------مجلة علوم الرافدين، المجلد 25، العدد 1، ص23-39، 2014------

المقاومة الحيوية لموت بادرات نبات الباميا باستخدام المبيدين الإحيائيين *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis*

نجوى بشير اللشي **عبير احمد محمود**

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

Email: Abeer_lecturer@yahoo.com **Email:**Najwab_2005@yahoo.com

(أستلم 2 / 1 / 2013 ؛ قُبل 29 / 4 / 2013)

الملخص

تم اختبار تأثير مستحضري المقاوم الحيوي البكتيري *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* في نمو الفطريات الممرضة *Macrophomina phaseolina*، *Rhizoctonia solani* و *Fusariun solani* المسببة لموت بادرات وتعفن جذور الباميا، أظهرت النتائج ان لكلا المستحضرين تاثيراً معنوياً في خفض نمو أقطار المستعمرات الفطرية والنسبة المئوية لتثبيط نموها وكان أعلاها لمستحضر البكتريا *P. fluorescens* مع الفطر *M. phaseolina* اذ بلغ 58.43 % وفي تجارب البيت الزجاجي حقق المستحضرين خفضاً معنوياً في النسبة المئوية لموت بادرات الباميا قبل وبعد ظهورها فوق سطح التربة وخاصة مع معاملة تلويث التربة بالفطر *F.solani* عند زراعة البذور المعاملة بمستحضر المقاوم الحيوي *P. fluorescens* اذ بلغت 17.79%. أما تأثير المستحضرين في معايير نمو نبات الباميا فقد أظهرا زيادة في طول المجموع الخضري والجذري مقارنة بالبذور غير المعاملة المزروعة في تربة ملوثة بالفطريات الممرضة فقط. كما أظهر كلاً منهما زيادة معنوية في الوزن الجاف للنبات بلغت أعلاها 0.016 غم في معاملة البكتريا *P.fluoresces* مع الفطر *F.solani*. وقد أظهرت جميع معاملات البذور بكل من المستحضرين *P.fluorescens* و *B.subtilis* زيادة معنوية كبيرة في نشاط انزيم البيروكسيديز مقارنة بالبذور غير المعاملة المزروعة في تربة ملوثة بالفطريات الممرضة كانت أعلاها عند زراعة البذور المعاملة بالبكتريا *P. fluorescens* ومزروعة في تربة ملوثة بالفطر *M. phaseolina* .

الكلمات الدالة: موت بادرات الباميا، المبيدات الاحيائية، بكتريا، *Pseudomonas fluorescens*، *Bacillus subtilis*.

Biological Control of Damping–off of Okra by the Biopesticides *Pseudomones fluorescens* and *Bacillus subtilis*

Najwa B. Al-Lashi **Abeer A. Mahmood**
Department of Biology
College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

In vitro studies were carried out on the effect of 2 bacterial biopesticide preparations, *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* on the growth of fungi *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina*, causing root rot of okra plants, results revealed a significant effect on reducing the growth of colony diameter and % inhibition with the highest effect noticed with *P. fluorescens* on the fungus *M. phaseolina* by 58.43%. The results of greenhouse experiments indicated that both bacterial preparations reduced the percentage of pre and post emergence damping off significantly especially when okra seeds were treated with *P. fluorescens* and planted in soil contaminated by *F. solani* (17.79%). Both biopesticides showed a significant increase in the length of shoot and root of okra plants as compared to the untreated seeds planted in contaminated soil. Also an increase in the dry weight of the plants with highest increase was noticed for *F. solani* reached 0.016 gm with the bacteria *P. fluorescens*. All seeds treated with *P. fluorescens* and *B. subtilis* preparations caused a significant increase in the peroxidase activity as compared to control with the highest increase noticed when seeds were treated with *P. fluorescens* and planted in *M. phaseolina* contaminated soil.

Keywords: Damping-off of Okra, Biopesticides, *Pseudomonas fluorescens, Bacillus subtilis.*

المقدمة

إن تفوق المواد الكيميائية في كفاءتها وسرعتها في مقاومة المرض على عوامل المقاومة الحيوية أمر مؤكد ناهيك عن تأثير الكيميائيات على صحة الإنسان والبيئة مما دعا الباحثين الى مناقشة الحاجة التدريجية للانتقال من الاعتماد الكلي على الطرق الكيميائية الى استخدام طرائق المقاومة الحيوية. وقد ركز (Deising *et al.*, 2008) على ظهور صفة المقاومة لدى الفطريات الممرضة للنبات في عدد من المحاصيل وتم اقتراح استخدام الطرائق الحيوية ومنها الأعداء الحيوية للمسببات الممرضة للنبات بديلاً آمناً للطرائق الكيميائية بسبب تنوعها وتعقد تداخلاتها والمسالك الايضية المتعددة (Kulkarni *et al.*, 2007). وتعد الميكروبات مخازن مذهلة للمركبات البايولوجية الفعالة (Mitchell *et al.*, 2008) وفي الوقت الحاضر يمكن

عمل مستحضرات من هذه العوامل الحيوية بوسائل بسيطة. يشتمل تحضير مستحضرات العوامل الإحيائية على وحدات تكاثرية حية مع مواد حاملة (مثل مواد خاملة، اومواد غذائية او تداخلاتها) لتجهيز المتطلبات المختلفة للعوامل الإحيائية في البيوت الزجاجية والحقل. وان العوامل الرئيسية التي تحدد نوع مستحضر العامل الإحيائي هي طبيعته فضلا" عن موقع تأثيره على المسبب المرضي المستهدف. وتعد المستحضرات الجافة والمستحضرات بشكل مساحيق المفضلة على المستحضرات السائلة لانها تحتوي على وحدات تكاثرية جافة علاوة على ميلها لمقاومة الظروف البيئة المتطرفة وكذلك بقائها مدة أطول وسهولة تخزينها (Kim and Hwang, 2007).

تستجيب النباتات الى عدد من المؤثرات الكيميائية التي تنتجها ميكروبات التربة المرتبطة بالنباتات والتربة وان مثل هذه المؤثرات ممكن ان تحفز دفاعات العائل النباتي او تكيفها من خلال تغيرات كيموحيوية التي تحفز المقاومة ضد الإصابة التي ستحدث من قبل المسببات المرضية كما ويلاحظ زيادة في نشاط أنزيم البيروكسديزالذي يرتبط ارتباطا طرديا مع المقاومة المستحثة في العائل ضد المسببات الممرضة خلال تعرضه لها وقد عرفت بعض أجناس البكتريا كعوامل محفزة لنمو النبات Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) ومنها *Bacillus*، *Rhizobium*، *Pseudomonas*، *Azospirillum* و*Azatobacter* وعادة تؤثر PGPR على نمو النبات بطريقة مباشرة وغير مباشرة وللتأثيرات غير المباشرة علاقة بإنتاجها مواد ايضية مثل المضادات الحيوية أو المواد المخلبية أو HCN والتي تعمل على خفض نمو المسببات الممرضة للنبات والكائنات الدقيقة الضارة بينما تشمل التأثيرات المباشرة قدرتها على تحفيز النبات من خلال اخذ العناصر الغذائية (Wahyudi *et al*., 2011). هدفت الدراسة إلى اختبار كفاءة مستحضرات المضادات الحيوية البكتيرية في مكافحة مرض موت بادرات الباميا وقدرتها في استحثاث المقاومة ضد المسببات الممرضة وتأثيرها في معايير النمو في النبات.

مواد وطرائق العمل

تأثير مستحضرات المضادات الحيوية البكتيرية في نمو الفطريات الممرضة مختبريا

اتبعت طريقة الدجيلي (2008) في اختبار تأثير مستحضرات المضادات الحيوية البكتيرية والتي تم الحصول عليها من أ.د. علي كريم الطائي / كلية الزراعة والغابات والمتحصل عليها من مشروع التسميد العضوي من وزارة الزراعة العراقية لغرض تقييم كفاءتها بوصفها مضادات حيوية ضد الفطريات الممرضة للنبات والتي تشمل كل من المستحضر البكتيري *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* وتم اختبار فاعليتهما ضد الفطريات الممرضة المسببة لتعفن جذور الباميا والتي سبق عزلها من نباتات باميا مصابة واشتملت كل من الفطريات *Macrophomina phaseolina* و *Rhizoctonia solani* و *Fusarium solani* وتم إضافة 0.1 غم من كل مستحضر على حدا الى 10 مل ماء مقطر معقم موضوعة في انبوبة

محكمة الغلق ثم حضر الوسط الزرعي Potato Sucarose Agar (P.S.A) وصب في اطباق بتري زجاجية معقمة بقطر 8.5 سم وبواسطة ماصة معقمة أخذ 0.1 مل من الانبوبة الحاوية على مستحضر المبيد الحيوي المذاب بالماء المقطر المعقم ونشر بوساطة لوب معقم بشكل خط في منتصف الطبق وترك لمدة 10 دقائق بعدها اخذ قرصين من كل قطر من الفطريات الممرضة المنمى مسبقا على وسط P.S.A وبعمر خمسة ايام ووضع كل قرص على جهة من الطـبق وتركت المنطقة الفاصلة بين القرصـين4 سم موضوع فيها المبيد الحيوي، واستخدمت 3 اطباق لكل مبيد حيوي ولكل من الفطريات الممرضة. حضنت الأطباق على درجة $\mp 25^{\circ}$ م ولمدة سبعة ايام حسب نمو الفطريات الممرضة. أما معاملة المقارنة فقد استخدم ماء مقطر معقم بدل المبيد الحيوي وبعدها تم حساب قطر المستعمرات الفطرية وحساب النسبة المئوية للتثبيط حسب المعادلة التالية :

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

تجارب البيت الزجاجي:

تم تهيئة البيت الزجاجي التابع لقسم علوم الحياة في كلية العلوم/جامعة الموصل، وعقمت البذور سطحيا بمحلول هايبوكلورايت الصوديوم (1%NaOCl) لمدة 3 دقائق ثم غسلت بالماء المقطر المعقم وجففت بعدها بواسطة ورق ترشيح معقم. وجرى اختبار مبدئي لحيوية البذور بزراعة 100 بذرة منها على اوراق ترشيح معقمة ومرطبة بماء مقطر معقم في أطباق بتري معقمة ووضعت في الحاضنة عند درجة حرارة 25 مئوية وحسبت نسبة الانبات بعد مرور ستة أيام من زراعة البذور وقد اعتبرت البذرة نابتة بعد ظهور الرويشة والجذير (ISTA, 1976) عقمت التربة بجهاز المؤصدة لمدة ساعة واحدة في درجة حرارة 121° سيليزية وضغط 15 باوند/ نج^2 ووضعت التربة المعقمة في سنادين بلاستيكية سعة 1 كغم ونفذت المعاملات التالية:

1- زراعة البذور في تربة ملوثة بالفطر *M. phaseolina* .

2- معاملة البذور بالمبيد الحيوي *P. fluorescens* وزراعتها في تربة ملوثة بالفطر *M.phaseolina*.

3- زراعة البذور في تربة ملوثة بالفطر *R. solani*.

4- معاملة البذور بالمبيد الحيوي *P. fluorescens* وزراعتها في تربة ملوثة بالفطر *R. solani*.

5- زراعة البذور في تربة ملوثة بـ *F. solani*.

6- معاملة البذور بالمبيد الحيوي *P. fluorescens* وزراعتها في تربة ملوثة بالفطر*F. solani*.

7- معاملة البذور بالمبيد الحيوي *B. subtilis* وزراعتها في تربة ملوثة بـ *M. phaseolina*.

8- معاملة البذور بالمبيد الحيوي *B. subtilis* وزراعتها في تربة ملوثة ب ـ *R. solani*.

9- معاملة البذور بالمبيد الحيوي *B. subtilis* وزراعتها في تربة ملوثة بـ *F. solani*.

10- زراعة بذور غير معاملة في تربة معقمة (غير ملوثة).

11- زراعة بذور معاملة بالمبيد الحيوي *P. fluorescens* في تربة معقمة.

12- زراعة بذور معاملة بالمبيد الحيوي *B. subtilis* في تربة معقمة.

لوثت التربة المعقمة بالفطريات الممرضة *M. phaseolina* و*R. Solain*و*F.solani* كل على حدا وبواقع 4/1 طبق/ كغم تربة بعد تقطيعه بخلاط كهربائي مع كمية مناسبة من الماء المقطر المعقم وخلطه مع التربة بشكل متجانس وسقيت التربة بالماء لمدة 5 ايام قبل الزراعة (Lo *et al.*, 1998).

عومات بذور الباميا صنف محلي بأخذ 1غم من المستحضرين البكتيريين *Pseudomonas* و*Bacillus* كل على حدا واذيب في 100مل ماء مقطر معقم مع اضافة صمغ الزانثان بنسبة 2 % كمادة لاصقة في طبق وخلطت بذور الباميا المعقمة سطحيا" مع هذا الخليط مع ضمان تغطية كاملة للبذور لمدة 3 ساعات. جففت البذور لمدة نصف ساعة على الهواء ثم زرعت مباشرة في التربة (Morsy *et al.*,2009). أما معاملة المقارنة تربة ملوثة فقط وتربة معقمة فقط فقد عومات بذورها بالماء المقطر المعقم فقط. زرعت بذور الباميا وبواقع 15 بذرة/ سندانة وثلاث مكررات / معاملة وبعد مرور اسبوعين تم حساب النسبة المئوية للاصابة بموت البادرات قبل وبعد ظهورها فوق سطح التربة وبعد 4 أسابيع من الزراعة تم حساب شدة الاصابة بتعفن الجذور تبعا لطريقة Wheeler (1970) والمكونة من 4 درجات وهي 0= بادرات سليمة 1 = بادرات حية ولكنها مصابة بتعفن الجذور 2 = موت بادرات قبل الظهور 3 = موت بادرات بعد الظهور وتم حساب شدة الاصابة حسب المعادلة التالية :

$$\text{شدة الإصابة} = \frac{\text{مجموع عدد البادرات} \times \text{درجتها}}{\text{العدد الكلي للبادرات} \times \text{أعلى درجة}}$$

تقدير فعالية أنزيم البيروكسديز:

قلعت خمسة بادرات من كل معاملة بعد مرور 10 أيام من الزراعة واخذ 1غم من جذور بادرات كل معاملة بعد تنظيفها بالماء الجاري ثم سحقت الجذور مع 2 مل من دارئ الفوسفات ذي الاس الهيدروجيني 7 في هاون خزفي وحفظت في انابيب الاختبار سعة 10مل ثم خضعت الانابيب الحاوية على خليط انسجة الجذور والمحلول الدارئ الى عملية انتباذ بسرعة 3000 دورة/ دقيقة وحفظ الجزء الطافي في درجة حرارة 0^0م لحين قياس فعالية الانزيم. تم قياس فعالية انزيم البيروكسديز حسب اختبار كوايكول Guaiacol (Howell *et al.*, 2000). يشمل الاختبار تحضير مكونات مزيج التفاعل المكون من:

1- محلول الكوايكول بتركيز 0.05 مولاري والمحضر من تخفيف 1.1 مل من كوايكول في 250 مل ماء مقطر.
2- محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 0.02 مولاري حضر بتخفيف 0.56 مل بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 30% في 50 مل ماء مقطر يحضر آنيا.
3- محلول دارئ Tris حضر بإذابة 1.211غم من مادة Tris مع 14.11 غم كلوريد الصوديوم NaCL مذابة في الماء المقطر ثم اكمل الحجم بالماء المقطر الى 250 مل للحصول على تركيز 0.04 مولاري لمحلول Tris و1 مولاري كلوريد الصوديوم NaCL. استخدم حامض الهيدروكلوريك HCL عياري لتعديل الاس الهيدروجيني من 9 الى7.5.
4- مزيج التفاعل: خلطت المحاليل من 1-3 مع الماء المقطر بنسبة 7:1:1:1 على التوالي للحصول على مزيج التفاعل قيست فعالية الانزيم باستخدام المطياف الضوئي Spectrophotometer وذلك بوضع خليط مكون من 3 مل من مزيج التفاعل و0.2 مل من مستخلص الجذور الخام في خلية الجهاز ومتابعة التغيير الحاصل في امتصاص الضوء عند الطول الموجي (420) نانوميتر وتم تعيير الجهاز باستخدام مزيج التفاعل بدون مستخلص الجذور (Whitakar and Berhard, 1972). وتم تسجيل التغيير الحاصل في امتصاص الضوء عند الطول الموجي 420 نانوميتر في درجة حرارة 30^0 سيليزية. أخذت النتائج بتسجيل القراءة لثلاثة مكررات من كل معاملة وتم حساب فعالية الانزيم من المعادلة التالية.

$$\text{فعالية الأنزيم / دقيقة/ غم نسيج رطب} = \frac{3 \times \Delta أ}{\Delta ن}$$

حيث Δ أ = التغير في امتصاص الضوء، Δ ن = المدة الزمنية المستغرقة للتغير في الامتصاص.

النتائج و المناقشة

تأثير المبيدات الحيوية *P.fluorescens* و *B.subtilis* في اقطار مستعمرات الفطريات وعلى النسبة المئوية لتثبيط نموها:

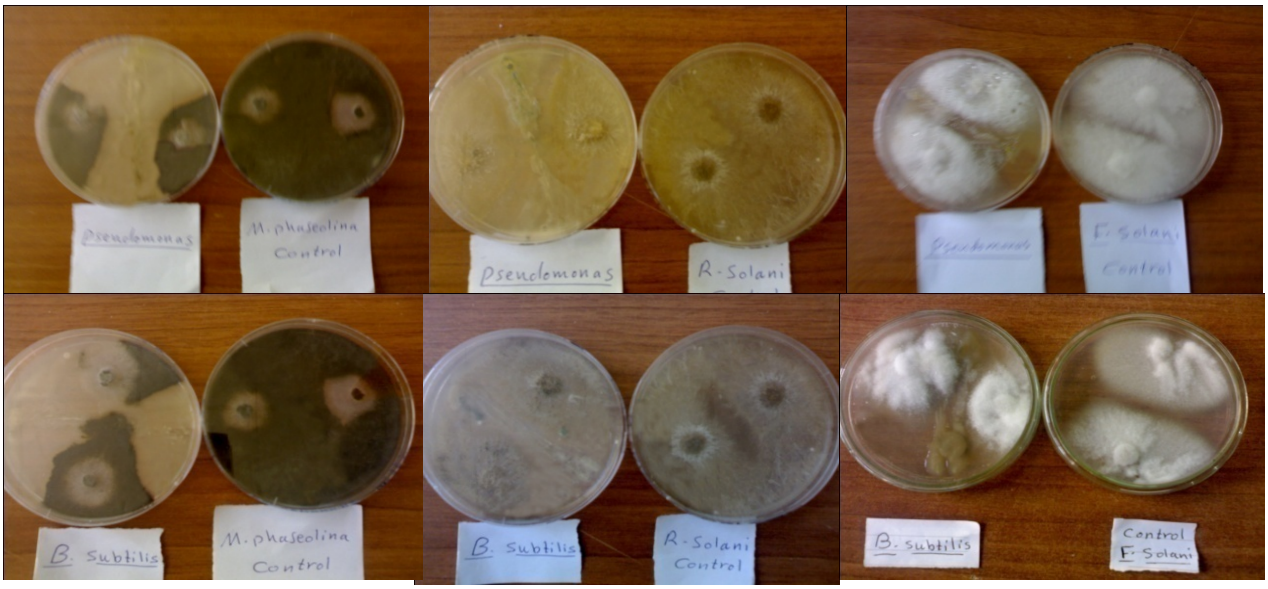
تشير النتائج الواردة في الجدول (1) والشكل (1) ان لمستحضرات المبيدات الحيوية المختبرة تأثيراً معنوياً في تثبيط الفطريات الممرضة المسببة لتعفن جذور الباميا نسبة للمقارنة (بدون إضافة المبيد الحيوي). ويلاحظ أن لمستحضر المبيد *P. fluorescens* تاثيراً عالياً في نمو الفطريات الممرضة مقارنة بالمبيد *B.subtilis* وقد ظهر أعلى تأثير في نمو الفطر *M. phaseolina* اذ بلغت نسبة التثبيط 58.43% في حين لم يختلف تاثير المبيد الحيوي على الفطرين *R.solani* و *F.solani* معنوياً اذ بلغت نسبة التثبيط 47.44 و 48.05 % على التوالي. أما بالنسبة للمضاد *B. subtilis* فان تاثيره على الفطريات الممرضة كان أقل نسبياً

وخاصة على الفطرين *M. phaseolina* و*R. solani* واللذين لم يختلفا معنوياً عن بعضهما في حين كان له تاثيراً أكبر على الفطر *F. solani* اذ بلغت نسبة التثبيط 53.33% ويرجع التاثير التثبيطي لكلا المستحضرين الى انتاجهما العديد من المواد الايضية المضادة للفطريات الممرضة فمثلا *P. fluorescens* ينتج مواد ايضية مختلفة بضمنها diacetylphloroglucinol –2,4 و pyrrolnitrin, إضافة الى معقد phenazine-1- carboxylic acid Marcorcyclic lectone 2,3- de- epoxy-3,3- didehydrarhizexin والتي تثبط نمو الفطريات الممرضة، وقد وجد ان Pyrrolnitrin فعال ضد الفطريات *Rhizoctonia* و *Fusariun spp.* وفطريات اخرى ممرضة للنبات واستخدم بوصفه مركباً يدخل في تطوير المبيد الفطري الزراعي Phenyl pyrrole (Ligon *et al*., 2000).

الجدول 1: تأثير المضادين الحيويين *P. flourescens* و *B. subtilis* في اقطار مستعمرات الفطريات وعلى النسبة المئوية لتثبيط نموها*

المضادات الحيوية	الفطريات الممرضة	قطر المستعمرة(سم)	النسب المئوية للتثبيط
P. fluorescens	*M. phaseolina*	3.53 D	58.43 A
	R. solani	4.46C	47.44 BC
	F. solani	4.43C	48.05 BC
	المقارنة	8.50 A	00.00 E
B.subtilis	*M. phaseolina*	4.63 BC	43.13 CD
	R. solani	5.30 B	53. 33 AB
	F. solani	3.96CD	53.33 AB
	المقارنة	8.50 A	00.00 E

*المتوسطات التي تحمل حروفا متشابهة لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن المتعدد المدى والمستوى احتمال 5%.



(أ) (ب) (جـ)

الشكل 1: تأثير المبيدين الاحيائيين *P. fluorescens* و *B. subtilis* في اقطار مستعمرات الفطريات الممرضة : أ- *M. phaseolina* ب - *R. solani* جـ - *F. solani*

وتوصل Srivastava and Shalini (2009) الى إمكانية استخدام رواشح عزلات البكتريا *P. fluorescens* بوصفه عامل كفوء في المكافحة الحيوية لبعض الفطريات الممرضة للنبات مثل *Alternaria cajani* و *Curvularia iunata* و *Fusarium sp.* و *Bipolaris sp.* و *Helminthosporium sp.* بتراكيز 1000 و 2000 و 3000 و 4000 و 5000 مايكروغرام/ مل ادى الى تثبيط نمو الفطريات مختبرياً وقد تم تثبيط أعلى انبات لابواغ الفطريات عند تركيز 4000 و 5000 مايكروغرام/ مل. كما لاحظ Schnider *et al.*, (2000) وجود بعض المواد الايضية المفرزة من قبل البكتريا *P. fluorescens* والتي تزيد من قدرة البكتريا على مقاومة الإمراض التي تسببها فطريات التربة وتعرف هذه المادة بـ 2,4 - diacetyl phloroglucinol (2.4-DAPG) اما آلية تأثير المبيد الحيوي *B. subtilis* في المقاومة الحيوية للفطريات المسببة لإمراض النبات يكون عن طريق انتاج المضادات الحيوية التي تفرز خارج خلاياها مثل إنزيم hydrolase وهيدروكابونات متطايرة وهي المسؤولة عن تثبيط نمو المسببات المرضية. ومن المعروف ان *B. subtilis* ينتج اكثر من 66 نوع من المضادات الحيوية معظمها ببتيدات ومن هذه المضادات bacilysin و mycosubtilin و subtilin، bacillomycin، eumycin، neocidin، subsporin وغيرها (Tzeng *et al.*, 2006). وتوصل Cazorla *et al.*, (2007) إلى أن سلالات المقاوم الحيوي *B. subtilis* المعزولة من رايزوسفير اشجار الافوكادرو السليمة اثبتت كفاءة عالية في تثبيط نمو مختلف الفطريات الممرضة المستوطنة في التربة. واظهرت التحليلات ان المركبات المضادة التي تفرزها هذه

السلالات هي انزيمات hydrolytic مثل glucanaseProteases والمضادات Lipopeptides و Surfactin و Fengycin و/اوIturin ضد الفطر *F.oxysporum f. sp. radicis- Lycopersci*.

تأثير معاملة البذور بالمبيدين الحيويين *P.fluorescens* و *B.subtilis* في النسبة المئوية لموت بادرات الباميا وشدتها:

اظهر اختبار حيوية بذور الباميا (صنف محلي) حدوث نسبة انبات بلغت 98% ويلاحظ من نتائج جدول (2) ان زراعة بذور الباميا بدون معاملة في تربة ملوثة بالفطريات الممرضة كان لها الاثر الواضح في موت البادرات قبل وبعد ظهورها فوق سطح التربة. ولكن عند زراعة البذور المعاملة بمستحضرات المبيدات الاحيائية البكتيرية *P.fluorescens* و *B.subtilis* كان لها من الاهمية في خفض النسبة المئوية لموت البادرات وكان للمبيد الحيوي البكتيري *P.fluorescens* دوره المميز في خفض النسبة المئوية لموت البـادرات قبـل الظهور فعند تلويـث التربة بالفطـر *F.solani* وزراعة بـذور مـعاملة بمستحـضر *P.fluorescens* أدى إلى خفض نسبة موت البادرات بمقدار 17.79%.

الجدول 2: تأثير المبيدين الحيويين *P.fluorescens* و *B. subtilis* في النسبة المئوية لموت بادرات الباميا وشدتها*

معاملات التربة	معاملات البذور	موت البادرات قبل الظهور%	موت البادرات بعد الظهور%	النباتات الباقية (%)	شدة الإصابة
M. phaseolina	1- بذور غير معاملة 2- بذور معاملة بالمبيد *P. fluorescens* 3- بذور معاملة بالمبيد *B. subtilis*	38.00 BC 28.33 ED 33.33 CD	40.00 A 24.16 C 30.0 BC	22.00E 47.51bC 36.67CD	0.30 CD 0.25 EF 0.28 DE
R. solani	1- بذور غير معاملة 2- بذور معاملة بالمبيد *P. fluorescens* 3- بذور معاملة بالمبيد *B. subtilis*	32.15 CD 24.0 E 28.0 DE	26.60 CD 20.19 E 22.10 DE	41.25C 55.81A 49.90AB	0.43 A 0.33 BC 0.36 B
F. solani	1- بذور غير معاملة 2- بذور معاملة بالمبيد *P. fluorescens* 3- بذور معاملة بالمبيد *B. subtilis*	52.12 A 34.33 BC 40.0 B	35.23AB 25. 00CDE 30.00BC	12.63F 40.67 30.00D	0.30 CD 0.22 F 0.25 EF
المتوسطات	1- بذور غير معاملة بـالمبيد 2- بذور معاملة بالمبيد *P. fluorescens* 3- بذور معاملة بالمبيد *B. subtilis.*	40.75 A 28.88 C 33.77 B	33.94 A 23.36 C 27.36 B	25.31DE 47.76B 38.87C	0.343A 0.266B 0.296B
تربة معقمة	1- بذور غير معاملة بـالمبيد 2- بذور معاملة بالمبيد *P. fluorescens* 3- بذور معاملة بالمبيد *B. subtilis*	0.00F 0.00F 0.00F	0.00F 0.00F 0.00F	100G 100G 100G	0.00 F 0.00 F 0.00 F

*المتوسطات التي تحمل حروفا متشابهة لاتختلف معنويا حسب اختبار دنكن المتعدد الحدود ولمستوى احتمال 5%.

اما بالنسبة لموت البادرات بعد الظهور فقد ادت المعاملة بالمستحضر الى خفض النسبة في معاملة الفطر *M. phaseolina* بمقدار 15.84% وكان للمبيد الحيوي دوره في خفض شدة الإصابة بنسب مختلفة تبعا للمعاملات وكانت معاملة *R. solani* اكثرها خفضا بلغت 0.10. ولم يختلف دور مستحضر المقاوم الحيوي *B.subtilis* عن سابقه في خفض تعداد الفطريات الممرضة ولكن بنسبة أقل من المستحضر السابق فقد حقق أعلى خفضاً في موت البادرات قبل الظهور في معاملة الفطر *F.solani* بمـقدار 12.12% يليه معـاملة *M. phaseolina* ثم معاملة *R. solani* اذ بلغت 4.67 و 4.15 % على التوالي. وتحققت أعلى نسبة لموت البادرات بعد الظهور مع معاملة الفطر *M. phaseolina* اذ بلغت نسبة الخفض 10% يليه *F.solani* ثم *R.solani* على التوالي. وكذلك الحال مع شدة الإصابة اذ سببت المعاملة بالمستحضر خفضا معنوياً نسبة للمقارنة وكان اكثرها خفض لمعاملة الفطر *R.solani* بلغت 0.07. وقد لوحظت اعلى نسبة من النباتات الباقية (السليمة) في البذور المعاملة بالبكتريا *P. fluorescens* يليها *B. subtilis* نسبة للبذور غير المعاملة المزروعة في تربة ملوثة بالفطريات الممرضة. وجاءت نتائجنا مطابقة لعدد من الباحثين حيث توصل Akhtar *et al*., (2010) الى ان تلويث التربة بالفطر*F.oxysporum* ادى الى حدوث ذبول للنباتات وخفض نمو النبات وعند معاملة البذور بمستحضر المقاوم البكتيري *Bacillus pumilus* مع بكتريا *Pseudomonas alcaligenes* ادى الى خفض نسبة وشدة المرض بالذبول الفيوزارمي وادى الى تحسين نمو النباتات الملقحة بالفطر *F.oxysporum*. وهذه النتائج ربما تأتي بسبب التضاد المباشر للمسببات المرضية او إنتاج المضادات الحيوية التي يفرزها كل من المبيدين الحيويين حيث يفرز *B. subtilis* عدد من المضادات الحيوية مثل Bulbiformin و Fungocin و iturin و bacillocin وbacilysin و mycobillin بالإضافة Zwittermicin وهذا المركب عبارة عن aminoglycoside وأعطت هذه المضادات الحيوية المنقاة كبحاً للمرض وثبطت تطور الفطريات البيضية عن طريق تقزم أنابيب إنباتها وتشويهها (Tzeng *et al*., 2006). تنتج البكتريا *B.subtilis* أكثر من 66 نوعاً من المضادات الحيوية معظمها ببتيدات حلقية ذات وزن جزيئي 270 -4500 دالتن وكذلك تفرز خارج خلاياها hydrolase وهيدوركربونات متطايرة وهي المسؤولة عن تثبيط نمو المسببات المرضية وكذلك التنافس مع المسببات المرضية على المغذيات الضرورية. وقد عرفت أنواع *Bacillus* بقدرتها على خفض شدة مرض الذبول في النباتات المـلقحة بالفطر *F.oxysporum* بسبب استحثاث المقاومة ضـد الفطـر الممرض ولوحـظ ان *B.subtilis* أدت ايضاً الى خفض نسبة الاصابة بتعفن جذور الحمص المتسبب عن الفطر *M. phaseolina* (Akhtar and Siddiqui, 2008).

وقد أثبتت التجارب الحقلية التي اجريت في ولاية وسكنسن زيادة قدرها 13.4 -13.9 % في حاصل فول الصويا عند استخدام بكتريا *Bacillus* كعامل مقاومة حيوية في معاملة البذور حيث أدى الى زيادة نسبة انبات البذور وبزوغ البادرات وزيادة استيطان الرايزوبيوم المفيدة وفي نفس الوقت ثبط نمو الفطر *F. solani* $AG_4R.$ وأحدث زيادةً ملحوظـةً في حاصـل الإنتـاج وتحسينـاً في مواصفـات

النبـات (Tzeng *et al*., 2006). كما استخدم Ben Slimenei *et al*., (2012) سلالة محلية لبكتريا *B. subtilis* عزلت من تربة تونس لمقاومة الفطر *Phoma medicaginis* المسبب لموت بادرات الجت وعند تنمية الخلايا لمدة 24 ساعة على وسط minimal medium اعطى رائق مزارع الابواغ ضعفي التاثير التثبيطي للفطر الممرض مقارنة بالخلايا الخضرية وأنتجت البكتريا كلاً من المضادات Iturin وSurfactins و Fengycins فضلاً عن أحماض دهنية طويلة السلسلة ومركبات اخرى لم يتم تشخيصها وقد أثبتت كلٌ من الخلايا الخضرية والأبواغ كفاءة عالية في تثبيط إنبات الأبواغ الكونيدية للفطر. وبين Killani *et al*., (2011) ان بكتريا *Bacillus* المستعملة تعد مستحضراً حيوياً تجارياً طبيعياً ممكن ان يستخدم كبديل للمبيدات الكيمائية لستراتيجيات مكافحة أمراض اللوبيا المتسبب عن *F. equiseti* و *F. verticilloides* و *R. solani* والمسببات المرضية الأخرى. اما بكتريا *Pseudomonas* فهي أيضا تعد عاملاً واعداً في المكافحة الحيوية اذ تمتلك *P. putida* WCS 358 فعالية ضد الفطر *F. oxysporum* لقدرتها المخلبية على جذب الحديد عن طريق إفرازها لمادة مخلبية *pyoverdin type* تدعى *Pseudobactin* 358 كما ان *P . fluorescence* هي احدى العوامل المحفزة لنمو النباتات لاستخدامها آليات كفوءة في ايقاف المرض وتنتج عدة مواد ايضية سامة للمسبب المرضي. وقد لوحظت الفعالية المضـادة لانواع بكتريـا .*Pseudomonas* spp في المحيط الجذري وعرفت بوصفها عاملاً رئيسياً في إيقاف نمو العديد من المسببات المرضية للنبات وشخص العديد من المواد الشبيهة بالمضادات الحياتية مثل bacteriocins و phenazine، ووجود بعض المواد الايضية المفرزة من بكتريا *P. fluorescens* والتي تزيد من قدرتها في مقاومة الامراض التي تسببها فطريات التربة وتعرف هذه المادة 2,4– diacetyl phloroglucinol (2,4- APG) (Schnider *et al*., 2000).

تأثير المبيدين الحيويين *P. flourescens* و *B. subtilis* في معايير النمو لبادرات نبات الباميا:

من نتائج التحليل الإحصائي لجدول (3) يلاحظ زيادة في معايير نمو نبات الباميا بما فيها طول المجموع الخضري والجذري والوزن الجاف عند معاملة البذور بمستحضر كل من نوعي المقاوم الحيوي *P.fluorescens* و *B.subtilis* نسبة للمقارنة (تربة ملوثة بالفطريات فقط). وكذلك يلاحظ أن جميع المعاملات المتضمنة تربة ملوثة بالفطر المسبب للمرض ادت الى اختزال معنوي في جميع مواصفات النبات مقارنة مع المعاملات المتضمنة معاملة بذور الباميا بمستحضر المقاوم الحيوي البكتيري *P.fluorescens* حققت زيادة في طول المجموع الخضري والجذري ولم تختلف المعاملات معنوياً عن بعضها وانعكس هذا على الوزن الجاف للنبات اذ سببت معاملة البذور بالمستحضر زيادة معنوية واعلاها مع معاملة التربة بالفطر *F. solani* بلغت 0.016 غم يليها معاملة *M. Phaseolina* ثم *F. solani* اذ بلغت 0.013 و0.010 غم على التوالي.

وكذلك الحال مع مستحضر المبيد الحيوي *B. subtilis* اذ أدت معاملة البذور بالمبيد الى زيادة معايير النمو المختلفة نسبة للمقارنة (بذور غير معاملة في تربة ملوثة) بما فيها طول المجموع الخضري والجذري والوزن الجاف واعلى زيادة كانت في معاملة التربة بالفطر *M. Phaseolina* بلغت (1.46) سم يليها معاملتي *F. solani* و *R. solani* بلغت 1.22 سم و0.67 غم على التوالي ورافقها زيادة في طول المجموع الجذري واعلاها مع معاملة الفطر*F. solani* 1.33 سم. أما الوزن الجاف فأعلاه كان مع معاملة التربة بالفطر *F. solani* والبذور بالمستحضر بلغت 0.010 غم أما معاملات المقارنة المتضمنة تربة معقمة فقط فقد تفوقت بصورة ملحوظة في معايير النمو مقارنة مع التربة الملوثة فقط اذ بلغت الزيادة في طول المجموع الخضري والجذري والوزن الجاف 4.23 سم و 3.80 سم و 1.015غم على التوالي. أما معاملة التربة المعقمة المتضمنة زراعة البذور المعاملة بمستحضر المقاوم الحيوي *P.fluorescens* فقد حققت زيادة ملحوظة في معايير النمو من حيث طول المجموع الخضري والجذري والوزن الجاف نسبة لمعاملة التربة المعقمة فقط بلغت 4.23 سم و3.13 سم و 0.210 غم على التوالي في حين حـقق المقاوم الحيوي *B. subtilis* زيادة مقدارها 1.83 سم و 1.37 سم و 0.173 سم على التوالي.

الجدول 3: تأثير المضادين الحيويين *P.fluorescens* و *B. subtilis* في معايير النمو لبادرات نبات الباميا*

معاملات التربة	معاملات البذور	طول المجموع الخضري (سم)	طول المجموع الجذري (سم)	الوزن الجاف للنبات (غم)
M. phaseolina	1- بذور غير معاملة	10.30 DE	7.40 DE	0.075 D
	2- بذور معاملة بالمبيد *P. fluorescens*	13.50 BCD	9.36 CD	0.088 C
	3- بذور معاملة بالمبيد *B. subtilis*	11.76 CDE	8.60 DE	0.080 D
R. solani	1- بذور غير معاملة	9.33 E	6.20 E	0.045 D
	2- بذور معاملة بالمبيد *P. fluorescens*	10.66 CDE	7.83 DE	0.055 D
	3- بذور معاملة بالمبيد *B. subtilis*	10.0 E	6.83 DE	0.051 D
F. solani	1- بذور غير معاملة	9.54 E	7.00 DE	0.052 D
	2- بذور معاملة بالمبيد *P. fluorescens*	11.00 CDE	9.00 CD	0.068 D
	3-بذور معاملة بالمبيد *B. subtilis*	10.76 CDE	8.33 DE	0.062 D
المتوسطات	1- بذور غير معاملة بـالمبيد	9.72 C	6.86 C	0.057 C
	2- بذور معاملة بالمبيد *P. fluorescens*	11.72 A	8.73 A	0.070 A
	3-بذور معاملة بالمبيد *B. subtilis*.	10.84 B	7.92 B	0.064 B
تربة معقمة	1- بذور غير معاملة بـالمبيد	14.50 BC	11.20 BC	1.090 C
	2- بذور معاملة بالمبيد *P. fluorescens*	18.73 A	14.33 A	1.300 A
	3-بذور معاملة بالمبيد *B. subtilis*	16.33 AB	12.53 AB	1.263 AD

*المتوسطات التي تحمل حروفا متشابهة لاتختلف معنويا حسب اختبار دنكن المتعدد الحدود ولمستوى احتمال 5%.

مما سبق يتضح دور معاملة البذور بنوعي مستحضر المقاوم الحيوي اذ أدى الى خفض نسبة وشدة الاصابة بموت البادرات وكذلك تحسين مواصفات النباتات. وجاءت نتائجنا مطابقة لعددمن الباحثين حيث بين Elsorra *et al*., (2004) أن استخدام رواشح البكتريا الجذرية المحفزة لنمو النبات *B.amyloliquifaciens, B.subtilis* أظهرت فاعلية عالية في تحفيز نمو نباتات الذرة وذلك لانتاجها تراكيز عالية من هرمون IAA (Indole Acetic Acid). وتعرف أنواع *Bacillus spp* بإنتاجها انزيمات hydrolases تفرز خارج الخلايا من ضمنها انزيمات proteases التي تقوم بهضم البروتينات الى ببتيدات صغيرة كما ان انواع *B. subtilis* و *B.amyloliquifaciens* لها القدرة على انتاج phytic acid الذي يمتلك القدرة على اذابة الفوسفات بالتربة مما يساعد على تسهيل امتصاص النبات للفوسفات ويعمل على تحسين نمو النبات (Tzeng *et al*., 2006).

وأشار Hernandez- Suarez (2001) الى ان تلقيح بذور الطماطة صنف Floradade بكبسولات تحتوي على سلالة البكتريا *B.subtilis* المشخصة B_1 و J_1 و M_2 ولقحت ثانية بالمقاوم الحيوي في السنادين التي تم تلقيحها مسبقاً بالفطريات الممرضة *R. solani* و *F. oxysporum* حيث أظهرت النتائج حدوث خفض ملحوظ في نسبة وشدة الاصابة بالمرض كما أن استعمال المقاوم الحيوي أدى الى تحسين مواصفات النبات والحاصل من الثمار واستنتج بانها يمكن ان تكون عوامل حيوية كفوءة ضد المسببات المرضية المستوطنة في التربة ويمكن استخدامها كسماد حيوي فعال بسبب تحسينها لصفات النمو والحاصل من الثمار نسبة للمقارنة.

وتوصل Wahyudi *et al*., (2011) الى تشخيص 14 عزلة من *Pseudomonas* غير ممرضة للنبات تقوم بانتاج هرمون IAA وتعمل على تحفيز نمو النبات وتزيد من أعداد الجذور الجانبية وهناك (8) عزلات أظهرت نشاطا ملحوظاً في اذابة الفوسفات و 12 عزلة لها القدرة على انتاج المواد المخلبية و 6 عزلات لها القدرة على تحليل الكايتين و 3 عزلات أظهرت قدرة في تثبيط نمو الفطر *Fusarium oxysporum* بمستوى عال بينما اعطت العزلة 1و 2 مستوى عالي من التثبيط لنمو كل من الفطرين *Sclerotium rolfsii* و *R. solani*. ووجد Mubarik *et al*., (2010) أن بكتريا *Pseudomonas* الموجودة في المحيط الجذري تلعب دوراً هاماً في نمو النبات وصحته وأن هذا النوع من المجاميع البكتيرية معروفة جيداً بانه (PGPR) ويمتلك هذا النوع ثلاث خصائص على الاقل تمكنها من تحفيز نمو النبات وهي القدرة على التنافس لاستيطان الجذور وتحفيز نمو النبات وعوامل مكافحة حيوية وتعمل على تحفيز النبات بصورة مباشرة او غير مباشرة ففي الاولى تتضمن إنتاجها هرمون IAA وتحفيزها نمو النبات من خلال أخذ العناصر المغذية وانتاج المواد المخلبية واذابة الفوسفات واستطالة الجذور وتحليل المواد السامة اما بصورة غير مباشرة عن طريق انتاج مواد أيضية مثل المضادات الحيوية و HCN والتي تعمل على خفض نمو المسببات المرضية (Siddiqui, 2006).

تأثير المبيدين الحيويين *P.fluorescens* و *B.subtilis* في فعالية انزيم البيروكسديز لبادرات نبات الباميا:

من نتائج التحليل الإحصائي في الجدول (4) يتضح ان فعالية إنزيم البيروكسديز المحسوبة في انسجة جذور الباميا كانت اعلى من الأنسجة السليمة وهذا يدل على ان فعالية انزيم البيروكسديز مرتبطة طردياً مع المقاومة المستحثة في العائل ضد المسببات الممرضة خلال تعرضه لها كما يشارك في تحفيز انتاج الفايتوالكسينات من خلال أكسدة الفينولات وتحويلها الى مواد اكثر سمية للمسببات المرضية (Hassan *et al.*, 2007). ويلاحظ زيادة نشاط انزيم البيروكسديز في المعاملات التي عوملت بذورها بمستحضرات المقاوم الحيوي البكتيري *P.fluorescens* و *B.subtilis* ولكن تفوق الاول في فعالية انزيم البيروكسديز مقارنة بالمقاوم الثاني. كما أن أعلى نشاط للانزيم كان مع معاملة التربة بالفطر *M.phaseolina* وزراعة بذور معاملة بمستحضر المقاوم الحيوي *P.fluorescens* اذ بلغ 1.660 / دقيقة / غم وزن رطب يليه نفس المعاملة ولكن باستخدام المقاوم *B. subtilis*1.592/ دقيقة/ غم وزن رطب ولم تختلف معاملتي التربة الملوثة بالفطر *F.solani* والبذور المعاملة بكل من المستحضرين عن بعضهما معنويا 1.485 و 1.495/ دقيقة/ غم وزن رطب على التوالي. اما أقل نشاط لانزيم البيروكسديز كان مع معاملة التربة المعقمة فقط اذ بلغ 0.200 / دقيقة/ غم وزن رطب مقارنة بالتربة الملوثة فقط 0.370 /دقيقة/ غم وزن رطب ولكن ارتفع نشاط الانزيم مع معاملة البذور بالمستحضر *P. fluorescens* و *B. subtilis* كل على انفراد وزراعتها في تربة معقمة اذ بلغ 1.220 و 1.198/ دقيقة/ غم وزن رطب على التوالي.

الجدول 4: تأثير المبيدين الاحيائيين *P.fluorescens* و *B. subtilis* في فعالية انزيم البيروكسديز لبادرات نبات الباميا*

معاملات التربة	معاملات البذور	فعالية الانزيم دقيقة / غم وزن رطب
M. phaseolina	1- بذور غير معاملة 2- بذور معاملة بالمبيد *P. fluorescens* 3- بذور معاملة بالمبيد *B. subtilis*	0.370 G 1.660 A 1.592 B
R. solani	1- بذور غير معاملة 2- بذور معاملة بالمبيد *P. fluorescens* 3- بذور معاملة بالمبيد *B. subtilis*	0.320 H 1.530 C 1.422 E
F. solani	1- بذور غير معاملة 2- بذور معاملة بالمبيد *P. fluorescens* 3-بذور معاملة بالمبيد *B. subtilis*	0.350 GH 1.485 D 1.495 D
المتوسطات	1- بذور غير معاملة بـالمبيد 2- بذور معاملة بالمبيد *P. fluorescens* 3-بذور معاملة بالمبيد *B. subtilis*.	0.347C 1.558A 1.503B
تربة معقمة	1- بذور غير معاملة بـالمبيد 2- بذور معاملة بالمبيد *P. fluorescens* 3-بذور معاملة بالمبيد *B. subtilis*	0.200 I 1.220 F 1.198 F

*المتوسطات التي تحمل حروفا متشابهة لاتختلف معنويا حسب اختبار دنكن المتعدد الحدود ولمستوى احتمال 5%.

يتضح من ذلك أن معاملة البذور بمستحضرات المبيدات الحيوية البكتيرية كل على انفراد وزراعتها في تربة ملوثة بالفطريات الممرضة أدى الى خفض معنوي في نسبة وشدة الاصابة بالمرض. وان بعض العوامل الاحيائية تعمل تغييرات مستمرة في النبات يؤدي الى زيادة المقاومة المستحثة في العائل ضد المسببات الممرضة خلال تعرضه لها. وتقوم سلالات البكتريا PGPR بافراز عدد من المؤثرات الكيميائية في المقاومة الجهازية المستحثة عند التلقيح بهذه البكتريا ومن ضمنها حامض السالسليك، مواد مخلبية، مواد دهنية متعددة السكريات 2,3, butanediol ومواد متطايرة أخرى (Ongena *et al*., 2004). وأوضح Ryais *et al*., (1996) في تجربة اجريت على درنات البطاطا لوقايتها من مرض التعفن البني المتسبب عن بكتريا *Pseudomonas* solanocearum وذلك بمعاملتها بمستحضر المقاوم الحيوي *P. fluorescens* سلالة CHAO وهذه السلالة تنتج المادة المخلبية Pyaverdin والتي تحفز تراكم حامض السالسليك والذي بدوره يستحث البروتينات المقترنة بالمقاومة المستحثة. وأظهرت سلالات البكتريا الجذرية PGPR قدرة على تحفيز جينات المقاومة في النبات وان تلقيح اوراق نبات الفاصوليا بخلايا *P. fluorescens* ادى الى تحفيز تراكم Chaleone Synthesis (CHS) والكايتينيز وانزيم Lipoxygenase وزيادة في انزيم البيروكسديز فضلا عن زيادة مستوى Phenylalanine layase (PAL) والتي تعمل جميعا على استحثاث المقاومة في النبات وذكر أن عزلة *P. fluorescens* 374WCS تنتج حامض السالسليك بكميات ترتبط بالتراكيز الواطئة من الحديد وان زيادة أيون الحديديك خارجيا" يقلل من انتاج حامض السالسليك (Vidhyasekaran *et al*., 2004). وتوصل Kilian *et al*., (2000) الى أن بكتريا *B. subtilis* تستحث المقاومة عن طريق تحفيزها لجينات المقاومة وتحسينها لمواصفات النبات وربما بسبب إنتاجها لهرمونات السايتوكانينات والاوكسينات التي تساعد على تكوين مجموع جذري قوي والى تحسين نمو النبات مما يساعد على مقاومة المرض.

المصادر العربية

الدجيلي، ذكرى مهدي (2008). الذبول الفيوزارمي على بعض نباتات الزينة وطرائق مكافحته. رسالة ماجستير، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، الموصل، العراق.

المصادر الأجنبية

Akhtar, M.S.; Siddiqui, Z.A. (2008). Biocontrol of root rot disease complex of chickpea by *Glomus intraradices, Rlizobium* sp. And *Pseudomonasstracta. Crop Protect*., **27**, 410- 417.

Akhtar, M.S.; Shakeel, U.; Siddiqui, Z.A. (2010). Biocontrol of fusarium wilt by *Bacillus pumilus, Pseudomonas alcaligenes and Rhizobium* sp. On *lentil. Tur. J. Biol*., **34**, 1-7.

Ben Slimene, I.; Tabbene, O.; Djbali, N.; Coseite, P.; Schmitter, J.M.; Jauenne, T.; Urdaci, M.C.; Limam, F. (2012). Putative use of a *Bacillus subtilis* L 194 Strain for

biocontrol *Phomamedicaginis* in *Mediago truncatula* seedlings. *Res. Microbiol,* **163**(5), 388- 397.

Cazorla, F.M.; Romero; perez-Garcia, D.A.; Lugtenberg, B.J.; Vicente A.D.; Bloemberg, G. (2007). Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *J. Appl. Microbiolo.***103**, 1950- 1959.

Deising, H.B.; Reimann, S.; Pscholatis, F. (2008). Mechanisms and significance of fungicide resistance *Braz. J. Microbiol*., **39**(2), 286- 295.

Elsorra, E.I.; Bochow, H.; Ross, H.; Borriss, R. (2004). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. V1.Phytohormone –like action of culture filtrates prepared from plant growth – promoting *Bacillus amyloliquefacience* FzB24, FzB42 , Fz45 and *Bacillus subtilis* FzB37. *J. Pl. Dis. Protect*. **111**(6), 583- 597.

Hernandez-Suarez, M.; Hernandez-castillo, F.D.; Lirasaldivar, R.H.; Aguilar, N. (2011). Biocontrol of soil fungi in Tomato with Microencapsulates containing *Bacillus subtilis*. *Am. J. Agric. Biol. Sci.,* **6**(2), 189- 195.

Hassan, E.M.; Maggie,S.; Saieda, S.; El-Abbasi, I.H.; Mikhail, M.S. (2007). Changes in peroxidase activity due to resistance induced against faba bean chocolate spot disease. *Egypt. J. Phytopathol*., **35**, 35-48.

Howell, C.R.; Hanson, L.E.; Stipanovic, R.D.; Duckhaber L.S. (2000). Induction of Terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctoniasolani* seed treatment with *Trichoderma virens. Phytopathology*, **35**, 49- 60.

ISTA. (1976). "Proceeding of the Seed Testing Association". International Rules For Seed Testing ening, Netherlan. Wogening, Netherlands,**4**(1),18-21.

Kilian, M.; Steiner, U.; Krebs, B.; J. Unge, H.; Schmiede- Knecht, G.; Hain, R. (2000). FZ 1324 *Bacillus subtilis*- mode of action of a microbial agent enhancing plant Vitality. *P flanzenschutz- Nachrichten* Bayer, **53**, 72- 93.

Killani, A.S.; Abaidoo, R.C.; Akintokun, A.K.; Abiala, M.A. (2011). Antagonistic effect of indigenous *Bacillus subtillis* on root/ soil borne Fungal pathogens of cowea. *Researcher*, **3**(3), 11.

Kim, B.S.; Hwang, B.K. (2007). Microbial fungicides in the control of plant disease. *Phytopathology*, **155**, 641- 653.

Kulkarni, M.; Chaudhari, R.; Chaudhari, A. (2007). Novel tension- active microbial compounds for biocontrol applications. In: General concepts in integrated pest and disease management (eds. A .ciancio and K.G. Mukerji). *Springer*, 295- 304.

Ligon, J.M.; Hill, D.S.; Hammer, P.E.; Turkewitz, N.R.; Hofmann, D.; Kempf, H.J.; Vanpee, K.H.. (2000). Natural products with antifungal activity for Psendomonas biocontrol bacteria. *PestManagement Sci.*, **56**, 688- 695.

Lo, C.T.; Nelsson, E.B.; Hayes, C.K.; Harman G.E. (1998). Ecological studies of transformed *T. harzianum* strain 1295- 22 in the rhizosphere and on Phyl – Loplane of creeping bentgrass. *Phytopathology*, **88**, 129- 136.

Mitchell, A.M.; Strobel, G.A; Hess, W.M.; vargas, P.N.; Ezra, D. (2008). Muscodor crispans, a novel endophyte from Ananas ananassoides in the Bolivian Amazon. *Fungal Diversity*. **31**, 37-43.

Morsy, E.M.; Abdel- Kawi, K.A.; Khalil, M.N.A. (2009). Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as *Biocontrol* agents against *Fusarium solani* on Tomato plants. *Egypt. J. Phytopathol*., **37**(1), 47- 57.

Mubarik, N.R.; Mahagiani, A.; Anindyaputri, S.; Santoso S.; Rusmana, I. (2010). Chitinolytic bacteria isolated from chili rhizosphere: chitinase characterization and its application as biocontrol for whitefly (*Bemisia Tabacci Genn*.). *Am. J. Agric. Biol*. *Sci.*, **5**, 430- 435.

Ongena, M.; Duby, F.; Rossignol, F.; Thonart, P. (2004). Stimulation of the Lipoxygenase pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a nonpathogenic Pseudomonas strain. *Mol. Plant- Microb. Interact*. **17**, 1009- 1018.

Ryais, J.A.; Neuenschwander, U.H.; Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **8**, 1809- 1819.

Schnider, K.U.; Seemater, A.; Maurhofer, M.; Duffy, B. (2000). Auto inducation of 2, 4- diacetyl- phloro glucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *J. Bacteriol*., **18**, 1215- 1225.

Siddiqui, Z.A. (2006). "PGPR: Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens". In Siddiqui, Z.A. (ed): PGPR: Biocontrol and Biofertilization. pp. 111- 142, Springer, the Netherlands, 2006.

Srivastava, R.; Shalini, K. (2009). Antifungal activity of *Pseudomonas fluorescens* against different plant pathogenic fungi. Intern. *J. Microbiol*., **7**(2), 1937.

Tzeng, D.D.; Taichung, T.W.; Huang, W.D. (2006). Method for preparing a composition containing *Bacillus subtilis* WG6- 14 and related use- United states, patent Application publication: US 2008/ 0152684 AI, Issued patent US 7632493, 15 Dec. 2009.

Vidhyasekaran, P. (2004). "Concise Encyclopedia of Plant Pathology Food Products". press® and the Haworth Reference press, imprints of the Haworth press, Inc., Binghamton. N.Y., 619 p.

Wahyudi, A.T.; Astui, R.I.; Giyanto, (2011). Screening *Pseudomonas* spp. Isolated from rhizosphere of soybean plant as plant growth promoter and biocontrol agent. *Am. J. Agric. Biol*. *Sci*., **6**(1), 134-141.

Wheeler, B.E.J. (1970). "An Introduction to Plant Disease". John Wiley and Sons. Ltd. London, New York, Sydney, Toronto, 374 p.

Whitakar, J.R.; Berhard, B.A. (1972). "Experiments for an Introduction to Enzymology". The Whbier Press. Davis, Calif . 420p.