جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

تقيم كفاءة المستخلص المائي لنبات الحلبة في السيطرة على الفطريات المرافقة لبذور السبانغ

بحث مقدم الى

كلية العلوم_قسم علوم الحياة

كجزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس

العلوم_علوم الحياة

من قبل الطالب_باقر حمزة ضايع

بأشراف

م.م.ولاء ياس

١٤٣٧_١٤٣٨ هجري ٢٠١٦_٢٠١٧ ميلادي

بسم الله الرحمن الرحيم

{فَفَتَحْنَا أَبْوَابَ السَّمَاءِ بِمَاءٍ مُّنْهَمِرٍ }

صدق الله العلي العظيم

سورة القمر

الاية (11)

الإهداء

الى سيد المرسلين ..... الرسول الكريم (صلى الله عليه واله وسلم)

الى قائد الغر المحجلين ..... أمير المؤمنين (عليه السلام)

الى من تعلمنا منهم الزهد في الدنيا ..... الأئمة الاطهار (عليهم السلام)

الى من رباني على الالتزام بمحبة الله والناس ..... والدي العزيز

الى من غذتني بحنانها وسهرت على تربيتي ..... والدتي العزيزة

الى روافد المحبة والوفاء ..... اخوتي

الى كل من يهمه نجاحي وتقدمي .....

..... أهدي ثمرة جهدي المتواضع هذا

شكر وتقدير

الحمد لله الذي أنار لنا درب العلم والمعرفة وأعاننا على أداء هذا الواجب ووفقنا إلى انجاز هذا العمل..

اتوجه بجزيل الشكر والامتنان إلى كل من ساعدنا من قريب أو من بعيد على انجاز هذا العمل وفي تذليل ما واجهناه من صعوبات ، ونخص بالذكر أساتذتي الذين لم يبخلوا علينا بتوجيهاتهما ونصائحهما القيمة التي كانت عونا لنا في إتمام هذا البحث.

الخلاصة :

شملت هذه الدراسة تأثير المستخلصات المائية لبذور نبات الحلبة (Trigonells Foenum Lin) على بعض الفطريات المرافقة لبذور السبانغ ودراسة تأثر هذه المعملات في النمو الشعاعي والوزن الجاف لبعض الفطريات المعزولة من هذه البذور.

تبين من خلال الكشف الكيميائي التمهيدي عن بعض المواد الفعالة في المستخلصات المائية لنبات الحلبة انها احتوت مستخلصات نبات الحلبة على القلويدات التانينات والراتنجات والصابونيات والفينولات والفلافونات .

اضهرت النتائج عزل انواع عدة من الفطريات المرافقة للبذور وتم تشخيص ستتة انواع منها وبنسب تردد مختلفة

وهي : *Aspergillus niger (Van Tieghem)* و *Alternaria alternata (Fr.Keissler)*

و *Rhizopus stolanifer (Ehremex Link)* و *Fusarium solani (mart)* و *Pythium aphanidermatium* و *Fusarium oxysporum (Synder g Hasen)* .

الفطريات المختبرة على الوسط PDA وهذه الفطريات *Aspergillus niger* و *Alternaria alternata*

Fusarium solani .

كما وجد ان المستخلصات المائية لها تأثيرات مثبطة معنوية لنمو الفطريات المختبرة على الوسط الغذائي الصلب PDA بالقياس مع معاملات المقارنة عند مستوى احتمال 5% .

اذا بلغت معدلات نسب التثبيط 79.26% , 79.63% على التوالي عند التراكيز 15 ملغم/مل ما بين (– 0.14 0.09 غم) لمعاملات المستخلص المائي لنبات الحلبة .

قائمة المحتويات

الموضوع	الصفحة
الخلاصة	1
المقدمة	3
استعراض المراجع	4
الفطريات المرافقة للبذور	4
النباتات الطبية واستخذاماتها المضادة للفطريات	4
نبات الحلبة	5
التوزيع الجغرافي	5
الوصف العام للنبات	6
المركبات الفعالة في الحلبة	6
استخدام نبات الحلبة طبيا	6
الاجهزة والمواد	8
الاجهزة	8
المواد	9
طريقة العمل	10
جمع البذور	10
الاوساط الزراعية والمحاليل	10
تحضير الاوساط الزراعية	10
وسط أكار البطاطا ديكستروز	10
وسط مرق البطاطا ديكستروز	10
جمع الأجزاء النباتية المختبرة	11
تحضير المستخلصات النباتية	11
المستخلص المائي الحار	11
تحضير المحلول الخزين	12
عزل الفطريات المرافقة لبذور والسبانغ	12
تشخيص الفطريات المعزولة	12
تأثير المستخلصات في الوزن الجاف للفطريات	13
عزل وتشخيص الفطريات	14
تاثير المستخلصات المائية والكحولية للنباتات المختبرة وبعض المبيدات في النمو الشعاعي للفطريات	16
تاثير المستخلصات المائية والكحولية للنباتات المختبرة وبعض المبيدات في الوزن الجاف	18

المقدمة :

السبانغ *spinacia oleracea L.* يتنمي الى العائلة الرمرامية *Chenopodiaceae* وهو من المحاصيل الخضر المهمة في العراق وغيره من بلدان العالم , وهو يزرع من اجل اوراقه التي تستعمل مطبوخه او في الشوربة واحيانا في السلاطة ويعد من المحاصيل الخضر الغنية بفيتامين A وهو يحتوي بلاضافة لذالك كميات لا بأس بها من فيتامين C وهو الريبوفلافين وكميات قليلة من الثيامين وهو غني بلحديد والكالسيوم كما يحتوي على كمية مرتفعة نسبيا من البروتين .

يعتقد ان الموطن الاصلي للسبانغ هو بلاد فارس (ايران حاليا) وقد نقله العرب في فتوحهم الى الاندلس سنة 1100 م

ومن هناك انتشر الى اوربا وهو من المحاصيل الشتوية وينمو بصورة جيدة في الجو البارد نسبيا ويقاوم الانجماد الى حد درجة (-8 °م) (الراوي والحديثي 1965) .

والسبانغ غني بفيتامين A وتحتوي كميات قليلة من حامض الاسكوربيك والريبوفلافين وكميات صغيرة من الثيامين وهي غنية ايضا بلحديد والكالسيوم ولاكن هنا الكلاسيوم غير ميسر بسبب اتحاده مع حامض الاسكوربيك مكونا اكسلات الكالسيوم (المتنبي واخرون 1959) .

يصاب السبانغ بعدة امراض , منها اصفرار السبانغ الذي يسببه فايروس موزائيك الخيار كما يصاب بمرض البياض الزغبي (Downy mildew) ويسببه الفطر *Peronospora effuse* ويتسبب عنه خسارة كبيرة كما يصاب بمرض الذبول الفيوزارمي (Fusarium wilt) ويسببه الفطر *Fusarium solani* وكذالك تبقع الاوراق ويسببه الفطر *Heterosporium sp.* .

يعد الفطر *Alternaria* من الفطريات المنتشرة عالميا وهي مسبب مرضي للنبات ويسبب تلف المنتجات النباتية في المخازن بعد حصادها 1998.

يضم جنس *Alternaria* (100) نوع ومعضمها ممرضة للنبات وتسبب تلف الحبوب والمحاصيل الحقلية قبل وبعد الحصاد واثناء الخزن (Thomma,2003) ويفرز العديد من السموم ولاسيما النوع *Alternaria alternata* الذي يفرز سموما تعرف ب Phytotoxins وهي عبارة عن احد النواتج الايضية الكيميائية المتنوعة ذات وزن جزيئي واطئ (Upadhyay and Mukerji 1997) ومن هذه السموم Tentoxin وZinniol (Fujiwara et al., 1988)

اما الفطر *Aspergillus* يعد من الفطريات الانتهازية وتكون سبوراته المحمولة بلهواء مسببه حساسية للجهاز التنفسي للانسان والحيوان ويسبب الفطر خسائر نوعيه وكمية على المنتجات الزراعية حيث تؤدي الى تلفها او تلوثها بلسموم الفطرية Aflatoxin (Dienor et al., 1978) يمكن تلافي الاضرار التي تسببها تلك الفطريات من الناحية الصحية والاقتصادية في العالم من خلال البحث في مركبات التي تحد من نموها وسير فعالياتها الحيوية والخلوية سواء هذا المركبات مصنعة او طبيعية او محظرة .

استعراض المراجع :

1 - الفطريات المرافقة للبذور

الفطريات كائنات حية واسعة الانتشار في الطبيعة وهي خالية من الكلوروفيل وتعود لمملكة الفطريات Mycetae و تمتلك اجساما اما تكون وحيدة الخلية او متعددة الخلايا وهذه بدورها متفرعة ومقسمة او غير مقسمة وتدعى Hyphae تنمو هذه الخيوط الفطرية في الوسط الغذائي او العائل وتتفرع لتكون الغزل الفطريMycelium ةتتكاثر جنسيا او لا جنسيا لتكون سبوراتها الجنسة او اللاجنسية لغرض اعادة دورة حياتها

. (Kwon-chang & Bennett . 1992 ; de Hoog & Guarro, 1995)

وهي كائنات حية صغيرة الحجم كثيرة الانواع وتختلف فيما بينها من حيث احتياجاتها وهي متعددة التغذية Heterotrophic و تتغذى بأحد انواع التغذية الرمية Saprophytism والطفيلية Parasitism و هناك بعض الفطريات التي تتبادل المنفعة Symbiosis مع كائنات حية أخرى مثل الطحالب لتكون الاشنات وتتغذى الفطريات بالامتصاص وهي اما وحيدة الخلية مثل الخمائر او خيوط فطرية غنية بالفطريات (نخيلان, 2010).

والفطريات لها متطلبات غذائية مختلفة فاما تكون رمية (Saprophyte) او متطفلة (Parasite) على الكائنات الحية وهذا التطفل اما اختياري او اجباري على العائل فتسبب تلف الانسجة والامراض للانسان والحيوان والنبات وقد تؤدي الى الموت كما تسبب تلف الاغذية وتلوثها بالسموم الفطرية كالحبوب والمنتجات الزراعية المخزونة نتيجة لعمليات النقل والخزن لمدد زمنية طويلة مما ينتج عنه تسمم غذائي (Food spoilage)

. (Collee at al., 1996 ; Pitt & Hocking , 1985)

2 - النباتات الطبية واستعمالاتها المضادة لفطريات

أن فكرة وجود قوة شفاء كبيرة في النباتات لامراض تصيب الانسان والحيوان هي فكرة قديمة جدا حيث عرف الانسان في جميع القارات استخدام النباتات منذ مئات او الاف السنين قبل التاريخ , حيث لوحظ استخدام انسان النيادرتال المكتشف في العراق استخدامه للنباتات قبل اكثر من 60000 سنة وبقيت هذه النباتات واسعة الاستخدام في المجال الطبي (ethnomedicin) في كل انحاء العالم (Stockwell , 1988)

كما استخدمت النباتات بديلا عن العلاجات الطبية بشكل واسع ومنتشر في اواخر 1990 و تشير الدراسات الى استخدام النبات الطبي بدلا عن العلاج الكيمائي ومعالجة الامراض ومسبباتها وملاحظة تاثيرها في هذه المببات (Ticky & Novak, 1998)

هناك العديد من النباتات والاعشاب الطبية المتنوعة البرية والصحراوية المنتشرة في الوطن العربي , ويعتبر العراق من البلدان التي تنمو فيها هذه النباتات بشكل طبيعي في كافة مناطقه .

يمكن تمييز النباتات الطبية عن غيرها من النباتات من خلال امتلاكها بعض المركبات الفعالة (Active compound) التي تقسم على (9) مجاميع وهي الزيتوت الطيارة (Volatile Oils) و الجليكوسيدات (Glycosides) و الصابونيات (Saponines) و التنينات (Tanins) و القلويدات (Alkaloides) و الشحميات (Lipidis) و الكاربوهيدرات (Carbohydrate) و الراتنجات (Resins) و الستيرويدات (Steroides) , حيث

وجد ما يقارب (50000- 25000) نوع من النباتات على الكرة الارضية تستخدم بعضها للاغراض الطبية (Al-Rawi & Chacravarty , 1988

وقد اوردت منظمة الصحة العالمية في تقرير لها ان حوالي 80% من سكان العالم يعتمدون بشكل رئيسي على الطب التقليدي و ان الجزء الاكبر من هذا الطب يستخدم مستخلصات النباتات او مكوناتها الفعالة (WHO , 1993)

ان للنباتات الطبية استعمالات عدة منها ما يستعمل كدواء او علاج لكثير من الامراض سواء أكانت تؤخذ بشكل مباشر كالكمون و الحبة السوداء و الحلبة او مصنعة مختبريا بالاستخلاص و التنقية مثل الاتروبين المستخلص من نبات البلادونا و المستعمل في توسيع حدقة العين او الكينين المستخرج من نبات القنقينة المستعمل لعلاج الملاريا وغيرها

3 - نبات الحلبة

الاسم المحلي : الحلبة

الاسم الانكليزي : Fenugreek

الاسم العلمي : *Trigonella Foenum Linn*

العائلة : العائلة البقولية Fabaceae

1-3 التوزيع الجغرافي

نبات الحلبة عالمي الانتشار , اذا يزرع في منطقة الشرق , شرق البحر المتوسط و اوربا و اسيا و الامريكيتين الشمالية والجنوبية و استراليا (Hand *et al*., 2005) و في العراق يزرع في دهوك وشقلاوة و السليمانية و كركوك و حمرين و ابو غريب و الكحلاء و الرستمية و العمارة و البصرة (Al-Rawi & Charkravarty, 1988) .

ويضم جنس الحلبة سبعين نوعا ومنها ثمانية عشر نوعا في العراق اهمها :

Trigonella Foenum linn .

Trigonella corniculata

Trigonella ruthenica

Trigonella monospellace

Trigonella anrantiace

Trigonella spinosa

Trigonella polyceratia

واهم الانواع *Trigonella foenum* (الموسوي , 1987)

2-3 الوصف العام للنبات

وهي من الاعشاب الحولية المعروفة منذ القدم باهميتها الطبية في جميع انحاء العالم وقد عني بدراستها الكثير من العلماء مثل ابن البيطار و غيره (Wallis , 1985) و هي من المحاصيل الشتوية التي تزرع لاغراض عدة منها غذاء الانسان او علف الماشية فضلا عن استعمالاتها في الادوية و العقاقير الطبية (مقبول و اخرون ,1995) , والنبات بشكله العام عشبي يتراوح طوله بين (٦٠-٢٠) سم , جوفاء السيقان و اوراقها ريشية مركبة ثلاثية الوريقات والزهرة بيضاء مائلة الى الاصفرار تتوافر في اباط الاوراق اما الثمار فهي من نوع القرنة الطويلة التي تستدق عند طرفها و تحتوي على بور عدة , وتكون البذور معينية الشكل ملساء ذات رائحة نفاذة .

3-3 المركبات الفعالة في الحلبة

تحتوي على نسبة عالية من الكربوهيدرات و البروتينات و الاحماض الامينية و الفيتامينات و تحتوي على 50% الياف و 18% صمغ و 2 % Hemicellulos (Ribes *et al.*, 1984) الى جانب احتواء البذور على مواد غروية (Mucilage) بنسبة 30% اهمها galactomannan .

كما تحتوي بذور الحلبة على نسبة عالية من القلويدات غير السامة اهمها Trigonellin المشتق من حامض النيكوتين الذي له القابلية على التحول الى Nicotine amide , ومن اهم القلويدات التي تحتويها بذور الحلبة مادة الكولين Choline ($C_5H_{15}N_2$) الذي يعد من المركبات المهمة التي تدخل في عمليات الايض الغذائي Metabolism كما تحتوي على التاينين والكورمارين الى جانب مركبات الفلافونيدات كالترايسين و الروتين و حامض الغاليك (Yoshikawa *et al.*, 1997) .

وتمتاز الحلبة برائحتها المميزة الناشئة عن احتوائها على الفيورانوم الذي تم عزله من الزيوت الطيارة للبذور الى جانب مركبات طيارة اخرى مثل Hexanol و Y-nonalactone و B-ionone (Newall *et al.*, 1996) .

كما تحتوي بذور الحلبة على مركبات صابونية سيترويدية بنسبة 1.5 % و هي مركبات لها خاصية تكوين رغوة متينة عند خلط محاليلها المائية اذ يعطي التحليل المائي لبذور الحلبة نوعين من سيترويدات الصابونين هما diosgenin و gitogenin بنسبة 9 : 1 الى جانب نسب قليلة من انواع اخرى مثل neogitogenin و (Tyler *et al.*, 1997) تعد بذور الحلبة مصدرا غنيا بالمعادن اهمها الحديد و الكالسيوم و البوتاسيوم و الفسفور و الصوديوم (Hussein , 1985) .

4-3 استخدام نبات الحلبة طبيا

تعد الحلبة من اقدم النباتات الطبية استخداما في المجال الطبي و يعود استخدامها الى المصريين القدماء تحت تسمية Itasin اذ استخدمت لاحداث الطلق و استحثاث عملية الولادة (Basch *et al.*, 2003) و يستخدم مغلي البذور للمصابين بالسل (lust , 1986) كما استخدمه الصينيون القدماء لعلاج مضاعفات التهابات الكلية و الحالات التي تصيب القناة التناسلية (Amin *et al.*, 2005)

الحلبة من النباتات المعروفة بفاعاليتها المخفضة لمستوى السكر في الدم بما فيها الاوراق و البذور (Zia *et al.*, Vasts, 2002) و يعود السبب الى احتوائها على Galatomannan و الالياف التي تطيل الزمن اللازم لعبور

الغذاء خلال القناة المعوية مما ينتج عنه بطء في امتصاص السكريات مع الغذاء و عدم ارتفاع مستوى السكر في الدم (Madar, 1990 ; Al-zudkhan *et al.,* 1995) او قد يعزى الى احتواء الحلبة على الحامض الاميني 4-HIL الذي يحفز لتحرير الانسولين المعتمد على الكلوكوز و زيادة عدد المستقبلات ومواقع الارتباط مع الانسولين في كريات الدم الحمر (الجبوري , 2004 ; Collins , 2002). تتميز الحلبة بخواص مضادة للالتهابات و الفايروسات (Aquino *et al.,* 1991 ; Wu *et al.,* 1991) و مضادة للسرطان كسرطان الجلد وسرطان القولون عن طريق غلق انزيمات مهمة في خطوات نمو الخلايا السرطانية (Ghanem *et al.,* 1995) و وجد ان لمادتي الصابونين والالياف المتواجدة في بذور نبات الحلبة اثر مهم في تخفيض مستوى الكوليسترول في الدم اما من خلال طرح الكوليسترول او احماض الصفراء مع العضلات (Rao et al., 1996) و لاحظت السعدي (2007) في دراستها اثر المستخلص الكحولي لبذور الحلبة بوصفها مضادة للجراثيم عن طريق تأثيره المثبط لنمو الاحياء المجهرية .

المواد وطرق العمل :

1- الاجهزة والمواد Apparatus & Materials

1 – 1 الاجهزة Apparatus

ت	الاجهزة	النوع	المنشأ
1	ميزان حساس sensitive balance	Gallan kamp	England
2	مطحنة كهربائية Blender electric grinder	Moukix	France
3	فرن كهربائي Oven	Memmert	Germany
4	المؤصدة Autoclave	Memmert	Germany
5	حاضنة Incubator	Memmert	Germany
6	مجهر ضوئي compound microscope	olympus	Japan
7	كابينة الزرع المجهري Laminar flow cabinet	Philips	Netherland
8	المبخر الدوار Rotary vaccum evaporator	Buchi	Switzerland
9	الثلاجة Refrigerattor	Chiller	Iraq

1 – 2 المواد Materials

A – المواد الكيميائية			
ت	المواد	الشركة المصنعة	المنشأ
1	كحول اثيلي 99% Ethanol	BDH	England
2	بلورات الفينول Phenol crystal	BDH	England

B – الاوساط الغذائية		
أسم الوسط	الأستخدام	الشركة المصنعة
وسط اكار البطاطا ديكستروز PDA(Potato 's Dextrose Agar)	عزل و حفظ الفطريات وتحديد النسبة المئوية لانبات بذور السبانغ وفحص حساسية الفطريات للمستخلصات المائية والكحولية والمبيدات والقلويدات	Hi Media Laboratories Iimited India
وسط مرق البطاطا ديكستروز PDB (Potato 's Dextrose Broth)	قياس الوزن الجاف للفطريات	حضر مختبريا

2 - طرائق العمل

2 – 1 جمع البذور Collection of seeds

تم جمع بذور السبانغ المستخدمة في هذا البحث من السوق المحلية لمدينة الديوانية باعتبارها نباتات عائلة لعدد من الفطريات اذ جمعت العينات لكل نوع من انواع البذور بصورة عشوائية من ثلاثة مواقع وبواقع 1 كغم لكل عينة , ثم تم تنقيتها من الشوائب و غسلها بالماء الاعتيادي ثم تركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة وحفظت في اكياس ورقية معقمة لحين استخدامها في البحث .

2 – 2 الاوساط الزراعية والمحاليل Culture Media and Solutions

2 – 2 – 1 تحضير الاوساط الزراعية Preparation of Cultures Media

1 – وسط أكار البطاطا ديكستروز Potato 's Dextrose Agar (PDA)

تم تحظير هذا الوسط باخذ 200 غم من درنات البطاطا المقشرة و المقطعة الى قطع صغيرة و غليها بالماء المقطر بحجم 500 سم3 لمدة 20-30 دقيقة في دورق زجاجي و بعد الانتهاء من مدة الغليان رشح الخليط بواسطة قطعة من قماش الشاش للحصول على المستخلص و تم اذابة 20 غم من سكر الدكستروز و 17 غم من الاكار في 500 مل من الماء المقطر و من ثم اضيف اليها راشح البطاطا و زرع في دوارق زجاجية بحسب الحاجة و اغلقت بسداد قطني و عقمت بواساطة المؤصدة بدرجة حرارة 121 °م و ضغط 15 باوند / انج2 لمدة 20 دقيقة وبعدها تركت الدوارق لتبرد و اضيف اليها المضاد الحيوي الكلور امفينيكول (Chloramphenicol) قبل تصلب الوسط و بمقدار 250 ملغم / لتر (عبد المنعم ,2007) .

2 – وسط مرق البطاطا ديكستروز Potato 's Dextrose Broth(PDB)

حضر في بالطريقة نفسها الواردة في الخطوة السابقة , ولكن دون اضافة الاكار ثم عقم بالمؤصدة , واضيف له المضاد الحيوي كلور امفينيكول بتركيز 250 ملغم / لتر بعد تبريده . استعمل هذا الوسط في اختبار قياس الوزن الجاف للفطريات . (عبد المنعم ,2007)

2 – 2 – 2 المحاليل Solutions

محلول صبغة ازرق القطن Cotton blue solution

أزرق القطن 0.3 غم

كحول اثيلي (96%) 30 مل (خفف الى 100 مل مع الماء المقطر)

تم اذابة المكونات السابقة و مزجت بشكل جيد و حفظت الصبغة في قنينة لحين الأستعمال (Ellis, 1994) .

3 – جمع الاجزاء النباتية المختبرة

تم الحصول على بذرة نبات الحلبة من السوق المحلية لمدينة الديوانية . ثم تم تنقية الثمار والبذور من الشوائب وغسلها جيدا ثم تجفيفها بدرجة حرارة الغرفة بعدها طحنت بمطحنة كهربائية و حفظ المسحوق بعبوات ورقية جافة لحين الاستعمال (Maklboul & Baky, 1998) .

4 – تحضير المستخلصات النباتية Preparation of Plant extract

4 – 1 المستخلص المائي الحار

حظر المستخلص المائي الحار لنبات الحلبة بالاعتماد على طريقة (Harborne, 1984) كالاتي :

أخذ 10 غم من المسحوق الجاف و اضيف اليه 200 مل من الماء المقطر في دورق زجاجي سعة 500 مل , بعدها وضع الدورق على مسخن حراري مغناطيسي بدرجة حرارة 40 °م و ترك الخليط ليمتزج جيدا لمدة 24 ساعة لاعطاء مجال اكبر لاستخلاص المادة الفعالة في العينة النباتية .

بعدها رشح المحلول بواسطة اوراق ترشيح Whattman NO. 1 باستعمال قمع بخنر موصل بواسطة جهاز التفريغ الهوائي و نقل بعدها الراشح في جهاز الطرد المركزي (Centerfuge) بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق لترسيب الاجزاء النباتية العالقة والحصول على محلول رائق و من ثم جفف الراشح باستعمال جهاز المبخر الدوار (Rotary vacum evaporator) بدرجة حرارة 40 °م لحين الحصول على سائل كثيف ثم اكمل تجفيف المستخلص بعد وضعه في دورق زجاجي في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 40 °م خلال 24 ساعة و كررت العملية عدة مرات للحصول على كميات كافية من المستخلصات الجافة و حفظ المسحوق الناتج بعد وزنه في الثلاجة لحين الاستعمال و بدرجة حرارة 4 °م .

تحضير المحلول الخزين Preparation of stock solution

تم تحضير محلول خزين (stock solution) لكل نوع من انواع المستخلصات للنباتات المستخدمة في هذا البحث و ذالك باذابة 4 غم من المستخلص الجاف في 100 مل من الماء المقطر المعقم ليكون التركيز 40 ملغم / مل بعدها عقمت المحاليل المحضرة باستخدام مرشحات دقيقة (Millipore filters) بقطر 0.22 مايكرون .

عزل الفطريات المرافقة لبذور السبانغ

قسمت البذور الى مجموعتين الأولى تضمنت مئة بذرة عقمت سطحيا باستخدام محلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 1% لمدة ثلاث دقائق ثم غسلت بلماء المقطر المعقم ثلاث مرات , أما المجموعة الثانية فتضمنت مئة بذرة ايضا غسلت بالماء المقطر المعقم فقط , بعدها زرعت البذور في أطباف بتري حاوية على الوسط الغذائي PDA (Potato 's Dextrose Agar) و بواقع خمس بذور في كل طبق و بثلاثة مكررات لكل مجموعة و تركت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 25 ºم و بعد اربعة أيام تم متابعة نمو الفطريات , اذ فحصت الأطباق لمعرفة الفطريات النامية و بعد تشخيصها تم حساب النسب المئوية لترددها من خلال المعادلة الاتية :

$$\text{النسبة المئوية لتردد الفطر} = \frac{\text{عدد مستعمرات النوع الفطري}}{\text{العدد الكلي لمستعمرات الانواع الفطرية}} \times 100 .$$

تشخيص الفطريات المعزولة

بعد عملية عزل الفطريات المرافقة لبذور السبانغ جرت عملية تشخيص هذه الفطريات الى مستوى النوع وذالك اعتمادا على المظهر الخارجي للمستعمرة (Morphological Features) مثل الشكل و اللون و قطر المستعمرة و ارتفاعها و أيضا اعتمادا على الصفات المجهرية (Microscopic features) مثل شكل و حجم و لون و تركيب الحوامل و الأبواغ و التراكيب الأخرى على وفق الأسس التصنيفية المعتمدة و باستخدام المفاتيح التصنيفية الواردة في المصادر التي تناولت تصنيف و دراسة الفطريات من الأجناس المدروسة في هذا البحث مثل :

(Barnett & Hunter, 1972 ; Domsch *et al.,* 1980 ; moustafa, 1982 ; moubasher & Al-subai , 1987)

بعدها تم انتخاب ثلاثة فطريات للقيام بهذه الدراسة و هي *fusarium solani* و *Aspergillus niger* و *Alternaria alternata* .

تأثير مستخلصات النباتات المختبرة في الفطريات المعزولة

1 – تاثير المستخلصات في النمو الشعاعي للفطريات

لتحديد فعالية المستخلصات المائية للنباتات المختبرة في النمو الشعاعي للفطريات اتبعت طريقة (Dixit *et al.*, 1976) و هي تنقية الغذاء المسموم (Poisoned food Technique) اذ تم تحضير ثلاثة تراكيز و هي (5 و 10 و 15) ملغم / مل من المستخلصات المائية و الكحولية للنباتات المختبرة من الوسط الغذائي المعقم PDA (Potato 's Dextrose Agar) , اما معاملة المبيدات الفطرية (دايثين م 45 , تابيسين 50 , مانكوزيب 80) فقد حضرت بتركيز 1 ملغم/مل من الوسط الغذائي PDA ثم صبت في الأطباق , أما معاملة المقارنة فقد تضمنت أطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي المعقم PDA من غير أية اضافة , و بعد أن تصلبت الأوساط في الأطباق تم نقل قطعة 7.5 ملم من مزارع نقية للفطريات بعمر سبعة أيام بأستخدام الثاقب الفليني و وضعت في منتصف الطبق و حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 ºم و بثلاثة مكررات لكل معاملة و لكل فطر من الفطريات المختبرة و تم قياس معدل نمو كل فطر في المعاملات المختلفة باستعمال المسطرة (معدل ثلاث أقطار متعامدة) بعد وصول الغزل الفطري في معاملة المقارنة الى حافة الطبق و تم حساب النسبة المئوية للتثبيط باستخدام المعادلة الاتية :

$$\text{نسبة التثبيط} = \frac{\text{معدل اقطار الفطر في اطباق المقارنة} - \text{معدل اقطار الفطر في اطباق المعاملة}}{\text{معدل اقطار الفطر في اطباق المقارنة}} \times 100$$

بعدها تم اجراء فحص مجهري لغزل الفطريات المختبرة لمعرفة تاثير المستخلصات المائية و الكحولية لنبات الحلبة في خيوط هذه الفطريات و لذالك بأخذ جزء من سطح المستعمرة الفطرية بواسطة ابرة التلقيح و مزجها مع قطرة من الماء المقطر المعقم الموضوعة على شريحة زجاجية , ثم وضعت قطرة من صبغة lactophenol Cotton Blue على الشريحة و غطيت الشريحة بغطاء الشريحة , ثم جففت قليلا على لهب ضعيف و فحصت الشريحة الزجاجية تحت المجهر و رافق ذالك تحديد نوع التأثير من خلال وجود أو عدم وجود تشوهات في طرف الخيط الفطري و كذالك نوع هذه التشوهات .

تأثير المستخلص في الوزن الجاف للفطريات

لاختبار تأثير المستخلصات المائية والكحولية للنباتات المختبرة في الوزن الجف للفطريات أستخدمت دوارق مخروطية سعة 250 مل و وضع فيها 50 مل من الوسط الغذائي PDB (Potato 's Dextrose Broth) وحضرت بعدها ثلاثة تراكيز للمستخلصات المختبرة و هي (5 و 10 و 15) ملغم/مل من الوسط الغذائي السائل المعقم PDB , اما معاملة المبيدات الفطرية (دايثين م 45 , ثابيسين50 , مانكوزيب 80) فقد حضرت بتركيز 1 ملغم/مل من الوسط الغذائي السائل المعقم , اما معاملة المقارنة فقد تضمنت الوسط الغذائي السائل المعقم من غير أية اضافة , ثم لقحت كل الدوارق بقطعة بقطر 7.5 ملم من غزل الفطريات المختبرة و بواقع ثلاث مكررات لكل تركيز و حضنت الدوارق في الحضانة بدرجة حرارة 25 ºم لمدرة سبعة ايام بعدها تم ترشيح الغزل الفطري لكل فطر على ورق الترشيح معقم ثم جففت في الفرن بدرجة حرارة 60 ºم لمدة 24 ساعة بعد ذالك تم قياس الوزن الجاف لكل فطر (محمود ,1985) .

النتائج والمناقشة results & Discussion

1 – الكشف الكيميائي التمهيدي عن بعض المواد الفعالة طبيا في النباتات المختبرة

اظهرت نتائج الكشف الكيميائي أحتواء مستخلصات بذور نبات الحلبة على عدد من المركبات الفعالة وتبين من النتائج في الجدول (1) احتواء ثمار البلوط على التانينات و الراتنجات و الصابونيات و الفينولات , اذ تحوي ثمرا البلوط على التانينات و حامض الغاليك و الاليجاتين Elliagitanin و الدباغيات التي تعود لبوليمرات الينول , يكون الدباغ ذات تأثير سمي و قاتل للخيوط الفطرية وخاصة مركب Elliagitanin (مركب دباغي) . تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه محمد و الريس (1981) بأن التانينات مركبات مضادة للتأكسد أي تحمي المركبات الحيوية المهمة و تمنع الاصابة بالكائنات الدقيقة , كما تعد الدباغيات الموجودة في البلوط لها تاثير سام للفطريات و الاحياء المجهرية و الخمائر (Cowan , 1999).

تتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليه السوداني (2004) بأن المركب الفعال في البلوط هو التاينين و Elliagitanin (Abbot, *et al.*, 1995) . اما بالنسبة لبذور نبات الحلبة فقد احتوت على المركبات الفعالة الاتية و هي النانينات و الراتنجات و الصابونيات و الفينولات و الفلافونات و القلويدات (جدول (1)) حيث تحتوي القلويدات Choline و Trigonelline التي تكون مضادة للفطريات و قاتلة لها , تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Townsend (1974) الذي اثبت احتواء نبات الحلبة على التانينات و الراتنجات , كما و تتفق مع Yoshikawa, *et al.*(1997) الذي وجد ان الحلبة تحتوي على القلويدات غير السامة Choline و Trigonelline الى جانب مركبات الفلافونيدات و حامض الغاليك , وقد ظهر ان الاس الهيدروجيني لنبات البلوط 5.27 و لنبات الحلبة 5.23 .

الجدول (1) الكشف الكيميائي التمهيدي عن بعض المواد الفعالة طبيا في مستخلصات نبات الحلبة

المواد الفعالة	أسم النبات مستخلص نبات الحلبة
التانيات	+
الراتنجات	+
الصابونيات	+
الفينولات	+
الفلافونات	+
الكلايكوسيدات	-
القلويدات	+

2 – عزل وتشخيص الفطريات Isolation and Identification of Fungi

تم عزل عدة انواع من الفطريات المرافقة لبذور السبانغ التي جمعت من السوق المحلية في مدينة الديوانية و تم تشخيص ستة انواع منها وهذه الانواع هي Aspergillus niger , Alternaria alternata (Fr. Keissler) (Van Tieghem) , Rhizopus stolanifer (Ehremb ex. Link) , Phthium aphanidermatium . (Edson Fitep) , Fusarium solani (Mart) , Fusarium oxysporum (Snyder & Hasen)

بينت النتائج في الجدول (2) وجود فروق معنوية في النسب المئوية لتردد الفطريات التي تم تشخيصها في معاملتي البذور غير المعقمة سطحيا و المعقمة و لكل محموعة من البذور .

وجد ان النسب المئوية للبذور الملوثة بالفطريات في معاملة البذور غير المعقمة سطحيا وهي الاعلى بالمقارنة مع معاملة البذور المعقمة سطحيا اذ وصلت سطحيا 80.0% لبذور السبانغ ويعزى السبب الى كون مادة هايبو كلورات الصوديوم مادة معقمة ولكن يقتصر تأثيرها بشكل اساسي على الفطريات المحمولة على الغلاف الخارجي و لا تؤثر في الفطريات التي ترافق البذور من الداخل او التي تصيب جنين البذرة . تتفق هذه النتائج مع ما وجده سرحان (1995) الذي اكد على تأثير مادة هيبوكلورات الصوديوم في الفطريات المحمولة داخل غلاف البذرة أو تصيب الجنين (سعدون, 2005) .

الجدول (1) النسب المئوية لتردد الفطريات في بذور السبانغ

الفطريات المعزولة	نسب تردد الفطريات (%)	
	غير المعقمة سطحيا	المعقمة سطحيا
Pythium aphanidermatium	28.57	0.0
Aspergillus niger	28.57	0.0
Alternaria alternata	25.39	66.66
Rhizopus stolanifer	0.0	0.0
Fusarium oxysporum	0.0	33.33
Fusarium solani	17.49	0.0

الجدول (2) تأثير المستخلصات المائية و الكحولية لنباتات المختبرة في انتاج بذور السبانغ على الوس الغذائي *PDA*

المعاملة	التركيز ملغم /مل	نسب انبات البذور(%) بذور السبانغ
مستخلص الحلبة المائي	5	53.33
	10	60
	15	66.66
Control	0.0	60

تأثير المستخلصات المائية للنباتات المختبرة في النمو الشعاعي للفطريات

بينت نتائج تأثير المستخلصات المائية ان المستخلصات المائية لبذور الحلبة أثرت تأثيرا معنويا مثبطا في نمو جميع الفطريات المختبرة عند احتمال 5% و هذه الفطريات هي *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* , *Fusarium solani* . اذ كانت معدلات اقطار المستعمرات الفطرية تقل كلما ازداد تركيز المستخلص على العكس من النسب المئوية للتثبيط التي كانت تزداد بزيادة تركيز المستخلص و بنسب تثبيط ما بين 79.26 – 79.63 % بالنسبة لمستخلص الحلبة المائي بالقياس الى معاملات المقارنة لهذه الفطريات التي كانت بمعدلات اقطار 90 ملم .

تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Haouala (2008) بأن المستخلصات المائية و المثيلية و الاثيلية لأجزاء نبات الحلبة (اوراق , سيقان , جذور) ذات تأثير مثبط معنوي للنمو الشعاعي للفطريات التالية : *Botrytis cinerea* , *Pythium aphanidermatium*, *Fusarium graminum* , *Rhizopus stolanifer*, *Aspergillus sp* .

كما وجد (2007) ان المستخلص الكحولي لازهار نبات الدفلة قد ثبط النمو الشعاعي للفطر *Alternaria alternata* اكثر من المستخلص المائي لنبات الدفلة .

تتفق ايضا هذه النتائج مع ما ذكرته حسن (2007) التي اثبتت ان المستخلص المائي لغلاف و ثمرة البلوط قد ثبط النمو الشعاعي للفطريات الجلدية قيد الدراسة بنسبة 100% و هذه الفطريات هي *Microsporium canis* , *Trichophyton verrucosum* .

الجدول (3) تأثير المستخلصات المائية للنباتات المختبرة في النمو الشعاعي للفطر *Alternaria alternata*

المعاملة	التركيز ملغم/مل	قطر النمو (ملم)	نسبة التثبيط (%)
مستخلص الحلبة المائي	٥	٣٠	٦٦,٦٦
	١٠	٢٢,٣٣	٧٥,١٨
	١٥	١٨,٦٦	٧٩,٢٦
control	٠,٠	٩٠	٠

الجدول (4) تأثير المستخلصات المائية للنباتات المختبرة في النمو الشعاعي A. Niger

المعاملة	التركيز ملغم/مل	قطر النمو (ملم)	نسبة التثبيط (%)
مستخلص الحلبة المائي	5	30	66.66
	10	23.33	74.07
	15	18.33	79.63
control	0.0	90	0

الجدول (5) تأثير المستخلصات المائية للنباتات المختبرة في النمو الشعاعي للفطر *F. Solani*

المعاملة	التركيز ملغم/مل	قطر النمو (ملم)	نسبة التثبيط (%)
مستخلص الحلبة المائي	5	29.33	67.41
	10	21.66	75.93
	15	18.33	79.63
Control	0.0	90	0

تأثير المستخلصات المائية للنباتات المختبرة في الوزن الجاف للفطريات

أكدت نتائج تأثير المستخلصات المائية لنبات الحلبة في الوزن الجاف للفطريات المختبرة اذ اظهرت مستخلصات نبات الحلبة قدرتها التثبيطية العالية في نمو الفطريات المتمثلة بانخفاض معدلات الوزن الجاف لهذه الفطريات بصورة معنوية بالقياس مع معاملات المقارنة و عند مستوى احتمال 5% و 0.09 – 0.14 غم في معاملات المستخلص المائي لنبات الحلبة بالقياس مع معاملات المقارنة لهذه الفطريات التي أعطت معدلات أوزان جافة عالية تراوحت ما بين 0.87 – 0.88 غم

تبين في التحليل الأحصائي لنتائج تاثير المستخلصات المائية لنبات الحلبة , تتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليه محمود (1985) التي و جدت ان لمستخلص نبات الكبازلو فعالية عالية في خفض معدلات الوزن الجف للفطر *Alternaria alternata* , وتتفق مع ما وجده سرحان (2001) الذي درس تاثير المستخلصات المائية لستة نباتات محلية هي الكزبرة والحبة الحلوة و العدس و الماش و الجزر و الحلبة , حيث اعطت مستخلصات بذور العدس والحلبة تثبيطا واضحا لنمو الفطر *A. Alternata* على الوسط الغذائي PDA .

الجدول (6) تأثير المستخلصات المائية في الوزن الجاف للفطر *Alternaria alternata* .

المعاملة	التركيز ملغم/ مل	معدل الوزن الجاف للغزل الفطري (غم)
مستخلص الحلبة المائي	5	0.17
	10	0.16
	15	0.12
تابسين 50	1	0.11
control	0.0	0.88

جدول (7) تأثير المستخلصات المائية في الوزن الجاف للفطر *Aspergillus niger* .

المعاملة	التركيز ملغم/مل	معدل الوزن الجاف للغزل الفطري (غم)
مستخلص الحلبة المائية	5	0.22
	10	0.17
	15	0.09
control	0.0	0.87

جدول (8) تأثير المستخلصات المائية في الوزن الجاف للفطر *fusarium saolani*

المعاملة	التركيز ملغم/مل	معدل الوزن الجاف للغزل الفطري (غم)
مستخلص نبات الحلبة المائي	5	0.19
	10	0.17
	15	0.14
control	0.0	0.87

المصادر Reverences

المصادر العربية :

السيد . (١٩٦٤) .محاصيل الخضر . الطلعة الرابعة . مكتبة الانجلو المصرية .

الراوي , الحديثي . (١٩٦٥) . وصف لأهم انواع الخضر التي تزرع في العراق نشره رقم ١٠٤ .

المتنبي واخرون . (١٩٥٩) . كتاب مترجم . محاصيل الخضر . الدار العربية للنشر والتوزيع .

استنبو واخرون . (١٩٦٣) . انتاج الخضر . الجزء الثاني . مكتبة الانجلو المصرية .

نخيلان. (٢٠١٠) . امراض النباتات الفطرية . جامعة بابل .

الكاتب . (١٩٨٨) . تصنيف النباتات البرية . مطبعة جامعة بغداد .

الزبيدي واخرون . (١٩٩٦) . دليل العلاج بالاعشاب الطبية العراقية . شركة اب للطباعة الفنية المحدودة .

الموسوي . (١٩٨٧) . علم تصنيف النبات . مطبعة جامعة بغداد . بغداد . العراق

مقبول واخرون . (١٩٩٥). كيمياء النباتات الطبية . المركزي العربي للخدمات الطلابية . عمان

حسين . (١٩٧٩) . النباتات الطبية . زراعتها ومكوناتها . الدار العربية للكتب .

الجبوري . (٢٠٠٤) . دراسة بالمجهر الالكتروني الناقل لتأثير الموثين PGF2α وبذور الحلبة في الفعالية الحيوية للبنكرياس في ذكور الفئران البيض .

محمود . (١٩٨٥) . تأثير المستخلصات النباتية على بعض الفطريات المسببة للأمراض النباتية .

محمد , الريس . (١٩٨١) . فسلجة النبات ,الجزء النباتي . (١) مؤسسة دار الكتب للطباعة .

السوداني . (٢٠٠٤) . تأثير خلاصة ثمار البلوط النامي في العراق في البكتريا المسببة لتسوس الاسنان .

سرحان . (١٩٩٥) . الفطريات المصاحبة للحبوب المخزونة في سايلو محافظة القادسية , المجلد ١.

سعدون . (٢٠٠٥) . استخدام مسحوق جذور الجت . وهايبوكلورات الصوديوم كبدائل الاستخدام المبيدات الكيميائية لمكافحة الفطريات المرافقة لبذور الحنطة قبل زراعتها .

حسن . (٢٠٠٧) . دراسة الفطريات المسببة لمرض سعفة الرأس *Tinea capitis*.

سرحان . (٢٠٠١) . تأثير مستخلصات البذور على نمو اثنين من الفطريات الممرضة للنبات .

المصادر باللغة الانكليزية :

Bottalico. (1998) .Toxigigenic *Alternaria* species of Economic importance. In : Mycotoxins in Agriculture and food .

Hasan, (1995). Alternaria mycotoxins in black rot lesion of tomato fruit : Condition and regulation of their production . Mycopathologia ., 171-177 .

Thomma .(2003). Pathogen profile , Alternaria spp . : from genera saprophyte to specific parasite. Molecular plant pathol. 4 (4) : 225 – 236

Abbot,(1995). The composition of Oak. Vatic. 46:292-294.

Afifi,(1988). Fenugreekseed extract as protectants of wheat grain against certain steroid product insects . Annuals of Agricultural science . Ain shms Univ. Egypt. 34(2) : 1331-1341.

Agarw al,Sinclair,(1997). Principles of Seeds Pathology .

Al-Rawi,A& Chakravarty,(1988). Medicinal Plants of Iraq. Minst .

Al-Zadkhan,(1995). Characterization of the Hypoglycemic effect o*f Trigonella foenum seed*.plant med. 61:358-360.

Amin,(2005). Chemoprotective activities of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek) against breast cancer. Cell biology International, 29:687-694.

Basch,(2003). Theraputic applications of fenugreek . Altern . Med. Rev. 8:20-27.

Collee,(1996). Parctical Medical Microbiology.

Collins,(2002). Discover your menopallse type . prima publishing Rocklin,CA.

Cowan,(1999). Plant products as antimicrobial agents ciln . Microbial-Rev.,12 : 564-582.

Diener,(1987). Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*.Ann. Rev. Phytopathology, 25 : 249-270.

Dixit,(1975). Fungi static properties of some seeding extracts.Current science,44 :279-280.

Domsch,(1980). Compendium of soil fungi Academie press,p :85,.

Handa,(2005). Effects of fenugreek seed extract in obese mice fed high-fat dite.Bio sci.

Hussein,(1985). Medical plants in Libya 1ed,Arab Encyclopedia House,85-86.

Kwon-Chung,Bennett,(1992). Medical Mycology Lea and Febiger, philadelphia. London.pp :866.

Lust,(1986). The herbBook.16 ed.Bantam publishing.

Madar,(1990). Polysaccharhde composition of agel fraction derived form fenugreek & its effect on starch digestion &bileacid absorption in rates .j.Agric .food.chem..,38:1535-1539.

Moustafa,(1982). Taxonomic studies on the fungi of Kuwait. Aspergilli.j.Uni Kuwait(Sci)., 9 :245-260.

Newall,(1996),Herbal medicines, Aguide for health care professionals.London , the pharmacential. Press.U.K.

Ribes,(1984). Effects of Fenugreek seeds on patterns of plasma thyroid hermones & herpatic monodeiodiace activity poult .Sci.63:81.

Schauenberg,(1990). Guide to Medicinal plants,Luttereworth press.

Townsend,(1974). Flora of Iraq . Mins. Of Agric Vol(3), Rep.Iraq. Baghdad.

Zia,(2001). Evaluation of the oral hypolycemic effect of *Trigonella foenum graecum*L.

(Methi)in normal mice J. Ethnopharmacol . 975 : 191-195.

Wu,(1990). Modulation of experimental autoimmune uveitis with formosanin-enguinea pigs.J.Out pharm. 6:301-311.