen *R.solain* inhibition with diameters average (5.1, 3.2 and 0.0)Cm. at (20, 40 and 60) %concentration respectively. While proplis extracts was lower inhibition efficacy. Whereas Royal jelly extracts had low effect in *R.solani* growth inhibition, them selver with diameters averages reached (6.0, 4.0 and 3.5)Cm. at (20,40and60)% concentration respevtivey .

المقدمـــة //

يعد الفطر *R. solani* احد أهم فطريات التربة المرضية حيث انه يمتلك مدى عائلي واسع يصل إلى 350 جنسا " نباتيا" [1] إذ يصيب الكثير من نباتات المحاصيل الاقتصادية المهمة كنباتات العائلة الباذنجانية والنجيلية والبقولية والقرعية ونباتات الزينة وغيرها من النباتات [3 ، 2]. أثبتت الدراسات إن الفطر يصيب أجزاء النباتات المختلفة من جذور وسيقان ورايزومات في التربة وحتى الأوراق الملامسة لسطح التربة الملوثة بالفطر، إذ يعد الفطر من أهم الممرضات التي تسبب تعفنا" للجذور والبذور وسقوط البادرات واللفحة والقرحة وتعفن الثمار والمواد المخزونة وذلك تبعا" لنوع النبات وتختلف أعراض المرض حسب نوع العائل ومرحلة نموه والظروف البيئة [5 , 4].

أشارت دراسات عديدة إلى إن الفطر *T. harzianum* يمتلك كفاءة تضادية عالية تجاه مختلف الفطريات الممرضة للنبات وتعزى الكفاءة التضادية للفطر إلى امتلاكه آليات عديدة في التأثير على المسببات المرضية منها: إنتاج مضادات حيوية أو إنزيمات

محللة [6] أو من خلال التنافس على الغذاء [7] أو التطفل مباشرة على الممرض واستغلاله [3] أو قابلية الفطر على استحثاث المقاومة [8 , 9]وغيرها من الآليات التي تعمل بصورة منفردة أو مجتمعة في القضاء على الكائن الممرض. أن الفطر *T. harzianum* يمتلك قدرة تضادية عالية ضد نمو الفطريات المرضية ومنها الفطر *R. solani* المسبب لموت بادرات الطماطة [10, 11].

البروبوليس (proplis) مادة صمغية تتكون من مواد راتنجية (Rutange) يجمعها نحل العسل من قلف الأشجار وأوراق وبراعم بعض الأشجار كالنخيل والصنوبريات واليوكالبتوس وبكميات كبيرة في الأوقات التي يقل فيها مصدر الرحيق (Necter) وحبوب اللقاح (Pollen) في الحقول ويمتاز البروبوليس بقدرته على الإذابة في الماء والمذيبات الكحولية مثل الكحول والأثير والكلايكول [12]. يحتوي البروبوليس على مركبات ذات فعالية بايولوجية ودوائية وهي مركبات الفلافونات (Flavonodis) وخاصة Pinocembrim, Clalanigin وChrysin لذا لعب دورا" مهما" في التاثير على الأمراض البكتيرية والفطرية والفايروسية الخطرة على الإنسان كما استعمل البروبوليس كمضاد حيوي ضد مرض موزائيك التبغ [14, 13].

الغذاء الملكي(Royal Jelly) مادة تتكون من مركبات معقدة تنتج من قبل الشغالات الحديثة لنحل العسل والتي تتراوح أعمارها بين 4-12 يوما بواسطة الغدد البلعومية (Hypotharyngeal Gland). بينت الدراسات الحديثة القيمة الغذائية والعلاجية للغذاء الملكي فقد وجد بان الغذاء الملكي يحتوي على مادة الجرميسيدين وهي مادة مطهرة تعمل كمضاد حيوي يعيق نمو الجراثيم والاعفان وكذلك احتوائه على مواد مضادة للبكتريا ولاسيما الحامض المسمى Hydroxydecenoic - 10 [15]، إذ أشار[16] إلى أن الغذاء الملكي يمتلك فعالية تضادية ضد بعض الجراثيم مثل Streptococcus pyogens وBacillus وبعض الفطريات.

لتوفر البروبوليس والغذاء الملكي بصورة طبيعية وسهولة أجراء عمليات استخلاصها فضلا" عن قلة توفر دراسات حول أمكانية استخدام البروبوليس والغذاء الملكي في المقاومة الاحيائية لبعض الفطريات ومنها الفطر *R. solani* ومقارنتها بفطر المقاومة الاحيائية *T. harzianum* أجريت هذه الدراسة .

المواد وطرائق العمل

تحضير الوسط الغذائي :

تم تحضير الوسط الغذائي أكار البطاطا والدكستروز (Potato Dextro Agre (PDA باستخدام 200غم من البطاطا و 20 غم دكستروز و 20 غم أكار في لتر ماء أضيف له المضاد الحيوي Chloramphencol بتركيز 250 ملغم / لتر وذلك بعد تعقيمه في جهاز الموصدة (Autoclave) على درجة حرارة 121 م° وضغط 1.5 بار/ سم^2 ولمدة 30 دقيقة.

اللقاح الفطري الممرض :

تم الحصول على عزلة مرضية للفطر *R. solani* من مختبر الدراسات العليا في الكلية التقنية المسيب والتي تم عزلها من درنات البطاطا المصابة بمرض تقرح الساق والقشرة.

فطر المقاومة الاحيائية :

تم الحصول على عزلة الفطر *T. harzianum* من المبيد الحيوي البيوكونت - ت (Biocont – T) الأردني المنشأ (المادة الفعالة *T. harzianum* بتركيز أعلى من 19 X 10بوغ /غم)، استعمل بعد تخفيفه بالماء بنسبة 25 غم/ 20 لتر وزرع بطريقة الصب (Pouring) في أطباق بتري حاوية على الوسط PDA وحضن بدرجة حرارة 25م° لمدة خمسة أيام وبعد ظهور المستعمرات أجريت عملية عزل لمستعمرات الفطر على الوسط ألزرعي PDA للحصول على مستعمرات نقية للفطر.

المستخلص المائي للبروبوليس:

اتبعت طريقة Contari (1987) [17] في تحضير مستخلصات البروبوليس مع بعض التحويرات حيث اخذ 10 غم من البروبوليس الخام وقطع قطعا" صغيرة ووضع في دورق حجمي سعة 250 مل أضيف إليه 100 مل ماء مقطر معقم وترك لمدة ٥ أيام بعدها رج باستخدام جهاز الرجاج المغناطيسي (Magnetic Stirrer) لمدة 15 دقيقة [18] وبعد الانتهاء من عملية الإذابة تم ترشيح المحلول بواسطة قطعة قماش نظيفة للتخلص من الجزيئات الكبيرة ثم رشح بواسطة ورق الترشيح نوع (Whatman.No.1)، بعد ذلك أجريت عملية استخلاص المحلول وتجفيفه بواسطة جهاز المبخر الدوار (Rotary Evaporator) تحت ضغط مخلخل ودرجة حرارة 45 م°. اخذ 2غم من المستخلص المائي للبروبوليس وأذيب في3,75 مل ماء مقطر ومعقم للحصول على مستخلص قياسي Stock Solution بتركيز 60% ومن ثم حضرت التخافيف 20 ، 40 و 60 % اللازمة للاختبار .

المستخلص المائي للغذاء الملكي .

لتحضير المستخلص المائي للغذاء الملكي اتبعت الخطوات السابقة في تحضير المستخلص المائي للبروبوليس .

تأثير الفطر *R. solani* في نسبة إنبات بذور الطماطة

اعتمدت طريقة Leiner (1986) [19] لقياس تأثير الفطر *R. Solani* في نسبة إنبات بذور الطماطة *Lycopersicom esculentum* Mill صنف سوبرمريموند، اذ تم زراعة بذور الطماطة المعقمة سطحيا" بمحلول هيبوكلورات الصوديوم 4% لمدة 4 - 5 دقيقة والتي جرى غسلها بالماء المقطر المعقم فيما بعد في أطباق بتري حاوية على الوسط ألزرعي PDA المعقم بمعدل 20 بذرة / طبق وبشكل دائري بعد تلقيح مركز الطبق بقرص قطره 1 سم مأخوذ من حافة مستعمرة الفطر *R. solani* النامي على الوسطPDA ولثلاث مكررات مع الأخذ بنظر الاعتبار إجراء معاملة مقارنة بزراعة بذور الطماطة على الوسط ألزرعي بالطريقة نفسها وبدون تلقيح الوسط بالفطر *R. Solani* . تم حساب نسبة أنبات بذور الطماطة بعد مرور ستة أيام من الحضن بدرجة حرارة 25 مْ وحسب القانون التالي :

$$\text{نسبة الإنبات} = \frac{\text{العدد الكلي للبذور - عدد البذور غير النابتة}}{\text{العدد الكلي للبذور}} \times 100$$

اختبار قدرة الفطر *T. harzianum* في التضاد مع الفطر الممرض *R. solani* .

اعتمدت طريقة الزرع المزدوج (Duble Culture Technigues) لاختبار قدرة فطر المقاومة الاحيائية *T. harzianum* في التضاد مع الفطر الممرض *R. solani* في أطباق بتري حاوية على الوسط PDA المعقم، إذ لقح مركز النصف الأول من الطبق بقرص قطره 1 سم من الفطر *T. harzianum* النامي على الوسط PDA وبعمر ثلاثة أيام أما مركز النصف الآخر من الطبق فقد لقحت بقرص مماثل من الفطر الممرض *R. solani* النامي على الوسطPDA وبعمر أربعة أيام، وأجريت معاملة مقارنة بتلقيح مركز احد نصفي الطبق بالفطر الممرض فقط، حضنت الإطباق لمدة سبعة أيام عند درجة حرارة 25 ± 2 م° قيست أقطار المستعمرات بعد مدة الحضن وقدرت درجة التضاد حسب مقياس Bell (1982)[20] المكون من خمس درجات .

1. الفطر المضاد يغطي الطبق بكاملة
2. الفطر المضاد يغطي 3/4 مساحة الطبق
3. الفطر المضاد والفطر الممرض كل منها يغطي نصف مساحة الطبق
4. الفطر الممرض يغطي 3/4 مساحة الطبق
5. الفطر الممرض يغطي الطبق بكاملة

اختبار تأثير راشح الفطر *T. harzianum* ومستخلصات البروبوليس والغذاء الملكي ضد الفطر *R. solani* .

بعد تحضير راشح الفطر *T. harzianum* والمستخلصات المائية للبروبوليس والغذاء الملكي وبالتراكيز(0، 20، 40 و 60)% لكل منهما صبت الرواشح والمستخلصات في أطباق بترية معقمة قطرها 9 سم كررت كل معاملة ثلاث مرات ولقحت الأوساط الحاوية على الرواشح والمستخلصات بعد تصلبها بأقراص قطر كل منها 1 سم من الفطر *R. solani* النامي على الوسط PDA وبعمر أربعة أيام. حضنت الأطباق لمدة سبعة أيام عند درجة حرارة 25± م°. تم قياس النمو القطري للفطر *R. solani* بأخذ معدل قطرين متعامدين من ظهر المستعمرة يمران بمركز القرص كل 24 ساعة ولحين وصول النمو في معاملة المقارنة إلى حافة الطبق وحسبت النسبة المئوية لتثبيط النمو القطري للفطر *R. solani* وفق المعادلة التالية [21]:

$$\text{لتثبيط النمو الفطري} = \frac{\text{معدل النمو القطري في المقارنة - معدل النمو القطري في المعاملة}}{\text{معدل النمو القطري في المقارنة}} \times 100\%$$

التصميم والتحليل الإحصائي

استخدم التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (CRD) وجرى تحليل التباين للعوامل الداخلة في التجربة تحت اختبار اقل فرق معنوي Least Significant Difference (L.S.D) تحت مستوى احتمالية 0.05% [22] .

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج معاملة بذور الطماطة صنف سوبرمريموند بالفطر الممرض *R. solani* إن نسبة إنبات هذه البذور كانت 38% بعد ستة أيام من تنميتها في وسط أل PDA الملقح بقرص الفطر الممرض مقارنة بالبذور غير معاملة .

أظهرت نتائج اختبار التضاد بوساطة الزرع المزدوج الذي اقترحه [20] وجود قدرة تضادية عالية بين فطر المقاومة الاحيائية والفطر الممرض آذ حقق الفطر درجة تضاد عالية بلغت 1,3 وذلك بعد سبعة أيام من التلقيح ألزرعي، وهذا يتفق مع ما ذكر من قبل [23 ، 11]. إن قدرة الفطر *T. harzianum* في القضاء على الفطر *R. solani* تتجسد من خلال العديد من الفعاليات والتي أبرزها آليتي التنافس والتطفل [24] .

يتضح من نتائج جدول (1) إن لراشح فطر المقاومة الاحيائية *T. harzianum* تأثيرا" معنويا" في معدل النمو القطري للفطر *R. solani* مقارنة بمعاملة المقارنة (بدون راشح) وللتراكيز 20 و 40 و60 % وبلغت أعلى نسبة مئوية للتثبيط 100% عند استخدام راشح مستعمره الفطر *T. harzianum* بتركيز 60%، في حين بلغت النسبة التثبيطية (40,00، 62,35 % بالتراكيز 20و 40 % وعلى التوالي. إن التأثير التثبيطي للفطر *T. harzianum* قد يعود إلى إنتاجه مركبات سامة مثل Trichothecin و Gliotoxin و Pyrones وغيرها من المواد [25]. أو قد يعود إلى وجود العديد من الإنزيمات المحللة مثل Protase و Chitinase و B, 1-4 glucanase و Cellulase [10].

كما بين الجدول (1) قدرة مستخلصات البروبوليس والغذاء الملكي في تثبيط نمو الفطر *R. solani* ولكافة التراكيز المستخدمة وبنسب تثبيطية مختلفة إذ بينت نتائج التحليل الإحصائي تفوق التركيز 60% من مستخلصي البروبوليس والغذاء الملكي في قيم النسبة المئوية لتثبيط الفطر الممرض *R. solani* مقارنة بالتراكيز الأخرى للبروبوليسوالغذاء الملكي . إذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط 89,21و 58,93% للمستخلصين وعلى التوالي. إن التأثير التثبيطي لمستخلصات البروبوليس والغذاء الملكي قد يعود إلى احتوائهما على مركبات ذات فعالية بايولوجية ودوائية ومنها مركبات الفلافونات بالنسبة للبروبوليس ومادة الجرميسيدين التي تعيق نمو الجراثيم والاعفان بالنسبة للغذاء الملكي [15].

من متابعة النتائج يتضح إن فطر المقاومة الاحيائية *T. harzianum* تفوق بقدرته التضادية ضد الفطر المرض *R. solani* وخاصة عند استخدام التركيز 60% من راشح مستعمرة الفطر *T. harzianum* يليه مستخلص البروبوليس ومن ثم الغذاء الملكي . نقترح إجراء دراسات أخرى باستخدام مستخلصات و تراكيز مختلفة للوصول إلى أفضل قدرة تثبيطية للفطر المرض .

جدول (١) تأثير راشح الفطر *T. harzianum* ومستخلصات البروبوليس والغذاء الملكي في تثبيط نمو الفطر *R. solani* النامي في وسط PDA (%)

التركيز %	النسبة المئوية التثبيطية للنمو القطري للفطر *R. solani*		
	الفطر *T. harzianum*	البروبوليس	الغذاء الملكي
0	0.00	0.00	0.00
20	40.00	33.60	29.17
40	62.35	57.11	46.45
60	100.00	89.21	58.39
L.S.D. (P= 0.05)	18.16	14.36	13.10

المصـــادر

1. Hin, R . 1999. Disease of urban blants . Universty of Arizona.

2. رسول ، طاهر نجم.1989. أنتاج أزهار القطف. مكتبة الرسالة – بغداد . العراق 129 صفحة.

3. Agrios, G.N. 1997. plant pathology. 4th ed .Academic press. London pp-: 150-203.

4. Asaka, O. and Shoda, M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctiona solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtithus* RB14.Appl.Environ. Microbiol .623: 97-404.

5. الوائلي، ضياء سالم علي.2004. دراسة مرض موت بادرات البطاطا ومكافحتها المتكاملة في مزارع الزبير وسفوان في البصرة. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم. جامعة البصرة .العراق.

6. Limon, M.C. ; Pintor-Toro, L.A and Benitez, T. 1999. Lncreased antifungal activity of *Trichoderma hrichoderma* transformants that overexpress a33- kolachitinase. Phytopathology 89 : 254-261.

7. Elad, Y. ; David, D.R. ; Levi, T. ; Kapat, A. ; kirshner, B.Guvrin, E. and Levine, A. 1999. *T richoderma harziamun* T – 39 mecganism of biocontrol of foliar. Pathogens . pp : 459-467. (citedin .Harman G.E.2000.)

8. Harman, G.E. . 2000. Myths a dogmas of biocontrol changes in perception derived from research on *Trichoderma harzianum* T - 22. Plant Dis Rep. 84.(4) : 377-393

9. حميد، فاخر رحيم.*2002* دراسة كفاءة عزلات الفطر *Trichoderma Spp.* في استحثاث المقاومة ضد الفطر *Rhizoctania solani* وتحفيز النمو في أربعة أصناف في القطن. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد. العراق.80 صفحة.

10. الموسوي. عبد العزيز إبراهيم ياسين. *2003. تأثير فصل التربة في نشاط الفطر* *Trichoderma harzianum* Rifai في المكافحة الاحيائية لبعض مسببات أمراض جذور ومحصول الطماطة في الترب الصحراوية في النجف. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة الكوفة. العراق.

11. صالح، يحيى عاشور ومحمد حسن بدن. 1999.المقاومة الكيميائية والحياتية للفطر *Rhizoctania solani* المسبب لموت البادرات في الطماطة. مجلة البصرة للعلوم الزراعية، المجلد 2 العدد (1) : 3- 14.

12. Krell, R. 1996. Valne – Added Products from bee Keeping. Food and Agricultura United Nations FAO. Roma Pp : 157-193.

13. Kaal, J. 1991.Natural Medicine from Honey Bees. Apitherapy Amsterdam.Pp.: 93.

14. االعمار، مهدي حسين.2001. تأثير فعالية مركبات البروبوليس في نمو بعض أنواع البكتريا الممرضة. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الكوفة. العراق.

15. الباشا، محمد خليل1983. الموسوعة في علم النحل. الطبعة الأولى. الدار العربية للموسوعات / بيروت. لبنان. 449صفحة.

16. المصري، علي. 1986. مملكة نحل العسل ومنتجاتها - الأمراض التي تصيبها ومعالجتها والوقاية منها. دار الكتاب العربي. دمشق. سوريا. 309 صفحة.

17. Contari, G. 1987 Process for the propolis extract Preparation Apicolt. Mod. 78 :147-150.

18. المسافر، محسن عبدا لله كريم.2005. الفعالية الحيوية للبروبوليس والغذاء الملكي وسم النحل في بكتريا تعفن الحضنة الأوربي. رسالة ماجستير. الكلية التقنية المسيب. هيئة التعليم التقني. العراق.117 صفحة.

19. Leiner, R.H.and Carling, D.E. 1986. Characterization of waitea circinata isolated from Agricultural soils in Alaska. Plant Dis. 78 : 385-388. .

20. Bell, D. K. ; Wells, H.D. and Markha C.R . 1982. ln vetro antagonism Trichderma species against six fungal plant pathogens. Phytothol. 72:692-694.

21. شعبان، عواد ونزار مصطفى الملاح.1993. المبيدات . دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. العراق. 520صفحة .

22. الراوي، خاشع محمود و عبدالعزيز خلف الله.1980. تصميم وتحليل التجارب الزراعية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. مطبعة مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل.488 صفحة.

23. عباس، محمد حمزة.*1998. دراسة حياتية للفطر* *Rhizoctania solani* Kuhn المسبب لتعفن بذور وموت بادرات الحنطة. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة البصرة. العراق. 88 صفحة.

24. عبيد ،زينة هادي ; جواد كاظم عبود ورباب عمران راضي.2007. تأثير بعض العوامل البيئة على عملية التضاد بين الفطر *Trichoderma harzianum* Rifai والفطر *Rhizoctoni Solan*i Kuhn . مجلة جامعة بابل العلوم . المجلد 14 (3): 233-244 .

25. Chisalberti, E.L. ; Narbey, M.J. ; Dewan, M.M.and SivasithamParain, k. 1990. Variability amony strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take all and to produce pyrines.Plant and soil. 121: 287-291