القدرة التضادية لبعض عزلات من *Bacillus* spp. إزاء الكائن الممرض المسبب لمرض ذبول العدس الوعائي *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*

سعيد الحسن[1]، بسام بياعة[1]، ويلي إرسكين[2]، وكريس اكيم[2]

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة حلب، حلب، سورية؛ (2) المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا) ص ب 5466 حلب، سورية.

الملخص

الحسن، سعيد، بسام بياعة، ويلي ارسكين وكريس اكيم. 1997. القدرة التضادية لبعض عزلات من *Bacillus* spp. إزاء الكائن الممرض المسبب لمرض ذبول العدس الوعائي (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*). مجلة وقاية النبات العربية. 15(2):65-73.

أمكن تعريف 35 عزلة بكتيرية، تنتمي جميعها للجنس *Bacillus* spp.، وتتسم بنشاط تضادي للفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* تراوح ما بين 52-77 %. وقد تم اختبار العزلات الستة الأقوى، فرادى أو في توافيق ثنائية أو ثلاثية، في حماية مدخلين من العدس أحدهما حساس ("Precoz"-ILL 4605) والثاني متوسط الحساسية (ILL 7136) عند زراعتهما في حقل موبوء بمرض الذبول الوعائي. لم تؤثر معاملة البذور بالبكتيريا في نسبة الإنبات، ولكنها أثرت في معدل الذبول الذي قدر على أساس النسبة المئوية للنباتات الذابلة بعد 127 و 136 يوماً من الزراعة والذي أبدى تأثراً ما بين الأصل الوراثي والمعاملة بالكائن المضاد. لم تؤثر العزلات الستة في نمو ثلاث سلالات من بكتيريا العقد الجذرية (*Rhizobium leguminosarum*) المتخصصة على العدس، كما أنها لم تتأثر بتراكيز مختلفة من مبيدي بينوميل وثيابندازول وهما المبيدان الأكثر استخداماً في تعقيم بذار العدس، الأمر الذي يشير إلى إمكانية استخدامها بنجاح في المكافحة الأحيائية والمتكاملة لذبول العدس.

كلمات مفتاحية: المكافحة الأحيائية، ذبول العدس الوعائي، التضاد الحيوي، عدس.

المقدمة

يزرع العدس في أصقاع عديدة من العالم، وتعتبر منطقة الشرق الأوسط، وبخاصة سورية وتركيا وقبرص وفلسطين المحتلة، المناطق الرئيسة لنشأة هذا المحصول (4). وقد بلغت المساحة العالمية المزروعة عدساً عام 1996 حوالي 3389 ألف هكتار غلّت 2819 ألف طن (14). وتزدهر زراعته على نحو خاص في تركيا، الهند، إثيوبيا، سورية، ودول شمال إفريقيا. كما دخلت زراعته حديثاً إلى عدة دول أجنبية كالولايات المتحدة الأمريكية، كندا، نيوزيلانده، وأستراليا. وفي سورية، بلغت المساحة المزروعة به للموسم الزراعي 1996 حوالي 128 ألف هكتار أنتجت 152 ألف طن (14).

يتعرض المحصول أثناء مراحل نموه للإصابة بعدد من الآفات (8، 19) والأمراض (5، 8، 26). ويعتبر مرض الذبول الوعائي الذي يحدثه الفطر *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen f.sp. *lentis* أهم الأمراض وأخطرها، نظراً للخسائر الكبيرة التي يحدثها في الغلة والمواصفات النوعية للبذور والتي قد تصل في المناطق الموبوءة إلى 100% (1، 6 ، 15، 25، 26). وقد تم تسجيله حتى الآن في 22 دولة (8) من بينها القطر العربي السوري (6)؛ وأشار حنونيك إلى وجوده في القطر واعتبره من الأمراض الرئيسة التي تهاجم محصول العدس (18). وأشار بللار وكبابة، من خلال الحصر الذي أجرياه عام 1980/1979، إلى انتشاره في شمال وشرق سورية بنسبة وصلت إلى 41% وبمدى تراوح ما بين 2-60% (7). وكانت نسبة انتشاره في وسط وشمال سورية 9%، كما بلغت الخسارة في المحصول حوالي9% (2). ووجد بياعة وآخرون، خلال الحصر الذي أجروه عام 1986، أن فطر الذبول *Fusarium oxysporum* هو الفطر الرئيس المعزول من النباتات المصابة، وبينوا أن نسبة الإصابة به قد تراوحت ما بين 2 -70% بمعدل وسطي قدره 11.5% (6). ويبدو فعلاً أن مرض الذبول الوعائي للعدس هو المشكلة الرئيسة التي يعاني منها المحصول في جنوب سورية، حيث وصل متوسط نسبة الإصابة به إلى 12.34%، وأدى ذلك إلى انخفاض في مردود الهكتار الواحد قُدّر بـ 865 كغ/ هكتار (1). كما أشارت تقارير المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا) إلى أن المرض قد يحدث نقصاً في الإنتاج يقدر بـ 12% (21). وبينت دراسة حديثة أن المرض يحدث فقداً في الغلة يقدر بـ 112 كغ/هكتار أو 8.77% عند نسبة إصابة 10% (12).

تظهر أعراض المرض وفق مرحلتين من تطور النبات، ذبول البادرة الذي يكاد يكون محدوداً على العدس المزروع في

المناطق الدافئة، وذبول النباتات في الطور الإثماري- مرحلة الإزهار وتكوّن القرون (26). وفي سورية يظهر المرض بدءاً من الأسبوع الثاني من نيسان/أبريل وتشتد وطأته في نهاية الشهر ذاته وفي النصف الأول من أيار/مايو. وتُسهم درجة الحرارة السائدة، على نحو كبير، في ظهور أعراض المرض (13).

وتعتبر المكافحة الأحيائية إحدى الوسائل الفضلى والأكثر أماناً والأقل تلويثاً للبيئة للتصدي لهذا المرض (24).

أظهرت دراسة سابقة أن معاملة بذور العدس (*Lens culinaris* Medik.) بالكائن المضاد *Bacillus subtilis* (Ehrenberg.) Cohn تخفض عفن جذور العدس المتسبب عن *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. وتزيد من نسبة البادرات الحية عند زراعة البذور المعاملة في تربة مصابة (20). كما أفادت معاملة البذور بالكائن المضاد نفسه في مكافحة أنواع عديدة من المسببات المرضية تُربيّة المنشأ التي تصيب أشجار الفاكهة (23، 30، 31، 32، 35، 36، 38)، ونباتات الخضار (37، 39)، والمحاصيل الحقلية (27)، ونباتات الزينة (33) مما يشير إلى طيف عمل واسع لهذا الكائن. وتم تسجيل عدد من المضادات الحيوية الإضافية التي ينتجها الكائن *B. subtilis* وأعطيت أسماء مختلفة bacitracin، bacillin، bulbiformin، mycosubtilin، subtilin (11، 28، 34، 41).

وتهدف الدراسة الحالية، إلى اختبار القدرة التضادية لبعض عزلات محلية من *Bacillus* sp إزاء الكائن الممرض المسبب للذبول الوعائي على العدس *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lentis*.

مواد البحث وطرائقه

1. المادة النباتية

تم دراسة تأثير الكائنات البكتيرية المضادة لمرض الذبول الوعائي في أداء مدخلين من العدس (ILL 4605 "Precoz" و ILL 7136) يختلفان في مدى قابليتهما للإصابة بالفطر المسبب للذبول. حيث يعتبر الأول شديد الحساسية للمرض بينما يعتبر الثاني متوسط الحساسية له (22).

2. جمع عينات التربة

تم خلال الموسم الزراعي (1994-1995) جمع 31 عينة، زنة كل منها حوالي 1 كغ، من الطبقة السطحية للتربة من بعض المناطق الرئيسة لزراعة العدس في سورية.

3. المستنبتات الغذائية المستخدمة

استخدمت في التجارب المستنبتات التالية: مستنبت بطاطا ديكستروز أغار (PDA) ، مستنبت الآغار المغذي (NA)، مستنبت مالت مستخلص خميرة سكروز أغار (MYSA)، مستنبت Tryptic Soy Agar (TSA)، مستنبت مستخلص الخميرة مانيتول الصلب (YMA) والسائل (YMB).

4. عزل الفطر الممرض

عزل الفطر من 7 سم من منطقة الساق الواقعة فوق المنطقة التاجية مباشرة، ومن نباتات عدس مصابة تم جمعها من الحقل المريض A21 الواقع ضمن أراضي المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا) الذي تسود فيه العزلة رقم 31 والتي أظهرت اختبارات سابقة أنها الأكثر شراسة. وقد تم تعقيم هذه المنطقة بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 0.525% لمدة 5 دقائق. وقطعت إلى عشرة أجزاء، تم إعطاؤها أرقاما متسلسلة، بحيث يشير الرقم 1 للقطعة الأقرب لمنطقة التاج والرقم 10 للقطعة الأبعد من منطقة التاج. وزرعت القطع على سطح مستنبت غذائي (PDA) في أطباق بتري، على نحو متساتل، وحضنت الأطباق عند درجة حرارة 27±2° س وإضاءة مستمرة لمدة 76 ساعة. وأخذت نموات الفطر من القطع الأخيرة (رقم 9 و 10)، وتمت تنقيتها على المستنبت نفسه. وحضرت منها مستعمرة وحيدة البوغ بطريقة الأطباق المخففة، واستخدمت فيما بعد لتحضير اللقاح المستخدم في الإعداء الإصطناعي.

5. عزل الكائنات الدقيقة المضادة من التربة واختبار قدرتها التضادية إزاء فطرالذبول في المختبر

عزلت الكائنات الدقيقة من العينات الترابية التي جمعت من منطقة جو جذور العدس ومن مواقع مختلفة من القطر بعد مجانستها، وذلك باعتماد طريقة أطباق التخفيف لعد كائنات التربة، وقد اختير التخفيف 1000/1 بعد عدة تجارب مبدئية استخدمت فيها تخفيفات مختلفة.

تم تخطيط النموات البكتيرية للمستعمرات المنقاة، على سطح مستنبت PDA بشكل متصالب. ووضعت أقراص مغطاة بنموات الفطرالمسبب للذبول، قطرها 0.5 سم، أخذت من أطراف مستعمرة نشطة بعمر 7 أيام، وذلك في مركز القطع الأربعة التي حددتها النموات البكتيرية وفقا لطريقة Michael & Nelson (29).

حضنت الأطباق عند درجة حرارة 27±2° س، وإضاءة مستمرة، لمدة 7 أيام، وأخذت قياسات متوسط نصف القطر الكبير لمستعمرة فطر فيوزاريوم (الأبعد من المستعمرة عن مركز الطبق)، ومتوسط نصف القطر الصغير (الأقرب من المستعمرة الى مركز الطبق)، وتم حساب نسبة منع نمو مستعمرة الفطر المتشكلة وفق المعادلة المقترحة من قبل Fokkema (16):

$$\text{نسبة المنع} = \frac{r_2 - r_1}{r_1} \times 100$$

حيث : r_1 متوسط طول نصف القطر الأكبر، r_2 متوسط طول نصف القطر الأصغر

كما تم تلقيح دوارق مخروطية تحوي 100 مل من مستنبت مالت مستخلص خميرة سكروز (MYS) السائل بـ : (أ)- قرص قطره 0.5 سم مأخوذ من مستعمرة فيوزاريوم بعمر أسبوع . (ب)- نموات العزلات (ذات الأرقام 1، 9 ، 17، 21، 26 و 27) التي تملأ رأس الملقحة. (جـ)- قرص مغطى بنموات الفطر فيوزاريوم + نموات العزلات المختبرة.

وبعد تحضين الدوارق على رجاج كهربائي أفقي الحركة لمدة أسبوع عند درجة حرارة 27±2°س، رشحت محتوياتها على ورق ترشيح (Whatman 1). وجففت أوراق الترشيح بما عليها من نموات (فطر، بكتيريا و فطر+ بكتيريا) في فرن كهربائي عند درجة حرارة 75° س لمدة ساعة، كما وضعت ورقة ترشيح غير مستعملة ومرطبة بالمستنبت السائل نفسه في المجفف أيضاً لتحديد وزنها الجاف، وتم حساب متوسط الوزن الجاف (3 مكررات) للنموات في كل معاملة بوساطة ميزان حساس.

ولمعرفة مدى تأثير مستنبتات مختلفة في نمو الكائنات الدقيقة، نفذت عملية المواجهة بين عزلات الكائنات الدقيقة المدروسة وفطر الذبول (*F. oxysporum*) على سطح مستنبتات صلبة مختلفة، متضمنة مستنبت NA، مستنبت PDA ومستنبت TSA، وبواقع 3 مكررات/ معاملة/ مستنبت، وبوجود معاملة شاهد للمقارنة. حضنت الأطباق عند درجة حرارة المختبر 27±2° س وتحت إضاءة مستمرة لمدة 7 أيام. وتم حساب متوسط نصف القطر الأكبر، ومتوسط نصف القطر الأصغر ونسبة منع النمو الشعاعي للفطر الممرض.

6. الإفادة من الكائنات الدقيقة التي أظهرت قدرة تضادية في مكافحة فطر الذبول

(أ) في المختبر: تم تلقيح 100 مل من مستنبت مالت مستخلص خميرة سكروز (MYS) بـ 1 مل من معلق كل من العزلات البكتيرية ذات الأرقام 1، 9، 17، 21، 26 و 27 تركيزه 8×10^6 جرثومة/مل. ووضعت الدوارق على رجاج كهربائي لمدة 6 أيام، وعند درجة حرارة 27 ± 2°س. عقمت بذور مدخل العدس (ILL 4605 "Precoz") سطحيا بوساطة هيبوكلوريت الصوديوم 0.525 % (كلوراكس تجاري 10 %) لمدة 5 دقائق، وغسلت بالماء المقطر والمعقم، ثم عوملت بواحدة من الطرق التالية:

1. رطبت بذور العدس المعقمة لمدة 10 دقائق في المعلقات البكتيرية للعزلات المختبرة بعد إضافة الديكسترين للمعلق بتركيز 4 بالألف واستخدمت 5 مل من هذا المعلق لترطيب1 كغ بذور.
2. رطبت بذور العدس المعقمة لمدة 10 دقائق في ماء مقطر(معاملة الشاهد)، ثم جففت هوائياً، ضمن حيز معقم. زرعت البذور المعاملة في الطريقتين 1 و 2 على أبعاد متساوية على المحيط الخارجي لطبق بتري حاوٍ على مستنبت MYSA الصلب بواقع 5 بذور للطبق الواحد، كما لقح مركز كل طبق بقرص قطره 0.5 سم مغطى بنموات الفطر الممرض. حضنت الأطباق عند درجة حرارة 27±2° س وتحت اضاءة مستمرة لمدة 7 أيام. وتم حساب نسبة الإنبات، ونسبة منع النمو الفطري بعد انتهاء فترة التحضين.

(ب) تحت شروط الدفيئة البلاستيكية: زرعت بذور العدس المغلفة بالعزلات البكتيرية وتوافيقها المختلفة في أصص بلاستيكية بقطر (13سم) مملوءة بتربة مزيجية معقمة، وبواقع 5 بذور عدس من المدخل (ILL 4605) في كل أصيص، وتضمنت معاملة الشاهد بذور عدس غير معاملة بالبكتيريا. وكررت كل معاملة ثلاث مرات. وزّعت الأصص عشوائيا فوق طاولة ألمنيومية ضمن دفيئة بلاستيكة 25 ± 2° س نهاراً (16 ساعة إضاءة طبيعية)، و15 ± 2° س ليلاً (8 ساعات). و بعد 15 يوماً من الزراعة، أعديت الأصص بمعلق للفطر تركيزه 2.5 x 10^6 بوغة/مل وبواقع 60 مل معلق/أصيص. ورويت الأصص بالماء حسب الحاجة، وجرت متابعتها لحساب (نسبة الإنبات، طول النبات، درجة الإصابة، عدد القرون المتشكلة والوزن البيولوجي). تم تقييس درجة الإصابة على سلّم تساعي حيث 1 خالي من المرض و 9 موت كلي للنبات.

(جـ) تحت الظروف الحقلية: تمت دراسة المقدرة التضادية للعزلات الجرثومية المختبرة في حقل موبوء بالفطر *F. o.* f sp. *Lentis*. الحقل (A21) الواقع ضمن أراضي المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة(ايكاردا). حيث زرعت بذور مدخلي العدس ILL 4605 و ILL 7136 المغلفة بالعزلات المضادة يدوياً (17 معاملة/صنف) بمعدل 50 بذرة في الخط الواحد (طول الخط 50 سم، والمسافة ما بين الخطوط 30 سم) وبواقع 3 خطوط/معاملة. ووزعت المعاملات المختلفة بطريقة يتردد فيها الشاهد بعد كل 4 خطوط من المدخل المعامل بالعزلة المضادة (شاهد حساس، 4 خطوط مدخل مختبر، شاهد حساس). استخدم تصميم القطع المنشقة (Split plot)، بواقع ثلاث مكررات منفصلة موزعة في الحقل.

سجلت القراءات التالية: عدد الأيام من الزراعة لـ 50% إزهار، وعدد الأيام من الزراعة للنضج،والنسبة المئوية للنباتات الذابلة بعد وصول النبات إلى طور الإزهار وتشكل القرون، الذي يوافق بدء ظهور الأعراض. وقد أخذت قراءات النسبة المئوية للذبول وفق التواريخ التالية: القراءة الأولى (بعد 116 يوماً)؛ القراءة الثانية (بعد 122 يوماً)؛ القراءة الثالثة (بعد 127 يوماً)؛ القراءة الرابعة (بعد 136 يوماً من الزراعة). حسبت النسبة المئوية للنباتات الذابلة لكل خط من خطوط المعاملة، وتم اعتماد متوسط النسبة في الخطوط الثلاثة كمتوسط للنسبة المئوية ذاتها لكل معاملة. حصدت النباتات في خطوط كل معاملة على انفراد، ووضعت في أكياس ورقية وقُدر الوزن الحيوي لنباتات كل معاملة، كما قدر وزن البذور بعد أسبوعين من الحصاد.

7. تأثير الكائنات الدقيقة في نمو ونشاط بكتيريا العقد الجذرية

(أ) على مستنبت مستخلص خميرة، مانيتول، آغار (YMA): درس تأثير العزلات الستة القوية في نمو ثلاث عزلات من بكتيريا العقد الجذرية (*Rhizobium leguminosarum*) المتخصصة على العدس (Le- 735, -726, -719) وذلك بتخطيط نموات فتيّة منها (بعمر 24 ساعة) أمام نموات فتية لعزلات البكتيريا المختبرة على سطح مستنبت YMA الصلب.

(ب) على مستنبت مستخلص خميرة، مانيتول، سائل (YMB): تم توزيع 150 مل من مستنبت (YMB) السائل في دوارق سعة 500 مل، وبعد التعقيم بالحرارة الرطبة (Autoclave) عند درجة حرارة121° س لمدة 15 دقيقة والتبريد، لقحت الدوارق وفقاً لما يلي:

1. أضيف 1 مل من معلق جرثومي تركيزه 5 x 10^6 جرثومة / مل تم تحضيره من نموات فتية (24 ساعة) لكل من العزلات المضادة (ذات الأرقام 1، 26 و27).
2. أضيف 1 مل من معلق جرثومي لبكتيريا العقد الجذرية (Le- 719) تركيزه 5 x 10^6 جرثومة / مل.
3. أضيف 1 مل من معلق جرثومي للعزلات المضادة (ذات الأرقام 1، 26 و 27) + 1 مل من معلق جرثومي لبكتيريا العقد الجذرية.

وبعد أسبوع من التحضين، عند درجة حرارة 27 ± 2°س فوق رجاج كهربائي، رشحت البيئة السائلة على ورق ترشيح (Whatman 1)، وجففت أوراق الترشيح بما عليها من نموات (بكتيريا مضادة، بكتيريا العقد الجذرية وبكتيريا مضادة + بكتيريا العقد الجذرية) في فرن كهربائي عند درجة حرارة 70° س لمدة 24 ساعة، كما وضعت ورقة ترشيح غير مستعملة مرطبة بمستنبت YMB غير ملقح في المجفف أيضاً لتحديد وزنها الجاف، وتم حساب متوسط الوزن الجاف للنموات الجرثومية في المكررات الثلاثة لكل معاملة بوساطة ميزان حساس.

8. تأثير المبيدات الفطرية في الكائنات الدقيقة المختبرة

حضّر PDA بالطريقة الاعتيادية، وعقم بالحرارة الرطبة (Autoclave) عند درجة حرارة 121°س وضغط 15 كغ / سم² لمدة 15 دقيقة، وترك يبرد حتى الدرجة 55°س، أضيف مسحوق المبيد Benlate (Benomyl) أومسحوق للمبيد Tecto 60 (Thiabendazol) وبمعدل(0.25، 0.5 و 1.0 غ مادة فعالة / ليتر مستنبت)، حرك المستنبت المسمم جيداً على رجّاج مغناطيسي (مع التسخين إذا لزم الأمر) لضمان تجانس توزع المبيد في كامل المستنبت، ووزع المستنبت المسمم في أطباق بتري بلاستيكية مسبقة التعقيم قطر 9 سم و بواقع 20 مل للطبق الواحد، وترك حتى يتصلب.

خططت نموات العزلات المختبرة على سطح مستنبت PDA المسمم بالمبيد Benlate أو بالمبيد Tecto 60. كما لقحت الأطباق طرفياً بعد 24 ساعة من التحضين بقرص قطره 0.5 سم مغطى بنموات ميسليومية للفطر *F. o.* f. sp. *lentis* المسبب لمرض ذبول العدس، وحضنت الأطباق ثانية عند درجة حرارة 27 ± 2° س. وتضمنت معاملة الشاهد زراعة الفطر في طرف طبق يحوي مستنبتاً غير مسمم وملقحاً بالنموات الجرثومية.

النتائج والمناقشة

1. دراسة القدرة التضادية للكائنات الدقيقة إزاء فطر الذبول في المختبر

(أ) في مستنبت صلب: أبدت 35 عزلة بكتيرية من أصل 2929 عزلة تأثيراً إيجابياً في منع نمو الهيفا الميسليومية للفطر المسبب للذبول الوعائي على العدس *F. o.* f. sp. *lentis*، وتراوحت نسب المنع لمستعمرة الفطر ما بين 52-77% بالمقارنة مع معاملة الشاهد الذي بلغت نسبة نموه 100 % (جدول 1). وقد تم اختيار العزلات الستة الأقوى أو بعضاً منها والتي تنتمي للجنس *Bacillus* sp. في الاختبارات اللاحقة، لاستخدامها كعوامل مكافحة أحيائية نشطة في مكافحة الفطر الممرض.

(ب) في مستنبت سائل: أظهرت نتائج دراسة القدرة التضادية للعزلات المختبرة واستزراعها مع الفطر في مستنبت مالت مستخلص الخميرة سكروز(MYS) السائل، أن معظم العزلات البكتيرية المختبرة تخفض النموات الميسليومية للفطر الممرض بشكل جيد (جدول 2)، وهذا يشير إلى احتمال أن تكون عزلات *Bacillus* sp. منافساً خارجياً للفطر على المواد الغذائية؛ أو

أنها تفرز مواد مضادة تؤثر في نموه؛ أو ان الكائن المضاد (البكتيريا) يستعمر المنطقة المحيطة بالبذور، ومشكلاً غلافاً أحيائياً فعّالاً في منطقة نمو الجذور قبل غزو الفطر الممرض لسطح الجذور، وبخاصة عندما تكون الظروف البيئية غير ملائمة لنشاط الفطر الممرض. وقد يمارس عامل المكافحة الأحيائية واحداً او أكثر من هذه الآليات (التي لم تدرس في البحث الحالي).

جدول 1. يبين تأثيرالعزلات المختلفة من البكتيريا على قطرالنمو للفطر المسبب لذبول العدس (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Lentis*) بعد أسبوع من المواجهة.

Table 1. Effect of different antagonistic bacterial isolates on *in vitro* growth of *F. o. f. sp. lentis* one week after confrontation.

رقم العزلة Isolate No.	متوسط نصف* القطر الأصغر بالسم mean small diameter/cm	متوسط نصف* القطر الأكبر بالسم mean big diameter/cm	نسبة النمو % growth %	نسبة المنع % inhibition %
1	0.8	2.2	36.4	63.6
2	0.8	1.7	47.1	52.9
3	0.9	2.0	45.0	55.0
4	0.7	1.9	36.8	63.2
5	0.6	1.7	35.3	64.7
6	0.5	1.7	29.4	70.6
7	0.8	1.9	42.0	58.0
8	0.6	1.8	33.3	66.7
9	0.8	2.0	40.0	60.0
10	0.6	1.8	33.3	66.7
11	0.8	1.8	44.4	55.6
12	0.6	1.9	31.6	58.4
13	0.7	1.9	36.8	63.2
14	0.7	2.0	35.0	65.0
15	0.5	1.9	26.3	73.7
16	0.4	1.6	25.0	75.0
17	1.0	2.3	43.5	56.5
18	0.8	2.4	33.3	66.7
19	0.7	2.3	30.4	69.6
20	0.8	2.2	36.4	63.6
21	0.8	2.4	33.3	66.7
22	0.6	2.4	25.0	75.0
23	0.9	2.4	37.5	62.5
24	0.8	2.3	34.8	65.2
25	0.6	2.4	25.0	75.0
26	0.9	2.4	37.5	62.5
27	0.5	2.2	22.7	77.3
28	0.6	2.3	26.1	73.9
29	0.7	2.4	29.2	70.8
30	0.6	2.5	26.0	74.0
31	0.6	2.4	25.0	75.0
32	0.8	2.3	34.8	65.2
33	0.9	2.3	39.1	60.9
34	0.9	2.2	40.9	59.1
35	0.8	2.2	36.4	63.6
شاهد	2.2	2.4	91.6	8.40

* الأرقام المعروضة هي متوسط أنصاف أقطار مستعمرات الفطر بالسم في ثلاثة مكررات.

* Figures are mean colonies diameters of three replications.

جدول 2. يبين الوزن الجاف لنموات الكائنات البكتيرية المختبرة منفردة، وللفطر المسبب، ولكليهما معاً بعد أسبوع من التحضين عند درجة حرارة 27±2°س.

Table 2. Mean dry weights of bacterium, fungus and bacterium + fungus growth after one week incubation at 27±2°C.

رقم العزلة Isolate No.	نوع النمو Organisms tested	متوسط الوزن بالغرام [1] Mean weight/g	فرق المتوسطات Mean difference
1	بكتيريا + فطر Bacterium + fungus	0.1589	0.1475 **
	بكتيريا Bacterium	0.0113	
	فطر Fungus	0.3066	
9	بكتيريا + فطر Bacterium + fungus	0.0018	0.3647 **
	بكتيريا Bacterium	0.0085	
	فطر Fungus	0.3664	
17	بكتيريا + فطر Bacterium + fungus	0.0111	0.2416 **
	بكتيريا Bacterium	0.0085	
	فطر Fungus	0.2527	
21	بكتيريا + فطر Bacterium + fungus	0.0334	0.2123 **
	بكتيريا Bacterium	0.0073	
	فطر Fungus	0.1488	
26	بكتيريا + فطر Bacterium + fungus	0.0175	0.3067 **
	بكتيريا Bacterium	0.0014	
	فطر Fungus	0.3243	
27	بكتيريا + فطر Bacterium + fungus	0.0339	0.2500 **
	بكتيريا Bacterium	0.0077	
	فطر Fungus	0.2838	
LSD	(P=0.01)		0.0914
LSD	(P=0.05)		0.0583

[1] الأرقام المعروضة هي متوسط الوزن بالغرام في ثلاثة مكررات.
(**) الفروق معنوية جداً.

[1] Figures are mean weight/g in three replication
** Highly significant difference

(جـ) نتائج دراسة تأثير مستنبتات مختلفة في نمو الكائنات الدقيقة: بينت نتائج دراسة القدرة التضادية للكائنات المختبرة في المستنبتات الغذائية NA، PDA و TSA أن المستنبت الغذائي NA كان أكثر ملاءمة لنمو البكتيريا والفطر معاً، حيث تراوحت النسبة المئوية لمنع نمو فطر الذبول فوقه بين 58-78%، في حين كان المنع ما بين 41-70% فوق مستنبت PDA، و 38-70% فوق مستنبت TSA، بالمقارنة مع الشاهد الذي اقتربت نسبة نموه من 100% (جدول 3).

جدول 3. تأثير العزلات البكتيرية المختبرة في قطر النمو الفطري للفطر المسبب لذبول العدس (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*) فوق مستنبتات مختلفة.

Table 3. Effect of different antagonistic bacterial isolates on growth of *Fusarium oxysporum* sp. *lentis* on different culture media.

نسبة المنع % Inhibition %	نسبة النمو % Growth %	متوسط نصف القطر بالسم Mean diameter/cm الأكبر big	الأصغر small	رقم العزلة Isolate No.	اسم * المستنبت Medium
60.0	40.0	1.5	0.6	1	NA
66.7	33.3	1.5	0.5	9	
77.8	22.2	1.8	0.4	17	
78.2	21.8	1.6	0.4	21	
68.5	31.5	1.9	0.6	26	
57.9	42.1	1.9	0.8	27	
11.2	88.8	1.8	1.6	Control شاهد	
52.6	47.4	1.9	0.9	1	PDA
41.2	58.8	1.7	1.0	9	
57.9	42.1	1.9	0.8	17	
72.2	27.8	1.8	0.5	21	
70.0	30.0	2.0	0.6	26	
68.5	31.5	1.9	0.6	27	
16.6	83.4	1.8	1.5	Control شاهد	
38.9	61.1	1.8	1.1	1	TSA
47.4	52.6	1.9	1.0	9	
55.6	44.4	1.9	0.8	17	
58.9	41.1	1.7	0.7	21	
68.5	31.5	1.9	0.6	26	
70.0	30.0	2.0	0.6	27	
15.8	84.2	1.9	1.6	Control شاهد	

* NA= الأجار المغذي؛ PDA = بطاطا ديكستروز أجار؛ TSA= Tryptic Soy Agar؛ شاهد= يحوي بكتيريا غير مضادة.

** الأرقام المعروضة هي متوسط أنصاف أقطار مستعمرات الفطر بالسم في ثلاثة مكررات.

* NA= Nutrient Agar; PDA= Potato Dextrose Agar; TSA= Tryptic Soy Agar; Control= Non-antagonistic bacteria.

** Figures are means of colony diameter/cm in three replications.

2. الإفادة من الكائنات الدقيقة التي أظهرت قدرة تضادية في مكافحة فطر الذبول

(أ) في المختبر: بينت نتائج دراسة القدرة التضادية للعزلات الستة المختبرة وتوليفاتها المختلفة على مستنبت MYSA، أن جميعها أبدت قدرة تضادية جيدة جداً إزاء فطر الذبول مقارنة مع الشاهد الغير معامل بالبكتيريا حيث احتلت نموات العزلات البكتيرية المختبرة ثلثي مساحة طبق البتري، وحسب مكان توضع البذور بينما بقيت نموات الفطر الممرض محدودة و لم يتجاوز امتدادها 1 سم في المنطقة المحيطة بالقرص الأساسي، في حين غطت نموات الفطر الممرض في معاملة الشاهد أكثر من ثلثي سطح طبق البتري. ولم تؤثر العزلات المختبرة في نسبة إنبات البذور المعاملة بها، الأمر الذي يشير إلى أمان استخدامها.

(ب) تحت شروط الدفيئة البلاستيكية: أوضحت نتائج دراسة القدرة التضادية للعزلات البكتيرية المختبرة تحت شروط الدفيئة البلاستيكية بأن إكساء البذور بمعلق تركيزه 8 x 10^6 جرثومة / مل من العزلات البكتيرية المختبرة وتوليفاتها المختلفة (جدول 4)، لم يؤثرفي النسبة المئوية لإنبات البذور حيث كانت النسبة المئوية للبذور المنبتة 100%. بينما لوحظت فروقات معنوية جداً بين المعاملات في نسبة الذبول عند قياس شدة الإصابة على مقياس تساعي الدرجة، بالمقارنة مع الشاهد الذي بلغت درجة إصابته 9. كما أظهرت معاملة البذور بالعزلات (ذات الأرقام 21، 26 و 27) أيضاً زيادة معنوية في الغلة البيولوجية (غ نبات/معاملة) مقارنة مع الغلة البيولوجية في معاملة الشاهد.

جدول 4. المعاملات المختلفة والعزلات البكتيرية المستخدمة فيها (منفردة أوفي توافيق) في تجارب الدفيئة (95/1994) والحقل (96/1995).

Table 4. Treatments and bacterial isolates used (singly or in combinations) in plastic house (1994/95) and field (1995/96) experiments.

المعاملة Treatment No.	العزلة/ العزلات Isolate/isolates في الدفيئة موسم (95/1994) Plastic house (1994/95)	في الحقل موسم (96/1995) Field (1995/96)
.1	1	1
.2	9	9
.3	17	17
.4	21	21
.5	26	26
.6	27	27
.7	9 + 1	9 + 1
.8	26 + 1	26 + 1
.9	27 + 1	27 + 1
.10	21 + 17 + 9	21 + 17 + 9
.11	21 + 9	21 + 9
.12	26 + 17	26 + 17
.13	26 + 17 + 1	26+ 17 + 1
.14	27 + 26 +21	27 + 26 + 21
.15	27 + 26	27 + 26
.16	شاهد (Dextrin)	شاهد (Dextrin)
.17	لم تدرس (not tested)	شاهد (Benlate)

(جـ) تحت ظروف الحقل: حللت البيانات المتحصل عليها وفق نظام التحليل الإحصائي Genstate لمقارنة متوسطات المعاملات ودراسة الفروق المعنوية باستعمال قيمة أقل فرق معنوي (LSD).

أظهرت نتائج المقارنة بين متوسطات المعاملات لصفة طول النبات وحساب أقل فرق معنوي (LSD) ، أن المعاملة (رقم 2) أعطت فروقاً معنوية جداً، في حين كانت الفروقات معنوية في المعاملات (ذات الأرقام 1 و4) لدى تفاعلها مع المدخل ILL 4605 (أنظر الجدول رقم 4 الخاص بتوزيع

المعاملات). وكانت الفروقات في المعاملات (ذات الأرقام 1، 2، 4، 5، 8، 14 و 15) معنوية جداً، بينما كانت الفروقات معنوية فقط في المعاملات (ذات الأرقام 6، 9، 10 و17) وغير معنوية في المعاملات (ذات الأرقام 3، 7، 11، 12 و 13) مع المدخل ILL 7136. ولم تؤثر العزلات في نسبة إنبات البذور، ولكنها أثرت في معدل الذبول الذي قدر على أساس النسبة المئوية للنباتات الذابلة بعد 127 و 136 يوماً من الزراعة، حيث كانت في المدخل (ILL 7136) أقل على نحو معنوي في كافة المعاملات مقارنة بمعاملة الشاهد، باستثناء المعاملتين (ذات الأرقام 2 و6). كما كانت هذه النسبة في المعاملة (رقم 3) أقل معنوياً في المدخل الحساس ILL 4605 مقارنة بالشاهد. وما سبق يعكس تأثراً معنوياً ما بين الأصل الوراثي للمدخل المختبر والمعاملة بالكائن الحي المضاد. ولوحظت زيادة معنوية في الغلة الحيوية وغلة القش في المدخل (ILL 7136) في المعاملات (ذات الأرقام 1، 4 و7) تجاوزت مثيلاتها في معاملة الشاهد بحوالي 20-50% (جدول 5).

3. دراسة تأثير الكائنات الدقيقة في بكتيريا العقد الجذرية

(أ) فوق مستنبت YMA الصلب: بينت دراسة تأثير العزلات المختبرة في نمو ثلاث عزلات من بكتيريا العقد الجذرية متخصصة على العدس فوق مستنبت YMA الصلب، عدم تأثير العزلات البكتيرية المختبرة في نمو بكتيريا العقد الجذرية، حيث كان نموها جميعاً جيداً فوق مستنبت YMA الصلب.

(ب) في مستنبت YMB السائل: أظهرت نتائج دراسة تأثير العزلات المختبرة (ذات الأرقام 21، 26 و 27) واستزراعها مع عزلة واحدة من بكتيريا العقد الجذرية (*Rhizobium leguminosarum*) (Le- 719) في مستنبت YMB السائل تركيزه 5×10^6 جرثومة/مل لكل منهما، وحساب الوزن الجاف لمزرعة مفردة من البكتيريا المختبرة، ومزرعة مفردة من بكتيريا العقد الجذرية، وأخرى للبكتيريا المضادة + بكتيريا العقد الجذرية، أن العزلات المختبرة لم تؤثر في نمو بكتيريا العقد الجذرية (*Rhizobium leguminosarum*) (Le- 719) حيث كان الوزن الجاف للبكتيريا المختبرة + الوزن الجاف لبكتيريا العقد الجذرية (Le-719) أكبر من

جدول 5. ملخص التحليل الإحصائي نتائج دراسة القدرة التضادية للعزلات المختبرة بالنسبة لطول النبات، الغلة البيولوجية والقش بالنسبة لصنفي العدس ILL 4605 و ILL 7136 تحت ظروف الحقل لموسم 96/1995.

Table 5. Statistical analyses of the effect of different antagonistic bacterial isolates on plant height, biological and straw yield of ILL 4605 and ILL 7136 under field conditions 1995/96.

القش (غ) Straw yield (gram)		الغلة البيولوجية (غ) Biological yield (gram)		الذبول بعد 136 يوما Wilt after 127 days		الذبول بعد 127 يوما Wilt after 127 days		طول النبات/ سم Plant height (cm)		المعاملات Treatments
ILL 7136	ILL 4605	ILL 7136	ILL 4605	ILL 7136	ILL 4605	ILL 7136	ILL 4605	ILL 7136	ILL 4605	
**	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	**	*	1
n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	**	**	2
n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	**	**	**	n.s.	n.s.	3
*	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	**	*	4
n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	5
n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	6
*	n.s.	*	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	7
n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	8
n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	*	n.s.	9
n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	10
n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	11
n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	12
n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	13
n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	14
n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	**	n.s.	15
n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	16(شاهد)
n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	17(شاهد)
9.21		12.05		35.06		28.55		2.22		(P=0.01) LSD
6.69		8.75		25.46		20.73		1.61		(P=0.05) LSD

(**) الفروق معنوية جداً ؛ (*) الفروق معنوية ؛ (n.s.) الفروق غير معنوية

المعاملات 1-6 عزلات منفردة وتوليفاتها من 7-15؛ و من 16-17 معاملات شاهد (أنظر الجدول 4).

(**) diffferences are highly significant; (*) differences are significant; (n.s.) differences are non significant.

Treatments 1-6 single isolates, 7-15 combination of isolates and 16-17 control treatments. Please refer to table 4.

مجموع الوزن الجاف للبكتيريا المختبرة بمفردها + الوزن الجاف لبكتيريا العقد الجذرية (الشاهد).

4. دراسة تأثير المبيدات الفطرية في نمو الكائنات الدقيقة

لم تمكن نتائج دراسة تأثير المبيدات الفطرية في نمو العزلات المختبرة لدى استزراعها في مستنبت PDA مسمم بالمبيد Benlate وآخر مسمم بالمبيد Tecto 60 عند التراكيز الثلاثة المستخدمة (0.25، 0.5 و 1.0 غ مادة فعّالة / ليتر بيئة) من ملاحظة أي خفض في نمو العزلات البكتيرية المختبرة بعد 48 ساعة من التحضين مقارنة مع الشاهد. في حين لم تظهر أيّة نموات ميسليومية للفطر الممرض على المستنبت PDA نفسه المسمم بأي من المبيدين السابقين بالمقارنة مع الشاهد النامي في مستنبت غير مسمم، الأمر الذي يظهر تأثر الفطر الممرض بالمبيدين السابقين وعدم تأثر العزلات البكتيرية المختبرة، مما يسمح باستخدامها بشكل متكامل مع عامل المكافحة الأحيائي.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية (مخبرياً، وفي الدفيئة البلاستيكية والحقل)، امكانية وأمان استخدام عزلات البكتيريا المضادة المختبرة (والتي تنتمي للجنس *Bacillus* sp.) بأمان كمعاملات بذور (كاسيات بذور) لمكافحة الذبول الوعائي على العدس، وتتفق النتائج المتحصل عليها مع نتائج دراسات سابقة استخدمت فيها *Bacillus subtilis* لمكافحة أنواع مختلفة من المسببات المرضية تربية المنشأ التي تصيب محاصيل عديدة (3، 9، 10، 17، 20، 32، 35، 36، 40).

شكر وتقدير

يتوجه الباحث الرئيسي بالشكر إلى إدارة المركز الدولي للبحوث الزراعية للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا) للتسهيلات العديدة التي قدمتها لتنفيذ هذا البحث.

Abstract

El-Hassan, S., B. Bayaa, W. Erskine and C. Akem. 1997. Antagonistic Effects of *Bacillus* spp. Against the Causal Organism of lentil Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis*). Arab J. Pl. Prot. 15(2):65-73.

Thirty five bacterial isolates of *Bacillus* spp., with antagonistic activity rates ranging from 52 to 77% against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* were identified. Six isolates were tested, singly or in combination, for their *in-vivo* antagonistic effect in soil infested with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* under plastic house (pots) and field conditions (sick plot). Two lentil lines: ILL 4605 (highly susceptible) and ILL 7136 (moderately susceptible) were used. In-vitro confrontations were made between the antagonists and three rhizobia specific to lentil for possible interaction. *In-vitro* test was also conducted to study the effects of commonly used seed dressing fungicides on the growth of antagonists. Results indicated that seed germination rate was not affected by coating lentil seeds with the antagonists. There was a significant genotype by treatment interaction for percent wilted plants taken 127 and 136 days after planting. The antagonists did not affect the growth of three lentil specific rhizobia strains. Moreover, their growth was not affected by the two commonly used seed dressing fungicides (benomyl and thiabendazole). From the above, their is good potential in the use of selected *Bacillus* spp. for the control of lentil vascular wilt, which is an indication of their potential role in the biological and integrated control of lentil wilt.

Key words: Biological control, lentil, vascular wilt, Antagonisim, *Lens culinaris*.

المراجع

1. **الأحمد، ماجد ونذير موصللي.** 1987. مرض ذبول وتعفن جذور العدس. LENS Newsletter 14 (2/1):27-31.
2. **بللار، مصطفى.** 1984. حصر أمراض العدس المنتشرة في وسط وشمال سورية. مجلة وقاية النبات العربية 2:10-15.
3. **Aldrich, J. and R. Baker.** 1970. Biological control of *Fusarium roseum* f. sp. *dianthi* by *Bacillus subtilis*. Plant Disease Reporter 54:446-448.
4. **Barulina, H.** 1928. [Lentils of Afghanistan]. Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding, Leningrad. (English summary).
5. **Bayaa, B. and W. Erskine.** 1996. Lentil pathology. In: *Pathology of Food and Forage Legumes* (eds D. Allen and J. Lenné), Commonwealth Agricultural Bureaux International, U.K. (In press).

References

6. **Bayaa, B., W. Erskine and L. Khoury.** 1986. Survey of wilt damage on lentils in Northern Syria. Arab Journal of Plant Protection 4: 118-119.
7. **Bellar, M. and S. Kababeh.** 1983. A list of diseases, injuries, and parasitic weeds of lentils in Syria, Survey 1979-1980. LENS Newsletter 10: 30-31.
8. **Beniwal, S.P.S., B. Bayaa, S. Weigand, K. Makkouk and M.C. Saxena.** 1993. Field Guide to Lentil Diseases and Insect Pests. ICARDA, Aleppo, Syria. 106 pp.
9. **Broadbent, P., K.F. Baker and Y. Waterworth.** 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. Aust. J. biol. Sci. 24:925-944.
10. **Dunleavy, J.** 1955. Control of damping-off of sugar beet by *Bacillus subtilis*. Phytopathology 45:252-258.

11. **El-Goorani, M.A.E., S.A. Farag and M.R.A. Shehata.** 1976. The effect of *Bacillus subtilis* and *Penicillium patulum* on *in-vitro* growth and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora cryptogea.* Phytopathol. Z. 85:345-352.
12. **Erskine, W. and B. Bayaa.** 1996. Yield loss, incidence and inoculum density associated with vascular wilt of lentil. Phytopath. medit, 35:24-32.
13. **Erskine, W., B. Bayaa and M. Dolli.** 1990. Effect of temperature and some media and biotic factors on the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, and its mode of seed transmission. Arab Journal of Plant Protection 8: 34-37.
14. **FAO. 1996.** Production yearbook, Roma, Italy. Vol 48:105 pp.
15. **Fleischmann, R.** 1937. Observations on lentil wilt. Pflanzenbau 14(2):49-56.
16. **Fokkema, N.J.** 1976. Antagonism betwen fungal saprophytes and pathogens on aerial plant surfaces. *In*: Microbiology of aerial plant surfaces. Eds: C.H. Dickinson and T.F. Preece. pp 487-506. Academic Press, London.
17. **Hall, T.J. and W.E.E. Davis.** 1990. Survival of *Bacillus subtilis* in silver and sugar maple seedlings over a two-year period. Plant Disease 74:608-609.
18. **Hanounik, S.B.** 1979. Diseases of major food legumes in Syria. pp. 98-102. In: Food Legume Improvement and Development. Ed. G.C. Hawtin and G.J. Chancellor. IDRC Pub. 12, Ottawa.
19. **Hariri, G.** 1981. Insects and other pests, pp. 173-189. In: *Lentils* (C. Webb and G. Hawtin eds), ICARDA, CAB, U.K.
20. **Hwang, S.F.** 1994. Potential for integrated biologcal and chemical control of seedling rot and preemergence damping-off caused by *Fusarium avenaceum* in lentil with *Bacillus subtilis* and Vitaflo-280. Journal of Plant Diseases and Protection 101(2):188-199.
21. **ICARDA.** 1988. Annual report "Food Legume Improvement Program", pp. 67-71.
22. **ICARDA.** 1995. Annual report "Food Legume Improvement Program".
23. **Jordon, V.W.L and H.S. Tarr.** 1987. Inoculum suppression of *Verticillium dalhiae.* Ann. Appl. Biol. 89:139-141.
24. **Kamboj, R.K., M.P. Pandey and H.S. Chaube.** 1990. Inheritance of resistance to *Fusarium* wilt in Indian lentil germplasm. (*Lens culinaris* Medik). Euphytica 50:113-117.
25. **Khare, M.N.** 1980. Wilt of lentil. JNKVV, Jabalpur, M.P., India. 155 pp.
26. **Khare, M.N.** 1981. Disease of lentil, pp. 163-172. In Lentils (C. Webb and G. Hawtin eds.), ICARDA, CAB, U.K.
27. **Kommendahl, T. and I.C. Mew.** 1975. Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonists. Phytopathology 65:296-300.
28. **Majumdar, S.K. and S.K. Bose.** 1958. Mycobacillin, a new antifungal antibiotic produced by *B. subtilis.* Nature 181:134-135.
29. **Michael, A. H. and P.E. Nelson.** 1972. Antagonistic effect of soil bacteria on *Fusarium roseum culmorum* from carnation. Phytopathol. 62:1052-1056.
30. **Pusey, P.L., and C.L. Wilson.** 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis.* Plant Disease 68:755-776.
31. **Pusey, P.L., C.L. Wilson, M.W. Hotchkiss and J.D. Fraklin.** 1986. Combatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, dicloran, and cold-storage conditions. Plant Disease 70:587-590.
32. **Pusey, P.L., M.W. Hotchkiss, H.T. Dulmage, R.A. Baumgardner, E.I. Zehr, C.C. Reilly and C.L. Wilson.** 1988. Pilot test for commercial production and application of *Bacillus subtilis* (B-3) for postharvest control of peach brown rot. Plant Disease 72:622-626.
33. **Rytter, J.L., F.L. Lukezic, R. Craig and G.W. Moorman.** 1989. Biological control of geranium rust by *Bacillus* . Phytopathology 79:367-370.
34. **Sharon, N., A. Pinsky, R. Turner-Graff, J. Babad and A.P. Cercos.** 1954. Classification of the antifungal antibiotics from *Bacillus subtilis.* Nature 174:1190-1191.
35. **Singh, V. and B.J. Deverall.** 1984. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Trans.* Br. Mycol. Soc. 83:487-490.
36. **Swineburn, T.R.** 1978. The potential value of bacterial antagonists for the control of apple canker. Ann. Appl. Biol. 89:94-96.
37. **Thirumalachar, M.J. and M.J. O'Brien.** 1977. Suppression of charcoal rot in potato with a bacterial antagonist. *Plant Disease Reptr.* 61:543-546.
38. **Utkhede, R.S.** 1984. Effect of bacterial antagonists on *Phytophthora cactorum* and apple crown rot. Phytopathol. Z. 109:169-175.
39. **Utkhede, R.S. and J.E. Rahe.** 1983. Chemical and biological control of onion white-rot in muck and mineral soils. Plant Disease 67:153-155.
40. **Utkhede, R.S. and P.L. Sholberg.** 1986. *In-vitro* inhibition by *Bacillus subtilis* and *Enterobacter aerogenes* and *in-vivo* control of two postharvest cherry diseases. Can. J. Microbiol. 32:963-967.
41. **Vasudeva, R.S., T.V. Subbalah, M.L.N. Sastry, G. Rangaswamy and M.R.S. Lyengar.** 1958. Bulbifomin an antibiotic produced by *Bacillus aubtilis.* Ann. Appl. Biol. 46:336-345.