

دراسة الفعالية التضادية للمستخلص الكحولي للعكبر propolis ضد الفطر *Fusarium oxysporum*

م.م أحمد ساهي دويش , م.م مهند عبد الاله قاسم, زيد ناجي حسن

الجامعة المستنصرية /كلية العلوم

قسم علوم الحياة

الخلاصة

نفذت هذه الدراسة لتحديد تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الايثانولي للعكبر (propolis) إزاء الفطر *Fusarium oxysporum* المسبب للعديد من الامراض النباتية .

بينت النتائج الكفاءة التثبيطية العالية لهذا المستخلص , إذ أدى التركيز العالي (5 ملغم /مل) إلى تثبيط النمو الشعاعي كلياً على الأوساط الغذائية (PDA) بينما تفاوتت التركيزات (2.5 و 1.25 ملغم/مل) في التأثير وبنسب وصلت الى 83.3% و 73.75% وعلى التوالي .

وقد أظهرت نتائج البحث قدرة المستخلص الكحولي للعكبر عند التركيز (5 ملغم / مل) المرشوش على ثمار الخيار المصابة بالفطر في منع تطور أصابه المرض وحقق حماية جيدة بشكل ملفت خاصة عند الرش بالمستخلص قبل 24 ساعة من التلقيح بالفطر من خلال منع نمو وانتشار الفطر بشكل كامل, في حين تفاوتت قدرة المستخلص الكحولي للعكبر المرشوش بعد 24 و 48 ساعة من التلقيح بالفطر على منع حدوث الإصابة بالمقارنة مع معاملة السيطرة . إذ ظهر نمو بطيء للمسبب المرضي .

**Study antifungal activity of ethanol extract propolis against
Fusarium oxysporum fungi**

Ahmed S.D ;Mohanad A.K ;Zaid N.H

AL-Mustansiriya University/ College of sciences

Dept .biology

Abstract

This study was conducted to determine the effect of different concentrations of ethanol extract propolis on plant pathogenic fungi which caused by *Fusarium oxysporum*,

Results show the high antifungal activity of ethanol extract propolis, this was evident with high concentration of extract (5 mg/ml), which completely inhibited the radial growth on solid media (PDA) of pathogen *F. oxysporum*

We observe that , ethanol extract propolis at concentration of 5 mg/ml which sprayed on cucumber were infected by fungal. the spraying of ethanol extract propolis before 24, 48 hour of treatment prevent development of disease and make a good protection of the mentioned plants from been infected with this fungus. While, the ability of fungus to grow after 24, 48 hours from ethanol extract propolis treatment was reduce markedly as compare with control ,such treatment show slow growth of pathogen infect.

المقدمة

العكبر (propolis) عبارة عن مادة صلبة راتنجية تنتج بواسطة حشرة النحل 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 ذات الفعالية العالية لمختلف انواع البكتريا والفيروسات والفطريات. (1,2)

التركيب الكيميائي للعكبر يختلف 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 قبل حشرات النحل المعتمدة في تغذيتها على اشجار اليوكالبتوس Eucalyptus يحتوي على بعض المركبات ذات الوزن الجزيئي العالي مثل lupeol alkanoates (5) الا ان بعض الاراء تشير الى ان اختلاف التركيب الكيميائي للعكبر من منطقة لآخرى يعتمد على اختلاف العوامل الوراثية genetic factor لحشرة النحل من مكان الى اخر اكثر من اختلاف المصادر النباتية (6)

اجريت العديد من الدراسات والبحوث على العكبر لاسيما في السنوات الاخيرة لاهميته الطبية , اذ يحتوي في تركيبه على العديد من المركبات الفعالة والمهمة وخاصة المركبات الفينولية والفلافونات التي تمتلك فعالية متعددة مضادة للعديد من انواع البكتريا والفطريات وتنشط نمو العديد من انواع الفايروسات عن طريق تثبيط بعض الانزيمات المهمة الموجودة فيها مثل Reverse transcriptase , Protease وعملها على تحطيم بعض الطفيليات الممرضة . (7,8)

يعد الفطر *Fusarium oxysporum* العائد للعائلة *Dematiaceae* التابعة لرتبة *Moniliales* ضمن الفطريات الناقصة Imperfect fungi (وهي الفطريات التي لم يعرف تكاثرها الجنسي بعد وتتكاثر لا جنسيا بتكوين الجراثيم الكونيدية(9) من الفطريات المترمة Saprophytes وذات مدى عائلي واسع والتي تعد أحد المسببات المرضية للعديد من الأمراض النباتية , اذ يسبب *Fusarium oxysporum* أمراض الذبول الوعائي وتعفن الجذور Root Rot & Vascular wilt (9,10) .

وبسبب الآثار السلبية التي يخلفها الاستعمال العشوائي للمبيدات الكيماوية فقد اتجهت أغلب الأبحاث والدراسات الحديثة إلى الاستفادة من المواد الطبيعية لاستعمالها للحد من العديد من المسببات المرضية التي تسبب خسائر اقتصادية كبيرة(9).

ومن أهداف هذا البحث التحري عن فعالية المستخلص الكحولي للعكبر على هذه المسببات المرضية ومدى القدرة التثبيطية التي يمتلكها ضد الفطريات .

المواد وطرائق العمل

• الفطريات الممرضة

تم عزل جميع الفطر المستخدم في هذه الدراسة من نباتات طماطم مصابه , اذ عزل الفطر *Fusarium oxysporum* بالاعتماد على مفاتيح التصنيف المعتمدة (11) جرى عزل وتشخيص الفطريات على وسط الدكستروز البطاطا (PDA) Potato Dextrose Agar اذ نقيت العزلة من خلال نقلها إلى أطباق PDA جديدة.

• تحضير اللقاح الفطري

تم جمع ابواغ الفطر *Fusarium oxysporum* بواسطة إمرار قضيب زجاجي معقم على وسط PDA حاوي على غزل الفطر بعمر أسبوعين بعد إضافة 10 مل ماء مقطر معقم وتم جمع العالق في قطارة معقمة وتم حساب أعداد الابواغ بواسطة شريحة العد Haemocytometer وتم تخفيف العدد إلى $10^6 \times 1$ بوغ / لتر وهذا هو المستوى المستخدم في التجارب التي أجريت.

• جمع عينات العكبر:

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

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

• تحضير مستخلص العكبر (propolis) :

وزن 2 غم من مسحوق العكبر واضيف له 50 مل من الكحول الايثيلي بتركيز 95% ثم خلط المزيج لمدة ساعة واحدة بواسطة المازج الدوار Vortex ، بعدها ترك لمدة 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 بعدها رشح المحلول بواسطة ورق الترشيح (Whatman No.1) ، ثم عرض الراشح للتبخير في الفراغ باستخدام جهاز التبخير الدوار بحرارة 45 م ، بعدها تم وزن المادة الجافة المتبقية والتي هي عبارة عن المستخلص (12).

• دراسة الفعالية التثبيطية Antifungal activity لمستخلص العكبر :-

• تأثير تراكيز مستخلص العكبر في النسبة المئوية لتثبيط النمو أشعاعي للفطريات الممرضة.

استخدمت طريقة (13) اذ تم اضافته (10,5,2.5) 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 الأطباق لتتصلب أعقبها زرع اللقاح الفطري المؤلف من قرص بقطر 6 ملم مقطوع بواسطة ثاقب فلين من حافات مزرعة بعمر أسبوع. و حضنت الأطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة أسبوعين. حسب النسبة المئوية لتثبيط النمو أشعاعي عند وصول النمو في معاملة السيطرة إلى حافات الطبق. وحسب المعادلة الآتية :

معدل النمو أشعاعي للفطر (سم) في أطباق السيطرة - معدل النمو أشعاعي في أطباق معاملة

نسبة تثبيط النمو أشعاعي % = ----- * 100

معدل النمو أشعاعي في أطباق السيطرة

• تقدير تأثير مستخلص العكبر المرشوش على أوراق نبات الخيار الملحق بالفطر *Fusarium oxysporum*

بفترات زمنية معينة :

أخذت ثمار خيار محليه وبعد غسلها و تعقيمها سطحيا بواسطة القاصر التجاري بتركيز 0.06% (هايوكلورات الصوديوم) لمدة نصف دقيقة، جففت و قسمت إلى 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 *Fusarium oxysporum* بواقع فطرتين لكل بقعة ورشت بمستخلص العكبر بتركيز 5 ملغم/مل وحسب المعاملات التالية: 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. ثم تم وضع المعاملات في أكياس نايلون لمدة 48 ساعة للمحافظة على الرطوبة اللازمة وتم متابعة تطور المرض على ثمار لمدة عشرة أيام مع حساب معدل قطر المتعادم لتوسع الإصابة.

النتائج والمناقشة

• تأثير تراكيز المستخلص في النسبة المئوية لتنشيط النمو الشعاعي للفطر.

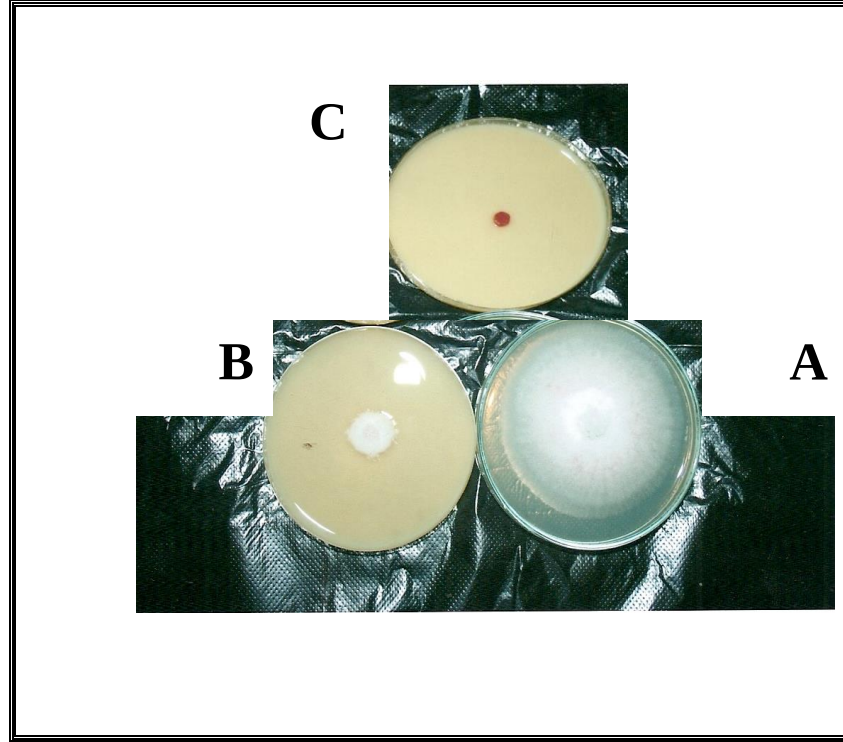
أشارت النتائج في الجدول (1) إلى أن أعلى نسبة مئوية لتنشيط النمو الشعاعي سجلت في معاملة الفطر *Fusarium oxysporum* المسبب لمرض الذبول الوعائي في الطماطم , إذ بلغت النسبة (100%) عند التركيز 5 ملغم / مل وسجل أقل نسبة مئوية لتنشيط (73.75 %) في معاملة الفطر عند التركيز 1.25 ملغم / مل
 إذ دلت النتائج أن زيادة تركيز المستخلص أدت إلى زيادة في النسبة المئوية لتنشيط النمو الشعاعي على الوسط الغذائي الصلب PDA. وكما موضح في الشكل (1)

ان النتائج الموضحة في الجدول (1) تتفق مع ما اشار اليه (14) الى ان المستخلص الايثانولي للعكبر يستخدم وبنجاح في علاج امراض ال candidiasis الناتج عن الاصابة بالخميرة *c. albicans* ووجد ان الفعالية مشابهة لفعالية المضاد الفطري ال . Nystatin .

اذ اشارت العديد من الدراسات الى التأثير الضد مايكروبي للعكبر والذي يعزى لوجود العديد من المركبات الفينولية كالاحماض الاروماتية واسترات الاحماض الفينولية والتربينات الثلاثية والثنائية فضلاً عن وجود الفلافونات (15).

الجدول (1) : تأثير تراكيز مستخلص العكبر في النسبة المئوية لتنشيط النمو الشعاعي للفطر *Fusarium oxysporum*

التركيز ملغم / مل	النسبة المئوية لتنشيط
5	100
2.5	83.3
1.25	73.75



الشكل (1) يوضح تجربة قياس النسبة المئوية لتثبيط النمو الشعاعي للفطر على وسط الـ PDA

- A - الفطر بدون المعاملة بمستخلص العكبر (سيطرة)
- B - الفطر معاملة بتركيز 2.5 ملغم / مل بمستخلص العكبر .
- C - الفطر معاملة بتركيز 5 ملغم / مل بمستخلص العكبر .

تأثير رش ثمار
بالفطر
oxysporum
العكبر
5ملغم / مل

المعاملات/سم					الأيام
ثمار خيار ملقحة بالفطر فقط معاملة سيطرة	ثمار خيار ملقحة بالفطر وقبل 48hr رشت بالمستخلص	ثمار خيار ملقحة بالفطر وقبل 24hr رشت بالمستخلص	ثمار خيار ملقحة بالفطر وبعد 48hr رشت بالمستخلص	ثمار خيار ملقحة بالفطر وبعد 24hr رشت بالمستخلص	
0.5*	0.5	0.5	0.5	0.5	الأول
0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	الثاني
1.2	0.5	0.5	0.8	0.6	الثالث
2.1	0.5	0.5	1	0.9	الرابع
2.8	0.5	0.5	1.8	1.5	الخامس
3.8	0.5	0.5	2.9	1.6	السادس
4.7	0.5	0.5	3.1	1.8	السابع
5.5	0.5	0.5	3.1	2	الثامن

جدول (2):
الخيار المصابة
Fusarium
بمستخلص
عند التركيز

6	0.5	0.5	3.1	2.1	التاسع
6	0.5	0.5	3.1	2.1	العاشر

* قطر رأس المسمار 0.5 سم

- تجربة ثمار الخيار المرشوشة بمستخلص العكبر (propolis) :

اذ ظهرت أعراض المرض في ثمار السيطرة متمثلة بنمو بني حول اللقاح مع هرس لنسيج الثمرة (نتيجة لإفرازات الفطر الإنزيمية مثل أنزيم البكتيناز pectinase (9) أدى إلى تلون وموت النسيج النباتي وترك الثمرة منكشحة وبنية ولينة وقد بلغ معدل قطر الاصابه 6 سم كما موضح في الجدول (2).

في حين لم تظهر الأعراض على ثمار الخيار المرشوشة بالمستخلص قبل 48,24 ساعة من التلقيح بالفطر وبقي معدل القطر 0.5 سم طيلة فترة التجربة .بينما حدث نمو بسيط للفطر على الثمار المرشوشة بالمستخلص بعد 48,24 ساعة من التلقيح بالفطر بلغ (2, 3.1) سم على التوالي في اليوم الأخير للتجربة الجدول (2) وعليه يمكن أن نستنتج أن قابلية الفطر على أحداث مرض العفن وحصول الاصابه في العائل النباتي يمكن أن تتضاءل عند رشها بالمستخلص الكحولي للعكبر نتيجة يمكن أن تدفع الباحثين إلى إجراء المزيد من الدراسات المستفيضة حول قابلية هذا المستخلص للحد من الأمراض التي تسببها مسببات مرضيه مختلفة يمكن لها أن تسبب خسائر اقتصادية كبيرة.

المراجع References

1. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Ambrosano GMB, Murata RM, Yatsuda R, Ikegaki M, Alencar SM, 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. *Fitooterapia* 71, 693D696.
4. Bankova , V.; Popova, m .; Bogdanov, S .;SABATINI, A.(2002).Chemical 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. Plant Pathology . 4th. Edition. (1997).
- 10- أسطفان ,زهير عزيز . محمود, حازم عبد العزيز. أفات الطماطم . مطبعة أدورد للطباعة الفنية الحديثة . وزارة الثقافة والأعلام.(1998).
11. Alexopoulos C.J.& Mims C.W. (1979). Introductory Mycology (3rd Edition) print in Singapore .P601.
12. Rhajaoui ,M.;Oumzil, H.;Faid ,M.;Lyagoubi, M.;Elyachioui,M.;Benjouad, A. (2001).Antibacterial activity of Moroccan propolis extracts,science letters , vol .3,No.3. (Research Article).
- 13.الخفاجي ، باسمه ربيع احمد (2000) ، تأثير مستخلصات نباتات سم الفراخ والصفصاف والميرمية على نمو بعض الفطريات الجلدية . رسالة ماجستير كلية العلوم ، الجامعة لمستنصرية .
14. 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.
15. Bankova V., De Castro S. L. and Marcucci M. C. (2000), Propolis: advances in chemistry and plant origin. Apidologie 31, 3D15.