دراسة الفعالية الضد فطرية للمستخلص الكحولي للعكبر propolis تجاه الفطرين *Botrytis cinerea, Altrnaria* sp المسببان للعديد من الامراض النباتية

احمد ساهي دويش

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية

الخلاصة

نفذت هذه الدراسة لتحديد تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الايثانولي للعكبر (propolis) إزاء الفطرين الناقصين(*Botrytis cinerea, Altrnaria* sp) المسببة للعديد من الامراض النباتية .

وقد اظهرت نتائج الكشف عن المركبات الفعالة باستخدام تقنية IR احتواء العكبر على الفلافونات وبصورة اساسية .

بينت التجارب الكفاية التثبيطية العالية لهذا المستخلص ،إذ أدى التركيز العالي (5) ملغم /مل إلى تثبيط النمو كليا على الأوساط الغذائية الصلبة (PDA) و السائلة (PDB) ،بينما تفاوت التركيزان (2.5و 1.25) ملغم /مل في التأثير .

كما أظهرت نتائج البحث قدرة المستخلص الكحولي للعكبر عند التركيز (5) ملغم / مل المرشوش على اوراق نبات الباذنجان و ثمار الخيار المصابة بالفطريات في منع تطور أصابه المرض وحقق حماية جيدة بشكل ملفت لاسيماعند الرش بالمستخلص بعد24و48 ساعة من التلقيح بالفطر من خلال منع نمو وانتشار الفطر بشكل كامل، في حين تفاوتت قدرة المستخلص الكحولي للعكبر المرشوش قبل 24 و48 ساعة من التلقيح بالفطر على منع حدوث الإصابة بالمقارنة مع معاملة السيطرة ،اذ ظهر نمو بطيء للمسبب المرضي .

المقدمة

العكبر (propolis) عبارة عن مادة صلبة راتنجية تنتج بوساطة حشرة النحل من خلال جمع المكونات الاساسية له من مختلف انواع النباتات والاشجار لاسيما اشجار الصنوبر، وخشب الحور لسد الفتحات والثقوب الموجودة في خلية النحل وذلك لمنع دخول مختلف انواع الممرضات الى داخل الخلية .تعد هذه المادة من المضادات الحيوية الطبيعية ذي الفعالية العالية لمختلف انواع البكتريا والفيرسات والفطريات وبقية انواع الممرضات. [1,2]

يختلف التركيب الكيميائي للعكبر باختلاف التوزيع الجغرافي لمناطق وجود حشرة النحل وذلك باختلاف وتنوع المصادر النباتية .[3] اذ ان التركيب الكيميائي للعكبر يتباين مع تنوع المصدر النباتي للحشرة ، لوحظ ان العكبر الناتج من حشرات النحل المعتمدة في تغذيتها على خشب الحور poplar يحتوي على chrysin, , pinocembrin, pinobanksin galanagin , caffeic acid and ferulic acid واسترات هذه الاحماض[4] ، بينما لوحظ ان العكبر المنتج من حشرات النحل المعتمدة في تغذيتها على اشجار اليوكالبتوس Eucalyptus يحتوي على بعض المركبات ذات الوزن الجزيئي العالي مثل lupeol alkanoates [5] . ان اختلاف التركيب الكيميائي للعكبر من منطقة الى الاخرى يعتمدعلى اختلاف العوامل الوراثية genetic factors لحشرة النحل من مكان الى اخر اكثر من اختلاف المصادر النباتية [6]اجريت العديد من الدراسات والبحوث على العكبر لاسيما في السنوات الاخيرة لاهميتها الطبية ، اذ يحتوي في تركيبه على العديد من

المركبات الفعالة والمهمة ولاسيما المركبات الفينولية والفلافونات التي تمتلك فعالية متعددة مضادة للعديد من انواع البكتريا والفطريات وتثبط نمو العديد من انواع الفايروسات عن طريق تثبيط بعض الانزيمات المهمة الموجودة فيها، مثل: Reverse transcriptase , Protease وعملها على تحطيم اغشية بعض الطفيليات الممرضة . [7,8]

وتعد الفطريات *Botrytis cinerea, Altrnaria sp* العائدة للعائلة Dematiaceae التابعة لرتبة Moniliales ضمن الفطريات الناقصة Imperfect fungi (9) تعد أحد المسببات المرضية للعديد من الأمراض النباتية ،اذ يسبب *الـ Altrnaria* sp مرض تعفن البذور والجذور Seed & Root Rot وأمراض تبقع الالترناري و اللفحات المتأخرة Late blight &Spot على العديد من النباتات ومرض تقرح الساق الالترناري Altrnaria Stem Canker. والفطر *Botrytis cinerea* فأنه يسبب مرض العفن الرمادي Gray mold [9,10] .

وبسبب الآثار السلبية التي يخلفها الاستعمال العشوائي للمبيدات الكيميائية 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 [11].

هدف هذا البحث الى التحري عن فعالية المستخلص الكحولي للعكبر (propolis) على هذه المسببات المرضية ومدى القدرة التثبيطية التي تمتلكها هذه المادة الطبيعية ضد هذه الفطريات باستخدام طرائق عديدة و التعرف على المحتوى الكيميائي للعكبر المستعمل في هذه الدراسة .

المواد و طرائق العمل

-عزل الفطريات الممرضة

عزل ال .*Altrnaria* sp من نبات الطماطم في حين عزل *Botrytis cinerea* من ثمار باذنجان و بالاعتماد على مفاتيح التصنيف المعتمدة [10] جرى عزل وتشخيص الفطريات على وسط الدكستروز البطاطا Dextrose Potato (PDA) Agar اذ تم تنقية العزلتان من خلال نقلهما إلى أطباق PDA جديدة.

-جمع عينات العكبر

جمعت عينات العكبر خلال شهري تشرين الثاني وكانون الثاني عام 2006 من خلايا نحل موجودة في قضاء الخالص – محافظة ديالى .

تم غسل العكبر بالماء العادي ثم الماء المقطر لغرض التخلص من الاتربة العالقة به وترك ليجف بدرجة حرارة الغرفة ثم طحن العكبر بمطحنة كهربائية وحفظ المسحوق في عبوات جافة لحين الاستعمال وفي درجة حرارة 4 °م .

-تشخيص المركبات الفعالة الموجودة في العكبر:

التشخيص باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء Infrared (IR) قيست امتصاصية الاشعة تحت الحمراء بجهاز Infrared Spectroscopy وباستخدام اقراص من المركب الذي يراد الكشف عنه في صلب بروميد البوتاسيوم في قسم الكيمياء – كلية العلوم / الجامعة المستنصرية .

-تحضير مستخلص العكبر (propolis) :

وزن 2 غم من مسحوق العكبر واضيف له 50 مل من الكحول الاثيلي بتركيز 95% ثم خلط المزيج مدة ساعة واحدة بوساطة المازج الدوار Vortex ، بعدها ترك مدة 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة ، بعدها سحبت الطبقة العليا الحاوية على المستخلص الكحولي ، ثم كررت العملية على الراسب المتبقي وجمع الراشح واضيف الى الراشح السابق.

رشح المحلول بواسطة ورق الترشيح (Whatman No.1) ،ثم عرض الراشح للتبخير في الفراغ باستخدام جهاز التبخير الدوار بحرارة 45 م ، بعدها وزنت المادة الجافة المتبقية التي هي عبارة عن المستخلص [12].

دراسة الفعالية التثبيطية Antifungal activity لمستخلص العكبر :

-تأثير تراكيز مستخلص العكبر في النمو الشعاعي للفطريات الممرضة.

استخدمت طريقة [13] اذ (10,5,2.5) أضيف مل من المحلول الأصلي (Stock Solution) للمستخلص الكحولي للعكبر بتركيز 10 ملغم /مل إلى (10,15,17.5) مل على التوالي من وسط PDA لغرض الحصول على التركيز (5,2.5,1.25) ملغم / مل على التوالي وهي التراكيز المستخدمة في هذه الدراسة .بواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز مع وجود أطباق السيطرة (بدون مستخلص) .ثم تركت الإطباق لتتصلب أعقبها زرع اللقاح الفطري المؤلف من قرص بقطر 6 ملم مقطوع بوساطة ثاقب فلين من حافات مزرعة بعمر أسبوع. حضنت الأطباق بدرجة حرارة الغرفة مدة أسبوعين. حسبت النسبة المئوية لتثبيط النمو الشعاعي عند وصول النمو في معاملة السيطرة إلى حافات الطبق وحسب المعادلة الآتية :

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

– دراسة تأثير تراكيز مستخلص العكبر في الوزن الجاف للفطريات الممرضة :

أتبعت طريقة[14] مع أجراء تعديلٍ بسيط اذ حضر وسط غذائي سائل نوع PD Broth وعقم في جهاز التعقيم (الموصدة)،بعد ذلك أضيفت تراكيز المستخلص الذي يراد دراستها ، مع تنفيذ معاملة المقارنة من دون أية إضافة ،كررت كل معاملة ثلاث مرات ،حضنت الدوارق بعد تلقيح كل معاملة بقرص واحد و بقطر 6 ملم من مستعمرة كل فطر ممرض في حاضنة في درجة حرارة الغرفة (25 م°) مدة أسبوعين ، سحب الغزل الفطري بعد نهاية مدة التحضين بوساطة ملقط وغسل جيدا بالماء المقطر المعقم و جفف في الفرن في درجة 70م° ،أخذت الأوزان الجافة وحسبت النسبة المئوية لتثبيط النمو الجاف كما في الفقرة السابقة.

– تحضير اللقاح الفطري :

جمعت ابواغ الفطرين *Altrnaria sp., Botrytis cinerea* بوساطة إمرار قضيب زجاجي معقم على وسط PDA حاوي على غزل الفطر بعمر أسبوعين بعد إضافة 10مل ماء مقطر معقم وجمع العالق في قطارة معقمة وحسبت أعداد الابواغ بوساطة شريحة العد Haemocytometer وتم تخفيف العدد إلى $10^6 * 1$ بوغ /لتر وهذا هو المستوى المستخدم في التجارب التي أجريت.

– تأثير المستخلص الكحولي للعكبر المرشوش على أوراق نبات الباذنجان الملقح بالفطرين Altrnaria sp., Botrytis cinerea بفترات زمنية معينة :

اتبعت طريقة[15]اذ اخذت نباتات باذنجان من النوع المحلي بعمر شهرين، اذ قطعت أوراقها وغمرت سويقاتها في الماء وتم تلقيحها بطريقة البقعة المكوية لغرض الحصول على تقويم كمي للإصابة بالفطر وذلك بتسخين الرأس العريض

لمسمار صغير على لهب ثم لمس سطح الورقة فأدى ذلك إلى موت البقعة الملامسة بقطر 0.5 سم ثم أضيفت قطرتين من عالق سبورات الفطر المحضر ورشت بالمستخلص الكحولي للعكبر وبتركيز 5ملغم /مل بواقع 3 مكررات و حسب المعاملات الآتية: لقحت المجموعة الأولى بالفطر *Botrytis* فقط (سيطرة). مجموعة لقحت بالفطر *Botrytis* وبعد 24 ساعة رشت بالمستخلص ، مجموعة لقحت بالفطر *Botrytis* وبعد 48 ساعة رشت بالمستخلص ، مجموعة رشت بالمستخلص وبعد 24 ساعة لقحت بالفطر *Botrytis*. المجموعة الأخيرة رشت بالمستخلص وبعد 48 ساعة لقحت بالفطر *Botrytis*. وقد اجريت المعاملات نفسها بالنسبة الى الفطر *Altrnaria sp.* .

حفظت المعاملات بجو المختبر مع توفير الرطوبة اللازمة مدة 48 ساعة بعد التلقيح بالفطر وذلك بوضع كيس نايلون عليها ثم أزالته و تركت المعاملات مدة عشرة أيام مع ملاحظة جميع التغيرات التي تطرأ على الأوراق.

-تأثير مستخلص العكبر المرشوش ثمار الخيار الملقح بالفطرين Altrnaria sp., Botrytis cinerea على مدد زمنية معينة:

اتبعت طريقة [15] اذ أخذت ثمار خيار محليه وبعد غسلها و تعقيمها سطحيا بوساطة القاصر التجاري بتركيز 0.06% (هايبوكلورات الصوديوم) مدة نصف دقيقة ،جففت و قسمت على خمس مجموعات كل مجموعة تضم 3 مكررات.تم عمل ثقبين عند طرف كل ثمرة بطريقة البقعة المكوية بقطر 0.5 سم ثم لقحت بعالق الفطر *Botrytis cinerea* بواقع قطرتين لكل بقعة ورشت بمستخلص العكبر بتركيز 5 ملغم/مل وحسب المعاملات الآتية: مجموعة من ثمار خيار لقحت بالفطر وبعد 24 ساعة رشت بالمستخلص ، مجموعة من ثمار خيار لقحت بالفطر وبعد 48 ساعة رشت بالمستخلص ، مجموعة من ثمار خيار رشت بالمستخلص وبعد 24 ساعة لقحت بالفطر. مجموعة من ثمار خيار رشت بالمستخلص وبعد 48 ساعة لقحت بالفطر والمجموعة الأخيرة من ثمار خيار ملقحة بالفطر للسيطرة. وقد اجريت المعاملات نفسها بالنسبة الى الفطر *Altrnaria sp.* .

بعدها وضعت المعاملات في أكياس نايلون مدة 48 ساعة للمحافظة على الرطوبة اللازمة وتم متابعة تطور المرض على ثمار مدة عشرة أيام مع حساب معدل قطر المتعامد لتوسع الإصابة.

-التحليل الاحصائي

حللت النتائج احصائياً باستخدام طريقة الفرق المعنوي الاصغر Least Significant Difference (LSD) للكشف عن مصادر الفروقات المعنوية بين قيم المعاملات لرش مستخلص العكبر قبل وبعد 24 و48 ساعة مع السيطرة [16] .

النتائج والمناقشة

-دراسة المواد الفعالة الموجودة في العكبر (propolis)

استخدمت مطيافية الاشعة تحت الحمراء في تحليل العكبر وذلك لأهميتها البالغة في تعيين المجموعة الكيميائية التركيبية مما يعيين في معرفة المادة .[17]

اظهرت مطيافية الاشعة تحت الحمراء للمستخلص الايثانولي للعكبر اهتزاز مط لمجموعة الكاربونيل عند المنطقة (1608-1643) سم−1 كذلك ظهر اهتزاز مط متناظر وغير متناظرلمجموعة الكاربوكسيل في المنطقة

(1165-1271) سم−1 كما اظهرت المنطقة (2850-2990)سم−1 اهتزاز مط لمجموعة (C-H) الهايدروكاربون المشبعة والمرتبطة بمجاميع CH2,CH3 ،في حين ظهر اهتزاز مط في المنطقة (3450-3500) سم−1 تابع الى مجموعة الهايدروكسيل وكما موضح في الشكل رقم (1) .

تدل هذه النتائج على ان الفلافونات هي المواد الرئيسة الموجودة في المستخلص ، اذ تعد الفلافونات مركبات فينولية متعددة الهايدروكسيل ويرتبط بذرتي الكاربون الثالثة والسادسة الحلقة الاروماتية وتعمل الفلافونات مادة مضادة ومؤثرة في الكثير من الاحياء المجهرية والفايروسات ،اذ تكمن فعالية هذه المركبات في قابليتها على تكوين معقد مع جدار الخلية البكتيرية والعمل على تمزيق الغشاء[18].

وهذه النتيجة تتفق مع الدراسة التي اجراها [19] في دراسة التركيب الكيميائي للعكبر في بلغاريا، وتركيا، واليونان، والجزائر ، اذ وجد انها تحتوي بصورة اساسية على الفلافونات .

-تأثير تراكيز مستخلص العكبر في النسبة المئوية لتثبيط النمو الشعاعي للفطريات

تدل النتائج في الجدول (1) إلى أن أعلى نسبة مئوية لتثبيط النمو الشعاعي سجلت في معاملة الفطرين *Altrnaria sp.*, *Botrytis cinerea* اذ بلغت النسبة(100)%عند التركيز 5 ملغم / مل وسجل أقل نسبة مئوية للتثبيط (73.75 و 81)% في معاملة الفطرين عند التركيز 1.25 ملغم / مل .

اذ تدل النتائج أن زيادة اتركيز المستخلص أدت إلى زيادة في النسبة المئوية لتثبيط النمو الشعاعي على الوسط الغذائي الصلب PDA . ان النتائج الموضحة في الجدول رقم (1) تتفق مع مااشار اليه [20] الى أن المستخلص الايثانولي للعكبر يستخدم وبنجاح في علاج امراض candidiasis الناتج عن الاصابة بالخميرة *c. albicans* ووجد ان الفعالية مشابهة لفعالية المضاد الفطري Nystatin . اذ اشارت العديد من الدراسات الى التاثير الضد مايكروبي للعكبر الذي يعزى لوجود العديد من المركبات الفينولية،مثل: الاحماض الاروماتية، واسترات الاحماض الفينولية، والتربينات الثلاثية، والثنائية فضلاً عن وجود الفلافونات [21]

-دراسة تأثير تراكيز مستخلص العكبر في النسبة المئوية لتثبيط الوزن الجاف للفطريات الممرضة

جاءت نتائج تأثير تراكيز المستخلص الأيثانولي للعكبر في الوزن الجاف للفطريات الممرضة متوافقة مع نتائج تثبيط النمو الشعاعي كما موضح في الجدول (2) ، فقد أخفق نمو الفطرين كليا على الوسط السائل PD Broth الحاوي على تركيز المستخلص (5)ملغم / مل ، في حين كانت النسبة لتثبيط الوزن الجاف للفطرين عند التراكيز الاقل (2.5,1.25) ملغم /مل تختلف عما سجل في تجربة تثبيط النمو الشعاعي للفطرين على الوسط الصلب ، اذ بلغت اقل نسب لتثبيط الوزن الجاف الفطر *Altrnaria* sp 46.8% عند التركيز 1.25ملغم /مل فيما كانت 53.4% بالنسبة للفطر *Botrytis cinerea* عند نفس التركيز .

-تأثير المستخلص الكحولي للعكبر المرشوش في أوراق نبات الباذنجان الملقح بالفطرين Altrnaria sp., Botrytis cinerea على مدد زمنية معينة .

سجلت معاملة أوراق الباذنجان المرشوشة بالمستخلص الكحولي للعكبر سواء قبل 24 او 48 ساعة من التلقيح بالفطر *Botrytis cinerea* اختلاف كبير مع معاملة السيطرة أو مع معاملات الرش بالمستخلص بعد 48,24 ساعة، اذ منع مستخلص العكبر نمو الفطر بالكامل من بدء المعاملة ولم تظهر أي أعراض للمرض في موقع التلقيح وكما هو موضح في الجدول (3) والشكل (2). اذ أن المستخلص الكحولي للعكبر أثر بصورة مباشرة في حيوية الفطر ومنع نموه و انتشاره من خلال منعه للفعاليات الايضية للفطر . أما الأوراق المرشوشة بالمستخلص بعد تلقيحها بالفطر سواء بعد 48,24 ساعة فقد أظهرت نموا" بطيأ للفطر أعقبه توقف لتطور الاصابه في اليوم السادس من بدء التجربة ، وقد بلغ معدل قطر البقعة (1-1.5) سم ويمكن تفسير هذه النتيجة على أساس احتمال أن الفترة التي سبقت الرش بالمستخلص كانت كافية لبدأ نمو الفطر و استقراره على النبات وظهور أعراض المرض .آلا أنه حدث خمول للفطر بعد الرش

وتوقف لانتشاره لما للمستخلص من تأثير في الفطر . وتم حساب نتائج تطور بقع الاصابه على أوراق نبات الباذنجان المصاب بالفطر *Botrytis cinera* في معاملة السيطرة اذ أكتمل تطور البقع إلى أصابه ناجحة ، وسجل زيادة في معدل قطر بلغ(4.8) سم. وتمثلت الأعراض على الأوراق بوجود سبورات رمادية اللون تتطاير بسهوله مع كتله لنمو الفطر.

أما تجربة ثمار الخيار المرشوشة بالمستخلص الكحولي للعكبر بتركيز 5 ملغم/مل فقد ظهرت أعراض المرض في ثمار السيطرة متمثلة بنمو بني حول اللقاح مع هرس لنسيج الثمرة نتيجة لإفرازات الفطر الإنزيمية مثل أنزيم البكتنيز pectinase [9] أدى إلى تلون وموت النسيج النباتي وترك الثمرة منكمشة و بنية و لينة كما في الشكل (3).وقد بلغ معدل قطر الاصابه 6 سم كما موضح في الجدول رقم (4).

في حين لم تظهر الأعراض على ثمار الخيار المرشوشة بالمستخلص سواء قبل 48و 24 ساعة وبقى معدل القطر 0.5 سم طوال مدة التجربة .بينما حدث نمو بسيط للفطر على ا لثمار المرشوشة بالمستخلص بعد 48و 24 ساعة بلغ (1,2) سم على التوالي في اليوم الأخير للتجربة (الجدول (4)) وهي نتيجة تتفق مع تجربة أوراق الباذنجان.

وقد دلت النتائج التي تم الحصول عليها الى تقارب النتائج المتحصل عليها من التجربة نفسها عند استخدام الفطر *Altrnaria sp* وكما موضح في الجدولين (5)و(6).

كما دلت نتائج التحليل الاحصائي باستخدام طريقة الفرق المعنوي الاصغر (LSD) عدم وجود فرق معنوي عند $p<0.05$ لليومين الاول والثاني ولجميع المعاملات و السيطرة كذلك عدم وجود فرق معنوي عند $p<0.05$ بين معاملات الرش بالمستخلص قبل 24 و48 ساعة، في حين لوحظ وجود فرق معنوي كبير عند $p<0.05$ عند معاملات الرش بالمستخلص بعد 24 و48 ساعة من الاصابة والسيطرة .

وعليه يمكن أن نستنتج أن قابلية الفطرين *Botrytis cinera* ، *Altrnaria sp* على أحداث المرض وحصول الاصابة في العائل النباتي (سواء كان أوراق الباذنجان او ثمار الخيار) يمكن أن تتضاءل عند رشها بالمستخلص الكحولي للعكبر وبتركيز 5 ملغم/مل لاسيما قبل أحداث المرض وكذلك كون التركيز المستخدم واطئ وبدون ان يسبب أي أعراض جانبية سواء على صحة الإنسان او الحيوان [22] .وهذه النتيجة يمكن أن تدفع الباحثين إلى أجراء المزيد من الدراسات المستفيضة حول قابلية هذا المستخلص في الحد من الإمراض التي تسببها مسببات مرضية مختلفة يمكن لها أن تسبب خسائر اقتصادية كبيرة

References

1.Koo, H. ;Rosalen, PL.; Cury, JA.; Ambrosano, GMB.; Murata, RM.; Yatsuda, R.; Ikegaki, M.;Alencar, SM. and Park, YK.(2000) Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. Curr Microbiol 41: 192-196.

2.Popova, M.; Silici, S.; Kaftanoglu, O.; Bankova, V.(2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. Phytomedicine 12: 221-228.

3.Velikova M., Bankova V., Tsvetkova I., Kujumgiev A. and Marcucci M. C. (2000), Antibacterial ent-kaurenefrim Brazilian propolis of native stingless bees. Fitoofterapia 71, 693D696.

4.Bankova , V.; Popova, M .; Bogdanov, S .;SABATINI, A.(2002).Chamical composition of European propolis; expected and unexpected results. Z –naturforsch- [c]; 57(5-6):530-3

5. Kosalec I, Bakmaz M, Pepeljnjak S.(2003). Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia. Acta Pharm 53: 275 − 285.

6.Custodio , A.R.; Ferreira , M.M.C.; Negeri, G.; Salatino ,A.(2003) .Clustering of comb and propolis waxes Based on the Distribution of Aliphatic constituents .j .Barz .Chem . Soc ., 14 (3) : 354-357 . [Article].

7.Havsteen ,B.H. (2002) .The biochemistry and medical significance of the flavonoids .Pharmacol- Ther ., 96 (2-3) : 67 – 202.
8. Castaldo , S. & Capasso , F. (2002) .Propolis an old remedy used in modern medicine . Fitoterapia 73 (suppl 1) : 1-6.
9- Agrios. George, N. (1997). Plant Pathology . 4th. Edition.
10- أسطفان ،زهير عزيز . محمود، حازم عبد العزيز . أفات الطماطم . مطبعة أدورد للطباعة الفنية الحديثة . وزارة الثقافة والأعلام.(1998).
11 - شعبان ،عواد ; الملاح ، نزار مصطفى . المبيدات . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة الموصل . دار الكتب للطبع والنشر . ص 502 .(1993).
12.Rhajaoui ,M.;Oumzil, H.;Faid ,M.;Lyagoubi, M.;Elyachioui,M.;Benjouad, A. (2001).Antibactrial activity of Moroccan propolis extracts,science letters , 3,(3). (Research Article).
13-الخفاجي ، باسمة ربيع احمد (2000) ، تأثير مستخلصات نباتات سم الفراخ والصفصاف والميرمية على نمو بعض الفطريات الجلدية . رسالة ماجستير كلية العلوم ، الجامعة لمستنصرية .
14 -Suberu, H. Preliminary studies of inhibitions of *Aspergillus flavus* with extract of tow lichens and Bentex- T fungicides. African J. of Biotech. 3(9):468-472.(2004).
15- يوسف 'دينا يوسف محمد(2004) دور حامض الساليسلك وبعض المبيدات الكيميائية في مكافحة ذبول الخيار المتسبب عن الفطر *Pythium ultimum*. *رسالة* ماجستير مقدمة الى كلية العلوم /الجامعة المستنصرية .
16- Zar,J.H.(1984)Biostatistical Analysis .2nd ed .Prentice Hall INC. Englewood Cliffs, N.J.
17.Silverstein , O.M.; Bassler, G.K.;Morrill, T.S. (1990) Spectrometric Identification of Organic Compounds.4th ed.
18. Cowan ,M.M. (1999). Plant Product's as antimicrobial agents: clinical microbiology reviews , 12(4) : 564-582.
19.Velikova, M.; Bankova, V.;Sorkun,K.;Houcine, S.; Tsvetkova I., Kujumgiev A. (2000), propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity.Z-naturforsch-[C] 55(9-10) :790-3.
20. Martins , R.S;Pereira , E.S.J ;Lima , S.M.; Senna, M.I.B.; Mesquita ,R.A.; Santos, V. R (2002) . Effect of commercial ethanol propolis extract on the *in vitro* growth of *candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV–seronegative Barazilian patients with oral candidiasis .J-oral-sci., 44(1):41-8.
21. Bankova, V.; De Castro, S. L. and Marcucci M. C. (2000), Propolis: advances in chemistry and plant origin. Apidologie 31, 3D15.
22. Hartwich, A.; Lequtko,J.; Wszolek , J.(2000). Propolis: properties and administration to patients treated for some surgical diseases .Przegl_Lek,57(4): 191-4.

جدول (1) : تأثير تراكيز مستخلص العكبر في النسبة المئوية لتثبيط النمو الشعاعي لبعض الفطريات الناقصة في وسط الPDA

الفطر	التركيز ملغم / مل	النسبة المئوية للتثبيط
Botrytis cinerea		
	5	100
	2.5	78.7
	1.25	73.7
الفطر	التركيز ملغم / مل	النسبة المئوية للتثبيط
Alternaria sp		
	5	100
	2.5	87
	1.25	81

جدول(2): تأثير تراكيز مستخلص العكبر في النسبة المئوية لتثبيط الوزن الجاف لبعض الفطريات الناقصة في الوسط السائل PD Broth.

الفطر	التركيز ملغم / مل	النسبة المئوية لتثبيط الوزن الجاف
Botrytis cinerea		
	5	100
	2.5	62.2
	1.25	53.4
الفطر	التركيز ملغم / مل	النسبة المئوية لتثبيط الوزن الجاف
Alternaria sp		
	5	100
	2.5	79.4
	1.25	46.8

جدول (3): تأثير رش أوراق نبات الباذنجان المصابة بالفطر *Botrytis cinerea* بالمستخلص

الكحولي للعكبر وبتركيز 5 ملغم / مل

الأيام	المعاملات/سم				
	أوراق نبات ملقحة بالفطر وبعد 24ساعة رشت	أوراق نبات ملقحة بالفطر وبعد48ساعة رشت	أوراق نبات ملقحة بالفطر وقبل24 ساعة رشت	أوراق نبات ملقحة بالفطر وقبل48 ساعة رشت	أوراق نبات ملقحة بالفطر فقط للسيطرة
الأول	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5*
الثاني	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
الثالث	0.7	0.8	0.5	0.5	0.8
الرابع	0.8	1.2	0.5	0.5	1.5
الخامس	1	1.5	0.5	0.5	2.2
السادس	1	2.2	0.5	0.5	2.4
السابع	1	2.2	0.5	0.5	3.2
الثامن	1	2.2	0.5	0.5	3.5
التاسع	1	2.2	0.5	0.5	4.8
العاشر	1	2.2	0.5	0.5	4.8

جدول (4): تأثير رش ثمار الخيار المصابة بالفطر *Botrytis cinerea* بالمستخلص الكحولي للعكبر وبتركيز 5 ملغم / مل

الأيام	المعاملات/سم				
	ثمار خيار ملقحة بالفطر وبعد 24 ساعة رشت	ثمار خيار ملقحة بالفطر وبعد48 ساعة رشت	ثمار خيار ملقحة بالفطر وقبل24 ساعة رشت	ثمار خيار ملقحة بالفطر قبل48ساعة رشت	ثمار خيار ملقحة بالفطر فقط للسيطرة
الأول	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5*
الثاني	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
الثالث	0.6	0.8	0.5	0.5	1.2
الرابع	0.9	1	0.5	0.5	2.1
الخامس	1.5	1.8	0.5	0.5	2.8
السادس	1.6	2.9	0.5	0.5	3.7
السابع	1.8	4.1	0.5	0.5	4.6
الثامن	2	4.1	0.5	0.5	5.5
التاسع	2.1	4.1	0.5	0.5	5.8
العاشر	2.1	4.1	0.5	0.5	6

* قطر رأس المسمار 0.5 سم

جدول (5): تأثير رش أوراق نبات الباذنجان المصابة بالفطر *Altrnaria sp* بالمستخلص الكحولي للعكبر وبتركيز 5 ملغم / مل

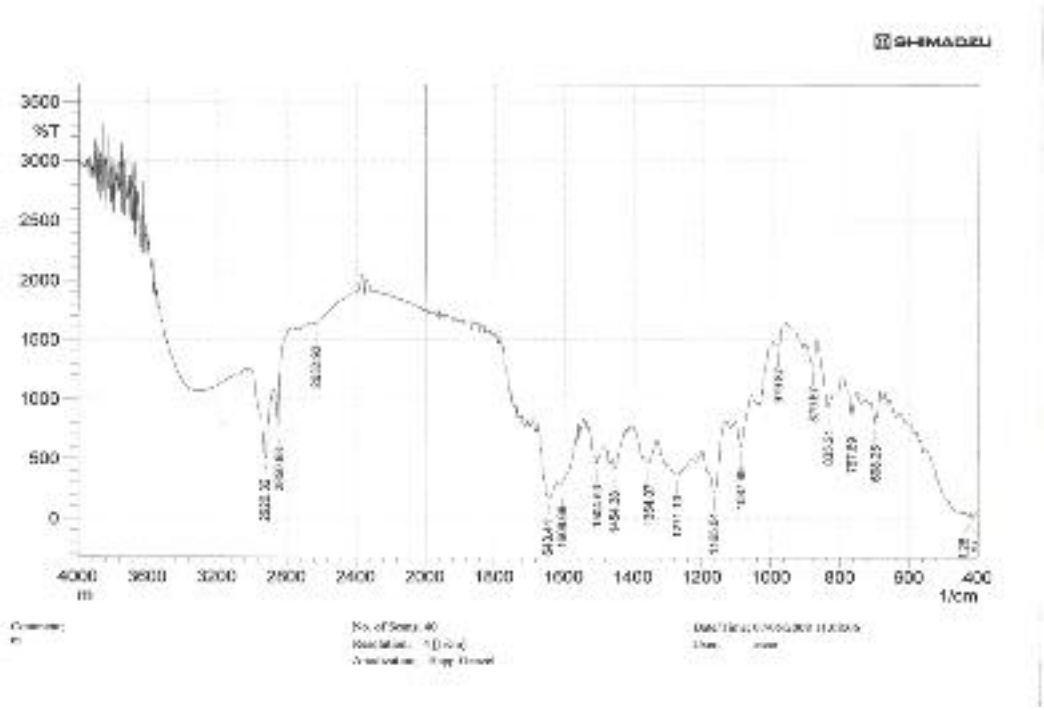
	المعاملات/سم

الأيام	أوراق نبات ملقحة بالفطر وبعد 24ساعة رشت	أوراق نبات ملقحة بالفطر وبعد48 ساعة رشت	أوراق نبات ملقحة بالفطر وقبل24 ساعة رشت	أوراق نبات ملقحة بالفطر وقبل48 ساعة رشت	أوراق نبات ملقحة بالفطر فقط للسيطرة
الأول	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5*
الثاني	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
الثالث	0.7	0.8	0.5	0.5	0.8
الرابع	0.8	1	0.5	0.5	1.5
الخامس	1	1.5	0.5	0.5	2
السادس	1	2	0.5	0.5	2.4
السابع	1	2	0.5	0.5	3.1
الثامن	1	2	0.5	0.5	3.5
التاسع	1	2	0.5	0.5	4.5
العاشر	1	2	0.5	0.5	4.5

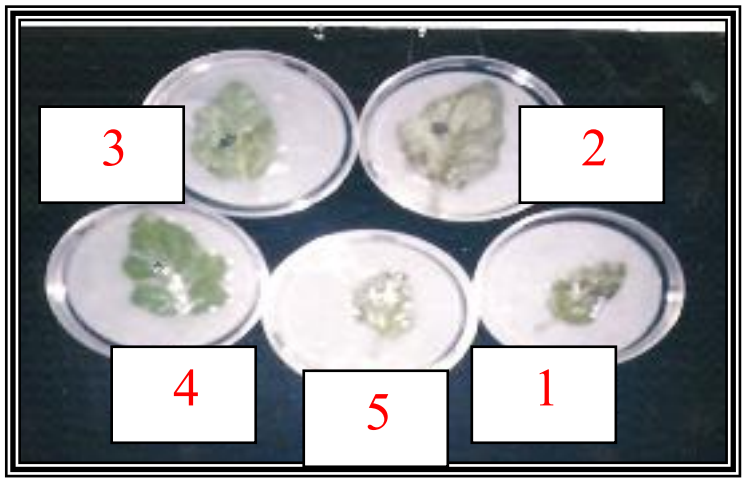
جدول (6): تأثير رش ثمار الخيار المصابة بالفطر *Altrnaria sp* بالمستخلص الكحولي للعكبر وبتركيز 5 ملغم / مل

الأيام	المعاملات/سم				
	ثمار خيار ملقحة بالفطر وبعد 24 ساعة رشت	ثمار خيار ملقحة بالفطر وبعد48 ساعة رشت	ثمار خيار ملقحة بالفطر وقبل ساعة24 رشت	ثمار خيار ملقحة بالفطر وقبل 48 ساعة رشت	ثمار خيار ملقحة بالفطر فقط للسيطرة
الأول	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5*
الثاني	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
الثالث	0.6	0.8	0.5	0.5	1.2
الرابع	0.9	1	0.5	0.5	2.1
الخامس	1.5	1.8	0.5	0.5	2.8
السادس	1.6	2.9	0.5	0.5	3.8
السابع	1.9	3	0.5	0.5	4.7
الثامن	2	3	0.5	0.5	5.5
التاسع	2.1	3	0.5	0.5	6
العاشر	2.1	3	0.5	0.5	6

* قطر رأس المسمار 0.5 سم



شكل (1):طيف الاشعة تحت الحمراء (IR) للمستخلص الايثانولي للعكبر



شكل (2) : يوضح تأثير رش أوراق الباذنجان بالمستخلص الكحولي للعكبر وبتركيز 5 ملغم / مل في منع نمو الفطر *Botrytis* وحسب المعاملات آلاتية :

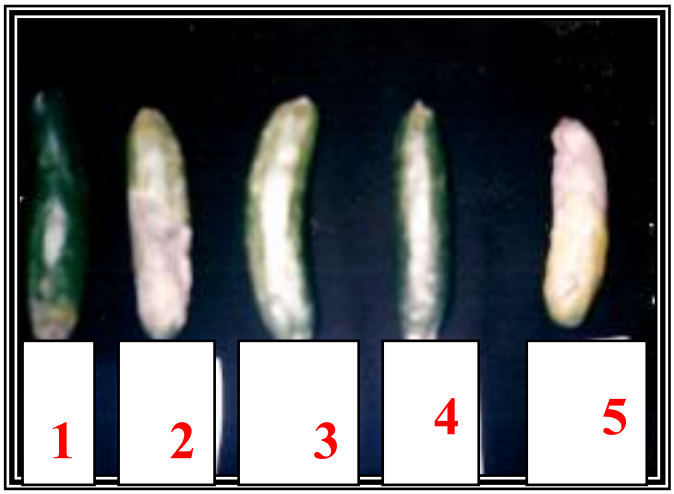
1 – لقحت بالفطر *Botrytis* وبعد 24 ساعة رشت بالمستخلص.

2 – لقحت بالفطر *Botrytis* وبعد 48 ساعة رشت بالمستخلص .

3 – رشت بالمستخلص وبعد 24 ساعة لقحت بالفطر *Botrytis* .

4 – رشت بالمستخلص وبعد 48 ساعة لقحت بالفطر *Botrytis* .

5 – لقحت أوراق النبات بالفطر *Botrytis* للسيطرة.



شكل (3): يوضح تأثير رش ثمار الخيار بالمستخلص الكحولي للعكبر وبتركيز 5 ملغم / مل في منع نمو الفطر *Botrytis* وحسب المعاملات الآتية:

1- ثمار خيار لقحت بالفطر *Botrytis* وبعد 24 ساعة رشت بالمستخلص.

2- ثمار خيار لقحت بالفطر *Botrytis* وبعد 48 ساعة رشت بالمستخلص.

3- ثمار خيار رشت بالمستخلص وبعد 24 ساعة لقحت *بالفطر Botrytis* .

4- ثمار خيار رشت بالمستخلص وبعد 48 ساعة لقحت *بالفطر Botrytis* .

5- ثمار خيار ملقحة بالفطر *Botrytis* فقط للسيطرة.

Antifungal Activity of Propolis Ethanol Extract Against *Botrytis cinerea, Altrnaria sp* Which Caused Many Plant Diseases

A. S.Darweesh
Department of Biology, College of sciences, University of AL-Mustansiriya

Abstract

This study was conducted to determine the effect of different concentrations of ethanol extract of propolis against two fungi *Botrytis cinerea, Altrnaria* sp.

The most important chemical constituents of propolis diagnosed by the Infra Red Spectroscopy, were the Flavonoids specificaly.

Results showed a high antifungal activity of ethanol extract of propolis, evidently with a high concentration of extract (5) mg\ml, which completely inhibited the radial growth on both solid and liquid media (PDA &PD Broth) of both fungi .

We observed that , ethanol extract propolis at concentration of 5 mg\ml were sprayed on experimental infection on some plants (eggplant leavers & cucumber) which were effected by fungal. The spraying of ethanol extract of propolis before 24, 48 hour prevented development of disease and made a good protection of the mentioned plants from being infected with this fungus. While, the ability of fungus to grow after 24, 48 hours from ethanol extract of propolis treatment was reduce markedly as compared with control ,such treatment show a slow growth of pathogen infect.