استجابة نمو بعض الفطريات إلى زيت ومستخلص المائي لنبات القرنفل *Eugenia caryophyllata*

علي عبدالواحد قاسم غسان مهدي داغر علي عذافة طعمة المالكي

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة ميسان

الخلاصة

اجري هذا البحث لتقويم استجابة نمو هايفات بعض الفطريات في الوسط PDA الحاوي على زيت البراعم الزهرية لنبات القرنفل تركيز 0.000 و 0.375 و 0.750 و 1.125% والمستخلص المائي للبراعم الزهرية تركيز 0 و 5 و 10 و 15 % . حيث ان زيت القرنفل ثبط نمو كل من الفطر *A.alternata* و *F.oxysporum* و *T.harzianum* في تركيز 1.125% إلى 0.00 سم كما ثبط في معاملة التركيز 0.375 % التي بلغ فيها نمو الفطريات 3.90 و 4.33 و 3.10 سم على التوالي . وفي معاملة التركيز 0.750 % وصل فيها النمو في الفطرين *A.alternata* و *F.oxysporum* إلى 2.23 و 2.73 سم على التوالي في حين معاملة الفطر *T.harzianum* وصل فيها النمو 0.00 سم ،مقارنتا مع التركيز 0.00 % الذي بلغ فيه النمو 9 سم في كلا الفطريات . إما المستخلص المائي لنبات القرنفل فأن التركيز 15 % ثبط نمو كل من الفطر *A.alternata* و *F.oxysporum* و *T.harzianum* إلى 0.00 سم ، أما التركيز 10 % فقد ثبط نمو الفطريات إلى 1.76 و 1.66 و 2.50 سم على التوالي ، في حين ثبط التركيز 5 % نمو الفطريات إلى 2.70 و 3.50 و 6.61 سم على التوالي . مقارنتا مع التركيز 0% الذي بلغ فيه النمو 9 سم في كلا الفطريات .

الكلمات المفتاحية :- زيت القرنفل ، المستخلص المائي للقرنفل ، نمو الفطريات

1- المقدمة

إن لبعض النباتات تأثيرات مضادة لنمو العديد من المسببات الممرضة للنبات و زاد الاهتمام بها لتميزها بخصائص عدة ، فقلة مقاومة المسبب المرضي لها ، وقلة تأثيراتها الجانبية وسميتها القليلة للبائن وتحللها السريع وتخصصها العالي وعدم تلويثها البيئة كانت من ابرز خصائصها التي شجعت على استخدامها (14). حيث تحتوي أزهار وأوراق وجذور كثير من النباتات على مركبات ثانوية ذات تأثير سمي للآفات الزراعية وبدأ الإنسان باختيار أكثرها كفاءة واستخدمها أما مباشرة عن طريق استعمال مسحوق الجزء النباتي الحاوي على المادة السامة أو بعد استخدام مستخلصاتها (2) . ويعد نبات القرنفل *E. caryophyllata* الذي يعود إلى العائلة Myrtaceae من النباتات الطبية التي تحتوي على الزيوت الطيارة المستخدمة في تثبيط نمو كل من الفطر *Candida albicans* و الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* عند استخدامه بالتركيز 40.3 و 39.0 جزء بالمليون على التوالي (19) . كما وجد ان المستخلص الكحولي الخام للبراعم الزهرية لنبات القرنفل *E. caryophyllata* وبالتركيز (1000) جزء بالمليون كان مثبطاً لنمو الفطرين *Rhizctonia solani* و *Pythium aphanidermatum* في حين كان التركيز (0.25 %) من مسحوق البراعم الزهرية لنبات القرنفل هو المثبط لنمو الفطرين الممرضين (7) . وفي دراسة قام بها الباحثان (12) ان معاملة التربة الملوثة بالفطر *F.oxysporum* بالمستخلص المائي لنبات القرنفل تركيز 10% قللت من الكثافة العددية للفطر. كما وجد الباحث (10) عند استخدام زيت أشجار الشاي الاسترالية *Melaleuca alternifolia* تركيز 0.625 مايكرولتر/ مل ثبطت نمو هايفات الفطر*T.harzianum* إلى 5.9% على الوسط ألزرعي PDA . كما وجد (6) ان استخدام الزيت العطري لنبات القرنفل بتركيز 1000جزء بالمليون ثبط نمو الفطرين *Fusarium moniliforme* و *Fusarium poae* إلى 71.11 و 100% على التوالي.

ونظرا لاحتواء بعض النباتات مركبات ايضية ثانوية فعالة في تثبيط بعض الفطريات المهمة تم أجراء هذا البحث لاختبار فعالية زيت ومستخلص المائي للبراعم الزهرية لنبات القرنفل في تثبيط نمو بعض الفطريات على الوسط الغذائي PDA .

2- المواد وطرائق العمل

2-1 : الفطريات المستخدمة بالتجربة

استخدمت في هذه التجربة ثلاثة فطريات هي *Fusarium f.* sp *oxysporum* IAM *lycopersici* و *Trichoderma harzianum* (تم الحصول عليهما من مختبر الدراسات العليا في قسم وقاية النبات كلية الزراعة جامعة البصرة) والفطر *Alternaria alternata* الذي تم عزله من أوراق نباتات طماطا مصابة بالتبقـع تم جلبــها من البيوت البلاستيكية من مشتل ميسان التي قطعت إلى قطع صغيرة حجم 0.5 سم ثم عقمت سطحيا في محلول هايبوكلورات الصوديوم تركيز 10% لمدة 2-3 دقائق و غسلت بماء مقطر معقم جففت على ورق ترشيح معقمة ثم زرعت في أطباق زجاجية معقمة سعة 9 سم حاوية على الوسط الغذائي Potato Dextrose Agar (PDA) المعقم ثم حضنت في الحاضنة على درجة حرارة 25 ±2 م ° وبعد ظهور المستعمرات الفطرية نقيت على نفس الوسط ثم شخص الفطر اعتمادا على الصفات التصنيفية التي أوردها (13) .

2-2: تحضير زيت البراعم الزهرية لنبات القرنفل

تم الحصول على زيت البراعم الزهرية لنبات القرنفل من الأسواق المحلية الذي يحمل اسم انتركلوف Interclove من صنع مختبرات انترفارما في حلب – سوريا في عبوة حجم 3 مل .

2-3 : تحضير المستخلص المائي لنبات القرنفل

حضر المستخلص المائي بإضافة 200 مل ماء مقطر إلى 20 غم من مسحوق البراعم الزهرية المجففة ومزج بالخلاط الكهربائي لمدة 15 دقيقة ثم ترك المزيج لمدة نصف ساعة ، بعدها رشح من خلال قماش ململ للتخلص من متبقيات البراعم ثم رشح من خلال أوراق ترشيح Whatman No.1 ، ثم مرر عبر ورق ترشيح Millipore قطر 0.45 مايكرون باستخدام مضخة التفريغ Vacum pump حتى تم الحصول على كمية مناسبة من المستخلص التي ستستخدم في الدراسة كمحلول أساس Stock Solution ثم حفظ المستخلص في الثلاجة على درجة حرارة 4 ± 1م° لحين الاستعمال (4) .

2-4: تأثير زيت البراعم الزهرية للقرنفل على نمو فطريات التجربة على الوسط PDA

حضر الوسط الغذائي PDA ووزع على أربعة دوارق زجاجية معقمة ثم عقم بجهاز Autoclave على درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند \ انج 2 لمدة 20 دقيقة ، وبعد انخفاض درجة حرارة الوسط وقبل أن يتصلب أضيف زيت البراعم الزهرية لنبات القرنفل إلى الدوارق الحاوية على الوسط الغذائي بالتركيز 0.000 و 0.375 و 0.750 و 1.125% ، تم إضافة قطرات من مادة Tween 80 إلى الأوساط لتماسك الوسط مع الزيت ثم رجت الدوارق جيدا لضمان تجانس المستخلص مع الوسط الغذائي ، صب الوسط في أطباق بتري معقمة سعة 9 سم بواقع ثلاث مكررات لكل فطر من كل تركيز ، لقحت الإطباق بعد تصلب الوسط بأقراص قطر 0.5 سم من مستعمرة الفطريات النامية على الوسط PDA بعمر خمسة أيام ، حضنت الإطباق بدرجة حرارة 26± 1 م° وعند وصول نمو الفطريات في معاملة 0.000 إلى حافة الطبق تم قياس معدل النمو بأخذ معدل قطرين متعامدين لنمو المستعمرة يمران من مركز الطبق .

2-5: تأثير المستخلص المائي للقرنفل على نمو فطريات التجربة على الوسط PDA

تم تحضير وتعقيم الوسط الغذائي كما في الفقرة (2-4) وقبل إن يتصلب الوسط أضيف المستخلص المائي للبراعم الزهرية لنبات القرنفل على الوسط الغذائي بتركيز 0 و 5 و 10 و 15 % ثم رجت الدوارق لضمان تجانس المستخلص مع الوسط الغذائي ، صب في أطباق معقمة سعة 9 سم وبعد تصلب الوسط لقح مركز كل طبق بقرص قطر 0.5 سم من مستعمرة الفطريات النامية على الوسط PDA بعمر خمسة أيام بواقع ثلاث مكررات لكل فطر من كل تركيز ثم حضنت الإطباق في الحاضنة على درجة حرارة 26± 1 م° وعند وصول نمو الفطريات في معاملة 0% إلى حافة الطبق تم قياس معدل النمو بأخذ معدل قطرين متعامدين لنمو المستعمرة يمران من مركز الطبق .

6-2: التحليل الإحصائي

أستخدم التصميم العشوائي التام Completely Randomized Design (C.R.D) وقورن بين المتوسطات باختبار أقل فرق معنوي معدل R.L.S.D تحت مستوى احتمال 0.01 في جميع التجارب بواقع ثلاث مكررات لكل فطر من كل تركيز (1) .

3- النتائج والمناقشة

1-3: تأثير زيت البراعم الزهرية للقرنفل على نمو فطريات التجربة في الوسط PDA

أظهرت نتائج الجدول (1) صورة (1) ان زيت القرنفل ثبط نمو كل من الفطر *A.alternata* و *F.oxysporum* و *T.harzianum* في تركيز 1.125% إلى 0.00 سم التي فاقت بفروقات عالية المعنوية عن التركيز 0.00 % التي وصل فيها النمو 9 سم في كلا الفطريات و فاقت بفروقات عالية المعنوية على معاملة التركيز 0.375 % التي بلغ فيها نمو الفطريات 3.90 و 4.33 و 3.10 سم على التوالي . كما فاقت بمعنوية عالية على معاملة التركيز 0.750 % التي وصل فيها النمو في الفطرين *A.alternata* و *F.oxysporum* إلى 2.23 و 2.73 سم على التوالي . بينما لم تختلف مع نفس المعاملة في الفطر *T.harzianum* التي كان فيها النمو 0.00 سم . توافقت هذه النتائج مع (5) عند استخدام زيت القرنفل تركيز 75 مل/ لتر في تثبيط الفطر *A.alternata* . كما توافقت هذه النتائج مع (3) في تثبيط نمو الفطر *A.alternata* إلى 100% عند استخدام زيت القرنفل تركيز 100مايكروغرام / مل في الوسط الغذائي PDA. أتت هذه النتائج متوافقة مع (11) في قابلية زيت القرنفل عند استخدامه بتركيز 100 جزء بالمليون فى تثبيط نمو الفطر *F.oxysporum* إلى 100% . وتوافقت النتائج مع (6) عندما وجد فاعلية زيت القرنفل تركيز 500 جزء بالمليون في تثبيط نمو الفطر *Fusarium poae* في الوسط الغذائي . كما أتت بصورة متوافقة مع الباحث (10) عند استخدام زيت أشجار الشاي الاسترالية *Melaleuca alternifolia* تركيز 0.625 مايكرولتر/ مل ثبطت نمو هايفات الفطر*T.harzianum* الى 5.9% على الوسط ألزرعي PDA . وتعود قابلية زيت البراعم الزهرية لبنات القرنفل على تثبيط نمو الفطريات إلى احتواءه بعض المركبات السامة للفطريات مثل 87% eugenol و8.01% eugenylacetate و 3.56% betacaryophyllene (9) . أو الى المركبات Carvacrol و Geraniol و Trans-cinnamaldehyde التي لها الفعالية العالية في تثبيط نمو الفطريات (11) .حيث وجد الباحث (15) عند استخدام المجهر الاليكتروني لمتابعة تأثير زيت القرنفل على نمو الفطريات فوجد تغيرات كبيرة تمثلت برقة جدار هايفات الفطر وتمزق الغشاء البلازمي وتشوه المايتوكندريا .

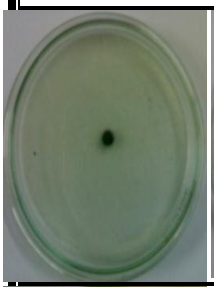
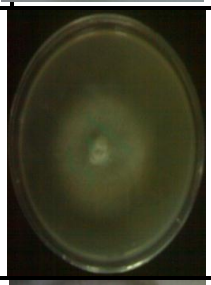
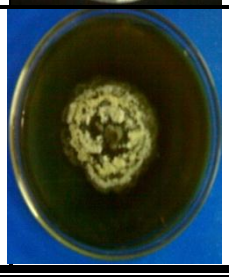
جدول (1) تأثير زيت البراعم الزهرية للقرنفل على نمو بعض الفطريات في الوسط PDA

التركيز / الفطريات	*A.alternata*	*F.oxysporum*	*T.harzianum*	المعدل
0.000	9.00	9.00	9.00	9.00
0.375	3.90	4.33	3.10	3.77
0.750	2.23	2.73	0.00	1.65
1.125	0.00	0.00	0.00	0.00
المعدل	3.78	4.01	3.02	

$RLSD_{0.01}$ للفطر *A.alternata* 0.68

$RLSD_{0.01}$ للفطر *F.oxysporum* 0.81

$RLSD_{0.01}$ للفطر *T.harzianum* 0.26

التركيز / الفطريات	0.000	0.375	0.750	1.125
A.alternata				
F.oxysporum				
T.harzianum				

صورة(1) تأثير زيت البراعم الزهرية للقرنفل على نمو بعض الفطريات على الوسط PDA

2-3: تأثير المستخلص المائي للقرنفل على نمو فطريات التجربة على الوسط PDA

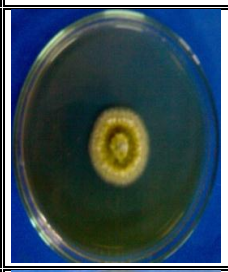
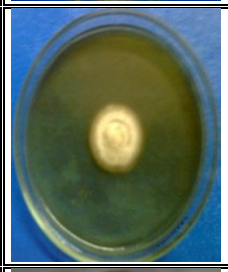
أظهـرت نتـائج الجدول (2) صورة (2) أن المستخلص المائي لنبات القرنفل التركيز 15 % ثبـط نمـو كـل من الفطر *A.alternata* و *F.oxysporum* و *T.harzianum* الى 0.00 سم بفروقات عالية المعنوية عن بقية التراكيز ، أما التركيز 10 % فقد ثبط نمو الفطريات الى 1.76 و 1.66 و 2.50 سم على التوالي بمعنوية عالية عن التركيز 5 و0% ، في حين ثبط التركيز 5 % نمو الفطريات الى 2.70 و 3.50 و 6.61 سم على التوالي . مقارنتا مع التركيز 0% الذي بلغ فيه النمو 9 سم في كلا الفطريات . وهذه النتائج تتوافق مع الباحث (16) عند معاملة بذور الحنطة المخزونة بالمستخلص المائي لنبات القرنفل تركيز 20% أدى إلى خفض أصابتها بالفطر *A.alternata* إلى 13% مقارنة مع معاملة السيطرة 43% . كما توافقت النتائج مع (18) عندما وجد المستخلص المائي لنبات القرنفل تركيز 1900جزء بالمليون هو اقل تركيز لتثبيط نمو الفطر *A.brassicicola* بينما التركيز 3800 جزء بالمليون هو ادني تركيز لتثبيط نمو الفطر *F. oxysporum* على الوسط الغذائي PDA . كما أتت متوافقة مع البـاحث (8) عـند استعمـال المستخلص المائي لنبـات القرنفـل تركيـز 2% أدى الى تثبيط نمـو الغـزل الفطـري للفطـر *F.oxysporum f*.sp. *lycopersici* الى 52.90% فـي الوسـط ألزرعي PDA . وتـوافقت النتائج مع الباحثان(17) حول تثبيط نمو الفطر *F.oxysporum f*.sp. *vanillae* الى 8.5 مليمتر عند استخدام مستخلص القرنفل المائي تركيز 10% على الوسط ألزرعي PDA .كما توافقت النتائج مع الباحث (19) عند استخدام مستخلص نبات *Centaurea attica* Nyman العائد الى العائلة Asteraceae تركيز 1ملغم / مل ثبط نمو كل من الفطرين *A.alternata* و *T.viride* . وتعود قابلية المستخلص المائي لنبات القرنفل على تثبيط الفطريات الى وجود مادة eugenol التي تعد المركب الرئيسي الجاعلة منه مضاد فطري Antifungal فعال ضد الفطريات . حيث وجد الباحثان (18) عند استخدام المجهر

المركب ان مستخلص القرنفل المائي أدى الى نمو غير طبيعي للغزل الفطري حيث يكون منتفخ وشاحب اللون و الكونيديات مشوهة وعددها يتناقص في كل من الفطرين *A.brassicicola* و *F. oxysporum* .

جدول (2) تأثير المستخلص المائي للقرنفل على نمو بعض الفطريات على الوسط PDA

الفطريات / التركيز	*A.alternata*	*F.oxysporum*	*T.harzianum*	المعدل
0%	9.00	9.00	9.00	9.00
5%	2.70	3.50	6.61	4.27
10%	1.76	1.66	2.50	1.97
15%	0.00	0.00	0.00	0.00
المعدل	3.36	3.54	4.52	

$RLSD_{0.01}$ للفطر *A.alternata* 0. 39
$RLSD_{0.01}$ للفطر *F.oxysporum* 0.35
$RLSD_{0.01}$ للفطر *T.harzianum* 0.48

التركيز / الفطريات	0%	5%	10%	15%
A.alternata				
F.oxysporum				
T.harzianum				

صورة(2) تأثير مستخلص البراعم الزهرية المائي للقرنفل على نمو بعض الفطريات على الوسط PDA

المصادر

1. الراوي ، خاشع محمود وخلف الله ،محمد عبد العزيز .1980. تصميم وتحليل التجارب الزراعية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل . العراق . 488 صفحة .
2. العادل، خال محمد ومولود كامل عبد . 1979. المبيدات الكيميائية في وقاية النبات .مطبعة دار الكتب للطباعة والنشر .جامعة الموصل .397 صفحة .
3. عباس ، فارس عباس .2010. تأثير الزيت الطيار لنباتي القرنفل *Syzygium aromaticum* و اليوكالبتوز *Eucalyptus camaldulensis* ضد بعض أنواع الفطر *Alternaria* المعزولة من جذور نبات اللهانة. مجلة أبحاث البصرة ((العلميات)) . 6: 133-142.
4. قاسم ، جمال راغب .1993. التأثيرات المثبطة لبعض الإعشاب الشائعة في حقول الحبوب على المحصولي القمح والشعير . مجلة دراسات ، مجلد 2: 7-28 .
5. الكرخي،عناء داود خماس . 2009. تقييم كفاءة بعض الزيوت النباتية في تثبيط النمو ألشعاعي لبعض الممرضات النباتية ، مجلة البصرة للعلوم الزراعية.22 (2):141
6. كريم ، طارق عبد السادة .2010. تقويم فاعلية خمسة زيوت نباتية عطرية في تثبيط نمو أربعة أنواع من الفطريات الممرضة. مجلة ديالى للعلوم الزراعية.2: 220- 228 .
7. كريم ، طارق عبد السادة .2000. فعالية مستخلصات البراعم الزهرية للقرنفل ضد مسببي مرض سقوط البادرات *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzpatrick. و*Rhizoctonia solani* kuhn على الخيار . رسالة ماجستير ـ كلية الزراعة ـ جامعة بغداد .

8. Abdulrahman, A.A. 2005. Antifungal activity of some extract against some plant pathogenic fungi. Pakistan Journal of Biological Sciences. 3: 413 – 417 .
9. Alma, M.H., M. Ertas, S. Nitz, and H. Kollmannsberger .2007. Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish Clove (*Syzygium aromaticum* L.). BioResources 2: 265-269.
10. Angelini, P.; Pagiotti, R. and Granetti, B .2008. Effect of antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil on antagonistic potential of *Pleurotus* species against *Trichoderma harzianum* in dual culture**.** World Journal of Microbiology and Biotechnology.24: 197-202.
11. Barrera-Necha, L.L. ; Garduno-Pizana,C. and Garcia-Berrera,L.J .2008. In vitro antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelia growth of *Fusarium oxysporum f.* sp *gladioli*(Massey)Snyder and Hansen. Plant Pathology Journal.7:1-5.
12. Bowers, J.H. and Locke, J.C .2000. Effect of biotanical extracts on the population density of *Fusarium* wilt in the greenhouse . Plant Disease.24:300-305.
13. Ellis, M.B .1971. Dematiuceous hyphomycets . Kew , surrey England : common wealth Mycological institute . pp :608 .
14. Lokendra , C. ; and Sharma , B. 1978 . Antifungal Properties of some plant extracts . Geobios . 5 : 49 – 53 .
15. Park,M.J.; Gwak,K.S.; Yang,I.; Choi,W.S.; Jo,H.J.; Chang,J.W.; Jeung.E.B. and Choi,I.G .2007. Antifungal activities of the Essential Oils in *Syzygium aromaticum* (L.)Merr. Etperry and *Leptopermum petersonii* bailey and their constituents against various Dermatophytes,The Journal of Microbiology.45:460-466.
16. Shaffique, S.; Javaid, A.; Baswa,R. and Shafique, SH .2007. Effect of Aqueousle of extracts of Allelopathic Trees on germination and seedborne Mycoflora of Wheat. Pakistan Journal Botany. 7:2619-2624.
17. SuPrapate, D.N. ; and Khalimi, K .2009. Efficacy of plant extract formulations to suppress stem rot disease on Vanilla seedlings. Journal ISSAAS.2: 34-41.

18. Suwitchayanon, P. and Kunasakdakul, K .2009. In Vitro effects of clove and turmeric extracts controlling crucifer pathogens. Journal of Agricultural Technology.5:193-199.
19. Verma, R.K.; Chaurasia, L. and Katiyar, S .2008. Potenial antifungal Plants for controlling building fungi. Natural Product Radiance. 7:374-387.

Response to the growth of some fungi to the oil and aqueous extract of the plant cloves *Eugenia caryophyllata*

Ali A. Qasim Ghassan Mehdi Daghir Ali Athafah Tomah Malki
Department of Biology / College of Science / University of Maysan

Summary

This research was conducted to evaluate the response to the growth of some fungi on the PDA containing the oil of floral buds of the Cloves (concentrations : 0.000 , 0.375 , 0.750 and 1.125 %) and aqueous extract (concentration : 0, 5, 10 and 15%.) . As the clove oil damped the growth of both fungus *A.alternata* ، *F.oxysporum* and *T.harzianum* in the concentration of 1.125% to 0.00 cm and damped in the treatment of 0.375% concentration, which was the growth of fungi 3.90 ، 4.33 and 3.10 cm respectively. Focus in the treatment of 0.750% reached the growth in fungi *A.alternata* and *F.oxysporum* to 2.23 and 2.73 cm respectively, while treatment of fungus growth, which reached *T.harzianum* 0.00 cm, with a focus Compared 0.00% growth which amounted to a 9 cm in both fungi. Either the aqueous extract of the plant cloves, the focus of 15% damped the growth of both fungus *A.alternata* ، *F.oxysporum* and *T.harzianum* to 0.00 cm, the concentration of 10% has discouraged the growth of fungi of 1.76 and 1.66 and 2.50 cm respectively, while the damped concentration of 5% growth of fungi to 2.70 and 3.50 and 6.61 cm respectively. With a focus Compared 0% growth which amounted to a 9 cm in both fungi**.**

Key words: - clove oil, aqueous extract of cloves, growth of fungi