اختبار قدرة عدّة عزلات محلية من الفطر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. على استيطان نبات الخيار في البيوت المحمية

د. محمد أحمد*

د. ابتسام غزال**

لبنى رجب***

(تاريخ الإيداع 9 / 5 / 2021. قبل للنشر في 10 / 10 / 2021)

□ ملخّص □

يُعد الفطر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. من أهم الفطريات الممرضة للحشرات المنتشرة عالمياً ضمن أنظمة بيئية طبيعية وزراعية مختلفة. ظهرت حديثاً قدرته على استيطان عدد من النباتات الوعائية والبقاء داخلها.

أجريت هذه الدراسة لمقارنة إمكانية تعايش عزلات محلية من الفطر *B. bassiana* داخل نبات الخيار في البيت المحمي باستخدام طريقتي إلقاح، تعفير البذار وري البادرات.

نُفّذت التجربة باستخدام 10 عزلات مختلفة من النوع *B. bassiana* وهي B83 وB100 وB157 وB186 وB195 وB202 وB203 وB221 وB239، وB240. وحُسبت نسب الاستيطان للأجزاء الهوائية (ورقة وعنق ورقة وساق) بعد 30 و60 يوماً من تنفيذ المعاملات. كما حُدّدت الأجناس الفطرية الأخرى المعزولة من هذه الأجزاء.

بيّنت النتائج قدرة جميع العزلات المستخدمة على الانتقال جهازياً والنمو داخل الأجزاء الهوائية لنبات الخيار في البيت المحمي في كلتا المعاملتين. حقّقت العزلات B100 وB195 وB240 أعلى نسب استيطان للنبات بدون فروق معنوية فيما بينها. وتفاوتت نسب الاستيطان من 0 إلى 100 % تبعاً للعزلة الفطرية والجزء النباتي، إذ كان الاستيطان الأعلى في الورقة يليها عنق الورقة ثمّ الساق. وتمكّن الفطر *B. bassiana* من البقاء داخل نبات الخيار لمدّة تصل حتى 60 يوماً في البيت المحمي.

كما أظهرت النتائج وجود عدّة أجناس فطرية أخرى داخل نبات الخيار، وكان أكثرها تردداً الفطر *Aspergillus* تلاه الفطر *Penicillium* بنسب تردّد بلغت 30.7 و29.5% بعد 60 يوماً من بدء التجربة، على التوالي.

الكلمات المفتاحية: تعايش داخلي، الفطر *Beauveria bassiana*، نبات الخيار، استيطان، انتقال جهازي، عزلة محلية.

* أستاذ، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية. mohmad.ahmad@tishreen.edu.sy

** أستاذ مساعد، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية. ghazalibtisam65@gmail.com

*** طالبة دراسات عليا (دكتوراه)، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية. lobna.h.rajab@tishreen.edu.sy

The ability of local isolates of the fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil., to colonize cucumber plants under greenhouse conditions

Dr. Mohammad Ahmad[*]
Dr. Ibtisam Gazal[**]
Lobna Rajab[***]

(Received 9 / 5 / 2021. Accepted 10 / 10 /2021)

□ ABSTRACT □

The fungus, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil., is one of the most important entomopathogenic fungi worldwide. It can be found in a variety of natural and agricultural habitats, and it has recently demonstrated the ability to live endophytically within plants.
The present study was conducted to compare the ability of local isolates of the fungus *B. bassiana* to colonize cucumber plants under greenhouse conditions, using two inoculation methods: seed dusting and seedling drench.
Ten different isolates of *B. bassiana*: B83, B100, B157, B186, B195, B202, B203, B221, B239, and B240 were used. Colonization of the upper plant parts (leaf, petiole, and stem) was calculated after 30 and 60 days of treatment. Other fungal genera present inside the plant were also determined.
The results show that all isolates used had the ability to grow systemically and colonize cucumber plants under greenhouse conditions in both treatments. The isolates, B100, B195, and B240, were the most well-established in the plant. Depending on the fungal isolate and the plant part, colonization varied from 0 to 100%. The colonization was highest in the leaf followed by the petiole, and the stem. Moreover, the fungus *B. bassiana* survived inside cucumber for at least 60 days under greenhouse conditions.
Additionally, various genera of fungi were isolated from the cucumber, of which, the genus, *Aspergillus*, was the most frequent, followed by the genus, *Penicillium*, with frequency reached 30.7 and 29.5 %, respectively, 60 days post-treatment.

Key words: endophyte, *Beauveria bassiana*, cucumber, colonization, systemic growth, and local isolate.

[*] **Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Latakia, Syria. mohmad.ahmad@tishreen.edu.sy.**
[**] **Assistance Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Latakia, Syria. ghazalibtisam65@gmail.com.**
[***] **PhD. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Latakia, Syria. lobna.h.rajab@tishreen.edu.sy.**

مقدمة

ينتمي الفطر *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. (Ascomycota: Hypocreales) إلى مجموعة الفطريات الممرضة للحشرات EPFs (Entomopathogenic Fungi) ذات المدى العوائلي الواسع. يُهاجم حوالي 700 نوعاً من مفصليات الأرجل، من حشرات وأكاروسات (Goettel *et al.*, 2001; Rehner, 2005). أُدخِل هذا الفطر في برامج مكافحة الآفات منذ عام 1888م، وكان يوزّع على المزارعين على هيئة أبواغ للاستخدام الحقلي المباشر (Lord, 2005). ولا يزال دوره في الطبيعة قيد الدراسة حتى الآن، فقد ظهرت قدرته على مكافحة الفطريات الممرضة للنبات (Ownley *et al.*, 2010)، وعلى مهاجمة الديدان الخيطية النباتية (Zhao *et al.*, 2013). برز دوره في تعزيز نمو وإنتاجية العديد من النباتات (Begum and Tamilselvi, 2016; Sàncher-Rodrìgues *et al.*, 2017). كما تبيّن مؤخراً أنّ الفطر *B. bassiana* يمكنه أن يقضي جزءاً من دورة حياته داخل النبات Endophyte أو على سطحه الخارجي Epiphyte عند غياب المضيف الحشري أو عندما تكون الظروف البيئية غير ملائمة دون أن يسبّب ضرراً للنباتات المضيفة(Vidal and Jaber, 2015; Klieber and Reineke, 2016; Nishi *et al*., 2020).

اتجهت الأبحاث في السنوات الأخيرة لدراسة دور الفطر *B. bassiana* كمتعايش داخل النبات، فبعد أن أثبت كفاءته ضدّ الآفات في المختبرات، كان واضحاً انخفاض فعاليته عند الانتقال إلى التطبيق الحقلي بسبب تأثر أجزائه التكاثرية بالعوامل الخارجية وخاصةً الإشعاع الشمسي وظروف الجفاف (Vega *et al*., 2012). وسُجِّل وجوده متعايشاً داخل العديد من النباتات أحادية وثنائية الفلقة(Vidal and Jaber, 2015; Card *et al*., 2016). ويعود المصطلح Endophyte إلى عام 1884، إذ استخدمه De Bary للتعبير عن نوع فطري أو جرثومي يعيش داخل أنسجة النبات خلال فترة محددة من دورة حياته، ولا يسبّب وجوده أية أعراض مرضية للعائل النباتي (Wilson, 1995). ينتشر هذا الشكل من الارتباط بين الفطور والنباتات في الطبيعة في مواطن عديدة أرضية ومائية (Begum and Tamilselvi, 2016)، إذ تبيّن حتى الآن أنّ معظم النباتات إن لم يكن كلها متعايشة إما مع ميكوريزا أو فطريات داخلية Endophytes (Petrini, 1986). والفطريات داخلية التعايش شائعة ومتنوعة تصنيفياً إلى حدٍ بعيد (Arnold, 2007)، وتضم عدداً من الفطريات الممرضة للحشرات من أجناس مختلفة مثل *Paecilomyces* و*Verticillium* و*Beauveria* (Bills and Polishook, 1991).

يُعَد الخيار (*Cucumis sativus* L.) واحداً من الخضار المهمة المزروعة في سورية وفي بلدانٍ مختلفة حول العالم، تنتشر زراعته محلياً في أغلب مناطق القطر وخصوصاً في المنطقة الساحلية، إذ يزرع في الحقول المكشوفة والبيوت المحمية. وقد ثبت تعايش الخيار مع فطريات ممرضة للحشرات، ومنها النوع *Lecanicillium muscarium* (Ascomycota: Hypocreales) (Petch) Zare and Gams (Hirano *et al.*, 2008)، والنوع *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf & Nirenberg (Ascomycota: Hypocreales) (Segarra *et al*., 2007). كما تمكّن Begum and Tamilselvi (2016) من عزل عدة فطريات ممرضة للحشرات متعايشة داخل الخيار تتبع أجناس *Acremonium* و*Chaetomium* و*Paecilomyces*.

استطاع النوع *B. bassiana* لأول مرة عالمياً استيطان أنسجة نبات الخيار باستخدام طرائق إلقاح صنعية في الظروف المخبرية (Rajab *et al*., 2020)، الأمر الذي يشجع على اختبار إمكانية حدوث هذا التعايش ضمن ظروف البيت المحمي بوجود كائنات حية أخرى منافسة في التربة والنبات من فطريات وجراثيم. نُفّذَ هذا البحث باستخدام عدّة عزلات

محلية من النوع *B. bassiana* استكمالاً للتجارب المخبرية. استُخدمَت طريقتان لإلقاح النباتات صنعياً بالفطر: معاملة البِذار تعفيراً وري البادرات. وحُسِبت نسبة الاستيطان بعد شهر وبعد شهرين من بدء التجربة.

أهميّة البحث وأهدافه

تأتي أهمية الدراسة الحالية من الأهمية الاقتصادية والغذائية لمحصول الخيار، وخطورة الآفات الحشرية التي تهاجمه وتأثيرها الكبير في الإنتاجية والنوعية. ويُعَد هذا البحث خطوة تمهيدية لاستقصاء دور الفطر *B. bassiana* كمتعايش ضدّ الآفات الحشرية التي تهاجم محصول الخيار في البيت المحمي وخصوصاً بعد نجاحه في استيطان نبات الخيار مخبرياً. **وهدَفَ البحث** إلى مقارنة قدرة عشر عزلات محليّة من الفطر *B. bassiana* على النمو داخل أنسجة نبات الخيار في ظروف البيت المحمي، وتحديد انتقاله جهازياً من مكان التلقيح إلى الأجزاء الهوائية من النبات.

طرائق البحث ومواده

نفّذت التجربة في بيتٍ محمي في قرية تلسنون –التابعة لمحافظة طرطوس– بدءاً من شهر شباط وحتى شهر أيار من العام 2019. ونفّذ الجزء المخبري في مختبر أبحاث وقاية النبات في قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة تشرين.

العزلات الفطرية:

استُخدِمَت 10 عزلات مختلفة من النوع *B. bassiana*، وهي B83 وB100 وB157 وB186 وB195 وB202 وB203 وB221 وB239، وB240 (الجدول 1). عُزلت من الترب خلال العام 2018 بطريقة الغاليريا كمصيدة "Galleria Bait Method" (GBM) الموصوفة من قبل Zimmermann (1986) وMeyling (2007) باستخدام يرقات دودة الشمع الكبرى *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) بالعمر الأخير. وحُدّد النوع مورفولوجياً وفق كل من Rehner *et al.* (2011) وHumber (2012) بناءاً على مواصفات المزرعة على الوسط المغذي ديكستروز آغار البطاطا Potato Dextrose Agar (PDA: Titan Biotech LTD.)، ومواصفات وقياسات الأبواغ والحامل البوغي تحت المجهر.

نُمّيت العزلات الفطرية على وسط PDA وحُفِظَت في البراد على الدرجة 4 ° س لحين الاستخدام.

الجدول (1): عزلات النوع *Beauveria bassiana* المستخدمة في البحث

العزلة	المنطقة	الغطاء النباتي	الإحداثيات الجغرافية
B83	نهر جوبر، طرطوس	مسطح أخضر	35°11'49"N 36°01'03"E
B100	الرنسية، طرطوس	بامياء	34°38'55"N 36°02'14"E
B157	كرسانا، اللاذقية	زيتون	35°37'00"N 35°48'59"E
B186	برج إسلام، اللاذقية	ليمون حامض	35°40'00"N 35°46'59"E
B195	الشبطلية، اللاذقية	زيتون	35°41'10"N 35°49'36"E
B202	السرسكية، اللاذقية	مسطح أخضر	35°42'40"N 35°55'54"E
B203	المغريط، اللاذقية	ليمون حامض	35°36'18"N 35°50'02"E
B221	صليّب التركمان، اللاذقية	زيتون	35°41'21"N 35°48'47"E
B239	الزوبار، اللاذقية	خوخ	35°38'04"N 35°59'38"E
B240	الزوبار، اللاذقية	زيتون	35°37'57"N 35°59'39"E

نباتات الاختبار:

استُخدِم هجين الخيار F1 Raade (Elite Plant-Breeding and Seeds Company, Russia) في هذه الدراسة. عُقّمت البذور قبل استخدامها سطحياً باستخدام محلول هيبوكلوريت الصوديوم 0.5 % لمدّة 3 دقائق، ومن ثمّ غُسلت بالماء المقطر المعقّم ثلاث مرات متتالية. اختير منها 15 بذرة عشوائياً وزرعت على وسط PDA في أطباق بتري (9 سم) بمعدل 5 بذور لكل طبق وحُضّنت على الدرجة 25 ± 2 ° س للتأكد من خلوّها من الفطر المدروس، واستخدمت البذور المتبقية في التجربة.

المعاملات:

استخدمت في هذه الدراسة طريقتان لإلقاح نباتات الخيار بالفطر *B. bassiana* هما: تعفير البذار وري البادرات. اختيرت طريقة تعفير البذار بالفطر لسهولة تطبيقها حقلياً، وطريقة ري التربة بعد ظهور البادرات ونموّها لإظهار إمكانية التعايش داخل النبات بعد أن تكون الكائنات الحية الدقيقة قد استوطنت داخله. نفّذت المعاملة الأولى وفق Dara *et al.* (2013) وذلك بوضع البذور قبل زراعتها على تماس مباشر مع سطح مزرعة متبوغة للفطر المدروس ضمن طبق البتري لمدّة ساعتين مع التقليب كل ربع ساعة، ثمّ نقلت البذور إلى ورق ترشيح مرطّب وتركت لمدّة عشر دقائق للمساعدة على التصاق الأبواغ بالبذور، ثمّ زرعت في الأرض الدائمة للبيت المحمي. وفي معاملة ري البادرات، حُضّر المعلق البوغي من مزارع فطرية متبوغة بإضافة 10 مل ماء توين (ماء مقطر معقم مضافاً إليه 0.05 80 Tween%) لكل طبق بتري. كُشِطَ سطح المزرعة الفطرية باستخدام إبرة معقّمة لحصاد أكبر كمية من الأبواغ، ورشّحت عبر ورق ترشيح للتخلص من قطع المشيجة وبقايا الوسط المغذي في حال وجودها. ووضعت على رجّاج كهربائي مدّة 15 دقيقة لتجانس المعلّق. حُسب تركيز المعلّق باستخدام شريحة مالاسييه Malassez counting chamber وضُبط إلى التركيز المطلوب (4.9×10^7 بوغ/ مل) وهو التركيز المنصوح به مرجعياً. جرى التحقق من حيوية الأبواغ وقدرتها على الإنبات بنشر 100 ميكروليتر من المعلق البوغي على وسط PDA وتحضينه على الدرجة 25 ± 2 °س لمدة 24 ساعة. حُسبَت النسبة المئوية لإنبات الأبواغ بالعد العشوائي لما لا يقل عن 300 بوغاً لكل ساحة رؤية تحت المجهر، وثلاث ساحات رؤية لكل معلّق. عُدّ البوغ منبتاً في حال كان طول أنبوبة الإنبات أكبر من نصف طول قطر البوغة. واستخدمت المعلقات البوغية التي تزيد حيوية الإنبات فيها عن 90 %، وهذا الأمر كان محققاً في جميع العزلات (Inglis *et al*., 2012).

نُفّذت معاملة ري البادرات باستخدام بادرات بعمر 14 يوماً، وذلك برَي تربة وجذور كل بادرة بـ 10 مل من المعلّق البوغي ضمن البيت المحمي وفق كل من Pus (2017) و Donga *et al.* (2018). وقُدّمَت عمليات العناية المطلوبة للنباتات من ري وتسميد بشكل دوري. أنجزَت التجربة بواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة والمكرر عبارة عن نبات واحد. وطبّقَت معاملات الشاهد لكلتا طريقتي التلقيح بدون الفطر المدروس. أخذت القراءات مرتين، بعد 30 و60 يوماً من بدء التجربة، لتحديد نمو ومثابرة الفطر داخل النبات. جُمعَت عينات من تربة البيت المحمي قبل البدء بالمعاملات من عدّة مواقع عشوائياً، ونقلت إلى المختبر حيث طبّقت طريقة الغاليريا كمصيدة GBM وذلك لتحديد وجود أو عدم وجود الفطر *B. bassiana* في التربة قبل المعاملات. وأعيدت الخطوة عند كل قراءة من التربة المحيطة بجذور النباتات. وعُرّف الفطر مورفولوجياً كالسابق.

تقصي استيطان الفطر

أجري تقييم استيطان الفطر *B. bassiana* للأجزاء الهوائية من نبات الخيار (ورقة، وعنق ورقة، وساق) لتحديد الانتقال الجهازي للفطر من مكان الإلقاح (البذور أو الجذور) إلى المجموع الخضري. في كل قراءة، أخذت عشوائياً من كل نبات أوراق مع أعناقها وأجزاء من السوق، ووضعت في أكياس بولي إيتيلين شفافة محكمة الإغلاق ونُقِلَت إلى المختبر لدراستها.

غُسِلَت هذه الأجزاء بماء الصنبور، ثمّ عُقّمت سطحياً بغمرها في محلول هيبوكلوريت الصوديوم 2.5 % لمدّة ثلاث دقائق، ثمّ كحول إيتيلي 70 % لمدّة دقيقة، وغُسلَت بالماء المقطر المعقّم ثلاث مرّات متتالية، دقيقتين في كل مرّة. زُرِع 100 ميكروليتر من ماء الغسل الأخير على وسط PDA وحُضّن على الدرجة 25 ± 2 °س لمدّة أسبوعين للتأكد من كفاءة عملية التعقيم السطحي التي تعد فعّالة في حال عدم وجود أي نمو فطري.

بعد التعقيم السطحي، قطّعت أجزاء من الأوراق وأعناق الأوراق والسوق إلى قطع صغيرة (بطول حوالي 4 مم للسوق وأعناق الأوراق وبقطر 1 سم للأوراق)، باستخدام مشرط معقّم ومسبار معقّم. اختيرت القطع عشوائياً وزرعت على وسط PDA بمعدّل 6 قطع لكل طبق بتري (9 سم)، وحُضّنت في الظلام على الدرجة 25 ± 2 °س لمدّة 21 يوماً. فُحصَت الأطباق دورياً لمراقبة النمو الفطري. وعند ظهور أي نمو فطري، نُقل جزء من طرف النمو إلى طبق جديد وحُضّن وفُحص بعد ذلك مجهرياً (Posada *et al*., 2007).

حُسبَ استيطان الأجزاء النباتية المدروسة باستخدام المعادلة (Petrini and Fisher, 1986):

الاستيطان % = (عدد القطع النباتية المغطاة بالنمو الفطري/ العدد الكلي للقطع) × 100.

أجريت مقارنة بين طريقتي الإلقاح المستخدمتين في الدراسة وقدرة الفطر على النمو داخل الأجزاء النباتية المختلفة من خلال اعتبار جميع العزلات المستخدمة معاملة واحدة والمتغير هو الجزء النباتي وطريقة الإلقاح فقط.

وحدّدت الأجناس الفطرية الأخرى التي ظهرت على القطع النباتية، وحُسب ترددها كنسبة مئوية من أصل 396 قطعة نباتية لكل جزء نباتي مدروس وفق طريقتي التلقيح ولكل تاريخ قراءة على حدة. عُرّفت الأجناس الفطرية وفق عددٍ من المفاتيح التصنيفية (Barnett and Hunter, 1972; Barron, 1972; Von Arx, 1981; Gerlach and Nirenberg, 1982). استمرّت مراقبة النباتات طوال فترة التجربة مقارنةً مع الشاهد لملاحظة وجود أية أعراض مرضية للفطر على النبات.

التحليل الإحصائي

استُخدِم البرنامج CoStat لإجراء التحليل الإحصائي، وزرعت النباتات بطريقة القطاعات العشوائية الكاملة. أجري اختبار التباين one-way ANOVA (Analysis of Variance) في كل قراءة لكل جزء نباتي مدروس وحُسبَت الفروق المعنوية بين العزلات باستخدام اختبار Duncan's عند مستوى معنوية $P \leq 0.05$. حُسب الانحراف المعياري SD (Standard Deviation). بينما حُسبت الفروق المعنوية بين طريقتي الإلقاح المتّبعتين (ري البادرات وتعفير البذار) في كل قراءة باستخدام اختبار أقل فرق معنوي LSD (Least Significant Difference) عند مستوى معنوية $P \leq 0.05$. كذلك استخدم اختبار أقل فرق معنوي LSD لحساب الفروق في تردّد الأجناس الفطرية المرافقة عند مستوى معنوية $P \leq 0.05$.

النتائج والمناقشة

نمو الفطر *Beauveria bassiana* داخل أنسجة نبات الخيار في البيت المحمي

بيّنت النتائج تمكّن جميع عزلات الفطر *B. bassiana* وفي كلتا طريقتي الإلقاح من النمو داخل الأجزاء الهوائية لنبات الخيار في البيت المحمي، إذ ثبت وجوده داخل كل من الساق والأوراق وأعناق الأوراق بعد شهر على الأقل من الدراسة

وبتفاوت بين العزلات المدروسة. في حين لم يظهر الفطر في أي من نباتات الشاهد أو في البذور التي نُمّيَت على الوسط الغذائي PDA، وهذا يدل على أنّ وجود الفطر في القطع النباتية مرتبط بعملية التلقيح الصنعي وليس نتيجة تلوّث أو نتيجة وجوده مسبقاً في البذور المستخدمة. كما لم يظهر الفطر في ماء الغسل الأخير وهو دليل نجاح عملية التعقيم السطحي، وإثبات أنّ الفطر داخلي النمو (الشكل 2).

أظهرت نتائج معاملة تعفير البذور أنّ العزلتين B240 وB186 أعطتا أعلى نسب استيطان في الساق دون فروق معنوية عن العزلتين B202 وB195، إذ وصلت نسب الاستيطان بعد 30 يوماً من المعاملة إلى 66.66 و53.33 و44.44 و38.88 %، على التوالي، وبفرق معنوي عن بقية العزلات. بينما كانت العزلتان B221 وB239 هما الأقل معنوياً بنسبة استيطان بلغت 5.55 % لكل منهما. وانخفضت نسب الاستيطان بعد 60 يوماً من المعاملة بشكل واضح (الجدول 2). بينما لم توجد فروق معنوية بين العزلات من حيث النمو داخل الورقة، وكان الاستيطان الأعلى ظاهرياً في العزلات B240 و B100وB195 وB202 بنسب بلغت 86.66 و83.33 و83.33 و83.33 %، بعد 30 يوماً من المعاملة على التوالي. ويُذكر أنّ العزلة B221 لم تنمو على أي قطعة للورقة بعد 60 يوماً من المعاملة.

كما أظهرت النتائج استيطان عنق الورقة بنسب وصلت إلى 100% و72.2 % بعد 30 و60 يوماً من المعاملة بالعزلة B100، وبدون فروق معنوية عن العزلات B240 وB195 وB202 وB203. بينما أعطت العزلة B239 أقل نسبة استيطان وكانت 5.55 % (الجدول 2).

وفي معاملة ري البادرات، تفوّقت العزلتان B240 وB195 في استيطان الساق على بقية العزلات بنسب بلغت 44.44 % لكل منهما بعد 30 يوماً من المعاملة، ووصلت إلى 41.27 و38.88 %، على التوالي بعد 60 يوماً من المعاملة. بينما لم تُظهِر العزلتان B239 وB221 أي نمو داخل الساق في معاملة ري البادرات، وكذلك أبدتا نمواً ضعيفاً معنوياً في كل من الورقة وعنق الورقة، إذ كانت نسب الاستيطان في الورقة على التوالي 22.22 و5.55 % بعد 30 يوماً من المعاملة، و11 و0 % بعد 60 يوماً من المعاملة. وكانت 11.11 و5.55 %، على التوالي في عنق الورقة بعد 30 يوماً من المعاملة، و5.5 و0 % بعد 60 يوماً. وأدّت العزلات B195 وB240 وB100 وB83 إلى أعلى استيطان للورقة بنسب بلغت على التوالي 88.88 و77.77 و77.77 و72.22 % بعد 30 يوماً من المعاملة. وكانت العزلتان B100 وB195 هما الأعلى في النمو داخل عنق الورقة بنسب بلغت 88.88 و72.21 % بعد 30 يوماً من ري البادرات على التوالي (الجدول 3).

جاءت نتائج هذه الدراسة لتؤكّد وتُكمِل نتائج التجربة المخبرية التي أجريناها سابقاً، واستُخدِمَت فيها العزلة B195 بخمس طرائق إلقاح مختلفة (وهي تعفير البذار، ونقع البذار، وري التربة، وري البادرات، ورش البادرات)، والتي أظهرت أنّ ري التربة بعد الزراعة مباشرةً ونقع البذور بالمعلّق البوغي أدّتا إلى أعلى نسب استيطان مخبرياً بدون فرق معنوي عن معاملة التعفير (Rajab *et al*., 2020).

وبنتيجة الدراسة الحالية تبيّن أن بعض العزلات المستخدمة من الفطر *B. bassiana* كانت واعدة حقلياً في النمو داخل نبات الخيار، إذ أدّت العزلة B100 إلى نسب استيطان وصلت إلى 100 %، بينما أظهرت عزلات أخرى قدرة أقل على النمو داخل الخيار، فلم تتمكن العزلة B221 من استيطان الأجزاء الهوائية في معظم الحالات. ومن المعروف تفاوت سلالات وعزلات النوع *B. bassiana* في أدائها وخصائصها نظراً للتنوع الوراثي الكبير ضمن النوع (Meyling and Eilenberg, 2007). وفي هذا السياق، لم تتجاوز نسب استيطان الفطر *B. bassiana* لأنسجة البندورة في دراسة Omukoko and Turoop (2017) 5 % في مختلف أجزاء النبات، وفشلت بعض العزلات في التعايش داخل نبات البندورة؛ في حين أثبت Gurulingappa *et al.* (2010) استيطان نبات البندورة بالفطر

B. bassiana بنسب عالية تراوحت بين 44 و91 %. كما كانت نسب استيطان البندورة بعزلات أخرى من الفطر *B. bassiana* أعلى من 40 % في دراسة Resquin- Romero *et al.* (2016).

وتتفاوت عزلات النوع *B. bassiana* فيما بينها أيضاً من ناحية الانتقال الجهازي أو الاستيطان الموضعي (Card *et al.*, 2016)، وفي هذه الدراسة أبدت جميع العزلات المستخدمة انتقالاً جهازياً من مكان المعاملة (الجذور أو البذور) إلى الأجزاء الهوائية للنبات، الأمر الذي قد يسهّل لاحقاً عمل الفطر في خفض الإصابة بالحشرات الضارة من خلال استخدام آلية التطفل المباشر بالإضافة إلى آليات العمل الأخرى من إنتاج المستقلبات الثانوية وتحفيز المقاومة الجهازية وغيرها (Ownley *et al.*, 2010). كما يُعَد بقاء العزلات الفطرية داخل النبات لمدّة لا تقل عن 60 يوماً، وهي مدّة التجربة، أحد المؤشرات الهامة التي تشجّع على استخدام الفطر بالطريقة المستدامة في مكافحة الآفات طيلة موسم نمو النبات (Bing and Lewis, 1992).

الجدول (2): نمو عزلات محلية من الفطر *B. bassiana* داخل الأجزاء الهوائية لنبات الخيار بعد معاملة تعفير البذور

العزلة	متوسط نسبة الاستيطان (%) ± SD					
	ساق		ورقة		عنق ورقة	
	بعد 30 يوماً	بعد 60 يوماً	بعد 30 يوماً	بعد 60 يوماً	بعد 30 يوماً	بعد 60 يوماً
B83	25.4 ± 22.22cd*	19.2 ± 22.22abc	13.4 ± 75.55a	16.6 ± 49.99a	16.6 ± 49.99bc	9.6 ± 38.88abcd
B100	9.6 ± 22.22cd	9.6 ± 11.106bc	28.8 ± 83.33a	25.4 ± 55.55a	0 ± 100a	9.6±72.2a
B157	28.8 ± 33.33bcd	25.4 ± 27.22abc	48.1 ± 55.55ab	38.4 ± 44.44ab	41.9± 38.88bcd	34 ± 27.77bcd
B186	5.7 ± 53.33 ab	13.4 ± 47.77a	25.5 ± 61.06a	9.6 ± 55.55a	16.6 ± 16.66cd	9± 11.1d
B195	9.6 ± 38.88 abc	16.7 ± 16.66bc	16.7 ± 83.33a	25.6 ± 61.106a	9.6 ± 72.22ab	16.6 ± 33.3bcd
B202	9.6 ± 44.44 abc	9.6 ± 38.88ab	16.6 ± 83.33a	16.7 ± 33.33ab	25 ± 61.106abc	9.6 ± 55.55ab
B203	9.6 ± 22.22 cd	9.6 ± 11.106bc	9.6 ± 55.55ab	25.4 ± 27.77ab	25.4 ± 61.106abc	19 ± 38.88abcd
B221	9.6 ± 5.55d	9.6 ± 5.55c	9.6 ± 5.55b	0b	16.7 ± 33.33bcd	9.6 ± 11.1d
B239	9.6 ± 5.55d	19.2 ± 11.11bc	53.7 ± 38.88ab	41.9 ± 44.44ab	9.6 ± 5.55d	28 ± 16.66cd
B240	16.6 ± 66.66a	16.6 ± 49.99 a	23.09 ± 86.66a	16.6 ± 66.66a	38.4 ± 77.77ab	28.8 ± 49.9abc
LSD 5%	26.098	26.907	48.539	42.1018	40.144	33.984
p	=0.0013	=0.0152	=0.0461	=0.1174	=0.0025	=0.0193

*: الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد تدل على وجود فروق معنوية بين العزلات وفق اختبار Duncan (P≤0.05).

الجدول (3): نمو عزلات محلية من الفطر *B. bassiana* داخل الأجزاء الهوائية لنبات الخيار بعد معاملة ري البادرات

العزلة	متوسط نسبة الاستيطان (%) ± SD					
	ساق		ورقة		عنق ورقة	
	بعد 30 يوماً	بعد 60 يوماً	بعد 30 يوماً	بعد 60 يوماً	بعد 30 يوماً	بعد 60 يوماً
B83	9.6 ± 11.106cde*	0 ± 0d	9.6 ± 72.22ab	16.7 ± 16.66de	9.6 ± 55.55bc	16.7 ± 66.66ab
B100	9.6 ± 38.88ab	9.6 ± 22.216b	9.7 ± 77.77ab	9.6 ± 55.55ab	9.6 ± 88.88a	9.6±72.2a
B157	9.6 ± 22.22bcd	9.4 ± 11.1bcd	9.6 ± 61.11bc	9.6 ± 55.55ab	9.8± 55.55bc	9.6 ± 27.77cd
B186	9.7 ± 27.77 abc	9.7 ± 5.55cd	16.6 ± 49.99c	9.6 ± 38.88bc	16.7 ± 33.33cd	16.7± 33.33c
B195	9.6 ± 44.44 a	9.6 ± 38.88a	9.7 ± 88.88a	8.6 ± 72.22a	9.6 ± 72.21ab	9.2 ± 44.44bc
B202	9.6 ± 5.55 de	0 ± 0d	9.6 ± 44.44cd	9.7 ± 27.77cd	25.4 ± 44.44c	25.5 ± 44.38bc
B203	9.6 ± 11.106 cde	16.7 ± 16.61bc	9.6 ± 27.77de	3.85 ± 37.77bc	9.4 ± 44.44c	13.3 ± 52.36abc
B221	0e	0 ± 0d	9.6 ± 5.55f	0d	9.7 ± 5.55e	0 ± 0e
B239	0e	0 ± 0d	9.8 ± 22.22ef	9.6 ± 11de	19.2 ± 11.11de	9.5 ± 5.5de
B240	19.2 ± 44.44a	8.3 ± 41.27 a	9.2 ± 77.77ab	9.6 ± 55.55ab	9.6 ± 55.55bc	9. ± 38.88c
LSD 5%	17.187	14.43	23.749	16.5	23.749	23.159
p	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

*: الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد تدل على وجود فروق معنوية بين العزلات وفق اختبار Duncan (P≤0.05).

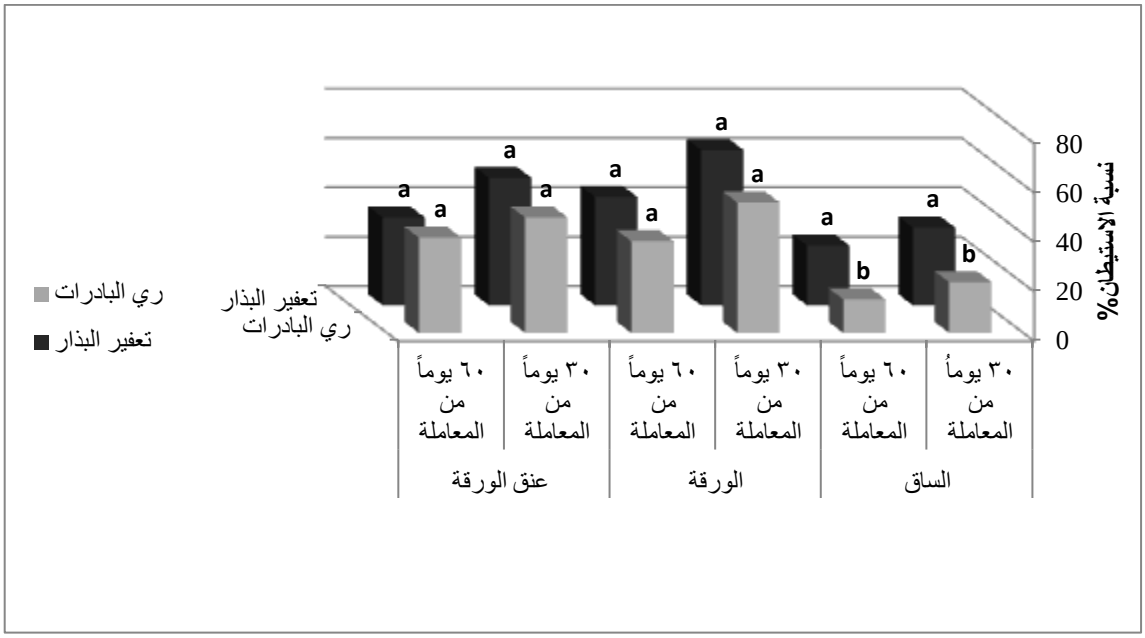
تأثير طريقة الإلقاح والجزء النباتي على نسبة استيطان الفطر *B.bassiana* لنبات الخيار في ظروف البيت المحمي

عند إجراء مقارنة بين طريقتي الإلقاح المستخدمتين لكافة العزلات معاً، لم تظهر فروق معنوية بينهما إلا في معاملة الساق وبلغت 31.44 و20.55 % بعد 30 يوماً من تعفير البذار وري البادرات، على التوالي، ووصلت إلى 24.22 و13.56% بعد 60 يوماً من المعاملات على التوالي (الشكل 1). كما وجد اختلاف في نمو الفطر تبعاً للجزء النباتي، فكانت نسبة استيطان الورقة وعنق الورقة أكبر من نسبة استيطان الساق بشكل معنوي، وكانت على التوالي 52.77 و46.66 و20.55 % بعد 30 يوماً من ري البادرات، و62.88 و51.66 و31.44 %، بعد 30 يوماً من تعفير البذار (الشكل 1).

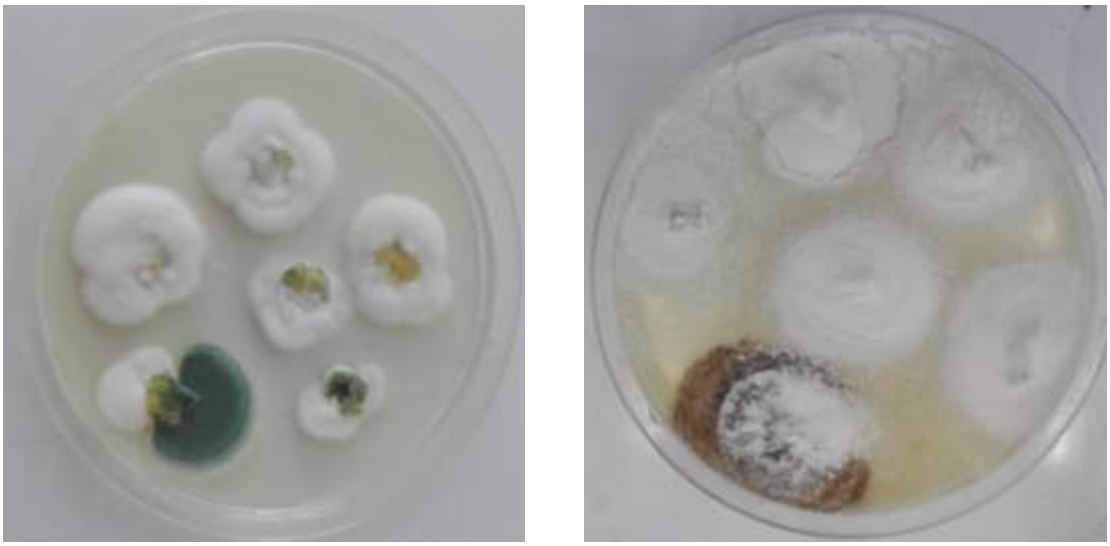
ويمكن أن تختلف نسبة الاستيطان تبعاً للجزء النباتي، إذ تراوح استيطان جذور الملفوف *Brassica oleracea* var. *capitata* L. بالفطر *B. bassiana* بين (57 و58%)، بينما تراوح بين (8 و17 %) بالنسبة للأوراق (Pus, 2017) . وقد تؤثر طريقة الإلقاح تأثيراً كبيراً في نجاح الاستيطان، إذ كانت نسبة النمو داخل أنسجة نبات البطاطا *Solanum tuberosum* L. بالفطر *B. bassiana* 50% عند معاملة الدرنات، بينما وصلت إلى 100% عند معاملة الأوراق (Alsaoud *et al*., 2017).

وتتفاوت النتائج تبعاً لعوامل عديدة، فاستخدم Ramakuwela *et al.* (2020) طريقة تعفير البذار كإحدى المعاملات لتلقيح جوز البيكان (*Carya illinoinensis*) pecan بالفطر *B. bassiana* وكانت الأقل معنوياً من حيث نسبة الاستيطان (16 %) مقارنةً مع طريقتي نقع البذور بالمعلق البوغي (50 %) وطريقة ري التربة (45 %)، بينما كانت هذه الطريقة في تلقيح النبات بالفطر فعالة في دراسة Rajab *et al.* (2020) ولم يوجد فروق بينها وبين طريقة نقع البذور في تلقيح الخيار، كما كانت فعالة في الدراسة الحالية في إيصال الفطر إلى أجزاء النبات المختلفة.

وتعد قدرة الفطر *B. bassiana* على استيطان أنسجة النباتات المختلفة من طرائق المكافحة الواعدة التي يعوّل عليها في المستقبل القريب لخفض كثافة مجتمعات الآفات، وتجرى حالياً أبحاث عديدة حول العالم لتحقيق هذه الغاية على مرحلتين، المرحلة الأولى هي التأكد من حدوث التعايش دون أي آثار سلبية على النبات (Alsaoud *et al*., 2017; Omukoko and Turoop, 2017; Donga *et al.*, 2018)، والمرحلة الثانية هي تأثير هذا التعايش في خفض الإصابة بالآفات المختلفة (Bing and Lewis, 1992; Gurulingappa *et al.*, 2010). ويعد البحث الحالي نواة للعمل في المرحلة الثانية.



الشكل (1): مقارنة بين طريقتي إلقاح نبات الخيار بالفطر *Beauveria bassiana* من حيث استيطان كل من الساق والورقة وعنق الورقة (الأحرف الصغيرة المختلفة تدل على فروق معنوية ضمن كل قراءة على حده وفق اختبار One-Way Anova وأقل فرق معنوي LSD عند معنوية ($P\leq0.05$).



الشكل (2): عزل الفطر *B. bassiana* من ساق (اليمين) وأوراق (اليسار) نبات الخيار بنتيجة الإلقاح الصنعي تحت ظروف البيت المحمي على وسط PDA

الأجناس الفطرية المرافقة:

أظهرت نتائج الدراسة وجود ستة أجناس فطرية داخل نبات الخيار أثناء عزل الفطر *B. bassiana* بما فيها نباتات الشاهد. وقد ظهرت بتردّد أقل معنويةً مقارنةً بالفطر المدروس *Beauveria* بعد 30 يوماً من المعاملة، والذي ظهر بنسبة إجمالية بلغت 44.36 %، تلاه معنوياً كل من الفطرين *Penicillium* و*Aspergillus* بنسب وصلت إلى

23.56 و21.1 %، على التوالي. أما بعد 60 يوماً من المعاملة لم تظهر فروق معنوية بين الأجناس الثلاثة بنسب تردد بلغت على التوالي 32.2 و29.5 و30.7 % (الجدول 4).

والجدير ذكره أن الفطر *Beauveria* لم يظهر في عينات التربة التي جمعت قبل بدء المعاملات، وظهر في معظم العينات التي أُخذَت عند كل قراءة باستثناء معاملتَي الشاهد، ما يدل على أنّ الفطر *Beauveria* المعزول من النبات وجد بنتيجة عملية التلقيح ولم يكن موجود مسبقاً في تربة البيت المحمي. كما يدل ذلك على أن النوع *B. bassiana* استطاع استيطان التربة المحيطة بالجذور والبقاء فيها بشكل رميّ.

لم يُعزل الجنس *Fusarium* في كلتا القراءتين إلا من الساق وبنسبة بلغت 10.1 و13.6 % بعد 30 وبعد 60 يوماً من المعاملة، على التوالي. وعُزل الفطر *Colletotrichum* بعد 60 يوماً، ومن جميع الأجزاء المدروسة بنسب بسيطة وصلت إلى 0.7 و2.5 و1.5 % لكل من الساق والورقة وعنق الورقة، على التوالي، ولم يظهر في القراءة الأولى. ولم يُعزل الفطران *Alternaria* و*Cladosporium* من الساق في هذه الدراسة (الجدول 4).

قد تكون بعض الأنواع التابعة لهذه الفطريات الداخلية رميّة تتغذى على الأجزاء النباتية التي أصبحت في طور الشيخوخة كالأوراق التي ستنفصل عن النبات، بينما يكون بعضها الآخر مفيداً للنبات سواءً في تعزيز نموه أو في مكافحة ممرضات النبات الفطرية، وقد يكون بعضاً منها ممرضاً أو كامناً في النبات (Wilson, 1993; Wilson, 1995; Schulz *et al.*, 1998). لم تظهر أية أعراض مرضية عموماً على النباتات خلال فترة التجربة في الدراسة الحالية. ويتزايد عدد الدراسات التي تهتم بدور الفطريات الداخلية الموجودة طبيعياً في النبات، ومنها الدراسة التي أجراها Hamayun *et al.* (2010) وأثبتوا من خلالها أنّ الفطر *Cladosporium* sp. المعزول من الخيار كان عاملاً معززاً لنمو النبات. وبرهن Waqas *et al.* (2012) أن تعايش كلاً من النوعين *Phoma glomerata* و*Penicillium* sp. مع نبات الخيار أدّى إلى زيادة الكتلة الحيوية للنبات ومؤشرات نموه، وحسّن من امتصاص البوتاسيوم والكالسيوم والمغنزيوم مقارنةً بالشاهد ضمن ظروف زيادة الملوحة، وخفّض سمية الصوديوم. كما أشار Huang *et al.* (2020) إلى إمكانية استخدام المتعايشات الداخلية في المكافحة الحيوية لأمراض الخيار الفطرية الساكنة في التربة. وأثبت Halo *et al.* (2020) أنّ النوع *Cladosporium omanense* المعزول من نبات الخيار ساهم في مكافحة الفطر *Pythium aphanidermatum* المسبب لمرض سقوط البادرات المفاجئ Damping off عند الخيار. كذلك توصّل Syamsia *et al.* (2021) إلى أنّ النوعين *Penicillium allahabadense* و*Aspergillus foetidus* المعزولين داخلياً من الخيار كانا عاملان معززان لمؤشرات النمو عند النبات. وتجدر الإشارة إلى ضرورة الاهتمام بتحديد الفطريات المرافقة الموجودة داخل النبات المعامل بالفطر المدروس لأنها قد تؤثر بطريقةٍ أو أخرى على عمل الفطر داخل النبات.

الجدول (4): تردّد الأجناس الفطرية داخل نبات الخيار بنتيجة العزل في طريقتي ري البادرات وتعفير البذور معاً

الجنس الفطري	عدد القطع النباتية التي ظهر عليها الفطر N والنسبة المئوية للتردد %															
	بعد 30 يوماً من المعاملات						الإجمالي		بعد 60 يوماً من المعاملات						الإجمالي	
	الساق		الورقة		عنق الورقة		n^{+}	%	الساق		الورقة		عنق الورقة		n	%
	N^{*}	%	N	%	N	%			N	%	N	%	N	%		
Alternaria	0	0	15	3.8	9	2.3	24	$2c^{\infty}$	0	0	10	2.5	4	1.01	14	1.17b
Aspergillus	100	25.3	66	16.7	85	21.5	251	21.1b	150	37.9	124	31.3	91	22.9	365	30.7a
*Beauveria***	103	26	229	57.8	195	49.2	527	44.36a	75	18.9	161	40.6	147	37.1	383	32.2a
Cladosporium	0	0	3	0.8	2	0.5	5	0.4c	0	0	5	1.3	4	1.01	9	0.75b
Colletotrichum	0	0	0	0	0	0	0	0c	3	0.7	10	2.5	6	1.5	19	1.59b
Fusarium	40	10.1	0	0	0	0	40	3.36c	54	13.6	0	0	0	0	54	4.54b
Penicillium	68	17.2	122	30.8	90	22.7	280	23.56b	101	25.5	134	33.8	116	29.3	351	29.5a
LSD 5%								12.79								10.95
p								<0.0001								<0.0001

***: تمثّل N عدد القطع النباتية التي ظهر عليها الفطر من أصل 396 قطعة لكل جزء نباتي. **: الفطر *Beauveria* ظهر بنتيجة التلقيح ووضع هنا للمقارنة مع الأجناس الفطرية الأخرى من حيث نسبة التردد الإجمالية. +: تمثّل n عدد القطع النباتية الإجمالية التي ظهر عليها الفطر من أصل إجمالي 1188 قطعة في كل موعد قراءة. ∞: الحروف المختلفة ضمن العمود تدل على وجود فروق معنوية بين الأجناس الفطرية من حيث التردد وفق اختبار One-Way Anova وأقل فرق معنوي LSD عند معنوية (P≤0.05).**

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

وفقاً للنتائج التي وصلت إليها الدراسة الحالية، نستنتج ما يلي:

1. يمكن للفطر *Beauveria bassiana* المعزول محلياً أن ينمو داخل الأجزاء الهوائية لنبات الخيار في البيوت المحمية وذلك بتلقيح البذار وبمعاملة تربة البادرات.
2. تتفاوت عزلات الفطر *B. bassiana* في قدرتها على استيطان نبات الخيار حقلياً وتتراوح من 0 وحتى 100% حسب العزلة والجزء النباتي.
3. يمكن للفطر *B. bassiana* أن ينتقل من مكان المعاملة (بذور وتربة وجذور) إلى أجزاء النبات الأخرى جهازياً.
4. يستطيع الفطر *B. bassiana* البقاء داخل نبات الخيار في البيت المحمي لمدة تصل حتى 60 يوماً، وينخفض الاستيطان مع الزمن.

التوصيات

بنتيجة هذا البحث نوصي بمتابعة العمل على دراسة دور تعايش الفطر *B. bassiana* في حماية الخيار من الآفات الحشرية التي تهاجمه في البيوت المحمية باستخدام العزلات التي أبدت كفاءة أعلى في الاستيطان ودور هذه الطريقة في تسهيل إدخال الفطر *B. bassiana* في برامج المكافحة المتكاملة. والبحث في إمكانية تعزيز نمو النبات عند التلقيح بالفطر المدروس.

References

[1] Alsaoud, N. A; Nammour, D. A; Ali, Y. A. *The endophytic ability of Beauveria bassiana (Balsamo) Vuill. in potato plant Solanum tuberosum L.* Al Baath Univ. J. 39, 2017, 139–168.

[2] Arnold, A. E. *Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers*. Fungal biology reviews, 21, 2007, 51-66.

[3] BARNETT, H. and HUNTER, B. *Illustrated Genera of impact fungi.* 3th. Ed. Burgess Publishing Company, USA, 1972, 215pp.

[4] BARRON, G. L. *The Genera of Hyphomycetes from Soil.* Robert E. Krieger Publishing Company, USA, 1972, 364pp.

[5] Begum, S. R. and Tamilselvi, K. *Endophytes are plant helpers: an overview.* Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 5, 2016, 424-436.

[6] Bills, G. F. and Polishook, J. D. *Microfungi from Carpinus caroliniana.* Canadian Journal of Botany, 69, 1991, 1477-1482.

[7] Bing, L. A. and Lewis, L. C. Endophytic Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and Ostrinia nubilalis (Hu¨bner). Biocontrol Sci. Technol, 1992, 2: 39–47.

[8] Card, S; Johnson, L; Teasdale, S; Caradus, J. *Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents.* FEMS microbiology ecology. 92 (8), 2016, 1-19.

[9] Dara, S. K; Dara, S. R; Dara, S. S. *Endophytic colonization and pest management potential of Beauveria bassiana in strawberries*. Journal of Berry Research, 3, 2013, 203-211.

[10] Donga, T. K; Vega, F. E; Klingen, I. *Establishment of the fungal entomopathogen Beauveria bassiana as an endophyte in sugarcane, Saccharum officinarum.* Fungal Ecology, 35, 2018, 70-77.

[11] GERLACH, W. and NIRENBERG, H. *The genus Fusarium- a Pictorial Atlas* 2nd ed., Berlin, 1982, 404pp.

[12] Goettel, M. S; Hajek, A. E; Siegel, J. P; Evans, H. C. *Safety of fungal biocontrol agents.* Fungi as biocontrol agents, progress, problems, and potential, 2001, 347-375.

[13] Gurulingappa, P; Sword, G. A; Murdoch, G; Mcgee, P. A. *Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta*. Biol. control., 55, 2010, 34–41.

[14] Halo, B. A; Al-Yahyai, R. A. and Al-Sadi, A. M. *Biological control of Pythium aphanidermatum-induced cucumber and radish damping-off by an endophytic fungus, Cladosporium omanense isolate 31R.* Biocontrol Science and Technology, 2020, 1-17.

[15] Hamayun, M; Khan, S. F; Khan, A. L; Rehman, G; Kim, Y; Iqbal, I; Hussain, J; Sohn, E; Lee, I. *Gibberellin production and plant growth promotion from pure cultures of Cladosporium sp. MH-6 isolated from cucumber (Cucumis sativus L.).* Mycologia, 102 (5), 2010, 989-995.

[16] Hirano, E; Koike, M; Aiuchi, D. and Tani, M. *Pre inoculation of cucumber roots with Verticillium lecanii (Lecanicillium muscarium) induces resistance to powdery mildew.* Res. Bull. Obihiro. Univ. 29, 2008, 82- 94.

[17] Huang, L.-Q; Niu, Y. G; Su, L; Deng, H; Lyu, H. *The potential of endophytic fungi isolated from cucurbit plants for biocontrol of soilborne fungal diseases of cucumber*. Microbiological research, 231, 2020, 1-11.

[18] HUMBER, R. A. *Identification of entomopathogenic fungi.* Manual of techniques in invertebrate pathology, 2012, 151-187.
[19] INGLIS, G. D; ENKERLI, J; GOETTEL, M. S. *Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales.* Manual of techniques in invertebrate pathology, 2, 2012, 18-53.
[20] Klieber, J. and Reineke, A. *The entomopathogen B eauveria bassiana has epiphytic and endophytic activity against the tomato leaf miner Tuta absoluta*. Journal of Applied Entomology, 140, 2016, 580-589.
[21] Lord, J. C. *From MetchnikoV to Monsanto and beyond: The path of microbial control*. Journal of Invertebrate Pathology, 89, 2005, 19–29.
[22] MEYLING, N. V. *Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment*. Manual for isolation of soil borne entomopathogenic fungi, 2007, 18p.
[23] Meyling, N. V. and Eilenberg. J. *Ecology of the entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control*. Biological Control, 43, 2007, 145–155.
[24] Nishi, O; Sushida, H; Higashi, Y; Iida, Y. *Epiphytic and endophytic colonisation of tomato plants by the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana strain GHA.* Mycology, 2020, 1-9.
[25] Omukoko, C. A. and Turoop, L. *Colonization of tomato varieties by Beauveria bassiana isolates in the screen house.* International Journal of Science and Research (IJSR), 6 (7), 2017, 1024- 1028.
[26] Ownley, B. H; Gwinn, K. D; Vega, F. E. *Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution*. BioControl, 55, 2010, 113-128.
[27] PETRINI, O. *Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues*. Microbiology of the Phyllosphere. edited by NJ Fokkema and J. van den Heuvel., 1986.
[28] Petrini, O. and Fisher, P. *Fungal endophytes in Salicornia perennis.* Transactions of the British Mycological Society, 87 (4), 1986, 647-651.
[29] Posada, F; Aime, M. C; Peterson, S. W; Rehner, S. A; Vega, F. E. *Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen Beauveria bassiana (Ascomycota: Hypocreales).* Mycological research, 111, 2007, 748-757.
[30] PUS, W. *Plant-mediated effects of Trichoderma spp. and Beauveria bassiana isolates on insect and pathogen resistance*, Lincoln University, 2017. 62p.
[31] Rajab, L; Ahmad, M; Gazal, I. *Endophytic establishment of the fungal entomopathogen, Beauveria bassiana (Bals.) Vuil., in cucumber plants.* Egyptian Journal of Biological Pest Control, 30, 2020, 1-7.
[32] Ramakuwela, T; Hatting, J; Bock, C; Vega, F. E; Wells, L; Mbata, G. N; Shapiro-Ilan, D. *Establishment of Beauveria bassiana as a fungal endophyte in pecan (Carya illinoinensis) seedlings and its virulence against pecan insect pests.* Biological Control, 140, 2020, 104102.
[33] Rehner, S. A. *Phylogenetics of the insect pathogenic genus Beauveria. Insect-fungal associations*. Ecology and evolution, 3, 2005, 27.
[34] Rehner, S. A; Minnis, A. M; Sung, G-H; Luangsa-Ard, J. J; Devotto, L; Humber, R. A. *Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus Beauveria.* Mycologia, 103, 2011, 1055-1073.

[35] Resquín-Romero, G; Garrido-Jurado, I; Ríos-Moreno, A. and Quesada- Moraga, E. *Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects.* J. Invertebr. Pathol. 136, 2016, 23–31.

[36] Sánchez-Rodríguez, A. R; Raya Dìaz, S; Zamarreño, À. M; Garcìa- Mina, J. M; Carmen Del Campillo, M. and Quesada- Moraga, E. *An endophytic Beauveria bassiana strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (Spodoptera littoralis) larvae*. Biological control, 2017, 1- 14.

[37] Segarra, G; Casanova, E; Bellido, D; Odena, M. A; Oliveira, E. and Trillas, I. *Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with Trichoderma asperellum strain T34.* Proteomics, 7, 2007, 3943–3952.

[38] Schulz, B; Guske, S; Dammann, U. *Endophyte-host interactions. II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction.* Symbiosis, 25, 1998, 213- 227.

[39] Syamsia, S; Idhan, A; Firmansyah, A. P; Noerfitryani, N; Rahim, I; Kesaulya, H. & Armus, R. *Combination on endophytic fungal as the Plant Growth-Promoting Fungi (PGPF) on cucumber (Cucumis sativus).* Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 22(3), 2021, 1194-1202.

[40] Vega. F. E; Meyling, N. V; Luangsa-Ard, J. J; Blackwell, M. *Fungal entomopathogens.* Insect pathology, 2012, 171-220.

[41] Vidal, S. and Jaber, L. R. *Entomopathogenic fungi as endophytes: plant–endophyte–herbivore interactions and prospects for use in biological control.* Current science, 2015, 46-54.

[42] VON ARX, J.A. *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*. 3rd. ed., Germany, 1981, 424pp.

[43] Waqas, M; Khan, A. L; Kamran, M; Hamayun, M; Kang, S; Kim, Y. and Lee, I. *Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress.* Molecules, 17, 2012, 10754- 10773.

[44] Wilson, D. *Fungal endophytes: out of sight but should not be out of mind*. Oikos, 1993, 379-384.

[45] Wilson, D. *Fungal endophytes which invade insect galls: insect pathogens, benign saprophytes, or fungal inquilines?* Oecologia, 103, 1995, 255-260.

[46] Zhao, D; Liu, B; Wang, Y; Zhu, X; Duan, Y; Chen, L. *Screening for nematicidal activities of Beauveria bassiana and associated fungus using culture filtrate.* African Journal of Microbiology Research, 7, 2013, 974-978.

[47] Zimmermann, G. *The 'Galleria bait method'for detection of entomopathogenic fungi in soil.* Journal of applied Entomology, 102, 1986, 213-215.