

## 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 :

استهدف البحث الحالي دراسة تأثير المستخلص الخام المائي والكحولي لأوراق نبات الدفلة *Nerium oleander* L. في هلاك يرقات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية *chitwood (kofoid and white) Meloidogyne incognita* 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 و 2000 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  $Lc_{50}$  3228.6 و 4312 ملغم/لتر للمستخلص المائي والكحولي على التوالي. وفي مجال دراسة تأثير أعلى ثلاثة تراكيز لهذه 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 *Lambricus rubellus* فقد أشارت النتائج انه ليس للتراكيز ذاتها تأثير مميت لديدان الأرض إذ بلغت النسبة المئوية للقتل 0% بالمقارنة مع 100% عند استخدام تركيز 1000 ملغم/لتر من المبيد الكيميائي Cadusafos.

#### Summary :

Targeted the current study the effect of aqueous crude extract and alcohol leaves of the oleander plant *Nerium oleander* L. The deaths of larvae second phase of worms root knot *Meloidogyne incognita* (kofoid and white) chitwood and their impact on non target organisms. as the results indicated that for both extracts impact in loss of larvae second phase of worms root knot in concentrations 1000, 2000, 3000, 4000 and 5000 mg /L and that this effect is a direct correlation with the concentrations used, on the other hand it has been shown that aqueous extracts impact in the loss of more than larval alcoholic extract as value  $Lc_{50}$  3228.6 and 4312 mg/L of aqueous extracts and alcohol respectively. In the study of the effect of higher concentrations of these extracts are 3000, 4000 and 5000 mg /L in nitrogen fixing bacteria *Rhizobium* sp. The results showed no effect of these concentration extracts as well as commercial pesticide user Cadusafos. In terms of impact to the deaths of earth worms *Lambricus rubellus*, the results indicate that the same concentrations have not impact deadly to earth worms as the percentage of murder 0% compared with 100% when using concentration 1000 mg/L of the pesticide chemical Cadusafos.

#### 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-knot الذي يعد من أكثر الأمراض النيماتودية انتشارا في العالم (2). أشار الحازمي وآخرون (3) أن المدى العوائلي لهذه الديدان واسع جدا إذ أنها تشمل كافة مجموعات محاصيل الحقل والخضر، و أشجار الفاكهة والغابات، ونباتات الزينة والمساحات 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 النيوماتودي كالمستخلصات النباتية . وقد أثبتت العديد منها فعاليتها العالية في السيطرة على النيوماتودا 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) م مع مراعاة التقليب المستمر لضمان التجفيف الجيد , و بعد التأكد من جفافها سحقت الأوراق بواسطة طاحونة بعدها حفظ المسحوق داخل علب بلاستيكية معتمدة .

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 نيوماتودا 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 م لمدة 48 ساعة , وبعدها تم حساب أعداد اليرقات الميتة والنسبة المئوية المصححة للموت باستخدام معادلة ابوت Abbott formula (10) .

عدد الأفراد الحية المقارنة – عدد الأفراد الحية للمعاملة

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

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 تمييزها حسب الأمين (11) على وسط الخميرة – مانيتول Yeast Mannitol Medium كوسط تشخيصي . تم اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية ضد بكتريا *Rhizobium* بتركيز (3000, 4000, 5000) ملغم/لتر وهي التراكيز الأكثر تأثيرا في نيوماتودا 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 Medium 12) وتم التعرف على أقطار التثبيط بعد فترة الحضانة وهي 48 ساعة . جمعت الديدان من حديقة منزلية في منطقة حي الحسين / محافظة كربلاء واختيرت بطول ( 5-7 ) سم . تم حفظها في أوعية بلاستيكية ذات مساحة 250 سم<sup>2</sup> 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 نيوماتودا 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 :

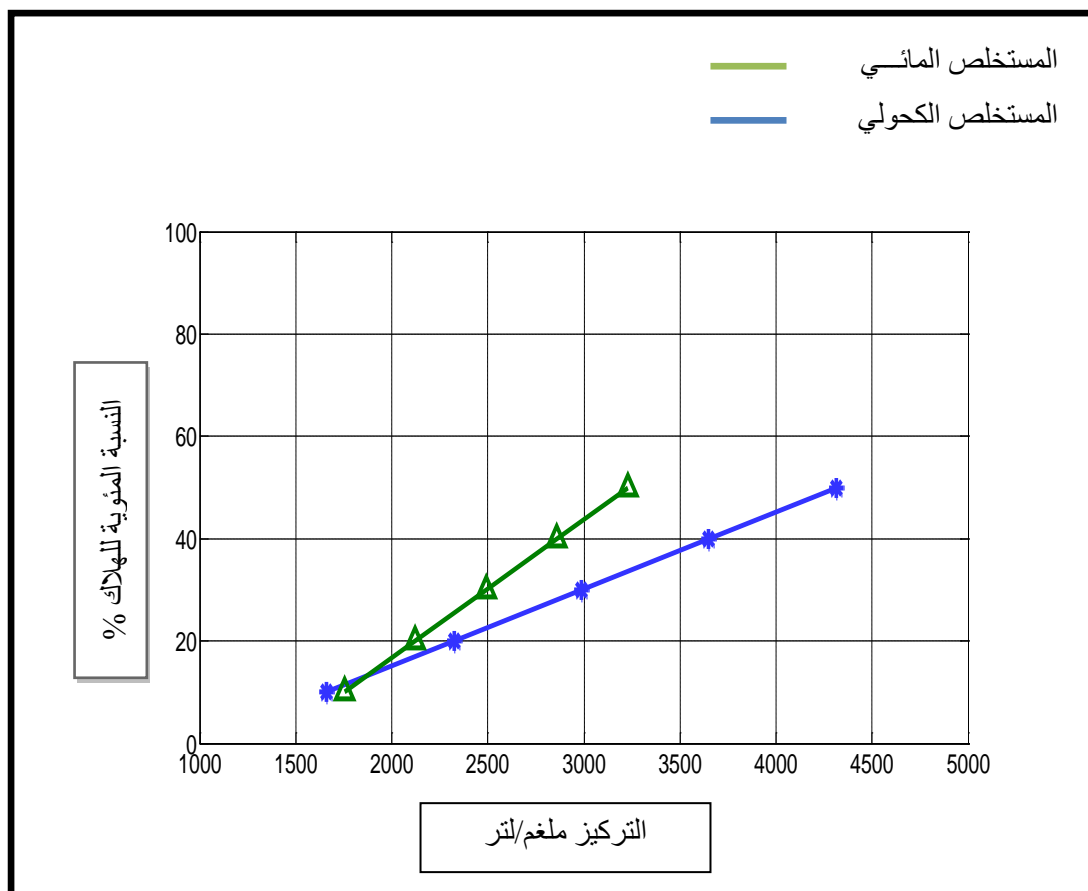
من خلال النتائج الواردة في جدول (1) , يتضح إن لكلا المستخلصين المائي والكحولي تأثير في هلاك يرقات الطور الثاني لنيوماتودا تعقد الجذور *M.incognita* وكان هذا التأثير ذي علاقة طردية مع التركيز المستخدم , حيث نلاحظ إن النسبة المئوية لهلاك يرقات الطور الثاني تزداد مع زيادة التراكيز المستخدمة ولكلا المستخلصين , فيما يخص المستخلص المائي نلاحظ انه لم يكن للمستخلص أي تأثير عند استخدامه بالتركيز 1000 ملغم/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 *Artemisia annua L.* *Melia azedarach L.* *Ricinus communis L.* كذلك لا بد من الإشارة إلى إن المعاملة بالمبيد الكيميائي cadusafos بتركيز 1000 ملغم/لتر سببت إحداث نسب هلاك بلغت 60% وهذه النسبة أكبر 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 *Blumea perotitiana* . وقد 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 الشبـك العصبـي 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 و Batra (17) أن نبات الدفلة يحوي العديد من المركبات الكيميائية مثل القلويدات و كلايكوسيدات nerine و oleandrin و التانينات . كما ذكرنا إن لنبات الدفلة سمية عالية تعود للعديد من المركبات التي يحويها , لكن أكثر المركبات سمية هي كلايكوسيدات oleandrin و nerine والموجودة 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*:

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



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 بركات الطور الثاني لديدان العقد الجذرية، تم اختيار التراكيز الثلاثة الأكثر تأثيراً (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 أنه 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 ميكائزم التأثير السام للمستخلصات النباتية والمبيد الكيماوي وعدم تأثيرها في نمو بكتريا تثبيت النتروجين. ولم تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه Saller (20) والذي استخدم حوالي 26 مبيد كيميائي Pesticides من ضمنه Carbofuron, Thiram, Aureofungin, Streptocyclin, Thiocarbonyl, Difoltan, Hexacarp, Thiodan والتي 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 الكيماوية التي استخدمها الباحث بالمقارنة مع مبيد cadusafos. ومن ناحية أخرى أشار Martinez-toledo وآخرون (21) أنه يمكن لبعض أحياء التربة إن تتحمل بعض الجرعات من المبيدات الكيماوية 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 التثبيت ( سم )	
	م. مائي	م. كحولي
1000	-	-
3000	0	0
4000	0	0
5000	0	0
السيطرة	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) Lang والذي اختبر التأثير السام لخاصة الشاي الأخضر و الأحمر كمبيد كيميائي pesticides ضد ديدان الأرض *Lambricus rubellus*, ووجد إن هذه الخلاصة مميّنة لديدان الأرض وبكل التراكيز المستخدمة في ساعات قليلة . لكن اتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه potter وآخرون (23) والذي أشار إلى إن العديد من المبيدات الكيميائية لها تأثير سام ضد ديدان الأرض , وان المعاملة الحقلية ببعضها مثل Fungicides و insecticides و Nematicides لها 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 أشار Reddy (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 *Aporrectocaliginosa* 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. مائي	م. كحولي
1000	-	-
3000	0	0
4000	0	0
5000	0	0
السيطرة	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 دعباح و موفق رمضان كراج 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 و احمد عبد السميع دواية . الطبعة الأولى , الجمعية العربية لوقاية النبات , عمان : الأردن . 284-245 .
- (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 غريبة ( 2010 ) . نيماتودا تعقد الجذور : الأضرار والخسائر الاقتصادية 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 . ص 285-327 .
- (8) Harborne, J.B.(1973). PhytochemistryMethods . Chapman and Hall, London, pp.182-192 .
- (9)Hussey , R.S. & K.R. Barker ( 1973 ) . Acomparision 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 عيد الأسدي (2011) . المكافحة المتكاملة لمرض العقد الجذرية في نبات الباميا المتسبب عن *Meloidogyne javanica* (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 nodulation 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 *Deroceeras* . 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 *Aporrectocaliginosa* .Qatar Univ. Sci. J. 15 (2) : 373- 377 .