مقاله تحقیقی

فعالیت ضد قارچی *Beauveria bassiana* در برابر قارچ عامل خشکیدگی شمشاد خزری (*Calonectria pseudonaviculata*)

سیده معصومه زمانی[۱]، سمیرا فراهانی[۲]، ابراهیم زرقانی[۳]، نرگس سپاسی[۴]

۱، ۲، ۴– استادیار، استادیار، پژوهشگر، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
۳– استادیار، ایستگاه تحقیقات منابع طبیعی نوشهر، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، نوشهر، ایران.

مسئول مکاتبات: سیده معصومه زمانی، ایمیل: zamani832003@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۲۴ ۱۰(۱) ۱۲۷–۱۴۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۰

چکیده

شمشاد خزری از ارزشمندترین درختان پهن‌برگ همیشه‌سبز جنگل‌های هیرکانی است و متاسفانه در دهه اخیر به بیماری بلایت ناشی از قارچ *Cylindrocladium buxicola* مبتلا شده است که خطر جدی برای بقا و تولید شمشاد می‌باشد. با توجه به وجود درختان شمشاد در اکوسیستم‌های جنگل و فضای سبز مناطق شهری، باید از ترکیبات ایمن و دوستدار محیط‌زیست برای کنترل بیماری استفاده شود. *Beauveria bassiana* قارچ اندوفیت گیاهی با توانایی بیماریزایی در حشرات است که خواص آن در افزایش رشد گیاهان، کنترل زیستی آفات و محدود کردن فعالیت قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی در چندین گیاه میزبان ثابت شده است. هدف از این مطالعه بررسی پتانسیل برخی از جدایه‌های *B. bassiana* بدست آمده از آفت برگخوار شمشاد (*Cydalima perspectalis*) در کنترل قارچ *C. buxicola* بود. فعالیت آنتاگونیستی چهار جدایه از *B. bassiana* با استفاده از کشت دوگانه در شرایط آزمایشگاهی و همچنین گیاهان با تلقیح قارچ اندوفیت در بذور گیاهان و تلقیح قارچ پاتوژن در برگ‌ها ارزیابی شد. هر چهار جدایه قادر به برقراری ارتباط اندوفیتی روی گیاهچه‌های شمشاد بودند. همه جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی فعالیت ضدقارچی قابل توجهی در برابر *C. buxicola* (۵۳–۸۸٪) نشان دادند. در نتیجه تلقیح قارچ اندوفیت به گیاه، اثر حفاظتی بالایی در برابر قارچ بلایت مشاهده شد و درصد سطح خسارت برگی در گیاهان شمشاد تلقیح شده با قارچ‌های اندوفیت به‌طور معنی‌داری کمتر از گیاهانی بود که فقط توسط پاتوژن تلقیح شده بودند. نتایج این تحقیق مسیر را برای استفاده موثرتر از *B. bassiana* در مدیریت تلفیقی و همزمان آفت برگخوار شمشاد خزری و قارچ عامل بلایت این گیاهان و همچنین افزایش رشد گیاه میزبان هموار می‌کند.

واژه‌های کلیدی: قارچ‌های بیمارگر حشرات، کنترل بیولوژیک، میکروارگانیسم‌های مفید، فعالیت ضد قارچی، *Cylindrocladium buxicola*، *Cydalima perspectalis*

مقدمه

شمشاد خزری (*Buxus hyrcana* Pojark.) از درختان همیشه سبز، ارزشمند و منحصر به فرد جنگل‌های ناحیه رویشی خزری است که به علت تولید چوب با ارزش، متاسفانه همواره بهره‌برداری قرار گرفته است، به‌طوری‌که در فهرست گونه‌های گیاهی در خطر انقراض اتحادیه بین‌المللی حفظ طبیعت (IUCN) قرار دارد. این گونه بومی جنگل‌های ایران از حوالی دوره کرتاسه در دوران مزوزوئیک در جنوب دریای کاسپین تا ارتفاعی از نیمرخ شمالی رشته کوه البرز ظاهر شده است و سابقه پیدایش آن به حدود ۱۳۵

میلیون سال قبل میرسد (Jalili & Jamzad, 1999). این گونه به دلیل اهمیتی که دارد ممنوع القطع است، اما متاسفانه در سال‌های اخیر نیز سطح قابل توجهی از جنگل‌های شمشاد دچار بیماری بلایت یا سوختگی شده است و این خشکیدگی در تمام مراحل زیستی این گونه از نهال تا درخت مسن به‌چشم می‌خورد. این در حالی است که به علت محدود بودن شمشادها چنانچه این گونه نابود شود، یکی از ذخایر گونه گیاهی با ارزش ایران از بین خواهد رفت، از این‌رو چگونگی برونرفت از این مسئله دغدغه اصلی دست‌اندرکاران منابع‌طبیعی کشور می‌باشد. عامل این بیماری به گونه‌ای از قارچ *Calonectria* از خانواده آسکومیست‌ها نسبت داده شده است (*C. pseudonaviculatum*: syn. *Cylindrocladium buxicola*, *C. pseudonaviculata*) که تک میزبانه و دارای چرخه‌های بیماری کوتاه و سریعی (کمتر از یک هفته) بوده و وقوع آن سبب ایجاد حالت سوختگی در برگ شمشاد، توسعه آن موجب خزان درخت و استمرار آن در چند سال متوالی منجر به خشکیدگی درخت خواهد شد (Henricot *et al.*, 2000). این بیماری اولین بار در سال ۱۳۹۰ در شمشادستان‌های جنگل‌های آستارا مشاهده شد و از همان زمان به‌سرعت در سطح وسیعی از گستره پوشش درختان شمشاد در جنگل‌های هیرکانی شیوع یافت (Mirabolfathy *et al.*, 2013). بروز این بیماری و خطر انقراض گونه شمشاد ضرورت برنامه‌ریزی و تدوین راهبردهای مناسب برای مبارزه با این بیماری را ایجاب می‌کند. با توجه به وجود درختان شمشاد در اکوسیستم طبیعی و نیز در فضای سبز و مناطق شهری، باید از ترکیبات ایمن و دوستدار محیط زیست در جهت کنترل این بیماری استفاده نمود. در این راستا، کنترل بیولوژیکی بیماری‌ها با استفاده از عوامل میکروبی با توجه به در دسترس بودن عواملی مانند قارچ‌ها، مخمرها، باکتری‌ها و ایمنی آنها برای انسان و محیط‌های طبیعی و نیز عدم ایجاد جدایه‌های مقاوم پاتوژن، نسبت به قارچ‌کش‌های شیمیایی مزیت‌های فراوانی دارد.

در سال‌های اخیر، به‌دلیل کاربرد رو به رشد این گروه از بیمارگرها به‌دلیل نداشتن خطر برای انسان و محیط زیست، شناسایی این عوامل بسیار اهمیت یافته است. امروزه، بازارهای جهانی تمایل فزاینده‌ای به استفاده از عوامل کنترل بیولوژیکی به عنوان جایگزینی برای آفت‌کش های سنتز شده شیمیایی نشان داده‌اند (Bailey *et al.*, 2010). بسیاری از میکروارگانیسم‌ها وجود دارند که در حال حاضر به عنوان آفت‌کش‌های زیستی استفاده می‌شوند، زیرا آنها یک سری مزایای اضافی و بیش از عملکردِ هدف خود را ارائه می‌دهند (Glare *et al.*, 2012). در این میان قارچ‌های بیمارگر حشرات مهم‌ترین عوامل کنترل زیستی به‌شمار می‌روند. مطالعات زیادی در نقاط مختلف جهان روی امکان استفاده از این قارچ‌ها به‌صورت اپی‌فیت به منظور مبارزه با حشرات آفت و در مقیاس کوچک‌تر، در برابر بیمارگرهای گیاهی صورت گرفته است (Lozano–Tovar *et al.*, 2013, 2017). به‌علاوه، در چند سال اخیر، علاقه فزاینده‌ای برای مطالعه آنها به عنوان اندوفیت‌های عامل بیوکنترل نیز به‌وجود آمده است (Barra–Bucarei *et al.*, 2019).

قارچ‌های اندوفیت به‌عنوان میکروارگانیسم‌هایی تعریف می‌شوند که بیشتر یا تمام چرخه زندگی خود را درون بافت‌های کلونیزه شده گیاه میزبان طی می‌کنند بدون اینکه آسیبی به میزبان وارد نمایند. آنها در اکثر گیاهان در اکوسیستم‌های طبیعی یافت شده و شریک بسیار مهمی برای توسعه گیاهان محسوب می‌شوند. این میکروارگانیسم‌های درون‌زی تعاملات مفیدی با میزبان برقرار می‌کنند (Lareen *et al.*, 2016)؛ به‌طوری‌که فعل و انفعالات آن‌ها به اثرات مفید در گیاهان از نظر رشد گیاه و مدیریت بیماری منجر می‌شود (Khare *et al.*, 2018). از این‌رو، این میکروارگانیسم‌های مرتبط با گیاه را می‌توان به عنوان کودهای زیستی سازگار با محیط زیست در کشت پایدار گیاهان مهم استفاده نمود (Lobo *et al.*, 2019). چنین کاربردهایی از اندوفیت‌ها در سیستم گیاهی، اثرات مفیدی را مانند بهبود جذب مواد مغذی (فسفر و نیتروژن)، افزایش بهره‌وری گیاه، ارتقای رشد گیاهان، جلوگیری از کلونیزه شدن گیاهان توسط میکروارگانیسم‌های انگل خارجی، حذف آلاینده‌های خاک، افزایش تحمل به دمای شدید، تحمل به شرایط شوری و در دسترس قرار دادن آب را ایجاد

می‌نماید (Quesada–Moraga *et al.*, 2009, Ownley *et al.*, 2010, Kauppinen *et al.*, 2016). در دهه اخیر، به دلیل ویژگی‌های مفیدی که این میکروارگانیسم‌ها به میزبان خود می‌دهند مورد توجه فراوان قرار گرفته‌اند (Aly *et al.*, 2010).

چندین مطالعه نشان داده‌اند که قارچ‌های اندوفیت می‌توانند از گیاهان میزبان خود در برابر پاتوژن‌ها و گیاه‌خواران محافظت کنند (Arnold & Lewis, 2005, Ownley *et al.*, 2008). در واقع، گیاه میزبان از تعامل با اندوفیت در ازای منابع مبتنی بر کربن مزایای متعددی دریافت می‌کند (Herre *et al.*, 2007). اندوفیت‌ها می‌توانند برای دوره‌های طولانی از چرخه زندگی خود در بافت‌های گیاهی باقی بمانند، بنابراین از میزبان خود در برابر حملات پاتوژن‌ها و همچنین تغییرات محیطی بالقوه‌ای که می‌تواند بقا و کارایی کنترل زیستی آنها را تهدید کند، محافظت کنند (Card *et al.*, 2016). همچنین می‌توانند فعل و انفعالات بین گونه‌ای ایجاد نموده و محافظت در برابر حمله پاتوژن ها را از طریق مکانیسم‌های مستقیم مانند رابطه رقابت،رابطه انگلی و رابطه آنتی‌بیوز (تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه، آنزیم‌ها یا ترکیبات فرار) و یا مکانیسم‌های غیرمستقیم مانند القای مقاومت ایجاد نمایند (Barra–Bucarei *et al.*, 2019).

در تحقیق حاضر چهار جدایه قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* جدا شده از جنگل‌های هیرکانی از آفت برگخوار شمشاد برای تعیین توانایی آن‌ها در کلونیزاسیون اندوفیتی گیاهان شمشاد استفاده شد. همچنین بررسی شد که آیا حضور آن‌ها در داخل گیاهان می‌تواند باعث کاهش اثرات منفی ناشی از قارچ عامل بلایت (*C. buxicola*) شود.

مواد و روش‌ها

منبع قارچ‌های بیمارگر حشرات، قارچ عامل بلایت شمشاد و بذر شمشاد

قارچ‌های بیمارگر از لاروهای آفت برگخوار شمشاد *Cydalima perspectalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) که از مناطق مختلف جنگل‌های هیرکانی و مستقیماً از شمشاد هیرکانی جمع‌آوری شده بودند، جداسازی شدند. برای این منظور، حشرات آلوده به صورت سطحی استریل شده و در محفظه مرطوب دسیکاتور تا ظهور میسلیوم فعال در حال رشد انکوبه شدند. میسلیوم به‌وجود آمده، به محیط کشت سابوردکستروز آگار (Sabouraud's dextrose agar) حاوی یک درصد عصاره مخمر (محیط SDYA) منتقل شد و سپس جدایه‌های قارچی در محیط‌های انتخابی حاوی ۴۰ گرم گلوکز (glucose)، ۱۰ گرم پروتئوز پپتون (proteose peptone)، ۱۵ گرم آگار (agar)، ۰/۰۱ گرم کریستال ویولت (crystal violet)، سیکلوهگزامید (cyclohexamide) ۰/۵ گرم کلرامفنیکل (chloramphenicol) و یک لیتر آب مقطر باز کشت شدند. تهیه کشت خالص از همه جدایه‌های به‌دست آمده با جداسازی تک اسپور (monosporic cultures) حاصل شد. پس از انجام بررسی‌های میکروسکوپی (Olympus BX51, Japan) و بر اساس کلیدهای شناسایی معتبر (Humber, 1997, Barnett & Hunter, 1998) جدایه‌ها از نظر مورفولوژیکی به عنوان گونه *B. bassiana* شناسایی شدند و بر اساس مطالعات مولکولی این شناسایی تایید شد.

جداسازی قارچ بیمارگر *Cylindrocladium buxicola* از بافت آلوده شمشاد خزری پس از طی مراحل پیش سترون سازی، ضدعفونی نمونه‌هایی از برگ از حدفاصل بافت آلوده و سالم و کشت در محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) صورت گرفت. ایزوله‌های قارچی به‌دست آمده، با توجه به خصوصیات ماکروسکوپی (ریخت‌شناسی، الگوی رویشی و رنگ پرگنه) و میکروسکوپی (خصوصیات کنیدیوم‌ها) و مطابقت این ویژگی‌های ریخت‌شناسی با منابع موجود (Crous, 2002) و نیز با عنایت به توصیف مجدد گونه توسط هنریکات و کالهام (Henricot & Culham, 2002) شناسایی شده و با روش تک اسپور نمودن روی محیط سیب‌زمینی هویج آگار خالص‌سازی شد.

بذر شمشاد از پایه‌های باکیفیت در رویشگاه هیرکانی باغ گیاهشناسی ملی ایران، پس از رسیدن (اوایل تیرماه) جمع‌آوری شده و در فضای انبار خشک شده و در

پاکت‌های کاغذی در سردخانه تا زمان کاشت نگهداری شدند.

ضدعفونی سطحی بذر شمشاد

بذرها طبق روش ارائه شده توسط Ownley *et al.* (2008) ضدعفونی شدند. به این ترتیب که بذرها به مدت یک دقیقه در محلول اتانول ۹۵ درصد و سپس به مدت سه دقیقه در محلول ۱/۵ درصد NaOCl غوطه‌ور شدند. سپس سه بار به مدت یک دقیقه در آب مقطر استریل شسته و در دمای اتاق روی کاغذ صافی استریل به مدت سه ساعت تحت جریان هود لامینار فلو خشک شدند و در تمام سنجش‌های مربوط به گیاهان مورد استفاده قرار گرفتند. برای آزمایش صحت ضدعفونی بذر، آخرین آب شستشو با رعایت شرایط کاملا استریل به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و آب‌رویی روی تشتک‌های پتری با محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) اضافه شد.

تلقیح شمشاد با جدایه‌های *B. bassiana*

کنیدی‌های خالص شده قارچ *B. bassiana* روی ظروف پتری حاوی محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار به‌همراه ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر کلرامفنیکل تلقیح شدند. ظروف در تاریکی در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند. پس از این مدت، کنیدی‌ها برداشت شده و زنده‌مانی آن‌ها تایید شد (Moore *et al.*, 1995). کنیدی‌ها در لوله‌های آزمایش با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و ۰/۰۱ درصد (v/v) توئین ۸۰ درصد تعلیق شدند و تهیه سری رقت‌ها تا رسیدن به غلظت ۱×۱۰^{۶} کنیدی در میلی‌لیتر با استفاده از لام هماسیتومتر انجام شد.

جهت تهیه مایه تلقیح قارچ *C. buxicola*، از کشت قارچ در محیط آب آگار ۲ درصد به همراه برگ میخک و قرار دادن کشت‌ها در تناوب ۱۲ ساعت تاریکی/ روشنایی تحت نور نزدیک فرابنفش جهت اسپورزایی استفاده شد. پس از ۱۴ روز اسپورهای ایجاد شده با استفاده از آب مقطر استریل و ۰/۰۱ درصد (v/v) توئین ۸۰ درصد از ظروف پتری جمع‌آوری و در غلظت ۱×۱۰^{۵} کنیدی در میلی‌لیتر تنظیم شدند. غلظت‌های ذکر شده در تمام آزمایش‌ها استفاده شدند.

برای بررسی توانایی قارچ‌ها در برقراری همزیستی اندوفیتی از لوله فالکون‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی سوبسترای پرلیت، پیت، کمپوست و ورمیکولیت استفاده شد که قبلاً توسط جدایه‌های مورد نظر از قارچ اندوفیت کلونیزه شده بودند. برای تهیه این سوبسترای کلونیزه شده، ابتدا لوله‌ها به میزان ۲۰ میلی‌لیتر با محیط PDA پرشده و پس از استریل نمودن، با دو میلی‌لیتر سوسپانسیون کنیدیایی تهیه شده تلقیح و در تاریکی به مدت ۴ روز در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. لوله‌های حاوی محیط کشت اما بدون تلقیح قارچی به‌عنوان شاهد به‌کار گرفته شدند.

هنگامی که رشد ظاهری قارچ در لوله فالکون‌ها مشاهده شد، ۲۰ میلی‌لیتر از بستر جامد به هر لوله اضافه شد که شامل مخلوطی از پرلیت، پیت، کمپوست و ورمیکولیت دو بار اتوکلاو شده (در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت) با نسبت ۱:۲:۲:۲ بود. مجددا کشت‌های قارچی و نیز شاهد در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز دیگر در تاریکی نگهداری شدند.

در هر لوله چهار بذر کاشته شد و پس از سبز شدن در هر لوله تنها یک گیاه باقی گذاشته شد. کشت‌ها در اتاقک‌های رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور(۵۰۰۰ –۳۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی تحت دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۶ هفته نگهداری شدند. آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی با پنج تکرار طراحی شد.

ارزیابی کلونیزاسیون گیاهان شمشاد توسط جدایه‌های *B. bassiana*

نمونه گیری از گیاهان شمشاد شش هفته پس از تلقیح انجام شد. در زمان نمونه گیری، پنج گیاه (تکرار) از هر نوع قارچ (چهار نوع) و گیاهان شاهد مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای بررسی توانایی کلونیزاسیون هریک از قارچ‌ها، ضدعفونی نمونه‌ها و جداسازی قارچ‌ها مطابق با روش

Greenfield *et al.* (2016) صورت گرفت. از هر تکرار ۱۰ ریز نمونه برگی و ریز نمونه ساقه در ظروف پتری حاوی محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار به اضافه کلرامفنیکل کشت داده شد که در مجموع ۲۰ قطعه در هر گیاه به‌دست آمد. اندازه هر ریز نمونه برگ به میزان حداکثر ۵×۵ میلی‌متر و ۱۰ میلی‌متر برای ساقه در نظر گرفته شد. ظروف پتری با پارافیلم پوشانده شده و در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. به‌منظور اطمینان از صحیح بودن روش ضدعفونی، همانند آزمایش صحت ضدعفونی بذر اقدام شد. بررسی مداوم کشت‌ها (هر دو الی ۳ روز) به‌مدت یک ماه صورت گرفت. در صورت رشد قارچ، ریزنمونه‌های حاوی کلنی قارچی شمارش شده و سپس حذف شدند. تایید گونه‌ی قارچ‌های بازیابی شده از طریق مشاهده ساختارهای قارچی زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ و با کمک کلیدهای طبقه‌بندی صورت گرفت (Watanabe, 2010).

ارزیابی فعالیت ضد قارچی *B. bassiana* در شرایط آزمایشگاهی

دیسک‌های میسلیومی سه روزه با قطر ۵ میلی‌متر از کشت‌های خالص *B. bassiana* در یک سانتی‌متری لبه ظروف پتری ۹ سانتی‌متری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار قرار داده شد. سپس دیسک‌هایی سه روزه با قطر ۵ میلی‌متر از بیمارگر *C. buxicola*، در فاصله مساوی مقابل اندوفیت قرار گرفتند و ظروف در تاریکی ۲۵±۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز انکوبه شدند. برای هر تیمار پنج تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی در نظر گرفته شد. در همان زمان، ظروف شاهد (فقط دارای عامل بیماری‌زا) ایجاد شد (Anees *et al.*, 2010). هنگامی که بیمارگر پتری دیش را کلونیزه کرد، درصد مهار رشد شعاعی پاتوژن (PRGIP) با استفاده از فرمول (۱) تعیین شد. شعاع کلنی‌ها در هر یک از تیمارها با استفاده از خط‌کش (میلی‌متر) اندازه‌گیری شد.

فرمول (۱):

$$PRGIP: [(R1 - R2)/R1] \times 100$$

در این فرمول، R1 شعاع کلنی پاتوژن (mm) است در زمانی که به تنهایی رشد می‌کند و R2 شعاع کلنی پاتوژن (mm) در زمانی است که در رقابت با اندوفیت رشد می‌کند.

ارزیابی فعالیت ضد قارچی *B. bassiana* در گیاه میزبان

بذرهای گیاهان شمشاد که طبق روش ذکر شده قبلا ضدعفونی‌شده بودند، در گلدان‌های پلاستیکی ۳۰۰ میلی‌لیتری در بستری متشکل از مخلوطی از پرلیت، پیت، کمپوست و ورمیکولیت (با نسبت ۱:۲:۲:۲) که دو بار در اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت استریل شده بود، کاشته شدند. گلدان‌ها در اتاقک رشد (در دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۸۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت نور(۵۰۰۰ –۳۰۰۰ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی به مدت ۶۰ روز نگهداری شدند. گیاهان هر سه روز یکبار با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل آبیاری شدند. گیاهان با ده تا دوازده برگ توسعه یافته از طریق خیس کردن بستر با محلولی از هریک از جدایه‌های قارچی *B. bassiana* (شامل نسبت ۲ به ۱ از آب مقطر استریل به همراه سوسپانسیون کنیدی قارچی با غلظت $۱۰^{۶}$ ×۱ کنیدی در میلی‌لیتر) در نزدیکی منطقه طوقه تلقیح شدند. گیاهان به مدت ۲۴ ساعت با یک کیسه پلاستیکی پوشانده شدند تا جوانه زدن قارچ و تلقیح گیاه در رطوبت بالا تسهیل شود. چهار هفته بعد از تلقیح گیاهان توسط قارچ *B. bassiana*، سوسپانسیون کنیدی از بیمارگر *C. buxicola* با غلظت $۱۰^{۵}$ ×۱ کنیدی در میلی‌لیتر به صورت محلول‌پاشی روی برگ‌های شمشاد برای آغشته‌سازی آنها با قارچ بیمارگر استفاده شد (Martin–Hernandez *et al.*, 2000). نگهداری گلدان‌های تلقیح شده به مدت دو هفته دیگر در اتاقک رشد با رطوبت 90 درصد و همان دما و دوره نوری ذکر شده صورت گرفت.

برای تجزیه و تحلیل این آزمون، شش هفته پس از تلقیح با قارچ اندوفیت، پنج برگ واقع در بخش میانی گیاهان شمشاد انتخاب شدند. تیمارها در قالب طرح کاملا تصادفی با پنج تکرار برای هر جدایه تنظیم شدند. شدت

بیماری در گیاهان ۱۴ روز پس از تلقیح قارچ بیمارگر مورد ارزیابی قرارگرفت. برای این ارزیابی از طریق فرمول ۲ درصد سطح تحت تاثیر پاتوژن (Surface Affected by the Pathogen: PSAP) ارزیابی شد (Kim *et al.*, 2001). برای این منظور کل مساحت برگ (Total Area: TA) و منطقه آسیب دیده در هر برگ (Affected Area: AA) با استفاده از دستگاه سنجش سطح برگ (Leaf Area Meter) اندازه‌گیری شد.

فرمول (۲):

$$PSAP: (S2/S1) \times 100$$

در این فرمول، S1 کل سطح برگ و S2 مساحتی از سطح برگ است که توسط پاتوژن آلوده شده است.

۷- تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار spss استفاده گردید. قبل از تجزیه واریانس تست نرمالیتی روی باقیمانده‌ها انجام گرفته و پس از اطمینان از حالت توزیع نرمال باقیمانده‌ها، تجزیه واریانس از طریق مدل خطی عمومی (GLM) انجام شد. آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی آنالیز شدند. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک یا پنج درصد استفاده شد. ترسیم گراف‌ها به وسیله نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

میزان کلونیزاسیون گیاهان شمشاد توسط جدایه‌های *Beauveria bassiana*

در مجموع چهار جدایه قارچی خالص از لاروهای *C. perspectalis* بر روی درختان شمشاد از مناطق مختلف جنگل‌های هیرکانی جداسازی و از نظر مورفولوژیکی به‌عنوان گونه *B. bassiana* شناسایی شدند و جهت تلقیح اندوفیتی گیاهان شمشاد مورد استفاده قرار گرفتند. مشخصات این جدایه‌ها و محل جمع‌آوری آن‌ها در جدول ۱ آمده است. توالی‌های نوکلئوتیدی در پایگاه اطلاعاتی GenBank (با شماره دسترسی OM413901) ثبت شده است.

جدول ۱– جدایه های بومی *Beauveria bassiana* به‌دست آمده و مورد استفاده در تحقیق

Table 1. Native isolates of *Beauveria bassiana* obtained and used in the research

Isolate number/ code	Locality/site	Host pest	Latitude–longitude
Isolate 1/B1	Guilan	*Cydalima perspectalis*	37°38′N, 49°02′E
Isolate 2/B2	Mazandaran	*Cydalima perspectalis*	36°34′N, 51°47′E
Isolate 3/F4	Mazandaran	*Cydalima perspectalis*	36°33′N, 51°47′E
Isolate 4/D2	Guilan	*Cydalima perspectalis*	37°47′N, 48°49′E

براساس تعیین درصد کلونیزاسیون گیاهان شمشاد مشخص شد که هر چهار جدایه قادر به برقراری ارتباط اندوفیتی روی گیاهچه‌های شمشاد بودند. آنالیز آماری داده‌های کلونیزاسیون قارچی گیاهان شمشاد نشان داد در سطوح کلونیزاسیون قارچی به‌طور معنی‌داری در میان جدایه‌های مختلف قارچی ($M.S.= 243.48, d.f.=3, p < 0.001$) اختلاف وجود دارد. میزان کلونیزاسیون بافت‌های گیاهان شمشاد توسط هریک از جدایه‌های *B. bassiana* در جدول ۲ آورده شده است.

جدول۲– نرخ کلونیزاسیون بافت‌های گیاهان شمشاد (٪) توسط جدایه‌های *Beauveria bassiana*

Table 2. Colonization rate of boxwood plant tissues (%) by *Beauveria bassiana* isolates

Host plant	plant tissue	Fungal Isolate code	Plant tissue colonization (%)
Buxus hyrcana	leaf	B1	7±32.1 bc
		B2	6±29.5 bc
		F4	12±69.3 a
		D2	7±39.5 b
	stem	B1	2±12.3 a
		B2	2±14.5 a
		F4	2±8.0 b
		D2	1±15.4 a

Different letters indicate a significant difference between the means based on Duncan's test ($p < 0.01$)

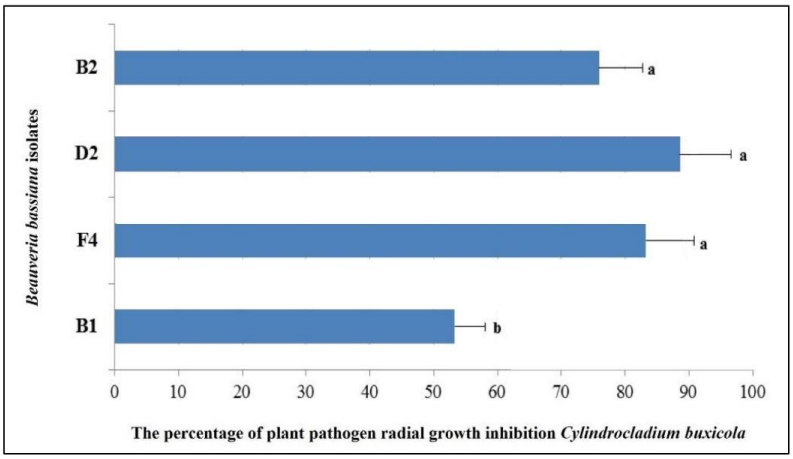
نرخ کلونیزاسیون اندوفیتی در گیاهان شمشاد بین ۲۹–۶۹٪ در برگ‌ها و ۸–۱۶٪ در ساقه متغیر بود.

بالاترین درصد کلونیزاسیون قارچی مربوط به جدایه F4 با نرخ ۳۸/۵ درصد (میانگین کل بافت‌های کلونیزه شده گیاه) بود و پس از آن جدایه D2 (با میانگین کلونیزاسیون ۲۷ درصد)، جدایه B1 (با میانگین کلونیزاسیون ۲۲ درصد) و در نهایت جدایه B2 (با میانگین کلونیزاسیون ۲۱/۵ درصد) قرار داشت.

بیشترین درصد کلونیزاسیون اندوفیت بین بافت‌های مختلف گیاه شمشاد در برگ بود.

مهار رشد بیمارگر گیاهی *Cylindrocladium buxicola* در شرایط آزمایشگاهی توسط جدایه‌های *Beauveria bassiana*

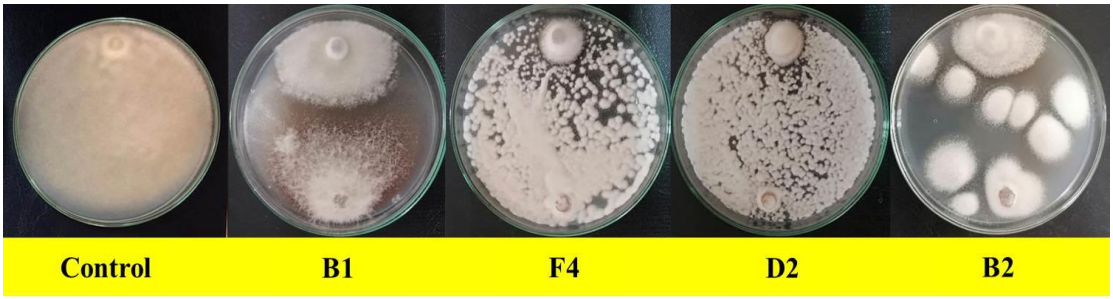
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین جدایه‌های مختلف *B. bassiana* از نظر بازدارندگی از رشد بیمارگر *C. buxicola* اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد ($p <$ 0.01, d.f.=3, M.S.= 168.32). مقایسه میانگین درصد مهار رشد شعاعی بیمارگر گیاهی *C. buxicola* توسط جدایه‌های *B. bassiana* نشان داد که بیشترین میزان درصد بازدارندگی در جدایه D2 مشاهده شد و جدایه B1 دارای کمترین میزان درصد بازدارندگی بود (شکل ۱).



شکل ۱– درصد مهار رشد بیمارگر گیاهی *Cylindrocladium buxicola* در روز دهم کشت متقابل با جدایه‌های مختلف قارچ *Beauveria bassiana*. حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار میان میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($p < 0.01$)

Fig. 1. The growth inhibition percentage of the plant pathogen *Cylindrocladium buxicola* on the 10th day of cross–cultivation with different isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. Different letters indicate a significant difference between the means based on Duncan's test ($p < 0.01$).

فعالیت ضدقارچی جدایه‌های *B. bassiana* در برابر *C. buxicola* در شرایط آزمایشگاهی بین ۵۳ تا ۸۸٪ متغیر بود. مشاهده شد که جدایه‌های *B. bassiana* در درجات متفاوتی از بازدارندگی اجازه نمی‌دهند میسلیوم‌های قارچ بیمارگر به تراکم و رشد موجود در پتری شاهد دست یابد (شکل ۲).



شکل ۲– مهار رشد بیمارگر گیاهی *Cylindrocladium buxicola* در کشت متقابل با جدایه‌های مختلف *Beauveria bassiana*.

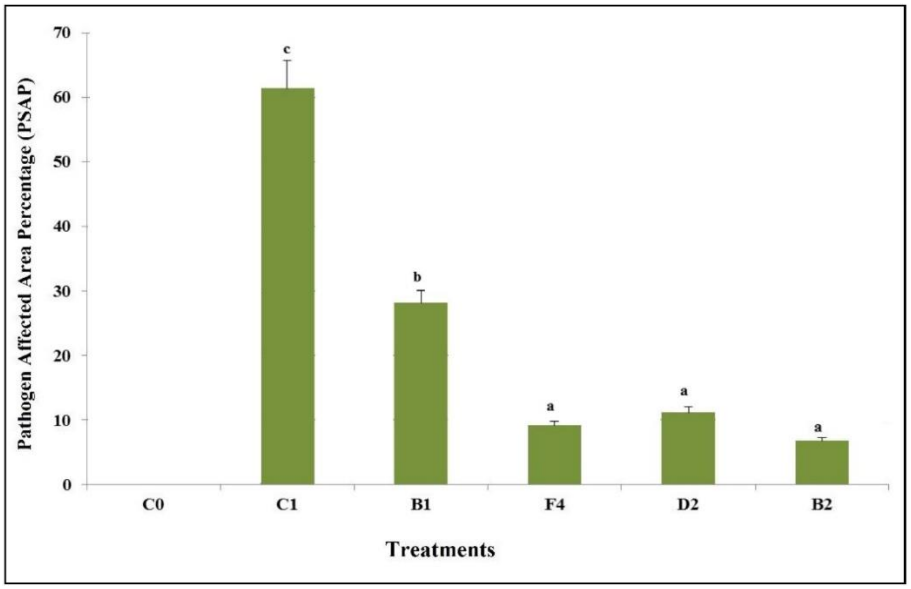
Fig. 2. Growth inhibition of the plant pathogen *Cylindrocladium buxicola* in cross–culture with different isolates of *Beauveria bassiana*.

فعالیت ضدقارچی جدایه‌های *Beauveria bassiana* در گیاهان شمشاد

درصد سطح تحت تاثیر پاتوژن (PSAP) در گیاهان شمشاد تلقیح شده با قارچ‌های اندوفیت به‌طور معنی‌داری کمتر ($M.S.= 3.383, d.f.=5, p < 0.01$) از گیاهانی بود که فقط توسط پاتوژن تلقیح شده بودند.

پس از تلقیح گیاهان شمشاد با قارچ بیمارگر *C. buxicola* مشاهده شد که علائم بیماری در برگ‌های گیاهان شمشاد بدون قارچ اندوفیت در هفته اول بعد از تلقیح آشکار شد در حالی‌که شروع لکه‌های برگی در گیاهان شمشاد تلقیح شده با جدایه‌های اندوفیت در هفته دوم قابل رویت بود.

درصد سطح تحت تاثیر پاتوژن گیاهان تلقیح شده با قارچ‌های اندوفیت بین ۶/۸ تا ۲۸/۲ درصد متغیر بود. کمترین درصد سطح تحت تاثیر پاتوژن برای جدایه B2 و بیشترین آن برای جدایه B1 به‌دست آمد. درصد سطح تحت تاثیر پاتوژن در گیاهان شمشاد بدون قارچ اندوفیت ۶۱/۴ درصد بود (شکل ۳).



شکل ۳– درصد سطح تحت تاثیر پاتوژن در برگ‌های گیاهان شمشاد روز چهاردهم پس از تلقیح با قارچ *Cylindrocladium buxicola*.

C0: گیاهان بدون تلقیح با پاتوژن؛ C1: گیاهان تلقیح شده با پاتوژن به تنهایی؛ B1، F4، D2 و B2: گیاهان تلقیح شده با جدایه‌های مختلف قارچ *Beauveria bassiana* و قارچ پاتوژن.

حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار میان میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن می‌باشد ($p < 0.01$)

Fig. 3. The percentage of the surface affected by the pathogen in the leaves of boxwood plants on the 14th day after inoculation with the fungus *Cylindrocladium buxicola*.
C0: plants without pathogen inoculation, C1: plants inoculated with the pathogen alone, B1, F4, D2 and B2: plants inoculated with different isolates of *Beauveria bassiana* and pathogenic fungi. Different letters indicate a significant difference between the means based on Duncan's test ($p < 0.01$).

بحث

توده‌های شمشاد خزری از کم نظیرترین توده‌های جنگلی در ناحیه اروپا–سیبری است که اگرچه در گذشته به‌صورت نوار تقریباً پیوسته از آستارا تا شرق کردکوی به‌صورت زیراشکوب درختان بلوط، ممرز، افرا، نمدار و راش به‌خصوص در جنگل‌های جلگه–کوهپایه‌ای گسترده بودند، اما امروزه به‌صورت قطعات پراکنده‌ای مشاهده می‌شود که از دلایل آن بیماری بلایت و خشکیدگی ناشی از قارچ *C. buxicola*، به‌عنوان خطر جدی برای بقا و تولید درختان شمشاد در اغلب رویشگاه‌های شمشاد در شمال کشور می‌باشد.

در این تحقیق، چهار جدایه بومی از قارچ *B. bassiana* برای توانایی آنها در کلونیزه نمودن گیاهان شمشاد مورد آزمایش قرار گرفتند. هر چهار جدایه مورد بررسی قادر به کلونیزاسیون گیاهان شمشاد بودند. بدین ترتیب این تحقیق برای نخستین بار کلونیزاسیون اندوفیتی *B. bassiana* در گیاهان شمشاد را گزارش می‌کند.

امروزه مشخص شده است قارچ‌های بیمارگر حشرات از جمله قارچ *B. bassiana* این پتانسیل را دارند که علاوه بر کنترل بیولوژیکی مستقیم آفات، از طریق محلول‌پاشی یا کاربرد آنها در خاک، بافت گیاهی را کلونیزه نموده و نقش مهمی در کاهش گیاه‌خواری آفات پس از کلونیزاسیون گیاهان به‌عنوان اندوفیت داشته باشند. این نوع کلونیزاسیون اندوفیتی قبلا در گیاهانی مانند گوجه‌فرنگی، فلفل، موز، پنبه، پیاز، لوبیا، هلو و غیره و سپس کاهش گیاه‌خواری آفات مهم گیاهان میزبان گزارش شده بود (Akutse *et al.*, 2014, Gathage *et al.*, 2016, Sword *et al.*, 2017, Jaber & Araj, 2018, González–Mas *et al.*, 2019a, b).

علاوه بر این، اخیراً مشخص شده است که این کلونیزاسیون‌های اندوفیتی اغلب دارای مزایای دیگری نیز از جمله محافظت از گیاهان در برابر پاتوژن‌ها گیاهی و افزایش رشد گیاه هستند. در حال حاضر شواهد قابل توجهی وجود دارد که نشان می‌دهد برخی از قارچ‌های بیمارگر حشرات، به‌ویژه *B. bassiana* و *Lecanicillium* spp. (که قبلا *Verticillium lecanii* نامیده می‌شد)، قادرند در حالت اندوفیتی فعالیت آنتاگونیستی علیه پاتوژن‌های گیاهی را علاوه بر فعالیت کنترل‌زیستی شناخته شده خود در برابر حشرات آفت نشان دهند (Jaber & Ownley, 2018, Vega, 2018, Dara, 2019). این واقعیت نشان می‌دهد که این قارچ‌های بیمارگر حشرات دارای پتانسیل نویدبخشی در جهت توسعه به‌عنوان آفت‌کش‌های زیستی برای اهداف متعدد در استراتژی‌های مدیریت تلفیقی (IPM) هستند.

چندین مطالعه وجود دارد که به دستیابی کلونیزاسیون اندوفیتی *B. bassiana* در گیاهان با روش‌های مختلف تلقیح شامل تلقیح از طریق دانه‌ها، برگ‌ها و ریشه‌ها اشاره کرده‌اند (Quesada–Moraga *et al.*, 2006, Ownley *et al.*, 2008, Tefera & Vidal, 2009). اینکه قارچ مذکور به‌عنوان اندوفیت اختیاری چندین گیاه تا کنون گزارش شده است (Jaber & Ownley, 2018) نشان می‌دهد *B. bassiana* یک اندوفیت خاص برای گونه‌های گیاهی یا رقم‌های گیاهی خاص نیست. این ویژگی را می‌توان به وسعت دامنه میزبانی قارچ بیمارگر حشرات نسبت به آفات حشره‌ای میزبان مرتبط دانست، به این معنی که دامنه میزبانی می‌تواند در مورد پاتوژن‌های اجباری بسیار محدود یا در مورد پاتوژن‌های اختیاری بسیار گسترده باشد (Wraight *et al.*, 2000).

در این تحقیق مشاهده شد که *B. bassiana* الگوی کلونیزاسیون سیستمیک را در گیاهان شمشاد نشان می‌دهد و بنابراین قارچ از برگ‌ها و نیز ساقه گیاه جدا شد. مطالعات در سایر گیاهان نیز الگوی کلونیزاسیون سیستمیک را برای این قارچ‌ها نشان داده‌اند (Tefera & Vidal, 2009, Jaber & Enkerli, 2016, Jaber & Araj, 2018). Behie & Jones (۲۰۱۵) گزارش نمودند که *B. bassiana* می‌تواند بافت‌های گیاهی را هم در بالای خاک و هم در زیر خاک کلونیزه کند، در حالی‌که اندوفیت‌های جنس *Metarhizium* ترجیح می‌دهند ریشه‌ها را کلونیزه نمایند. این الگوی کلونیزاسیون از دیدگاه توسعه کنترل‌کننده‌های زیستی بسیار جالب و حائز اهمیت است، زیرا امکان دسترسی به مکان‌هایی در گیاه را فراهم می‌کند که اکثر محصولات شیمیایی نمی‌توانند به آن دسترسی یابند.

سطح بالای کلونیزاسیون اندوفیتی جدایه‌های *B. bassiana* در گونه گیاهی شمشاد می‌تواند به تکامل این قارچ‌ها در طول زمان مرتبط باشد. Barelli *et al*. (2016) نشان می‌دهند برخی از قارچ‌های بیماری‌زای حشره‌زا از قارچ‌های همزیست با گیاهان تکامل یافته‌اند و بیماری‌زایی در حشرات بخشی از یک فرآیند تطبیقی جدیدتر است. به عبارت دیگر، این قارچ ها ابتدا اندوفیت بودند و سپس توانستند از گیاهان مستقل شده و به عنوان پاتوژن حشرات زنده بمانند. این نویسندگان همچنین پیشنهاد می‌کنند که این قارچ‌ها هرگز رابطه همزیستی خود را با گیاه ترک نکرده‌اند و بیماری‌زایی نسبت به حشرات می‌تواند راهبردی باشد که توسط آن اندوفیت‌ها به منابع نیتروژن در ازای کربوهیدرات‌های ارائه‌شده توسط گیاه دسترسی پیدا کنند. این مکانیسم توسط Herre *et al*. (2007) گزارش شده و توسط Behie *et al*. (2012) شرح داده شده است. بر همین اساس کلونیزاسیون اندوفیتی گیاهان شمشاد توسط هر چهار جدایه قارچ *B. bassiana* که از آفت برگخوار شمشاد جداشده بودند، دور از انتظار نبود.

در آزمون آزمایشگاهی مهار رشد بیمارگر گیاهی *C. buxicola* در کشت متقابل با جدایه‌های *B. bassiana* مشاهده شد که چهار جدایه مورد مطالعه با درجات متفاوتی از بازدارندگی از رشد میسلیوم‌های قارچ بیمارگر ممانعت نمودند. این نشان می‌دهد جدایه‌های مورد مطالعه از قارچ *B. bassiana*، متابولیت‌های ثانویه‌ای تولید می‌کنند (یا باعث تولید افزون آن‌ها می‌شوند) که در برابر رشد میسلیوم، جوانه‌زنی کنیدی‌ها و طویل شدن لوله‌های تندش قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی فعالیت بازدارندگی دارند.

اوسپورئین (Oosporein)، بووریسین (beauvericin)، باسیانولید (bassianolide)، باسیانین (bassianin)، بووریولید (beauveriolide)، باسیاکریدین (bassiacridin) و سیکلوسپورین (cyclosporine) شناخته شده‌ترین متابولیت‌های تولید شده توسط *B. bassiana* هستند (Sinno *et al.*, 2021) و در میان آن‌ها، بووریسین و اوسپورئین دارای خواص آنتی‌بیوتیکی و ضدقارچی قابل توجهی هستند (Nagaoka *et al.*, 2004, Wang & Xu, 2012) و احتمالاً مسئول مهار رشد قارچی در سنجش زیستی صورت گرفته در تحقیق حاضر می‌باشند.

گزارشات دیگری نیز وجود دارد که نشان دهنده اثر ضد قارچی این قارچ اندوفیت در برابر پاتوژن‌هایی مانند *Botrytis cinerea* Pers.، *Cladosporium herbarum*، *Fusarium* spp. Link (Pers.) Link، *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* J. Walker، Rhizoctonia solani Kühn و *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl در ارزیابی‌های آزمایشگاهی می‌باشند (Renwick *et al.*, 1991, Bark *et al.*, 1996, Ownley *et al.*, 2004, Orole & Adejumo, 2009, Culebro–Ricaldi *et al.*, 2017, Jaber 2018, Barra–Bucarei & Gerding, 2020, Sinno *et al.*, 2021)، اما این اولین گزارش در مورد مهار رشد قارچ *C. buxicola* توسط *B. bassiana* می‌باشد.

بررسی فعالیت ضد قارچی جدایه‌های *B. bassiana* در گیاهان شمشاد در برابر *C. buxicola* نشان داد درصد سطح تحت تاثیر پاتوژن (PSAP) در گیاهان شمشاد تلقیح شده با قارچ‌های اندوفیت به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از گیاهانی بود که فقط توسط پاتوژن تلقیح شده بودند. این نتایج نشان می‌دهد که قارچ *B. bassiana* به‌عنوان اندوفیت، می‌تواند توان گیاهان شمشاد را در مقاومت در برابر حمله عوامل بیماری‌زا مانند *C. buxicola* افزایش می‌دهد.

نتایج مطالعه Wagner & Lewis (2000) نشان می‌دهد که *Beauveria bassiana* تلقیح شده روی ریشه‌های گیاه، قادر است ریشه را کلونیزه نموده، به سمت ساقه حرکت کرده، احتمالاً از طریق سیستم آوندی و به برگ‌ها که پاتوژن روی آن‌ها تلقیح شده بود برسد. در تحقیق حاضر نیز گیاهان شمشاد از طریق خیس کردن بستر در نزدیکی منطقه طوقه با محلولی از جدایه‌های قارچی *B. bassiana* تلقیح شدند و در نتیجه برقراری این همزیستی اندوفیتی درصد سطح تحت تاثیر پاتوژن به‌شدت کاهش یافت، به‌ویژه در مورد سه جدایه‌ی D2، B2 و F4 که بالاترین تاثیر ضد قارچی را نشان دادند. در حالی که گیاهان شاهد (بدون همزیستی اندوفیتی؛ گیاهان C1) تحت تاثیر پاتوژن قرار گرفته و درصد سطح تحت تاثیر پاتوژن در آنها بیشتر از ۶۰ درصد بود.

کاهش به‌دست آمده در سطح تحت تاثیر پاتوژن در برگ‌های شمشاد می‌تواند نتیجه اثر مستقیم یا غیرمستقیم اندوفیت در گیاه باشد. اثرات مستقیم زمانی رخ می‌دهد که اندوفیت بتواند از طریق ریشه وارد شود، از طریق سیستم آوندی حرکت کند تا به بافت‌های برگ برسد و برای فضا و غذا با عامل بیماری‌زا رقابت کند و بدین ترتیب توانایی کلونیزاسیون آن را کاهش دهد (Ownley *et al.*, 2004). احتمال دیگر می‌تواند زمانی باشد که هیف‌های پاتوژن وارد برگ‌ها شده و توسط هیف‌های اندوفیت انگلی می‌شوند (مایکوپارازیتیسم) که این موضوع باعث تضعیف و کاهش پتانسیل آسیب آنها می‌شود (Ownley *et al.*, 2008).

در حال حاضر تعداد فزاینده‌ای از مطالعات وجود دارد که شواهدی از عملکرد محافظتی *B. bassiana* از گیاهان مختلف در برابر پاتوژن های گیاهی را گزارش می‌دهند (Ownley *et al.*, 2004, 2008, Vega *et al.*, 2009, Jaber, 2015, 2018). مطالعه حاضر اولین گزارشی است که اثر محافظتی اندفیت *B. bassiana* در برابر پاتوژن گیاهان شمشاد را نشان می‌دهد.

اثر غیرمستقیم در وهله اول می‌تواند ناشی از عملکرد متابولیت‌های ثانویه باشد. همان‌طور که برای کشت‌های متقابل آزمایشگاهی ذکر شد که می‌توانند در بافت‌های گیاهی دوردست‌تر از محل تولید عمل کنند، مانند آن دسته از متابولیت هایی که با عملکرد آنزیمی خود دیواره سلولی را تجزیه می‌کنند و عملکرد آنها مکانیسم مهمی در کنترل قارچ‌های بیماری‌زا گیاهی محسوب می شود (El Kichaoui *et al.*, 2017). از سوی دیگر، اثر غیرمستقیم می‌تواند با فعال

کردن مقاومت سیستمیک در گیاه رخ دهد. مکانیسم عملی که توسط اندوفیت *B. bassiana* در برابر ویروس موزاییک زرد کدو سبز (zucchini yellow mosaic virus) در کدو تنبل (Jaber & Salem 2014) و در برابر *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* در پنبه (Ownley *et al.*, 2008) استفاده می‌شود. همچنین گزارش شده است اثر ضدقارچی نشان داده شده توسط اندوفیت‌ها می‌تواند ناشی از ترکیبی از مکانیسم‌های ذکر شده قبلی، نه به‌دلیل عملکرد یک مکانیسم واحد باشد (Vega *et al.*, 2009, Ownley *et al.*, 2010).

در مطالعه Jaber & Ownley (2018)، قارچ *B. bassiana* به‌عنوان یک عامل کنترل دوگانه (dual control agent) معرفی و بر پتانسیل این عامل بیوکنترل برای مهار توام آفات و پاتوژن‌ها و به‌علاوه ایجاد مقاومت سیستمیک در بسیاری از محصولات زراعی تاکید شده است. این نتایج با یافته‌های ارائه‌شده در این تحقیق تأیید می‌شود که نشان می‌دهد جدایه‌های بومی *B. bassiana* جداشده از آفت برگ‌خوار شمشاد می‌تواند علاوه بر کنترل این آفت (Zamani *et al.*, 2023)، در مهار قارچ عامل بلایت این گیاهان نیز موثر واقع شده و در مدیریت تلفیقی و همزمان آفت و قارچ مذکور استفاده شود. بنابراین، سه جدایه‌ی D2، B2 و F4 که بالاترین تاثیر ضد قارچی را در این تحقیق نشان دادند، نماینده‌های قابل قبولی را برای یک استراتژی کنترل زیستی دوگانه نشان می‌دهند.

علاوه بر این، گفته می‌شود تیمار خیساندن خاک (که در تحقیق حاضر نیز برای افزون قارچ اندوفیت *B. bassiana* بکار گرفته شد) می‌تواند تأثیر مستقیمی بر آفات و پاتوژن‌های ساکن در ریزوسفر داشته باشد و بدین ترتیب محافظت بیشتری برای گیاهان ایجاد کند. به‌علاوه اینکه، به لحاظ توانایی شناخته شده قارچ‌های بیمارگر حشرات (مانند متاریزیوم) در حالت اندوفیتی، از طریق انتقال نیتروژن از حشرات به گیاهان، افزودن این قارچ‌ها می‌تواند از منظر تغذیه‌ای نیز مفید واقع شود (Behie *et al.*, 2012)، اگرچه این عوارض جانبی سودمند درمان نیاز به بررسی بیشتر برای شمشاد و *B. bassiana* دارد. این جنبه‌ها به‌ویژه در چارچوب برنامه‌های مدیریت یکپارچه آفات و عوامل بیماری‌زا قابل توجه می‌باشند.

با معرفی سه جدایه بیوکنترل انتخاب شده بر اساس نتایج این مطالعه و تحقیقات پیشین روی خواص ضد حشره‌ای آن‌ها (Zamani *et al.*, 2023)، تحقیقات آینده می‌تواند بر توسعه فرمولاسیون‌های زیستی حاوی ترکیبی از بهترین جدایه‌های *B. bassiana* برای کنترل زیستی پاتوژن‌ها، توام با کنترل زیستی آفات، به‌علاوه محرک زیستی گیاهی تمرکز کند. علاوه بر این، ترکیبات میکروبی متشکل از عوامل بیوکنترل مختلف، مانند قارچ‌های بیمارگر حشرات، سایر عوامل بیوکنترل، قارچ‌های میکوریز، و ریزوباکترهای محرک رشد گیاهان، با خواص حفاظتی مختلف، می‌توانند با مخلوط کردن میکروارگانیسم‌های سازگار برای موفقیت در کاشت و احیاء گونه‌های گیاهی استفاده شود (Woo & Pepe, 2018).

References

Akutse, K.S., Fiaboe, K.K.M., Van Den Berg, J., Ekesi, S. & Maniania, N.K. 2014. Effects of endophyte colonization of *Vicia faba* (Fabaceae) plants on the life–history of leafminer parasitoids *Phaedrotoma scabriventris* (Hymenoptera: Braconidae) and *Diglyphus isaea* (Hymenoptera: Eulophidae). PLOS One, 9: 1–11.

Aly, A.H., Debbab, A., Kjer, J. & Proksch, P. 2010. Fungal endophytes from higher plants: A prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. Fungal Diversity, 41: 1–16.

Anees, M., Tronsmo, A., Edel–Hermann, V., Hjeljord, L.G., Héraud, C. & Steinberg, C. 2010. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. Fungal Biology, 114: 691–701.

Arnold, A.E. & Lewis, L.C. 2005. Ecology and Evolution of Fungal Endophytes, and Their Roles against Insects. Insect–Fungal Associations: Ecology and Evolution, Oxford University Press: New York, NY, USA, 74–96.

Bailey, K.L., Boyetchko, S.M. & Langle, T. 2010. Social and economic drivers shaping the future of biological control: A Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. Biological Control, 52: 221–229.

Barelli, L., Moonjely, S., Behie, S.W. & Bidochka, M.J. 2016. Fungi with multifunctional lifestyles: Endophytic insectpathogenic fungi. Plant Molecular Biology, 90: 657–664.

Bark, Y.G., Lee, D.G., Kang, S.C., Kim, Y.H. 1996. Antibiotic properties of an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea*. Korean Journal of Plant Pathology, 12: 245–250.

Barnett, H.L. & Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 3a. ed. American Phytopathological Society, Saint Paul, Minnesota, U.S.A., 240 p.

Barra–Bucarei, L., France, A. & Millas, P. 2019. Crossing frontiers: Endophytic entomopathogenic fungi for biological control of plant diseases. In Endophytes for a Growing World, Cambridge University Press: Cambridge, UK, p. 67.

Barra–Bucarei, L. & Gerding, M. 2020. Antifungal Activity of Beauveria bassiana Endophyte against Botrytis cinerea in Two SolanaceaeCrops. Microorganisms, 8: 65.

Behie, S.W., Jones, S.J. & Bidochka, M.J. 2015. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi Metarhizium and Beauveria. Fungal Ecology, 13: 112–119.

Behie, S.W., Zelisko, P.M. & Bidochka, M.J. 2012. Endophytic insect–parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. Science, 336: 1576–1577.

Card, S., Johnson, L., Teasdale, S. & Caradus, J. 2016. Deciphering endophyte behaviour: The link between endophyte biology and efficacious biological control agents. FEMS Microbiology Ecology, 92.

Crous, P.W. 2002. Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera. APS Press, St. Paul, Minnesota, U.S.A.

Culebro–Ricaldi, J.M., Ruiz–Valdiviezo, V.M., Rodrguez–Mendiola, M.A., avila–Miranda, M.E., Gutiérrez–Miceli, F.A., CruzRodriguez, R.I., Dendooven, L. & Montes–Molina, J.A. 2017. Antifungal properties of Beauveria bassiana strains against Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici race 3 in tomato crop. Journal of Environmental Biology, 38: 821–827.

Dara, S.K. 2019. Non–entomopathogenic roles of entomopathogenic fungi in promoting plant health and growth. Insects, 10: 277p.

El Kichaoui, A., Elnabris, K., Shafie, A., Fayyad, N., Arafa, M. & El Hindi, M. 2017. Development of *Beauveria bassiana*–Based Bio–Fungicide Against FusariumWilt Pathogens for *Capsicum annuum*, a Promising Approach Toward Vital Biocontrol Industry in Gaza Strip. IUG Journal of Natural Studies, 25: 183–190.

Gathage, J.W., Lagat, Z.O., Fiaboe, K.K.M., Akutse, K.S., Ekesi, S. & Maniania, N.K. 2016. Prospects of fungal endophytes in the control of Liriomyza leafminer flies in common bean Phaseolus vulgaris under field conditions. BioControl, 61: 741–753.

Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L. & Stewart, A. 2012. Have Biopesticides come of age? Trends Biotechnology, 30: 250–258.

Gonzalez–Mas, N., Cuenca–Medina, M., Gutiérrez–Snchez, F. & QuesadaMoraga, E. 2019a. Bottom–up effects of endophytic *Beauveria bassiana* on multitrophic interactions between the cotton aphid, *Aphis gossypii*, and its natural enemies in melon. Journal of Pest Science, 92: 1271–1281.

Gonzalez–Mas, N., Sanchez–Ortiz, A., Valverde–Garcca, P., QuesadaMoraga, E. 2019b. Effects of endophytic entomopathogenic ascomycetes on the life–history traits of *Aphis gossypii* Glover. Insects, 10: 165.

Greenfield M., Gómez–Jiménez M.I., Ortiz V., Vega F.E., Kramer M. & Parsa S. 2016. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. Biological Control, 95: 40–48.

Henricot, B. & Culham, A., 2002. *Cylindrocladium buxicola*, a new species affecting *Buxus* spp, and its phylogenetic status. Mycologia, 94(6): 980–997.

Henricot, B., Pérez Sierra, A. & Prior, C., 2000. A new blight disease on *Buxus* in the UK caused by the fungus *Cylindrocladium*. Plant Pathology, 49: 805 p.

Herre, E.A., Mejia, L.C., Kyllo, D.A., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A. & Van Bael, S.A. 2007. Ecological implications of anti–pathogen e_ects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. Ecology, 88: 550–558.

Humber, R.A. 1997. Fungi: Identification. In L.A. Lacey (ed.) Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press. New York, USA, 153– 185.

Jaber, L.R. & Araj, S.E. 2018. Interactions among endophytic fungal entomopathogens (Ascomycota: Hypocreales), the green peach aphid *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae), and the aphid endoparasitoid *Aphidius colemani* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). Biological Control, 116: 53–61.

Jaber, L.R. & Enkerli, J. 2016. Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. Biological Control, 103: 187–195

Jaber, L.R. & Ownley, B.H. 2018. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? Biological Control, 116: 36–45.

Jaber, L.R. & Salem, N.M. 2014. Endophytic colonisation of squash by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) for managing Zucchini yellow mosaic virus in cucurbits. Biocontrol Science and Technology, 24: 1096–1109.

Jalili, A. & Jamzad, Z. 1999. Red Data Book of Iran: A Preliminary Survey of Endemic, Rare and Endangered Plant Species in Iran. Research Institute of Forests and Rangelands Publications, Tehran, 748p.

Kauppinen, M., Saikkonen, K., Helander, M., Pirttilä, A.M. & Wäli, P.R. 2016. Epichloë grass endophytes in sustainable agriculture. Nature Plants, 2: 15224.

Khare, E., Mishra, J. & Arora, N.K. 2018. Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and Prospects. Front. Microbiology, 9: 2732.

Kim, J.–C., Choi, G.J., Park, J.–H., Kim, H.T. & Cho, K.Y. 2001. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. Pest Manag. Sci. Former. Journal of Pesticide Science, 57: 554–559.

Lareen, A., Burton, F. & Schäfer, P. 2016. Plant root–microbe communication in shaping root microbiomes. Plant Molecular Biology, 90: 575–587.

Lobo, C. B., Tomás, M. S. J., Viruel, E., Ferrero, M. A. & Lucca, M. E. 2019. Development of low–cost formulations of plant growth–promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. Microbiological Research, 219: 12–25.

Lozano–Tovar, M.D., Garrido–Jurado, I., Quesada–Moraga, E., Raya–Ortega, M.C. & Trapero–Casas, A. 2017. *Metarhizium brunneum* and *Beauveria Bassiana* release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium Dahliae* and *Phytophthora Megasperma* olive pathogens. Crop Protection, 100: 186–195.

Lozano–Tovar, M.D., Ortiz–Urquiza, A., Garrido–Jurado, I., Trapero–Casas, A. & Quesada–Moraga, E. 2013. Assessment of entomopathogenic fungi and their extracts against a soil–dwelling pest and soil–borne pathogens of olive. Biol.ogical Control, 67: 409–420.

Martin–Hernandez, A.M., Dufresne, M., Hugouvieux, V., Melton, R. & Osbourn, A. 2000. Effects of targeted replacement of the tomatinase gene on the interaction of *Septoria lycopersici* with tomato plants. Molecular Plant–Microbe Interactions, 13: 1301–1311.

Mirabolfathy, M., Ahangaran, Y., Lombard, L. & Crous, P.W. 2013. Leaf blight of *Buxus sempervirens* in northern forests of Iran caused by *Calonectria pseudonaviculata*, Plant Disease, 97(8): 1121 p.

Moore, D., Bateman, R.P., Carey, M. & Prior, C. 1995. Long–term storage of Metarhizium flavoviride conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. Biocontrol Science and Technology, 5: 193–200.

Nagaoka, T., Nakata, K. & Kouno, K. 2004. Antifungal activity of oosporein from an antagonistic fungus against *Phytophthora infestans*. Zeitschrift für Naturforschung C., 59: 302–304.

Orole, O.O. & Adejumo, T.O. 2009. Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. African Journal of Microbiology Research, 3: 969–973.

Ownley, B.H., Griffin, M.R., Klingeman, W.E., Gwinn, K.D., Moulton, J.K. & Pereira, R.M. 2008. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. Journal of Invertebrate Pathology, 3: 267–270

Ownley, B.H., Gwinn, K.D. & Vega, F.E. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: Ecology and evolution. In The Ecology of Fungal Entomopathogens, Springer: Dordrecht, The Netherlands, ISBN 9789048139651.

Ownley, B.H., Pereira, R.M., Klingeman, W.E., Quigley, N.B. & Leckie, B.M. 2004. *Beauveria bassiana*, a dual-purpose biological control with activity against insect pests and plant pathogens. Emerg. Concepts Plant Health Manag, 255–269.

Quesada–Moraga, E., Landa, B.B., Muaoz–Ledesma, J., Jiménez–Dnaz, R.M. & Santiago–alvarez, C .2006. Endophytic colonization of opium poppy, *Papaver somniferum*, by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. Mycopathologia, 161: 323–329

Quesada–Moraga, E., Munoz–Ledesma, F.J. & Santiago–Alvarez, C. 2009. Systemic protection of *Papaver somniferum* L. against *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) by an endophytic strain of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). Environmental Entomology, 38: 723–730.

Renwick, A., Campbell, R. & Coe, S. 1991. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. Plant Pathology, 40: 524–532.

Sinno, M., Ranesi, M., Di, Lelio, I., Iacomino, G., Becchimanzi, A., Barra, E., Molisso, D., Pennacchio, F., Digilio, M.C., Vitale, S., Turrà, D., Harizanova, V., Lorito, M. & Woo, S.L. 2021. Selection of Endophytic *Beauveria bassiana* as a Dual Biocontrol Agent of Tomato Pathogens and Pests. Pathogens, 10(10): 1242.

Sword, G.A., Tessnow, A. & Ek–Ramos, M. J. 2017. Endophytic fungi alter sucking bug responses to cotton reproductive structures. Insect Science, 24: 1003–1014.

Tefera, T., Vidal, S. 2009. Effect of Inoculation Method and Plant Growth Medium on Endophytic Colonization of Sorghum by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. Biocontrol, 54: 663–669.

Vega, F. E. 2018. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. Mycologia 110, 4–30. doi: 10.1080/00275514.2017.1418578

Vega, F.E., Goettel, M.S., Chandler, D., Jackson, M.A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N.K., Monzon, A., Ownley, B.H., Pell, J.K., et al. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. Fungal Ecol. 2: 149–159.

Wagner, B.L. & Lewis, L.C. 2000. Colonization of corn, Zea mays, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Applied and Environmental Microbiology, 66: 3468–3473.

Wang, Q. & Xu, L. 2012. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: A short review. Molecules, 17: 2367–2377.

Watanabe, T. 2010. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, CRC press: Boca Raton, FL, USA.

Woo, S.L. & Pepe, O. 2018. Microbial consortia: Promising probiotics as plant biostimulants for sustainable agriculture. Front. Plant Science, 9: 7–12.

Wraight, S.P., Carruthers, R.I., Jaronski, S.T., Bradley, C.A., Garza, C.J. & Galaini–Wraight, S. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Biological Control, 17: 203–217.

Zamani, S.M., Gholami Ghavamabad, R. & Kazerani, F. 2023. Efficacy of indigenous isolates of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* against the box tree moth, *Cydalima perspectalis*, invasive pest in Iranian forests. Bulletin of Insectology, 76(1): 117–125.

Antifungal Activity of *Beauveria bassiana* Endophyte against Boxwood Blight Pathogen (*Calonectria pseudonaviculata*)

Seyedeh Masoomeh Zamani[1], Samira Farahani[2], Ebrahim Zarghani[3], Narges Sepasi[4]

1., 2., 4. Assistant Professor, Assistant Professor, Research Expert, Research Institute of Forests and Rangeland, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

3. Assistant Professor, Botanical Garden of Nowshahr, Research Institute of Forests and Rangeland, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Nowshahr, Iran.

Corresponding author: Seyedeh Masoomeh Zamani, email: zamani832003@yahoo.com

Received: May., 14, 2023 10(1) 127–142 Accepted: May., 31, 2023

Abstract

Caspian boxwood is one of the most valuable broadleaf evergreen trees in Hyrcanian forests and unfortunately, in the last decade, it has been affected by blight disease caused by the fungus *Cylindrocladium buxicola*, which is a serious threat to the survival and production of boxwood. Due to the presence of boxwood trees in the forest ecosystems and green spaces of urban areas, safe and environmentally friendly compounds should be used to control the disease. *Beauveria bassiana* is a plant endophytic fungus with pathogenic ability in insects, whose properties have been proven to increase plant growth, biocontrol pests and limit the activity of phytopathogenic fungi in several host plants. The aim of this study was to investigate the potential of some *B. bassiana* isolates obtained from the *Cydalima perspectalis* in controlling the fungus *C. buxicola*. Antagonistic activity of four isolates of *B. bassiana* was evaluated using double culture in laboratory conditions and also in the plants by inoculation of endophyte fungus in seeds of plants and inoculation of pathogen fungus in leaves. All four isolates were able to establish endophytic relationship on boxwood seedlings. All isolates showed significant antifungal activity against *C. buxicola* (53–88%) *in vitro*. As a result of inoculating the plant with endophytic fungi, a high protective effect against blight fungus was observed and the percentage of leaf damage in boxwood plants inoculated with endophytic fungi was significantly lower than the plants that were inoculated only by the pathogen. The results of this research pave the way for a more effective use of *B. bassiana* in the integrated and simultaneous management of the leaf–eating pest of Caspian boxwood and the blight fungus of these plants, as well as increasing the growth of the host plant.

Keywords: Insect pathogenic fungi, biological control, beneficial microorganisms, antifungal activity, *Cylindrocladium buxicola*, *Cydalima perspectalis*