Effect of Water and alcohol extract from *Nerium oleander* L. s *Meloidogyne incognita* and some in control nematode larvae non-target organisms

تأثير المستخلص المائي والكحولي لنبات الدفلة *Nerium oleander* L. في مقاومة يرقات ديدان العقد الجذرية *Meloidogyne incognita* وبعض الأحياء غير المستهدفة

آلاء عدنان الجنابي د. رافد عباس العيسى
جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

الخلاصة :

إستهدف البحث الحالي دراسة تأثير المستخلص الخام المائي والكحولي لأوراق نبات الدفلة *Nerium oleander L.* في هلاك يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية *Meloidogyne incognita*(kofoid and white) chitwood و تأثيرهما في بعض الأحياء غير المستهدفة, إذ أشارت النتائج إلى إن لكلا المستخلصين تأثير في هلاك يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية و بالتراكيز 1000 و2000 و 3000 و 4000 و 5000 ملغم/لتر وان هذا التأثير ذي علاقة طردية مع التراكيز المستخدمة , من ناحية أخرى فقد تبين إن للمستخلص المائي تأثير في هلاك اليرقات أكثر من المستخلص الكحولي إذ بلغت قيمة Lc50 3228.6 و 4312 ملغم/لتر للمستخلص المائي والكحولي على التوالي . وفي مجال دراسة تأثير أعلى ثلاثة تراكيزلهذه المستخلصات وهي 3000 و 4000 و 5000 ملغم/لتر في بكتريا تثبيت النتروجين *Rhizobium* sp. فقد بينت النتائج عدم وجود تأثير للمستخلصين وكذلك المبيد التجاري المستخدم Cadusafos. أما من ناحية التأثير في هلاك ديدان الأرض *Lambricusrubellus* فقد أشارت النتائج انه ليس للتراكيز ذاتهاتأثير مميت لديدان الأرض إذ بلغت النسبة المئوية للقتل 0% بالمقارنة مع 100% عند استخدام تركيز1000 ملغم/لتر من المبيد الكيميائي Cadusafos .

Summary :

Targetedthecurrentstudytheeffectofaqueouscrudeextractandalcoholleavesoftheoleanderplant*Nerium oleander* L.The deaths oflarvaesecond phaseofwormsroot knot*Meloidogyne incognita* (kofoid and white) chitwoodandtheir impacton somenon targetorganisms . as the results indicatedthatfor bothextracts impactinloss oflarvaesecond phaseofwormsroot knot in concentrations1000 , 2000, 3000, 4000and 5000 mg /L andthatthis effect isadirectcorrelationwiththeconcentrationsused, on the other handit has been shownthataqueousextractsimpactin thelossofmore thanlarvaealcoholic extractasvalueLc50 3228.6and4312 mg/L of aqueous extractsandalcoholrespectively.Inthestudyoftheeffectofhigherconcentrations oftheseextracts are3000, 4000 and5000mg /Linnitrogen fixingbacteria*Rhizobium* sp.Theresults showednoeffectofthese concentrationsextractorsas well ascommercialpesticideuserCadusafos. In terms ofimpactto the deaths ofearthworms*Lambricusrubellus*, the results indicate that the sameconcentrations have not impact deadlytoearthwormsasthe percentage ofmurder0%comparedwith100%when usingconcentration 1000 mg/L of the pesticidechemicalCadusafos.

المقدمة :

تعد ديدان العقد الجذرية أو ما يسمى بالديدان الثعبانية (النيماتودا) واحدة من خمس أكثر الآفات النباتية أهمية في العالم (1) حيث أنها تسبب مرض تعقد الجذور Root-knotالذي يعد من أكثرالأمراض النيماتودية انتشارا في العالم (2). أشار الحازمي و آخرون (3) أن المدى العوائلي لهذه الديدان واسع جدا إذ أنها تشمل كافة مجموعات محاصيل الحقل والخضر , و أشجار الفاكهة والغابات , ونباتات الزينة والمسطحات الخضراء , والحشائش . وربما لا يوجد الآن أي نبات اقتصادي مزروع في المنطقة العربية ينجو من الإصابة بنوع أو أكثر من أنواع نيماتودا تعقد الجذور .

إن استخدام المبيدات الكيميائية هي الوسيلة الأسرع بين العديد من طرائق السيطرة لاختزال أعدادها في وقت قصير بالمقارنة مع الطرائق الأخرى مثل السيطرة البايولوجية التي أصبحت غير قادرة على حماية المحاصيل من هذه الآفة (4). إلا أن استخدام المبيدات الكيميائية يواجه العديد من الانتقادات والتحذيرات, وذلك لما تسببه من آثار سلبية مباشرة أو غير مباشرة على البيئة

والإنسان والحيوان (5 , 6) , لذلك اتجه العلماء للبحث عن مواد كيميائية طبيعية أكثر أمانا من الناحية البيئية مع الاحتفاظ بنشاط المبيد النيماتودي كالمستخلصات النباتية . وقد أثبتت العديد منها فعاليتها العالية في السيطرة على النيماتودا المتطفلة على النباتات و بدأت تطبق كإحدى الطرائق المستعملة لمكافحة هذه الآفة (7) .

المواد وطرائق العمل :

تم جمع العينات النباتية لأوراق نبات (الدفلة) من الحدائق العامة لمحافظة كربلاء لغرض استخدام مستخلصاتها في البحث و تم التشخيص العلمي لنبات الدفلة من قبل الدكتور عبد الكريم البيرماني / كلية العلوم للبنات / جامعة بابل , حيث تم تجفيف الأوراق النباتية في غرفة درجة حرارتها (22-26) مْ مع مراعاة التقليب المستمر لضمان التجفيف الجيد , و بعد التأكد من جفافها سحقت الأوراق بواسطة طاحونة بعدها حفظ المسحوق داخل علب بلاستيكية معتمة .

تم تحضير نوعين من المستخلصات النباتية وهي المستخلص المائي والمستخلص الكحولي وكانت طرائق الاستخلاص المتبعة حسب طريقة (8) .

تم جمع كميات كبيرة من جذور نبات الباذنجان المصابة بالديدان من بساتين محافظة كربلاء والتي تعرف من خلال وجود العقد الجذرية root knot وبشكل واضح على المجموع الجذري للنبات المصاب وتم جمع البيوض حسب طريقة Hussy & Barker (9).

تم تهيئة سلسلة تراكيز من كل مستخلص (1000, 2000 , 3000 ,4000 , 5000) ملغم/لتر, و تم معاملة يرقات الطور الثاني من نيماتودا تعقد الجذور بواقع ثلاث مكررات لكل معاملة ولكل معاملة عشرة يرقات في أقداح بلاستيكية , بالإضافة إلى ذلك فان الاختبار تم بوجود معاملة المبيد الكيميائي التجاري cadusafos كمعاملة مقارنة والذي استخدم بتركيز 1000 ملغم/لتر , وتم حفظ المعاملات بدرجة حرارة 25±2 مْ لمدة 48 ساعة , وبعدها تم حساب أعداد اليرقات الميتة والنسبة المئوية المصححة للموت باستخدام معادلة ابوت Abbott formula (10) .

$$\% \text{ للموت} = \frac{\text{عدد الأفراد الحية المقارنة} - \text{عدد الأفراد الحية للمعاملة}}{\text{عدد الأفراد الحية المقارنة}} \times 100$$

تم عزل بكتريا تثبيت النتروجين *Rhizobium Leguminosarum* المتخصصة على النباتات البقولية التابعة لمجموعة البزاليا ,من جذور نباتات الباقلاء النامية في حقول محافظة كربلاء (منطقة الحسينية) وتم تنميتها حسب الأمين (11) على وسطالخميرة – مانيتول Yeast Mannitol Medium كوسط تشخيصي .تم اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية ضد بكتريا *Rhizobium* بتركيز (3000 5000,4000) ملغم/لتر وهي التراكيز الأكثر تأثيرا في نيماتودا العقد الجذرية بوجود معاملة المقارنة من المبيد الكيميائي التجاري بتركيز 1000 ملغم/لتر وفق طريقة الانتشار في الاكار بواسطة الحفر على وسط آكار مولر-هنتون (Muller- Hinton Agar Medium12) وتم التعرف على أقطار التثبيط بعد فترة الحضن وهي 48 ساعة . جمعت الديدان من حديقة منزلية في منطقة حي الحسين / محافظة كربلاء واختيرت بطول (5-7) سم . تم حفظها في أوعية بلاستيكيةذات مساحة 250 سم^2 وارتفاع 5 سم ضمن تربتها الأصلية , وتمت إضافة الماء والمادة العضوية باستمرار للحفاظ على الديدان وعدم جفاف التربة , لحين إجراء المعاملات .

استخدمت التراكيز الأكثر تأثيرا في نيماتودا العقد الجذرية (3000 , 4000 , 5000) ملغم/لتر بواقع ثلاث مكررات مع وجود معاملة السيطرة والتي تضمنت إضافة الماء المقطر فقط ووجود معاملة المبيد الكيميائي التجاري cadusafos كمعاملة مقارنة والتي تضمنت إضافة المبيد حسب ما موصى به من قبل وزارة الزراعة العراقية 6 مل / 1 .

النتائج والمناقشة :

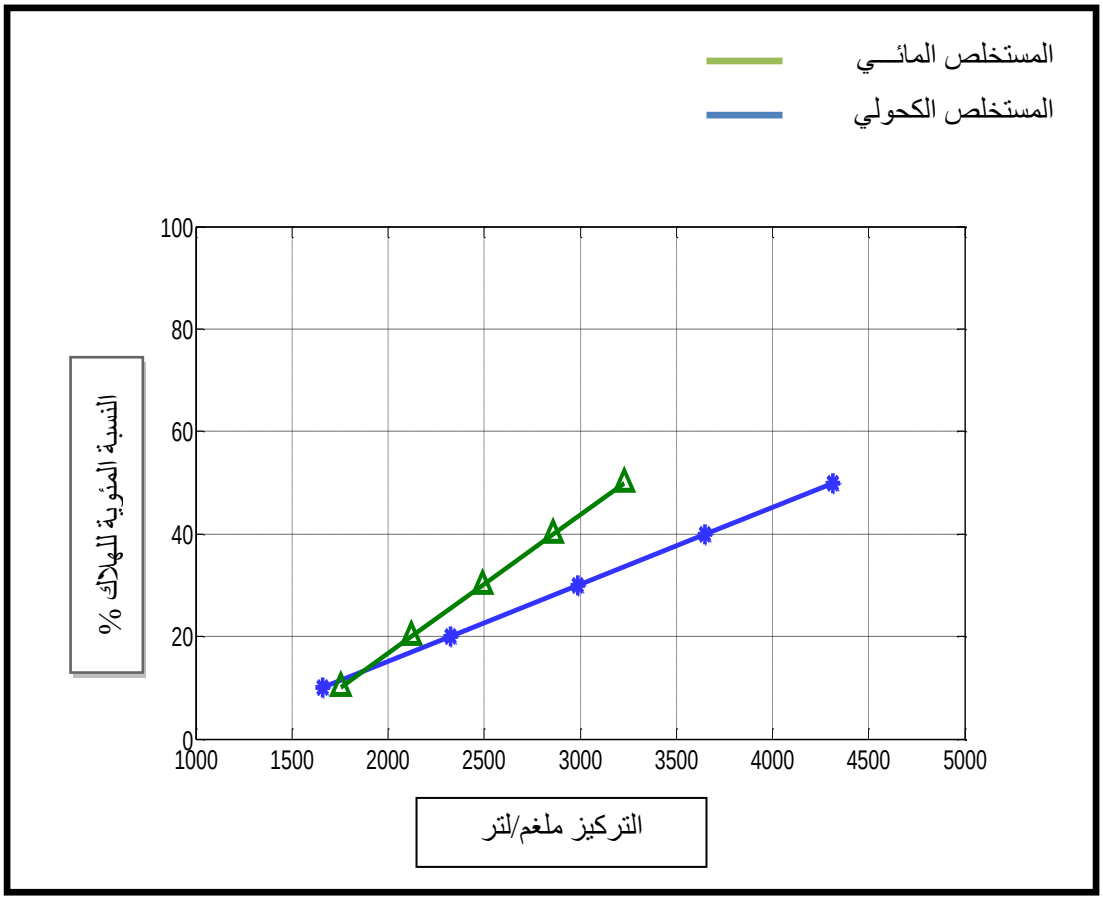
من خلال النتائج الواردة في جدول (1) , يتضح إن لكلا المستخلصين المائي والكحولي تأثير في هلاك يرقات الطور الثاني لنيماتودا تعقد الجذور *M.incognita* وكان هذا التأثير ذي علاقة طردية مع التركيز المستخدم , حيث نلاحظ إن النسبة المئوية لهلاك يرقات الطور الثاني تزداد مع زيادة التراكيز المستخدمة ولكلا المستخلصين , فيما يخص المستخلص المائي نلاحظ انه لم يكن للمستخلص أي تأثير عند استخدامه بالتركيز 1000ملغم/لتر , إذ بلغت نسبة الهلاك 0% وكانت مساوية لمعاملة السيطرة وعند زيادة التركيز إلى 2000 ملغم/لتر فان النسبة المئوية للهلاك بلغت 10% وازدادت هذه النسبة مع زيادة التركيز المستخدم لتصل إلى 100% عند استخدام التركيز 5000 ملغم/لتر . وعند استخدام المستخلص الكحولي نلاحظ من خلال النتائج الواردة في الجدول إن العلاقة طردية بين التركيز المستخدم والنسبة المئوية للهلاك بشكل واضح كما كانت مع المستخلص المائي , لكن تختلف النسب المئوية للهلاك حيث بلغت هذه النسبة 10% عند استخدام التركيز 1000 ملغم/لتر وازدادت لتصل 66% مع استخدام التركيز 5000 ملغم/لتر, وهذا يتفق مع ما توصل إليه Katooli وآخرون (13) والذي بين إن نسبة الهلاك ليرقات الطور الثاني تزداد مع زيادة تركيز المستخلص الكحولي .*Ricinuscommunis* L. *Meliaazedarach*L. *Artemisia annua* L. كذلك لابد من الإشارة إلى إن المعاملة بالمبيد الكيميائيcadusafos بتركيز 1000ملغم/ لتر سببت إحداث نسب هلاك بلغت 60% وهذه النسبة اكبر بكثير لو أردنا المقارنة بينها وبين نسب الهلاك التي سببها المستخلص النباتي ولكلا المذيبين وبالتركيز ذاته . وهذا يتفق مع ما توصل إليه Anjorin&Salako (14) اللذين بينا إن نسبة الهلاك التي يسببها المبيد الكيميائي carbofuran ليرقات الطور الثاني من ديدان العقد الجذرية بعد 48 ساعة من تعرضها للمبيد أعلى بالمقارنة مع المستخلص الأيثانولي لأوراق نبات*Blumeaperotitiana*. و قد يعود السبب في ذلك إلى طبيعة المبيد الكيميائي المستعمل إذ أن المتعارف عليه أن مبيد

Cadusafos (المستعمل حاليا في مكافحة نيماتودا العقد الجذرية) هو مبيد فسفوري عضوي Organophosphate يعمل على تثبيط إنزيم Acetyl cholinesterase (ACHE) في مواقع الشبك العصبي في الجهاز العصبي للنيماتودا(15) .

بين الوائلي و آخرون (16) إن تأثير الدفلة يعود إلى السموم التي يحويها , إذ أن مستخلص الأوراق يؤثر على يرقات الطور الثاني وعلى عدد أكياس بيض النيماتودا *Meloidogyne* sp. . كما أشار Zibbu وBatra (17) أن نبات الدفلة يحوي العديد من المركبات الكيميائية مثل القلويدات و كلايكوسيدات oleandrinوneriine و التانينات . كما ذكرا إن لنبات الدفلة سمية عالية تعود للعديد من المركبات التي يحويها , لكن أكثر المركبات سمية هي كلايكوسيدات oleandrin و neriineوالموجودة في كل أجزاء النبات ولكن تتركز بشكل كبير في (sap) وهو السائل الذي يجري في أوعية النبات . بين Kellerman و آخرون (18) بأن للكلايكوسيدات آثار مميتة بسبب تأثيرها في ثلاثة أجهزه هي الجهاز الهضمي والتنفسي والعصبي , وان التأثير في الجهاز العصبي عن طريق تثبيط إنزيم ATPase وتأثيرها على نفاذية غشاء الخلية العصبية لايونات البوتاسيوم و الصوديوم. أما من ناحية تباين التأثير بين المستخلصين المائي والكحولي فقد بين Bernard (19) أن التباين قد يعود إلى إختلاف القطبية فيما يخص المذيب المستعمل إذ تعود إلى إختلاف ثابت العزل الكهربائي لهذه المذيبات , إذ يبلغ ثابت العزل الكهربائي للماء 78,4 في حين يبلغ 24,5 للكحول الأثيلي ومن ثم ستختلف المركبات الذائبة في الماء والكحول . ومما يجدر الإشارة إليه فان نسبة هلاك اليرقات في معاملة السيطرة بلغت 0% في تجربة المستخلص الكحولي أو المائي أو عند استعمال مبيد المقارنة . وعند رسم خط السمية لتحديد التركيز القاتل لـ 50% من الأفراد المختبرة إحصائيا (LC50) نلاحظ من خلال النتائج الواردة في الشكل (1) إن هذه القيمة بلغت (3228.6) ملغم/لتر للمستخلص المائي و (4312) ملغم/لتر للمستخلص الكحولي , أي مما يدل شدة التأثير السام للمستخلص المائي مقارنة مع المستخلص الكحولي .

جدول (1) : تأثير المستخلص الكحولي و المائي لنبات الدفلة في يرقات نيماتودا تعقد الجذور *M.incognita*:

النسبة المئوية للهلاك % / المعاملات	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي	L.S.D
السيطرة	0	0	0.95
المبيد	60	60	
1000	0	10	
2000	10	13	
3000	36	26	
4000	73	36	
5000	100	66	
L.S.D	0.67		L.S.D التداخل 1.52



شكل (1) : يوضح قيمة LC50 للمستخلصين المائي والكحولي .

بعد أن تمت معرفة العلاقة الطردية للتأثير السام للمستخلصات النباتية لأوراق نبات الدفلة *Nerium oleander*(مائي و كحولي) في يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية , تم اختيار التراكيز الثلاثة الأكثر تأثيرا (3000 , 4000 , 5000) ملغم/لتر من كل مستخلص لمعرفة مدى تأثيرها في بكتريا تثبيت النتروجين.*Rhizobium* sp.. حيث أشارت النتائج الواردة في جدول (2) إلى انه لم يكن لأي من المستخلصات المذكورة ولكافة التراكيز المشار إليها أي تأثير تثبيطي لنمو بكتريا تثبيت النتروجين . حيث بلغت مساحة منطقة التثبيط بلغ (0 سم) وهذه النتيجة جاءت مطابقة لما موجود في معاملة السيطرة والتي تضمنت إضافة الماء المقطر فقط إليها . قد يكون السبب في عدم التأثير هو اختلاف ميكانزم التأثير السام للمستخلصات النباتية والمبيد الكيميائي وعدم تأثيرها في نمو بكتريا تثبيت النتروجين . ولم تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه Saler (20) والذي استخدم حوالي 26 مبيـد كيميائـي Pesticides من ضمنهCarbofuron ,Thiram,Aureofungin,Streptocyclin ,Difoltan, Hexacarpو Thiodanوالتي أظهرت جميعها تثبيط للبكتريا بدرجات مختلفة و لمختلف التراكيز . وقد يعود السبب في ذلك هو اختلاف التراكيز المستخدمة , حيث إن معدل التراكيز التي استخدمها الباحث بلغت 1500 مايكرو غرام لكل مل . أو يكون السبب هو اختلاف في المجاميع الكيميائية التي استخدمها الباحث بالمقارنة مع مبيد cadusafos . ومن ناحية أخرى أشارMartinez-toledo وآخرون (21) انه يمكن لبعض أحياء التربة إن تتحمل بعض الجرع من المبيدات الكيميائية المستخدمة دون إن تتأثر بها . بالإضافة إلى ذلك قد يكون لنوع السلالة البكتيرية المستخدمة سبب في عدم التأثير هذا .

جدول (2) : تأثير أعلى ثلاثة تراكيز لمستخلصي أوراق نبات الدفلة في بكتريا تثبيت النتروجين *Rhizobium* sp :

التركيز ملغم/لتر	منطقة التثبيط (سم)		
	م. كحولي	م. مائي	مبيد
1000	-	-	0
3000	0	0	-
4000	0	0	-
5000	0	0	-
السيطرة	0	0	0

أشارت النتائج في جدول (3) إلى انه لم يكن لتراكيز مستخلصات أوراق نبات الدفلة *Nerium oleander*(3000 , 4000 , 5000) تأثير في معدل النسب المئوية لهلاك ديدان الأرض . إذ بلغ معدل النسب المئوية للهلاك في التراكيز المستخدمة كافة ولكلا المستخلصين (المائي والكحولي) 0% . وعند مقارنة هذه النتائج مع ما ورد عند استعمال المبيد الكيميائي cadusafos بتركيز 1000 ملغم/لتر فان النسبة المئوية للهلاك بلغت 100% مما يدل على شدة التأثير السام لهذا المبيد الموصى به والمستخدم في مكافحة ديدان العقد الجذرية على ديدان الأرض . لا تتفق هذه النتائج التي تم التوصل إليها مع ما توصل إليه (22) Langوالذي اختبر التأثير السام لخلاصة الشاي الأخضر و الأحمر كمبيد كيميائي pesticides ضد ديدان الأرض *Lambricusrubellus*, ووجد إن هذه الخلاصة مميتة لديدان الأرض وبكل التراكيز المستخدمة في ساعات قليلة .لكن اتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليهpotterوآخرون(23) والذي أشار إلى إن العديد من المبيدات الكيميائية لها تأثير سام ضد ديدان الأرض , وان المعاملة الحقلية ببعضها مثلFungicides و insecticides وNematicidesلها تأثيرات ضارة على ديدان الأرض , فقد وجد على سبيل المثال إن المعاملة بأحد أنواع Fungicides (benomyl)أو insecticides (ethoprop, carbaryl, bendiocarb) وبالمعدلات الموصى بها يسبب اختزال أعداد الديدان بقيمة 60-90% . وكذلك أشارReddy (24) بان المبيد الكيميائي Nematicides (carbofuran) له تأثير ضار على نمو وتكاثر ديدان الأرض . أشار Al-Yousuf (25) إلى تأثير المبيد الحشري Primicid في الخلايا العصبية الإفرازية في العقد العصبية لدودة الأرض Aporrectodacaliginosa إذ أن استعمال المبيد أدى إلى تغيرات في أنسجة الخلايا الإفرازية في الدماغ و بذلك أدى إلى إعاقة عملية النقل الكهربائي و أن هذا التأثير في أنسجة الدماغ يزداد مع زيادة التراكيز المستعملة من المبيد و اعتبر الباحث أن تغيرات الأنسجة و الخلايا في الأحياء يعد قياس دقيق للتلوث البيئي و أضرار هذه المواد على البيئة .

جدول (3) : تأثير أعلى ثلاثة تراكيز لمستخلصي أوراق نبات الدفلة في ديدان الأرض :

التركيز ملغم/لتر	نسبة الهلاك %		
	م. كحولي	م. مائي	مبيد
1000	-	-	100
3000	0	0	-
4000	0	0	-
5000	0	0	-
السيطرة	0	0	0

المصادر :

(1) Sasser, J. N. (1987) .A perspective on Nematode Problems Worldwide.InProceedings, Nematodes Parasitic to Cereals and Legumes in Temperate Semiarid Regions, Larnaca, Cyprus.ICARDA, Aleppo, Syria .pp. 1-12.

(2) الزرري , عبد الجواد و عبد الحميد طرابية (1981) . الديدان الثعبانية (نيماتودا النبات) . مديرية دار الكتب للطباعة والنشر , جامعة الموصل , 238 .

(3) الحازمي , احمد سعد و خليفة حسين دعباج و موفق رمضان كراجه و صالح نعمان النظاري(2010) . إحيائية نيماتودا تعقد الجذور . في : نيماتودا النبات في البلدان العربية . الجزء الأول . أبو غريبة , وليد إبراهيم , احمد سعد الحازمي , زهير عزيز اسطيفان واحمد عبد السميع دوابة. الطبعة الأولى , الجمعية العربية لوقاية النبات,عمان : الأردن . 245-284 .

(4) Hague, N.M.H. & S.R. Gowen (1987).Chemical control of nematodes.pp 131-178. In: Principles and Practices of Nematode Control in Crops (Eds.) R.H. Brown and B.R. Kerry. Academic Press, Sydney.

(5) ديكسون , د.و. (2000) . القرن الحادي والعشرون بدون بروميد المثيل : تطوير بدائل مستدامة . كتاب وقائع المؤتمر العربي السابع لعلوم وقاية النبات . 22-26 أكتوبر, 2000, عمان , الأردن , ص 7 . (ملخص) .

(6) Wheeler,W.B. & N.S. Kawar (1997) . Environmental hazards of Fumigants : The need for safer alternative . Arab. J. pl. Prot., 15(2) : 154-162 .
(7) اسطيفان , زهير عزيز و وليد إبراهيم أبو غربية (2010) . نيماتودا تعقد الجذور : الأضرار والخسائر الاقتصادية في : نيماتودا النبات في البلدان العربية , الجزء الأول . أبو غربية , وليد إبراهيم , احمد سعد الحازمي , زهير عزيز اسطيفان واحمد عبد السميع دوابة, الطبعة الأولى , الجمعية العربية لوقاية النبات,عمان : الأردن . ص 285-327 .
(8) Harborne, J.B.(1973). PhytochemistryMethods . Chapman and Hall, London, pp.182-192 .
(9)Hussey , R.S. & K.R. Barker (1973) . Acomparison of methods of collecting inoculaof *Meloidogyne* spp. Including a new technique . pl Dis. Report. 57: 1025-1028 .
(10) Abbott , W.S. (1925) . Amethod for compunting the effectiveness on insecticide .J.Econ.Ent. 13: 265-267 .
(11) الأمين , صادق صاحب هادي (1999) . تأثير محتوى التربة من الطين في نشاط بكتريا اللقاح العقدية . رسالة ماجستير , كلية الزراعة – جامعة بغداد .
(12)Egorove , N.S. (1985). Antibiotics a scientific approach.Mir Publishers. Moscow.
(13) Katooli, N. ; E.M. Moghadam ; & S. Hadiyan (2011) . Plant extracts to control *Meloidogyne incognita* on Cucumber . Pak. J. Nematol., 29 (2): 179-186 .
(14)Anjorin, S. T. & E. A. Salako (2008) . Comparative nematotoxicity and fungitoxicity of crude and partitioned ethanolic leaf extracts of three plant species . Afr. J. of Biotechnology . 7 (16) : 2874-2877.
(15) Opperman, C.H. & S. Chang (1990) .Plant-parasitic nematode acetylcholine esterase inhibition by Carbamate and organophosphate nematicides. J. Nematol., 22:481-488.
(16) الوائلي , ضياء سالم , طه ياسين مهودر وعلي زهير عبد الأسدي (2011) . المكافحة المتكاملة لمرض العقد الجذريـــــة في نبات الباميـــــا المـــــتسبب عن *Meloidogynejavanica* (Treub) Chitwood . مجلة أبحاث البصرة (العلميات) , 37 (4) :31-43 .
(17) Zibbu, G. & A. Batra (2010) .A Review on Chemistry and Pharmacological activity of *Nerium oleander* L. J. Chem. Pharm. Res., 2(6):351-358 .
(18) Kellerman, T.S. ; J.A.W. Coetzer ; T.W. Naudé& C.J. Botha (2005) . Plant poisonings and mycotoxicoses of livestock in southern Africa, 2nd ed. Oxford Univ. press, Cape town.
(20) Saler, R.S. (2011) .Pesticidal effects on nodulatioin and n-fixation in groundnut (Arachishypogaea L) c.v.sb- 11 . IPCBEE vol.24 .
(21) Martinez-toledo, M.V.; V. Salmeron& J. Gonzalez-lopez (1992) . Effect of the insecticides methylpyrimifos and chlorpyrifos on soil microflora in an agricultural loam . Plant & Soil 147: 25-30 .
(22) Lang, S.Z. (2012) . The Toxic Effects of Teas as Pesticides or Repellents on Lambricusrubellus, Genus Helix, and Genus Deroceras . California state science fair .
(23) Potter D.A. ;M.C. Buxton;C.T. Redmond;C.G. Patterson &A.J. Powell (1990). Toxicity of pesticides to earthworms (Oligochaeta: Lumbricidae)and effect on thatch degradation in Kentucky bluegrass turf. J Econ. Entomol. 83:2362–2369 .
(24) Reddy,V.M. (1999) . Management of Tropical Agroecosystems and the Beneficial Soil Biota ,387.
(25) Al-Yousuf, S.(1995) . The effect of the insecticide (Primicid) on neurosecretory of the earthworm Aporrectodacaliginosa .Qatar Univ. Sci. J. 15 (2) : 373- 377 .