تقييم كفاءة البكتريا *Bacillus subtilis* في مقاومة مسبب مرض تعفن بذور و موت بادرات الطماطة المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani* .

احمد فاضل عبد　　سلمان شبيب عاكول　　عامر عباس حسين
المعهد التقني / كوفة

الخلاصة :

هَدَفَتْ هذه الدراسة الى تقييم كفاءة البكتريا *Bacillus subtilis* في مقاومة مرض تعفن بذور و موت بادرات الطماطة المتسبب عن الفطر *Rhizoctonia solani*. في حقول المعهد التقني الكوفه2012-2013، أظهرت نتائج تجربة التضاد تأثير البكتريا *B. subtilis* معنويا في خفض معدل النمو ألشعاعي للفطر الممرض، إذ بلغ معدل النمو للفطر**19.65 ملم** بوجود البكتريا واختلفت بفارق معنوي عن معاملة المقارنة التي بلغ معدلها **60.00 ملم** حيث وصلت نسبة التثبيط الى 67.25% .كذلك و فرت البكتريا *B. subtilis* حماية جيدة لبذور و بادرات الطماطة من الإصابة بالفطر الممرض ، حيث لوحظ آن لزيادة التركيز بالبكتريا *B. subtilis* لمقاومة الفطر *R. solani* كان واضحا بشكل كبير حيث كانت البذور الميتة عند تركيز 5% 20 بذره والبادرات المصابة 65 بادره أما عند التركيز 20% فكان للبذور 2 بذره والبادرات 7 بادرات عند تغطية البذور بالبكتريا ، أما عند أضافه البكتريا للتربة فكانت البذور الميتة عند تركيز 5% 72 بذره أما البادرات المصابة فكانت7 بادرات. لوحظ أيضا آن هناك فروق معنوية كبيرة جدا بين طرق الإضافة المختلفة حيث آن تغطية البذور بالبكتريا لحمايتها من الفطر *R.solani* كان أكثر تأثيرا عما لو أضيفت البكتريا إلى التربة مباشرا لحمايتها من الفطر،حيث كانت عند التركيز 20% للبذور الميتة 2 بذره والبادرات المصابة 7 بادرات، آما عند تلويث التربة بالبكتريا لحمايتها من الفطر عند تركيز 20% للبذور الميتة 19 بذره وللبادرات المصابة 26 بادره .

Evaluation the efficiency of the bacteria *Bacillus subtilis* to control seeds rot and seedling death disease of tomato caused by fungus *Rhizoctonia solani*.

Abstract :

The aim of this study was to evaluate the efficiency of *Bacillus subtilis* on control to tomato seed decay and seedling death caused by *Rhizoctonia solani* Antagonism experiment revealed a significant effect of *B. subtilis* on reduction in the mean of radial growth of fungus , the radial growth was 19.65mm in present of Bactria , these were significantly different with control treatment that produced mean growth of 60.00 mm ,the inhibition rate was 67.25% . The bacteria produced good protection to seeds and seedling of tomato from the infection of this fungus **.**We noted that increase the concentration of the bacteria *B. subtilis* to control fungus *R. solani* was a significant, where the seeds rot at a concentration 5% ,20 and seedling infected 65 but at a concentration 20% was for seeds 2 and seedling 7 when cover seeds with bacteria, but when add bacteria to the soil were seeds rot at a concentration of 5% 72 and the infected seedling was 7. It

ISSN 2072-3875

was also showed that there are significant differences between different added as the cover seeds with bacteria to protect it from fungus *R. solani* was more significant than if added bacteria to the soil directly to protection from the fungus, where it was at a concentration 20% the seeds rot 2 and seedling infected 7, and when contaminate bacteria with soil to protect seeds from fungus at a concentration 20% the rotten seeds were 19 and seedlings infected 26.

المقدمة :

تعـد الطماطـة (***Lycopersicon esculentum*** **Mill.**) مـن محاصـيل الخضـر المهمـة اقتصـاديا فـي العـالم وذلـك لقيمتهـا الغذائيـة العاليـة ولتعـدد طـرق اسـتعمالها حيـث تـدخل فـي شـتى أنـواع المأكولات التي يتناولها الإنسان وتشكل الجزء الأكبر من المساحة المخصصة لزراعة الخضر في العراق (مطلوب وآخرون ، 1981) وأن هـذا التوسـع رافقه الكثيـر مـن المشـاكل، أهمهـا الآفـات الزراعيـة، ومنهـا مـرض سـقوط البـادرات damping- off مـرض يسببه الفطـر *Rhizoctonia solani* Kuhn أحـد أكثـر الأمـراضِ الواسـعة الانتشـار لنبـات الطماطـة وخاصـــة بالنســـبة للمشـــاتل(Papadopdoulos ، 1991) والبيـوت المحميـة (Latorre، 2004) ويسـبب خسـائر كبيـرة للمـــحصولِ تحـت الظـروف البيئيـة المناسبة (Rini و Sulochana ، 2007) ويعتبر من أهم مسببات أمراض تعفن البذور وموت البـادرات فـي العـراق [البهـادلي،وآخرون 1988]. الآمـر الـذي اسـتوجب اسـتعمال المبيـدات الكيمياويـه للتقليل من أضرار الآفات وزيادة الإنتاج متناسين أن الإفـراط فـي اسـتعمالُ المبيـداتِ الكيميائيـةِ الحشـرية والفطرية تؤدي إلى تلوثِ التربةِ وتأثيرات ضارّة على صحة الإنسان والبيئة [Montealegre ، وآخرون 2003] ، (Horinouchia، وآخرون 2008) و (Minuto، وآخرون، 2006) . وهذا أدى إلى ظهور حملات مناهضة من قبل الباحثين والمختصين بشؤون البيئـة والصـحة ، أتاحـت الفرصـة إلـى طـرح طـرق مقاومـة بديلـة عـن المبيـدات آلا وهـي المقاومـة الإحيائيـة ، وخاصـة استخدام الفطريـات آو البكتريـا لمقاومة الأمراض المحمولة بالتربة soil- diseases borne .

تعتبـر البكتريـا *Bacillus Subtilis* موجبـة لصبغة كرام و تتواجد بشكل كبير في التربـة والمـاء و الهـواء ومخلفـات النباتـات المتحللـة (Madigan و Martinko ، 2005) ويكـون مسـتوى تواجـدها بالتربـة 10^6- 10^7\ غـرام تربـة وان 60-100% مـن البكتريـا التـي تتواجـد بالتربـة تكـون بشـكل سـبورات داخليـة غيـر نشـطة (Alexander ، 1977) . ولهـا القابليـة علـى تكـوين سـبورات سـابحة وهـذا يسـاعدها على الانتقـال بشـكل سـريع بالتربـة، وتنـتج مـدى واسـع مـن مضـادات البكتريـا والفطريـات وطيـف واسـع مـن Lipopeptides مثـــل Surfactin ويشـــمل (lichenysins وpumilacidins) (Peypoux ، وآخـرون 1999) و Fengycin ويشـمل (plipastatins) (Vanittanakom، وآخـــــرون 1968) و Iturin ويشـــمل (mycosubtilins و Bacilomycins) (Peypoux ، وآخرون 1978) .

أشــارا كـل مـن (Emmert و Handelsman ، 1999) الـى أن استخدام البكتريـا *B. subtilis* كعامل مقاومة لبعض مسببات الأمراض الفطرية اقل كلفة من بـاقي الأحيـاء التـي لا تكـون مرحلـة مقاومـة للظـروف البيئية(السـبورات الداخليـة). وهـذه التراكيـب تكـون مقاومـة للجفـاف والحـرارة والأشـعة فـوق البنفسـجية والمذيبات العضوية وعلية تعتبـر مـن عوامـل المقاومـة المرشـحة بنجـاح لاسـتخدامها فـي مقاومـة العديـد مـن الأمـراض النباتيـة وخاصـة طريقـة تغطيـة البـذور (Rhodes ، 1990) ،أما الفطر *R. solani* فلَـهُ مدى مضيّقِ واسع جداً (Anne ، وآخرون 2002) ولا توجد أصناف مقاومةِ للطماطـة ضدّ هذا المرضِ كُـلّ أصـناف الطماطـة سـريعة التـأثير وحساسـة لهـذا الفطـر ، لكن درجـةَ التـأثّر تَتفـاوتُ. يعيش الفطـرِ فـي التربـةِ بهيئـة غـزل فطـري نشـط ويمكن آن يبقـى فـي التربة لمدة طويلة فضلا عن تكوينه الأجسام الحجريـة القـادرة علـى البقـاء فـي التربـة لفتـرة طويلـة (علـي وآخرون، 2006) وتعد هذه التراكيب مصدر للإصابة الأولية ثم ينتقل الفطر بعد ذلك عن طريق ماءِ الرَيِّ, ويكون الانتشار عن طريق الأوراق .

ISSN 2072-3875

الأطباق في الحاضنة تحت درجة حرارة 30 م ولمدة 48ساعة تم عزل المستعمرات المنفردة ونُقلت إلى أطباق أخرى حاوية على وسط PDA وذلك بطريقة التخطيط ثم جرى تنقية البكتيريا مرة أخرى حتى تم الحصول على مزارع نقية. تم التعرف على ***B. subtilis*** بالشكل وتركيب السبورات استنادا إلى(Anonymous ، 1984) وبعد استخدام الاختبارات التالية، شكل الخلايا وحركتها و صبغه كرام ، وردود الفعل مع الجلوكوز السكروز واللاكتوز (Buchanan و Gibbons ، 1974) .

تم إكثار البكتريا بتلقيح مجموعة من الدوارق سعة 1000 مل تحوي الوسط الغذائي Potato dextrose Broth ب 5 أقراص بقطر 10ملم بثاقبة فلين معقمة من البكتريا النامية على الوسط الغذائي PDA ونميت على درجة حرارة 30° م ولمدة أسبوعان (Lin ، وآخرون ، 2011) ، خزن السائل الذي تم الحصول عليه في الحاضنة لحين الاستخدام لأجراء الدراسات ألمختبريه والحقلية حضرت مجموعة من التخافيف منه لغرض اختبار النشاط الإحيائي للبكتريا إذ حضرت التراكيز التالية : 5% - 10%- 15% -20% آما معامله المقارنة Control فكانت عبارة عن الوسط الغذائي المعقم فقط.

تحضير البذور:

جرى تعقيم بذور الطماطة صنف سوبر مريموند سطحيا بمحلول هايبوكلوريد الصوديوم 5% لمده 10 دقائق بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم لمده 5 دقائق ثم تركت لتجف على ورق الترشيح .تم نقع بذور الطماطة لمدة ساعتين في التركيز المستخدم ثم جففت على ورق الترشيح وزرعت.

التجربة الأولى:اختبار القدرة التضادية بين البكتريا *B. subtilis* والمسبب المرضي *R. solani* :

أجريت التجربة لدراسة العلاقة التضادية بين الفطر الممرض *R. solani* والبكتريا *B. subtilis* باستخدام طريقة الزرع المزدوج (Dual Culture Technique) وذلك بأخذ قرص بقطر 5 مليمترٍ مِنْ حافة مزرعة *R. solani* بعمر 7 أيامٍ ووضع في مركز طبق يحوي على الوسط الغذائي PDA ، وضع على مسافة 6سم خط دائري بواسطة قطارة 1مل

يهدف البحث الى تَقييم كفاءة البكتريا *Bacillus subtilis* للسيطرةَ الحيويةَ ضدّ مسبب مرض سقوط البادرات لشتلاتِ الطماطةِ .

المواد وطرائق العمل :

عزل الفطر *Rhizoctonia solani* :

عُزل المسبب المرضي لسقوط البادرات مِنْ حقول الطماطة المُصَابةِ بآخذ أجزاء من جذور النباتات المصابة وتقطيعها إلى قطع صغيرة غُسلت تحت ماء جاري في دوارق زجاجية ثم بماء مقطر معقم في دوارق زجاجية معقمة وعقمت سطحياَ مَع 5 % هايبوكلوريد الصوديوم لمدة 5 دقائق ، ثم غُسلت بالماء المقطر المعقم لإزالة اثر المعقم ووضعت على ورق ترشيح لإزالة الماء منها بعدها وضعت الأنسجةُ المصابة في الوسط الغذائي PDA (Potato Dextrose Agar) الذي عقم في جهاز التعقيم البخاري عند درجه حرارة 121° م لمده 30 دقيقه وضغط 15 باوند\انج^{2} ،الأطباق حضنت على درجة حرارة (25 ±1°م) لمدّة 3 أيام المستعمرات النامية للفطر نُقلتَ إلى أطباق جديدةٍ للتنقيةِ والتشخيص. حيث تم التعرف على الفطر ***R.solani*** استنادا إلى الصفات التي ذكرها(Parmeter و Whitney 1970)

عزل البكتريا ***Bacillus subtilis***

تم عزل البكتريا من ترب الحقول الزراعية بطريقة التخفيف (Dilution Method) وحسب ما جاء بطريقة (Johnson و Curl 1972) إذ تم أخذ أربع عينات من مناطق مختلفة من تربة الحقل وزن كل عينة كيلوغرام واحد ومزجت العينات الأربع جيداً (عينة مركبة) داخل كيس معقم ثم نقلت إلى المختبر، وقسمت إلى أربعة أجزاء متساوية واستخدمت كمكررات لأغراض البحث .حيث علق 10 غم من التربة المذكورة في 90 مل ماء مقطر معقم في دورق مخروطي حجم 250 مل، وتم عمل سلسلة من التخافيف هي 10^{5} ، 10^{6} ، 10^{7} ، جرى حساب أعداد البكتريا بالتخفيف بـ معدل أعداد البكتريا\مل= عدد المستعمرات في كل طبق x مقلوب التخفيف (Clark، 1965) .أخذ 1 مل من كل تخفيف، ووضع في طبق بتري قطره 9 سم، (بمعدل ثلاث مكررات لكل تخفيف)وصب عليه وسط PDA ،بعد تصلبه وضعت

ISSN 2072-3875

المقارنة فقد وضع الوسط الغذائي دون بكتريا إلى التربة . التربة في كل الصناديق احتفظت بالرطوبة (السعه الحقلية 50%) ، أضيف لتربة الصناديق السماد المركب NPK وحسب النسبة الموصى بها لهذا المحصول (الهيئة العامة للتدريب والارشاد الزراعي ، وزارة الزراعة، 1991)، قلعت النباتات بعد 30 يوم . سجلت عدد البذور الميتة، وعدد البادرات المصابة . صممت التجربة بطريقه التصميم العشوائي الكامل بـ 3مكررات في كل معاملات التجربة استخدم اختبار اقل فرق معنوي LSDللمقارنة بين المتوسطات واختبار معنوية الفروق بينها لتحديد أفضلها (الراوي وخلف الله، 1980).

النتائج :

التجربة الأولى:اختبار القدرة التضادية للبكتريا *B. subtilis* والمسبب المرضي *R. solani* ك

لوحظ من الجدول 1 آن البكتريا ***B. subtilis*** لها قدرة تضاد عالية مع الفطر***R. solani*** لوحظ أيضا عدم وجود اتصال طبيعي بين البكتريا والفطر ووجود هالة في منطقة الالتقاء بينهما التي تعني وجود إفرازات سامة للبكتريا تطرحها في الوسط الغذائي لقتل الفطر(Ongena و Jacques ، 2008 و Nagorska، وآخرون 2007) وان البكتريا تقوم بإفراز مجموعة من المواد antifungal metabolites (Lipopeptides) مثل Surfactin وiturin A التي لها القابلية على التأثير على أغشية خلايا الممرض واختراقها وبالتالي تثبيط نموها (Carrillo، وآخرون 2003 و Ongena و Jacques ، 2008) . ومن ناحية أخرى لوحظ تغير في لون هايفات الفطر عند منطقة الاقتراب من البكتريا الذي هو عبارة عن تضخم السايتوبلازم للغزل الفطري وتشوهه عند الأطراف وهذا يتفق مع ما توصل إلية الباحثون (Bing Liu ،وآخرون 2010) . وان البكتريا تقوم بإفراز أنزيمات محللة لجدر خلايا المسبب المرضي(Shoda ، 2000) .

تركيز 20% من معلق البكتريا *B. subtilis* حضن الطبق على درجة حرارة (28 ±2 °م) و(12 ساعة ضوء\يوم) و(75% رطوبة) لمدّة 4 أيام سجل قطر نمو الفطرِ وقورن مع فطر المقارنة (فطر محاط بماء مقطر معقم) . استخدم ثلاث مكررات لكل معاملة . استخدمت معادلة(Abbot ، 1925) لحساب نسبة التثبيط للفطر.

% inhibition = C-T\C X100

C=Control T=Treatment

التجربة الثانية/ تأثير لقاح البكتريا *B. subtilis* على الفطر*R. solani* في التربة:

عقمت تربه رمليه مزيجيه في جهاز المؤصدة لمدة ساعة ،كرر التعقيم في اليوم التالي(ديوان وكمال الدين،2009) ووزعت على صناديق بلاستيكية معقمة (60 x40 x20 سم) (8000 غرام/ صندوق) أضيف لقاح الفطر (بذور الدخن المعقمة الحاملة للفطر) إلى التربة بنسبه 50 غرام بذور دخن/كغم تربه (Dewan ، 1989) آما معامله المقارنة فقد أضيفت إلى تربتها بذور دخن معقمه خاليه من الفطر خلط اللقاح الفطري بالتربة بشكل جيد بعدها رطبت التربة وتركت لعدة ساعات قبل الزراعة . بعد المعاملة اجري آلاتي:

أولاً: زرعت 100 بذرة من بذور الطماطة في كل صندوق (بعد نقعها بالتركيز(5% - 10%- 15% -20%) كلاً على حدا(3 مكررات لكل معامله). وزعت الصناديق عشوائيا في البيت البلاستيكي . قلعت النباتات بعد 30 يوم من الزراعة. سجلت عدد البذور الميتة، وعدد البادرات المصابة آما معاملة المقارنة فقد نقعت البذور فيه بالماء المقطر المعقم .

ثانياً: تمت إضافة اللقاح البكتيري إلى التربة مباشرة وحسب التركيز(5% - 10%- 15% -20%) كلا على انفراد في الصناديق وغطي بطبقة خفيفة من التربة ثم زرعت 100 بذرة من بذور الطماطة في كل صندوق (3 مكررات لكل معامله)، وزعت الصناديق عشوائيا في البيت البلاستيكي آما معامله

ISSN 2072-3875

جدول(1) القدرة التضادية للبكتريا *B. subtilis* ضد الفطر *R. solani*

	النمو القطري للفطر *R. solani*(مليمتر)	نسبة التثبيط %
B. subtilis+ *R.solani*	19.65ملم	67. 25
R.solai لوحدة Control	60.00ملم	صفر
LSD(0.05)	7.55	----

، وآخرون 1995) إلى أن زيادة الرطوبة وخاصة عند 82% تؤدي إلى زيادة مادة الSurfactin والتي تؤدي بالتالي إلى مقاومة الفطر الذي يزداد نشاطه أيضا بزيادة الرطوبة. وتعتبر الظروف البيئية الملائمة لإنبات البذور هي نفسها ملائمة لتطور المسبب المرضي *R.solani* وعلية تكون بادرات الطماطة حساسة جدا للمسبب المرضي وخاصة في المرحلة الأولى لنموها (Sneh ، 1996). لذا فالنمو السريع للمرض تحت ظروف البرد والرطوبة وغياب التنافس يمكن أن يسبب إصابة كبيرة وظهور الأعراض في عدة أيام على البادرات وقبل ترسيخ المقاوم في التربة لذلك يمكن مقاومة المرض بصورة كبيرة عند تعفير البذور بالبكتريا.فتعفير البذور يعطي حماية اكبر للبذور أثناء تطورها إلى بادرات.وهذا يتفق مع ما توصل آلية (Howell و Stipanovic، 1980) عند تغطية بذور القطن بالبكتريا *Pseudomonas fluorescens* لمكافحة المسبب المرضي *Pythium ultimum* المتسبب لمرض سقوط بادرات القطن. وهذا أيضا يتفق مع ما توصل آلية الباحثان(Jhooty وGrover، 1971) اللذان أكدا بان أعلى نسبة وشدة الإصابة التي يسببها الفطر *R.solani* على المحاصيل الزراعية تكون في الأسبوع الأول والثاني من الزراعة ، وتزداد المقاومة بتقدم العمر.إذا المطلوب هو حماية النبات بالأسبوعين الأوليين من عمرة وبعدها يستطيع النبات آن يقام الفطر بنسب مختلفة. آن عملية المقاومة تمت بواسطة إفراز مواد مثبطة ، عدم إصابة الجذور المتكونة الجديدة للبادرات يعني آن البكتريا تستطيع آن تنتشر مع الجذور النامية وتكون طبقة حيوية حولها عند نمو النبات وحتى عند معاملتها كتغطية للبذور (Bais ، وآخرون 2004 و Fall، وآخرون 2004) كما لوحظ أيضا أن جذور البادرات النامية بوجود المسبب

التجربة الثانية/ تأثير طرق إضافة مختلفة من لقاح البكتريا *B. subtilis* على الفطر *R.solani*

يلاحظ من الجدول2 آن لزيادة تركيز للبكتريا *B. subtilis* علاقة مع مقاومة الفطر *R. solani* حيث كانت البذور الميتة عند تركيز 5% 20 بذره والبادرات المصابة 65 بادره أما عند التركيز 20% فكان للبذور 2 بذره والبادرات 7 بادرات عند تغطية البذور بالبكتريا ، أما عند أضافه البكتريا للتربة فكانت البذور الميتة عند تركيز 5% 72 بذره أما البادرات المصابة فكانت7 بادرات. وهذا يعني آن زيادة تركيز البكتريا المستخدمة بالمقاومة تعطي نتائج اكبر فقد بينت النتائج آن هناك تدرج بالأعراض عند زيادة التركيز بالبكتريا نحو الانخفاض كلما زاد التركيز وهذا يتفق مع ما توصل آلية (Sabaratnam ، 1999 و Yitbarek، وآخرون 1988)الذي أكدا على آن وجود تركيز عالي من المسبب المرضي *Rhizoctonia solani* يؤدي إلى زيادة نسبة الإصابة بمرض تعفن و موت بادرات الطماطة والباحثين(Elizabeth و Handelsman 1999) الذين أشاروا إلى أن البكتريا يمكن آن يظهر تأثيرها بشكل اكبر كلما ازدادت نسبة تواجدها في التربة .

لوحظ أيضا آن هناك فروق معنوية كبيرة جدا بين طرق الإضافة المختلفة حيث آن تغطية البذور بالبكتريا لحمايتها من الفطر *R.solani* كان أكثر تأثيرا عما لو أضيفت البكتريا إلى التربة مباشرا لحمايتها من الفطر،حيث كانت عند التركيز 20% للبذور الميتة 2 والبادرات المصابة 7 ، آما عند تلويث التربة بالبكتريا لحمايتها من الفطر عند تركيز 20% للبذور الميتة 19 وللبادرات المصابة 26، ويعود ذلك لكون البكتريا تحمي البذور من الإصابة الأولية بالفطر لحين وصول النبات إلى مرحلة متقدمة من النمو يستطيع فيها آن يقاوم المرض. كما أشار(Ohno

ISSN 2072-3875

والذي يؤثر على الكثير من الأمراض الفطرية نتيجة تواجدها في منطقة الجذور ومنافستها للأمراض التي تهاجم جذور النبات (Anonymous ، 2002) .

المرضـي أظهـرت أعـراض الإصـابة وهـي تلـون الجذور بلون بني وتحللها، آما في الصناديق النامية مع الممرض والبكتريا فقد ظهرت الجذور للبادرات بعدم وجـود إصـابة آو أعـراض خفيفـة ويعـود السـبب أن البكتريا تنتج بعض المضادات الحيوية تسمى(Iturin)

جدول(2) يبين تأثير طرق الإضافة المختلفة للبكتريا *B. subtilis* على الفطر *R.solani*

1. تركيز البكتريا *Bacillus subtilis*	طرق التلويث بالبكتريا			
	2. معامله البذور		معامله التربة	
	البادرات المصابة	البذور الميتة	البادرات المصابة	البذور الميتة
%5	65	20	7	72
%10	27	12	32	37
%15	17	6	27	32
%20	7	2	26	19
Control(بدون بكتريا وفطر)	صفر	صفر	صفر	صفر
Control(مع الفطر فقط)	73	67	70	77
LSD(0,05)	5.1	2.00	10.1	8.9

المصادر:

البهادلي،علي حسين و هناء محمد الزحرون وناهده مهدي صالح.1988. مقاومة الفطر ***Rhizoctonia solani*** المسبب لمرض سقوط البادرات باستخدام المبيد Monceren .مجلة البحوثالزراعية والموارد المائية،المجلد 7. العدد1

الهيئة العامة للتدريب والارشاد الزراعي . وزارة الزراعة. 1991. توصيات حول استعمال الاسمدة الكيمياوية. سلسلة الارشاد الزراعي .

الراوي، خاشع محمود وعبد العزيز محمـد خلف الله، 1980. تصيم وتحليل التجارب الزراعيـة مؤسسه دار الكتب للطباعة والنشر. جامعه الموصل. 488 ص.

ديـوان ، مجيد متعـب و زاهـد نـوري كمـال الـدين2009.. تـأثير راشـحي الفطـرين *Aspergillus niger* و *Trichoderma harzianum* وخليطهما في حيوية الفطر *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* وفي نمو بادرات الطماطة. مجله الكوفة للعلوم الزراعية: 1 (1) 1-12 .

-مطلـوب ،عـدنان ناصـر وعـز الـدين سـلطان محمـد وكـريم صـالح عبـدول .1998.أنتـاج الخضـراوات، الجـزء الثاني،الطبعة الثانية المنقحة،مطبعة التعليم العالي.موصل، العراق.

علـي، بتـول زينـل ، حبيـب، خالـد عبد الـرزاق وتوفيـق ، محمد محسن.2006.علم الفطريـات. الطبعـة الأولـى مطبعـه جامعه بغداد. 103 صفحه

Abbott, W.S. 1925 . A method of computing the effectiveness of an insecticide . Journal of Economic Entomology.18: 265-267.

Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Microbiology. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Anne,E.D.,Pattrick,E.L.,& Dennis.R.M.2002.Rhizoctonia Damping-off & stem rot of soybean .Ohio State University extension fact plant pathology.

Anonymous. 2002. *Bacillus subtilis*. http://www.agrobiologicals.com.

ISSN 2072-3875

Anonymous, 1984. Berggey's Manual of Systematic Bacteriology. Amer Soc. J. Met. The Will and Wilk Co., Baltimore, USA.

Bais, H. P., Fall, R., and J. M. Vivanco.2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. *Plant Physiology*, Vol. 134, pp. 307–319

Bing Liu, Lili Huang , Heinrich Buchenauer and Zhensheng Kang .2010. Isolation and partial characterization of an antifungal protein from the endophytic *Bacillus subtilis* strain EDR4 Pesticide Biochemistry and Physiology 98 : 305–311.

Buchanan, R. E. & Gibbons, N. E., eds. 1974. Bergey's *Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md. 21202. xxvi + 1246 pp.

Carrillo, C., Teruel, J.A., Aranda, F.J., Ortiz, A., 2003. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes 1611, 91–97.

Clark, F. E. 1965. Agar-plate method for total microbial counts, pp. 1460-1466. (Cited From: Black, 1965. Method of soil analysis part. 2. Publisher Madison Wisconsin U.S. A. 1572 pp.).

-Dewan,M.M.1989**.**Identity & frequency of occurrence of fungi in root of wheat &ryegrass& their effect on take-all & host growth. Ph. D. Thesis . Univ .Wes.Australia . 201 pp.

Elizabeth, A.B. Emmert a;b, Jo Handelsman. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. FEMS Microbiology Letters 171 :1-9

Emmert,E.A.B,Handelsman,J.1999.Biocontrol of plant disease : a Gram positive perspective. FEMS MicrobiolLett171:1–

Fall, R., Kinsinger RF, Wheeler KA .2004. A simple method to isolate biofilm forming Bacillus subtilis and related species from plant roots. Systematic and Applied. Microbiology 27(3):29-37.

Holt, J. G, Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T., eds. 1994 . Bergey's manual of dedicative bacteriology, 9" Ed. Williams & Wilkins Maryland, ، USA. 605-623 pp .

Horinouchi,H. N. Katsuyama, Y. Taguchi, M. Hyakumachi,.2008.Control of Fusarium crown and root rot of tomato in a soil system by combination of a plant growth-promoting fungus, *Fusarium equiseti,* and biodegradable pots. Crop Protection 27; 859–864.

Howell, C. R., and Stipanovic. R. D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin . Phytopathology 70**:**712-715.

Jhooty , J.S. &Grover , R.K. 1971 . *Rhizoctonia* root rot of cucurbits &its control in Indian . Indian Phytopathology . 24:571-574.

ISSN 2072-3875

Jinantana, J. and Sariah. M. 1997. Antagonistic effect of Malaysian isolates of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* or *Sclerotium rolfsii* . pertanika ,J. Tropical Agriculture science. 20: 38-41.

Johnson, I.F. and Curl, E.A. 1972**.** Methods for research on ecology of soil-borne pathogens, Burgess Publ. Co. Minneapolis, 247.

Latorre, B. 2004 *Enfermedades de las plantas cultivadas*. Santiago; Ediciones Universidad Católica de Chile. 638 p. ISBN 956-14-0756-6.

Lin H.F, Chen T.H. and Liu S.D. 2011The antifungal mechanism of *Bacillus subtilis* against *Pestalotiopsis eugeniae* and its development for commercial applications against wax apple infection, African Journal of Microbiology Research 5(14) 1723-1728

Madigan, M. and J. Martinko, 2005. Brock Biology of Microorganisms. 11th Edn., Prentice Hall, New Jersey, USA.

Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L., 2006. Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. Crop Prot. 25, 468e475.

Nagorska, K., Bikowski, M., Obuchowski, M., 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of Bacillus subtilis as a powerful biocontrol agent. Acta Biochimica Polonica:54, 495–508.

Ohno, A., Ano, T. and Shoda, M. 1995. Effect of temperature on production of lipopeptides antibiotics, iturin A and surfactant by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation. *J. Ferment. Bioeng*., **80**, 517-519.

Ongena, M., Jacques, P., 2008. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology 16, 115–125.

Papadopoulos, **A.** P. 1991. Growing greenhouse tomatoes in soi1 and soilless media. Agriculture Canada Publication 1855/E.

Parameter, J.R. and Whitney, H.S., 1970. Taxonomy and Nomenclature of the Imperfect State of *Rhizoctonia solani* Biology and Pathology. Los Angles press, pp.7-10.

Peypoux, F.,Guinand, M.,Michel,G.,Delcambe,L.,Das, BC.,and E.Lederer1978 - Structure of iturin A, a peptide lipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **17,** 3992-3996.

Peypoux F., Bonmatin J. M., and Wallach J. 1999. Recent trends in

Rhodes,D.J.1990. Formulation requirements for biological control agents. Aspects of Applied Biology,.24:145-153.

Rini ,C.R., and K.K. Sulochana.2007. Usefulness of *Trichoderma* and *Pseudomonas* against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* infecting tomato. Journal of Tropical Agriculture 45 (1-2): 21–28.

Sabaratnam,S.1999. Biological control of of ***Rhizoctonia*** damping-off tomato with a rhizosphere actinomycete , Ph.D.thesis, University of Western Ontario London, Ontario ,

ISSN 2072-3875

Shoda, M. 2000.Bacterial control of plant diseases. J Biosci Bioeng 89, 515–521.

Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, **S.,** and Dijst. G., eds. 1996. *Rhizoctonia*

Species:Taxonomy , Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Academic Publishers. Kluwer, Boston, London. 578 p.

Vanittanakom N., Loeffler W., Koch U., and Jung G. 1986, Fengycin D anovel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. J. Antibiot. **39**, 888-901

Yitbarek, S.M., P.R. Verma, R.K. Gugel, and R.A.A. Morrall. 1988. Effect of soil temperature and inoculum density on pre-emergence damping-off of canola caused by *Rhizoctonia solani*. Can. J. Plant Pathol. 10: 93-98.

ISSN 2072-3875