الفطريات المستنبتة في أوراق وأغصان اللبخ *Albizia lebbeck* وفعاليتها المضادة للفطريات

بتول زينل علي
احمد عبد الأمير محمد
قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم - (الصرفة ابن الهيثم) /جامعة بغداد

استلم في: 15/ايلول /2014 , قبل في : 20/تشرين الاول / 2014

الخلاصة

استهدفت هذه الدراسة عزل وتشخيص الفطريات المستنبتة في أوراق واغصان نبات اللبخ *Albizia lebbeck* واختبار فعاليتها المضادة لبعض الفطريات الخيطية المرضية للنبات. أظهرت النتائج الحصول على 57 فطراً مستنبتاً من مجموعة 240 قطعة أوراق وأغصان بشدة استيطان 47.43%، مثلت الفطريات المعزولة 16 نوعاً فطرياً سادت فيها أنواع جنس *Aspergillus* (6 أنواع) وثلاث عزلات من جنس *Penicillium* ونوع واحد أو اكثر من جنس *Paecilomyces*، *Drechslera*، *Fusarium*، *Curvularia*، *Nigrospora* وفطر عقيم شفاف، واظهرت النتائج اختلافاً معنوياً في شدة استيطان أو تردد الأنواع المختلفة في جزأي النبات المختلفة. اختبرت الفطريات المعزولة بطريقة الزراعة المزدوجة Dual culture على الوسط الصلب لدراسة فعالية التضاد Antagonism بينها وبين ثلاثة أنواع من الفطريات الممرضة للنبات: *Fusarium oxysporum*، *Fusarium graminearum* و *Macrophomina phaseolina* أظهرت النتائج اختلاف فعالية التضاد معنوياً تجاه هذه الممرضات باختلاف الفطر المستنبت والممرض التي قومت اعتماداً على النسب المئوية للتثبيط، وظهرت عدة حالات لتضاد وبين هذه الفطريات والممرضات تراوحت بين تطفل فطر آخر Mycoparasitism الى حالة التنافس Competition الى تكوين منطقة تثبيط للنمو بينهما. تعطي هذه النتيجة إشارة الى كفاءة استعمال الفطريات المعزولة في التطبيقات الزراعية كعوامل مقاومة احيائية تجاه الممرضات الفطرية النباتية.

الكلمات المفتاحية: الفطريات المستنبتة ونبات اللبخ وفعالية التضاد.

المقدمة

الفطريات المستنبتة هي الفطريات التي تغزو انسجة النبات الداخلية من دون احداث اعراض مرضية ظاهرة على النبات العائل [1]، وهي تستوطن الأجزاء الخضرية والتكاثرية والجذور بعلاقة تكافلية Mutualism. أظهرت العديد من الدراسات سعة انتشار هذه الفطريات ووجودها في جميع النباتات التي فحصت منذ اكتشافها لغاية الوقت الحاضر [1، 2]. كما أظهرت الدراسات ان كل نبات يمكن ان يستوطن بنوع واحد أو اكثر من هذه الفطريات، وقد يصل عددها الى مائة نوع [3]. فضلاً عن النباتات الراقية، إذ أمكن عزل الفطريات المستنبتة من المجاميع النباتية الأخرى مثل الطحالب، والحزازيات، والسرخسيات، والاشنات [4، 5].

تؤدي الفطريات المستنبتة أدواراً حيوية مهمة وإيجابية تجاه عائلاتها النباتية من ضمنها تحفيزها للنمو عن طريق آليات مختلفة [6]، كما تعمل على زيادة مقاومة النبات للاجهادات البيئية كالجفاف والملوحة ودرجات الحرارة العالية [7]، فضلاً عن فاعليتها في تحفيز مقاومة النبات تجاه الممرضات المختلفة وبآليات مختلفة [8]. وأظهرت الفطريات المستنبتة قابلية لانتاج مواد ايض ثانوية رائدة وفعالة لها فعاليات احيائية متعددة منها مضادات السرطان، ومضادات الاحياء المجهرية، ومضادات الاكسدة، مضادات الحشرات ومركبات مخفضة للمناعة، ومركبات مضادة للطفيليات والفايروسات [9، 10، 11]. وأشار العديد من الباحثين الى ان هذه الفطريات هي مصانع كيميائية داخل النبات [12، 13]. كما لقيت هذه الفطريات الكثير من الاهتمام في الوقت الحاضر وذلك لان المركبات التي تنتجها غالباً ما تكون مشابهة لما هي عليه في نباتاتها العائلة وذلك يعود إلى تطورها ومعيشتها التكافلية معها التي قد تؤدي الى انتقال الجينات بينهما، تشمل هذه المركبات القلويدات، والفلافونويدات، والكوينونات، وحوامض فينولية، وتربينات، وغيرها من المركبات الفعالة التي لها تطبيقات فعالة مختلفة زراعية وصناعية وطبية [14، 15]. لذلك أشارت العديد من الدراسات الى ان نواتج أيض الفطريات المستنبتة يمكن ان تكون بدائل للمركبات والمضادات الصناعية التي تزداد مقاومة الاحياء المجهرية لها بمرور الزمن فضلاً عن إمكانية تراكمها في البيئة من دون تحلل وتأثيراتها الصحية في الانسان والحيوان [8، 16]. كما اشير الى انها مركبات لها فعالية احيائية مشابهة لتلك الموجودة من نباتات العائلة يمكن ان يقلل الاعتماد على النباتات ولاسيما بطيئة النمو أو النادرة او التي تنمو في بيئات محددة، كما ان المصدر الميكروبي ولاسيما مصدر الفطريات المستنبتة يعد أكثر اقتصادياً، اذ يمكن ان تزرع الفطريات وتنمى بنحو سريع كما يمكن الحصول على كتلة حيوية كبيرة باستعمال مخمرات كبيرة [16، 17].

نبات اللبخ هو من أشجار الظل الكبيرة واسع الانتشار جغرافياً، يزرع في المتنزهات والشوارع والحدائق المنزلية ويعد من النباتات الطبية المهمة، اذ اشارت الدراسات الى احتوائه على العديد من المركبات الفعالة احيائياً كالفينولات،و الستيرويدات، والاحماض الامينية، والكربوهيدرات، والدهون كما يحوي على كلايكوسيدات قلبية وصابونينات وتانينات [18]. مستخلص أوراقه له تأثيرات مضادة للاكسدة، مضادة للبكتريا، ويستعمل هذا النبات في الطب الشعبي لعلاج امراض العين والعشو الليلي، كذلك يستعمل لعلاج الامراض الجلدية والزهرية، لعلاج قرحة المعدة، والسعال، واضطرابات الجهاز التنفسي وامراض الدم فضلاً من التهاب الاسنان وغيرها عن الفعاليات الأخرى [18، 19].

لذلك استهدفت هذه الدراسة التحري عن انتشار ووجود الفطريات المستنبتة في أوراق واغصان اللبخ ودراسة فعاليتها المضادة لبعض الممرضات النباتية الفطرية.

المواد وطرائق العمل

-**عينات النبات**: تم الحصول تم الحصول على عينات أوراق وأغصان من 12 لبخ *Albizia lebbeck* سليمة وغير مظهرة للأعراض المرضية للمدة أيلول- تشرين الأول (2013) من جانبي الكرخ والرصافة في محافظة بغداد، جُمعت العينات في أكياس بلاستيكية نظيفة ونقلت إلى المختبر لادراء عزل الفطريات منها في يوم الجمع نفسه.

-**عزل الفطريات المستنبتة:** أتبعت طريقة [20] في ذلك إذ تم غسل عينات الأوراق والأغصان بكمية وافرة من ماء الحنفية لإزالة الأتربة والغبار ثم قطعت الأوراق والأغصان إلى قطع صغيرة (0.5-1) سم بواسطة المقص وعقمت بالكحول الاثيلي (75)% لمدة دقيقة واحدة، ثم غمرت بعد ذلك في محلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز (2.5)% لمدة (4) دقائق، بعدها عقمت بالكحول الأثيلي بتركيز (75)% لمدة (30) ثانية، ثم غُسلت 3 مرات بالماء المقطر المعقم وجففت بواسطة أوراق ترشيح معقمة. زُرعت القطع في أطباق بتري حاوية على وسط (PDA) المضاف له الروز بنكال (0.05 غم/ لتر) قبل التعقيم للحد من نمو الفطريات السريعة النمو كما اضيف المضاد الحيوي كلورامنفيكول بنسبة (0.05 غم/ لتر) بعد التعقيم للحد من نمو البكتريا، وزعت 5 قطع من أجزاء النبات لكل طبق بأبعاد متجانسة، ثم غلفت الأطباق بشريط شمعي (Parafilm) بدرجة حرارة (25±2) م لمدة (3-4) أسابيع مع مراقبة نمو المستعمرات يومياً. عُزلت المستعمرات النامية من قطع النسيج النباتي ونُميت على وسط PDA الخالي من الإضافات لتشخيصها. تم تشخيص الفطريات بالاعتماد على الصفات المزرعية والمظهرية الدقيقة للعينات بواسطة المجهر الضوئي بالاعتماد على المصادر التصنيفية [20، 21، 22، 23، 24]. حُفظت العزلات الفطرية على وسط (PDA) المائل وتم حساب النسب المئوية لتردد مستعمرات الفطريات المستنبتة (النسبة المئوية للاستيطان (Colonization frequency) وبالاعتماد على ما جاء في [25]:

$$\text{النسبة المئوية للاستيطان}\%(\mathbf{C.F.}) = \frac{\text{عدد القطع التي ظهرت فيها مستعمرات الفطر(عدد عزلات الفطر)}}{\text{عدد القطع الكلية المزروعة(عدد الفطريات الكلي)}} \times 100$$

-اختبار فعالية التضاد للفطريات المستنبتة تجاه بعض الفطريات: اتبعت الطريقة التي اعتمدها [26] والمتمثلة بطريقة الزراعة المزدوجة Dual culture methods على الوسط الصلب وذلك بأخذ قرص من النمو الفطري لكل من الفطريات المستنبتة والفطريات المختبرة (*F. oxysporum*، *F. graminearum* و*M. phaseolina*) من مزارع حديثة بعمر 7 أيام بواسطة ثاقب الفلين بقطر 3 ملم، وضع القرصان في طبق حاوي على وسط PDA بمسافة فاصلة بينهما نحو 5 سم، كما استعملت أطباق مقارنة للفطر الممرض لوحده بثلاثة مكررات للمعاملتين. تم حضن الأطباق في درجة حرارة (25±2)°م لحين وصول طبق السيطرة إلى الحافة، وتم حساب قطر المستعمرة (معدل قطرين متعامدين) للفطر الممرض، وقدرت القدرة التضادية للفطريات المستنبتة على أساس نسبة تثبيط الفطريات الممرضة وبحسب المعادلة الآتية:

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط } \% = \frac{\text{ق1} - \text{ق2}}{\text{ق1}} \times 100$$

إذ ان: ق$_1$= قطر مستعمرة الفطر الممرض وحده

ق$_2$= قطر مستعمرة الفطر الممرض من المزرعة المزدوجة

وتمت ملاحظة ما إذا كان التداخل بينهما بصورة تثبيط (تكوين منطقة منع للنمو) أو نمو إحداهما فوق الاخر. وتم تحليل نتائج التجربة بالاعتماد على المقياس (Scale) الذي اعتمده (27) والذي يوضح:

0 = No growth
1 = 1 – 25 % growth inhibition
2 = 26 – 50 % growth inhibition
3 = 51 – 75 % growth inhibition
4 = 76 – 100 % growth inhibition

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج عزل الفطريات المستنبتة فـي أوراق وأغصان اللبخ جدول (1) المستحصل عليها من مجموع 240 قطعة من الأوراق والأغصان (120 قطعة أوراق و120 قطعة أغصان)، الحصول على عدد كلي للفطريات المعزولة بواقع 57 فطراً مستنبتاً بنسبة استيطان كلية مساوية الى 47.43% توزعت بين 31 عزلة من الأوراق بنسبة استيطان 25.79% و26 عزلة من الأغصان بنسبة استيطان 21.64%. تتفق هذه النتيجة مع ما وجده (25، 28) من أن الأوراق تحوي بنسبة في الفطريات أعلى من الأغصان، كما ذكر (27) بأن الاختلافات في نسبة عزل الفطريات من الاوراق عن الساق قد تعود إلى ألفة (Affinity) هذه الفطريات للأنسجة المختلفة التي تعكس قابليتها للاستغلال أو المعيشة في مادة أساس معينة (أنسجة لها شكل وتركيب كيميائي مختلف) يوضح الجدول (1) الحصول على 16 نوعاً فطرياً موزعاً بين 14 نوعاً في الأوراق وعشرة أنواع من الأغصان، سادت في الجزأين أنواع جنس *Aspergillus* على بقية الأنواع وتمثلت بالأنواع *A. niger* و*A. flavus* التي سادت في جزأي النبات بنسبة استيطان 5% و4.16% لكلا النوعين على التوالي من الاوراق بنسبة 3.33% لكلا النوعين من الاغصان. كما تم عزل أنواع أخرى من جنس *Aspergillus* من الأوراق وهي *A. fumigatus*، *A. glauscus* و*A. raperi* بنسبة استيطان 0.83% لكل منهم من الاوراق، اما من الاغصان فلم يعزل النوع *A. glauscus* الذي ظهر في قطع الأوراق، وعُزل النوعان *A. raperi* و*A. fumigatus* بنسبة 2.50 و0.83% على التوالي. كما أمكن الحصول على عدد من عزلات البنسليوم مختلفة الصفات المظهرية للمستعمرات والمتمثلة بـ *Pen.*sp.1, 2, 3 كما آوت الاوراق الأنواع *Curvularia cymbopogonis*، *Fusarium solani*، *F. verticilloides*، *Paecilomyces* sp. و*P. variotii* التي لم يتم عزلها من الاغصان، بالمقابل ظهر النوع *A. sclerotioniger* في الاغصان ولم يعزل من الأوراق كما عزل الفطر *Drechslera australiensis* من جزأي النبات بنسبة استيطان متساوية 1.66% فضلاً عن عزل فطر عقيم شفاف من قطع الاغصان.

ان نسب عزل الفطريات المستنبتة من جزأي النبات في هذه الدراسة التي تراوحت بين 0.83-8.33%؛ سجلت كذلك في دراسات عديدة تختص بالفطريات المستنبتة في نباتات أخرى [1، 26، 28]. ان انخفاض نسبة العزل هذه قد تعود الى احتواء النبات لمواد مضادة للفطريات [29] وقد يكون السبب نتيجة التأثيرات البيئية التي تؤثر في انتشار وتوزيع الفطريات المستنبتة. كما ان أغلب الفطريات التي عزلت في هذه الدراسة تتطابق مع الفطريات المعزولة في دراسات أخرى من نباتات أخرى [1، 27، 28، 30، 31].

-فعالية التضاد للطريات المعزولة اتجاه بعض الفطريات المرضية للنبات: اشارت العديد من الدراسات الى تداخلات التضاد بين الاحياء المجهرية يمكن ان تعتمد في المقاومة الاحيائية تجاه الممرضات. أظهرت النتائج في (جدول 2) ان هنالك اختلافاً في فعالية التضاد للفطريات المستنبتة والمعزولة تجاه الممرضات الثلاثة المختبرة باختلاف الفطر المستنبت والممرض. من الجدول أظهر الفطر *A. niger* أعلى فعالية تضاد تجاه الفطر *F. oxysporum* (النسبة المئوية للتثبيط 67.30% ومقياس 3) تلاه النوعان *F. verticilloides* و*Paecilomyces variotii* (نسبة التثبيط 60.30% ومقياس 3). اما العزلات *F. solani*، Mycelia sterilia، *A. fumigatus*، *A. sclerotioniger*، *C. cymbopogonis* و *Pen.* sp.2فأظهرت نسب تثبيط تراوحت بين أعلاه 57% واوطأ نسبة 50.33% التي تقع كذلك ضمن المقياس 3، وأظهرت بقية العزلات نسب تثبيط <50>40% وظهر المقياس 2.

اما تضاد هذه الفطريات تجاه الفطر *F. graminearum* فأظهرت الفطريات الآتية: *C. cymbopogonis* (نسبة التثبيط 60.70%)، *A. niger*، *A. sclerotioniger* و*F. verticilloides* نسب تثبيط 59.97، 59.67، 59.33% على التوالي، وأظهرت العزلات *A. fumigatus*، *F. solani*، *Paecilomyces* وMycelia sterilia نسب تثبيط بين 51.83-56.23% وضمن المستوى 3 كذلك. اما بقية العزلات فأظهرت نسبة تثبيط <50>40% ضمن مستوى 2.

اما تضاد الفطريات المستنبتة تجاه الفطر *M. phaseolina* فأظهرت أجمعها نسب تثبيط أقل مما اظهرته تجاه نوعي الفطر *Fusarium* وكان اعلاها تثبيطاً ضمن المستوى 3 هو الفطر Mycelia sterilia (نسبة التثبيط 50.56%) اما بقية العزلات فأظهرت نسب تثبيط تراوحت بين أعلاها 46.60% وأوطئها 26.63% أي ضمن المستوى 2 مما يدل على الفعالية التضادية الواطئة للفطريات قيد الدراسة تجاه هذا النوع المرضي من الفطريات.

وتظهر فعالية التضاد بين الفطريات المستنبتة والفطريات المرضية التي تلاحظ نتائجها كذلك في الصورة (1) ان هنالك عدة حالات للتضاد ظهرت في هذه الدراسة بين الفطريات المستنبتة والممرضات المختبرة وهي:

1.الفطر المستنبت المضاد ينمو فوق الفطر الممرض (صورة 1 أ) وفي هذا المجال اشارت الدراسات الى أن نمو أحد الفطريات فوق الآخر بطريقة الزراعة المزدوجة يدل على فعالية التطفل الفطري (Mycoparasitism) الذي يؤدي إلى إفراز أنزيمات من الفطر الطفيلي تحلل جدران هايفات الفطر الشريك وقد تقتله (32).

2.الفطر الممرض ينمو فوق الفطر المستنبت المضاد (صورة 1 ب) وفي هذه الحالة أظهر الفطر الممرض *F. oxysporum* فعالية ضعيفة للنمو فوق الفطر المستنبت *C. cymbopogonis* التي تدل على فعالية التطفل الفطري (Mycoparasite) للفطر *F. oxysporum* تجاه الفطر المستنبت.

3.نمو كلا النوعين من الفطريات باتجاه الآخر، ويتوقفان عند نقطة التماس بينهما (صورة 1 جـ) دون تكوين منطقة منع للنمو، اذ يظهر النوعان تنافساً على الغذاء والمكان وتعتمد على سرعة ومعدل نمو الفطر وتختلف باختلاف الفطر المضاد والممرض.

4.وجود منطقة منع للنمو بين الفطرين الناميين (صورة 1 د، هـ، و، ز) وفي هذا الصدد ذكر (13) أن من بين كل حالات التضاد التي لوحظت تعدّ الحالة الأخيرة هي المهمة التي تدل على فعالية الفطر المستنبت او الممرض في إفراز مواد مضادة تمنع نمو وتطور الفطر الشريك، كما أشار عدد من الباحثين الى ان وجود منطقة منع للنمو بين الفطرين بطريقة الزراعة المزدوجة تدل على إفراز أحد الفطرين مواد مضادة أو سموم اتجاه الاخر (34، 35).

وخلاصة القول أظهرت النتائج كفاءة بعض الفطريات المستنبتة في منافستها للفطريات الممرضة على الغذاء أو المكان Competition فضلاً عن قابليتها لانتاج مواد مضادة Antibiotic أو سموم وقابليتها على التطفل على الفطريات Mycoparasitism، وان كل هذه الفعاليات تعطي إشارة الى كفاءة الفطريات المستنبتة في المقاومة الاحيائية Biological control للسيطرة على امراض النبات المتسببة عن الفطريات التي اكدتها كذلك العديد من الدراسات [36، 37].

المصادر

1-Anitha, D.; Vijaya, T.; Pragathi, D.; Reddy, N. V.; Mouli, K. C.; Venkateswarulu, N. & Bhargav, D. S. (2013). Isolation and characterization of endophytic fungi from endemic medicinal plants of *Tirumala hills*. Internat. J. Life Sci. Biotechn. & Pharm. Res., 2(3): 367-373.

2-Powthong, P.; Jantrapanukorn, B.; Thongmee, A. & Suntronthiticharoen, P. (2012). Evalution of endophytic fungi extract for their antimicrobial activity from *Sesbania grandiflora*. Int. J. Pharmac. & Biomed. Res., 3(2): 132-136.

3-Sanchez Marquez, S.; Bills, G. F. & Zabalgogeazcoa, I. (2007). The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. Fungal Divers., 27: 171-195.

4-Zucucro, A.; Schoch, C. L.; Spatafora, J. W.; Kohlmeyer, J. (2008). Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*. Appl. Environ. Microbiol., 74(40: 931-941.

5-Suryanarayanan, T. S.; Venkatachalam, A.; Thirunavukkarasu, N.; Ravishankar, J. P.; Doble, M. & Geetha, V. (2010). Internal mycobiota of marine macroalgae from the *Tamilnadu coasti*: distribution, diversity and biotechnological. Botanica Marina, 53: 457-468.

6- Dai, C. C.; Yu, B. Y. & Li, X. (2008). Screening of endophytic fungi that promote the growth of *Euphorbia pekinensis*. Afric. J. Biotechn., 7(19): 3505-3510.

7-Malinowski, D. P. & Belesky, D. P. (2000). Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. Crop Sci., 40(4): 923-940.
8- Mandyam, K. & Jumpponen, A. (2005). Seeking the elusive functions of the root colonizing dark septa endophytic fungi. Studies Mycol., 53: 173-189.
9-Aly, A. H., Debbab, A.; Clements, C.; Ebel, R. A. E.; Orlikova, B.; Diederich, M.; Wrary, V.; Lin, W.H. & Proksch, P. (2011). NF Kappa B inhibitors and antitrypanosomal metabolites from endophytic fungus *Penicillium* sp. Isolated from *Limonium tubiflorum*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 19(1):414-412.
10- Huang, W. Y.; Cai, Y. Z.; Xing, J.; Corke, H. & Sun, M. (2007). Potential antioxidant resource endophytic fungi isolated from traditional Chinese medicinal plants. Econ. Bot., 61(1): 14-30.
11- Isaka, M; Bekkaew, P.; Intereya, K.; Komwijit, S. & Sathitkunanon, T. (2007). Antiplasmoidial and antiviral cyclohexadepsi peptides from the endophytic *Pullularia* sp. BCC 8613. Tetrahedron, 63(29): 6855-6860.
12- Tejesivi, M. V.; Kini, K. R.; Prakash, H. S.; Subbiah, V. & Shetty, H. S. (2007). Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. Fungal Div., 24: 37-54.
13-Prabavathy, D. & Vallinachiyar, C. (2013). Antimicrobial and antidiabetic activity of an endophytic fungi isolated from *Adathoda beddomei.* Int. J. Pharm. & Pharmac. Sci., 5(3): 780-783.
14- Strobel, G. & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiol. & Molec. & Biol. Rev., 67(4): 491-502.
15-Lou, J.; Fu, L.; Luo, R.; Wang, X.; Luo, H. & Zhou, L. (2013). Endophytic fungi from medicinal herb *Salvia mitiorrhiza* bunge and their antimicrobial activity. Afr. J. Microbiol. Res., 7(4): 5343-5349.
16-Sadrati, N.; Daoud, H.; Zerroug, A.; Dahamna, S. & Bousharati, S. (2013). Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Tritcum durum*). J. Plant Prot. Res., 53(2): 128-136.
17- Idris, A. M.; Al-Tahir, I. & Idris, E. (2013). Antibacterial activities of endophytic fungi extracts from the medicinal plant *Kigelia africana* Egypt. Acad. J. Biol., 5(1): 1-9.
18- Affandi, H.; Nuryadin, A. & Read, R. W. (1998). Studies on natural products of *Albizia* sp. Biotropia, 11: 1-8.
19- Saha, A.; & Ahmed, M. (2009). The analgesic and anti-inflammatory activities of the extracts of *Albizia lebbeck* in animal model. Pak. J. Parmac. Sci, 22(1): 74-77.
20- Chhetri, B. K.; Maharjan, S. & Budhathoki, U. (2013). Endophytic fungi associated with twigs of *Buddle asiaticalour*. J. Sci. Engin. & Technol., 9(1): 90-95.
21- Ellis, M. B. (1971). Dematiaceous hyphomycites Kew: Common wealth mycological institute: 608.
22- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi: 3rd edition, Burgess Publishing Company: 273.
23-Qualhato, T. F.; Lopes, F. A.; Steindroff, A. S.; Brandao, R. S.; Jesuino, R. S. & Ulhoa, C. J. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathologenic fungi: Evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. Biotechnol. Lett., 35(9): 1461-1468.
23- Samson, R. A.; Hoekstra, E. S. & Oorschot, C. A. N. (1984). Introduction to food-borne fungi. 2nd ed. Boarn, Netherlands: Centeral odbureau voor Schimmel cultures: 284.
24- Samson, R. A.; Noonim, P.; Mejer, M.; Houbraken, J.; Frisvad, J. C. & Varga, J. (2007). Diagnostic tools to identify black aspergilli. Studies Mycol., 59(1): 129-145.

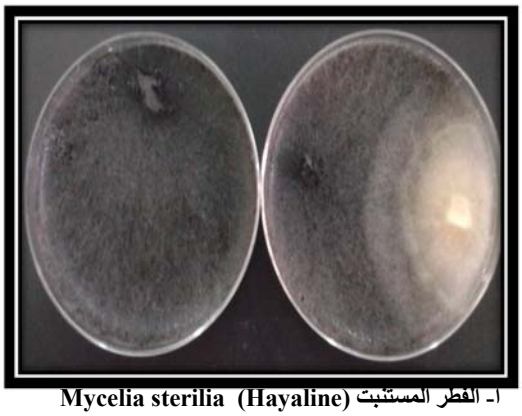
25- Goveas, S. W.; Madtha, R.; Nivas, S. K. and D'souza, L. (2011). Isolation of endophytic fungi from *Coscinium fenestratum* -a red listed endangered medicinal plant. EurAsian J. Biosci., 5: 48-53.
26- Gomathi, S. & Ambikapathy, V. (2011). Antagonistic activity of fungi against *Pythium debarynum* (Hesse) isolated from chilli field soil. Advances in Appl. Sci. Res., 2(4): 291-299.
27-Zivkovic, S.; Stojanovic, S.; Ivanovic, Z.; Gavrilovic, V.; Popovic, T. & Balaz, J. (2010). Screening of antagonistic activities of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotricum gloesporioides*. Arch. Biol. Sci., 62(3): 611-623.
28-Jeffrey, L. S. H.; Son, R. & Tosiah, T. (2008). Preliminary screening of endophytic fungi isolated from medicinal plant at MARDI sessang, Sarawak for their bioactivity. J. Trop. Agric. & Food Sci., 36(1): 121-126.
29-Huang, Y.; Wang, J.; Li, G.; Zheng, Z. & Su, W. (2001). Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortune* and *Torreya grandis*. FEMS Immunol. & Med. Microb., 31(2): 163-167.
30-Khan, R.; Shahzad, S.; Choudhary, M. I.; Khan, S. A. & Ahmed, A. (2010). Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania somnifera*. Pak. J. Bot., 42(2): 1281-1287.
31-علوان، نور موفق (2013). عزل وتشخيص الفطريات المستنبتة من نباتي الادغال الحلفاء *Imperata cylindrical* (cogongrass) والطرطيح (الحمض) *Schangina eagyptiaca* (Suwad) ونشاطها المضاد لبعض الفطريات الممرضة لنبات. رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية: 68.
32-Rajagopal, K.; Kalavathy, S.; kokila, S.; Karthikeyan, S.; Kathiravan, G. & Prasad, P. (2010). Diversity of fungal endophytes in few medicinal herbs of south India. Asian J. Exper. Biol. Sci., 1(2): 415-418.
33-Khan, R.; Shahzad, S.; Chovdhary, M. I.; Khan, S. A. & Ahmed, A. (2007). Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (A_1T) R.B.R. Pak. J. Bot., 39(6): 2233-2239.
34- El-Nagerbi, S. A. F.; Elshafie, A. E. & Alkhanjari, S. S. (2013). Endophytic fungi associated with *Ziziphus* species from mountainous area of Oman and new records. Biodiversitas, 14(1): 10-16.
35- Qualhato, T. F.; Lopes, F. A.; Steindroff, A. S.; Brandao, R. S.; Jesuino, R. S. & Ulhoa, C. J. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathologenic fungi: Evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. Biotechnol. Lett., 35(9): 1461-1468.
36- Garoe, N. T.; Cabrera, R.; Andreea, C.; Martin, T. T. & Cristina, G. (2013). Survey of Banana endophytic fungi isolated in artificial culture media from an applied viewpoint. J. Horticulture, Forestry & Biotechnol., 17(2): 22-35.
37-Sharma, P. (2011). Complexity *Trichoderma-Fusarium* interaction and manifestation of biological control. Austr. J. Crop Sci., 5(8): 1927-1038.
38-Suciatmih & Rahmansyah, M. (2013). Endophytic fungi isolated from mangrove plant and have antagonism role against *Fusarium wilt*. ARPN J. Agric. & Biol. Sci., 8(3): 251-257.
39-Siameto, E. N.; Okoth, S.; Amugune, N. O. & Chege, N. C. (2010). Antagonism of *Trichoderma farzianum* isolates on soil borne plant pathogenic fungi from Embu District Kenya. J. Yeast & fungi Res., 1(3): 47-54.
40-Sundram, S. (2013). First report: Isolation of endophytic *Trichoderma* from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and their *in vitro* antagonistic assessment on *Ganoderma boninense*. J. oil Palm Res., 25 (3): 368-372.

جدول رقم (1): الفطريات المستنبتة المعزولة من أوراق وأغصان نبات اللبخ *Albizia lebbeck* والنسب المئوية لشدة الاستيطان (Colonization frequency).

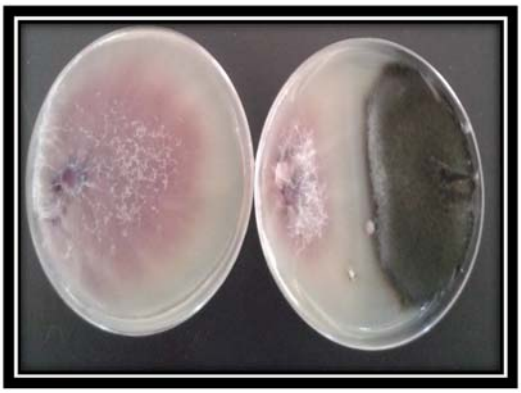
Total C.F (%)	اغصان		اوراق		الفطريات المعزولة
	C.F (%)	No. Colonies	C.F (%)	No. Colonies	
22.48	10.83	13	11.65	14	*Aspergillus* spp.
7.49	3.33	4	4.16	5	*Aspergillus flavus*
1.66	0.83	1	0.83	1	*Aspergillus fumigatus*
0.83	0.00	0	0.83	1	*Aspergillus glaucus*
8.33	3.33	4	5.00	6	*Aspergillus niger*
3.33	2.50	3	0.83	1	*Aspergillus raperi*
0.83	0.83	1	0.00	0	*Aspergillus sclerotioniger*
0.83	0.00	0	0.83	1	*Curvularia cymbopogonis*
3.32	1.66	2	1.66	2	*Drechslera australiensis*
0.83	0.00	0	0.83	1	*Fusarium solani*
0.83	0.00	0	0.83	1	*Fusarium verticilloides*
1.66	0.00	0	1.66	2	*Paecilomyces* sp.
2.50	0.00	0	2.5	3	*Paecilomyces variotii*
14.16	8.33	10	5.83	7	*Penicillium* spp.
3.33	2.25	3	0.83	1	*Penicillium* sp.1
5.83	3.33	4	2.50	3	*Penicillium* sp.2
5.00	2.50	3	2.50	3	*Penicillium* sp.3
0.83	0.83	1	0.00	0	Mycelia sterilia (Hyaline)
47.43	21.64	26	25.79	31	Total
**7.253	*4.265		*4.119		قيمة مربع كاي (Chi-square)
(P ≤ 0.01)**			(P ≤ 0.05)*		

جدول رقم (2): النسب المئوية لتثبيط بعض الفطريات المستنبتة المعزولة من نبات اللبخ اتجاه بعض الفطريات المرضية بطريقة الزراعة المزدوجة على وسط PDA ودرجة حرارة 25±2°م ولمدة 7 ايام.

المتوسط ± الخطأ القياسي			عزلات الفطريات المستنبتة
M. phaseolina	***F. graminearum***	***F. oxysporum***	
0.77 ± 45.07	0.73 ± 56.23	0.73 ± 54.03	***A. fumigatus***
0.00 ± 46.60	1.27 ± 44.40	0.73 ± 42.93	***A. glaucus***
0.44 ± 34.17	1.29 ± 59.97	1.31 ± 67.30	***A. niger***
1.47 ± 34.77	0.73 ± 51.83	1.15 ± 42.00	***A. raperi***
0.73 ± 45.13	1.45 ± 59.67	1.52 ± 54.00	***A. sclerotioniger***
1.27 ± 33.30	1.50 ± 60.70	1.47 ± 54.77	***C. cymbopogonis***
1.17 ± 26.67	0.47 ± 43.27	1.98 ± 50.53	***D. australiensis***
1.17 ± 26.67	0.00 ± 55.50	1.96 ± 57.00	***F. solani***
0.77 ± 32.63	0.77 ± 59.33	0.58 ± 60.00	***F. verticilloides***
0.73 ± 36.23	0.77 ± 56.17	1.02 ± 45.30	***Paecilomyces* sp.**
1.33 ± 40.00	0.43 ± 49.57	1.02 ± 60.30	***Paecilomyces variotii***
0.73 ± 36.97	1.97 ± 49.57	0.76 ± 50.33	***Pen.* sp.2**
0.73 ± 50.56	0.73 ± 56.23	1.27 ± 55.50	**Mycelia sterilia (Hyaline)**
*2.766	*3.096	*3.917	**قيمة LSD**
(P ≤ 0.05)*			

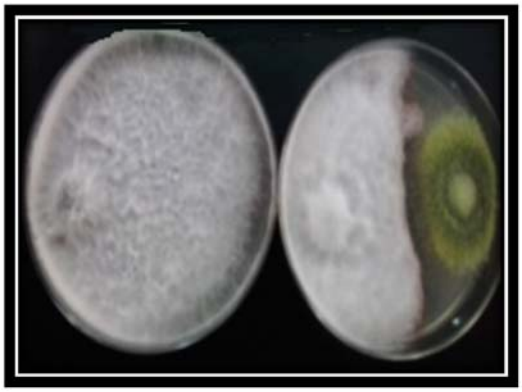


أ- الفطر المستنبت Mycelia sterilia (Hayaline) اتجاه *M. phaseoline*

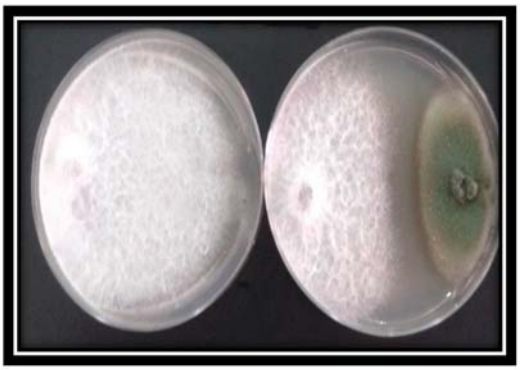


ب-الفطر المستنبت *C. cymbopogonis* اتجاه *F. oxysporum*

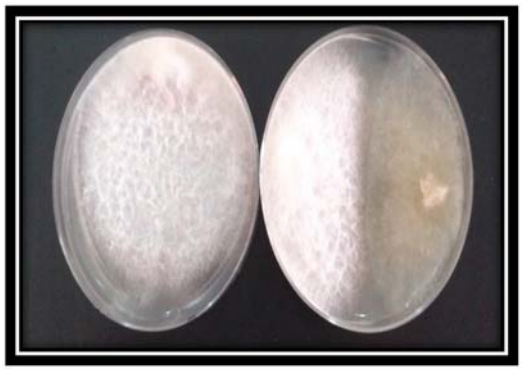
جـ الفطر المستنبت *Paecilomyces* sp. اتجاه *M. phaseoline*



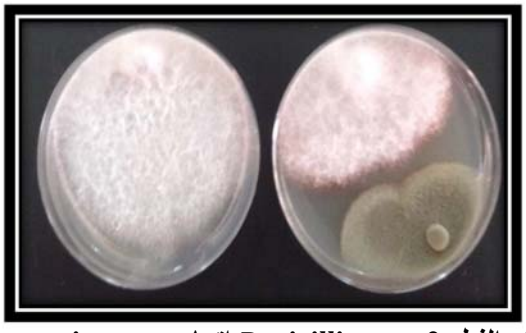
د- الفطر المستنبت *Paecilomyces* sp. اتجاه *F. graminearum*



هـ-الفطر المستنبت *Aspergillus glaucus* اتجاه *F. graminearum*



و- Mycelia sterilia (Hyaline) اتجاه *F. graminearum*



ز- الفطر *Penicillium* sp.2 اتجاه *F. graminearum*

صورة (1): فعالية التضاد بين الفطريات المستنبتة والفطريات المرضية

Endophytic Fungi from Leaves and Twigs of *Albizia lebbeck* and Their Antifungal Activity

Batoal Z. Ali
Ahmed A. M. Alfayed
Dept. of Biology/ College of Education for Pure Science(Ibn Al-Haitham)/
University of Baghdad

Received on :15 /September/2014 , Accpted on: 20/October/2014

Abstract

The study was conducted to isolate and identify endophytic fungi from leaves and twigs of lebbeck (*Albizia lebbeck*) and study their antagonistic activity against some plant fungal pathogens. Results showed isolation of 75 isolate endophytic fungi from 240 segments of leaves and twigs representing colonization frequency of 47.43%. Isolated fungi included different species of *Aspergillus* which prevail over other species (6 species), and three different isolates of *Penicillium*, one more species of *Paecilomyces*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Nigrospora* and hyaline sterile fungus. Results showed variation in colonization frequencies within all species isolated from the two plant parts.

Dual culture methods for testing antagonistic activity of isolated endophytes against three plant fungal pathogens, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium graminearum* and *Macrophomina phaseolina* showed different antagonistic activities with different endophytes and pathogens, antagonistic activity was evaluated as percentage of inhibition of fungal pathogen. Moreover different antagonistic interactions revealed range between mycoparasitism to competition and production of inhibition zones between the two fungi interaction. These results give indication of the efficiency of using endophytic as fungi as a biocontrol agents in agricultural application against fungal plant pathogens.

Key words: Endophytic fungi, Lebbeck, Antagonistic activity.