دراسة الفعالية التضادية لمستخلص أوراق نبات الكلغان *Silbum marianum* على بعض أنواع الفطريات الناقصة

دنيا يوسف محمد يوسف
قسم علوم الحياة ،كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية

الخلاصـــة

نفذ هذا البحث لدراسة تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الايثانولي لأوراق نبات الكلغان *Silbum marianum*إزاء بعض الفطريات الممرضة للنبات وهي : *Fusarium oxysporum , Alternaria sp., Botrytis cinerea* .

بينت التجارب الكفاية التثبيطية العالية لهذا المستخلص ،إذ أدى التركيز العالي (80)ملغم /مل إلى تثبيط النمو كليا على الوسط الغذائي(PDA) للفطريات الممرضة المدروسة ، كذلك أخفقت كونيدات الفطريات *Fusarium oxysporum* ، *Botrytis cinerea* في الإنبات عند تركيز (80) ملغم/ مل.في حين تفاوتت قدرة كونيدات الفطر *Alternaria sp.*على الإنبات عند التراكيز المختبرة.

وقد سجل المستخلص تأثير سميا في أنبات بذور الباذنجان عند معاملتها بالمستخلص الخام ، اذ وصلت نسبة الإنبات الى 33% بالمقارنه مع المعاملة الضابطه 89%.

المقدمـــة

يوصف نبات الكلغان (Milk thistle) *Silybum marianum* الذي ينتمي إلى عائلة زهرة النجمة (Asteraceae) [1] بأنه نبات ثنائي الحول، طوله(1-2) متر، شبه أملس، أخضر شاحب.الساق بسيط قليل التفرع ، مجوف (يحتوي أخاديد)، محاط بزغب معطيا مظهرا قطني.الأوراق كبيرة مزركشة بعروق بيضاء، جيوبها مفصصة أو أبرية الى مثلثة، تحتوي على جيوب مسننة، فصوص مشوكة الأوراق القاعدية تتضيق إلى قاعدة جالسة، الأوراق الموجودة في الساق تتضخم مع محاور مهدبة شوكيه، منتصبة بقوة [3,2] . ويحتوي نبات الكلغان على العديد من المركبات الفعالة طبيا وتتركز هذه المواد في البذور ومن ثم الأوراق. وتعد المركبات الفينولية المعقدة مثل Flavono-lignans التي تعرف بالسيمارين ااكثر المركبات استعمالا في التداوي والعلاج ضد العديد من الامراض [5,4,2].

تعد الفطريات *Fusarium oxysporum , Alternaria sp., Botrytis cinerea* العائدة للعائلة *Dematiaceae* التابعة لرتبة *Moniliales* ضمن الفطريات الناقصة Imperfect fungi (وهي الفطريات التي لم يعرف تكاثرها الجنسي بعد وتتكاثر لا جنسيا بتكوين الجراثيم الكونيدية[6]) من الفطريات المترممه Saprophytic fungi وذي مدى عائلي واسع التي تعد أحد المسببات المرضية للعديد من الأمراض النباتية ، اذ يسبب *Fusarium oxysporum* أمراض الذبول الوعائي وتعفن الجذور Vascular wilt &ّ Root Rot diseases أما الـ *Alternaria sp.* فهو أحد المسببات المرضية لتعفن البذور والجذور Seeds & Roots Rot diseases وأمراض التبقع الالترناري Alteranial diseasesو اللفحات المتأخرة Late blight على العديد من النباتات

ومرض تقرح الساق الالترناري Alternarial Stem Canker. *أما الفطر Botrytis cinerea* فأنه يسبب مرض العفن الرمادي Gray mold disease [7,6] .

وبسبب الآثار السلبية التي يخلفها الاستعمال العشوائي للمبيدات الكيماوئية فقد اتجهت أغلب الأبحاث والدراسات الحديثة إلى الاستفادة من النباتات الطبية و البرية لاستعمالها للحد من العديد من المسببات المرضية التي تسبب خسائر اقتصادية كبيرة اذ تتمتع بعض النباتات بتأثير افضل من المركبات الصناعية [9,8,3].

أستهدف هذا البحث التحري عن فعالية المستخلص الكحولي لأوراق نبات الكلغان على هذه المسببات المرضية ومدى القدرة التثبيطية التي يمتلكها النبات ضد هذه الفطريات .

المواد وطرائق العمل

الفطريات الممرضة

عزلت جميع الفطريات المستعملة في هذه الدراسة من نباتات طماطم و باذنجان مصابه ، اذ أخذت النموات القطنية المتكونة على سطح الثمار المصابة و عزل كل من *Fusarium oxysporum , Alternaria sp.* من نبات الطماطم ،في حين عزل *Botrytis cinerea* من ثمار الباذنجان و بالاعتماد على مفاتيح التصنيف المعتمدة [10] جرى عزل وتشخيص الفطريات على وسط أكار دكستروز البطاطا (PDA) Potato Dextrose Agar ،اذ نقيت العزلة من خلال نقلها إلى أطباق PDA جديدة.

البذور

أخذت بذور الباذنجان (صنف الجنان) وغسلت بالماء المقطر المعقم ، عقمت بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 1% مدة نصف دقيقة أعقبها غسلها بالماء المقطر المعقم و تنشيفها بورق النشاف المعقم لتكون جاهزة للاستخدام .

عينات أوراق نبات الكلغان

جمعت أوراق نبات الكلغان من الحدائق الخلفية للجامعة المستنصريه وبعد غسلها لإزالة الأتربة العالقة ، تركت لتجف في المختبر خلال شهر تموز للعام 2007 . بعدها سحقت لتكوين مسحوق ناعم .

عملية الاستخلاص

تم وزن 100 غم من مسحوق أوراق نبات الكلغان، ونقع في 500 مل من الكحول الايثانولي (بتركيز70%) ، مزج جيدا وترك في حاضنة هزازة مدة 24 ساعة بدرجة 35 م^{o} ،ثم نبذ المستخلص بجهاز الطرد المركزي بقوة 2500 دورة /دقيقة مدة (15) دقيقة ،بعدها رشح الرائق بورق ترشيح (Whatman No.1)، ثم عرض الراشح للتجفيف بدرجة حرارة الغرفة للحصول على مسحوق جاف و حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.[9]

دراسة الفعالية التثبيطية للمستخلص النباتي

تأثير تراكيز مستخلص أوراق نبات الكلغان في النسبة المئوية لتثبيط النمو ألشعاعي للفطريات الممرضة

أتبعت طريقة[11] مع أجراء تعديلات بسيطة، اذ أضيف (16,8,4) مل من المحلول القياسي او الخزين (Stock Solution) لمستخلص الكحولي لأوراق نبات الكلغان بتركيز 100 ملغم /مل إلى (4,8,16) مل على التوالي من وسط PDA المعقم لغرض الحصول على التخافيف (80,40,20) ملغم / مل على التوالي المستخدمه في هذه التجربة .بواقع ثلاثة مكررات لكل تخفيف مع وجود أطباق السيطرة (بدون مستخلص) . تركت الإطباق لتتصلب أعقبها زرع اللقاح الفطري المؤلف من قرص بقطر 6 ملم مقطوع بوساطة ثاقب فلين من حافات مزرعة بعمر

أسبوع. و حضنت الأطباق بدرجة (28)م^{o} مدة أسبوعين. حسبت النسبة المئوية لتثبيط النمو ألشعاعي عند وصول النمو في معاملة السيطرة إلى حافات الطبق .وحسب المعادلة الآتية :

$$\text{نسبة تثبيط النمو ألشعاعي \%} = \frac{\text{معدل النمو ألشعاعي للفطر(سم) في أطباق السيطرة} - \text{معدل النمو ألشعاعي للفطر(سم)في أطباق معاملة}}{\text{معدل النمو ألشعاعي للفطر(سم) في أطباق السيطرة}} \times 100$$

دراسة تأثير تراكيز مستخلص أوراق نبات الكلغان في النسبة المئوية لتثبيط التبوغ وإنبات الابواغ للفطريات الممرضة

بعد نهاية مدة التحضين في الفقرةالسابقة أخذت أقراص قطرها 6 ملم من كل معاملة ووضعت في عبوات زجاجية حجم 10 مل حاوية على 4.5 مل من محلول : فورما لين:حامض الخليك :أيثانول (F.A.A) بنسبة 8:1:1 على التوالي ،رجت العبوة الزجاجية جيدا ، قدرت أعداد الابواغ باستعمال شريحة العد Haemocytometer، أما إنبات الابواغ فقد أخذ أقراص قطرها 6 ملم من الفطريات النامية على الوسط الغذائي(PDA) بعمر سبعة أيام ، وضع كل قرص في عبوة زجاجية معقمة حاوية على 4.5 مل ماء مقطرا معقما، رجت جيدا ثم أخذ 1 مل من المعلق البوغي بوساطة ماصة معقمة ونقل إلى عبوة زجاجية أخرى تحوي على 9 مل ماء مقطرا معقما ليصبح التخفيف النهائي 10 −2 ، أخذ 1 مل من المعلق البوغي ووضع في أطباق بتري معقمة ، ليصب علية وسط الاكار المائي (2%) Water agar الحاوي على تراكيز المستخلص كل على حدة ، حركت الإطباق حركة رحوية وحضنت بعدها في الحاضنة في درجة 28 م^{o} .وأخذت قراءة أنبات الابواغ بعد 48 ساعة و ذلك بالعد في أربعة حقول مجهرية مع تثبيت 25 بوغا لكل حقل [12,11].

دراسة تأثير مستخلص أوراق نبات الكلغان في أنبات بذور الباذنجان

عقمت 10 غم من بذور نبات الباذنجان (ضرب الجنان) بمحلول الكلوراكس 10 % مدة ثلاث دقائق ، وزرعت بعد التعقيم بمقدار 25 بذرة لكل طبق بتري معقم بقطر 9 سم يحوي على ورق ترشيح معقم ،وعملت البذور بمحلول المستخلص الخام بمقدار 5 مل ،مع ترك مجموعة معاملة بـ 5 مل ماء مقطرا معقما للمقارنة، كررت كل معاملة أربع مرات ،حضنت الإطباق في درجة حرارة (28) م^{o} مدة أسبوع ،حسبت النسبة المئوية لإنبات البذور.

النتائـج والمناقشـة

تأثير تراكيز مستخلص أوراق نبات الكلغان في النسبة المئوية لتثبيط النمو ألشعاعي للفطريات الممرضة:-

أشارت نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (1) إلى أن أعلى نسبة مئوية لتثبيط النمو الشعاعي سجلت في معاملة الفطر *Botrytis cinerea* المسبب لمرض العفن الرمادي في الباذنجان ، إذ بلغت 87.97 % ،تلته معاملة الفطر *Fusarium oxysporum* المسبب لمرض الذبول الوعائي في الطماطم ، اذ بلغت النسبة (81. 56 %). وسجلت أقل نسبة مئوية للتثبيط (37.34 %) في معاملة الفطر *Alternaria sp.* المسبب لمرض تعفن البذور و الجذور في نباتات الطماطم .

كذلك أوضحت النتائج أن زيادة التركيز المستخلص أدت إلى زيادة في النسبة المئوية للتثبيط الشعاعي فقد كانت 31.31 %في معاملة (20) ملغم /مل لترتفع ويصل معدلها الأقصى الى (88.55 %) . أما عن التداخل بين الفطر والتركيز ، فقد أخفق الفطر *Botrytis cinerea* في النمو بصورة كلية على الوسط الغذائي الصلب PDA في التركيزين (40, 80)ملغم / مل ، التي لم تختلف معنوية نتائجها عن معاملة الفطر المسبب لمرض الذبول الوعائي في الطماطم *Fusarium oxysporum* في التركيز 80 ملغم / مل ، في حين سجلت أقل نسبة

مئوية للتثبيط الشعاعي في معاملة الفطر *Fusarium oxysporum* في تركيز (20)ملغم / مل وقد بلغت 18.00 % . ومن الجدير بالذكر أن الفطر *Alternaria sp.* المسبب لمرض تعفن البذور و الجذور تمكن من النمو على جميع التراكيز المدروسة (20, 40 ,80) ملغم / مل ، ولو بنسب متفاوتة. الجدول(1).

ان الفعالية التثبيطية العالية لمستخلص أوراق نبات الكلغان قد تعود إلى تأثير المركبات الفعالة الموجودة في المستخلص مثل الفلافونويدات Flavonoids و الكومارينات Coumarins و القلويدات Alkaoids والصابونينات Saponiuns ومواد مخاطية Mucilage's materials وزيوت طيارة Volatile oils و والتربينات Terpenoids كما تحتوي على histamine, tyramine وعلى المواد المرة أيضاً مثل الراتنجات Ressins [15,14,13,4].

دراسة تأثير تراكيز مستخلص أوراق نبات الكلغان في النسبة المئوية لتثبيط التبوغ وإنبات الابواغ للفطريات الممرضة :

أشارت نتائج التحليل الإحصائي المبينة في الشكل (1 و 2) إلى تفاوت نسب تثبيط التبوغ و أنبات الابواغ للفطريات المختبرة ، إذ أخفقت ابواغ الفطر *Botrytis cinerea* و *Fusarium oxysporum* في الإنبات عند التركيز 80 ملغم / مل ، في حين سجلت نسبة تثبيط التبوغ و أنبات الابواغ (82.43 و 86.06 %) للفطر المسبب لمرض تعفن البذور و الجذور *Alternaria sp.* ، على التوالي . ولابد من الإشارة إلى أن هذا الفطر أستطاع الإنبات في جميع التراكيز المختبرة و لو بنسب متفاوتة. أن تثبيط التبوغ وإنبات الابواغ بفعل المستخلصات النباتية قد أشير اليه في دراسات عديدة أثبتت أخفاق الفطريات الممرضة للنبات في تكوين الابواغ و الإنبات مثل *Aspergillus fumigatus* و *Botrytis fabae* و *Alternaria sp.* و *Azotobacter tennisima* [18,17,16,15].

تأثير مستخلص أوراق نبات الكلغان في أنبات بذور الباذنجان:

سجل المستخلص الخام لأوراق نبات الكلغان تأثيرا" سميا" على أنبات بذور الباذنجان ، التي سجلت نسبة أنبات بلغت 33 % عند معاملتها بـ 5 مل من المستخلص الخام واختلفت معنويا عن معاملة السيطرة 89 % الشكل (3). وكما سبق أن ذكرنا فأن المركبات الفعالة لها دور في التثبيط التي يمكن أن يكون لها دور لتثبيط نسبة الإنبات . وسيما" وجود الفلافوندات التي تعد مثبطات نباتية تؤثر في نموالنبات ، أما بتقليل الانقسام الخلوي أو استطالة الخلايا ومن ثم قله في معدل النمو والإنبات [20,19] .

ان البحث الحالي أثبت القدرة التثبيطية العالية للمستخلص الايثانولي لأوراق نبات الكلغان لمؤشرات النمو المدروسة للفطريات الممرضة للنبات ؛ مما يوفر أمكانية أجراء دراسات مستفيضة عن دور المركبات الفعالة في المستخلص ، وإمكانية الاستفادة من زراعة الأنسجة لتطوير مقدرة النبات على أنتاج هذه المركبات الفعالة لاعتمادها في برامج مكافحة لممرضات النباتية .بالرغم من وجود جانب سلبي للمستخلص الايثانولي مثل تأثيره السمي في أنبات بذور الباذنجان.

المصادر

1 - Brown, D. (1993). Silymarin education monograph. Herbal Res. Update Summer: 23-36.

2- Schulz, V.; Hansel, R .and Tyler, V.E. (1998) .Rational phytotherapy: As physician guide to herbal medicine, 3rd .Berlin: Springer.P528

3- يحيى، توفيق الحاج. (2003)النبات والطب البديل.الدارالعربية للعلوم.مطبعة المتوسط_ جامعة بيروت– لبنان.

4- Zheljazkov,V.D.,I. Zhalnov,and N.K.Nedkov.(2006).Herbicides for weed control in blessed thistle*(Silybum marianum)* .Weed Technol.20: 1030-1034.

5- Tedesco,D.; Steidler, S.; Galletti, S.; Tamen, M.; Sonzogni, O.& Ravarotto, L. (2004).Efficacy of Silymarin-Phospholipid complex in reducing the toxicity of aflatoxin B-1 in broiler chicks. Poultry Sc.83:(1839-1843). Agrios. George, N. (1997). Plant Pathology. 4 th Edition.

6- Agrios. George, N. (1997). Plant Pathology. 4 th Edition.

7 - أسطفان ، زهير عزيز. محمود، حازم عبد العزيز. (1998). أفات الطماطم.مطبعة أدورد للطباعة الفنية الحديثة . وزارة الثقافة والأعلام..

8 - شعبان،عواد؛ الملاح، نزار مصطفى (1993) . المبيدات . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة الموصل . دار الكتب للطبع والنشر . ص 502 .

9- Anessing, C. and Perez, C. (1993). Screeing of plants used in Argentine Folk Medicine for antimicrobial activity.P750

10 - Alexopulus C.J. & Mims C.W. (1979). Introductory Mycology (3rd Edition) print in Singapore .P601

11-Levinson, W.and Jawetz,E.(1998). Medical Microbiology and Immunology. Examination and board Review. 5th Ed. Lange Medical Book \McGraw –Hill.NewYork.

12- Suberu, H. (2004). Preliminary studies of inhibitions in *Aspergillus flavus* with extract of tow lichens and Bentex- T fungicides. Africa J. of Biotech. 3(9):468-472.

13- Wangkiat, A. (2005). Antifungal effect of medicinal herb extracts on some plant pathogenic fungi. Bangkok (Thailand).

14- Cammine, A. and Burges, B.B.A. (2003**).** *Silybum marianum* (Milk thisthe). J. Pharmacy Society of Wiscontion.

15- Taylor,J.L.S.T.Rabe ,L.J.McGaw,A.K.Jager.and J. Van Staden.(2001).Towardshe Scientific Validation of traditional medicinal plants.Plant Growth Regul.34,23-37.

16- الدليمي .إبراهيم جابر عبد. (2005). دراسة طرق استخلاص المواد الطبية من نبات الكلغان *Silybum marianum* ومدى تأثيرها في نمو بعض الأحياء المجهرية الممرضة. رسالة ماجستير / جامعة بغداد /علوم الحياة/علم النبات.

17- Mayah, A.A.S. and Al- Waily , D.S. (2002). Inhibitory effect of some aqueous plant extracts *on Aspergillus fumigaus* of *chickens in vitro*. Al-Qadisiya J. vet.Med.Sci. 1(2):54-57.

18- Mohamoud, Y.A.G.; Ebrahim, M.K.H. & Aly, M.M. (2004) Influence of some plants extracts and micro-bioagents on some physiological triats of faba bean infected with *Botrytis fabae* . Turk Bot. 28 :(519-528).

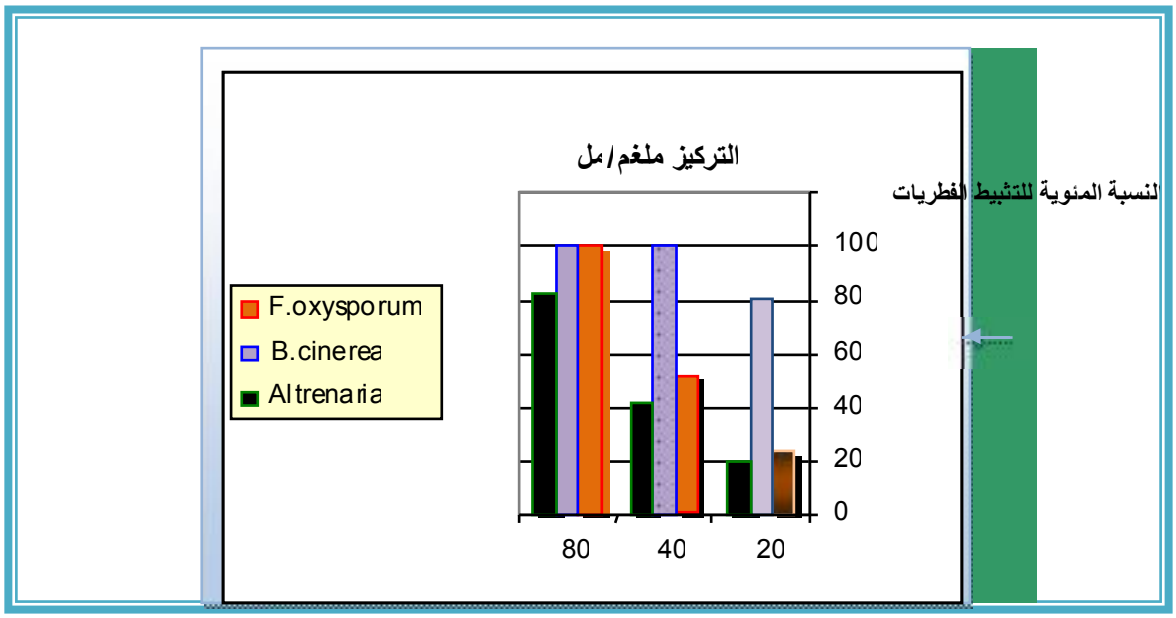
19- Narayana ,K.R.;Reddy, M.S.,Chaluvadi, M.R. and Krishna,D.R. (2001).Bioflavonoid Classification pharmacological ,biochemical effects and therapeutic potent . J. Phrenology. 33, 2-16.

20-Ahmed,E.A.T.Noor,A.Malik,S.Ferheen &N.Afza.(2007).Structural determination triterpenes from *Silybum marianum* by 1D&2D NMR spectroscopy. Magn Reson.Chem.45 : 79-81.

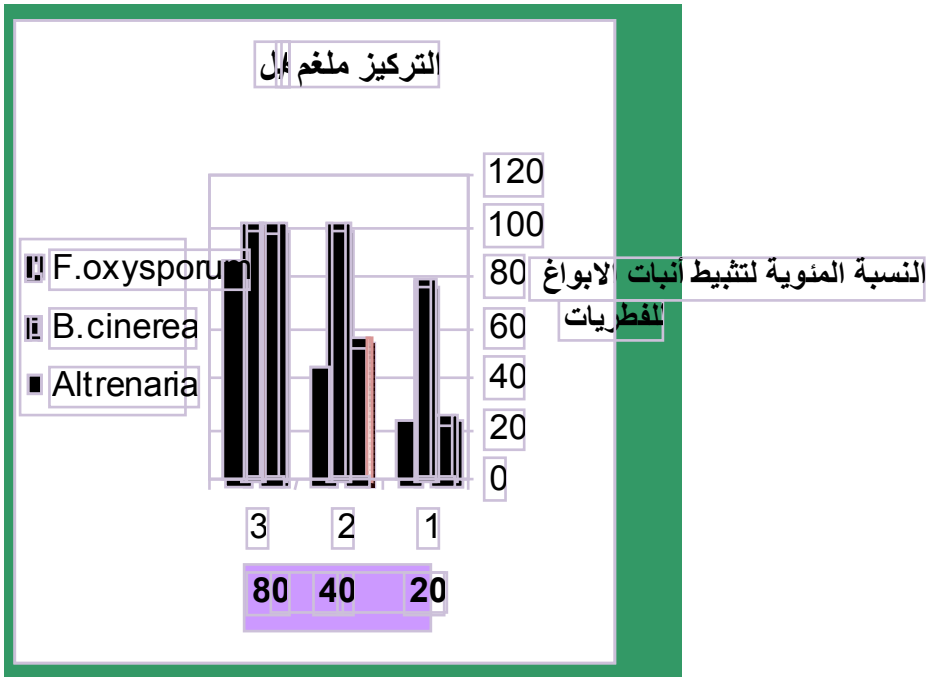
جدول (1):تأثير تراكيز مستخلص أوراق نبات الكلغان في النسبة المئوية لتثبيط النمو الشعاعي لبعض الفطريات الناقصة في أطباق زجاجية

الفطريات	التركيز ملغم/مل			متوسط الفطريات
	20	40	80	
Fusarium oxysporum	**18.00**	**52.44**	**100**	**56.81**
Botrytis cinere	**63.91**	**100**	**100**	**87.97**
Alternaria sp.	**12.04**	**34.32**	**65.67**	**37.34**
متوسط التركيز	**31.31**	**62.25**	**88.55**	

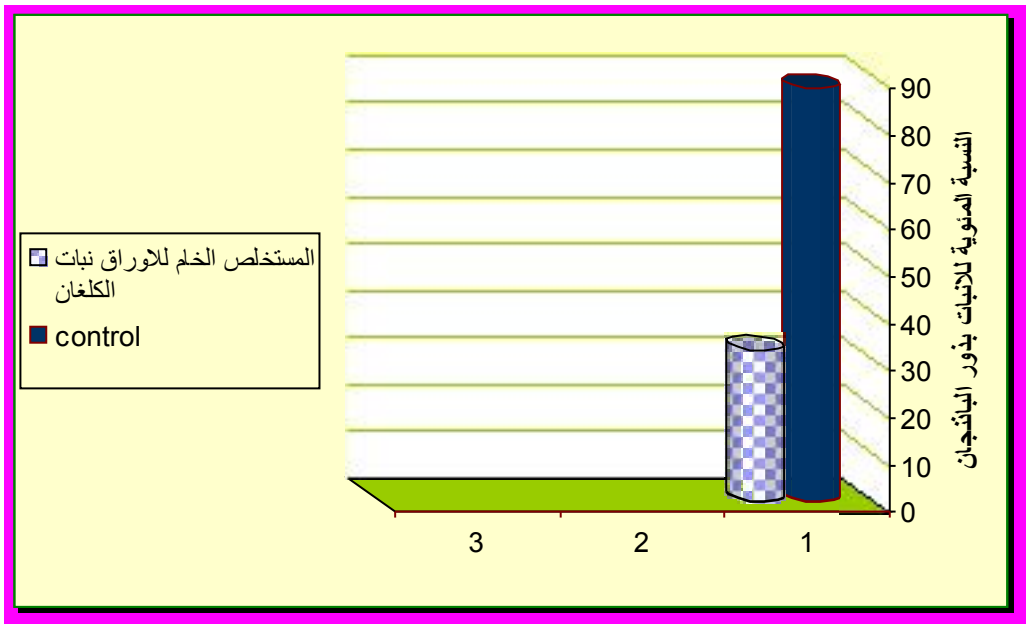
L.S.D (0.01) للفطريات= 4.1, وللتركيز = 3.5, وللتداخل بين الفطريات والتركيز = 2.4



شكل (1): تأثير تراكيز مستخلص أوراق نبات الكلغان في النسبة المئوية لتثبيط التبوغ للفطريات المدروسة



الشكل (2): تأثير تراكيز مستخلص أوراق نبات الكلغان في النسبة المئوية لإنبات الابواغ للفطريات المدروسة



شكل (3): النسبة المئوية لانبات بذور الباذنجان بوجود المستخلص الخام لأوراق نبات الكلغان

Study of Antifungal Activity of *Silbum marianum* Extracts Against Some Species of Imperfect Fungi

D.Y.M.Yousif
Department of Biology , College of Science, University of Al- Mustansiriya

Abstract

This research was conducted to determine the effect of different concentrations of (milkthistle) *Silbum marianum* leaves extracts on some plant pathogenic fungi included: *Fusarium oxysporum, Alternaria sp., and Botrytis cinerea.*

Results showed the high antifungal activity of milk thistle leaves extract; this was evident at high concentration of extract (80) mg\ml, which completely inhibited the radial growth on solid media (PDA) for pathogens *Fusarium oxysporum and Botrytis cinerea*. While the spores of pathogen *Alternaria sp.* was able to grow in all concentration which used in this study.

The extract had toxic effect on the eggplant seeds germination when treated with 5 ml of crude extract, the germination percentage reached 33% compared to 89% in control treatment.