تأثير التداخل بين مستخلص الدارسين وبكتريا *Bacillus subtilis* ضد الفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لمرض تعفن جذور الفلفل

م.م ابتسام محمد حسين

المعهد التقني – بابل (مقاومة حيوية)

المستخلص

في هذه الدراسة تم اختبار فعالية التداخل بين بكتريا *Bacillus subtilis* ومستخلص الدارسين المائي بتراكيز مختلفة في تثبيط نمو الفطر الممرض *Rhizoctonia solani* المسبب لمرض تعفن جذور نبات الفلفل و مقارنتها فيما لو استخدمت البكتريا والمستخلص كلاً على انفراد ، اظهرت النتائج المختبرية ان معاملات التداخل بين بكتريا *B.subtilis* ومستخلص الدارسين المائي بتركيز (10و20و30) ملغم /مل حققت اعلى نسبة مئوية في تثبيط نمو الفطر *R.solani* والتي بلغت (76.66 و 82.21 و 89.71) %على التوالي بعد ثلاثة وستة ايام قياساً بمعاملة المقارنة والتي بلغت فيها النسبة المئوية لتثبيط الفطر الممرض 0.00% ، اما معاملة استخدام البكتريا بمفردها فقد ادت الى تثبيط نمو مستعمرة الفطر الممرض في كلا الفترتين الزمنيتين وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة فقد بلغت النسبة المئوية لتثبيط الفطر فيها 74.71% و 64.71% بعد ثلاثة ايام وستة ايام على التوالي ، اما معاملات استخدام مستخلص الدارسين بمفرده بتراكيز (20 ، 30) ملغم / مل حققت فروقاً معنوية عالية قياساً بمعاملة المقارنة اذ بلغت النسبة المئوية لتثبيط الفطر الممرض في كلا الفترتين الزمنيتين (40.55 و 54.71) % على التوالي بعد ثلاثة ايام و (13.88 و 46.10) % على التوالي بعد ستة ايام . اما معاملة استخدام مستخلص الدارسين بمفردة بتركيز (10) ملغم / مل فقد كانت النسبة المئوية لتثبيط الفطر 31.91% بعد ثلاثة ايام وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة ولكن هذه المعاملة كانت مشجعة لنمو مستعمرة الفطر الممرض *R.solani* خلال الفترة الزمنية الثانية اذ بلغت النسبة المئوية لتثبيط الفطر 0.00 % بعد ستة ايام بدون أي فروقات معنوية عن معاملة المقارنة .

The effect of combination between the *Cinnamomum* extract and the *Bacillus subtilis* against *Rhizoctonia solani* fungus that causes root rot disease *Capsicum*

Abstract

In this study the test combination activity between *Bacillus subtilis* and watery *cinnamomum* extract is concentration different in the growth inhibition of the *Rhizoctonia solani* caused the root rot disease of *capsicum* plant and compared if the uses bacteria and extract both alone . It showed the results of laboratory the combination treatments between *Bacillus subtilis* and watery extract of *cinnamomum* the concentration (10 , 20 ,30) mg / ml has the highest percentage in the inhibition of the growth *Rhizoctonia solani* which has(76.66 , 82.21 , 89.71) % respectively after

three and six days compared to the control treatment which has to the percentage of inhibition of the pathogen fungus 0.00% . As uses of bacteria treatment alone has led to the growth inhibition of the pathogenic fungus colony in both time periods and a difference significant for the control which has the percentage of the fungus inhibition 74.71% and 64.71% after three days and six days respectively . Either uses of *cinnamomum* extract alone of the concentration of (20, 30) mg / ml has a highly significant difference compared to the treatment control as percentage of pathogenic fungus inhibition in both the two time periods (40.55 , 54,71) % respectively after three days and and (13.88 , 46.10) % respectively after six days . The uses of *cinnamomum* extract treatment alone concentration of 10 mg / ml the percentage of fungus inhibition 31.91% after three days and asignificant difference for the control treatment , but treatment is encouraging for the growth of the pathogenic fungus colony *Rhizoctonia solani* during the second time period as the percentage of inhibition fungus 0.00% after six days without any significant differences from the control treatment . We conclude from the results of this study the use of *Bacillus subtilis* and watery *cinnamomum* extract as combination considered method is very important in achieving the best results in control on the *Rhizoctonia solani* fungus causes the root rot capsicum .

المقدمة

يعتبر نبات الفلفل *Capsicum annum* من الخضر المهمة في العديد من دول العالم وهو يعود الى العائلة الباذنجانية Salonaceae ، موطنه الأصلي امريكا الوسطى والجنوبية (16و 54). يعد الفطر *Rhizoctonia solani* من المسببات الفطرية المهمة المسببة لمرض تعفن الجذور Rot Root في نبات الفلفل فهو يهاجم النباتات في مراحل نموها المختلفة اذ يصيب البذور في التربة والبادرات قبل وبعد البزوغ ويصيب الجذور (49 و 10 و 12). ولعدم وجود اصناف فلفل مقاومة لمرض تعفن الجذور جعل عملية مكافحة المرض امراً صعباً (15 و 29] . استخدمت عدة طرق في مكافحة فطريات التربة واكثرها استخداماً المكافحة الكيميائية وذلك لسهولة استخدامها وسرعة تأثيرها في المسببات المرضية لكن تكرار استخدام المبيدات الكيميائية ادى الى ظهور مشاكل عديدة منها صفة المقاومة (53) ، اضافه الى تلويثها للبيئة وخطورتها على صحة الأنسان والحيوان (20) . لذلك توجه الباحثين الى استخدام الكائنات الحية الدقيقة في مكافحة مسببات الأمراض النباتية ومنها مسببات امراض الجذور ومن هذه الكائنات استخدام بكتريا *Bacillus* (42). تعد بكتريا *Bacillus subtilis* عامل مقاومة احيائي كفوء ضد العديد من المسببات الممرضة للنبات ومنها الفطريات (25) . وقد تم استخدام بكتريا *Bacillus subtilis* في المكافحة الحيوية لما تمتلكه من صفات مثل التأثير على استعمار الجذور وامتلاكها لعدة ميكانيكيات تستخدمها ضد مختلف المسببات المرضية اضافه الى قدرتها على تكوين السبورات(26) . وأكدت الدراسة التي قام بها (51) حدوث خفض معنوي لمرض تعفن جذور نباتات الفلفل المتسبب عن الفطر *R.solani* عند معاملة البذور أو تغطيس جذور النباتات بمعلق السلالة البكتيرية *B.subtilisHS93*(10^6 خلية/ مل) . كذلك تم استخدام المستخلصات النباتية ولاقت اهتماماً واضحاً

في العقدين الأخيرين لأمتلاكها فعالية مضادة ضد العديد من الفطريات ولها مواصفات مرغوبة مثل سرعة تحللها (52) . استخدم نبات القرفة (الدارسين) *Cinnamomum zylanicum* الذي ينتمي للعائلة الزنجبيلية Zingibiraceae في مجال المقاومة الحيوية فهو يحتوي على مادة فعالة تدعى الدهيد القرفة Cinnamaldehyde اذ انها تشكل 36% تقريباً من الزيت العطري الذي يحتويه هذا النبات[35 و 36]. ولخطورة مرض تعفن جذور الفلفل المتسبب عن الفطر *R.solani* هدفت هذه الدراسة الى استخدام المكافحة الحيوية لمرض تعفن جذور الفلفل باستخدام عملية التداخل المتأزر ما بين بكتريا *B.subtilis* ومستخلص الدارسين المائي ضد الفطر *R.solani* .

المواد وطرائق العمل

العزل والتشخيص

جمعت عينات عشوائية من نبات الفلفل ظهرت عليها اعراض المرض من خمس مواقع ضمن محافظة بابل (المهناوية – النيل – الناصرية – الحصن – المعافات) للفترة من 2013/6/2 ولغاية 2013/6/17 وتم فصل الجذور عن باقي اجزاء النبات وغسلت بالماء الجاري لمدة 30دقيقة ثم قطعت الى اجزاء صغيرة بطول 0.5 سم وعقمت سطحياً بغمرها بمحلول هايبوكلورات الصوديوم (1%) لمدة 2–3 دقيقة ثم نقلت على اوراق ترشيح لغرض تجفيفها بعد ذلك نقلت بواسطة ملقط (Forceps) معقم الى اطباق بتري بقطر 9 سم حاوية على وسط PDA (Potato Dextrose Agar) مضاف اليه المضاد الحيوي Tetracyclin بتركيز 250ملغم / لتر بعد عملية التعقيم بجهاز الموصدة على درجة حرارة 121مْ وضغط 1جو ولمدة 20دقيقة ، وضع في كل طبق 3قطع ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25± 2 مْ لمدة 3 ايام ثم نقيت الفطريات المختلفة بعد 5 ايام فحصت تحت القوى الصغرى للمجهر المركب وشخصت الأجناس والأنواع اعتماداً على المفاتيح التصنيفية المعتمدة (44 و 22) .

اختبار المقدرة الأمراضية لعزلات الفطر *R.solani* باستخدام بذور اللهانة

باتباع طريقة (14) فقد تم تحضير اطباق بتري بقطر (9سم) حاوية على وسط الأكار المائي Water agar (20غم اكار – 1لتر من الماء المقطر) المعقم بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121مْ وضغط 1جو لمدة 20 دقيقة مضافاً اليه المضاد الحيوي التتراسايكلين 250ملغم / لتر ، بعد ان تصلب الوسط لقحت الأطباق في مركزها بقرص قطر 0.5 سم اخذ من قرب حواف مستعمرة الفطر *R.solani* بعمر 5ايام ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 ± 2مْ لمدة ثلاثة ايام بعد ذلك زرعت بذور لهانة محلية (اختبرت نسبة انباتها مسبقاً) بعد ان عقمت بمحلول هايبوكلورات الصوديوم (1%) بحيث وضعت بذور اللهانة بصورة دائرية قرب حافة الطبق وبمعدل 25بذرة / طبق ، استعملت 4 اطباق كمكررات لكل عزلة من عزلات الفطر *R.solani* اضافه الى معاملة المقارنة بدون فطر ممرض حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 ± 2 ثم اخذت النتائج بعد 7ايام وذلك بحساب النسبة المئوية للأنبات حسب المعادلة : النسبة المئوية للأنبات = (عدد البذور النابتة / العدد الكلي للبذور) × 100

عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus subtilis*

عزلت البكتريا من جذور نباتات الخيار وذلك بفصل الجذور عن باقي اجزاء النبات ثم هزت النباتات بلطف لأزالة التربة ثم وزن 1 غم من الجذور ووضعت في انبوبة اختبار تحتوي على 9 مل ماء مقطر معقم ثم رجت في جهاز ال Vortex لمدة 30 دقيقة بعدها تركت 2 دقيقة حتى تترسب حبيبات التربة (2) بعد ذلك حضرت سلسلة من التخافيف لمحلول التربة وصولاً الى التخفيف 10^{-9}باستعمال Micropipette .وضعت جميع الأنابيب في حمام مائي بدرجة 80مْ لمدة 10 دقائق للقضاء على الخلايا الخضرية ثم نقل 1مل من كل تخفيف الى اطباق بتري وصب عليها الوسط الزرعي Nutrient agar وتركت الأطباق لتتصلب ثم حضنت في الحاضنة بصورة مقلوبة بدرجة 37مْ لمدة 48 ساعة بعدها فحصت البكتريا تحت المجهر بعد تصبيغها بصبغة غرام ، المستعمرات التي أعطيت نتيجة موجبة لصبغة غرام وذات شكل عصوي مع وجود الأبواغ تم تنقيتها على وسط N.agar وحضنت بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة ثم حفظت مستعمرات نقية في انابيب اختبار حاوية على الوسط الزرعي N.agar بصورة مائلة عند درجة حرارة 4مْ (33) . وتم تشخيص البكتريا باستخدام الفحوصات البايوكيميائية والفسيولوجية .

جمع عينات الدارسين

تم الحصول على عينات قلف الدارسين من السوق المحلية ونظفت من الأتربة المتعلقة بها ، ورغم ان قلف الدارسين كانت جافة لكن تم تجفيفها للتخلص من أي رطوبة بها فقد تركت لتجف وذلك بفرشها على قطعة من القماش على شكل طبقات رقيقة في غرفة جيدة التهوية مع التقليب المستمر للعينات لمنعها من التعفن والاسراع في التجفيف ، طحنت العينات النباتية باستعمال مطحنة كهربائية ثم غربلت بشكل ناعم ووضعت في اكياس بولي اثيلين ثبت عليها اسم النبات ووزن النموذج وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال (7) .

تحضير مستخلص الدارسين المائي :-

اتُبعت طريقة (50 و 48) في تحضير المستخلص المائي وذلك بمزج 150 غم من مسحوق النبات مع 1000 مل من الماء المقطر في دورق حجمي بسعة 2000 مل، ثم وضع الدورق على جهاز Magnatic sterrier لغرض الرج المستمر لمدة 72ساعة ثم رُشح المزيج باستخدام طبقات عدة من الشاش الطبي ثم عقم خلال Millipore filter µm0.22 . وضع السائل في الحاضنة بدرجة 37مْ حتى جف واصبح بشكل مسحوق (للتخلص من الماء ومعرفة كمية المادة الفعالة بدقة) ثم وضع في أوعية محكمة الغلق في الثلاجة لحين الاستعمال (17) .

تحضير تراكيز مستخلص الدارسين المائي

حضرت اوزان 1غم و 2غم و 3غم من مسحوق مستخلص الدارسين المائي واضيفت الى 100مل من الوسط الزرعي PDA المعقم كلاً على حده وبذلك اصبحت التراكيز 1000ملغم / 100مل و 2000ملغم / 100مل و 3000ملغم / 100مل اي 10ملغم/ مل و 20ملغم/مل و30ملغم/مل .

اختبار المقدرة التضادية لبكتريا *B.subtilis* ضد الفطر *R. solani* المسبب لتعفن جذور الفلفل:-

تحديد التركيز الفعال من لقاح بكتريا *B. subtilis* المثبط لنمو الفطر *R. solani*

حضرت سلسلة من التخافيف (10^{-1}-----10^{-10}) وذلك باستخدام عشرة أنابيب اختبار تحوي كل أنبوبة 9مل ماء مقطر معقم ثم اضيف 1مل من عالق البكتريا بعمر 24 ساعة إلى الأنبوبة الأولى بواسطة Micropipette ومزجت المكونات جيداً ثم اخذ 1مل من الأنبوبة الأولى وأضيف إلى الأنبوبة الثانية ومزجت المكونات جيداً وكررت العملية على باقي أنابيب الاختبار . لقحت أطباق حاوية على PDA في مركزها بقرص قطر 0.5 سم من حواف مستعمرة الفطر *R.solani* المنماة على وسط PDA بعمر 5 أيام ثم اضيف 1مل /طبق من كل تخفيف من العالق البكتيري ووضع بشكل بقع دائرية تبعد عن حافة الطبق 1سم وبواقع أربعة أطباق لكل تخفيف وتركت أربعة أطباق للفطر من دون تلقيح بالبكتريا أضيف إليها 1 مل ماء مقطر للمقارنة (6). حضنت الأطباق بدرجة حرارة 22 ± 1مْ وقرأت النتيجة بعد وصول مستعمرة الفطر في معاملة المقارنة إلى حافة الطبق .

حساب الكثافة العددية لبكتريا *B. subtilis* :-

حضرت أربعة أطباق بتري قطر 9 سم حاوية على الوسط الزرعي N.A المعقم ثم لقحت الأطباق بالعالق البكتيري من التخفيف المثبط للفطر *R.solani* والذي كان 10^{-7} وذلك بأخذ 1 مل /طبق ثم حضنت الأطباق بالحاضنة في درجة حرارة 25 ± 1 لمدة 24 ساعة بعد ذلك تم حساب عدد المستعمرات في كل طبق باستخدام جهاز Colony counter واستخرج المعدل ثم ضرب في مقلوب التخفيف الفعال المثبط للفطر(18).

وحدة تكوين مستعمرة /1 مل = معدل عدد المستعمرات النامية × مقلوب التخفيف

وبذلك تم حساب الكثافة العددية لبكتريا *B.subtilis* والذي كان 8.1 × 10^{8} اعتمد في الدراسات اللاحقة.

اختبار حساسية بكتريا *B.subtilis* لمستخلص الدارسين المائي :-

اتبعت طريقة الانتشار في الاكار Agar Diffusion Method بوساطة الحفر Wells (23) في اختبار حساسية البكتيريا لمستخلص الدارسين المائي . تتضمن الطريقة نشر 0.1 مل من التخفيف الفعال لبكتريا *B.subtilis* 10^{-7} (الذي حضر من عالق البكتيريا بعمر 24ساعة) على وسط Nutrient agar ثم عمل اربع حفر بأبعاد متساوية في الاكار المغذي الصلب وبقطر 5ملم بواسطة الثاقب الفليني Cork Borrer واضيف لكل حفرة مقدار 0.2 مل وبتركيز 100% من مستخلص الدارسين (5). تركت الاطباق في الثلاجة لمدة 2-4 ساعة لانتشار المستخلص في الوسط الزرعي (28) وحضنت بدرجة حرارة 27± 2°م لمدة 24 ساعة وقرأت النتيجة بعد 24 ساعة بوجود او عدم وجود مناطق تثبيط Inhibition zone لنمو البكتريا .

أختبار تأثير المستخلص النباتي المائي للدارسين وبكتريا *B.subtilis* في تثبيط نمو الفطر الممرض *R.solani* على الوسط الزرعي PDA

اتبعت طريقة مزج المستخلص المائي مع الوسط الزرعي PDA بعد ان عقم وبرد الى درجة حرارة 45مْ (30) فقد اخذ 1 غم من مسحوق مستخلص الدارسين المائي وذوب في 5مل ماء مقطر معقم ثم اضيف الى

90 مل من سط PDA المعقم (الذي حضر من استخدام الكمية المقررة من قبل الشركة في 100مل ماء مقطر واذابتها في 90مل ماء مقطر) بعد ذلك اكمل الحجم الى 100مل بواسطة ماء مقطر معقم ومزج جيداً فأصبح التركيز 10ملغم/مل ثم صب الوسط في اطباق بتري وترك ليتصلب واتبعت نفس الطريقة بالنسبة الى استخدام (2 و 3) غم/ 100مل . اما بالنسبة الى بكتريا *B.subtilis* فقد تم اضافتها الى الوسط بأخذ 1مل /طبق من اقل تخفيف مثبط للفطر الممرض *R.solani* 10^{-7} وبتركيز 8.1×10^{8} المحضر من العالق البكتيري بعمر 24ساعة بواسطة Micropipette وضع بشكل بقع دائرية تبعد عن حافة الطبق 1سم بعد وضع في مركز الطبق قرص بقطر 0.5 سم من حواف مستعمرة الفطر *R.solani* المنماة على وسط PDA بعمر 5 أيام وبواقع أربعة أطباق (6) وكانت المعاملات كما يلي :

1- الفطر الممرض *R.solani* + المستخلص بتركيز 10 ملغم/ مل + بكتريا *B.subtilis*

2- الفطر الممرض *R.solani* + المستخلص بتركيز 20 ملغم /مل + بكتريا *B.subtilis*

3- الفطر الممرض *R.solani* + المستخلص بتركيز 30 ملغم/مل + بكتريا *B.subtilis*

4- الفطر الممرض *R.solani* + المستخلص بتركيز 10 ملغم/ مل

5- الفطر الممرض *R.solani* + المستخلص بتركيز 20 ملغم /مل

6- الفطر الممرض *R.solani* + المستخلص بتركيز 30 ملغم/مل

7- الفطر الممرض *R.solani* + بكتريا *B.subtilis*

8- الفطر الممرض *R.solani* بمفرده (Control)

اخذت النتائج على فترتين من الزمن الأولى بعد ثلاثة ايام والثانية بعد ستة ايام بحساب معدل قطرين متعامدين من نمو كل مستعمرة وتم حساب النسبة المئوية للتثبيط. باستخدام المعادلة :

$$\text{للتثبيط \%} = \frac{\text{المعاملة مستعمرة قطر متوسط} - \text{المقارنة مستعمرة قطر متوسط} \times 100}{\text{المقارنة مستعمرة قطر متوسط}}$$

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص الفطر *R.solani*

بينت نتائج العزل والتشخيص وجود عدة اجناس وانواع من الفطريات المرافقة لجذور نباتات الفلفل المصابة وكان الفطر *R.solani* هو اكثر الفطريات ظهوراً فقد بلغت النسبة المئوية لظهوره 82.33 % اما

الفطريات المرافقة الأخرى فقد شملت عدة اجناس منها *Fusarium* و *Aspergillus* و *phytophthora* و *Mucor* . واعتمد في تشخيص الفطر *R.solani* والأجناس الفطرية الأخرى على المفاتيح التصنيفية المعتمدة (44 و 22) . وكذلك اعتمد في تشخيص الفطر *R.solani* على ما يمتلكه من صفات تشخيصيه مهمة منها التخصرات الموجودة في مناطق اتصال خيوط الغزل الفطري مع الخيط الرئيسي .

اختبار المقدرة الأمراضية لعزلات الفطر *R.solani* باستخدام بذور اللهانة

بينت نتائج اختبار المقدرة الامراضية ان جميع عزلات الفطر *R.solani* احدثت خفضا معنويا في النسبة المئوية لانبات بذور اللهانة قياساً بمعاملة المقارنة التي بلغت نسبة الانبات فيها 93.00 % وقد تفوقت العزلة R_4 على باقي العزلات في خفض النسبة المئوية للأنبات والتي بلغت 3% جدول (1) . وان اختلاف العزلات في تاثيرها على انبات بذور اللهانة قد يعزى الى اختلاف هذه العزلات في سرعة النمو او قد يعزى السبب الى اختلافها في قدرتها على انتاج المواد الايضية كالسموم و الانزيمات المحللة (1) . ان التأثير الذي احدثته الفطريات يعود الى طبيعة هذه الفطريات التطفلية اذ تهاجم بذور العديد من العوائل النباتية مؤدية الى تعفنها او منعها من الانبات بافرازها لبعض المركبات السامة التي تؤدي الى قتل الاجنة وافرازها لعدد من الانزيمات المحللة للسيليلوز و البكتين و البروتين والتي تسبب تعفن البذور واحداث الاصابة في النبات او قد تعود الى قابلية الفطريات على افراز انزيمات محللة للكنين في جدار خلية العائل مثل Peroxidase و Ligninase وانتشار سموم الفطر وانزيماته في تلك الخلايا ، او قد تعود قدرة الفطر في خفض نسبة انبات بذور اللهانة الى قابليته على انتاج مواد سامة مثل Phenyl Acetic Acid (PAA) ومشتقاته الهيدروكسيلية مثل Beta-hyderoxy و Para hyderoxy (39 و 55 و 1 و 47 و 37) او ربما يعزى السبب الى اختلاف العزلات في مقدرتها على التطفل المباشر اذ ان العزلات شديدة الامراضية غطت البذور بالغزل الفطري ولم تسمح لها بالانبات (4).

جدول (1) تأثير عزلات الفطر *R.solani* في انبات بذور اللهانة .

مكان العينة	رمز العزلة	النسبة المئوية لأنبات بذور اللهانة %
الناصرية	R1	8
الحصن	R2	13
المعافات	R3	22
النيل	R4	3
المهناوية	R5	16
	Control	93
	L.S.D. عند مستوى 5%	10.15

عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus subtilis*

شخصت بكتريا *B.subtilis* بدراسة الصفات المظهرية حيث ظهرت مستعمرات ذات لون كريمي ويتغير لون المستعمرة بتقدم عمرها إذ تصبح ذات لون تبني داكن لكن عند اعادة الزرع البكتيري (Activation) لمدة 24ساعة يعود لون المستعمرات الى لونها الأصلي ، كذلك درست الصفات المجهرية والفحوصات البايوكيميائية (جدول 2) بالأعتماد على (32 و 19 و 38).

جدول (2) الاختبارات التشخيصية للنوع *B. subtilis* .

الاختبارات	النتيجة
Colony shape	Large – Irregular
Bacteria cell shape	Bacilli
Gram stain reaction	G+ve
Endospore formation	+
Blood hemolysis	β –Hemolysis +
Amylase	+
Gelatinase	+
Lecithinase	–
Catalase	+
Motility	+
7.5 % NaCl	+
Anaerobic growth	–
Arginine	–
Glucose	+
Mannitol	+
Xylose	+
Arabinose	+
Simmon citrate	+
Starch hydrolysis	+
Voges – proskauer	+
Indole	–

اختبار المقدرة التضادية لبكتريا *B.subtilis* ضد الفطر *R. solani* المسبب لتعفن جذور الفلفل:

بينت النتائج قدرة بكتريا *B.subtilis* بتركيز 8.1×10^8 (وحدة تكوين مستعمرة /مل) على تثبيط عزلة الفطر الممرض *R.solani* (R4) على الوسط الزرعي PDA ويعود سبب ذلك الى امتلاك البكتريا عدة اليات تمكنها من السيطرة على الفطريات الممرضة للنبات فهي تمتلك القدرة على انتاج انزيمات مثل Protease تكون مسؤولة عن تحلل الجدار الخلوي للفطريات اضافة الى انتاجها للمركبات الطيارة التي تحد من نمو الفطريات على الوسط الزرعي PDA (11) . كذلك تمتلك بكتريا *B.subtilis* القدرة على انتاج مواد فعالة مضادة للفطريات والبكتريا الممرضة للنبات مثل مادة lipopeptide surfactin و Iturin و Bacillomycin و Surfactin (21) . وتتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه (40) ان بكتريا *B.subtilis* لها القدرة على تثبيط نمو العديد من ممرضات النباتات الفطرية ومن ضمنها الفطر *R.solani* على الوسط الزرعي PDA.

اختبار حساسية بكتريا *B.subtilis* لمستخلص الدارسين المائي : –

استطاعت بكتريا *B.subtilis* ان تنمو خلال 24ساعة بوجود مستخلص الدارسين المائي وهذا يدل على عدم تأثر البكتريا بالمواد الفعالة الموجودة في مستخلص الدارسين المائي . ويعود سبب ذلك الى امتلاك غالبية الأنواع البكتيرية التابعة الى جنس *Bacillus* صفات فسيولوجية خاصة منها تكوينها للسبورات الداخلية endospore وامتلاكها للجدار الخلوي المتكون من عدة طبقات هذا مكنها من البقاء حية والعيش في انظمه متنوعة من البيئات (41). وهذه النتيجة تتطابق مع ما توصل اليه (56) عندما استخدم بكتريا *B.subtilis* مع عدد من المستخلصات النباتية لمكافحة الفطريات التي تسبب تلون الأخشاب فقد استطاعت البكتريا ان تنمو على الوسط الزرعي بوجود المستخلص النباتي .

إختبار تأثير المستخلص النباتي المائي للدارسين وبكتريا *B.subtilis* بصورة متداخلة ومنفردة في تثبيط نمو الفطر الممرض *R.solani* على الوسط الزرعي PDA :–

يبين جدول (3) علاقة الزمن بالنمو القطري لمستعمرة الفطر الممرض *R.solani* والنسبة المئوية لتثبيط الفطر الممرض حيث أظهرت النتائج وجود فروق معنوية عالية ما بين معاملات التداخل ومعاملة المقارنة اذ تفوقت معاملة التداخل مابين بكتريا *B.subtilis* ومستخلص الدارسين المائي بتركيز (30) ملغم /مل بوجود الفطر الممرض على باقي المعاملات في تثبيط نمو الفطر *R.solani* اذ بلغ معدل النمو القطري لمستعمرة الفطر الممرض والنسبة المئوية لتثبيط الفطر الممرض في كلا الفترتين الزمنيتين 0.92 سم و 89.71% على التوالي قياساً بمعاملة المقارنة والتي بلغ فيها معدل النمو القطري لمستعمرة الفطر الممرض والنسبة المئوية لتثبيط الفطر الممرض 9.00 سم و 0.00% على التوالي ، تلتها معاملة التداخل بين بكتريا *B.subtilis* ومستخلص الدارسين بتركيز 20ملغم / مل بوجود الفطر الممرض فقد كان معدل النمو القطري لمستعمرة الفطر الممرض والنسبة المئوية لتثبيط الفطر الممرض فيها في كلا الفترتين الزمنيتين 1.60سم و 82.21% على التوالي اما معاملة التداخل بين بكتريا *B.subtilis* ومستخلص الدارسين بتركيز 10ملغم / مل بوجود

الفطر الممرض فقد بلغ معدل النمو القطري لمستعمرة الفطر الممرض والنسبة المئوية لتثبيط الفطر فيها 2.10 سم و 76.66% على التوالي . ويعود سبب تفوق معاملات التداخل في تثبيط نمو مستعمرة الفطر الممرض الى ان استخدام عملية التداخل بين المستخلصات واي عامل مقاومة اخر يعطينا نتائج افضل فيما لو استخدم المستخلص لوحده فقد وجد (31) ان استخدام التداخل بين المستخلصات النباتية و حامض salicylic acid كان فعالاً ضد بكتريا *Pseudomonas marginalis* المسببة لمرض لفحة الأوراق على الخيار . كما ان استخدام بكتريا *B.subtilis* مع أي عامل مقاوم اخر ضد الممرضات النباتية نحصل على نتائج افضل فيما لو استخدم العامل المقاوم لوحده وهذا يتفق مع ما توصل اليه (46) ان استخدام بكتريا *B.subtilis* مع مبيدات الفطريات flutolanil و difenoconazole اعطى نتائج افضل من استخدام المبيدات بصورة منفردة ضد الفطر *Rhizoctonia cerealis* . وهذه النتيجة جاءت مطابقة مع ما توصل اليه (34) الى ان استخدام بكتريا *B.subtilis* و بكتريا *Pseudomonas flourescens* مع مستخلص الثوم المائي ادى الى السيطرة على نمو الفطر *Alternaria solani* على الوسط الزرعي . وقد يعود السبب في ذلك الى ان طريقة الاستخلاص المائي البارد التي اتبعت كانت ملائمة في استخلاص المواد الفعالة وبالتالي اثرت على نمو الفطر وعملت على تثبيطه. كذلك قد يعود سبب ذلك الى ان نبات القرفه (الدارسين) يعتبر من اشجار التوابل ويحتوي على العديد من المركبات الفعالة ويستعمل ضد مدى واسع من الأحياء المجهرية اذ يملك مستخلص الدارسين فعالية ضد الفطريات وهذه الفعالية تعود وبصورة رئيسية الى احتواءه على مركب Cinnamaldehyde و مادة Eugenol (27) ،كما ان المستخلص المائي لنبات الدارسين يحوي على العديد من المجاميع الفعالة ومنها الكلايكوسيدات، التانينات، الراتنجات، الصابونينات والفينولات (8). ويتفق هذا مع ما ذكره (45 و 24) بأن المركبات الفينولية لها القدرة على تغيير طبيعة البروتينات والاضرار بالاغشية الخلوية للخلايا الفطرية من خلال ارتباطها بالمواقع الفعالة للانزيمات الخلوية وتثبيط عملها. كما ذكر (43) بان الصابونيات لها القدرة على تثبيط نمو الفطريات . اما معاملات استخدام مستخلص الدارسين بمفرده وبوجود الفطر الممرض بتراكيز (20 ، 30) ملغم / مل حققت فروقاً معنوية عالية قياساً بمعاملة المقارنة اذ بلغ معدل النمو القطري لمستعمرة الفطر الممرض *R.solani* (4.90 و 4.07) سم على التوالي بعد ثلاثة ايام و (7.75 و 4.85) سم على التوالي بعد ستة ايام ، اما النسبة المئوية لتثبيط الفطر الممرض فقد كانت (40.55 و 54.71) % على التوالي بعد ثلاثة ايام و (13.88 و 46.10) % على التوالي بعد ستة ايام . اما معاملة استخدام مستخلص الدارسين بمفردة بتركيز (10) ملغم / مل بوجود الفطر الممرض فقد بلغ معدل النمو القطري لمستعمرة الفطر والنسبة المئوية لتثبيط الفطر 6.12سم و 31.91% على التوالي بعد ثلاثة ايام وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة ولكن هذه المعاملة كانت مشجعة لنمو مستعمرة الفطر الممرض *R.solani* خلال الفترة الزمنية الثانية اذ بلغ معدل النمو القطري لمستعمرة الفطر والنسبة المئوية لتثبيط الفطر 9.00 سم و 0.00 % على التوالي بعد ستة ايام بدون أي فروقات معنوية عن معاملة المقارنة . قد يعود سبب ذلك انه بزيادة تراكيز مستخلص الدارسين يزداد استخلاص المواد الفعالة المضادة للفطريات الممرضة للنبات . وقد يعزى سبب فعالية

المستخلصات في التأثير على النمو الشعاعي للفطريات الممرضة الى احتواء هذه النباتات على مركبات كيميائية ذات تأثير سلبي في نمو الفطر *R. solani* والتي تحررت عند اضافتها للوسط الزرعي مما ادى الى تغير خواص الوسط الطبيعية وجعله وسط اقل ملائمة لنمو الفطر (3) وهذه النتيجة مطابقة لما توصل اليه (9) ان لاستخدام مستخلص الدارسين تأثير ضد اربعة انواع من ممرضات النبات الفطرية *Rhizoctonia solani* و *Fusarium oxysporum* و *Phytophthora drechsleri* و *Bipolaris sorokiniana* على الوسط الزرعي PDA . واتفقت هذه الدراسة مع ما توصل اليه (13) ان بزيادة تراكيز المواد المستخلصة من عدة نباتات ومن ضمنها نبات الدارسين يزداد تثبيط الفطر *Botrytis cinera* .. اما معاملة استخدام البكتريا بمفردها فقد ادت الى تثبيط نمو مستعمرة الفطر الممرض في كلا الفترتين الزمنيتين وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة فقد بلغ معدل النمو القطري لمستعمرة الفطر والنسبة المئوية لتثبيط الفطر فيها 2.10 سم و 74.71% على التوالي بعد ثلاثة ايام و 3.17سم و 64.71% على التوالي بعد ستة ايام .ويعود سبب ذلك الى ان بكتريا *B.subtilis* لها القدرة على انتاج العديد من المركبات المضادة للفطريات والتي تعمل على اختزال نمو الخيوط الفطرية لمختلف الفطريات الممرضة للنباتات (57) . تبين من نتائج هذه الدراسة ان استخدام بكتريا *B.subtilis* ومستخلص الدارسين المائي بصورة متداخلة تعتبر طريقة مهمة جداً في تحقيق افضل النتائج في السيطرة على الفطر *R.solani* المسبب لمرض تعفن جذور الفلفل .

جدول (3) تأثير المستخلص النباتي المائي للدارسين وبكتريا *B.subtilis* بصورة متداخلة ومنفردة في تثبيط نمو الفطر الممرض *R.solani* على الوسط الزرعي PDA .

اسم المعاملة	بعد ثلاثة ايام		بعد ستة ايام	
	معدل النمو القطري لمستعمرة الفطر (سم)	معدل النسبة المئوية لتثبيط الفطر %	معدل النمو القطري لمستعمرة الفطر (سم)	معدل النسبة المئوية لتثبيط الفطر %
مستخلص 10ملغم/ مل + *R.s*	6.12	31.91	9.00	0.00
مستخلص 20ملغم/ مل + *R.s*	4.90	40.55	7.75	13.88
مستخلص 30ملغم/ مل + *R.s*	4.07	54.71	4.85	46.10
R.s + B.sub	2.27	74.71	3.17	64.71
مستخلص 10ملغم/ مل + *R.s + B.sub*	2.10	76.66	2.10	76.66
مستخلص 20ملغم/ مل + *R.s + B.sub*	1.60	82.21	1.60	82.21
مستخلص 30ملغم/ مل + *R.s + B.sub*	0.92	89.71	0.92	89.71
الفطر بمفرده (Control)	9.00	0.00	9.00	0.00
L.S.D. عند مستوى 5%	0.21	3.97	0.82	2.87

- كل رقم بالجدول يمثل معدلاً لأربعة مكررات .

المصادر

1- البياتي ، ماجد هزاع وخليل بندر ابراهيم وعلي حسين البهادلي . (1988). مقارنة العزلة الممرضة وغير الممرضة للفطر *Rhizoctonia solani* في انتاج بعض الانزيمات .مجلة زانكو . 2 : 122-129.

2- الحميدان ، هدى حمد و البندري ناصر السلوم .(2007). المقاومة الحيوية لفطر *Fusarium oxysporum* باستخدام بكتريا *Pseudomonas fluorescens* في نبات الكوسة . مجلة العلوم البايولوجية السعودية . مجلد 14. عدد (2). 169- 176.

3- الركابي ، فراس علي احمد . (2008). تأثير مستخلصات النمو الخضري لبعض الأدغال على الفطريات الممرضة لجذور الطماطة وعلى فطر المقاومة الاحيائية *Trichoderma harzianum* Rifai . رسالة ماجستير .كلية الزراعة . .جامعة الكوفة .

4- العيساوي ، ذياب عبد الواحد فرحان. (2006). عزل وتشخيص بعض الفطريات المرافقة لمرض موت بادرات وتعفن جذور الرقي ومقاومتها بالطرق الإحيائية والكيميائية . رسالة ماجستير . الكلية التقنية . المسيب .

5- المشهدي ، خلود عبد المجيد محمد جعفر . (2011). الفعالية الحياتية لبعض المستخلصات النباتية والعامل الإحيائي Pseudomonas fluorescens على البكتريا Erwinia carotovora المسبب لمرض التعفن الطري على البطاطا . رسالة ماجستير . الكلية التقنية- المسيب .

6- حسون ، إبراهيم خليل. (2005). المكافحة البايولوجية والكيميائية لمسبب تقرح ساق البطاطا Rhizoctonia solani Kuhn . أطروحة دكتورا . كلية الزراعة . جامعة بغداد .

7- كريم ، طارق عبد السادة.(2000). فعالية مستخلصات البراعم الزهرية للقرنفل ضد مسببي مرض سقوط البادرات Pythium aphanidermatum (Edson) Fitzpatrick و Rhizoctonia solani Kuhn على الخيار. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد.

8- هاشم ، عبدالكريم جاسم و وصال هشام علي ومهدي ضمد القيسي . (2008) . التأثير التثبيطي للمستخلص الزيتي لنبات القرفة (Cinnamomum zeylanicum) في نمو وانتاج الأفلاتوكسين B1 من للفطر Aspergillus flavus المجلة العراقية للعلوم . مجلد 49 . عدد1 : 74- 85 .

9- Abdolmaleki M , Salari M , Bahraminejad S , Panjeke N , Abbasi S .(2008) . Antifungal effects of *Cinnamomum zeylanicum* extract on growth of *Rhizoctonia solani* , *Phytophthora drechsleri* , *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris sorokiniana* . plant pathol .44:255- 261.

10-Agrios, G.N.(1997). Pant Pathology. 4th Edn., Academic Press, San Diego, CA. USA., Pages: 635.

11-Ann, Y.C.(2012) . Rhizobacteria of pepper (Piper nigrum) and their antifungal activities . African Journal of Microbiology Research Vol. 6(19), pp. 4185-4193, 23 May .

12-Anne, E.D.; Patrick, E.L. and Dennis, R.M.(2002). Rhizoctonia Damping-off and stem rot of Soybean. Ohio state University extension fact sheet plant pathology .

13-Behdani , M. ; M. Pooyan and S. Abbasi .(2012) . Evaluation of Antifungal Activity of some medicinal plants essential oils against Botrytis cinerea, causal agent of postharvest apple rot, in vitro . Int. J. Agri. And Crop Sci. Vol., 4 (14), 1012-1016 .

14-Bolkan, H.H.; and E.E. Butler.(1974). Studies on Heterokaryosis virulence of Rhizoctonia solani. Phytopathology. 64: 513 – 522.

15-Bosland, P.W. and D.L. Lindsey.(1991). A Seedling screen for Phytophthora root rot of pepper, Capsicum annum. Plant Dis. 75: 1048-1050.

16-Chan, S. (2000). Vegetable breeding (2nd Edition) Agricultural press. Asia. 257pp.

17-Chevalier, A. (2003). The Encyclopedia of Medicinal plants. Dorling Kindersley limited, London. pp.290. (in Arabic).

18-Clark, F.E.(1965). Agar-plats method for total microbial count. C. F: Black,1965. method of soil analysis part. 2. Publisher Madison Wisconson U.S.A. pp. 1572.

19-Collee, J.G.; A.G. Fraser; B.P. Marmion; and A. Simmons.(1996). Practical medical microbiology, 14th ed. Churchill Livingston, London.

20-Den Hond, F.; P. Groenewegen and N. M. Van Straalen .(2003) .Questions Around the Persistence of the Pesticide Problem. In : den Hond, F., Groenewegen P.and van Straalen N. M. (eds)Pesticides : Problems, Improvements, Alternatives. Chapter 1. Blackwell Science Ltd.

21-Dimkic , I. ; S. Zivkovic ; T. Beric ; Z. Ivanovic ; V. Gavnlovic ; S. tankovic and D. Fira . (2013) . Characterization and evaluation of two **Bacillus** strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi . Biological control 3 (65) : 312-321 .

22-Dugan, F.M(2006). The identification of fungi an illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature. u.s. department of agriculture . agricultural research service Washington State University Pullman .176 pp.

23-Egorove, N.S. (1985). Antibiotic a Scientific Approach. Mir Poblishers. Moscow .

24-Farage, R.S.; Daw, Z.Y.; Hewedi, F.M. and El-Baroty, G.S. (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spices essential oils. J. Food Prot., 52:665-667.

25-Foldes, T.; I. Banhegy; Z. Herpai; L. Varga; and J. Szigeti.(2000). Isolation of Bacillu strain from the rizosphere of cereal and Invitro screening for antagonism against phytopathogenic, Foodborne pathogenic and spoilage microorganism applied microbiology. 89: 840 – 846.

26-Hassan MN, Osborn AM, Hafeez FY (2010). Molecular and biochemical characterization of surfactin producing bacillus species antagonistic to colletotrichum falcatum went causing sugarcane red rot. Afr. J. Microbiol. Res., 4(20): 2137-2142 .

27-He, ZD., Qiao CF., Han QB., Cheng CL., Xu HX., Jiang RW., Pui-Hay BP., and Shaw PC.(2005). Authentication and quantitative analysis on the chemical profile of Cassia bark (cortex cinnamomi) by high pressure liquid chromatography. J. Agri. Food Chem. 53: 2424-2428.

28-Hernandez, M.; Lopez, R. ; abanal, R.M.; Darias. V; and Arias, A. (1994). Antimicrobial activity of Visnea mocanera leaf extracts. J. Ethnopharmacology. 41 : 115 – 119.

29-Kelaniyangoda, D. B. ; A. S A. , Salgadoe, S. J. B. A. Jayasekera. ; Sh. A. Khanzada; Sh M. Iqbal and A. Akram .(2011). In vitro efficacy of plant leaf extracts against Sclerotium rolfsii Saac. Mycopath., 4(1) : 51-53.

30-Khanzada, Sh. A., Sh M. Iqbal and A. Akram .(2006). In vitro efficacy of plant leaf extracts against Sclerotium rolfsii Saac. Mycopath., 4(1) : 51-53.

31-Khodakaramian , G. and N. Khodakaramian .(2012) . Management of ucumis sativus Leaf Blight Disease using Human Health Friendly and nvironmental Un-Pollutant Approach . International Conference on Applied athematics, Finance and Economics Dec. 28-29, 105 – 108 .

32-Krieg, N.R. ; J.G. Holt ; D. Bergg ; and P.H.A. Sneath.(1993). Bergey's manual of Systematic bacteriology (9th. ed.). Williams and Wilkins Company, Baltimore, USA.

33-Lacey, L.A. (1997). Manual of techniques in Insect pathology. Acad Press, NY, USA, p. 409.

34-Latha, P.; T. Anand; N. Ragupathi; V. Prakasam; and R. Samiyappan. (2009). Antimicrobialactivity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and zimmu leaf extract against Alternaria solani. Biological Control. 50: 85–93.

35-Lis-Balchin, M.; S. S.G.Hart Deans; and E. Eaglesham.(1996). Comparison of the pharmacological and antimicrobial action of commercial plant essential oils. Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants.4:69–86.

36-Lis-Balchin, W.; S.G. Denas; and S. Hart .(1997). A study of the variability of commercial peppermint oils using antimicrobial and pharmacological parameters. Medical Science Research. 25(3): 151– 152.

37-Lozovaya, V. V. ; A. V. Lygin ; O. V. Zernova ; S. Li ; J. M. Widholm and G. L. Hartman. (2006). Lignin degradation by Fusarium solani f. sp. glycines. Plant Dis. 9: 77-82.

38-Macfaddin, J. F.(2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. (3rd.ed.). Williams and Willkins Compony. USA., 912 pp.

39- Mandova, N. B., R. G. Orellana, J. D. Warther, J. E. Werely, S. R. Duthy, H. Finegerd and B. C. Weathington. 1980. Phytotoxins In Rhizoctonia solani, Isolation and Biological activity of m. Hydroxy and m. methoxy Phenylacetic acid. J. Agric. food.chem. 28: 71– 75.

40-Matar, S. M. ; S. A. El-Kazzaz; E. E. Wagih; A.I. El-Diwany; H. E. Moustafa; G. A. Abo-Zaid; H.E. Abd-Elsalam and E. E. Hafez. (2009). Antagonistic and Inhibitory Effect of Bacillus subtilis Against Certain Plant Pathogenic Fungi, I. Biotechnology, 8: 53-61.

41-Mcspadden-Gardener, B.B.(2004). Ecology of Bacillus and Panenibacillus spp. In agricultural sgstems. The American Phytopathological Society, 94: 1252-1258.

42-Moses, R. T.(2006). Biological and chemical control of fungal seedling disease of cowpea. University of Pretoria.

43-Papadopoulou, K.; Melton, R.E.; Leggett, M.; Daniels, M.J. and Osboum, A.E. (1999). Compromised disease resistance in saponin-deficient. Plant Biol., 96(22):12923-12928.

44- Parmeter, J.R.;and H.S.Whitney.1970. Taxinomyand nomenclature of the imperfect stage In:Rhizoctonia solani Biology and Pathology .(ed) J.R.Parmeter.University of California Barkely.LosAmgeless.7-19 pp.

45-Pelczar, M.J.; Chan, E.C. and Krieg, N.R.(1986). Microbiology (5th ed.). McGraw-Hill Book Co. New York.

46-Peng, D. ; S. Li ; C. Chen and M. Zhou . (2014) . Combined application of Bacillus subtilis NJ-18 with fungicides for control of sharp eyespot of wheat . Biologicall control 70 : 28- 34 .

47-Rasmussen, P.; H.Collins; and R.W.Smiley .(1989). Long term management effects on soil productivity and crop yields in semi-arid regions of eastern Oregon. Oreg. State Univ. Columbia Basin Agric. Res. Ctr., Stn. Bull. 675.

48-Seema, M., S. Reenivas, S. S., Rekha, N. D. and N. S. Deraki .(2011). In vitro studies of some plant extracts against Rhizoctonia solani Kuhn Infecting FCV tobacco in Karnataka Light Soil, Karnataka, India. Journal of Agricultural Technology vol.7(5): 1321-1329.

49-Shanon, E., and D. Cotter. (1992). Chile disease control. NMSU cooperative extension service guide H-219.

50-Shekhawat, P. S and Prasada.(1961). Antifungi properties of some plant extract inhibition of spore germination. Phytopath., 24:8000-8002.

51- Sid-Ahmed, A., M. Eziyyanl, Z. S. Perez, and M. Candela. 2003. Effect of chitin on biological control activity of Bacillus spp and Trichoderma harzianum
against root rot disease in pepper (Capsicum annium) plants. European Journal of plant pathology. 109: 633 – 637.

52-Stampor – Chrzan E.(2001). Antifungal activity of leaf and bark extracts on the growth and development of damping – off fungi and their practical utilization in protection of seedlings. Second European Allelopathy Symposium .

53-Taylor, R.J.; B.Salas; G.A.Secor; V.Rivera; and N.C.Gudmestad .(2002). Sensitivity of north american Isolates of Phytophthora erythroseptica and Pythium ultimum to mefonoxam (metalaxyl). Plant Disease. 86 : 797-802.

54-Tewari, J.P.(2001). Guide to commercial greenhouse sweet bell pepper production in Alberta. Agriculture and Rural Development, Government of Alberta .

55-Vance, C.P. ; T.K. Kirk and R. T. Sherwood. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance . Annu. Rev. Phytopathol. 18: 259-288 .

56-Wang , Y. ; J. Chang ; J.J. Morell ; C.M. Freitage and J.J.Karchesy. (2012). An integrated approach using Bacillus subtilis B26 and essential oils to limit fungal discoloration of wood . BioResources 7(3) , 3132 – 3141 .

57-Wise , C. ; L. Novitsky ; T. J. Avis .(2012) . Antifungal compounds from Bacillus subtilis strain CU12 . Phytopathology . 102 (1) .